

UNIVERSIDAD METROPOLITANA  
ESCUELA DE ASUNTOS AMBIENTALES  
SAN JUAN, PUERTO

**TOXICIDAD Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE SALES BENZAZOLO[3,2-a]  
QUINOLINIOS FLUORESCENTES EN LINFOBLASTOS NORMALES (TK6) Y  
CÉLULAS DE LINFOMA (TOLEDO)**

Requisito parcial para obtener el Grado de Maestría en Ciencias en Gerencia Ambiental  
en Evaluación y Manejo de Riesgo Ambiental

Por  
Jessica Soto Hernández

## **DEDICATORIA**

*A todos los que creyeron en mí y con sus palabras de motivación fortalecieron mis deseos de perseverancia. En honor a mis familiares que han luchado contra la batalla del cáncer*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi directora de tesis, la doctora Beatriz Zayas por haberme ofrecido la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y creer en mí. Deseo agradecer a los miembros de mi comité de tesis el Dr. Osvaldo Cox y el Dr. José A. Cardé. En especial debo agradecer la valiosa ayuda de Christian Vélez que sin su apoyo no hubiese sido posible la culminación de este trabajo investigativo. Asimismo agradezco a Karoline Ríos, Víctor Correa, Edmazuleyska Ruiz, Giselle Barreto y Gabriela Bergollo por su aportación durante el proceso de esta investigación. También quiero darle las gracias a la Fundación Jaime Pierluisi, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta maestría, gracias a su aportación económica. Gracias al programa de becas NIH/NCRR INBRE (1P20RR-16470-01) por financiar esta investigación.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE APÉNDICES.....	iii
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	1
Trasfondo del problema de estudio.....	1
Problema del estudio .....	5
Justificación del estudio .....	6
Meta y objetivos .....	7
Objetivos específicos.....	7
CAPÍTULO II REVISIÓN LITERARIA .....	9
Marco teórico .....	9
Tipos de cáncer.....	10
Sistema Inmune .....	11
Agentes etiológicos del cáncer .....	12
Tratamientos .....	16
Las sales benzaolo[3,2]quinolinios (BQS) .....	19
Mecanismos .....	23
Avalúo de Riesgo .....	34
Marco Legal .....	36
CAPÍTULO III METODOLOGÍA .....	38
Tipo y lugar de estudio.....	38
Materiales y Métodos.....	39
Líneas celulares bajo estudio .....	39
Desinfección.....	39
Preparación de soluciones estándar de los BQS.....	40
Preparación de soluciones estándar de los controles positivos .....	40
Procedimientos experimentales .....	41
CAPÍTULO IV RESULTADOS .....	45
Discusión .....	53
CAPÍTULO V CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	66
Literatura Citada .....	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentración inhibitoria (IC50) Tk6 y Toledo .....	81
Figura 2. Gráfica de potencial de membrana mitocondrial en Tk6 .....	82
Figura 3. Gráfica de potencial de membrana mitocondrial en Toledo .....	83
Figura 4. Gráfica de fragmentación de ADN en células TK6.....	84
Figura 5. Gráfica de fragmentación de ADN en células Toledo .....	85
Figura 6. Gráfica de las diferentes fases del ciclo celular en TK6 .....	86
Figura 7. Gráfica de células Tk6 tratadas con BQS en la fase SubG0 del ciclo celular .....	87
Figura 8. Gráfica de células Tk6 tratadas con BQS en la fase G0/G1 del ciclo celular .....	88
Figura 9. Gráfica de células Tk6 tratadas con BQS en la fase S del ciclo celular.....	89
Figura 10. Gráfica de células Tk6 tratadas con BQS en la fase G2/M del ciclo celular .....	90
Figura 11. Gráfica de las diferentes fases del ciclo celular en Toledo .....	91
Figura 12. Gráfica de células Toledo tratadas con BQS en la fase SubG0 del ciclo celular.....	92
Figura 13. Gráfica de células Toledo tratadas con BQS en la fase G0/G1 del ciclo celular.....	93
Figura 14. Gráfica de células Toledo tratadas con BQS en la fase S del ciclo celular .....	94
Figura 15. Gráfica de células Toledo tratadas con BQS en la fase G2/M del ciclo celular.....	95
Figura 16. Gráfica de activación de Caspasa 3 & 7 en Toledo .....	96
Figura 17. Gráfica de ROS en células de Toledo.....	97

## LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Protocolo de preparación de solución de los compuestos BQS .....	100
Apéndice 2. Protocolo de exposición de células a las drogas .....	101
Apéndice 3. Protocolo de Viabilidad Celular por Exclusión Trypan Blue .....	102
Apéndice 4. Protocolo para la Permeabilización de la Membrana Mitocondrial .....	103
Apéndice 5. Protocolo de fragmentación del ADN y ciclo celular .....	104
Apéndice 6. Protocolo para la Activación de Caspasas 3 & 7 .....	107
Apéndice 7. Tablas de toxicidad 60 Cell Line Screening .....	109
Apéndice 8. Informe del Instituto de Cáncer: “60 Cell Line Screening” .....	110

## RESUMEN

Este estudio evaluó los efectos tóxicos de las sales benzazolo[3,2]quinolinios (BQS) en linfoblastos normales TK6 y en células de linfoma Toledo. Los nuevos compuestos (ABQ48, ABQ95, NBQ95 y NBQ48) son catiónicos heterocíclicos, sintetizados en nuestra institución, que han demostrado causar apoptosis. En este estudio reportamos actividades biológicas en cuatro miembros seleccionados de la familia BQS probados en células de linfoblastos tumorales y normales. La bioactividad estudiada incluye: inhibición de viabilidad (IC50), daño a la membrana mitocondrial, fragmentación del ADN y alteración en el ciclo celular. Las células se mantienen en el medio de crecimiento RPMI 1640 a 37° C con CO2 al 5%. Las células en cultivo fueron expuestas a BQS durante 48 horas para determinar la concentración que inhibe el 50% de viabilidad (IC50). El IC50 lo evaluamos para medir las diferentes actividades biológicas. Determinamos la inhibición de viabilidad por exclusión de azul tripán, para estudiar los cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial utilizamos el ensayo JC-1 (NucleoCounter 3000) basado en imágenes de fluorescencia y para medir la fragmentación del ADN y cambios en el ciclo celular utilizamos un ensayo de DAPI. Los resultados indicaron que los BQS presentan toxicidades diferentes. El IC50 observado para ABQ95 fue 16µM en Toledo y 270µM en TK6. El IC50 en NBQ95 fue de 14µM en Toledo y 33µM en TK6. ABQ48 obtuvo un IC50 de 50µM en Toledo y 8.6µM TK6. La concentración de IC50 para NBQ48 fue 100µM en ambas líneas celulares. Resultados de potencial de membrana mitocondrial indican que BQS causa una disminución en el potencial mitocondrial en las células de Toledo. En TK6 el único compuesto que no afecta el potencial mitocondrial fue NBQ95. La fragmentación del ADN se observó solo sólo para ABQ48, NBQ48, y NBQ95 en células de Toledo; mientras que NBQ48 y NBQ95 fueron capaces de fragmentar el ADN en TK6. Los compuestos BQS causaron arresto en diferentes fases del ciclo celular. En conclusión los BQS tienen la capacidad de inducir muerte celular por la ruta mitocondrial o mediada por el ADN.

## ABSTRACT

This study evaluates the toxic effects of benzazolo[3,2] quolinium salts (BQS) on normal Tk6 lymphoblast and Toledo lymphoma cells. The novel experimental drugs (ABQ48, ABQ95, NBQ95 and NBQ48) are cationic heterocyclic compounds generated at our institution that have demonstrated apoptosis induction. We here report biological activities with four selected members of the BQS family in tumor and normal lymphoblast cells. The measured bioactivity included: viability inhibition (IC<sub>50</sub>), mitochondrial membrane damage, DNA fragmentation and cell cycle. Cells were maintained in RPMI1640 media at 37°C with 5%CO<sub>2</sub>. Cells in culture were exposed to BQS for 48 hours to determine the concentration that inhibits 50% viability (IC<sub>50</sub>). The IC<sub>50</sub> was then applied to measure the different bioactivities. Viability inhibition was determined by trypan blue exclusion, changes to the mitochondrial membrane permeability applying the NucleoCounter 3000 JC-1 imaging assay and for DNA fragmentation & Cell Cycle a DAPI assay was used. Results indicated that BQS presented various toxicities. Observed IC<sub>50</sub> of ABQ95 exposures were 16µM in Toledo and 270µM in TK6 cells. IC<sub>50</sub> concentrations for NBQ95 were 14µM in Toledo and 33µM in TK6 cells. The observed IC<sub>50</sub> for ABQ48 were 50µM in Toledo and 8.6µM in TK6 cells. IC<sub>50</sub> concentrations for NBQ48 were 100µM in both cell lines. Mitochondrial membrane results indicate that BQS caused decreased in the mitochondrial membrane potential in Toledo cells. In Tk6 cells the only compound that did not affect the mitochondrial potential was NBQ95. DNA fragmentation was shown only by ABQ48, NBQ48, and NBQ95 in Toledo cells. NBQ48 and NBQ95 were able to caused DNA fragmentation in TK6. BQS caused cell cycle arrest in different stages in both cell lines. We concluded that BQS have the capacity to induce cell death by the mitochondrial pathway or DNA mediated.



## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

#### **Trasfondo del problema de estudio**

El cáncer es una enfermedad en el cual ocurre un crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo (NIH, 2012). Constantemente en el cuerpo ocurre un crecimiento controlado de células, las cuales llevan a cabo división y remplazo por células nuevas cuando es necesario, de no ser así las células mueren. En ocasiones la división normal de células se ve afectada por diferentes causas incluyendo alteraciones en su material genético. Estas alteraciones pueden causar el inicio de un crecimiento celular excesivo lo que lleve a la acumulación de células y generar un tumor (Weinberg, 2007).

Un *tumor* es una masa de tejido que se forma por la acumulación de células, también se conoce como neoplasma (NCI, 2012). Los tumores se categorizan de dos formas benignos o malignos. Los tumores benignos se caracterizan porque por lo general pueden ser removidos ya que son masas compuestas de células que no se dispersan a otros tejidos. En contraste, los tumores malignos están compuestos de células anormales que pueden invadir tejidos a su alrededor y propagarse a otros órganos del cuerpo afectando los mismos. Las células malignas o cancerosas de estos

pueden desprenderse y entrar al torrente sanguíneo o al sistema linfático. El proceso de propagación de células malignas por el torrente sanguíneo o el sistema linfático lleva a la formación de nuevos tumores en diferentes partes del cuerpo, este proceso se conoce como metástasis (NCI, 2012; Kleinsmith, 2006).

Existe un sinnúmero de factores de riesgo que pueden aumentar la probabilidad de desarrollar cáncer. Estos factores pueden ser externos e internos entre ellos se encuentran productos químicos, toxinas ambientales, radiación, exposición excesiva a la luz solar, consumo excesivo del alcohol, obesidad, inactividad física, mala nutrición, virus, bacterias, factores de estrés, condiciones inmunes y problemas genéticos (CDC, 2010; NHI, 2012). Ciertos tipos de cáncer están relacionados con agentes infecciosos como el virus de la hepatitis B y C (HepB y HepC), virus de papiloma humano (VPH), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), *Helicobacter pylori* (*H.pylori*), entre otros (NCI, 2012, Zabaleta, 2012). La infección con ciertos virus puede aumentar el riesgo de padecer de algunos tipos de cáncer, pero el cáncer en lo particular no se transmite de persona a persona por los virus.

El factor genético es un elemento sumamente importante en la etiología del cáncer. Se conoce que ciertas alteraciones o mutaciones en los genes encargados de controlar el crecimiento y la muerte normal de una célula pueden causar cáncer. Una mutación es un cambio en la secuencia de ADN de una célula. Este cambio en la secuencia puede ser causado por errores en el proceso de replicación de la célula o factores ambientales que puedan dañar el ADN (NCI, 2012; Weinberg, 2007). Muchas mutaciones son dañinas porque alteran el crecimiento, desarrollo o funcionamiento del cuerpo. Otras pueden tener algún beneficio o no tener ningún efecto. Dependiendo del

lugar donde ocurra la mutación pueden ser heredadas tales como en las que ocurre en células que producen los óvulos y espermatozoides, que si presentan en otro tipo de células no se heredan (NCI, 2012; Starr & Taggart, 2004).

Heredar una alteración genética o mutación no significa que siempre la persona se verá afectada por cáncer, significa que aumenta la posibilidad de padecer del mismo en comparación con otra persona que no ha heredado alguna alteración en sus genes. Sin embargo, algunos estilos de vida y factores ambientales como el uso del tabaco, dieta, exposición de rayos ultravioletas (UV), exposición a sustancias tóxicas en el ambiente o carcinógenos (sustancias que pueden causar cáncer, tales como asbesto, benceno, cadmio, níquel y cloruro de vinilo) pueden influenciar en que genes normales se transformen en genes alterados que pueden llevar a la formación de células cancerosas (NCI, 2010; Kleinsmith, 2006; Golubnitschaja et al., 2013). A pesar de que se conocen algunos tipos de factores que pueden aumentar o disminuir la posibilidad de padecer de cáncer, la comunidad científica continúa en búsqueda de causas que todavía se desconocen.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Los tipos de cáncer que causan más muertes cada año son los cánceres de pulmón, estomago, hígado, colon y mama (OMS, 2013). Los tres tipos de cáncer más común en hombre estadounidense son el cáncer de próstata, pulmonar y colon, mientras que en mujeres estadounidense son el cáncer de mama, colon y pulmonar. Los tipos de cáncer varían entre países. Por ejemplo, el cáncer del estómago es común en Japón pero en Estados Unidos no es tan frecuente. Diferentes factores pueden influenciar esas diferencias (NIH, 2012). Otros tipos de cáncer que se encuentran son el linfoma de

Hodgkin, linfoma de no-Hodgkin, riñón, cerebral, cervical, leucemia, ovárico, piel, testicular, uterino y cáncer de tiroides (NCI, 2012; Jung et al., 2013). Deficiencias en el sistema inmunológico aumentan el riesgo de padecer de linfomas. El linfoma de no-Hodgkin (NHL) representa acerca del 4% de todos los cánceres más comunes en Estados Unidos (ACS, 2012).

Existen diferentes tratamientos para el cáncer y estos dependen de la etapa de la enfermedad y el tipo. Dentro de los tratamientos de cáncer se encuentran la cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia biológica y terapia inmunológica. Los tratamientos pueden actuar de diferentes formas, local o sistémica, dependiendo del área que se vaya a tratar, puede ser local o sistémica. Si es un área específica donde se encuentra el tumor este tipo de tratamiento se conoce como tratamiento local y consiste en la remoción o destrucción del tejido canceroso en una sola parte del cuerpo. Por otro lado, la terapia sistémica consiste de enviar sustancias o medicamentos a diferentes partes del cuerpo por medio del torrente sanguíneo con el propósito de destruir las células cancerosas que se encuentren en el cuerpo (NCI, 2012; Lagha et al., 2012). Han surgido nuevos tratamientos de cáncer dirigidos al sistema inmunológico que combaten ciertas proteínas necesarias para la proliferación y propagación de células cancerosas (Kleinsmith, 2006; Lagha et al., 2012).

El surgimiento de nuevos tratamientos ha aumentado con el pasar de los años por la alta incidencia de cáncer. La síntesis de drogas dirigidas a eliminar células cancerosas es un área de gran interés en la comunidad científica (Cox et al., 1982; Stiborova, Rupertova, Schmeister & Frei, 2006). Los compuestos presentados en este estudio son las sales de benzazolo[3,2-a]quinolinios (BQS). Los BQS son análogos de

la familia de los alcaloides y se sintetizaron con el propósito de estudiar su posible actividad antitumoral (Cox et al., 1982).

### **Problema del estudio**

Debido a la alta incidencia de cáncer existe la necesidad de tratamientos anti cancerosos y nuevas técnicas para el diagnóstico temprano. El estudio sobre el cáncer es un gran reto para la comunidad científica, ya que una vez se logran avances en ciertos parámetros que podrían ayudar a encontrar una solución, surgen nuevos factores que alejan esta posibilidad. El cáncer es una enfermedad multifactorial por lo que combatir el cáncer con un método solamente no sería posible. Esto ha dado pie a la búsqueda de soluciones con múltiples enfoques. Un factor importante que contribuye a la complejidad del cáncer es que el mismo cambia o evoluciona, puede variar de formas en una misma persona, crecer de forma descontrolada en diferentes partes del cuerpo y desarrollar maneras diferentes de resistencia a drogas entre otros factores.

Uno de los problemas que enfrentan diferentes tratamientos es la selectividad, o sea el poder atacar las células de cáncer sin provocar daño a las células normales. El reto que conlleva generar un tratamiento abre la puerta al estudio específico de mecanismos moleculares, determinación de grado de toxicidad y estudios genéticos de diferentes drogas dirigidas a combatir el cáncer. El estudio sobre el uso de una sustancia como técnica terapéutica o de diagnóstico se puede llevar a cabo por medio de mecanismos moleculares y el grado de toxicidad que pueda generar la misma. La identificación del mecanismo y determinación de la dosis óptima a la cual una droga

lleva cabo su acción puede contribuir a predecir sus posibles efectos y generar distintas aplicaciones terapéuticas.

### **Justificación del estudio**

El enfoque principal de este estudio fue evaluar si las nuevas drogas identificadas como BQS tienen potencial anticancerígeno en células de linfoma. Estos compuestos poseen ciertas similitudes estructurales, por ejemplo (la carga positiva, anillos fundidos y estructura planar) con compuestos anticancerígeno conocidos como elipticina y fangoronina. La estructura planar de los BQS hace posible su intercalación en el ADN, a su vez su carga positiva permanente le permite interactuar con diferentes moléculas biológicas. El estudio utiliza BQs sustituidos con un grupo nitro (NBQs) o un grupo amino (ABQs). Existen diferencias químicas entre los compuestos ABQ y NBQ. Debido a su naturaleza estos poseen estructuras electrónicas distintas, el grupo nitro es un electro atrayente fuerte mediante resonancia y efectos inductivos, mientras que el compuesto amino es un electro donante fuerte. Por su naturaleza las moléculas sustituidas por estos grupos manifiestan tener diferentes interacciones de puentes de hidrógenos y electrostáticas con otras especies químicas en la célula. El grupo nitro solo puede actuar como receptor, mientras que el grupo amino puede actuar tanto como donante como receptor en la formación de enlaces de hidrogeno. La comparación de los posibles efectos citotóxicos y daños celulares que pueden provocar los BQS entre linfoblastos normales versus los de tumor, contribuye al surgimiento de nuevas aplicaciones con fines terapéuticos. La información recopilada también permitió evaluar otros posibles usos de estas nuevas drogas, como por ejemplo, que se pueda

utilizar los ABQs de forma diagnóstica como marcadores biológicos con fines de investigación debido a su capacidad de fluorescencia.

### **Meta y objetivos**

La meta final de esta investigación es presentar evidencia sobre los efectos citotóxicos y los posibles mecanismos de acción de los nuevos compuestos BQS en linfoblastos normales versus células de linfoma.

#### Objetivos específicos

1. Determinar la citotoxicidad y establecer la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de los diferentes BQS en linfoblastos normales (TK6) versus linfomas (Toledo) para establecer cuan específico son a células normales o de tumor.
2. Evaluar y comparar el cambio en el potencial mitocondrial en linfoblastos normales (TK6) versus linfoma (Toledo) expuestos a los BQS como indicador de la capacidad de inducir apoptosis.
3. Determinar la habilidad de los BQS para fragmentar el ADN como parte del mecanismo de acción.
4. Identificar la capacidad de causar arresto en el ciclo celular y determinar en qué fase del ciclo se acumulan las células luego de la exposición con los BQS.
5. Evaluar la activación de caspasas durante el proceso de apoptosis como parte del mecanismo de acción. Las caspasas son unas enzimas que están inactivas y requieren de una proteólisis limitada en sus residuos aspárticos para su

activación. Son los efectores principales de apoptosis activando una cadena de señales para poder llevar a cabo muerte celular (Logue & Martin, 2008



## CAPÍTULO II

### REVISIÓN LITERARIA

#### **Marco teórico**

Cáncer es una enfermedad en la cual células anormales se dividen descontroladamente y son capaces de invadir tejidos a su alrededor. Las células cancerosas pueden propagarse a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y sanguíneo (NCI, 2012). Existen diferentes tipos de cáncer y se nombran según origen del tejido. Algunas de las categorías para agruparlos son: carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, mieloma y cáncer del sistema nervioso central. El carcinoma comienza en la piel o en otros tejidos que cubren órganos internos. Sarcoma se origina en el hueso, cartílago, grasa, músculos, vasos sanguíneos u otros tejidos conectivos. Leucemia es un cáncer que comienza en la médula ósea y da origen a muchas células anormales. El linfoma y mieloma comienzan en células del sistema inmune. Cáncer en el sistema nervioso central tiene origen en el cerebro y el cordón espinal (NCI, 2012).

El cáncer se origina en las células que pierden el control de su división celular, por tal razón es necesario el crecimiento y la división controlada de células para mantener el cuerpo saludable. Células dañadas o viejas mueren y son remplazadas por nuevas constantemente. Sin embargo, este proceso ordenado se ve afectado por

diferentes condiciones. Algunos factores que afectan el crecimiento celular son cambios en el material genético, el cual puede estar dañado, causando mutaciones y a su vez causando crecimiento y división de células anormal. La acumulación de células a causa de un crecimiento descontrolado lleva a la formación de una masa de tejido llamado tumor. Existen dos tipos de tumores los malignos y benignos. El tumor benigno puede ser removido y sus células no pueden propagarse a otras partes del cuerpo. Un tumor maligno puede invadir tejidos cercanos y propagarse a otras partes del cuerpo (NIH, 2010; Weinberg, 2007).

#### Tipos de cáncer

Los tipos de cáncer más comunes son de seno, colon, pulmón, riñón, bazo, vejiga, endometrial, pancreático, tiroideo, melanoma, leucemia y linfoma. El tipo de cáncer más común, con 240,000 casos nuevos en los Estados Unidos para el 2012, fue el de próstata. El cáncer con menor incidencia, con 43,920 casos, es el pancreático (ACS, 2010). En el 2012 el estimado de casos nuevos para varios tipos de cáncer en los Estados Unidos fue: para el cáncer de vejiga 73,510; seno 226,870; colon 143,460, endometrial 47,130; riñón 59,588; leucemia 47,150; pulmón 226,160; melanoma 76,250; linfoma non-Hodgkin 70,130 y tiroideo 56,460 (Cancer Facts, 2012; Abdullah & Chow, 2013).

El linfoma es un tipo de cáncer sanguíneo bastante común. El linfoma ocurre cuando linfocitos crecen descontroladamente y se propagan por otras partes del cuerpo, llevando a su acumulación y a la formación de tumores. Existen dos tipos de linfoma el Hodgkin (HL) y non-Hodgkin (NHL). El linfoma Hodgkin no es muy común y aproximadamente 8,500 casos nuevos son proyectados cada año (LRF, 2011). Se

caracteriza por la presencia de células de Reed-Sternberg y usualmente comienza en los nódulos linfáticos. Factores de riesgos que pueden causar linfoma Hodgkin son: tener un sistema inmune comprometido, infección con HIV, Epstein- Barr virus e historial familiar con linfoma. El linfoma non-Hodgkin es el cáncer más común del sistema linfático. Cerca de 65,000 casos de NHL son diagnosticados anualmente en los Estados Unidos (LRF, 2011). El linfoma non-Hodgkin comienza cuando un linfocito, usualmente célula B, se vuelve anormal creciendo descontroladamente (NCI, 2012).

## Sistema Inmune

El sistema inmune es una red formada por células, tejidos y órganos los que trabajan en conjunto para defender el cuerpo de invasores extraños, como los microorganismos como las bacterias, parásitos y hongos pueden causar infecciones. Los virus también tienen esta capacidad. El propósito del sistema inmune es reconocer y recordar agentes invasivos, destruirlos y removerlos del cuerpo. Este sistema lleva a cabo una comunicación dinámica, en la cual millones de células se organizan y se comunican entre sí. Una vez las células inmunes reciben una señal, se activan y comienzan a producir químicos; estas sustancias les permiten regular su propio crecimiento, comportamiento y reclutar a otras células. Las células T y B están envueltas en el sistema inmunológico (NIAID, 2011). Una célula B, también conocida como linfocito B, es un tipo de glóbulo blanco que elabora anticuerpos para combatir infecciones. Las células T son conocidas como linfocito T y timocito, y ayudan a controlar respuestas inmunitarias, ya que pueden atacar células extrañas, cancerosas o infectadas por virus (Schau & McBride, 2012). La médula ósea es un tejido suave localizado en el centro de los huesos y es la fuente principal de las células sanguíneas, incluyendo las inmunes. El timo es un órgano localizado en el esternón y los linfocitos T

maduran en él. El bazo, encontrado en el hipocondrio izquierdo en el abdomen, contiene lugares donde las células inmunes se reúnen y se enfrentan a los antígenos (Sun & Juskevicius, 2012). Las células cancerosas al transformarse, sufren cambios en sus antígenos superficiales y desprenden fragmentos de proteínas de sus superficies al interior del sistema circulatorio. Los antígenos desprendidos incitan la acción de células T, citotóxicas y macrófagos. Las células del sistema inmunológico están constantemente vigilando el cuerpo y eliminando células malignas; una vez este sistema se afecta lleva al desarrollo de tumores (NCI, 2012).

#### Agentes etiológicos del cáncer

Las causas del cáncer son variadas y complejas. Puede haber factores son de origen químico, ambiental, genético, inmunológico o viral. La exposición constante a sustancias químicas, pesticidas, metales y otros agentes carcinógenos puede aumentar el riesgo de cáncer. Algunos carcinógenos conocidos son asbestos, níquel, cadmio, uranio, radón, cloruro de vinilo, bencidina y benceno (Korbecki, Baranowska, Guotwska & Chlubek, 2012; ATSDR, 2012). Asbesto es un mineral silicato que contiene hierro, magnesio y calcio. Las fibras de asbestos son resistentes al calor, químicos y no conducen electricidad; por tal razón, se utiliza en varias industrias para aislamiento, plástico, cemento, techado, absorción de sonido, entre otros. La exposición a asbesto es por medio de la respiración, donde las fibras son atrapadas en los pulmones alojándose allí por mucho tiempo causando una inflamación (Ostrof et al., 2012). El mesotelioma es una de las formas de cáncer más común por exposición a asbesto (ATSDR, 2012). Dentro de las actividades carcinogénicas del asbesto se encuentra daño al ADN causado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido

a las fibras de hierro del asbesto y al enredo en los cromosomas (Matsuzaki et al., 2012).

Ciertos carcinógenos actúan por mecanismo genotóxico, llevando su efecto a través del daño al ADN. Se piensa que benzo[a]pyreno (BaP), una clase de hidrocarburo poli cíclico aromático (PAHs), causa cáncer a través de enlaces covalentes de su metabolito reactivo al ADN formando aductos a éste (Hamouchene, Arlt, Giddings & Phillips, 2011). Los PAHs causan un rango de perturbaciones en el ciclo celular, por ejemplo se afecta la replicación del ADN y se inhibe la proliferación celular (Hamouchene et al., 2011). Cierta exposición a pesticidas tiene un potencial de riesgo a linfoma non-Hodgkin. Dichlorodiphenyltrichlorethane (DDT) y organoclorados son compuestos que se encuentran en los pesticidas y son carcinogénicos en animales; la producción y la liberación al ambiente de estos compuestos resultan en bioacumulación. Los organoclorados están presentes como una mezcla en compuestos madres y metabolitos en el ambiente y se caracterizan por su alta solubilidad en lípidos y larga vida en tejidos humanos (Vaclavik et al., 2012). Acrilamida es un producto químico que se utiliza como bloque para hacer poliacrilamida. Se utiliza para procesos industriales como la producción de papel, tintes, plásticos y tratamientos para agua potable. Se encuentra en productos como empaques de comida y en ciertos adhesivos. Trazas de acrilamida permanecen en los productos, causando efectos negativos a la salud. Se ha encontrado, en Estados Unidos y Europa, acrilamida en alimentos que fueron calentados a temperatura por encima de los 120° C. La ingestión de acrilamida puede llevar a riesgo de desarrollar cáncer en la cavidad oral, faringe, esófago, laringe, riñón, seno y ovario (NCI, 2012). Cloruro de vinilo (VC) es utilizado para la producción de policloruro de vinilo (PVC), que es uno de los plásticos de manufactura más común que

se utiliza en el mundo para productos de empaque, partes de automóvil, materiales de construcción, muebles y tubos. Es asociado con cáncer de hígado y carcinoma hepatocelular (HCC). La exposición a VC ocurre mayormente en industrias petroquímicas y de plásticos. La población en general está expuesta a los PVC por agua y aire. VC es un gas, por lo cual su mayor exposición es mediante el tracto respiratorio. La absorción es rápida en humanos y su mecanismo subsecuente ocurre en el hígado. La primera fase del metabolismo es vía el citocromo P-450 que genera un intermediario reactivo óxido cloroetileno (CEO) y cloroacetilaldehído (CAA), los cuales son metabolizados en la fase II por reacciones de las transferasas de glutatión (GSTs) y dehidrogenasa aldehído 2 (ALDH2) para un producto final y por último la excreción. CEO y CAA pueden interaccionar con macromoléculas como el ADN y producir efectos mutagénicos y aductos al ADN. Los VC pueden inducir mutaciones en el gen p53 llevando a cabo cambios conformacionales en la proteína (Brandt-Rauf et al., 2012). Formaldehído es un compuesto químico incoloro, inflamable y con un olor fuerte que se utiliza en materiales de construcción. Es utilizado para productos de madera, fibra, adhesivos, telas, desinfectantes, fungicidas y germicidas. La exposición a formaldehído puede estar asociada con cáncer nasofaríngeo y leucemia (NCI, 2012).

Otra causa de cáncer es el uso excesivo de tabaco ya que los carcinógenos están presentes en el humo del cigarrillo. El humo del tabaco contiene al menos 60 carcinógenos y 6 sustancias tóxicas para el desarrollo. Es causante del 80% del cáncer en pulmón, pero también se asocia con cáncer en la boca, faringe, laringe, esófago, páncreas, riñón y vejiga (NCI, 2012). Dentro de las sustancias carcinogénicas se encuentra la nitrosamina 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) y los hidrocarburos poli cíclicos aromáticos como benzopireno. La NNK puede inducir

mutaciones en el gen K-ras. Los hidrocarburos pueden inducir mutaciones en el gen p53 implicado en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN y apoptosis (Gómez, Carpeño & González, 2007).

La radiación como en radiografías, sustancias radioactivas y rayos ultravioleta pueden producir daño al ADN de las células y provocar cáncer. La radiación es la emisión de energía de cualquier fuente. Hay un espectro de radiación de muy alta energía y baja energía. Las formas principales de radiación son rayos gamma, rayos X, luz visible, rayos ultravioleta, rayos infrarrojos, microondas y ondas de radiofrecuencia. La energía ionizante o no ionizante de la radiación distingue el tipo de riesgo a la salud. La radiación de alta frecuencia tiene la energía suficiente para eliminar un átomo o molécula, lo que puede dañar el ADN en las células. Los tipos de radiación ionizante son rayos Gamma, rayos X y rayos UV. La leucemia es un tipo de cáncer inducido por la radiación. La glándula tiroides y la médula ósea son sensibles a la radiación. Algunos tipos de cáncer relacionados a la exposición a la radiación son cáncer de pulmón, piel, tiroides, mieloma, seno y estómago (ACS, 2010).

El cáncer puede surgir debido al funcionamiento anormal de los genes. Los genes están compuestos por ADN y son los que contienen la información para construir las proteínas para el mantenimiento celular. Las mutaciones génicas pueden pasar de padres a hijos por el óvulo o espermatozoide. Las mutaciones adquiridas (somáticas) ocurren en una célula en algún momento durante el ciclo celular y luego son heredadas por las células hijas. Los genes pueden tener distintos roles en el cáncer entre ellos están los oncogenes y los genes supresores de tumores. Los oncogenes son formas mutadas de ciertos genes normales que controlan el tipo de célula y la frecuencia de división celular.

Al ocurrir una mutación en este tipo de gen, pasa a ser un oncogén y comienza el crecimiento descontrolado. Los genes supresores son genes que desaceleran la división celular, reparan errores en el ADN o indican a la célula cuándo llevar a cabo apoptosis (ACS, 2010). Los oncogenes resultan de las mutaciones que ocurren en un proto-oncogen. Dentro de los mecanismos asociados con la activación de los oncogenes se incluyen mutaciones de punto, supresiones o inserción y translocaciones genéticas (Chial, 2008).

## Tratamientos

Los tratamientos de cáncer dependen principalmente del tipo de cáncer y la etapa de la enfermedad. El tratamiento puede trabajar en un área específica (terapia local) o través del cuerpo (terapia sistémica). La terapia local remueve o destruye el cáncer en un lugar del cuerpo; por ejemplo la radioterapia es un tipo de terapia local. Terapia sistémica envía drogas o sustancias a través del torrente sanguíneo para destruir las células cancerosas en el cuerpo. La quimioterapia, terapia hormonal y biológica son terapias sistémicas (Lagha et al., 2012).

En la cirugía se remueve el tumor y algún tejido alrededor para prevenir que el tumor se regenere. En muchos casos se hace remoción de los nódulos linfáticos cercanos. Radioterapia utiliza rayos de alta energía para matar las células cancerosas. Existen varias combinaciones de tratamiento de radiación: la externa, donde la radiación proviene de una maquina fuera del cuerpo, la interna, que proviene de un material radioactivo que se coloca en agujas o tubos plásticos cerca del tejido y la sistémica, donde la radiación proviene de un líquido o cápsula que contiene material radioactivo y se transporta a través del cuerpo (NCI, 2012). El principal mecanismo de radiación es



daño oxidativo a las células de cáncer y se presume que ocurren cambios en los niveles de marcadores de estrés oxidativo, regulación de alza de citoquinas inflamatorias, señales adicionales y amplificación de las rutas de inflamación (Kim et al.,2012).

La quimioterapia utiliza drogas para matar células cancerosas y usualmente es dada en ciclos. Los efectos secundarios dependen del tipo de droga y la dosis se que utiliza. Uno de sus efectos no deseados, es dañar otras células además de las cancerosas, como las sanguíneas, causando que el cuerpo se debilite y sea más propenso a infecciones. También causa pérdida de cabello, fertilidad y que se afecte el tracto digestivo (NCI, 2012). Drogas utilizadas en la quimioterapia buscan dañar el ADN de células cancerosa, inhibir la síntesis de nuevas hebras de ADN para así detener la replicación celular y parar la mitosis, deteniendo la división celular. Los agentes quimioterapéuticos se dividen en tres categorías basados en su mecanismo de acción. Una de éstas es deteniendo la síntesis de moléculas que sirven como bloques de construcción de ADN; esos bloques son ácido fólico, bases heterocíclicas y nucleótidos. Al detenerlos, el ADN y RNA no pueden ser sintetizados. Algunas de estas drogas son metotrexato, fluorouracilo, hydroxiurea y mercaptopurina. Otro mecanismo es dañando directamente el ADN en el núcleo de la célula interrumpiendo la replicación del ADN o causando la manufactura de ADN o RNA sin sentido, es decir, no codifican para nada útil. Drogas en esta clase son cisplatino, daunorubicina, doxorubicina y etopósido. La última consiste en efectos en la síntesis o rompimiento del huso mitótico. El huso mitótico es importante porque ayuda a la división de copias nuevas de ADN. Las drogas interrumpen la formación del huso y la división celular. Ejemplos de drogas en esta clase son vinblastina, vincristina y paclitaxel (He et al., 2012).

Cisplatín (cisPt) se ha utilizado en quimioterapia para diferentes tipos de cáncer por sus efectos de apoptosis. Se enlaza al ADN generando aductos que provocan la distorsión de la transcripción de la doble hélice y procesos de replicación. Induce muerte celular por la activación de receptores de apoptosis mediados por mecanismos de señalización como la ruta mitocondrial. Muerte inducida por la mitocondria es considerada un objetivo importante, ya que el cisPt hidrolizado genera un metabolito de carga positiva que se acumula dentro de la mitocondria cargada negativamente, resultando en apoptosis (Santin et al., 2011).

Terapia hormonal evita que las células de cáncer adquieran o utilicen hormonas necesarias para su crecimiento. Se usan drogas o cirugías para llevar a cabo este tipo de terapia. Las drogas detienen la producción de ciertas hormonas y previenen su funcionamiento. En la cirugía se remueven órganos que producen hormonas como los ovarios o testículos (NCI, 2012). Antes de comenzar la terapia hormonal se debe llevar a cabo una prueba de receptores hormonales. La prueba mide la cantidad de ciertas proteínas, es decir, receptores hormonales en los tejidos cancerosos. Hormonas como estrógeno y progesterona se pueden enlazar a estas proteínas. Si la prueba resulta positiva, indica que la hormona está ayudando al crecimiento de células cancerosas. Drogas utilizadas en la terapia hormonal son tamoxifeno, anastrozol, letrozol y fulvestrant (Lee et al., 2012).

La terapia biológica es sistemática, ayuda al sistema inmune a combatir el cáncer. La terapia biológica se da por medio intravenoso e influye directamente o indirectamente al sistema inmune. Causa que las células de cáncer sean reconocibles para el sistema, cambia la forma en que las células crecen y detiene los procesos que

cambian células normales a cancerosas, ayuda a la reparación o reemplazo de células dañadas y previene la propagación de células cancerosas al cuerpo (Lee et al., 2012). Trasplante de células madre es la infusión de células madres saludables al cuerpo. Este tipo de terapia se lleva a cabo cuando la médula ósea para de funcionar y no produce suficientes células madres. Ayuda al cuerpo a generar mayor cantidad de células blancas, rojas o plaquetas, reducir el riesgo de infecciones, anemia y sangrado (Mayo Clinic Organization, 2012). Existen tres tipos de trasplante: el auto análogo, donde el paciente recibe sus propias células madre, el singénico, donde se reciben de un gemelo idéntico y el alogénico, en que reciben las células de un hermano o pariente (NCI, 2012).

#### Las sales benzaolo[3,2]quinolinios (BQS)

El desarrollo de nuevas drogas anti cancerígenas ha tenido mucha dedicación en el área de investigación. Las sales de benzaolo[3,2]quinolinios (BQS) son unas drogas con potencial anticanceroso que incluyen un sistema heteroaromático tetra cíclico planar, incorporando un átomo de nitrógeno cuaternario con carga positiva y un benzazol fundido. Estos sistemas incluyen especies de iones iminios y muchos de ellos también incluyen un grupo nitro o amino, ambos con capacidad de llevar a cabo reacciones redox. La carga positiva en estos compuestos facilita la interacción con organelos celulares. La activación reductiva de estas sales en agua es evidenciada por la reducción de ferricitocromo medida por BQS en presencia de xantina y xantina oxidasa y se ha propuesto que este proceso ocurre vía la formación de intermediarios radicales de BQS (Cox, Dumas, Rivera, García & Alegría, 1999; Zayas et al., 2007). Estudios sobre el modo de acción de elipticina y sus análogos sugieren que la presencia de la carga positiva de los átomos de nitrógeno ayuda a estabilizar el complejo formado

con ADN. La síntesis de estos nuevos compuestos de sales BQS incorporando la presencia de rasgos estructurales de compuestos de actividad biológica conocida, es una ruta para encontrar agentes terapéuticos nuevos y efectivos. La actividad biológica de estos compuestos fue probada en células de KB y HeLa. Los compuestos en que el átomo de azufre fue sustituido por un átomo de oxígeno en la posición siete mostraron actividad inhibitoria menor, indicando que probablemente dicha sustitución induce un cambio en el ambiente electrónico alrededor del grupo nitrógeno. Los BQS que incorporan selenio, mostraron una diferencia en la actividad inhibitoria según se cambia el átomo X (grupo sustituyente) por sulfuro u oxígeno. La interacción de ciertas drogas con ADN nativo conduce a la estabilización de la estructura de doble hélice de macromoléculas a llevar a cabo una desnaturalización termal (Cox et al., 1982). Los BQS están relacionados a la familia de los alcaloides benzo[c]fenantridinas, los cuales exhiben actividad antitumoral, como el derivado de elipticina. Estudios con estos alcaloides, realizados para estudiar el mecanismo de acción, indicaron que la inhibición de síntesis de ADN probablemente es por la interacción de los pares de base adenina y timina. Variaciones en la estructura al remplazar el grupo sustituyente de azufre por oxígeno, nitrógeno o selenio son factores críticos para producir una actividad inhibitoria. Estudios con NBQS o BQS que incorporan un grupo nitro como sustituyente, indican que estos tienen la capacidad de producir efectos citotóxicos en las líneas de células HeLa y KB. También muestran una buena actividad antitumoral en contra de leucemia P388 y los astrocitos de tumor Ehrlich *in vivo*. Además inhiben la síntesis de ácidos nucleicos en ambas células de tumor. Los NBQS han mostrado estabilizar el ADN de timo de bovino en contra la desnaturalización por calor (Báez, González, Vázquez & Waring,. 1983). El espectro de absorción ultravioleta de los NBQS esta caracterizado

por dos máximos a 273nm y 363nm. En presencia de aumentos de concentración de ADN, la fluorescencia sustancialmente se desaparece. La formación de aductos no-covalentes de los NBQ con ADN es fuertemente dependiente de la fuerza iónica. Los iones de sodio de los grupos fosfatos del ADN limitan la posibilidad de neutralización de las moléculas de NBQ. Estudios han revelado que la interacción de los NBQ con ADN rico en A:T es más fuerte que la interacción con ADN rico en G:C, sugiriendo una preferencia por los pares de base A:T (Casiano & Báez,1986). Los NBQ y fagaronina llevan a cabo su actividad citotóxica por dos mecanismos independientes, que envuelven la inhibición de síntesis de ácidos nucleicos por la interacción con las moléculas de ADN y la inhibición de síntesis de proteína por la interacción con el aparato de síntesis de proteína. Los NBQ intercalan con las moléculas de ADN para formar un complejo reversible. Mientras que la fagaronina estabiliza el ADN de timo en contra la desnaturalización por calor e induce un aumento en viscosidad del ADN nativo, sugiriendo que fagaronina interacciona con las moléculas de ADN, probablemente, por intercalación. NBQ inhiben la incorporación de timidina, uridina y leucina a las células de tumor KB y Ehrlich. NBQ y Fagaronina interfieren con el rol de ADN como temple en la transcripción y replicación (Casiano & Báez, 1986). Los radicales oxi están implicados en la acción de muchos carcinógenos. Estos surgen del producto final de procesos metabólicos usualmente vía transferencia de carga. Aparentemente, la alta reactividad de los radicales subsecuentemente ataca el ADN celular, como por igual otros constituyentes, resultando en una transformación a un estado oncogénico. Una paradoja en la oncología es que, generalmente, ciertas sustancias que pueden inducir cáncer también pueden ser antineoplásicas. Cae en la premisa que estos agentes causan cáncer por la producción excesiva de oxi radicales y que la habilidad de poder

combatir esta condición está íntimamente relacionada con esta propiedad química (Kovacic et al., 1986). NBQ muestra una preferencia de intercalación por los pares de base A-T. Los efectos citotóxicos y antitumorales de los NBQ se adjudican a la intercalación de ellos a las moléculas de ADN, como la inhibición de la actividad de topoisomerasa II (González, Llende, Báez & Ortiz, 1987). Las sales cloruro de benzazolo[3,2-a]quinolinios inhiben la actividad catalítica de la topoisomerasa II (desencadenamiento y relajación). Estos compuestos estabilizan la formación *in vivo* del complejo de escisión entre la topoisomerasa II y el ADN. Estos compuestos parecen ser más dependientes de su habilidad de inhibir la topoisomerasa II que de la afinidad de enlace del ADN o la intercalación (Vivas et al., 1997). Los nitro-BQS son compuestos lipofílicos cargados positivos y proveen una selectividad amplia a la mitocondria. También, los BQS que contienen grupo nitro, bajo condiciones anaeróbicas, se enlaza un grupo tiol de albumina de suero bovino y también reacciona con glutathione (GSH). Los nitro-BQS (NBQS) son capaces de ser reducidos por la reductasa NADH/NADH y X/XO con el consumo consecuente de oxígeno y la formación de especies reactivas de oxígeno. Bajo condiciones anaeróbicas, los NBQS reaccionan con los grupos tiol más en la presencia de HX/XO que en su ausencia y también con GSH en presencia de HX/XO pero no en su ausencia. Estos compuestos pueden ser reducidos por sistemas enzimáticos bajo condiciones anaeróbicas y su producción de especies reactivas de oxígeno hace que estos compuestos sean candidatos potenciales para drogas bioreductivas que pueden mostrar toxicidad diferencial a células hipóxicas. GSH juega un rol importante en la defensa celular en contra los electrófilos, estrés oxidativo y especies nitrosantes. El consumo de GSH por los NBQS puede resultar en muerte celular hipóxica. Estos cationes se pueden concentrar en la mitocondria relativa al

citoplasma. El glutatión en la mitocondria es la única defensa disponible que metaboliza peróxido de hidrógeno; el consumo de GSH por los NBQS en la mitocondria puede ser letal bajo condiciones de hipoxia (Alegría et al., 2004).

## Mecanismos

Apoptosis es uno de los mecanismos de muerte celular en respuesta a las terapias de cáncer. La apoptosis genera diferentes efectos en las células, estos pueden ser la permeabilización de la membrana mitocondrial, fragmentación del ADN, la liberación del citocromo c, formación del apoptosoma, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de una serie de proteínas llamadas caspasas, finalizando en muerte celular. Las alteraciones en susceptibilidad a la apoptosis no sólo contribuyen al desarrollo neoplástico sino a la resistencia de terapias anti cáncer convencionales como la radiación y los agentes citotóxicos. Uno de los mecanismos sugeridos de resistencia a drogas antineoplásticas citotóxicas es la alteración en la expresión de los miembros de la familia de proteína Bcl-2. Las Bcl-2 son una familia de proteínas que consiste de 25 miembros apoptóticos que interactúan para mantener el balance entre nuevas células formadas y las células que se están muriendo. En el momento que las Bcl-2 se sobre expresan, la muerte celular apoptótica puede ser prevenida. La apoptosis puede mejorarse y superar la resistencia farmacológica a la terapia de cáncer si la misma puede enfocarse en la familia de proteína Bcl-2. Dos rutas principales donde la apoptosis converge es la ruta intrínseca o extrínseca (Kang & Patrick, 2009).

## Rutas de Apoptosis

La ruta intrínseca, conocida como ruta mitocondrial apoptótica, es activada por un amplio rango de señales, incluyendo radiación, drogas citotóxicas, estrés celular, disminución de factores de crecimiento y envuelve la liberación de proteínas, incluyendo citocromo c, desde los espacios de la membrana mitocondrial. El citocromo c se combina con una molécula adaptadora activador de proteasa factor 1 y también con una caspasa de iniciación e inactiva la procaspasa-9 dentro de un complejo multiproteico llamado apoptosoma. Esto lleva a la activación de caspasa-9, la cual desencadena la activación de una cascada de caspasas (caspasa-3, caspasa-6, caspasa-7), resultando en cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la apoptosis por caspasas (Logue & Martin, 2008).

Durante apoptosis, la familia de proteasas aspárticas, conocidas como las caspasas, contiene a los mayores efectores en la muerte celular. Debido a su potencial de naturaleza letal estas enzimas se expresan de forma inactiva y requieren proteólisis limitada en residuos aspárticos para llevar a cabo su activación. Las caspasas son expresadas en cadena sencilla compuesta por tres dominios: un terminal nitro pro péptido, una subunidad grande y una pequeña. Se dividen en dos grupos según su rol, las iniciadoras, que son las caspasas 2, 8, 9 y 10, responsables de activar la cascada; y las efectoras, las 3,6 y 7, responsables de la demolición de la célula durante apoptosis (Logue & Martin,2008). La escisión de sólo una pequeña parte de estos sustratos se ha asociado con características ligadas a apoptosis como la condensación nuclear, ruptura en membrana plasmática y la fragmentación del ADN. La caspasa 3 mediada por el corte de ICAD (inhibidor de caspasa-activadora Dnasa), rompe la asociación de CAD



con ICAD, permitiendo que CAD inicie la fragmentación del ADN (Logue & Martin, 2008). En presencia de citocromo c y dATP, Apaf-1 recluta y activa la caspasa 9 la cual propaga la activación de la cascada de caspasas. La función de Apaf-1 es ser un sensor para las células dañadas, detectando la liberación de proteínas mitocondriales que no se encuentran en el citosol de células saludables, y existe en su forma monomérica, incapaz de interactuar con caspasa 9 si no hay presencia de citocromo c. Caspasa 9 es directamente responsable de activar la caspasa 3 y 7, la caspasa 3 propaga la cascada activando las caspasas 2 y 6. En la última etapa de la cascada, caspasa 6 cataliza la activación de caspasas 8 y 10 (Cowling & Downward, 2002).

La ruta de muerte celular extrínseca funciona independientemente de la mitocondria y es activada por receptores superficiales de muerte celular como Fas y el factor de necrosis tumoral, induciendo receptores de ligando, directamente activando la cascada de caspasa vía una caspasa de iniciación (caspasa-8) dentro de un complejo de muerte inducida. La permeabilización de la membrana externa es considerada como un punto de no regreso para la muerte celular apoptótica, desencadenando la liberación de proteínas del citoplasma que median la muerte celular, como el citocromo c. La permeabilización de la membrana interna puede ser alterada por estatus redox de proteínas mitocondriales que tienen grupos tiol y a través de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. La proteína supresora de tumor p53 puede inducir la expresión de numerosos productos pro-apoptóticos que inician la ruta intrínseca y extrínseca de apoptosis (Kang et al., 2009).

## Mitocondria

La quimioterapia dirigida a la mitocondria es una herramienta útil para combatir la proliferación de células de cáncer resistentes a la apoptosis. Las mitocondrias son las productoras de energía celular y son esenciales para mantener las células vivas, también juegan un rol importante en la muerte celular cuando la membrana ha sido permeabilizada (Lena et al., 2009). Las células cancerosas llevan a cabo su metabolismo energético de forma diferente a las células normales, esto da origen a la teoría de Warburg de que la causa de cáncer es principalmente debida a un defecto de metabolismo energético. Mutaciones en el genoma de mitocondria desencadenan la transformación de células normales a cancerosas (Jianping, 2010).

La mitocondria es un organelo vital para la célula, ya que provee diferentes mecanismos que le permiten adaptarse a varias condiciones de estrés y tiene la capacidad de determinar cuándo puede llevar a cabo muerte celular. Dentro de su rol tiene el transporte de iones a través de la membrana y la generación de un gradiente de protones que es base para la producción de ATP (Trifosfato de adenosina). La mitocondria tiene un potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) que es mantenido por el suministro de oxígeno y una fuente de carbono que a su vez mantiene un gradiente de pH a través de la actividad de la cadena de transporte de electrones (Szabadkai & Duchon, 2008). Un constante flujo de iones inorgánicos y metabolitos ocurren entre el citosol y la mitocondria. La mitocondria tiene dos membranas una interna y externa. La membrana externa es permeable a moléculas polares hasta 5kDA (Szewczyk & Wojtczak, 2002). Sin embargo, la membrana interna es permeable a ciertos compuestos como agua, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>. Otros metabolitos hidrofílicos e iones inorgánicos pueden cruzar la

membrana debido a la presencia de canales específicos y proteínas acarreadoras. Varias drogas lipofílicas y anfifílicas tienen buena capacidad de penetrar la mitocondria (Szewczyk & Wojtczak, 2002).

La permeabilización de la membrana mitocondrial es el resultado de la disipación del potencial de membrana, un parámetro que es requerido para varias funciones como el transporte de iones, importe de proteínas, biogénesis y conservación de energía (Armstrong, 2006). La consecuencia de la permeabilización de la membrana mitocondrial es la muerte celular (Green & Kroemer, 2004). La permeabilidad puede ocurrir tanto en la membrana interna o externa de la mitocondria. La permeabilización de la membrana externa es controlada por proteínas de la familia Bcl-2, las cuales inhiben o promueven la muerte celular, modificando la integridad de membrana externa. Mientras que la membrana interna es regulada por reacciones redox de proteínas y la formación de un poro mitocondrial (Armstrong, 2006). La familia de proteínas Bcl-2 que controla la membrana externa de la mitocondria incluye proteínas anti-apoptóticas, tales como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y A1/Bfl-1, que contienen dominios homólogos (BH1-4), las proteínas pro-apoptóticas, como Bax, Bak y Bok, que carecen del dominio BH4 y las que contienen el dominio BH-3, como Bid, Bim, Bad, Bmf, Noxa y Puma (Buron et al., 2010). Existen dos modelos de activación en los cuales se permeabiliza la membrana externa. De forma directa, se requiere la inducción de Bim o Bid para que Bax o Bak se oligomericen y formen poros en la membrana externa (Buron et al., 2010). Bak y Bax sufren un cambio conformacional para poder llevar a cabo la oligomerización. Bak se desplaza desde sus interacciones inhibitoras con Bcl-XL y Mcl-1, entonces el dominio BH3 de Bid es expuesto libremente para interactuar con Bax, Bak y otras proteínas anti-apoptóticas. Una vez se forman los poros por Bax y Bak, se libera el

citocromo c y otras proteínas intermembranales (Gillick & Crompton, 2008). Ciertas proteínas anti-apoptóticas pueden bloquear este proceso en la membrana externa como las proteínas Bax/Bak. Mientras que de forma indirecta proteínas con el dominio BH-3 pueden antagonizar el efecto anti-apoptótico liberando las proteínas Bax/Bak. Una vez se permeabiliza la membrana externa se liberan otros factores apoptóticos como Omi/HtrA2 y Smac/Diablo, los cuales son efectores dependientes de caspasa, u otros factores independientes de caspasa, como el factor inductor de apoptosis (AIF) y EndoG (Buron et al., 2010). El citocromo c juega un rol esencial en la generación del potencial transmembranal de la mitocondria. El potencial de membrana alterado lleva a la liberación del citocromo c y a la activación de caspasas o a la inversa la liberación del citocromo c afecta la función mitocondrial y en ausencia de la actividad de caspasa se lleva a cabo muerte celular. Su liberación procede con la generación de poros o canales en la membrana externa por proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. También puede ocurrir por la ruptura de la membrana externa después de la hinchazón de la matriz mitocondrial debido a la apertura del poro de transición o como consecuencia del cierre de un canal dependiente de voltaje en la membrana externa (Waterhouse, Goldstein, Ahsen, Shuler & Newmeyer, 2001).

La apoptosis puede ser desatada por una variedad de estímulos como radiación ionizante o UV, drogas, hipotermia y algunas hormonas. Estos agentes activan nucleasas endógenas que cortan la cromatina resultando en una serie de fragmentos de ADN. P53 es uno de los genes más mutados en tumores humanos, este gen controla la progresión del ciclo celular, reparación del ADN y regula la apoptosis (El-awady, Saleh & Awward, 2002). La actividad de p53 dañado promueve la acumulación de ADN dañado en células, lo cual lleva a fenotipos de cáncer. El p53 se puede enlazar a la

región promotora del gen Bax y regular la transcripción genética; también puede ser un factor de transcripción para PUMA y NOXA. PUMA juega un rol en determinar muerte celular programada o arresto al ciclo celular en respuesta a la activación de p53 (Suzuki & Matsubara, 2011). La proteína p53 suprime la formación de tumor no sólo por apoptosis sino causando arrestos en el ciclo celular (Taylor & Stark, 2001).

## Ciclo celular

En el ciclo celular ocurren diferentes fases, la primera es la interfase que se subdivide en G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>. La segunda fase es la fase de mitosis que se divide en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Starr & Taggart, 2004). La fase G<sub>0</sub> consiste de células que son diferenciadas para llevar a cabo una función en particular, permanecen en un periodo de latencia hasta que sean necesarias para llevar a cabo síntesis de proteína. Las células en la fase G<sub>0</sub> pueden reintegrarse nuevamente al ciclo en respuesta a ciertos estímulos (Pollard & Earnshaw, 2004). La fase G<sub>1</sub> es el intervalo entre mitosis y la replicación del ADN. En esta fase de G<sub>1</sub> la célula se encuentra activa metabólicamente para poder llevar a cabo el crecimiento celular adecuado antes de la replicación del ADN. El progreso de pasar de G<sub>1</sub> es regulado por un punto de restricción y un punto de verificación de daño al ADN (Pollard & Earnshaw, 2004). La fase de síntesis (S) consiste de la replicación del ADN. En la fase de G<sub>2</sub> ocurre la verificación de la estructura del ADN y es preparatoria para la mitosis. En esta fase se encuentra otro punto de verificación en que detecta ADN sin replicar o dañado, de ocurrir algún daño se inactivan las ciclinas dependientes de quinasas (CDK) necesarias para la entrada en mitosis (Pollard & Earnshaw, 2004; Jalili et al., 2012). En el ciclo celular se encuentran unas ciclinas asociadas con las diferentes fases, en G<sub>1</sub> (ciclina D), en la S

(ciclina E y A) y en la mitosis ciclina B y A (Murray, 2004). En condiciones normales, un arresto en el ciclo celular en fase de G0/G1 es asociado con un fenómeno de latencia, en el cual las células no reciben suficiente estimulación mitogénica en términos de factores de crecimiento (Scicchitano & Mellon, 1997; Singh, Roswall, Uhrbom & Westermark, 2011). Dependiendo del tipo de estrés celular, p53 puede inducir arrestos en G1 a través de la activación de la transcripción de un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21 (CDKs). También regula la transición de G2/M, ya que puede bloquear la entrada de la célula a mitosis inhibiendo Cdc2, la cual es necesaria para enlazar la ciclina B1. Represión de ciclina B1 por p53 también causa arresto en G2 (Taylor & Stark, 2001). En ausencia de estrés celular, p53 se encuentra inactivo y en bajas concentraciones. Los niveles de la proteína p53 son regulados principalmente por la ligasa ubiquitina Mdm2. En respuesta a estrés celular, las interacciones entre p53 y Mdm2 disminuyen, resultando en la reducción de ubiquinización de p53 y acumulación de la misma (Holley, Sanjit & St Clair, 2010). En células de cáncer ocurren varias anomalías en la regulación del mecanismo del ciclo celular. La proliferación celular es regulada por diferentes mecanismos que responden a cambios internos y externos, estrés físico o químico a la célula, inhabilidad de responder a señales mitogénicas, daño al ADN, pérdida de la función de genes regulatorios en el ciclo celular pueden hacer que ocurra un detenimiento en el ciclo celular (Singh et al., 2011). La capacidad de las células a llevar a cabo arresto celular es por una red de proteínas que realizan su ejecución. Las proteínas que permiten que continúe el ciclo celular son el complejo de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas y las que inhiben son las proteínas (INK4) inhibidoras de quinasa 4, proteínas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas (CIP), entre otras (Denicourt & Dowdy, 2004). Existen seis quinasas dependientes de

ciclinas pero solo la 1, 2, 4 y 6 han sido caracterizadas y las ciclinas que se conocen son la A, B, D y E (Shirsath, Manohar & Joshi, 2012). Las proteínas INK4 inhiben los complejos de quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 con la ciclina D; la p16 es una INK4 que está caracterizada actualmente (Bai et al., 2012). Las proteínas inhibidoras de ciclina inhiben los complejos de quinasas dependientes de ciclina 1, 2, 4 y 6, las cuales se conocen como p21, p27 y p53 (Otieno & Kriwacki, 2012; Honda, Valogne, Bou, Bréchet & Faivre, 2012). El movimiento de la fase G1 a la fase S es regulada por una serie de eventos. Las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6 deben interactuar con ciclina D para que se active y fosforile la proteína retinoblastoma (Rb). La fosforilación de Rb causa que se separe del complejo inhibidor con el factor de transcripción E2F, lo que lleva a la expresión de varios genes como ciclina. La interacción de ciclina E con CDK2 facilita la entrada a la fase S (Singh et al., 2011). El factor de transcripción E2F estimula la síntesis de las quinasas dependientes de ciclinas 2 y la ciclina E, proteínas que participan en la síntesis de ADN (Johnson & Walker, 1999). La proteína retinoblastoma (Rb) es desactivada a consecuencia de la separación del complejo E2F-Rb y la síntesis de cdk2 y ciclina, esto permite que disminuya la concentración de p27 (Johnson et al., 1999). La proteína INK4A y ARF inhiben la interacción entre CDK4/6 y ciclina D, compitiendo con ciclina D para así unirse a la CDK4/6 (González & Serrano, 2006). Otra proteína que funciona como regulador del ciclo celular es la quinasa CDKN1A inhibiendo el complejo de ciclina E-CDK2 y E-CDK4 y puede causar arresto celular en G1 o a principios de la fase S en respuesta a daño al ADN. La expresión de CDKN1A es controlada por el gen supresor TP53 que es activado en respuesta a daño al DNA; en varios tipos de cáncer la función de este gen se pierde (Jalili et al., 2012). Mutaciones en los genes reguladores del ciclo celular como TP53,

CDKN1A, INK4A y ARF hacen más complejo el control del ciclo. Esto permite que las células cancerosas puedan escapar del bloqueo en la fase G0/G1 en respuesta al estímulo, lo cual normalmente causaría un arresto en G0/G1 (Singh et al., 2011; Schnerch et al., 2012).

### Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

El p53 puede afectar la producción de ROS mitocondrial regulando la expresión y la interacción directa con la enzima antioxidante mitocondrial dismutasa superóxida de manganeso (MnSOD). Especies reactivas de oxígeno (ROS) se forman como resultado del metabolismo de oxígeno e incluyen los radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). ROS juega un rol importante en regular procesos celulares, incluyendo apoptosis y en la respuesta inmune actuando como mensajero secundario. Afecta las funciones normales celulares alterando la actividad de tirosinas, quinasas y factores de transcripción (Indo et al., 2007). La mitocondria es la fuente principal de ROS bajo condiciones normales, siendo los radicales superóxidos los principales ROS producidos. El complejo I y complejo III de la cadena de transporte de electrones son los lugares principales de la producción de superóxido en la mitocondria. Los radicales de superóxido pueden atacar los centros de sulfuro-hierro de muchas enzimas mitocondriales, llevando a la liberación de hierro el cual cataliza la formación de radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno por la reacción de Haber-Weiss. También pueden reaccionar con óxido nítrico mitocondrial y formar peroxinitritos, lo que altera la actividad de varias enzimas en la mitocondria (Indo et al., 2007). La liberación de citocromo c desde la mitocondria lleva a la activación de caspasas que a su vez es mediada por especies reactivas de oxígeno. El citocromo c se enlaza la superficie



externa de la membrana interna de fosfolípidos especialmente a la molécula cardiolipina. Cardiolipina es rica en ácidos grasos no saturados, lo cual facilita la interacción con citocromo c. Daño oxidativo por especies reactivas de oxígeno puede afectar la unión de citocromo c con la molécula cardiolipina y causar que el citocromo c se disocie y se libere al espacio extracelular (Petrosillo, Ruggiero & Paradies, 2003). La molécula de cardiolipina muestra especificidad para dirigir tBid hacia la mitocondria. El tBid se ha demostrado que promueve la liberación del citocromo c desde la mitocondria (Kang & Patrick, 2009). Un aumento en la generación de ROS induce la liberación de citocromo c desde la mitocondria, sin afectar la membrana externa de la mitocondria. Si ocurre liberación del citocromo c, se activa la cascada de caspasas, lo que lleva a que se desate la apoptosis (Petrosillo et al., 2003; Park & Park, 2007).

Las células normalmente responden a estímulos externos por diferentes mecanismos altamente regulados. Sin embargo, en las células cancerosas se observan alteraciones en la fisiología y crecimiento celular y una reducción en la muerte celular. La regulación de pérdida de crecimiento celular se ha atribuido a mutaciones en genes supresores y oncogénicos (Weinberg, 2007). La disminución de la respuesta al estímulo de muerte celular es relacionada con la expresión atípica de proteínas apoptóticas. Glutación (GSH) protege la célula de los radicales libres y está relacionada a la regulación de mecanismos carcinogénicos, sensibilidad contra xenobióticos, radiación ionizante, citoquinas, síntesis de ADN y proliferación celular (Ortega, Mena & Estella, 2011). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) representan los radicales libres de mayor abundancia en células. Un aumento en los niveles de radicales libres lleva a que se activen las diferentes defensas celulares y si el daño es irreversible puede causar muerte celular. El estrés oxidativo está asociado con daños a carbohidratos, lípidos,

proteínas y ADN, lo que lleva a una función celular anormal y eventualmente apoptosis. También puede causar fragmentación del ADN, daños en la mitocondria que causa que se disminuya el potencial de membrana, alterando la permeabilidad lo que facilita la liberación de señales de muerte celular (Smith et al., 2008).

### Avalúo de Riesgo

Riesgo se define como la probabilidad de un resultado adverso en base a la exposición y la potencia del agente peligroso (Klaasen, 2008). El avalúo de riesgo es una evaluación sistemática de los posibles efectos adversos como resultado a una exposición a una situación o un agente peligroso. Consiste en cuatro componentes fundamentales: identificación de un riesgo, evaluación de dosis respuesta, avalúo de exposición y caracterización del riesgo (Brown & Stine, 2006).

1. Identificación de un Riesgo- se determina si la sustancia es un posible riesgo para la salud. En orden de evaluar la toxicidad de una sustancia química cuatro tipos de estudios se utilizan: relación de estructura y actividad (SAR); estudios *in vitro* o a corto plazo; estudios *in vivo* con animales y estudios humanos epidemiológicos. En algunos casos la información de toxicidad de un compuesto químico es limitada dificultando el proceso de evaluación (Klaasen, 2008; EPA, 2000).
2. Avalúo de dosis-respuesta- es la base fundamental entre la relación cuantitativa de la exposición de una sustancia química y la incidencia de una respuesta adversa. Métodos de extrapolación de dosis altas a bajas, y de cómo extrapolar de un riesgo a un animal a riesgo humano son requeridos y abarcan la mayor parte del avalúo de dosis respuesta. El análisis de la

relación de dosis respuesta debe comenzar con la determinación de los efectos críticos y que estos sean cuantitativamente evaluables. Un efecto adverso crítico se define como un efecto adverso biológico que ocurre a niveles bajos de exposición. Caracterizar una relación de dosis respuesta incluye la identificación de los niveles de efecto que pueda tener una dosis como LD50 (dosis que produce el 50% de muerte), LC50 (concentración que produce el 50% de letalidad) y la ED10 (dosis que produce un 10% de respuesta) (Klaasen, 2008).

3. **Avalúo de exposición-** Se basa en determinar la fuente, el tipo, la magnitud y la duración de contacto de la sustancia química de interés. Es un elemento clave para el avalúo de riesgo, ya que un riesgo no ocurre si no se lleva a cabo una exposición. El enfoque de este avalúo, utiliza la información de exposición de manera cuantitativa. El objetivo de estas calculaciones es determinar el tipo y la cantidad total de exposición, y también buscar cómo puede alcanzar tejidos específicos. Un paso clave es determinar la ruta de exposición. Hay tres enfoques básicos para cuantificar una exposición: la medida de punto de contacto, la evaluación del escenario y la reconstrucción. Este último se basa en estimar la exposición en una dosis, el cual puede reconstruirse a través de indicadores internos (como por ejemplo, biomarcadores, peso corporal y niveles de excreción) después de la exposición. Existen diferentes rutas por las cuales puede ocurrir una exposición por ingestión, inhalación o dermal (Klaasen, 2008; EPA, 2000).

4. Caracterización de un riesgo-se basa en la estimación de los posibles efectos que puede tener una sustancia química en una población. Una buena caracterización de riesgo debe expresar resultados claros, articular las principales hipótesis e incertidumbres, identificar interpretaciones razonables y separar conclusiones científicas de los juicios políticos. Existen cuatro principios básicos en la póliza de caracterización de riesgo de la EPA: transparencia, claridad, consistencia y que sea razonable la información recopilada (EPA, 2000).

### Manejo de Riesgo

El manejo de riesgo se lleva a cabo después del avalúo de riesgo y este consiste en el proceso de la toma de decisiones reguladoras con respecto a un riesgo que concierne un efecto adverso a la salud. Además de tomar en consideración los resultados del avalúo de riesgo, se evalúan factores políticos, sociales y económicos a la hora de tomar decisiones sobre la regulación de tóxicos potenciales (Brown et al., 2006; EPA, 2000).

### Marco Legal

La investigación presente recae bajo las regulaciones del Código de Regulaciones Federales (CFR). El código de Regulación Federal, Título 21 parte 1270 y 1271 regula las células o tejidos humanos destinados para trasplante o transferencia como un producto basado en células y tejidos (HCT/P). La parte 864 del CFR 21 regula los artículos hematológicos y patológicos usados en laboratorios (DHHS, 2006). La Subparte B establece las normas para las tinciones biológicas y soluciones químicas

para tinciones. Subparte C regula los productos de cultivo celular y de tejidos. Subparte D establece las regulaciones de los instrumentos patológicos (DHHS, 2006).

Bajo el concepto de regulaciones locales dicha investigación está sujeta a los reglamentos de la Junta de Calidad Ambiental (JCA) donde aplica el Reglamento para el Manejo de los Desperdicios Sólidos No Peligrosos. Un desperdicio biomédico regulado (DBR) es cualquier desperdicio sólido generado en el diagnóstico, tratamiento, o inmunización de seres humanos o animales, investigaciones, producción o prueba de productos biológicos, o en el embalsamamiento de cuerpos humanos. A través de las Reglas 580 a la 586 de dicho reglamento se discuten los siguientes temas referentes a los DBR: generación, segregación, empaque, rotulación, almacenaje, tratamiento, manejo, transporte, disposición y documentación (JCA, 1997).

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

En este estudio se estudiaron dos nuevos compuestos pertenecientes a la familia de compuestos llamados sales de benzazolo[3,2-a]quinolinios (BQS) con el propósito de evaluar sus actividades biológicas y tóxicas en células humanas en cultivo tales como linfoblastos normales (TK6) y linfoma (Toledo). Comparamos sus efectos de toxicidad en ambas líneas de células y sus diferentes efectos biológicos que llevan a entender su mecanismo de acción. Entre los parámetros medidos se incluyeron: permeabilidad de la membrana mitocondrial, fragmentación del ADN y alteración al ciclo celular para identificar el mecanismo de muerte celular causada por los compuestos BQS.

#### **Tipo y lugar de estudio**

De la familia de compuestos conocidos como BQS, en este estudio nos enfocamos principalmente en ABQ48, NBQ48, ABQ95 y NBQ95. Realizamos un estudio de citotoxicidad de estos compuestos en células normales y malignas implementando técnicas de cultivo celular *in vitro*. Llevamos a cabo la parte experimental en las facilidades del Laboratorio de Toxicología Química, Ambiental y Molecular (ChEMTox Lab) afiliado a la Escuela de Asuntos Ambientales en el Edificio de Investigación Científica de la Universidad Metropolitana, dirigido por la Dra. Beatriz Zayas.

## **Materiales y Métodos**

### Líneas celulares bajo estudio

En el estudio *in vitro* utilizamos la línea de células Toledo (número de catálogo CRL-2631) y estas se obtuvieron de “American Type Culture Collection” (ATCC) por sus siglas en inglés (Virginia, USA). Las células Toledo se identifican como linfoma y se utilizan como modelo para estudios de Non-Hodgkin linfoma. Son de procedencia de un linfoma en el cerebro y se establecieron en 1990. Otra línea de células que utilizamos son las TK6 (número de catálogo CRL-8015) también obtenidas del ATCC. Las células TK6 son linfoblastos normales y su procedencia es del bazo. Ambas líneas de células las cultivamos y el medio que utilizamos fue RPMI 1640, 1X (Roswell Park Memorial Institute, por sus siglas en inglés) modificado con 10% de suero fetal de bovino (ATCC), 0.3% de glucosa, 0.1% de solución de Penicillin-Streptomycin estabilizada y 1.19g de HEPES (Sigma). Las células fueron mantenidas a una temperatura de 37°C, 95% de humedad relativa y 5% de bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) de atmósfera en una incubadora Sanyo Model MCO-18 AIC. Mantuvimos una concentración de células de 2 x 10<sup>5</sup> a 1 x10<sup>6</sup> células/ ml para Tk6, de 3 x 10<sup>5</sup> a 3 x10<sup>6</sup> células/ ml fue para las células de Toledo. Reemplazamos el medio nutricional celular cada dos a tres días para mantener la concentración celular óptima.

### Desinfección

Con el propósito de mantener el área de trabajo en condiciones optimas, técnicas de desinfección fueron aplicadas para trabajar con el cultivo celular y preparación de drogas bajo estudio. Entre las técnicas que utilizamos fueron agentes químicos y radiación ultravioleta. Antes de utilizar el gabinete de flujo laminar donde

trabajamos el cultivo celular, encendimos la lámpara de luz ultravioleta (UV) por 15 minutos para irradiar cualquier acción bactericida. Luego de haber irradiado con luz ultravioleta se deja encendido por 15 minutos antes de comenzar a trabajar, luego proseguimos desinfectando la superficie del gabinete y los materiales para los ensayos. Esperamos de dos a tres minutos antes de comenzar a trabajar. Luego de trabajar, removimos todos los materiales que estaban dentro del gabinete, utilizamos un sanitizante de amonio cuaternaria para limpiar la superficie del mismo e irradia nuevamente con luz ultravioleta por 15 minutos.

#### Preparación de soluciones estándar de los BQS

Los BQS que utilizamos en la investigación fueron: ABQ48, NBQ48, ABQ95 y NBQ95. La solución estándar para el análisis es de 3mM. Calculamos estequiométricamente la cantidad de sólido de BQ para hacer las hacer las diluciones con agua purificada MSG (Mass Spect Grade, por sus siglas en inglés) (Apéndice 1). Las diluciones que realizamos fueron concentraciones de 3 a 200 $\mu$ M. Una vez preparadas las diluciones se guardaron en la nevera a 4°C, en frascos pequeños de plástico cubiertos con papel de aluminio para evitar la foto degradación de los compuestos.

#### Preparación de soluciones estándar de los controles positivos

Las soluciones de los controles fueron preparadas a una concentración de 3mM. El control positivo cisplatin (cis- Diamninedichloroplatinum) fue disuelto en agua purificada MSG. Disolvimos valinomycin y camptothecin en DMSO (dimetil sulfóxido). Almacenaos los controles en la nevera a 4°C en frascos pequeños de plástico.



## Procedimientos experimentales

### Determinación de citotoxicidad

La determinación de la citotoxicidad la llevamos a cabo midiendo el efecto en la sobrevivencia de las células una vez expuestas a los compuestos bajo estudio. Establecimos la relación dosis-respuesta y la concentración que inhibe viabilidad en cincuenta por ciento de la población (IC50) en la línea de células TK6 y Toledo.

La exposición de las células a los BQS fue a diferentes concentraciones entre el rango de (5 a 200 $\mu$ M) partiendo de una solución de 3mM (Apéndice 2). Realizamos la exposición en un envase de cultivo celular de 12.5cm<sup>2</sup> con una densidad de células de 5 x 10<sup>5</sup> células/ ml, solución de medio de cultivo y solución de BQS para un volumen total de 2mL (Apéndice 2). Realizamos triplicados para cada muestra de concentración y se expusieron por un período de 48 horas. La viabilidad de las células la determinamos a través del método de exclusión de azul tripán (trypan blue) (Sigma). El azul tripán es un tinte y su reactividad se basa en que es un cromóforo cargado negativamente y que no interacciona con las células al menos que su membrana esté dañada. Por lo tanto, las células que excluyan el tinte son viables (Invitrogen). El instrumento utilizado para determinar la viabilidad fue el (Countess<sup>TM</sup> automated cell counter de Invitrogen<sup>TM</sup>) este detecta las células vivas y no vivas de una manera automatizada. Una vez expuestas a los BQS por el periodo correspondiente tomamos una muestra de 100 $\mu$ l de la solución de células con medio y añadimos 100 $\mu$ l de azul tripán. Luego tomamos 10 $\mu$ l de la mezcla y añadimos en el hemocítometro para hacer la lectura en el instrumento (Apéndice 3).

## Determinación de permeabilización mitocondrial en TK6 y Toledo

Este ensayo mide el potencial de permeabilización mitocondrial  $\Delta\Psi_m$  utilizando la tinción catiónica JC-1. La interrupción  $\Delta\Psi_m$  está asociada con apoptosis como mecanismo de muerte celular. El equipo que utilizamos para este ensayo es el sistema NucleoCounter NC-3000 (ChemoMetec A/S, Allerød, Denmark). Una vez expuestas las muestras a los BQS por un período de 48 horas, tomamos muestras de células aproximadamente de  $1 \times 10^6$  células por mililitros y la suspendimos en 1ml de PBS (Phosphate buffered saline, por sus siglas en ingles) (Sigma). Luego añadimos 12.5 $\mu$ l de JC-1 (2.5 $\mu$ g/ml) (Sigma) a cada muestra de célula y luego se incubo durante 20 minutos a 37°C. Realizamos una centrifugación a 400g por 5 minutos, se decanto el sobrenadante y se suspendió el pellet de las células en 1-2ml de PBS. Repetimos el paso anterior dos veces y en la última centrifugación re suspendimos el pellet obtenido en 0.25ml de DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) en PBS Analizamos las muestras en el NucleoCounter. Las células con el potencial mitocondrial colapsado exhiben una disminución en la razón de intensidad de fluorescencia de color rojo/ verde (Apéndice 4).

## Fragmentación del ADN y Ciclo Celular

Este ensayo lo utilizamos para cuantificar el contenido de ADN en células de mamíferos y detectar las células en apoptosis con fragmentación de ADN (células en sub-G1). La fijación de las células en medio de suspensión lo realizamos recolectando las células después de llevar a cabo una centrifugación durante 5 minutos a 200g a temperatura de ambiente. Las células fueron lavadas una vez con PBS. Luego contamos las células y re suspendimos de  $1 \times 10^6$  a  $2 \times 10^6$  células en 0.5ml de PBS. Era

importante mantener la densidad celular dentro del rango de  $2 \times 10^6$  a  $4 \times 10^6$  células por mililitros para obtener una tinción adecuada. Añadimos 4.5ml de 70% etanol a cada tubo de centrifugación de 10-15ml los mismos se deben mantener en hielo. La suspensión celular fue transferida en los tubos que contienen etanol a 70% frío, luego utilizamos el vortex para agitarlo y mantener las células por el agente fijador durante un mínimo de 12 horas. Es necesario tener una suspensión simple de células al momento de mezclar con etanol. Las células la almacenamos en etanol al 70% por varias semanas a  $0-4^{\circ}\text{C}$ . Luego centrifugamos las células suspendidas en etanol por 5 minutos a 200g y luego decantamos el etanol. Suspendimos el pellet de las células en 5mL PBS, dejamos reposar por 50 segundos y centrifugamos nuevamente por 5 minutos a 200g. Luego suspendimos el pellet en 0.45mL de DAPI (1ug/ml DAPI, 0.1% triton X-100 en PBS) incubamos durante cinco minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Utilizamos el sistema operativo Nucleo View del NucleoCounter (NC-3000) para analizar las muestras. Dependiendo la cantidad de muestra se utiliza la laminilla de dos cámaras (NC-Slide A2) o la de ocho cámaras (NC-Slide A8). En la laminilla de dos cámaras utilizamos aproximadamente 30ul de la suspensión celular en cada lado de la laminilla. En la de 8 utilizamos aproximadamente 9ul de la suspensión en cada lado (Apéndice 5). Analizamos las muestras y la fluorescencia celular es cuantificada y las células en apoptosis con ADN fragmentado son observadas en forma de pico de la sub fase  $G_1$  el histograma de la pantalla.

El ensayo de ciclo celular lo realizamos utilizando la misma muestra del ensayo anterior con la diferencia que ciclo celular para analizar la misma en el NucleoCounter. La fluorescencia celular es cuantificada y las células se muestran en diferentes fases del ciclo celular sub  $G_0$ ,  $G_0/G_1$ , fase S y  $G_2/M$ . Este ensayo lo realizamos según el

protocolo No.3003 Rv.1.1 ensayo de fragmentación de ADN y No.3001 análisis de ciclo celular (ChemoMetec A/S, Allerod, Denmark).

#### Actividad de caspasa 3 & 7

Las caspasas median muerte celular y juegan un rol importante en la apoptosis, necrosis e inflamación. Son reguladas a niveles post- transduccionales y se pueden activar rápidamente. Se activan por cortes proteolíticos y de forma específica con su precursor. Una forma de medir la actividad de caspasa es utilizando un inhibidor de secuencia específico ligado a una sonda fluorescente conocido como Fluorochrome Inhibitor of Caspases Assay (FLICA) por sus siglas en inglés (ImmunoChemistry Technologies, Bloomington MN, USA). El inhibidor permeabiliza la célula pasando a través de la membrana plasmática y se une covalentemente a los residuos de cisteína de la caspasa activa. Si no ocurre enlace entre las formas inactivas estas se difunde fuera de la membrana. La fluorescencia da una medida directa de la cantidad de caspasas activas en la célula viva. Este ensayo lo realizamos utilizando el protocolo No. 3021 (ChemoMetec A/S, Allerod, Denmark) y la fluorescencia la medimos con el instrumento NucleoCounter (NC-300). Al utilizar el reactivo FLICA las células con actividad de caspasa florecen verde después del enlace con el inhibidor (Apéndice 6).

#### Estadística

Efectuamos pruebas estadísticas para todos los datos obtenidos en este estudio. Realizamos una ANOVA con post-prueba Tukey usando el programa GraphPad Prism (Version 5.04) para identificar significancia de los valores experimentales.

## CÁPITULO IV

### RESULTADOS

El propósito principal de este estudio fue determinar los efectos de cuatro compuestos pertenecientes a las sales de benzazolo[3,2-a]quinolinios a nivel celular en linfoblastos normales TK6 y células de linfoma Toledo. Una vez las células fueron expuestas a los BQS, el primer parámetro evaluado fue el grado de toxicidad o efecto en la viabilidad de estas células. Para ello se determinó que concentración inhibe viabilidad en 50% (IC50) de la población. Una vez determinado el IC50, evaluamos cuatro parámetros que ayudarían a entender el mecanismo de muerte celular ejercido por estos compuestos. La determinación de apoptosis como mecanismo principal de muerte celular la llevamos a cabo por ensayos de potencial de la membrana mitocondrial, fragmentación del ADN, cambios en el ciclo celular y activación de caspasas 3 y 7.

Determinación de citotoxicidad de los BQS para cuantificar la concentración inhibitoria (IC50) en linfoblastos normales TK6 y linfoma Toledo.

Las células TK6 y Toledo fueron expuestas a las siguientes drogas ABQ48, NBQ48, ABQ95 y NBQ95 por un periodo de 48 horas. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto ABQ48: en Toledo (0 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 175  $\mu$ M) y en TK6 (0 $\mu$ M, 8.6 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 175

$\mu\text{M}$ ). El compuesto amino ABQ48 obtuvo un  $\text{IC}_{50}$  de  $50\mu\text{M}$  en las células de Toledo. En las células de TK6 el  $\text{IC}_{50}$  fue de  $8.6\mu\text{M}$  para el compuesto ABQ48. Las diferentes concentraciones de NBQ48 utilizadas fueron las siguientes para: Toledo ( $0\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $25\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $175\mu\text{M}$ ,  $200\mu\text{M}$ ,  $300\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$ ) y en Tk6 ( $0\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $200\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$ ). El compuesto nitro NBQ48 presentó un  $\text{IC}_{50}$  de  $100\mu\text{M}$  en ambas líneas de células, linfoblastos normales y linfoma. Tratamos las células con las siguientes concentraciones del compuesto ABQ95: Toledo ( $0\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $15\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $150\mu\text{M}$ ) y TK6 ( $0\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $250\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$ ,  $600\mu\text{M}$ ,  $1,000\mu\text{M}$ ). El  $\text{IC}_{50}$  del compuesto ABQ95 para las células de Toledo fue de  $16\mu\text{M}$ . Mientras que en las células de Tk6 el  $\text{IC}_{50}$  para el ABQ95 fue  $270\mu\text{M}$ . La curva de diferentes concentraciones para el compuesto NBQ95 fue para Toledo ( $0\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $20\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $150\mu\text{M}$ ) y en TK6 ( $0\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $25\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $250\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$ ). El compuesto NBQ95 en las células de Toledo tuvo un  $\text{IC}_{50}$  de  $14.6\mu\text{M}$  y en las Tk6 fue de  $33\mu\text{M}$ . En la figura 1 presentamos las diferentes concentraciones inhibitorias ( $\text{IC}_{50}$ ) en ambas líneas de células TK6 y Toledo.

Determinación de los efectos de los BQS en el potencial de la membrana mitocondrial de linfoblastos normales TK6 y linfoma Toledo

Los resultados de los efectos de los BQS en el potencial de membrana mitocondrial en las células normales TK6 se presentan en la figura 2. Los linfoblastos normales TK6 sin ser tratados presentaron un potencial de 20.3%. Valinomicina fue la droga utilizada como control este posee una carga neutral, el cual mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control negativo. El 55.7% de las células tratadas con el control Valinomicina mostraron un potencial colapsado. El

otro control utilizado fue Camptotecina, este en comparación con el control negativo también obtuvo un valor significativo ( $p < 0.05$ ). El 48.6% de las células expuestas al control positivo Camptotecina presentaron un potencial afectado. El compuesto ABQ48 mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) versus el control negativo. El 56.7% de las células tratadas con el compuesto amino mostraron estar despolarizadas. El compuesto NBQ48 si mostró tener diferencia significativa con el control negativo. El 47.3% de las células tratadas con NBQ48 mostraron tener alguna diferencia en potencial. Sin embargo, con el compuesto ABQ95 el 48% de las células estaban despolarizadas mostrando una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control negativo. Mientras que el compuesto NBQ95 no mostró tener diferencia significativa con el control negativo y solo el 12.2% presento cambio en potencial. Los compuestos ABQ48 NBQ48, ABQ95 y NBQ95 no mostraron diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control Valinomicina y Camptotecina. Es decir los compuestos ABQ48, NBQ 48 y ABQ95 tienen la capacidad despolarizar la membrana mitocondrial, mientras que el compuestos nitrogenados NBQ95 no la tiene.

La figura 3 muestra los resultados de los efectos en el cambio del potencial de la membrana mitocondrial para las células de linfoma (Toledo) luego de haber sido expuestas a los compuestos bajo estudio. El cambio en potencial de la membrana mitocondrial para las células de linfoma Toledo no expuestas fue de 16%. El control positivo Valinomicina mostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control negativo presentando un cambio en potencial mitocondrial de 55.3%. El segundo control positivo Camptotecina presentó un potencial menor (aunque cercano) de un 51.67%, el cual fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) versus el control negativo. Células expuestas al compuesto ABQ48 si mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el

control negativo y el 57.67% de las células tratadas con este compuesto demostraron tener un potencial de la membrana colapsado. Cuando evaluamos el efecto del compuesto nitrogenado NBQ48, este indujo un efecto en potencial de la membrana mitocondrial de 51.33% en las células expuestas. Esto resultó en una diferencia significativa al compararse con el control negativo. El compuesto ABQ95 afectó el potencial de membrana mitocondrial en las células de Toledo en un 59.67% y el NBQ95 despolarizó solamente un 35%. Ambos compuestos amino y nitro BQ95 mostraron diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control negativo.

En comparación con el control positivo Valinomicina los compuestos ABQ48, NBQ48 y ABQ95 no presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Mientras que al comparar con el control positivo Camptotecina todos demostraron tener una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Todos los compuestos fueron capaces de despolarizar la membrana mitocondrial en las células de Toledo.

Fragmentación del ADN en linfoblastos normales TK6 y linfoma Toledo luego de ser expuestas a los BQS

La figura 4 muestra los resultados de fragmentación del ADN en las células TK6 luego de ser expuestas a los compuestos BQS. Los linfoblastos normales TK6 sin ser tratados fragmentaron su ADN en un 8%. El control positivo que utilizamos para este ensayo fue Camptotecina. El 79% de las células tratadas con el control positivo fragmentaron el ADN, mostrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con las células no tratadas. Las células tratadas con el compuesto ABQ48 fragmentaron un 16%, este valor no fue estadísticamente significativo, en comparación con el control negativo. Mientras que el compuesto nitro NBQ48 si mostró tener diferencia ( $p < 0.05$ )



versus el control negativo. Las células expuestas a este compuesto fragmentaron en un 56%. El compuesto NBQ95 fragmento el ADN en un 79% presentando una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con el control negativo. Los compuestos ABQ48 y NBQ48 presentaron una diferencia ( $p < 0.05$ ) con el control positivo Camptotecina. Mientras que el compuesto NBQ95 no mostró diferencia alguna. Si comparamos el compuesto amino ABQ48 con su forma nitrogenada si se observa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Los compuestos nitrogenados NBQ48 y NBQ95 fragmentaron el ADN de los linfoblastos normales TK6. Mientras que el compuesto amino ABQ48 no causó fragmentación en el ADN.

En la figura 5 observamos los resultados de fragmentación de ADN en las células de Toledo. Las células sin tratar fragmentaron el ADN en un 6%. El control positivo Camptotecina fragmentó en un 73%, con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control negativo. Las células tratadas con el compuesto ABQ48 fragmentaron un 37% demostrando una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) al compararlo con el control negativo. El compuesto NBQ48 fragmento un 28% y también demostró diferencia significativa. Sin embargo, al tratar las células con el compuesto ABQ95 no hubo diferencia significativa y solo el 11% de las células presentaron ADN fragmentado. Al tratar las células con el compuesto nitrogenado NBQ95 si observamos una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) y una fragmentación de un 28%. Los compuestos ABQ48, NBQ48 y NBQ95 no presentaron diferencia significativa al compararlos con el control positivo Camptotecina. ABQ95 demostró inducir fragmentación con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) versus el control positivo. El único compuesto que no fragmento el ADN en las células de Toledo fue el ABQ95. Los dos compuestos nitrogenados y ABQ48 si lograron causar ese efecto.

Efecto en el ciclo celular de linfoblastos normales TK6 y linfoma Toledo causados por la exposición a los compuestos BQS

El ciclo celular se divide en diferentes fases: SubG0, G0/G1, S y G2/M. En la figura 6 pudimos observar los resultados de las células Tk6 en sus diferentes fases después de ser expuestas a los BQS y la figura 7 presenta los resultados de las células normales en la fase de SubG0. Las células no tratadas acumularon un 2% en la fase de SubG0. El control positivo Camptotecina acumuló un 29% en esta fase, presentando una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control negativo. El compuesto ABQ48 detuvo un 4%, el NBQ48 un 3% y NBQ95 un 1%, ninguno mostró diferencia estadísticamente significativa con el control negativo. Sin embargo, al ser comparados con el control positivo Camptotecina, si observamos una diferencia significativa de ( $p < 0.05$ ).

La figura 8 presenta los resultados de las células Tk6 expuestas a los BQS en la fase de G0/G1 del ciclo celular. Las células sin tratar acumularon un 35% de su población en la fase de G0. Mientras que las células tratadas con el control positivo Camptotecina presentaron un valor de 18% demostrando una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el control negativo. Las células tratadas con el compuesto ABQ48 no mostraron diferencia significativa alguna y solo el 19% de las células se acumularon en la fase G0. El compuesto NBQ48 logró detener tan solo un 3% y el NBQ95 un 13%. Ambos compuestos nitrogenados presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el control negativo. Ninguno de los compuestos utilizados mostró alguna diferencia significativa con el control positivo Camptotecina.

En la figura 9 pudimos observar las células Tk6 en la fase de síntesis luego de ser expuestas a los BQS. El 43% de las células sin tratar se acumuló en la fase S. Al tratarlas con el control positivo Camptotecina, observamos una acumulación de 22% lo cual demuestra una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el control negativo. El compuesto ABQ48 acumuló un 41%, NBQ48 un 42% y NBQ95 un 47%. Estos compuestos no mostraron diferencia significativa alguna en comparación con el control negativo, pero si con el control positivo Camptotecina ( $p < 0.05$ ).

La figura 10 presenta las células TK6 en la fase de G2/M del ciclo celular una vez expuestas a los BQS. Las células sin tratar se acumularon en la fase de G2/M un 18%. Las células expuestas a Camptotecina, se acumularon en esta fase en un 25%, lo cual no observamos diferencia significativa con el control negativo. Las células tratadas con los compuestos ABQ48 y NBQ48 lograron detener el 45% y el 52% de sus células en la fase de G2, demostrando una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con el control negativo. Solo el 14% de las células tratadas con el compuesto NBQ95 se detuvo en la fase de G2/M, lo cual no observamos diferencia significativa con las células sin exponer. Los compuestos ABQ48 y NBQ48 mostraron un valor significativo de ( $p < 0.05$ ) al ser comparado con el control Camptotecina.

En la figura 11 observamos los resultados de las células Toledo en diferentes fases del ciclo celular después de ser expuestas a los BQS. La figura 12 muestra solamente los resultados de las células Toledo en la fase SubG0. El 2% de las células sin tratar se acumuló en la fase SubG0. Las células expuestas al control positivo Camptotecina acumularon un 21% con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). El compuesto ABQ48 no mostró diferencia significativa y solo el 3% de las células se

detuvieron en esta fase. NBQ48 tampoco demostró tener alguna diferencia con el control negativo y solo el 4% fue acumulado. Sin embargo, el 32% de las células tratadas con NBQ95 se acumularon en la fase de SubG0, presentando una diferencia significativa de ( $p < 0.05$ ). El compuesto amino ABQ95 no mostró diferencia alguna con el control negativo y solo el 2% de las células se acumularon en esta fase. Los compuestos utilizados en este ensayo si presentaron tener diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control positivo.

Los resultados de las células Toledo tratadas con los BQS en la fase de G0/G1 los observamos en la figura 13. Las células sin exposición a droga acumularon un 29% en la fase de G0. Las células tratadas con Camptotecina se detuvieron en esta fase en un 6% mostrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) versus el control negativo. El compuesto ABQ48 acumuló un 3% y el NBQ48 un 2%, ambos compuestos muestran una diferencia significativa de ( $p < 0.05$ ). El 25% de las células tratadas con NBQ95 se detuvo en la fase de G0. ABQ95 logró acumular un 26% en esta fase. Estos dos compuestos no mostraron tener diferencia alguna con el control negativo pero si en comparación con el control positivo ( $p < 0.05$ ).

La figura 14 presenta los resultados de la fase de síntesis en las células de Toledo. Las células sin tratar se detuvieron en la fase S por un 22%. El compuesto control Camptotecina logró acumular un 11% y este no presentó diferencia significativa con el control negativo. Las células tratadas con los compuestos BQS no mostraron diferencia significativa en comparación con las células no tratadas. El compuesto ABQ48 acumulo un 17%, NBQ48 un 20%, NBQ95 26% y ABQ95 un 35%. El compuesto ABQ48 y NBQ48 no presentaron diferencia significativa versus el control positivo.

Mientras que los compuestos ABQ95 y NBQ95 si exhibieron una diferencia de ( $p < 0.05$ ) con Camptotecina.

En la figura 15 observamos los resultados de las células Toledo en la fase de G2/M del ciclo celular. Las células de Toledo sin exponer se acumularon en un 32%. Camptotecina logró detener un 30% de las células en la fase de G2, no mostrando diferencia significativa. Los compuestos ABQ48, NBQ48, ABQ95 no presentaron diferencia significativa con el control negativo. El compuesto ABQ48 acumuló un 22%, NBQ48 un 21% y el ABQ95 un 14%. Mientras que el compuesto NBQ95 si mostró tener una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) versus el control negativo con 1% de células acumuladas en la fase de G2/M.

#### Actividad de Caspasa 3 & 7 en las células de linfoma Toledo

La figura 16 muestra la actividad de caspasa de las células de Toledo después de ser expuestas a los compuestos NBQ48 y NBQ95. Las células sin tratar mostraron un 34.6% de actividad de caspasa 3 y 7. El control positivo Camptotecina presentó la activación de caspasa en un 76%, mostrando una diferencia significativa de ( $p < 0.05$ ). Las células tratadas con el compuesto NBQ48 si mostraron actividad de caspasa en un 60.6% con una diferencia de ( $p < 0.05$ ) en comparación con el control negativo. Mientras que el compuesto NBQ95 no mostró diferencia alguna con el control negativo y solo el 40.5% mostró actividad de caspasa 3 y 7.

### **Discusión**

El propósito principal de este estudio era determinar la toxicidad de las sales benzazolo[3,2-a]quinolinios (BQS) en la línea de células TK6 y Toledo y su posible

mecanismo de acción. Los compuestos analizados fueron ABQ48, NBQ48, ABQ95 y NBQ95. Ambas líneas de células fueron expuestas a esta familia de compuestos por un periodo de 48 horas y los analizamos bajo las mismas condiciones. Los resultados de citotoxicidad se basaron en la determinación de la concentración que inhibe el 50% de la población celular ( $IC_{50}$ ). El  $IC_{50}$  en los linfoblastos normales TK6 para ABQ48 (8.6 $\mu$ M), NBQ48 (100 $\mu$ M), ABQ95 (270 $\mu$ M) y NBQ95 (33 $\mu$ M). En las células de linfoma Toledo el  $IC_{50}$  para el compuesto ABQ48 (50 $\mu$ M), NBQ48 (100 $\mu$ M), ABQ95 (16 $\mu$ M) y NBQ95 (14.6 $\mu$ M). Algunos de estos compuestos tales como ABQ48, NBQ48 y NBQ95 fueron evaluados por el Instituto Nacional del Cáncer Programa de Desarrollo Terapéutico. El análisis consistió en una evaluación del compuesto a una dosis de 10 $\mu$ M en 60 líneas de células tumorales (NCI-60 Tumor Cell Line Screen, por sus siglas en inglés) representando diferentes tipos de tejidos: leucemia, melanoma, cáncer del pulmón, colon, riñón, ovario, seno, próstata y sistema nervioso central.

Si comparamos la toxicidad de los compuestos por línea de células podemos observar que el compuesto ABQ48 muestra mayor toxicidad en los linfoblastos normales TK6 que en las células de linfoma Toledo. Sin embargo, este compuesto mostró toxicidad en diferentes líneas de células de tumor semejantes a las células estudiadas tales como K-562, MOLT-4, RPMI-8226 y SR, hacer referencia a la tabla 1 (Datos no publicados). El compuesto ABQ48 también mostró ese grado de toxicidad en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer como pulmonar (A454, EXCX, HOP-92, NCI-H23, NCI-H522, NCI-H460); colon (COLO 205, HCC-2998, HCT-116, HT29, KM12); sistema central nervioso (SF-268, SNB-19, SNB-75, U251); melanoma (MALME-3M, MDA-BM-435, SK-MEL-2, SK-MEL-5, UACC-257); ovario( OVCAR-3, OVCAR-4, SK-OV-

3); renal (SN12C); próstata (PC-3) y seno (MCF7, HS 578t, BT-549,MDA-MB-468), (Datos sin publicar).

El compuesto NBQ48 mostró igual toxicidad en ambas líneas de células. A pesar de que este compuesto no causó diferencia en toxicidad en las células estudiadas, si mostró actividad citotóxica según el análisis de "NCI 60 cell line screening" en otras células de tumor tales como leucemia (HL-60, K-562, RPMI-8226, SR); pulmonar (EKVX, NCI-H23,NCI-H522); colon (HT29); SNC ( SF-268, SF-539, U251); melanoma (MALME-3M, SK-MEL-5, UACC-257); ovario (OVCAR-3, 4,8); próstata (PC-3) y seno (MDA-MB-231, T-47D, MDA-MB-468), (Datos sin publicar). El NBQ48 fue evaluado para detección de citotoxicidad en diferentes líneas de células basado en un ensayo colorimétrico de Sulforrodamina B (SRB), el cual mostró un IC50 de 3 $\mu$ M en HL-60, 78 $\mu$ M SW-480, 36 $\mu$ M HT-29, 69 $\mu$ M FaDu y 23 $\mu$ M CEM, hacer referencia a la tabla 3 (Báez et al., 1995). A pesar de que la toxicidad de este compuesto fue evaluado por diferentes ensayos, podemos asumir que la diferencia en líneas de células tumorales o el tipo de cáncer el cual provienen es un factor determinante para la resistencia o sensibilidad a un compuesto.

El compuesto ABQ95 demostró mayor resistencia en toxicidad para las células normales TK6 con un IC50 de 270 $\mu$ M, siendo más toxico en las células de tumor Toledo con un IC50 de 16 $\mu$ M. El compuesto NBQ95 también demostró tener mayor toxicidad para las células Toledo que para las células TK6, aunque en un grado menor en comparación con el compuesto ABQ95. La diferencia en toxicidad puede ser atribuida por las diferentes modificaciones en la estructura química del compuesto. Ambos

compuestos poseen una estructura similar pero hay una diferencia entre sí, el grupo amino y nitro.

Las diferencias en toxicidad de los BQS en varias líneas de células pueden estar basadas en la relación de estructura y actividad del compuesto. Desde el punto de vista de estructura, la carga iminio en el nitrobenzothiazolo parece explicar su baja actividad antitumoral, por ejemplo en el caso de NBQ48. Se ha sugerido que la presencia de un grupo amonio cuaternario puede estar impidiendo la penetración intracelular de los compuestos (Báez, Riou, Le Pecq & Riou, 1995). Es decir que la carga y los distintos grupos sustituyentes en la estructura química de los BQS al parecer son factores que influyen en el grado de penetración del compuesto y en la toxicidad del mismo.

Otro factor que puede estar aportando a esa diferencia en toxicidad de los BQS es el tipo de cáncer. En efecto, las diferentes características de las células tumorales podrían influir en la resistencia y sensibilidad del compuesto (Sclafani et al., 2010). Según las bases farmacológicas, para que una droga sea toxica en células de tumor, debe estar presente en su forma activa bioquímicamente en el lugar de acción, a concentraciones y periodos de tiempo adecuados, y debe interaccionar con un objetivo de importancia biológica. Con el fin de no ser tóxico, uno o más de estos requisitos del modo de acción de droga no se deben cumplir (Henderson, 1969; Golan, Tashjan & Armstrong, 2011). Las variaciones cuantitativas y cualitativas en muchos de los factores que influyen en cuan toxico o no sea un compuesto en células de tumor, puede llevar a esa diferencia selectiva en toxicidad (Henderson, 1969).

Muchas sustancias tóxicas se conoce que su modo de acción comienza en lugares específicos. A menudo, este lugar específico es una molécula biológica, tales



como proteínas, enzimas, lípidos y ácidos nucleicos dentro de la célula; donde el agente tóxico se puede enlazar o reaccionar con una o más de estas moléculas. Un agente tóxico se puede enlazar covalentemente a macromoléculas celulares llevando a cambios permanentes dentro de la célula. Enlaces no covalentes como la formación de enlaces de carácter iónico o enlaces de hidrogeno tienden hacer reversible (Brown & Stine, 2006).

Los agentes tóxicos pueden interactuar con varias enzimas mitocondriales. La mitocondria es un organelo importante en la producción de energía y es esencial para la vida celular (Armstrong, 2006). Los diferentes efectos que puede causar un agente tóxico en la mitocondria consiste en:

1. Un bloqueo en la cadena de transporte de electrones, ya sea inhibiendo el complejo de enzima citocromo oxidasa (miembro de la cadena de transporte) u otros complejos de enzimas, el efecto del agente tóxico es completamente apagar el flujo de electrones en la cadena bloqueada, lo que previene que ocurra la última transferencia de electrones a una molécula de oxígeno causando una disminución en consumo de oxígeno por la célula y debido a que el gradiente de protones no se desarrolló adecuadamente ocurre una reducción en la producción de ATP (Dong et al., 2011; Brown & Stine, 2006)
2. Otra enzima mitocondrial la cual podría ser afectada por un agente tóxico es  $Mg^{++}$  ATPase, inhibidores de ATPasas bloquean la formación de ATP. La inhibición de ATPasas impide la descarga del gradiente de protones y la presión resultante causa que se reduzca el bombeo de protones, transporte de

electrones y por lo tanto la absorción de oxígeno (Murphy, 2008; Brown & Stine, 2006).

3. Otra clase de agentes tóxicos que actúan en la mitocondria son los desacopladores. Estos intervienen con dos procesos el transporte de electrones y la producción de ATP. El resultado es una estimulación en el transporte de electrones junto con la reducción de ATP. Muchos desacopladores probablemente interaccionan con proteínas o lípidos de la membrana alterando su permeabilidad, lo cual interfiere con el mantenimiento del gradiente de protones (Suen, Norris & Youle, 2008; Brown & Stine, 2006).

Estudios recientes muestran que la mitocondria juega un rol en la muerte celular cuando sus membranas se permeabilizan (Kroemer, Galluzi & Brenner, 2007). La pérdida de potencial de membrana mitocondrial se conoce que precede la apoptosis y la necrosis (Lena et al., 2009). La mitocondria juega un rol central en eventos apoptóticos a través de la liberación de citocromo c, Smac, "apoptosis inducing factor" (AIF) y endonucleasa G. (Suen et al., 2008) El ensayo basado en fluorescencia utilizando el tinte lipofílico cationico JC-1 te permite medir el potencial de membrana mitocondrial. Según el ensayo con JC-1, los compuestos ABQ48, NBQ48 y ABQ 95 tienen la capacidad de causar una despolarización en la membrana mitocondrial de los linfoblastos normales TK6. Sin embargo el compuesto NBQ95 en TK6 no afecta el potencial de membrana mitocondrial. En un estudio realizado en la línea de células TK6 tratadas con óxido nítrico, observamos que ocurrió daño al ADN, seguido de la activación de p53, el cual regula proteínas de permeabilidad mitocondrial como PUMA y NOXA, y disminuye la expresión de proteínas Bcl-2 y Bcl-x/L, lo que lleva a la

despolarización mitocondrial y la liberación de proteínas apoptóticas tales como citocromo c, SMAC, AIF y endonucleasa G que llevan a muerte celular (Li et al., 2004).

Aunque la expresión de proteínas apoptóticas no se midió en este estudio, daño al ADN pudimos observar con los compuestos NBQ 48 y NBQ95 estos causaron fragmentación de ADN en las células TK6. Esto nos puede indicar que el compuestos NBQ 48 semejante al tratamiento con óxido nítrico, al causar daño al DNA, activan p53 lo que lleva a un aumento en proteínas que intervienen en la permeabilidad de la membrana mitocondrial causando despolarización de la membrana y la liberación de proteínas que conllevan a muerte celular. Sin embargo, el compuesto ABQ48 no causó fragmentación del ADN pero si presento una despolarización en el potencial de la membrana mitocondrial en las células TK6 contrario al NQB95 que mostró el efecto opuesto que no se afectara el potencial de la membrana pero si se fragmentara el ADN. Lo que indica que el mecanismo de muerte celular de este compuestos en TK6 no involucra una relación de la mitocondria con el ADN para llevar a cabo muerte celular. Lo que puede sugerir que el modo de acción de estos compuestos es más específico, es decir que puede involucrar una cascada de eventos por medio de la ruta dependiente de mitocondria o afectar el ADN de manera negativa, lo que puede lleva a cambios en el ciclo celular y proseguir con muerte celular (Schnerch et al., 2012).

Todos los compuestos bajo estudio fueron capaces de permeabilizar la membrana mitocondrial en las células de Toledo. La despolarización de la membrana mitocondrial puede llevar a la liberación de ciertas proteínas que pueden o no activar una cascada de eventos como la activación de caspasas iniciadoras y efectoras, expresión de proteínas apoptóticas y causar cambios bioquímicos en la célula (Kroemer

et al.,2007). La presencia de estrés oxidativo puede afectar la homeostasis celular, alterando las proteínas envueltas en la reparación del ADN y activación de rutas de señalamiento envueltas en la sobrevivencia celular (Robbins & Zhao, 2012). El estrés oxidativo induce un sin número de eventos en la ruta de apoptosis, incluyendo la activación de quinasas (mitogen-activated protein kinase (MAPKs) por sus siglas en inglés; reducción del potencial de membrana mitocondrial, liberación del citocromo c, AIF de la mitocondria y la activación de caspasa (Lee et al., 2007). Los compuestos ABQ48, NBQ 48 y NBQ95 fueron capaces de fragmentar el ADN en las células de Toledo y a su vez despolarizar la membrana mitocondrial. Lo que puede sugerir que estos compuestos llevan a cabo apoptosis ya que presentan fragmentación del ADN y despolarización de la membrana mitocondrial. La ruta de señalamiento mitocondrial es mediada por la despolarización, es decir una disminución en el potencial de membrana de la mitocondria, un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, liberación de proteínas apoptóticas y la activación de caspasas (Huang et al., 2011). Estudios de activación de caspasa solo se realizaron para los compuestos NBQ48 y NBQ95, solo el compuesto NBQ48 mostró tener actividad de caspasa 3 y 7 en las células de Toledo. Lo que puede sugerir que el compuesto NBQ 95 puede llevar a cabo muerte celular independiente de caspasa (Tait & Green, 2008). El ensayo de “Annexin V” es utilizado para la detección de fosfatidilserina en la superficie de las células, un evento clave en las células apoptóticas (Tait, 2008; Shutter& Reutelings, 2010). El compuesto NBQ48 demostró tener presente la fosfatidilserina en la superficie de la célula de Toledo, lo que demuestra ser positivo para Annexin V (Datos sin publicar).

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) fue un parámetro estudiado para los compuestos ABQ95, NBQ95 y ABQ48 en las células de Toledo, en el

cual los tres compuestos generaron un aumento en especies reactivas de oxígeno (Datos sin publicar). Los datos preliminares de ROS ilustrados en la figura 17 correlacionó con los resultados de potencial de membrana mitocondrial, ya que estos tres compuestos también fueron capaces de permeabilizar la membrana mitocondrial lo que sustenta que ocurra un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno y como resultado del estrés oxidativo lleve a muerte celular. El AQB95 no causó fragmentación en el ADN, pero sí causó permeabilización de la membrana mitocondrial y se produjo un aumento en ROS, lo que sugiere que el mecanismo de muerte celular de este compuesto es mediado por la ruta dependiente de mitocondria. Estudios de expresión de proteínas proapoptóticas tales como citocromo c y activación de caspasa deben realizarse para sustentar este mecanismo de muerte celular.

La estructura de doble hélice del ADN esta propensa a problemas topológicos debido a la interrelación de sus hebras complementarias. Cualquier dificultad en el proceso de desenrollamiento de la doble hélice promueve que se afecten los procesos de transcripción, replicación, ensamblaje de cromatinas y segregación de cromosomas (Salerno et al., 2010). Las topoisomerasas son enzimas que ayudan a estabilizar el ADN y resuelven problemas de superenrollamiento que surge durante la replicación y transcripción (Shi, Marcus & Lowary, 2011). El compuesto NBQ48 mostró tener la capacidad de inhibir la topoisomera I y II (Báez et al 1995). La expresión de topoisomera I fue evaluada en las HL-60 tratadas con NBQ48, lo cual resultó en una disminución de expresión de topo I, indicando que el modo de acción de esta droga es dirigida a topo I (Torres, 1995). Estudios preliminares de expresión de topoisomerasa II fueron realizados en las células de Toledo con el compuesto ABQ48 y observamos una disminución en la expresión, lo que sugiere que el compuesto ABQ48 también puede

tener actividad antitopoisomerasa similar al compuesto NBQ48. (Datos sin publicar). La habilidad de interferir con enzimas o generar daño mediado por enzimas, en especial las topoisomerasas encargadas de la integridad genómica es una estrategia efectiva para la terapia de cáncer (Salerno et al., 2010). Los inhibidores de topoisomerasa I y II representa una clase de agentes anticancerosos. Condiciones que alteren fisiológicamente la función de las topoisomerasas, son responsables de las alteraciones en el ADN que aportan a la inhibición del progreso del ciclo celular (Ng et al., 2013; Mukherjee et al., 2010).

Inducción de arresto en el ciclo celular y apoptosis en células tumorales puede ser considerada una estrategia de tratamiento para diferentes tipos de cáncer. Existe evidencia que células tumorales pueden llevar a cabo muerte celular por medio de interrupción en el ciclo celular y apoptosis (Huang et al., 2011). El complejo (CDK1/Ciclina B) frecuentemente se está estudiando por su importancia en la regulación de la fase de G2/M. El punto de verificación G2/M juega un rol importante en la apoptosis inducida por daño al ADN (Jaganathan & Mandal, 2009).

El compuesto NBQ48 causó arresto en el ciclo celular en la fase de G2/M en las células de Toledo y TK6. Este compuesto tiene la capacidad de inhibir la expresión de topoisomerasa II, lo que sugiere que el daño en el ADN puede ser por la intervención del compuesto con la topo II, lo que provoca que se fragmente el ADN y como consecuencia el progreso en el ciclo celular se detenga. También logró afectar el potencial de la membrana mitocondrial, activó caspasa 3, 7 y presentó fosfatidilserina en la superficie de las células de Toledo, indicativo de apoptosis. Aunque en las células de TK6 no realizamos ensayos de activación de caspasa, Annexin V y expresión de

topoisomerasa, podemos sugerir que su mecanismo de acción es parecido al de las células de Toledo, ya que ocurrió fragmentación del ADN y permeabilización de la membrana mitocondrial. La citotoxicidad del compuesto NBQ48 en ambas líneas de células fue de un IC50 de 100uM, lo que sustenta que su mecanismo de acción es similar. Doxorubicin es una droga que causa arresto en diferentes fases del ciclo celular, inhibe la síntesis de ADN porque inhibe Topoisomerasa II e intercala el ADN, afectando de manera directa la transcripción y la replicación (Hosseini, Azimian, & Sahranavard, 2012).

El compuesto ABQ48 detuvo el ciclo celular en la fase de G2/M en las células de Toledo, lo que puede ser causa de la inhibición de la topoisomerasa II y la fragmentación en el ADN. Este compuesto amino causó una despolarización en la membrana mitocondrial y generó un aumento en especies reactivas de oxígeno, lo que se puede aludir que la muerte celular provocada por este compuesto es apoptosis. Ensayos de Annexin V, activación de caspasa y expresión de proteínas apoptóticas deben realizarse para confirmar el mecanismo propuesto. Sin embargo, el compuesto ABQ48 no causó fragmentación en el ADN en las células de Tk6, pero sí tuvo una disminución en el potencial de membrana mitocondrial y llevó a cabo arresto en la fase G2/M del ciclo celular. Estudios con azida de sodio  $\text{NaN}_3$  demostraron tener un comportamiento similar al ABQ48 en las células de TK6, ya que no presentaron fragmentación del ADN, pero sí una disminución en potencial de membrana mitocondrial sugiriendo que su muerte es por necrosis (Sato, Suzuki, Hoshi, Sugino & Hasegawa, 2008). Ensayos de Annexin V se deberían realizar en esta línea de células para confirmar si la muerte celular es mediada por apoptosis o necrosis. El compuesto

ABQ48 en Tk6 al tener arresto en la fase G2/M puede llevar a cabo apoptosis o necrosis (Pei-Chin & Chien-Hui, 2005).

ABQ95 a diferencia de los compuestos mencionados anteriormente, causó arresto en la fase de síntesis del ciclo celular en las células de Toledo, fragmentación en el ADN no fue observada para este compuesto. Sin embargo, ocurrió una despolarización de la membrana mitocondrial y se produjo un aumento en especies reactivas de oxígeno. Lo que sugiere que este compuesto puede llevar a cabo muerte celular mediada por la ruta dependiente de mitocondria. Aunque el arresto en la fase S puede ser una consecuencia de la inhibición de una enzima clave en la biosíntesis de purinas que pueden estar envueltas en la inhibición de la síntesis de ADN (Yazdanparast, Moosavi & Mahdavi, 2006). El compuesto NBQ95 en las células de TK6 también detuvo su ciclo en la fase de síntesis, pero si llevo a cabo fragmentación del ADN, aunque pudimos deducir que este compuesto causó muerte celular independiente de la ruta mitocondrial.

En las células de Toledo NBQ95 causó fragmentación del ADN y detuvo el ciclo celular en la fase de SubG0. Ocurrió una despolarización del potencial de la membrana mitocondrial, aumento en especies reactivas de óxigeno pero fue negativo para caspasa 3 y 7. Lo que sugiere que la ruta de muerte celular es independiente de caspasa (Tait & Green, 2008). Resultados de un estudio con Centchroman(CC) agente anticanceroso fueron similar al NBQ95 ya que causaron fragmentación del ADN, despolarización de la membrana mitocondrial y un arresto en la fase de subG0 (Nigam, Ranjan, Srivastava, Sharma & Balapure,2008).



En resumen, la capacidad de algunos de los BQS de interactuar con Topoisomerasa I y II, puede estar relacionado con su capacidad antiproliferativa, causar arrestos en el ciclo celular, fragmentación del ADN y disminución del potencial mitocondrial. Esto sugiere que su modo de acción puede ser mediado por apoptosis en las células de Toledo y TK6.

## CÁPITULO V

### CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

El objetivo principal de este estudio era demostrar los efectos citotóxicos de los compuestos BQ's en los linfoblastos normales TK6 y células de linfoma Toledo. Identificar diferencias algunas en sus posibles mecanismos de acción entre ambas líneas de células. Los hallazgos arrojados en este estudio demuestran que existen diferencias en toxicidad por compuesto. Estudiamos cuatro compuestos, dos de ellos tenían estructura similar, solo cambiaba un grupo amino por un grupo nitro. Este cambio en el grupo funcional en la estructura del compuesto, le aporta un efecto biológico diferente. El cual se pudo observar en los distintos parámetros analizados.

Este estudio reveló que el compuesto ABQ48 presentó más toxicidad en las células TK6 que en Toledo. Mientras que el compuesto NBQ48 demostró tener la misma citotoxicidad en ambas líneas de células, pero menor que el compuesto amino. Lo que sugiere que el grupo amino le aporta mayor toxicidad al compuesto. Sin embargo, el compuesto ABQ95 manifestó ser menos toxico en las TK6 que en las células de Toledo, con una diferencia significativa. Demostrando que las células TK6 tienen mayor grado de resistencia al compuesto. En cambio, el compuesto nitrogenado NBQ95 fue más tóxico que el compuesto amino en ambas líneas de células. Estas diferencias en toxicidad sustentan que existe una relación entre estructura y actividad

del compuesto, el cual varía según las modificaciones realizadas en el compuesto. Los resultados de IC50 observados demuestran que el tipo de células también aporta a la resistencia al compuesto.

En el análisis de potencial de membrana mitocondrial, observamos que todos los compuestos estudiados fueron capaces despolarizar la membrana mitocondrial en las células de Toledo. Mientras que en las células TK6, el único compuesto que no causó permeabilización en la mitocondria fue el NBQ95. Basado en estas observaciones, los BQ's pueden estar llevando a cabo muerte celular mediada por la ruta mitocondrial, ya que además de causar despolarización en la mitocondria, también tienen la capacidad de generar un aumento en especies reactivas de oxígeno. Aunque en algunos casos pueden causar muerte celular independiente a la ruta mitocondrial e involucrar una ruta relacionada al ADN.

Otro parámetro que indica que los compuestos BQs pueden estar llevando a cabo apoptosis es su capacidad de fragmentar el ADN y causar arrestos en el ciclo celular. El compuesto ABQ48 causó fragmentación en el ADN en las células de Toledo y arresto en la fase de G2/M del ciclo celular. ABQ48 también tuvo la capacidad de inhibir la expresión de la topoisomerasa II en las células de Toledo, lo que puede correlacionar que el daño al ADN es por la inhibición de la topo II y como consecuencia no prosiga el ciclo celular. A pesar que este compuesto también causó un arresto en la fase G2/M en las células TK6, no fragmentó el ADN, pero sí ocurrió permeabilización en la membrana mitocondrial y aumento en especies reactivas de oxígeno. Lo que nos hace pensar que debido a su alta toxicidad en las células TK6, su mecanismo de acción envuelve permeabilidad de la mitocondria y su tipo de muerte celular es necrosis. El

compuesto ABQ95 no fragmentó el ADN en Toledo, pero detuvo el ciclo celular en la fase de síntesis. El arresto en la fase S puede ser a causa de una inhibición en alguna enzima clave en la síntesis de ADN. El compuesto NBQ95 también detuvo el ciclo celular en la fase de síntesis para las células TK6 y causó fragmentación en ADN. Sin embargo, no afectó el potencial de la membrana mitocondrial. Esto sugiere que el mecanismo de muerte celular es independiente de la ruta mitocondrial y puede envolver proteínas reguladoras envueltas en transcripción y replicación del ADN. En las células Toledo NBQ95 fragmentó el ADN y causó arresto en la fase SubG0, el primer punto de cotejo del ciclo celular. Este compuesto actuó distinto en Toledo que en TK6, ya que si afectó el potencial de membrana mitocondrial, fragmento el ADN, causó arresto en el ciclo celular y fue negativo para activación de caspasa 3 y 7. Los que nos dirige a que el mecanismo de muerte celular del compuesto NBQ95 en Toledo es apoptosis independiente de caspasa.

El compuesto NBQ48 actuó similar en ambas líneas de células causando el mismo grado de toxicidad, fragmentación del ADN, permeabilización en la membrana mitocondrial y arresto en el ciclo celular en la fase de G2/M. También causó activación de caspasa 3 y 7 en las células Toledo, lo que nos dirige a concluir que el mecanismo de muerte celular es apoptosis. También hay que resaltar que este compuesto NBQ48 tiene la capacidad de inhibir topoisomerasa I y II en distintas líneas de células. Esta actividad antitopoisomerasa puede influir en el modo de acción del compuesto.

Finalmente, podemos concluir que el mecanismo de muerte celular de la mayoría de los compuestos BQ's estudiados es a través de la apoptosis, ya que puede causar fragmentación en el ADN, arresto en el ciclo celular, permeabilización de la

membrana mitocondrial y su ruta puede ser dependiente e independiente de la activación de caspasas.

Para fines de futuros trabajos, debemos realizar estudios de expresión de proteínas que están envueltas en la ruta de señalamiento de apoptosis, tales como citocromo c, AIF, Bax, Bcl-2 y caspasas. También se deben medir la activación de proteínas relacionadas al ciclo celular como p21, ciclinas y quinasas. Otro parámetro que se debe tener en consideración para futuros experimentos es cambiar el tiempo de exposición a diferentes largos de tiempos tales como 6h, 12h o 24h para así poder identificar si el efecto biológico en la célula cambia a medida que aumenta el tiempo de exposición.

Estudios de los efectos citotóxicos de los BQ's en diferentes tipos de cáncer y llevar a cabo estudios genéticos aportarían a entender mejor el mecanismo de acción de los compuestos bajo estudio.

## LITERATURA CITADA

- Abdullah, L. & Chow, E. (2013). Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine*, 2:3, DOI:10.1186/2001-1326-2-3
- Agency for Toxic Substance & Disease Registry. (2012). Cancer and the environment. Retrieved <http://www.atsdr.cdc.gov/risk/cancer/cancer-introduction.html>
- Alegría, A., Flores, W., Cordones, E., Rivera, L., Sánchez, P., Cordero, M. & Cox, O. (2004). Reductive activation and thiol reactivity of benzazolo[3,2-a]quinolinium salts. *Toxicology*. 199(2-3): 87-96.
- American Cancer Society (2012). *Cancer facts & figures 2012*. Atlanta: American Cancer Society (No. 500810). Atlanta, United States: Department of Surveillance and Health Policy Research.
- Armstrong, J. (2006). Mitochondria: a target for cancer therapy. *British journal of pharmacology*, 147,239-248. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706556
- Báez, A., González, F., Vazquez, D., & Waring, M. (1983). Interaction between a 3-nitrobenzothiazolo(3,2-a)quinolinium antitumor drugs and deoxyribonucleic acid. *Biochemical Pharmacology*, 32(13): 2089-2094. doi: 10.1016/0006-2952(83)90431
- Báez, A., Riou, J.F., Le Pecq, J.B. & Riou, G. (1995). Interaction of DNA intercalator 3-nitrobenzothiazolo(3,2-a)quinolinium with DNA topoisomerases: a possible-mechanism for its biological activity. *Molecular Pharmacology*, 37(3): 377-382.
- Bai, P., Xiao, X., Zou, J., Cui, L., Bui, T., Liu, J., & Wang, H. (2012). Expression of p14 (ARF), p15 (INK4b), p16(INK4a) and skp2 increases during esophageal squamous cell cancer progression. *Experimental and therapeutic medicine*, 3:6, 1026-1032. DOI: 10.3892/etm.2012.523
- Brandt-Rauf, P., Y.Li., Long, C., Monaco, R., Kowali, G., & Marion, M. (2012). Plastics and carcinogenesis: The example of vinyl chlorride. *Journal of Carcinogenesis*, 11:5. DOI: 10.4103/1477-3163.93700
- Brown, T. & Stine, K. (2006). *Principles of Toxicology*. Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida.
- Buron, N., Porceddu, M., Brabant, M., Desgué, Racoeur, C., Lassalle, M. & Borgne, A. (2010). *PlusOne*, 5:3, e9924. DOI: 10.1371/journal.pone.0009924
- Casiano, C., & Báez, A. (1986). Effects of the antitumor drug 3-nitrobenzothiazolo[3,2-a]quinolinium and fagaronine on nucleic acid and protein synthesis. *Biochemical Pharmacology*. 35(4): 679-685.

- Centers for Disease Control and Human Services. (2010). Efectos del cáncer en la nación. *Registros y Vigilancia del Cáncer*. Atlanta, USA: Department of Health and Human Services. Recuperado de <http://www.cdc.gov/spanish/cancer/fs/2004/npcr.htm>
- Chial, H. (2008). Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature education*
- Cowling, V., & Downward, J. (2002). Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome-c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death & Differentiation*, 9:10, 1046-1056 doi:10.1038/sj.cdd.4401065
- Cox, O., Dumas, J., Rivera, L., García, C., & Alegría, A. (1999). Electrochemical and Electron Spin Resonance Studies of Selected Benzazolo[3,2-a]quinolinium Salts. *Journal Heterocyclic Chemistry*, 36, 943
- Cox, O., Jackson, H., Vargas, V., Baez, A., Colón, L., González, B. & de León, M. (1982). Synthesis and biological activity of benzothiazolo- and benzoxazolo[3,2-a]quinolinium salts. *Journal of Medicinal Chemistry*, 25(11): 1378-1381. doi: 10.1021/jm00353a020
- Denicourt, C. & Dowdy, S. (2004). Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes & Development*, 18, 851-855. DOI: 10.1101/gad.1205304
- Department of Health and Human Services. (2006). Part 864: Hematology and pathology devices. *Code of Federal Regulations*. Title 21, volume 8.
- Dong, L., Jameson, V., Tilly, D., Cerny, J., Mahdavian, E., Marín, A. & Neuzil, J. (2011). Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *The Journal of biological chemistry*, 286:5, 3717-3728. DOI: 10.1074/jbc.M110.186643
- El-Awady, R., Saleh, E. & Awward, H. (2002). Apoptosis, p53 and DNA Damage in Human Lymphoblast Cells: Relation to Cell Death after Radiation. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 14:1, 59-65.
- Environmental Protection Agency. (2000). *Risk characterization handbook* (EPA 100-B-00-002). Washington D.C., United States: Office of Research and Development
- Gillick, K. & Crompton, M. (2008). Evaluating cytochrome c diffusion in the intermembrane spaces of mitochondria during cytochrome c release. *Journal of cell science*, 121:pt 5, 618-626. DOI:10.1242/jcs.021303
- Golan, D., Tashjan, A. & Armstrong, E. (2011) *Principles of Pharmacology The pathophysiologic basis of drug therapy*.
- Golubnitschaja, O., Yeghiazaryan, K., Costigliola, V., Trog, D., Braun, M., Debal, M., Kuhn, W. & Schild, H. (2013). Risk assessment, disease prevention and personalised treatments in breast cancer: is clinically qualified integrative approach in the horizon. *The EPMA Journal*, 4:6. DOI: 10.1186/1878-5085-4-6

- Gómez, C., Carpeño, J., & González, M. (2007). Factores etiológicos del cáncer de pulmón: fumador activo, fumador pasivo, carcinógenos medioambientales y factores genéticos. *Medicina Clínica*, 128:10, 390-396. DOI: 10.1157/13099973
- González, F., Llende, M., Báez, A. & Ortiz, J. (1987). The antitumor drug 3-nitrobenzothiazolo[3,2-*a*]quinolinium chloride (NBQ): Effects on lens regeneration and interaction with DNA of *Notophthalmus viridescens*. *Differentiation*. 36(2): 125-129.
- González, S., & Serrano, M. (2006). A New Mechanism of Inactivation of the INK4 / ARF Locus Extra View ND ES SC. *Cell Cycle*, 5:13,1382-1384
- Green, D. & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305,626-629. 10.1126/science.1099320
- Hamouchene, H., Arlt, V., Giddings, I., & Phillips, D. (2011). Influence of cell cycle on responses of MCF-7 cells to benzo [ a ] pyrene. *BMC Genomics*, 12:1, 333. DOI: 10.1186/1471-2164-12-333
- He, C., Rong, R., Liu, J., Wan, J., Zhou, K. & Kang, J. (2012). Effects of Coptis extract combined with chemotherapeutic agents on ROS production, multidrug resistance, and cell growth in A549 human lung cancer cells. *Journal of Chinese medicine*, 7:1 DOI: 10.1186/1749-8546-7-11
- Henderson, J. (1969). Variation in Selective Toxicity: Causes and Consequences. *Cancer Research*, 29:2404-2406.
- Holley, A., Sanjit, D. & St Clair, D. (2010). Manganese superoxide dismutase versus p53: the mitochondrial center. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201, 72-78 DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05612.x
- Honda, A., Valogne, Y., Bou, M., Bréchet, C., & Faivre, J. (2012). An intron-retaining splice variant of human cyclin A2, expressed in adult differentiated tissues, induces a G1/S cell cycle arrest in vitro. *PlosOne*, 7:6, e39249. DOI: 10.1371/journal.pone.0039249
- Hosseini, G., Azimian, V., & Sahranavard, P. (2012). Combined Treatment of Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Line DU145 with Chemotherapeutic Agents and Lithium Chloride: Effect on Growth Arrest and/or Apoptosis. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 4:2, 75-87.
- Huang, W., Ko, S., Tsai, H., Chung, J., Chiang, J., Chen, K. & Yang, J. (2011). Cantharidin induces G2/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colon 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways. *International journal of oncology*, 38:4, 1067-1073. DOI: 10.3892/ijo.2011.922
- Indo, H., Davidson, M., Yen, H., Suenaga, S., Tomita, K., Nishii, T. & Majima, H. (2007). Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport



- chain and mitochondrial DNA damage. *Journal Mitochondrion*, 7:1, 106-118. DOI: 10.1016/j.mito.2006.11.026
- Jaganathan, S. & Mandal, M. (2009). Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *Journal of biomedicine & biotechnology*, DOI: 10.1155/2009/830616
- Jalili, A., Wagner, C., Pashenkov, M., Pathria, G., Mertz, K., Widlund, H. & Wagner, S. (2012). Dual Suppression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors CDKN2C and CDKN1A in Human Melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 104:21, 1673-1679. DOI: 10.1093/jnci/djs373
- Jianping, D. (2010) Mutation of mitochondria genome: trigger of somatic cell transforming to cancer cell. *International Archives of Medicine*,3, 1-3
- Johnson, D., & Walker, C. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual review of pharmacology and toxicology*. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.295
- Jung, S., Verdicchio, M., Kiefer, J., Hoff, D., Berens, M., Bittner, M., & Kim, S. (2013). Learning contextual genes set interaction networks of cancer with condition specificity. *BMC Genomics*, 14:110 DOI: 10.1186/1471-2164-14-110
- Junta de Calidad Ambiental. (1997). Reglas (580-586): *Desperdicios biomédicos regulados. Reglamento para el manejo de desperdicios sólidos no peligrosos*. Reglamento No. 5717.
- Kang, M., & Patrick, C. (2009). Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 15, 1126-1132
- Kim, H., Kim, J., Whan, S., Wu, H., Choi, J., Lee, K., & Kang, S. (2012). Changes in biologic markers of oxidative stress and plasma endotoxin levels in gynecologic cancer patients treated with pelvic radiotherapy: a pilot study. *Journal of gynecologic oncology*, 23:2, 103-109. DOI: 10.3802/jgo.2012.23.2.103
- Klaasen, C. (2008). *Casarett and Doull Toxicology- The basic science of poisons*. McGraw-Hill. Kansas City, Kansas
- Kleinsmith, L. J. (2006). *Principles of cancer biology*. San Francisco, California: Pearson Benjamin Cummings.
- Korbecki, J., Baranowska, I., Guotwska, I. & Chlubek. (2012). Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta biochimica Polonia (ABP)*, Vol 59, No 2,195-200 PMID: 22693688
- Kovacic, P., Ames, J., Lumme, P., Elo, H., Cox, O., Jackson, H., et al. (1986) Charge transfer-oxy radical mechanism for anti-cancer agents. *Anti-Cancer Drug Desing*, 1, 197-214

- Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiology Reviews*, 87: 99-163. doi: 10.1152/physrev.00013.2006
- Lagha, A., Chraiet, N., Ayadi, M., Krimi, S., Allani, B., Rifi, H., Raies, H. & Mezlini, A. (2012). Systemic therapy in the management of metastatic or advanced salivary gland cancers. *Head & Neck Oncology*, 4:19
- Lee, M., Kang, S., Pocz, M., Song, K. & Park. (2007). Resveratorl protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine. *Experimental and Molecular Medicine*, 39:3, 376-384
- Lee, Y., Won, A., Lee, J., Jung, J., Yoon, S., Lee, B. & Kim, H. (2012). Molecular mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. *International journal of medical sciences*, 9:10, 881-893. 10.7150/ijms.5011
- Lena, A., Rechichi, M., Salvetti, A., Bartoli, B., Vecchio, D., Scarcelli, V., et al. (2009). Drugs targeting the mitochondrial pore act as cytotoxic and cytostatic agents in temozolomide-resistant glioma cells. *J Transl Med*, 7, 13.
- Li, C., Robles, A., Hanigan, C., Hofseth, L., Trudel, L., Harris, C. & Wogan, G. (2004). Apoptotic signaling pathways induced by Nitric Oxide in human lymphoblastoid cells expressing wild-type or mutant p53. *Cancer Research*, 64, 3022-3029
- Logue, S. & Martin, S. (2008). Caspase activation cascade in apoptosis. *Biochemical Society transactions*, 36: Pt 1, 1-9. DOI: 10.1042/BST0360001
- Lymphoma Research Foundation [LRF] (2011). Understanding Hodgkin Lymphoma. Cavallo, J. & Coleman, M. Retrieved <http://www.lymphoma.org/site/pp.asp?c=bkLTKaOQLmK8E&b=6293111>
- Lymphoma Research Foundation (2011). Understanding Non-Hodgkin Lymphoma. Cavallo, J. & Coleman, M. Retrieved <http://www.lymphoma.org/site/pp.asp?c=bkLTKaOQLmK8E&b=6292453>
- Matsuzaki, H., Maeda, M., Lee, S., Nishimura, Y., Kumagai, N., Yammamoto, S. & Otsuki, T. (2011). Asbestos-induced cellular and molecular alteration of immunocompetent cells and their relationship with chronic inflammation and carcinogenesis. *Journal of biomedicine & biotechnology*. Doi: 10.1155/2012/492608
- Mayo Clinic Organization (2012). Stem cells. Retrieved by <http://www.mayoclinic.org/news2012-rst/7184.html>
- Mukherjee, A., Dutta, S., Shanmugavel, M., Mondhe, D., Sharma, P. & Singh, S. (2010). 6-Nitro-2-(3-hydroxypropyl)-1H-benz[de]isoquinoline-1,3-dione, a potent antitumor agent, induces cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29:175. DOI: 10.1186/1756-9966-29-175

- Murphy, M. P. (2008). Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1777(7-8), 1028-1031
- Murray, A. (2004). Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Journal Cell*, 116:2, 221-224
- National Cancer Institute. (2007). SEER Cancer Statistics Review. US Department of Health and Human Services. Washington DC. US gov, printing office.
- National Cancer Institute. (2010). What you need to know about non-hodgkin lymphoma. US Department of Health and Human Services. Washington DC. US gov, printing office.
- National Cancer Institute. (2012). Cancer. US Department of Health and Human Services. Washington DC. US gov, printing office.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (2011). Immune System Retrieved <http://www.niaid.nih.gov/topics/immuneSystem/Pages/whatIsImmuneSystem.aspx>
- National Institute of Health. (2010). *Cancer and the environment; what you need to know, what you can do*. (NIH Publication No. 03-2039). Maryland, United States: US Department of Health and Human Services.
- Ng, K., Bustamam, A., Aspollah, M., Ibrahim, S., Mohan, S., Buckle, M. & Rahman, S. (2013). Induction of selective cytotoxicity and apoptosis in human T4-lymphoblastoid cell line (CEMss) by boesenbergin an isolated from boesenbergia rotunda rhizomes involves mitochondrial pathway, activation of caspase 3 and G2/M phase cell cycle arrest. *BMC complementary and alternative medicine*, 13:41 DOI: 10.1186/1472-6882-13-41
- Nigam, M., Ranjan, V., Srivastava, S., Sharma, R. & Balapure, AK. (2008). Centchroman induces G0/G1 arrest and caspase-dependent apoptosis involving mitochondrial membrane depolarization in MCF-7 and MDA MB-231 human breast cancer cells. *Life Science*, 82, 577-590. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.11.028
- Organización Mundial de la Salud. (2013). Cáncer .Nota descriptiva N297
- Ortega, A., Mena, S. & Estela, J. (2011). Glutathione in Cancer Cell Death. *Journal Cancers*, 3:1, 1285-1310. DOI:10.3390/cancers3011285
- Ostroff, R., Mehan, A., Stewart, A., Ayers, D., Brody, E., Williams, S., Levin, S. & Pass, H. (2012) Early detection of malignant pleural mesothelioma in asbestos-exposed individuals with a noninvasive proteomics-based surveillance tool. *Plos one*, 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0046091
- Otieno, S. & Kriwacki, R. (2012). Probing the Role of Nascent Helicity in p27 Function as a Cell Cycle Regulator. *Plos one*, 7:10. DOI: 10.1371/journal.pone.0047177
- Park, E. J. & Park, K. (2007). Induction of reactive oxygen species and apoptosis in BEAS-2B cells by mercuric chloride. *Toxicology In Vitro*, 21(5), 789-794.

- Pei-Chin, L. & Chien-Hui, L. (2005). Cell cycle specific induction of apoptosis and necrosis by paclitaxel in the leukemic U937 cells. *Life Sciences*, 76:14, 1623-1639
- Petrosillo, G., Ruggiero, F. & Paradies, G. (2003). Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 17:15. DOI:10.1096/fj.03-0012com
- Pollard, T. & Earnshaw, W. (2004). *Cell Biology*. Saunders Elsevier, Inc. Philadelphia, Pennsylvania.
- Robbins, D. & Zhao, Y. (2012). Oxidative Stress Induced by MnSOD-p53 Interaction: Pro- or Anti-Tumorigenic. *Journal of signal transduction*. DOI: 10.1155/2012/101465
- Salerno, S., Settimo, D., Taliani, F., Simorni, C., Motta, L., Fornaciari, G. & Marini, A. (2010). Recent advances in the development of dual topoisomerase I and II inhibitors as anticancer drugs. *Current medicinal chemistry*, 17: 4270-4290
- Santin, G., Scietti, L., Veneroni, P., Barni, S., Bernocchi, G. & Grazia, M. (2011). Effects of Cisplatin in Neuroblastoma Rat Cells: Damage to cellular organelles. *International Journal of Cell Biology*. DOI:10.1155/2012/424072
- Sato, E., Suzuki, T., Hoshi, N., Sugino, T. & Hasegawa, H. (2008). Sodium azide induces necrotic cell death in rat squamous cell carcinoma SCC131. *Medical Molecular Morphology*, 4:211-220
- Schaue, D. & McBride, W. (2012). T lymphocytes and normal tissue responses to radiation. *Frontiers in oncology*, 2, 119. DOI: 10.3389/fonc.2012.00119
- Schnerch, D., Yalcintepe, A., Schmidts, A., Becker, H., Follo, M., Engelhardt, M. & Wäsch, R. (2012) Cell cycle control in acute myeloid leukemia. *American journal of cancer research*, 2,508-28. ISSN:2156-6976/ajcr0000132
- Scicchitano, D. & Mellon, I. (1997). Transcription and DNA damage: a link to a kink. *Environmental Health Perspective*, 105: 145-153
- Sclafani, F., Vincenzo, D., Rimassa, L., Bertuzzi, G., Pressiani, E., Stroppa, S. & Santoro, A. (2010). Different toxicity profile of sorafenib across various types of cancer. *Journal of Clinical Oncology*
- Shi, W., Marcus, S. & Lowary, T. (2011). Cytotoxicity and topoisomerase I/II inhibition of glycosylated 2-phenyl-indoles, 2-phenyl-benzo[b]thiophenes and 2-phenyl-benzo[b]furans. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19:603-612. DOI: 10.1016/j.bmc.2010.10.054
- Shirsath, N., Manohar, S. & Joshi, K. (2012). P276-00, a cyclin-dependent kinase inhibitor, modulates cell cycle and induces apoptosis in both in vitro and in vivo mantle cell lymphoma cell lines. *Journal of Molecular Cancer*, 11:77. DOI: 10.1186/1476-4598-11-77

- Shutters, K. & Reutelings, C. (2010). Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 15:9, 1072-1082. DOI: 10.1007/s10495-010-0503-y
- Singh, U., Roswall, P., Uhrbom, L. & Westermarck, B. (2011). CGGBP1 regulates cell cycle in cancer cells. *BMC molecular biology*, 12, 28. DOI:10.1186/1471-2199-12-28
- Smith, R. A., Adlam, V. J., Blaikie, F. H., Manas, A. R., Porteous, C. M., James, A. M., et al. (2008). Mitochondria-targeted antioxidants in the treatment of disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 105-111.
- Starr, C. & Taggart, R. (2004). *Biologia: La unidad y diversidad de la vida*. International Thomson Editors. Mexico
- Stiborova, M., Rupertova, M., Schmeister, H., & Frei, E. (2006). Molecular Mechanisms of Antineoplastic Action of an Anticancer Drug Ellipticine. *Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University Olomouc, Czech Republic*, 150 (1):13-23.
- Suen, D. Norris, K. & Youle, R. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & development*, 22:12, 1577-1590. DOI: 10.1101/gad.1658508
- Sun, P. & Juskevicius, R. (2012). Histological and immunohistochemical features of the spleen in persistent polyglonal B-cell lymphocytosis closely mimic splenic B-cell lymphoma. *Diagnostic pathology*. Doi: 10.1186/1746-1596-7-107
- Suzuki, K. & Matsubara, H. (2011). Recent advances in p53 research and cancer treatment. *Journal of biomedicine & biotechnology*. DOI: 10.1155/2011/978312
- Szabadkai, G. & Duchon, M. (2008). Mitochondria: the hub of cellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Physiology, News in Physiological Science*, 23, 84-94. DOI: 10.1152/physiol.00046.2007
- Szewczyk, A. & Wojtczak, L. (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Journal Pharmacological reviews* 54:1, 101-127.
- Tait, J. (2008). Imaging of apoptosis. *Journal of nuclear medicine*, 49:10, 1573-1576, doi:10.2967/jnumed.108.052803
- Tait, S. & Green, D. (2008). Caspase independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*, 27:50, 6452-6461. DOI: 10.1038/onc.2008.311
- Taylor, W. & Stark, G. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20:15, 1803-1815, DOI: 10.1038/sj.onc.1204252
- Torres, R. (1995). Correlation between cytotoxicity and the ability to inhibit DNA topoisomerase I by a group of NBQ analogues. Thesis. University of Puerto Rico, Rio Piedras

- Vaclavik, E., Sorensen, M., Gaudreau, E., LeBlanc, A., Thorup, K., Tjonneland. & Raaschou, O. (2012). A Prospective Study of Organo chlorines in Adipose Tissue and Risk of Non - Hodgkin Lymphoma. *Environmental Health Perspective*, 120:107-11
- Vivas-Mejías, P.E., Rodríguez-Cabán, J.L., Díaz-Velázquez, M., Hernández-Pérez, M.G., Cox, O. & González F.A. (1997). DNA binding-independent anti-proliferative action of benzazolo[3,2 a]quinolinium DNA intercalators. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 177: 69-77.
- Waterhouse, N., Goldstein, J., Ahsen, O., Shuler, M. & Newmeyer, D. (2001). Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *The Journal of cell biology*, 153:2, 319-328.
- Weinberg, Robert A. (2007). *The biology of cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. USA
- Yazdanparast, R., Moosavi, M. & Mahdavi, M. (2006). Guanosine 5'-triphosphate induces differentiation-dependent apoptosis in human leukemia U937 and KG1 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27:9, 1175-1184. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2006.00364.x
- Zabaleta, J. (2012). MicroRNA: A Bridge from H. pylory Infection to Gastritis and Gastric Cancer Development. *Frontiers in Genetics*, 3:294.doi: 10.3389/fgene.2012.00294
- Zayas, B., Beyley, J., Terron, M., Cordero, M., Hernandez, W., Alegría, A. E. & Cox, O. (2007). Comparison of the nucleic acid covalent binding capacity of two nitro-substituted benzazolo[3,2-a]quinolinium salts upon enzymatic reduction. *Toxicology in Vitro*, 21(6): 1151-116. doi: 10.1016/j.tiv.2007.03. 004.

## FIGURAS

<b>BQ'S COMPOUNDS</b>	<b>TK6 CELLS</b>	<b>TOLEDO CELLS</b>
ABQ48	8.6 $\mu$ M	50 $\mu$ M
NBQ48	100 $\mu$ M	100 $\mu$ M
ABQ95	270 $\mu$ M	16 $\mu$ M
NBQ95	33 $\mu$ M	14.6 $\mu$ M

*Figura 1.* Determinación de la concentración inhibitoria (IC50) en células Tk6 y Toledo.



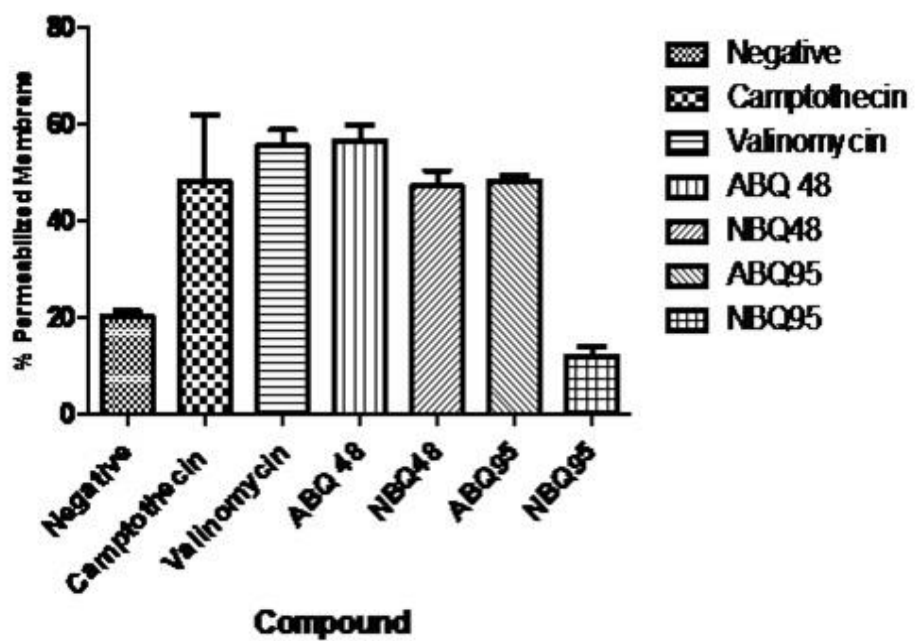


Figura 2. Gráfica de potencial de membrana mitocondrial en las células Tk6.

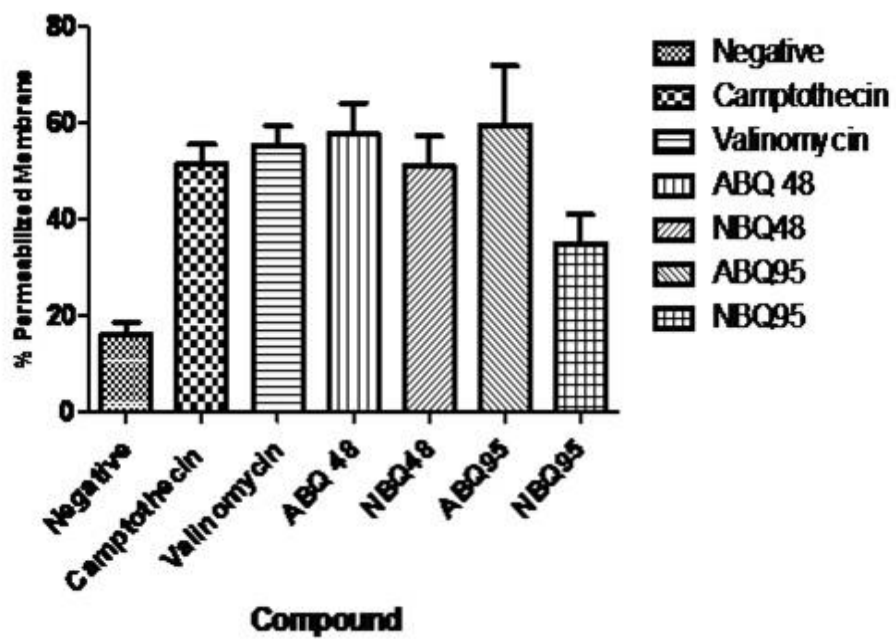


Figura 3. Gráfica de potencial de membrana mitocondrial en las células Toledo

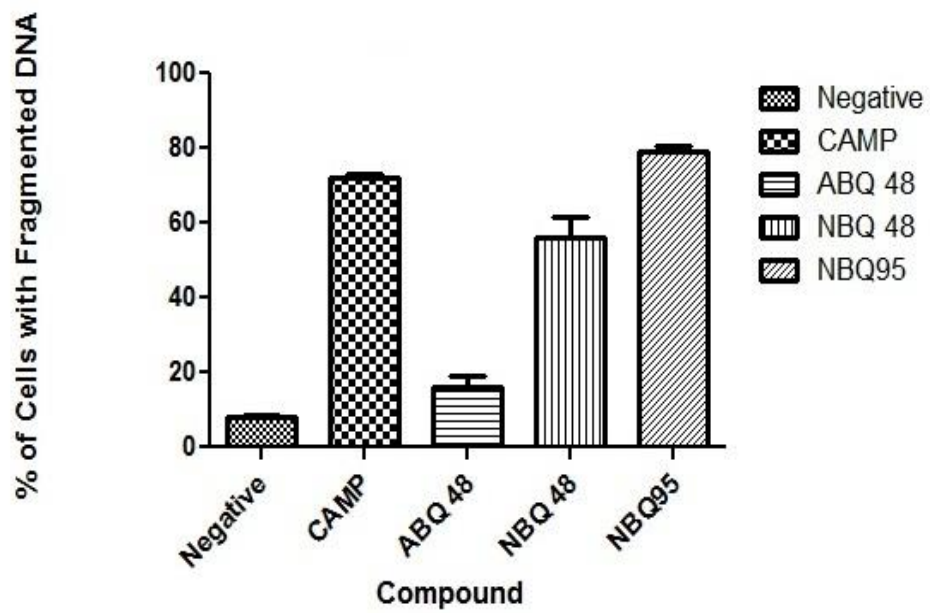


Figura 4. Gráfica de fragmentación de ADN en células TK6

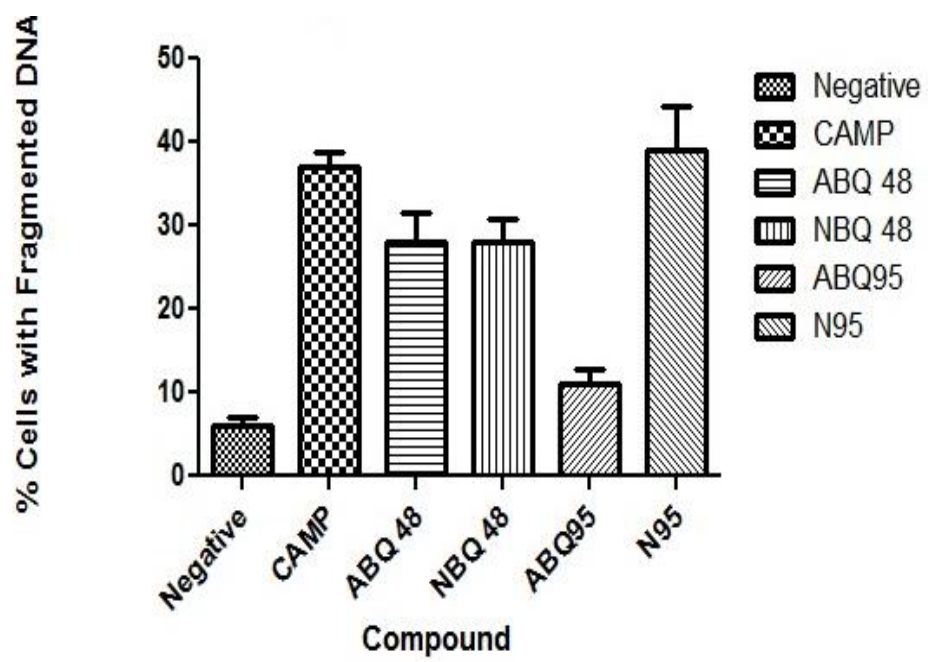


Figura 5. Gráfica de fragmentación de ADN en células Toledo

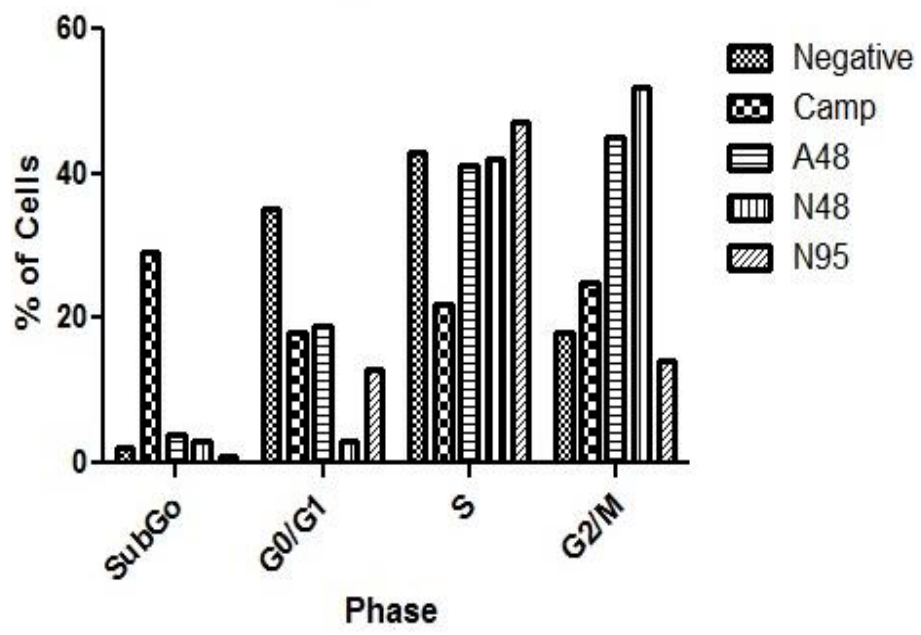


Figura 6. Gráfica de las diferentes fases del ciclo celular en las células TK6.

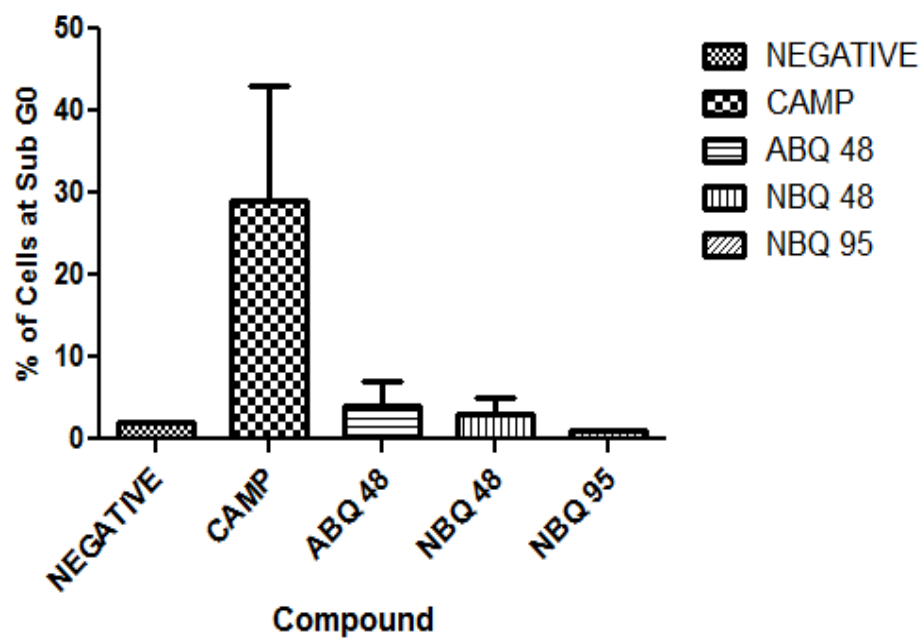


Figura 7. Gráfica de células Tk6 tratadas con BQS en la fase SubG0 del ciclo celular

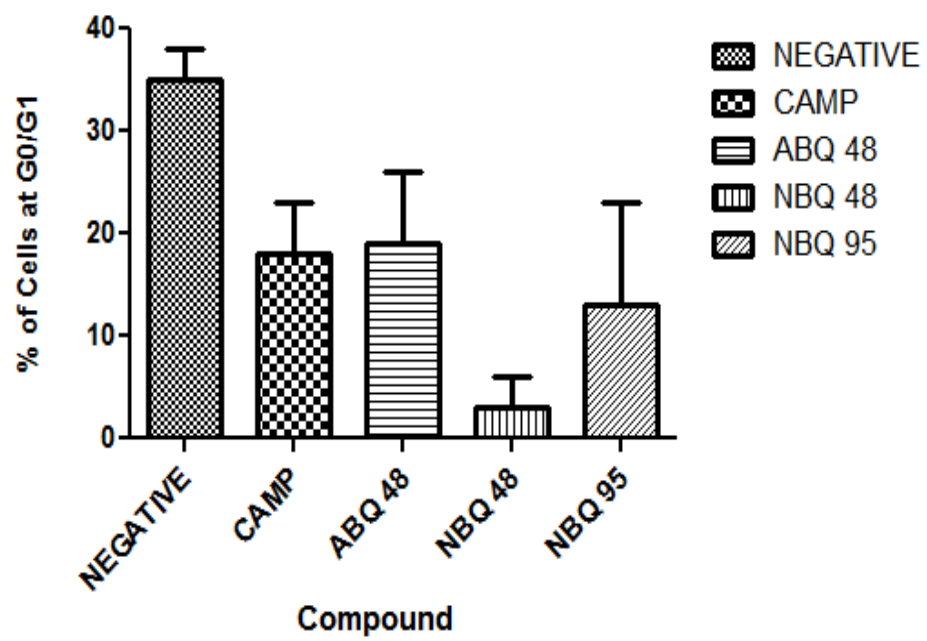


Figura 8. Gráfica de células Tk6 tratadas con BQS en la fase G0/G1 del ciclo celular

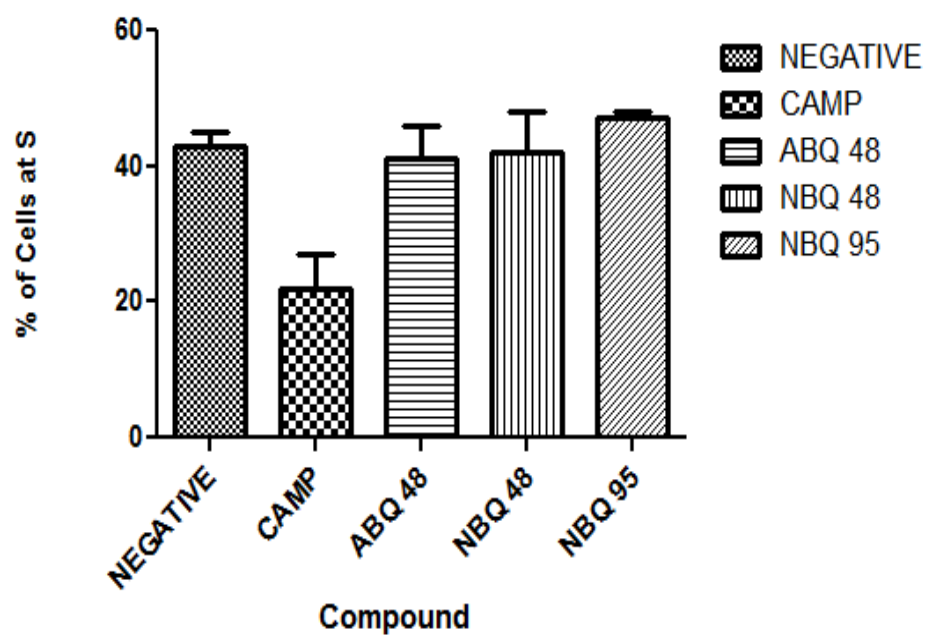


Figura 9. Gráfica de células Tk6 tratadas con BQS en la fase S del ciclo celular



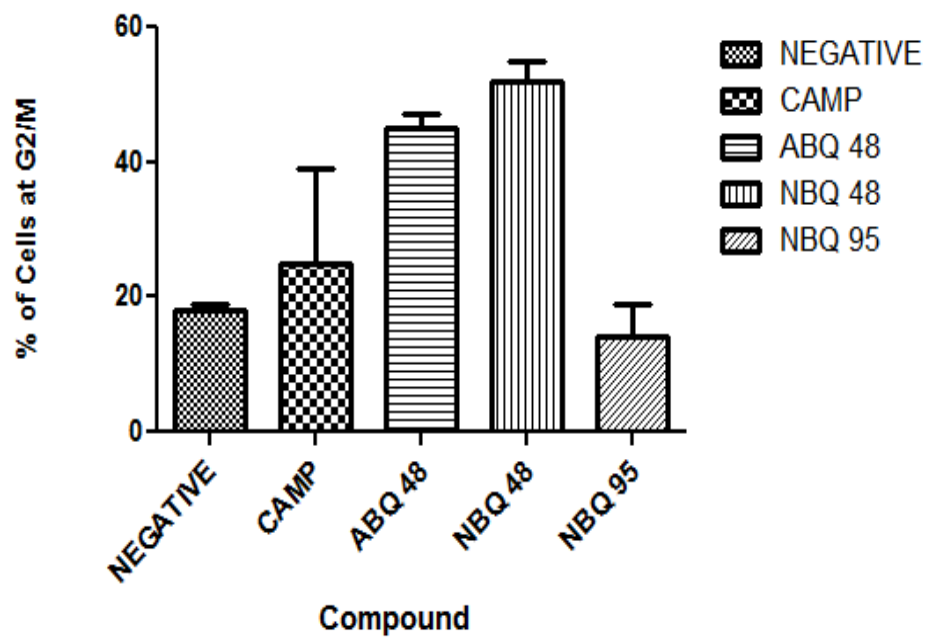


Figura 10. Gráfica de células Tk6 tratadas con BQS en la fase G2/M del ciclo celular

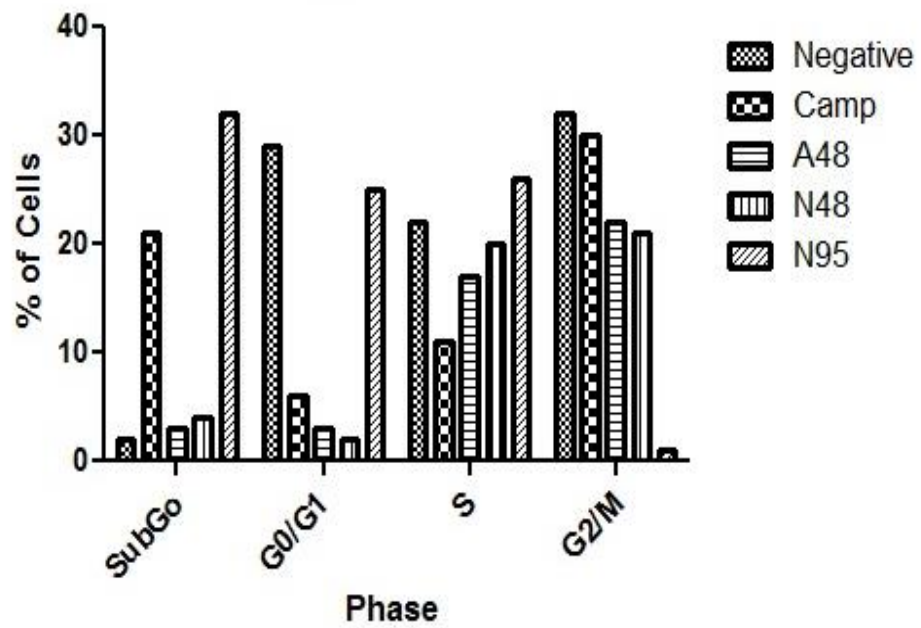


Figura 11. Gráfica de las diferentes fases del ciclo celular en las células Toledo

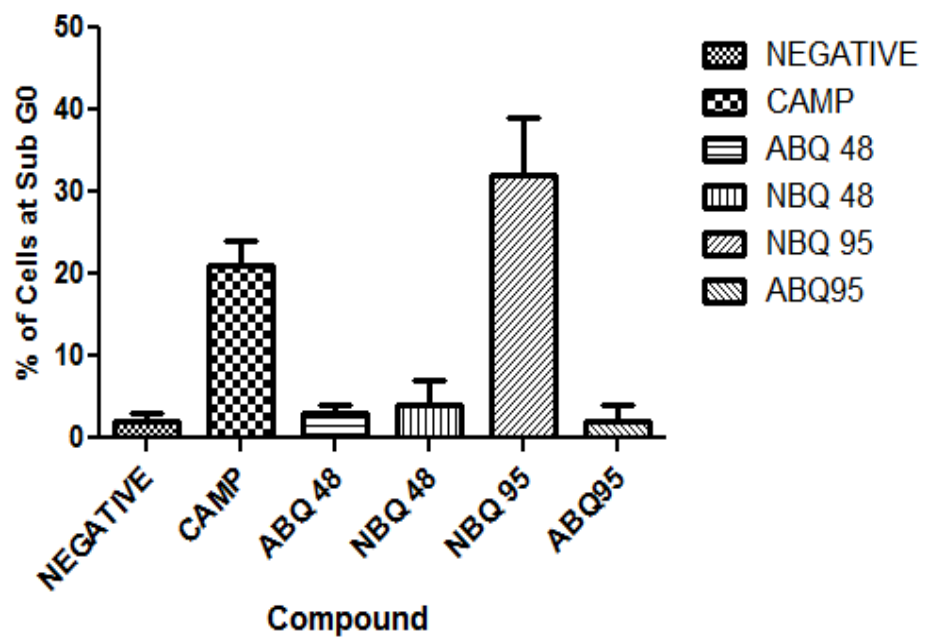


Figura 12. Gráfica de células Toledo tratadas con los BQS en la fase de SubGo

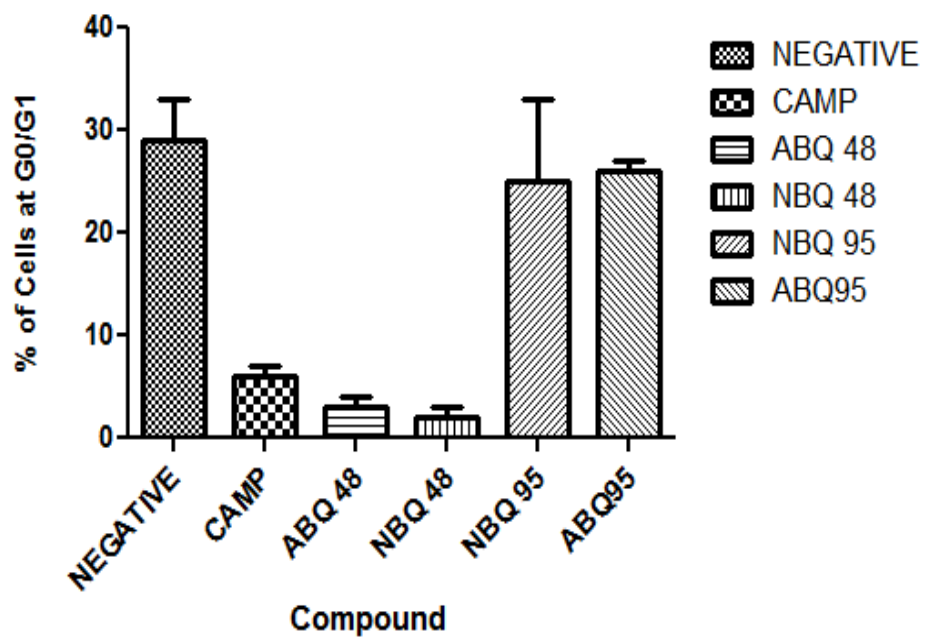


Figura 13. Gráfica de células Toledo tratadas con los BQS en la fase de G0/G1

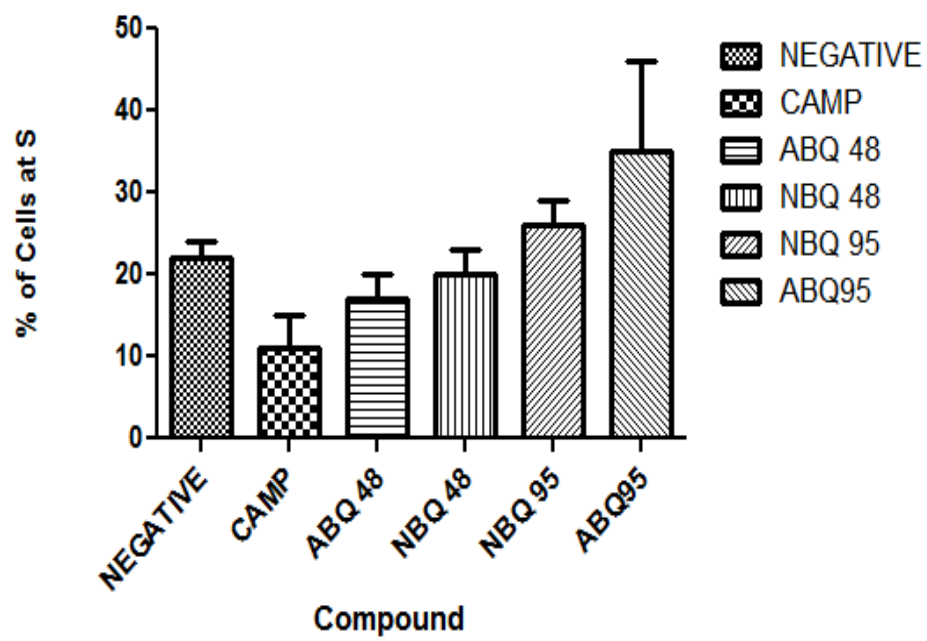


Figura 14. Gráfica de células Toledo tratadas con los BQS en la fase de S

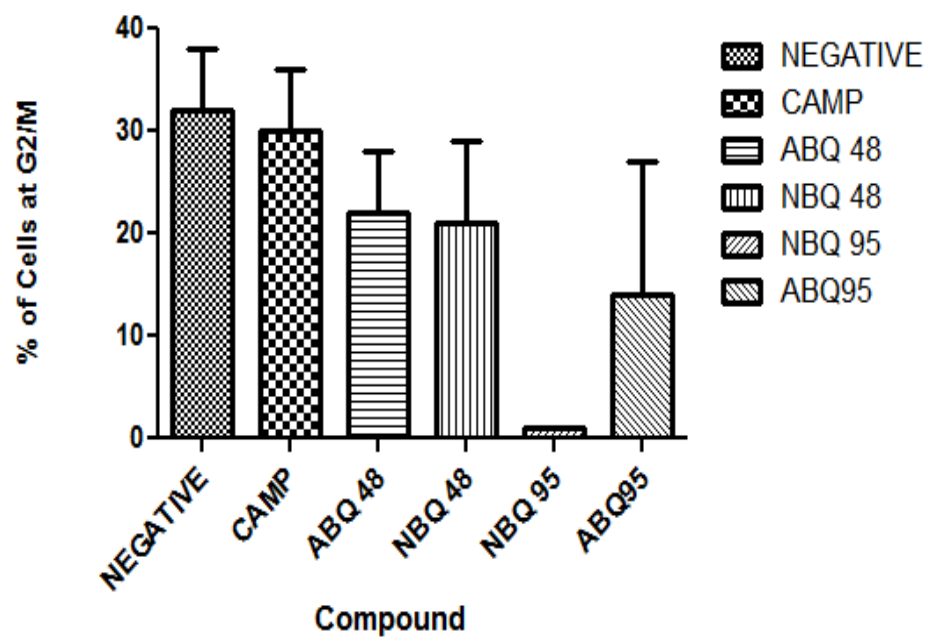


Figura 15. Gráfica de células Toledo tratadas con los BQS en la fase de G2/M

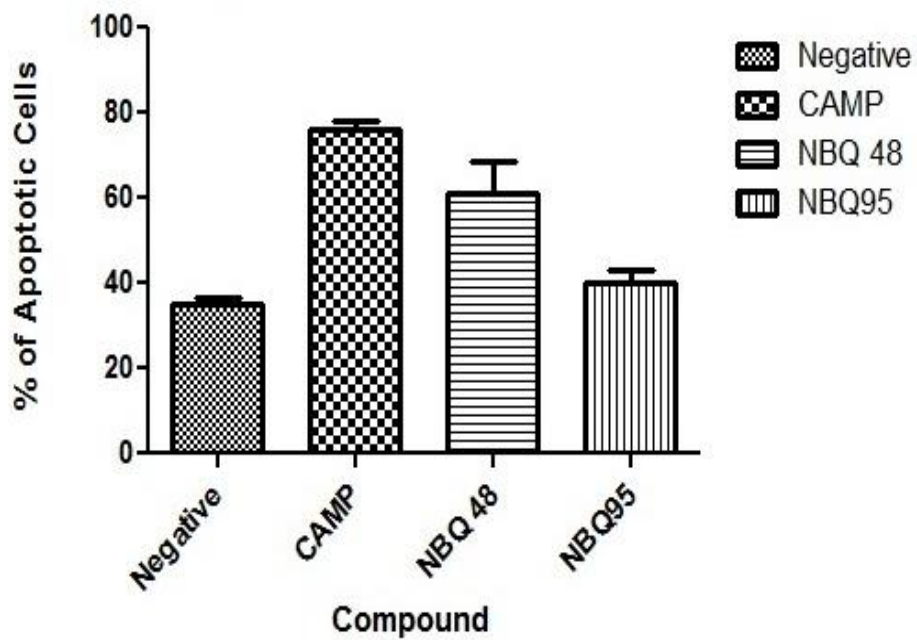


Figura 16. Gráfica de actividad de caspasa 3 & 7 en células Toledo

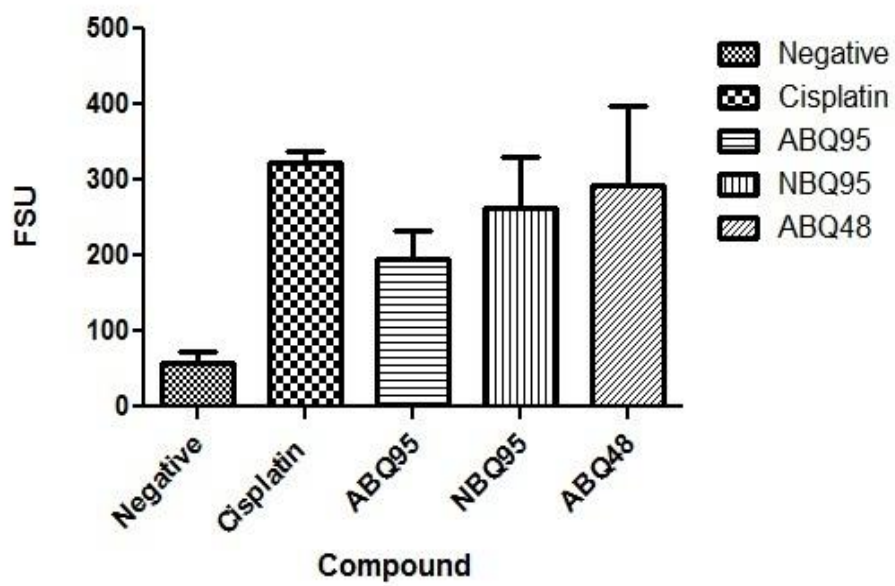


Figura 17. Gráfica de actividad de especies reactivas de oxígeno en Toledo

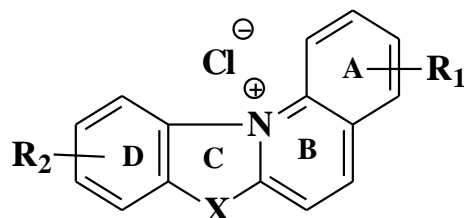


## APÉNDICES

## Apéndice de Metodología

### Apéndice 1

Protocolo de preparación de solución de los compuestos BQS



No. de BQ	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Formula	Peso molecular
NBQ-95	S	2-Cl, 3-NO <sub>2</sub>	10-Me	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	365.24 g/mol
NBQ-48	NCH <sub>2</sub> Ph	3-NO <sub>2</sub>	H	C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	389.83 g/mol
ABQ-95	S	2-Cl, 3-NH <sub>2</sub>	10-Me	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> S	335.25 g/mol
ABQ-48	NCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	3-NH <sub>2</sub>	H	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub>	359.85 g/mol

- Una solución estándar de concentración a 3mM fue preparada para cada compuesto bajo estudio. El sólido de BQ es disuelto en agua purificada MSG (Mass Spect Grade, por sus siglas en inglés). Se calcula la cantidad de solido necesaria para preparar la solución estándar con la siguiente ecuación:

$$3\text{mM} = \frac{3 \text{ moles}}{\text{L}} \left( \frac{1 \text{ mol}}{10^3 \text{ nmoles}} \right) \left( \frac{\text{PM}(\text{g/mol})}{1 \text{ mol}} \right) \left( \frac{1 \text{ L}}{10^3 \text{ ml}} \right) = \text{X g/ml}$$

$$\text{X g/ml} \left( \text{X ml} \right) = \text{g del compuesto}$$

2. Una vez calculado los gramos de solido basado en el peso molecular de cada compuesto y el volumen deseado para preparar la solución estándar. Pesamos el compuesto y lo disolvemos en agua estéril. La solución preparada se divide en diferentes alícuotas y se almacenaron en frascos pequeños cubiertos con papel de aluminio en la nevera a 4°C.

## Apéndice 2

### Protocolo de exposición de células a las drogas

1. Las células se exponen a diferentes concentraciones experimentales de la droga. Se utiliza la siguiente ecuación para calcular el volumen de la solución estándar necesario para las diferentes dosis experimentales:

$$\text{Vol Sol BQx } (\mu\text{L}) = \frac{[\text{Concentración deseada de BQx}(\mu\text{M})][\text{Vol experimental(ml)}]}{3\text{mM Solución estándar } (\mu\text{l})}$$

#### 3mM Solución estándar ( $\mu\text{l}$ )

2. Luego de calcular la concentración experimental de la droga deseada se calcula el volumen requerido de células en el semillero para sembrar la concentración de células deseadas de  $(5 \times 10^5$  a  $3 \times 10^6$  células por ml) en un frasco de  $12.5\text{cm}^2$ .
3. Añadir al frasco el volumen de células calculado y volumen de dosis experimental de la droga a partir de la solución estándar 3mM. Suspender en medio de cultivo fresco hasta alcanzar de 2 a 3.5ml de volumen deseado. El volumen del medio depende de la cantidad de células que se van a sembrar.

### Apéndice 3

Protocolo de viabilidad celular por exclusión del tinte azul tripano (trypan blue)

1. Transferir 100µl de células en suspensión a una placa de 96 huecos.
2. Añadir 100µl de azul de tripano para teñir las células que se encuentran en los huecos de la placa.
3. Transferir 10µl de la muestra de células teñidas a cada cámara del hemócitometro. Rellenado las cámaras con mucho cuidado para evitar que el contenido sobresalga.
4. Se prosigue a contar con el contador automático de células de Invitrogen. Es necesario agrandar la imagen del contador para verificar si el sistema está enfocando bien las células.
5. El instrumento detecta células vivas y no vivas, pero el número de células de interés es de las células vivas.
6. Se realiza un cálculo para determinar el % de viabilidad celular de la muestra, basado en el promedio de las células en la cámara 1 del hemocítometro más el promedio de las células en la cámara 2 dividido entre dos multiplicado por el volumen de suspensión de la muestra de donde se extrajo las células.

## Apéndice 4

Protocolo de análisis de potencial de membrana mitocondrial con tinción JC-1

Materiales:

- Células
- PBS ( Phosphate buffered saline por sus siglas en ingles)
- Tinte JC-1 -Solución 7 (200µg/ml)
- DAPI en PBS -Solución 8 (1µg/ml)
- Laminillas NC-Slide A2 o A8
- BQS

Procedimiento:

1. Exponer las células al  $IC_{50}$  de los compuestos BQ y control positivo Valinomycine o Camptothecin por 48 horas, luego de la exposición pasarlas a un tubo para centrifugarlas y suspenderlas en 2ml de PBS.
2. Contar la muestra, utilizar para el ensayo aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por ml y suspenderlas en 1ml de PBS.
3. Añadir 12.5µl de JC-1 a las células e incubar por 20 minutos a 37°C.
4. Centrifugar las células teñidas a 400g por 5 minutos a temperatura de ambiente y remover el sobrenadante completamente sin perturbar el precipitado de células.

5. Suspender el precipitado de células en 1-2ml de PBS, centrifugar a 400g por 5 minutos y remover el sobrenadante con mucho cuidado luego suspender el precipitado en PBS.
6. Repetir el paso anterior
7. Luego de remover el sobrenadante, suspender el precipitado en 0.25ml de Solución 8 (DAPI en PBS).
8. Añadir la muestra en la laminilla dependiendo del número de muestras escoges la laminilla de dos o de ocho cámaras. Si es la de dos cámaras añadir 30µl de la muestra y si es de la de ocho añadir 9µl de la muestra y analizar la muestra inmediatamente.
9. Utilizar el software de análisis el NucleoView NC-3000 del instrumento y escoger el ensayo de Potencial de membrana mitocondrial. Las células serán cuantificadas por fluorescencia. La fluorescencia es de color azul, verde y rojo, las células con que muestren potencial mitocondrial colapsado exhibirán una disminución en la intensidad de fluorescencia rojo/ verde. Los resultados son ilustrados en histogramas y diagramas de dispersión.

## **Apéndice 5**

Protocolo de fragmentación de ADN y ciclo celular

Materiales:

- Células
- PBS

- Fijador: 70% etanol
- Solución 3 (1µg/ml DAPI, 0.1% triton X-100 en PBS)
- Laminillas NC-Slide A2 y NC-Slide A8
- BQS

Procedimiento:

1. Exponer las células al IC<sub>50</sub> de los compuestos BQS y al control positivo Camptothecin por 48 horas. Luego de la exposición centrifugar por 5 minutos a 500g a temperatura de ambiente.
2. Lavar las células con PBS y contar las mismas. Utilizar aproximadamente de 1 x10<sup>6</sup> a 2x10<sup>6</sup> células por ml y suspenderlas en 0.5ml de PBS.
3. Anadir 4.5ml de 70% etanol en tubos de centrifugación de 10-15ml mantenerlos en hielo. El etanol se utiliza para fijar las células.
4. Transferir las células en suspensión con PBS en los tubos apropiados que están en hielo con etanol 70%, mezclar rigurosamente y mantenerlas en el fijador por lo menos 12 horas. Las células pueden estar en etanol por varias semanas en 0-4°C.
5. Luego de mantener las células suspendidas en etanol, centrifugar la muestra por 5 minutos a 500g, decantar el etanol con mucho cuidado sin perder células en el proceso de lavado.

6. Suspender el precipitado en 5ml de PBS, dejarlo por 50 segundos y centrifugar por 5 minutos a 500g.
7. Decantar el sobrenadante y suspender el precipitado en 0.5ml de Solución 3(DAPI) e incubar por 5 minutos a 37°C.
8. Luego de la incubación añadir la muestra en la laminilla dependiendo del número de muestras escoges la laminilla de dos o de ocho cámaras. Si es la de dos cámaras añadir 30µl de la muestra y si es de la de ocho añadir 9µl de la muestra.
9. Encender el instrumento NuclCounter NC-3000 y utilizar el software NucleoView para analizar la muestra en la laminillas. Escoger el ensayo de interés ya sea fragmentación de ADN o ciclo celular. Ambos ensayos tienen el mismo procedimiento solo cambia la forma de analizarlos.
10. En el ensayo de fragmentación de ADN la fluorescencia celular es cuantificada y las células en apoptosis con ADN fragmentado se muestran con un pico en sub-G1 en el histograma de ADN que se muestra en la pantalla de la computadora.
11. En el ensayo de ciclo celular la fluorescencia es cuantificada en el histograma de contenido de ADN que se muestra en la pantalla de la computadora. Los marcadores que se muestran en el histograma se utilizan para demarcar las células en diferentes estados del ciclo celular.



## Apéndice 6

Protocolo de activación de caspasa 3 y 7

Materiales:

- Células
- Solución salina (PBS)
- Buffer de apoptosis
- Reactivo FLICA
- Hoeschst 33342 (500µg/ml) Solución 15
- Yoduro de propidio (500µg/ml) Solución 16
- Laminillas NC-Slide A2

Procedimiento:

1. Exponer las células al  $IC_{50}$  de los compuestos BQS y al control positivo Cisplatin por 48 horas.
2. Luego de incubar las células expuestas a las drogas por 48 horas. Centrifugar para remover la droga, remover el sobrenadante y suspenderlas en PBS. Repetir el paso de lavado dos veces.
3. Diluir el reactivo FLICA en una proporción de 1:5 en PBS (200µl PBS in 50µl of FLICA).
4. Añadir 5µl del FLICA diluido a 93µl de células en suspensión.

5. Añadir 2µl Hoeschst y mezclar bien con la pipeta.
6. Incubar las muestras de células por 60 minutos a 37°C.
7. Luego de la incubación, lavar las células dos veces con 400µl 1X buffer de apoptosis. Realizar una centrifugación menor de <400g.
8. Luego de los dos lavados re suspender las células en 100µl de buffer de apoptosis y añadir 2µl de yoduro de propidio (Solución 16).
9. Encender el instrumento NuclCounter NC-3000 y utilizar el software NucleoView para analizar la muestra en la laminillas. Escoger el ensayo de interés: Caspase assay
10. Añadir 30µl de la muestra preparada en las laminillas y analizar inmediatamente.

**Apéndice 7. Tablas de toxicidad 60 Cell Line Screening**

	<b>ABQ48</b>	<b>NBQ48</b>	<b>NBQ95</b>
<b>LEUKEMIA</b>	K-562 MOLT-4 RPMI-8226 SR	HL-60(TB) K-562 RPMI-8226 SR	K-562 RPMI-8226 SR
<b>LUNG</b>	A549/ATCC EKVX HOP-92 NCI-H23 NCI-H522 NCI-H460	EKVX NCI-H23 NCI-H522	NCI-H460 NCI-H522
<b>COLON</b>	COLO 205 HCC-2998 HCT-116 HT29 KM12	HT29	HCC-2998 KM12
<b>CNS</b>	SF-268 SNB-19 SNB-75 U251	SF-268 SF-539 U251	SNB-19 SNB-75 U251
<b>MELANOMA</b>	MALME-3M MDA-MB-435 SK-MEL-2 SK-MEL-5 UACC-257	MALME-3M SK-MEL-5 UACC-257	LOX IMVI SK-MEL-2 SK-MEL-5 UACC-62
<b>OVARIAN</b>	OVCAR-3 OVCAR-4 SK-OV-3	OVCAR-3 OVCAR-4 OVCAR-8	IGROV1 OVCAR-3 OVCAR-4 SK-OV-3
<b>RENAL</b>	SN12C		A498 A57
<b>PROSTATE</b>	PC-3	PC-3	PC-3
<b>BREAST</b>	MCF7  HS 578T BT-549 MDA-MB-468	MDA-MB-231/ATCC  T-47D MDA-MB-468	MCF7 MDA-MB-231/ATCC T-47D MDA-MB-468

Tabla 2. Tabla de actividad de compuestos en diferentes tipos de cáncer (60-cell line Screening, NCI)

### Apéndice 8. Informe del Instituto de Cáncer: “60 Cell Line Screening”

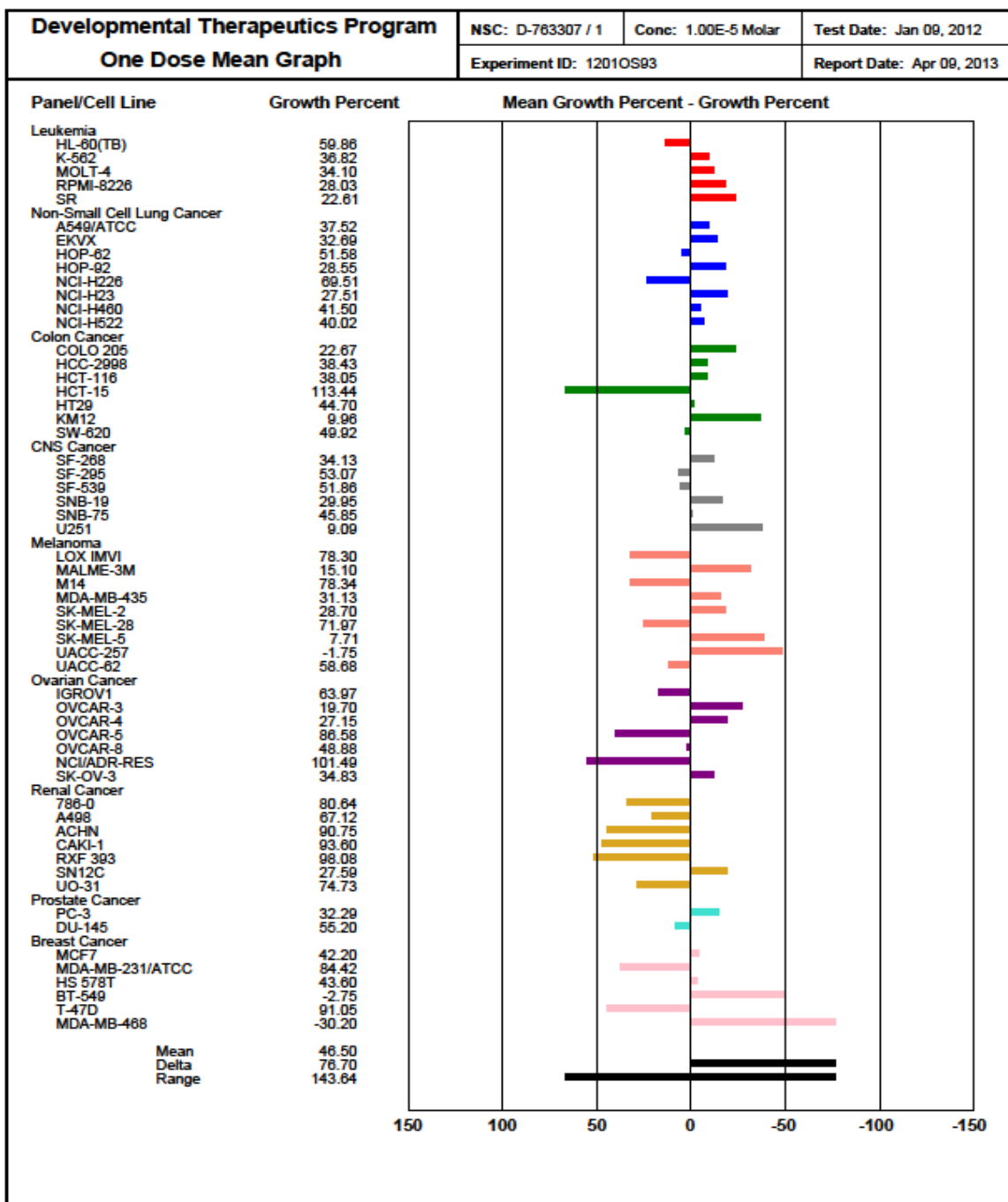


Tabla 3. Tabla de porcentaje de crecimiento en diferentes tipos de cáncer (60-cell line Screening, NCI)