



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

Efecto citotóxico del Ácido de Caracaine y nuevos derivados indeno(2,1-c)quinolinas sobre las líneas celulares de cáncer de mama humana MCF-7 y SKBr3. Combinaciones con un fármaco antitumoral

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por la bachiller Marlene Peticara De Jesús como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Francisco A. Arvelo A.

Caracas, Venezuela

Mayo 2012

A mis padres, Fernanda y Gennaro.

Mi Gordo, fue por ti.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Le dedico y agradezco este Trabajo Especial de Grado, toda mi carrera universitaria y mi vida principalmente a Dios por ser quien me ha abierto todas las puertas para crecer personal y profesionalmente, por estar a mi lado y guiarme en cada paso que di, dándome las fuerzas para continuar en todo momento a pesar de los obstáculos que se pudieron presentar. Y a la Virgencita Auxiliadora, por guiarme desde niña por caminos de verdad y de amor y cuidarme entre sus brazos.

Le agradezco con todo mi corazón a esas dos personas que han estado conmigo siempre, que se levantaban temprano para prepararme el día y acompañarme a donde fuera necesario, que me aconsejaron, ayudaron y apoyaron en todas mis decisiones. Este triunfo es tan mío como de ustedes, mis bellos padres Fernanda y Gennaro; sin ustedes no lo hubiera logrado. Los quiero mucho.

Les agradezco a mis hermanas las cuales estuvieron conmigo en toda mi vida estudiantil, ayudándome y compartiendo conmigo esos momentos que sólo se pueden vivir entre hermanos.

A mi tía bella, Lucía, por apoyarme y creer en mí, por preocuparse de mí y alegrarse cada día con mis logros. Para ti mi bella tía, gracias por estar aquí. A Gaby y José, por ser mis geniales primos que se rieron conmigo en mis alegrías y me abrazaron y lloraron conmigo en mis caídas. Los quiero y saben que siempre estaré para ustedes. A mi linda abuelita, eres lo más lindo que tengo en mi corazón, y este regalo es para ti.

No puedo olvidarme de unos grandes compañeros, que aprendí a amarlos como mi familia, mi sangre. A Kruzkaya Márquez, Daznia Bompert, Luis Hernández, Alberto Mejía, Fernando Machado, Alejandro Moreno, Bladimir Lopera. Los quiero "amigos", son lo mejor que el cielo me pudo regalar y nunca me olvidaré de ustedes ya que tienen un gran espacio en mi corazón. Estaré siempre para ustedes.

Hay un grupo de personas que también forman parte de mi historia, de mis alegrías y vivencias; Vicky Malavé, Mariangelina Zuloaga, Johana Ballesteros, Williams Magallanes, Raúl Llavaneras, Luis De Freitas (hermanito), Francis Martínez (prima), Argenis Lira, y a todos aquellos que por la emoción del momento sus nombres no se encuentran escritos. A ustedes, mis más grandes agradecimientos.

Otro grupo de personas que no puedo dejar de nombrar es mi segunda familia, aquella que me recibió con los brazos abiertos y me abrió un espacio en sus corazones. Gracias por su cariño hacia mí, Mary, Salva y Salvi, los adoro.

Gracias a mi tutor Francisco Arvelo y a mi gran compañero y amigo de trabajo Felipe Sojo, por aceptarme y permitirme trabajar en un ambiente lleno de alegrías y momentos inolvidables. Gracias por hacerme parte de ustedes, nunca los olvidaré.

Adicionalmente, quiero agradecer a esos profesores que han estado en mi carrera y me han ayudado de manera personal y profesional, en donde entre regaños y risas vivimos momentos que permanecerán conmigo, entre los cuales puedo nombrar Lourdes Suárez, María Eugenia Grillet, Juan Carlos Navarro, Maribe Raymunde, Guillermina Alonso. A

todos ustedes, mi más grande agradecimiento y honor por haber sido su alumna y aprender de ustedes lo maravillosa que es la Biología.

No puedo olvidar, y por último no por ser lo menos importante, sino por ser aún lo más grande que tiene mi vida, la razón por la que levanto mi rostro en cada golpe, por la que amanezco cada mañana siendo la mujer más feliz del mundo, una persona que ha cambiado mi mundo para un cuento de princesas y dragones y se vistió con armadura, luchando contra grandes demonios por mí, y haciéndome su angelita para toda la vida. Esto fue por ti, por nuestra vida, nuestro futuro. Por ti, mi amor, Francisco Daniel Marichal.

"Los guerreros de la luz conservan el brillo en los ojos, están en el mundo y forman parte de la vida de otras personas, no siempre son valientes ni actúan correctamente. Sufren por cosas inútiles, a veces se consideran incapaces de crecer y con frecuencia se creen indignos de cualquier bendición o milagro. No siempre están seguros de lo que están haciendo aquí y pasan noches en vela pensando que sus vidas no tienen sentido. Por eso son guerreros de la luz. Porque se equivocan. Porque se preguntan. Porque buscan una razón, y no se detienen hasta encontrarla."
P.C.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El cáncer	1
1.2 El cáncer a nivel mundial	2
1.3 El cáncer de mama	6
1.3.1 Antecedentes del cáncer de mama en Venezuela	9
1.4 Terapias contra el Cáncer	12
1.5 Fármacos utilizados en la terapia clínica contra el cáncer de mama	14
1.6 Estudios farmacológicos aplicados en el descubrimiento de nuevos fármacos	16
2. ANTECEDENTES	18
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo general	21

3.2 Objetivos específicos	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 Líneas celulares	22
4.2 Productos	23
4.2.1 Derivados sintéticos	23
4.2.2 Producto natural	25
4.2.3 Fármaco antitumoral utilizado en clínicas (Taxol)	25
4.3 Ensayo de citotoxicidad	26
4.4 Índice de selectividad	28
4.5 Curvas de crecimiento	28
4.6 Combinación de productos	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1 Evaluación citotóxica de los derivados indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas sobre las líneas tumorales y células control	32
5.2 Evaluación citotóxica del Ácido de caracasine sobre las líneas tumorales y células control	36

5.3 Evaluación citotóxica del Taxol sobre las líneas tumorales y células control	37
5.4 Selectividad de los derivados sintéticos indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas y el Ácido de caracasine en las células tumorales y control	39
5.5 Relación estructura-actividad y características farmacológicas de las indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas y el Ácido de caracasine	42
5.6 Efecto citotóxico sobre la tasa de crecimiento por las indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas y el Ácido de caracasine	49
5.7 Efecto citotóxico de las combinaciones entre tres compuestos del grupo indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas, el Ácido de caracasine y el fármaco antitumoral sobre las líneas tumorales y células control	53
5.7.1 Combinaciones sobre la línea tumoral de mama SKBr3	53
5.7.2 Combinaciones sobre la línea tumoral de mama MCF-7	55
5.7.3 Combinaciones sobre el cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos	56
6. CONCLUSIONES	59
7. RECOMENDACIONES	61

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9. ANEXOS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Distribución de las tasas estimadas de incidencia y de mortalidad de las principales localizaciones de cáncer por sexo, ajustadas por edad en el continente americano	5
Fig. 2 Incidencia y mortalidad de las principales localizaciones de cáncer en ambos sexos para Venezuela, tasas ajustadas por edad	11
Fig. 3 Distribución de las tasas de incidencia promedio de cáncer de mama en el periodo 2001-2005 por Entidades Federales en Venezuela	12
Fig. 4 Estructura química del Taxol (Paclitaxel)	15
Fig. 5 Mecanismo de acción de inhibidores de la tubulina, como el Paclitaxel, Vincas e Indibulin	16
Fig. 6 Estructura de un terpeno	19
Fig. 7 Estructura de las quinolinas	20
Fig. 8 Molécula estructural de los compuestos indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas	23
Fig. 9 Estructura química del producto natural Ácido de caracasine	25

Fig. 10 Esquema de la obtención de las concentraciones a utilizar para la evaluación de las combinaciones de los productos (derivados sintéticos, natural y droga comercial) basado en el diseño experimental propuesto por Chou	30
Fig. 11 Curvas de viabilidad de la línea celular SKBr3 frente a los compuestos seleccionados pertenecientes al grupo indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas, el Ácido de caracasine y el fármaco antitumoral (Taxol) a las 72 horas de tratamiento ...	46
Fig. 12 Curvas de viabilidad de la línea celular MCF-7 frente a los compuestos seleccionados pertenecientes al grupo indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas, el Ácido de caracasine y la droga antitumoral (Taxol) a las 72 horas de tratamiento	47
Fig. 13 Curvas de viabilidad del cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos frente a los compuestos seleccionados pertenecientes al grupo indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas, el Ácido de caracasine y la droga antitumoral (Taxol) a las 72 horas de tratamiento	48
Fig. 14 Efecto de los compuestos Cris 148, Cris 142 y Ar 4 del grupo sintético indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas, el Ácido de caracasine y la droga antitumoral Taxol en la proliferación celular de las tres líneas celulares evaluadas en un intervalo de 0 - 120 horas	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructuras y propiedades químicas de los compuestos indeno (2,1- <i>c</i>)quinolinas	24
Tabla 2. Rangos de IC referidos para la selección de los patrones de combinación de fármacos	31
Tabla 3. Valores de concentración inhibitoria del 50% de la población (CI ₅₀) a las 72 horas de tratamiento de los productos evaluados para cada una de las líneas tumorales de cáncer de mama y las células control	33
Tabla 4. Valores de índices de selectividad de cada producto evaluado en las líneas celulares de cáncer de mama SKBr3 y MCF-7	40
Tabla 5. Índices de combinación entre los compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas, el Ácido de Caracasine y el Taxol obtenidos para la línea celular SKBr3	54
Tabla 6. Índices de combinación entre los compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas, el Ácido de Caracasine y el Taxol obtenidos para la línea celular MCF-7	55

Tabla 7. Índices de combinación entre los compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas, el Ácido de Caracaine y el Taxol obtenidos para el cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos	57
Tabla 8. Resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad (CI ₅₀) expresada en μM para las líneas celulares de cáncer de mama y los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos	75
Tabla 9. Porcentajes de citotoxicidad para cada uno de los compuestos del grupo indeno(2,1- <i>c</i>)quinolinas, el Ácido de Caracaine y el Taxol sobre las líneas celulares tumorales y el cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos	76

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la anormalidad en el crecimiento de las células provocado por factores ambientales y múltiples cambios en la expresión de los genes, lo que conlleva a un descontrol en el balance entre la proliferación y muerte celular. El cáncer de mama representa una de las enfermedades que más afecta a la población femenina de Latinoamérica y el Caribe. Particularmente en Venezuela, según cifras del Ministerio del Poder Popular para la Salud, para el año 2007 el cáncer de mama presentó una incidencia estimada de 5400 casos y una mortalidad de 1700 según el Informe Mundial para el Cáncer. Los tratamientos antineoplásicos actúan de manera citotóxica sobre las células cancerígenas, los cuales incluyen radioterapias, inmunoterapias, terapias hormonales, y la más común, la quimioterapia. En la actualidad, se ha mostrado un auge en las investigaciones sobre compuestos extraídos de diversas plantas con posibles agentes antitumorales. Entre los compuestos naturales de importancia están los derivados de quinolinas aisladas de plantas superiores, y los seco-ent-kauranos aislados principalmente de plantas del género *Croton*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el posible efecto citotóxico de los compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1-*c*)quinolina y el Ácido de caracaine (compuesto natural - seco-ent-kaurano) en líneas de cáncer de mama SKBr3 y MCF-7 y células normales obtenidas de cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos. La técnica utilizada fue la del MTT diseñada por Mossman en 1983; luego de 72 horas de incubación se calcularon los valores de concentración inhibitoria (CI₅₀), índices de selectividad, relaciones estructura-actividad y se realizaron combinaciones con el fármaco antitumoral Taxol que es utilizado frecuentemente en los tratamientos quimioterapéuticos del cáncer de mama. Los resultados obtenidos muestran una alta selectividad de los

compuestos sintéticos y natural evaluados hacia las líneas celulares MCF-7 ($CI_{50} = 3,53$ a $48,64 \mu\text{g/mL}$) y SKBr3 ($CI_{50} = 16,41$ a $43,95 \mu\text{g/mL}$) con respecto a las células control ($CI_{50} = 53,09$ a $> 100 \mu\text{g/mL}$), mostrándose claras diferencias entre los diversos compuestos sintéticos con diferentes sustituciones químicas realizadas sobre la molécula patrón de los compuestos indeno(2,1-*c*)quinolinas. Además, se pudo observar diferencias en las respuestas obtenidas por las diferentes líneas tumorales estudiadas frente a las combinaciones de las drogas, encontrándose que la presencia de un tercer compuesto antitumoral en una combinación de drogas sobre las líneas celulares evaluadas no ejerce un efecto positivo sobre la citotoxicidad combinada. En conclusión, las sustituciones realizadas en la molécula patrón de las indeno(2,1-*c*)quinolinas estudiadas en este trabajo, disminuyeron la actividad citotóxica presentada sobre las líneas tumorales de mama MCF-7 y SKBr3, por lo que el mejor compuesto encontrado con posibles estudios a futuro como alternativa en la terapia antineoplásica de mama es el compuesto patrón, Cris 142.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cáncer

El cuerpo está formado por diversos tipos de células (epiteliales, musculares, nerviosas, conectivas, entre otras), donde un gran conjunto de procesos bioquímicos y genéticos controlan su crecimiento, además de conducir a eventos de muerte o apoptosis cuando éstas envejecen o se dañan (Crespo, 2006). Sin embargo, algunas veces este proceso ordenado se descontrola. El material genético (ADN) de una célula puede dañarse o alterarse, lo cual produce cambios significativos que afectan su crecimiento y proliferación normal (Instituto Nacional de Cáncer, 2011).

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la anormalidad en el crecimiento de las células provocado por factores ambientales y múltiples cambios en la expresión de los genes, lo que conlleva a un descontrol en el balance entre la proliferación y muerte celular (Ruddon, 2007). En estos cambios genéticos se han implicado dos tipos de genes: los protooncogenes, oncogenes que al ser activados de manera excesiva mediante mutaciones promueven el crecimiento celular, y los genes supresores de tumores, que normalmente restringen el crecimiento y que cuando se dañan se produce un aumento inapropiado de las células (Lodish y col., 2005). Sin embargo, a diferencia de otras enfermedades genéticas, el cáncer es causado por una acumulación de mutaciones que generalmente se producen en las células somáticas, aunque aproximadamente el 1% de los cánceres se asocian a mutaciones en la línea germinal que aumenta la probabilidad de padecer ciertos tipos de cáncer (Klug, 2006).

Los tumores pueden clasificarse en benignos y malignos de acuerdo a su habilidad de invadir localmente o migrar a otros tejidos distantes para originar tumores secundarios, proceso que se denomina metástasis (Khanna y Hunter, 2005). Para el diagnóstico de la formación de un tumor maligno mediante transformación de uno benigno es necesaria la demostración de la invasión tisular o vascular (vía linfática o sanguínea) y/o la existencia de metástasis (Pardo, 1996).

La metástasis puede localizarse en diferentes órganos y/o regiones del mismo órgano. Aún cuando se produce metástasis en una parte distinta del órgano donde se originó el cáncer, éste se seguirá considerando como de la parte del cuerpo donde emergió (Langley y Fidler, 2007).

Clínicamente, diversas características determinan el origen, estado y avance de un cáncer, las cuales pueden ser la edad de iniciación, la velocidad de proliferación, el estado de diferenciación, el grado de invasión, su capacidad metastásica y de pronóstico (Knowles y Selby, 2005). Cada cáncer también depende del tipo de tejido donde se origina y de su mecanismo de oncogénesis.

1.2 El cáncer a nivel mundial

El cáncer es una de las enfermedades más estudiada en los últimos años, teniendo un gran avance en el aspecto molecular, desde aquellos que explican la proliferación descontrolada y la pérdida de la regulación de la apoptosis celular, hasta los mecanismos de desarrollo de la metástasis (Luque y Herráez, 2008).

Diversas organizaciones mundiales han realizado campañas de investigación, docencia y prevención del cáncer. En un Informe de la Organización Mundial de la Salud se enfatiza que el cáncer, siendo entre las enfermedades crónicas la segunda causa de mortalidad a nivel mundial después de las afecciones cardiovasculares, está afectando de manera considerable a un gran número de países, en especial aquellos de ingresos bajos y medios (OMS, 2005). Sin embargo, también se ven perturbados los países desarrollados, ya que éstos mantienen un estilo de vida que favorece los malos hábitos, como la adicción al tabaco, seguido de una mala alimentación y la falta de ejercicio, lo que influye en la propensión de esta enfermedad.

En cuanto a la epidemiología del cáncer, el Informe Mundial del Cáncer para el 2008 estima que hay unos 12 millones de nuevos diagnósticos de cáncer en todo el mundo, y se calcula que 7 millones de personas morirían a causa de la enfermedad. Las cifras proyectadas para el año 2030 son de 20 a 26 millones con diagnósticos nuevos de cáncer y de 13 a 17 millones las muertes por cáncer (Boyle y Levin, 2008). Esto podría deberse principalmente al continuo envejecimiento de la población, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. Con todo esto se puede deducir que el cáncer es un importante problema de salud pública a nivel mundial.

Durante las tres últimas décadas, los países americanos han vivido transformaciones importantes a nivel demográfico, social y epidemiológico, por lo que las enfermedades no transmisibles, y en particular el cáncer, han tenido grandes incrementos en su incidencia en ambos sexos, con lo que estudios direccionados hacia la caracterización de la incidencia y mortalidad de esta enfermedad, además de la supervivencia de pacientes afectados, han sido el propósito de numerosos esfuerzos (Parkin y col., 2005; Bosetti y col., 2005). Para el año

2008, se estimaron más de dos millones y medio para nuevos casos y 1.200.000 de muertes por cáncer en Latinoamérica y el Caribe (Ferlay y col., 2008).

En los distintos países de Latinoamérica y el Caribe, las tasas de incidencia y de mortalidad difieren considerablemente (Fig. 1a). Como puede observarse, las tasas de incidencia más elevadas corresponden a los países del hemisferio norte y algunos países del hemisferio sur (mayormente, Argentina), mientras que las tasas de mortalidad más elevadas se encuentran en todo el continente (con mayor énfasis en Canadá, El Salvador, Honduras, Perú y Uruguay). Además, algunos tipos de cáncer se manifiestan de forma diferenciada en hombres y mujeres, bien sea por factores biológicos o de riesgo, lo que influye en su prevalencia (Fig. 1b). Para las mujeres, las tasas más elevadas se presentan en el cáncer de mama (con una incidencia de 57,2 casos y una mortalidad de 13,7 casos, ambos casos por 100.000 personas y ajustada por edad), mientras que para los hombres se muestran en el cáncer de próstata (con una incidencia de 66,7 y una mortalidad de 12,9, ambos casos por 100.000 personas y ajustada por edad).

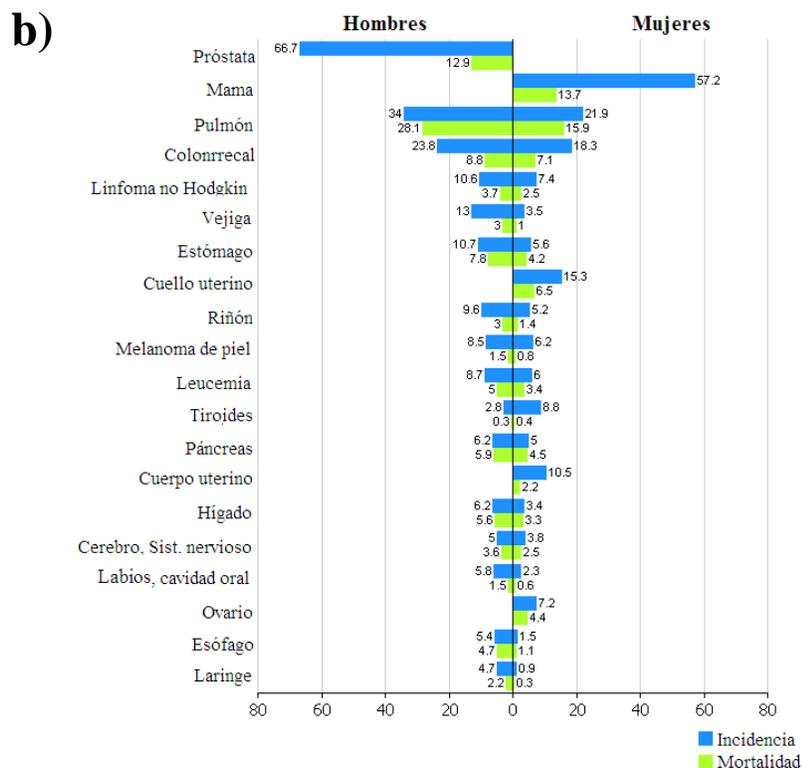
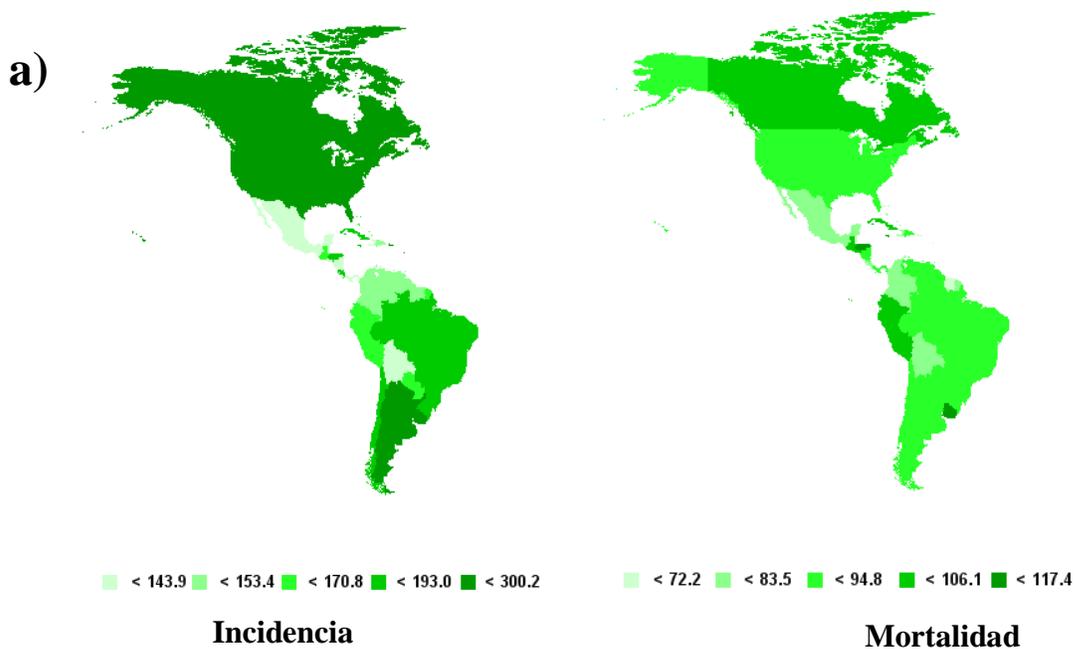


Figura 1. a) Distribución de las tasas estimadas de incidencia y mortalidad, ambas ajustadas por edad (población mundial estándar), de todos los países donde potencialmente ocurren tumores (excepto el cáncer de piel diferente al melanoma) en ambos sexos, en el continente americano expresadas en casos por 100.000; **b)** Incidencia y mortalidad de las principales localizaciones de cáncer por sexo en América, tasas ajustadas por edad (población mundial estándar) expresadas en casos por 100.000 (Tomado de Ferlay y col., 2008; fuente Globocan 2008)

1.3 El cáncer de mama

Como se señaló, el cáncer de mama es una de las principales causas de incidencia y mortalidad en las mujeres del continente americano y en general a nivel mundial. Esta enfermedad puede puntualizarse como un proceso de proliferación anormal maligna de las células epiteliales de la glándula mamaria. Esta neoplasia se encuentra limitada al epitelio ductual (conductos que llevan leche desde la mama hasta el pezón) y tubular (lobulillos donde se produce la leche) (Carlson y col., 2009). De acuerdo con esto, se presentan diversos tipos de cáncer de seno:

- ✿ Carcinoma ductal in situ: es el tipo más común de cáncer de seno no invasivo, donde las células cancerosas están dentro de los conductos pero no se han propagado a través de las paredes de los conductos hacia el tejido que rodea el seno.
- ✿ Carcinoma lobulillar in situ: comienza en las glándulas productoras de leche, pero no crece a través de la pared de los lobulillos.
- ✿ Carcinoma ductal invasivo (o infiltrante): éste es el tipo más común de cáncer de seno y comienza en un canal o conducto lácteo del seno, penetra a través de la pared del conducto y crece en el tejido adiposo del seno. En este punto puede tener la capacidad de propagarse (hacer metástasis) hacia otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo.
- ✿ Carcinoma lobulillar invasivo (o infiltrante): comienza en las glándulas productoras de leche (lobulillos). Al igual que el carcinoma ductal invasivo, se puede propagar a otras partes del cuerpo.

Diversos estudios han encontrado varios factores de riesgo de cáncer de seno, y entre los más importantes podemos encontrar (Instituto Nacional de Cáncer, 2010; McPherson y col., 2000):

- Edad: las probabilidades de padecer cáncer de seno aumentan conforme la mujer envejece, duplicándose por lo general luego de los 10 años posteriores a la menopausia.
- Antecedentes personales de cáncer de seno: la mujer que ha tenido cáncer en un seno tiene un riesgo mayor de padecer esta enfermedad en su otro seno.
- Antecedentes familiares: su riesgo de presentar cáncer de seno es mayor si su madre, padre, hermana o hija, tuvo cáncer de seno. El riesgo es aún mayor si ese familiar tuvo cáncer antes de los 50 años de edad.
- Ciertas alteraciones genéticas: los cambios en ciertos genes, como BRCA1 o BRCA2, aumentan considerablemente el riesgo de cáncer de seno.
- Antecedentes relacionados con la reproducción: en cuanto más edad tiene la mujer cuando da a luz a su primer hijo, mayores son sus probabilidades de padecer cáncer de seno. Igualmente las mujeres que nunca tuvieron hijos tienen un mayor riesgo de cáncer de seno.
- Antecedentes relacionados con la menstruación: las mujeres que empezaron su menstruación antes de los 12 años tienen un riesgo mayor de cáncer de seno, asimismo las mujeres que entraron en la menopausia después de los 55 años de edad.

- Raza: el cáncer de seno se diagnostica con más frecuencia en mujeres de raza blanca que en mujeres afroamericanas o negras, hispanas o latinas, asiáticas o nativas de las islas del Pacífico, indígenas americanas o nativas de Alaska.
- Inactividad física: las mujeres que son inactivas físicamente en su vida pueden tener un riesgo mayor de cáncer de seno.
- Estilos de vida:
 - ✓ *Dieta*: si una mujer que tiene una dieta con alto contenido de grasas o que está expuesta a ciertas sustancias en el medioambiente tiene un riesgo mayor.
 - ✓ *Obesidad o sobrepeso después de la menopausia*: la posibilidad de tener cáncer de seno después de la menopausia es mayor en las mujeres que son obesas o tienen exceso de peso.
 - ✓ *Consumo de alcohol*: algunos estudios sugieren que en cuanto más bebidas alcohólicas consume una mujer, mayor es su riesgo de cáncer de seno.

Es importante señalar que el cáncer de mama no solamente es padecida por las mujeres, sino también por los hombres, representando aproximadamente del 1 al 1,5% de las neoplasias malignas en el hombre, aunque en ciertas regiones de Asia y África la incidencia puede llegar al 10% (Valera y col., 1997; Donegan y Redligh, 1996). Según estadísticas tomadas de la Asociación Norteamericana de Registros Centrales de Cáncer (NAACCR, siglas en inglés), para el año 2009 se estimaron 1910 de nuevos casos y 440 defunciones por cáncer de mama en hombres en Estados Unidos (Jemal y col., 2009). Esta

enfermedad, estudiada a pesar de tener una baja incidencia en comparación con la enfermedad de la glándula mamaria en la mujer, tiene un impacto devastador en la salud del hombre pues tiene un grave pronóstico (Delgado y col., 2009). Algunos factores de riesgo de cáncer de mama en hombres se han asociado con la disfunción testicular, la edad, la ascendencia judía, la historia familiar, y el síndrome de Klinefelter, además de mutaciones en el gen BRCA2 que predisponen a los hombres al cáncer de mama y puede representar un 4% a 14% de los casos. (Thomas, 1993; Giordano y col., 2002).

1.3.1 Antecedentes del cáncer de mama en Venezuela

En Venezuela, el cáncer constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, ocupando la segunda posición en la mortalidad general luego de las enfermedades del corazón, situación que ha mantenido en los últimos 25 años y representando el 15% de la mortalidad diagnosticada en el país (Capote, 2008). Para el año 2005, de acuerdo al Anuario Epidemiológico publicado por el Ministerio del Poder Popular para la Salud, el cáncer de próstata es el más frecuente en la población masculina, con una incidencia y mortalidad estimada en 4408 y 1710 casos anuales respectivamente, y el cáncer de cuello uterino (3685 casos estimados de incidencia) y el cáncer de mama (3549 casos estimados de incidencia), que representan el 43% de la incidencia anual de cáncer en mujeres, y en lo referente a la mortalidad por cáncer en féminas, para los cánceres de cuello uterino y de mama se presentan 1602 y 1449 casos anuales respectivamente.

Como se describió con anterioridad, el cáncer de mama en Latinoamérica y el Caribe representa una de las enfermedades que más afecta a la población femenina. Para el año 1980, el cáncer de mama se encontraba como el tercer tipo de tumor maligno más común en la población femenina venezolana de acuerdo al Anuario de Epidemiología del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (Ravelo, 2001). En nuestro país, según cifras del Ministerio del Poder Popular para la Salud, para el año 2006 representó la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer venezolana, teniendo una incidencia total estimada de 5400 casos (tasa de incidencia de 42,5 casos por 100.000) y una mortalidad total de 1700 casos (tasa de mortalidad de 13,7 casos por 100.000), según el Informe Mundial del Cáncer del 2008 (Fig. 2) (Ferlay y col., 2008).

En cuanto a la distribución geográfica del cáncer de mama en el país (Fig. 3), para el periodo 2001-2005, esta enfermedad presentó un promedio nacional de 24,8 casos por cada 100.000 mujeres, donde los estados con mayor tasa de incidencia fueron Distrito Capital, Vargas, Miranda y Aragua, los cuales presentan mayor desarrollo demográfico, económico e industrial, viéndose la contraposición en aquellos estados con menor desarrollo y de actividades principalmente agropecuarias la menor tasa de incidencia (Capote, 2006).

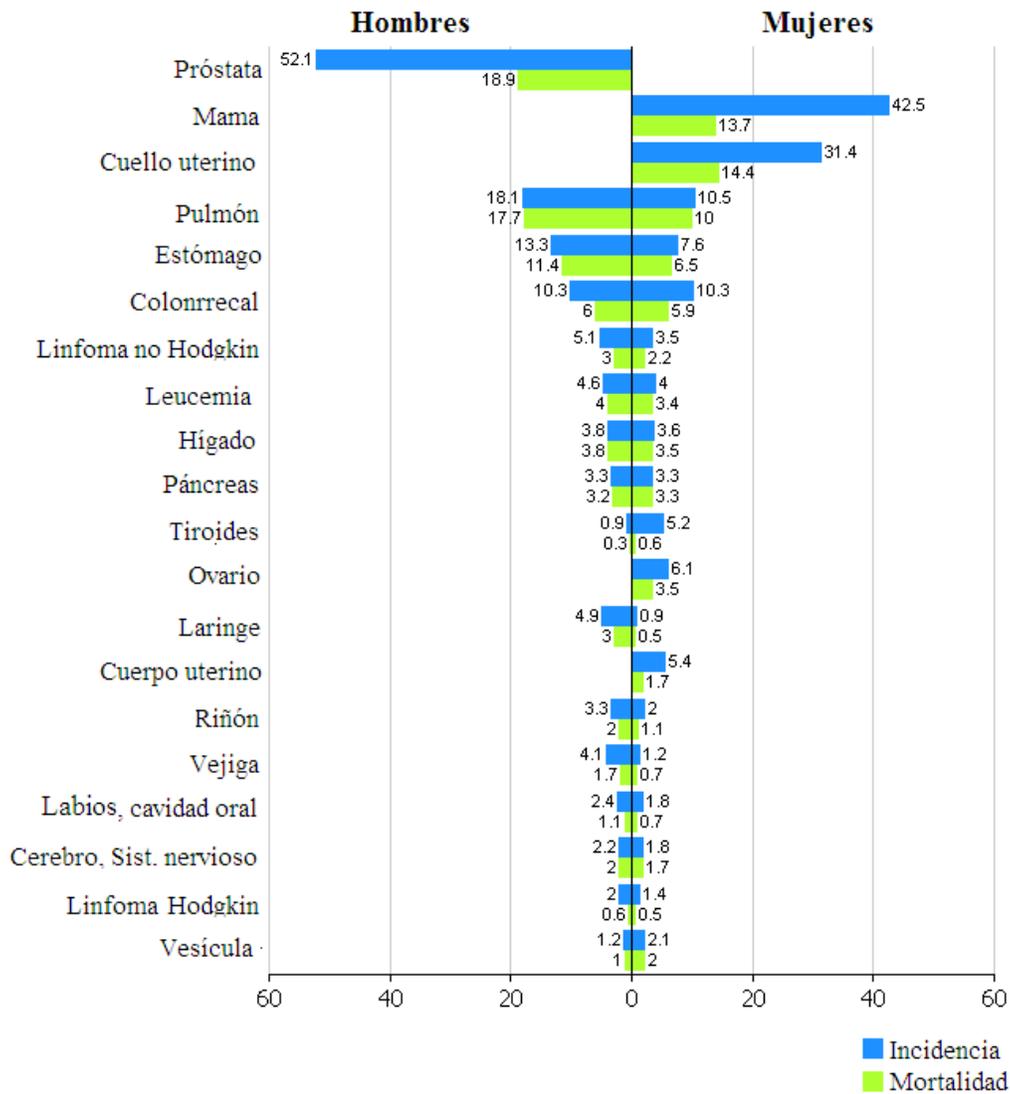


Figura 2. Incidencia y mortalidad de las principales localizaciones de cáncer en ambos sexos para Venezuela, tasas ajustadas por edad (población mundial estándar) expresadas en casos por 100.000 (Tomado de Ferlay y col., 2008; fuente Globocan 2008).

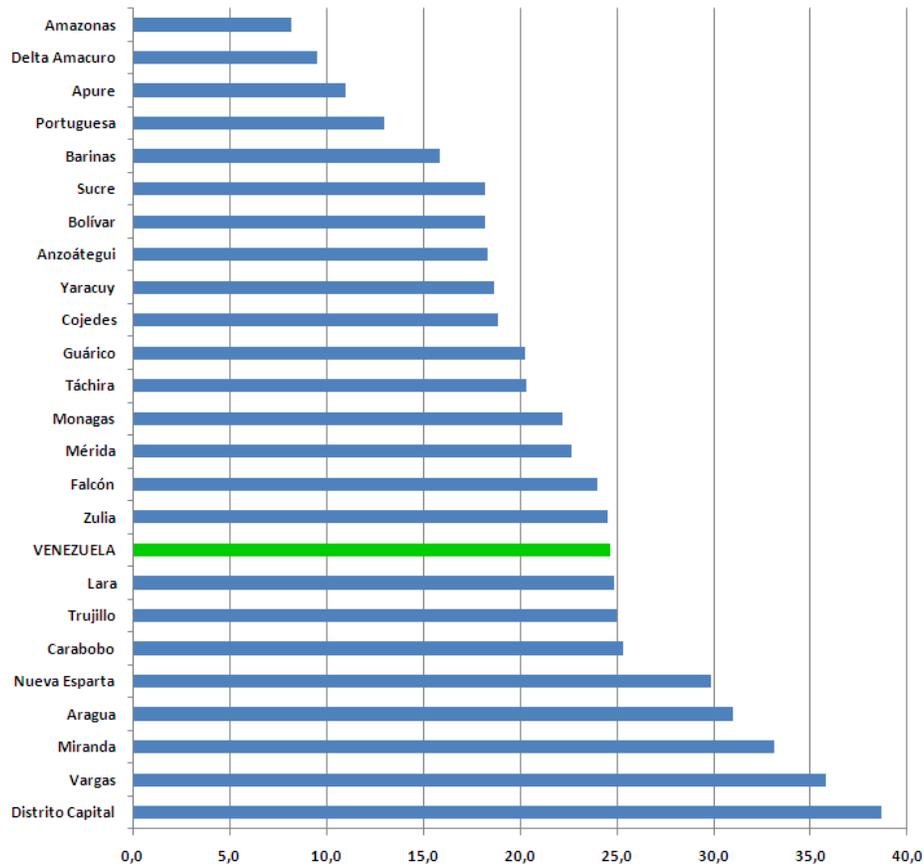


Figura 3. Distribución de las tasas de incidencia promedio (por cada 100.000 mujeres) de cáncer de mama en el periodo 2001-2005 por Entidades Federales en Venezuela (Tomado y modificado de Capote, 2006).

1.4 Terapias contra el cáncer

Conjuntamente con los estudios del efecto en la demografía y salud pública del cáncer de mama en Venezuela, se han estado realizando investigaciones sobre una gran diversidad de tratamientos antineoplásicos que tengan mayor eficiencia con un bajo potencial adverso en el paciente.

Los tratamientos antineoplásicos, a diferencia de la cirugía, actúan de manera citotóxica sobre las células cancerígenas. Estos procedimientos incluyen quimioterapias, radioterapias, inmunoterapias y terapia hormonal, entre otras (Alberts y col., 1994).

La forma de actuación de los fármacos antineoplásicos es muy diversa, desde aquellos que tienen efecto sobre una o varias fases del ciclo celular hasta los que intervienen en los mecanismos de control de la proliferación celular (Prieto y col., 1999).

El objetivo principal de cualquier tratamiento antineoplásico es la erradicación total de un cáncer, aunque esto resulta difícil puesto que constantemente se seleccionan subpoblaciones que poseen ventajas evolutivas que le permiten resistir al tratamiento, por lo que la aplicación de dichos métodos antitumorales por un tiempo prolongado puede conducir a la adquisición por parte de la célula del fenómeno denominado resistencia a múltiples drogas o MRD (“multidrug resistance”) (Albert y col., 1994; Sánchez y Benítez, 2006).

La resistencia a múltiples drogas puede darse por dos mecanismos distintos: algunos tumores no responden a los fármacos de manera innata (resistencia primaria), mientras que otros son sensibles inicialmente, pero eventualmente pueden adquirir resistencia (resistencia secundaria) (Arvelo y col., 2000). Esta diferencia en la resistencia a las drogas se debe principalmente a que, en general, cada fármaco tiene un blanco específico en las células tumorales (monoterapia), por lo que su eliminación es limitada a las células que se encuentran en contacto con dicho fármaco y permanecen viables aquellas que son resistentes al tratamiento o que no se ven afectados por el mismo.

En la actualidad, se están direccionando los estudios sobre la quimioterapia en la búsqueda de tratamientos que no sean integrales para cada tumor, sino en el diseño de cocteles de fármacos (politerapia o multiterapia), para con ello eliminar la mayor proporción de células cancerosas mediante la acción sobre múltiples blancos en las células. Igualmente, para que estas terapias puedan tener una alta efectividad es necesario tomar en cuenta las variaciones farmacogenéticas (variación efectiva de un tratamiento sobre un mismo tipo de cáncer en distintas personas) y las variaciones farmacogenómicas (respuesta del tratamiento según las alteraciones moleculares del tumor) (Salazar, 2008; Morán y col., 2008; Frías y col., 2007).

1.5 Fármacos utilizados en la terapia clínica contra el cáncer de mama

Como ya se mencionó, el objetivo último de la terapéutica anticancerosa es la eliminación completa de toda célula tumoral, mediante métodos quirúrgicos, radioterápicos y farmacológicos (Flórez y col. 2008). En la actualidad, los tratamientos quimioterapéuticos dirigidos contra el cáncer de mama son muy variantes, entre los que se pueden nombrar los fármacos citotóxicos que alteran el material genético o los microtúbulos de la célula tumoral, y los fármacos citostáticos que intervienen en las vías de señalización intracelular, inducen la apoptosis y alteran la angiogénesis (Allevato, 2008). Uno de los fármacos con modo de acción citotóxico de mayor utilización en la terapia contra el cáncer de mama es el Taxol (Paclitaxel).

El Taxol es un metabolito secundario, específicamente un diterpeno, cuya estructura dio origen a una nueva clasificación estructural dentro de los dipertenoides, conocida como taxano, aislándose por primera vez de la corteza del Tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia Nutt.* Hoy en día también se ha aislado de otras especies de taxus, obteniéndose por medio de un proceso de biosíntesis natural de fermentación (Guo y Wang, 2008; Manrique y col.; 2005). Su nombre químico es 4,10-diacetato 2-benzoato 13-éster de 5 β ,20-epoxi-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -hexahidroxitax-11-eno-9-ona con (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilisoserina, y su fórmula estructural se muestra en la figura 4.

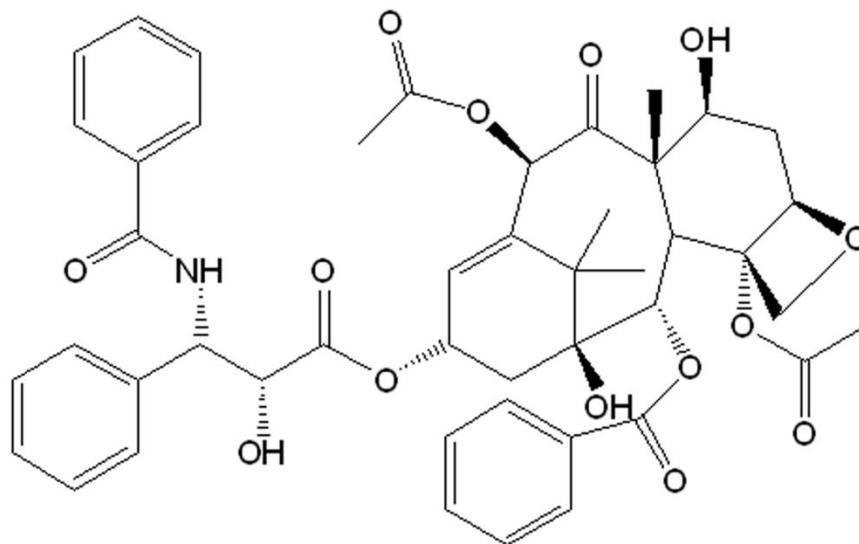


Figura 4. Estructura química del Taxol (Paclitaxel) (Tomado de <http://www.paclitaxel.org/>).

Al igual que todos los taxanos, como el docetaxel, se une principalmente a la subunidad β de la tubulina de los microtúbulos en su porción N-terminal, lo que promueve la polimerización de la tubulina en microtúbulos estables pero poco funcionales, ya que carecen de la flexibilidad necesaria para cumplir su función dinámica, eliminando a las

células en las fases G2 y M del ciclo celular (Villaescusa, 2006; Lau y col., 1999; Miller y Sledge, 1999). Tiene función contraria a los alcaloides como la vincristina y vinblastina, los cuales evitan la polimerización de los microtúbulos (Fig. 5).

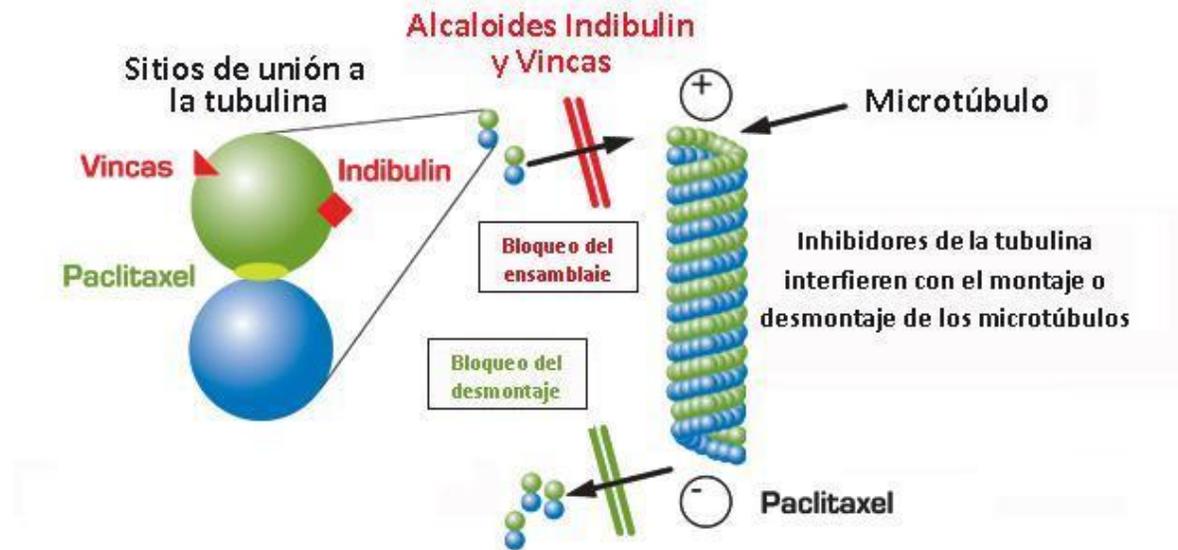


Figura 5. Mecanismo de acción de inhibidores de la tubulina, como el Paclitaxel, Vincas e Indibulin (Tomado y modificado de http://www.ziopharm.com/clinical_zio301.php).

1.6 Estudios farmacológicos aplicados en el descubrimiento de nuevos fármacos

La quimioterapia ha sido uno de los tratamientos con mayor utilización en la lucha contra el cáncer, por lo que una gran variedad de investigaciones se han direccionado en la búsqueda de nuevos compuestos que puedan detener la multiplicación de células tumorales además de ser selectivos, es decir, sin afectar el tejido normal. Las investigaciones de productos naturales o sintéticos con propiedades antitumorales han tenido un incremento en

las últimas décadas, convirtiéndose en un campo interdisciplinario que comprende áreas como la botánica, bioquímica, farmacología, toxicología, medicina, ecología, biología celular, molecular, entre otras (Arvelo y col., 2008).

Antes de cualquier utilización de un producto con actividad antitumoral sobre un paciente, se debe realizar diversos estudios que permitan evaluar tanto sus características físicoquímicas como sus efectos citotóxicos (farmacología preclínica o básica) y la tolerancia dada por el hombre (farmacología clínica). Estos estudios previos generalmente se realizan en animales de experimentación u otros modelos experimentales, como por ejemplo, cultivos celulares (Malone, 1978).

En cuanto a las investigaciones en condiciones *in vitro* o farmacología preclínica o básica, el diseño experimental más importante es el denominado Screening o Tamizaje, el cual consiste en la detección de una determinada acción farmacológica o cualquier actividad biológica de un compuesto nuevo, considerándose como una técnica cualitativa (Furones, 2002). Por otro lado, dentro de la farmacología básica se encuentra otra técnica que permite valorar el efecto y la potencia de un compuesto, con el objetivo de garantizar la uniformidad de los efectos que se deben obtener con su administración, los cuales se denominan bioensayos, y son por ende métodos cuantitativos.

Otro de los medios que frecuentemente se utilizan para estudiar la actividad farmacológica de algún compuesto son las curvas dosis-respuesta, las cuales cuantifican o estiman el efecto de una dosis aplicada a un conjunto de células, proporcionando con ello la medida de la magnitud de la actividad del compuesto en una dosis determinada (Goodman y Gilman, 1996).

2. ANTECEDENTES

Las plantas medicinales han sido utilizadas por el hombre desde la antigüedad como medio de prevención y tratamiento de diversas enfermedades. Se han desarrollado fórmulas químicas y fármacos sintéticos a partir de extractos de estas plantas, colaborando fundamentalmente en la creación de nuevos fármacos (Gran y col., 2000).

Para poder evaluar diversas plantas como agentes antitumorales, se han tomado en consideración aquellas que tienen efectos positivos sobre patologías como inflamaciones, enfermedades virales y parasitarias, ya que éstas poseen estadíos similares a la enfermedad del cáncer (Popoca y col., 1998). Entre los agentes antitumorales provenientes de la naturaleza se encuentran algunos derivados de microorganismos como la Doxorubicina y otros de plantas como es el caso de la Vinblastina, Irinotecan, Topotecan, Vincristina, Taxanos, Etopósidos, entre otros (Cragg y Newman, 1999).

La actividad citotóxica de fármacos derivados de plantas puede deberse a una gran diversidad de mecanismos, entre los que se encuentran la inducción de la muerte celular, la intervención en la replicación y reparación del material genético, la inhibición de proteasas, como molécula antiangiogénica o alquilantes, anti-inflamatorio, antibióticos, entre otros (Hidalgo y Eckhart, 2001).

Uno de los géneros de plantas latinoamericanas más utilizadas y estudiadas con propiedades medicinales, específicamente antitumorales, es el *Croton*, de la familia Euphorbiaceae, el cual se caracteriza por la presencia de diterpenos (Fig. 6), agentes anticancerosos (Sandoval y col., 2002; Fuentes y col., 2004). En el 2009 se realizaron

investigaciones sobre el efecto citotóxico del grupo seco-ent-kaurano, un tipo tetracíclico de diterpenos, en líneas tumorales de próstata (PC-3) y de útero (HeLa), el cual presentó una marcada citotoxicidad en las líneas mencionadas y una menor actividad sobre un cultivo primario de fibroblastos, por lo que este grupo de derivados naturales son de gran aporte farmacológico y toxicológico en la búsqueda de análogos naturales para el tratamiento del cáncer (Vivas, 2009). Igualmente, se han realizado varios estudios en la evaluación antibacterial y antitumoral sobre líneas de cáncer humano de diversas especies de *Croton*, además de caracterizar la composición de los aceites de estas plantas (Suárez y col., 2008b; Suárez y col., 2009; Compagnone y col., 2010).

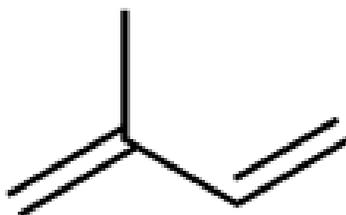


Figura 6. Estructura de un terpeno.

En cuanto a derivados sintéticos, un gran número de investigaciones se han desarrollado enfocados en las quinolinas (Fig. 7), las cuales han sido utilizadas como potenciales agentes anticancerígenos (Wallace y col. 2003), particularmente sobre células de cáncer de próstata (Isaacs y col., 2006) y como inhibidores de telomerasas en células humanas (Caprio y col., 2000). En el 2008 se realizó un análisis sobre el efecto citotóxico de un grupo de tetrahydroquinolinas sobre cultivo de células de cáncer de mama humano (SKBr3 y MCF-7), mostrando una inhibición sobre la viabilidad celular y una alta

selectividad hacia la citotoxicidad sobre las líneas tumorales estudiadas (Muñoz, 2008; Muñoz y col., 2011).

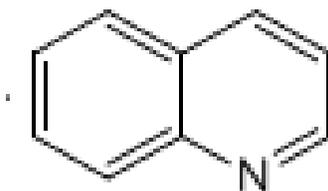


Figura 7. Estructura de las quinolinas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar el posible efecto citotóxico del Ácido de Caracasine y de nuevos derivados indeno(2,1-*c*)quinolinas sobre líneas celulares de cáncer de mama humana MCF-7 y SKBr3, y su respuesta en combinaciones con un fármaco antitumoral.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar el efecto citotóxico del Ácido de Caracasine y de nuevas indeno(2,1-*c*)quinolinas sobre líneas celulares de cáncer de mama humana MCF-7 y SKBr3.
- ✓ Determinar el efecto citotóxico del Ácido de Caracasine y de nuevas indeno(2,1-*c*)quinolinas en cultivos primarios de fibroblastos humanos (células no tumorales - control).
- ✓ Evaluar el efecto citotóxico del fármaco Paclitaxel utilizado en clínicas en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, en las líneas celulares MCF-7 y SKBr3 y en cultivos primarios de fibroblastos humanos.
- ✓ Evaluar el efecto citotóxico de la combinación directa de las indeno(2,1-*c*)quinolinas, el Ácido de Caracasine y el fármaco Paclitaxel en las líneas celulares MCF-7 y SKBr3 y en cultivos primarios de fibroblastos humanos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Líneas celulares

✓ **MCF-7**: (Donada gentilmente por la Dr. Marie France Poupon, Instituto Curie, Paris, Francia). La línea celular MCF-7 es una línea tumoral de mama humana que presenta niveles fisiológicos de la oncoproteína HER2/neu (Siddiqa y col., 2008; Vázquez y col., 2007; Fan y col., 1995; Blagosklonny y col., 1995; Kastan y col., 1992). La línea MCF7 expresan el oncogén WNT7B, además de conservar varias características de epitelio mamario diferenciadas tales como la capacidad para procesar el estradiol a través de receptores estrogénicos citoplasmáticos (Huguet y col., 1994).

✓ **SKBr3**: (Donada gentilmente por el Dr. Manuel Rieber, Instituto de Investigaciones Científicas (IVIC)). La línea celular SKBr3 es una línea tumoral de mama humana que posee una delección en uno de los alelos del gen p53 y una mutación puntual en el aminoácido 175 del alelo restante, lo que codifica a una proteína p53 no funcional, además de sobreexpresar la oncoproteína HER2/neu (Berkeley, 2007; Blagosklonny y col., 1995; Kovach y col., 1991).

✓ **Cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos**: fueron obtenidos a partir de un cultivo primario de dermis humana.

Las líneas celulares MCF-7 y SKBr3 y los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM - GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (GIBCO), 1% de glutamina y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina [100 U/mL/100 µg/mL]-

GIBCO 15240). Tanto las líneas celulares como los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos fueron mantenidos en una estufa a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂, con cambio de medio a las células de al menos tres veces a la semana.

4.2 Productos

4.2.1 Derivados sintéticos

El grupo de compuestos químicos fueron sintetizados a partir de un compuesto fenilpropano denominado *trans-Isoeugenol*, el cual es una sustancia natural aislada por lo general de plantas de Clavos de olor (*Eugenia caryophyllata*) y Canela (*Cinnamomum verum*) (Martínez, 2003). Partiendo de esta estructura se realizaron reacciones de cicloadición imino Diels-Alder (reacción de Povarov) para obtener el compuesto que fue denominado Cris 142. Posteriormente, al compuesto Cris 142 se le realizaron sustituciones altamente selectivas en los radicales R₁ y R₂, suministrando ocho derivados (Fig. 8), siendo sustancias sólidas y estables luego de una purificación cromatográfica y que fueron denominados indeno(2,1-*c*)quinolinas (comunicación personal del Dr. Vladimir V. Kouznetsov, Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia) (tabla 1). Los nueve compuestos sintéticos fueron gentilmente donados por el Dr. Vladimir V. Kouznetsov para la realización de este estudio.

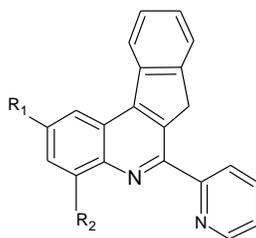
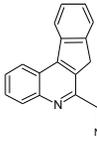
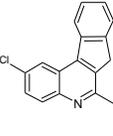
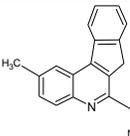
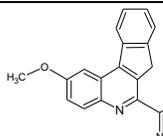
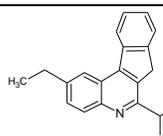
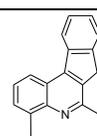
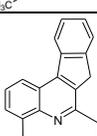
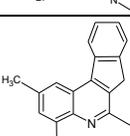
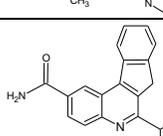


Figura 8. Molécula estructural de los compuestos indeno(2,1-*c*)quinolinas.

Tabla 1. Estructuras y propiedades químicas de los compuestos indeno(2,1-*c*)quinolinas.

Compuesto	Estructura química	Grupos funcionales sustituidos		Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)
		R ₁	R ₂		
Cris 142*		H	H	C ₂₁ H ₁₄ N ₂	308
Cris 131		Cl	H	C ₂₁ H ₁₃ ClN ₂	294
Cris 148		CH ₃	H	C ₂₂ H ₁₆ N ₂	328
Cris 153		OCH ₃	H	C ₂₂ H ₁₆ N ₂ O	324
Ar 4		CH ₂ CH ₃	H	C ₂₃ H ₁₈ N ₂	322
Ar 68		H	CH ₂ CH ₃	C ₂₃ H ₁₈ N ₂	322
Ar 69		H	Br	C ₂₁ H ₁₃ BrN ₂	373
Ar 70		CH ₃	CH ₃	C ₂₃ H ₁₈ N ₂	322
Ar 71		CONH ₂	H	C ₂₂ H ₁₅ N ₃ O	337

Cris 142*: compuesto seleccionado como patrón.

4.2.2 Producto natural

El producto natural se obtuvo a partir de hojas y flores de la planta *Croton micans* aislado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, y cedidos gentilmente por la Prof. Alírica Suárez para la realización de este trabajo (Suárez y col., 2008a). Este producto posee como estructura patrón un seco-ent-kaurano y fue denominado Ácido de Caracasine (Fig. 9); tiene un peso molecular de 316 g/mol y una fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_3$.

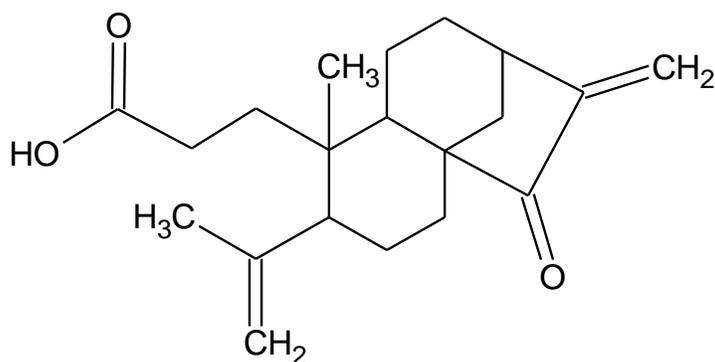


Figura 9. Estructura química del producto natural Ácido de caracasine.

4.2.3 Fármaco antitumoral utilizado en clínicas (Taxol)

Se utilizó el Taxol (Paclitaxel) como control positivo debido a su actividad citotóxica y que es actualmente utilizado en el tratamiento clínico de una variedad de neoplasias. Es un agente antimicrotubular que estabiliza los microtúbulos impidiendo la despolimerización, provocando la inhibición de la reorganización dinámica normal de la red microtubular (Infodoctor, 2008). Tiene un peso molecular de 853,9 g/mol y una fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$.

4.3 Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de los productos utilizados en este trabajo (derivados sintéticos, natural y comercial) disueltos en DMSO se realizó mediante la construcción de las curvas dosis-respuesta para con ello determinar la concentración del producto que inhibe la proliferación celular del 50% de la población (Alzamora y col., 2007), denominado concentración inhibitoria media (CI₅₀). La determinación de la citotoxicidad *in vitro* en las diferentes líneas celulares y cultivo primario de fibroblastos se realizó a las siguientes concentraciones: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5; 10; 15; 25 y 100 µg/mL, mediante el ensayo de MTT. Este método se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y1)-2,5-difeniltetrazol, llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, con la formación de un compuesto coloreado azul-violeta denominado formazán, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido utilizado para medir la supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células metabólicamente activas es proporcional a la cantidad de formazán presente (Mosmann, 1983).

Las células en una densidad de 5.000 por pozo se sembraron en placas de 96 pozos en un volumen de 50 µL de medio DMEM. Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir la adherencia de las células al soporte y cumplido el periodo de incubación se prepararon las diluciones de los compuestos y el fármaco o droga antitumoral en medio de cultivo. Luego de añadir las diluciones de los productos a las células en un volumen de 50 µL (para obtener un volumen final por pozo de 100 µL), éstas se incubaron bajo condiciones de 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas para permitir la

acción de los productos. Transcurrido este tiempo, se descartó el medio con los productos y seguidamente se añadieron 50 μL de MTT (0,4 mg/mL); se incubaron las placas por 3 horas a 37°C para permitir la formación de los cristales de formazán; posteriormente se eliminó el sobrenadante y finalmente se agregaron 50 μL de DMSO por pozo con la finalidad de disolver los cristales de formazán. Por último, se leyó la densidad óptica de los pozos a una longitud de onda de 570 nm (DO_{570}) en un lector de placas TECAN.

Se estableció el porcentaje de citotoxicidad (%C) para la relación entre las células control y las tratadas, con la finalidad de obtener el porcentaje de células afectadas por el tratamiento, lo cual se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de citotoxicidad (\%C)} = 1 - \frac{DO_{570} \text{ células tratadas}}{DO_{570} \text{ células control}} * 100$$

Cada ensayo se realizó por triplicado, tomando en cuenta el control de viabilidad, el cual representa un grupo de pozos en la placa con el medio de cultivo más las células sin el producto a evaluar, y el blanco, que representa un grupo de pozos sin células pero con medio de cultivo y el tratamiento respectivo. La concentración final del disolvente DMSO luego de la preparación de las diluciones de los compuestos para los ensayos se encontró por debajo al 1%, debido a que por encima de este valor es tóxico para los cultivos *in vitro* (Rowley y Anderson, 1993; Goldman y col., 1987).

Con los valores de viabilidad obtenidos mediante el ensayo con la técnica del MTT, se calculó la concentración inhibitoria media (CI_{50}), con un intervalo de confianza del 95% mediante una regresión no lineal, usando para ello el software GraphPad Prism 4 (Institutive Software for Science, San Diego, California, EUA).

Finalmente, se elaboraron las representaciones gráficas de las curvas de viabilidad para los compuestos seleccionados. Dichas representaciones se obtuvieron mediante un gráfico XY, donde se tienen como variables Porcentaje de viabilidad vs. Concentración de los compuestos ($\mu\text{g/mL}$), y fueron elaboradas mediante el uso del software OriginPro 8.

4.4 Índice de selectividad

Una vez obtenidas las CI_{50} se calcularon los índices de selectividad de los compuestos sintéticos, definido como la relación de citotoxicidad entre las células normales y las células cancerosas:

$$\text{Índice de selectividad} = \frac{CI_{50} \text{ fibroblastos dérmicos humanos}}{CI_{50} \text{ línea tumoral}}$$

Un valor mayor a 1 indica que la citotoxicidad para las células tumorales supera a la citotoxicidad en las células normales, por lo que el producto evaluado es considerable como posible quimioterapia (Callacondo y col., 2008).

4.5 Curvas de crecimiento

Una vez obtenidos los valores de CI_{50} para cada derivados sintéticos, se procedió a seleccionar aquellos compuestos con los mayores valores de citotoxicidad sobre las líneas tumorales evaluadas, y conjuntamente con el compuesto natural (Ácido de caracasine) y el control (Taxol) se realizaron las curvas de crecimiento para cada uno de la siguiente

manera: se sembraron 5×10^4 células en placas de 60 mm y se incubaron con los compuestos a una concentración equivalente a la obtenida para la CI_{50} para cada compuesto durante los periodos de incubación seleccionados: 24, 48, 72, 96 y 120 horas respectivamente. Una vez cumplido cada periodo de tiempo, se desprendieron las células con una solución de Tripsina-EDTA y se realizó un ensayo de viabilidad. Dicho ensayo contó con un control celular para cada línea evaluada, el cual no tuvo la presencia de algún compuesto citotóxico. La viabilidad celular se determinó empleando el método de exclusión del colorante Azul de Tripano y realizando el conteo celular en la cámara de Neubauer.

Las curvas de crecimiento se representaron mediante un gráfico XY, donde se tienen como variables la Viabilidad celular (células viables/mL) vs. Tiempo de incubación (horas), y fueron elaboradas mediante el uso del software OriginPro 8.

4.6 Combinación de productos

Con los valores de CI_{50} determinados para cada uno de los compuestos químicos a evaluar en cada una de las líneas celulares utilizadas, se tomaron los mismos compuestos seleccionados para la elaboración de las curvas de crecimiento y se procedió a realizar las combinaciones de compuestos (derivados sintéticos y natural) y el fármaco antitumoral.

El protocolo a seguir fue el propuesto por Chou y colaboradores (1984) y Chou (1991), el cual es definido como Método de Índice de Combinación (M.I.C.). Este método tiene como base ecuaciones matemáticas cuyos orígenes se derivan de las usadas en los modelos de cinética enzimática. El esquema propuesto para este experimento se presenta en

la figura 10, y el mismo se realizó utilizando diluciones seriadas de una mezcla en proporción 1:1 o 1:1:1 según sea el caso (producto (derivado sintético o natural) + fármaco-droga antitumoral; producto (derivado sintético) + producto (natural)). Debido a esta equivalencia en las proporciones de las mezclas, los efectos citotóxicos de cada compuesto serán iguales.

		Producto 1				
		0,25 x CI ₅₀	0,50 x CI ₅₀	1,00 x CI ₅₀	2,00 x CI ₅₀	4,00 x CI ₅₀
Producto 2	0,25 x CI ₅₀					
	0,50 x CI ₅₀					
	1,00 x CI ₅₀					
	2,00 x CI ₅₀					
	4,00 x CI ₅₀					

Figura 10. Esquema de la obtención de las concentraciones a utilizar para la evaluación de las combinaciones de los productos (derivados sintéticos, natural y droga comercial) basado en el diseño experimental propuesto por Chou en 1991.

Utilizando esta metodología para las combinaciones propuestas por Chou y colaboradores (1984), se realizaron combinaciones entre dos productos (derivado sintético vs. producto natural; derivado sintético vs. fármaco-droga antitumoral; producto natural vs. fármaco-droga antitumoral), y combinaciones entre los tres productos (derivado sintético vs. producto natural vs. fármaco-droga antitumoral). Para la triple combinación, las concentraciones a utilizar seguirán el mismo protocolo para la combinación entre dos productos mostrado en la figura 10. Las concentraciones utilizadas para cada compuesto en la combinación se encuentran relacionadas con factores asociados al CI₅₀; en caso de que el valor de concentración inhibitoria media fuera mayor que 100 µg/mL, se establece como

CI₅₀ una concentración de 100 µg/mL. Los ensayos de combinación se realizaron con la misma metodología aplicada para los ensayos de citotoxicidad.

Los análisis correspondientes a estos ensayos se elaboraron utilizando el software estadístico CalcuSyn (Chou y Martín, 2005) utilizando los datos de absorbancia obtenidos mediante el ensayo del MTT, con el cual se efectuaron los cálculos de los Índices de Combinación (IC) para establecer el grado de sinergismo, antagonismo o aditividad de las combinaciones. Si se obtienen valores de IC <1, =1 y >1, nos indican la presencia de sinergismo, aditividad y antagonismo, respectivamente. Por otra parte, se pudo establecer en qué grado ocurren estas interacciones, para lo cual se utilizaron los rangos de IC propuestos por Chou y Martin (2005) (Tabla 2).

Tabla 2. Rangos de IC referidos para la selección de los patrones de combinación de fármacos (Tomado y modificado de Chou y Martin, 2005).

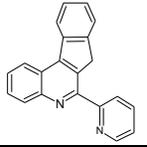
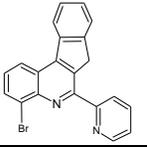
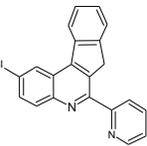
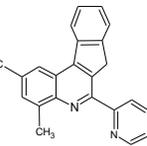
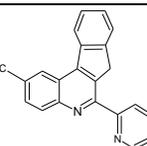
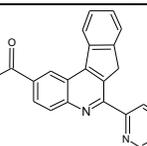
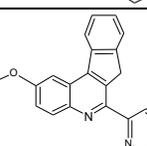
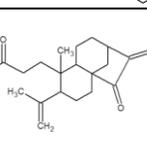
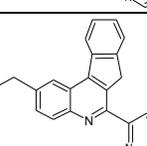
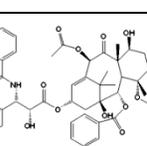
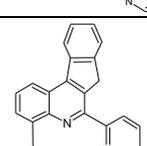
Rango de Índice de Combinación	Descripción
< 0,1	Sinergismo muy fuerte
0,1 - 0,3	Sinergismo fuerte
0,3 - 0,7	Sinergismo
0,7 - 0,9	Sinergismo débil a moderado
0,9 - 1,1	Cercano a la aditividad
1,1 - 1,45	Antagonismo débil a moderado
1,45 - 3,3	Antagonismo
> 3,3	Antagonismo fuerte a muy fuerte

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación citotóxica de los derivados indeno(2,1-*c*)quinolinas sobre las líneas tumorales y células control

En general, los fármacos pueden definirse como cualquier sustancia capaz de generar una modificación en la actividad celular, ya sea incrementándolas o disminuyéndolas (Flores y col., 2008; Morón y Rodríguez, 2002; Velazco y col. 1993). Estas modificaciones se pueden realizar mediante la asociación a moléculas generalmente encontradas en membranas celulares, en donde estas relaciones vienen dadas de acuerdo a la sensibilidad que posea el compuesto con la molécula blanco en particular y el grado de actividad intrínseca que posea. En este trabajo se evaluaron los efectos citotóxicos de las moléculas indeno(2,1-*c*)quinolinas con diversas modificaciones químicas en su estructura sobre las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SKBr3 y células no tumorales utilizadas como control (cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos). En la tabla 3 se puede observar los valores de concentración inhibitoria obtenida *in vitro* del grupo de compuestos sintéticos (indeno(2,1-*c*)quinolinas), además del compuesto natural (Ácido de caracaine), comparándose los valores con la droga antitumoral comercial (Taxol) tomada como control positivo, obtenidos a las 72 horas de acción de los compuestos.

Tabla 3. Valores de concentración inhibitoria del 50% de la población (CI₅₀) a las 72 horas de tratamiento de los productos evaluados para cada una de las líneas tumorales de cáncer de mama y las células control.

Compuesto	Estructura química	Líneas tumorales		Células control	Compuesto	Estructura química	Líneas tumorales		Células control
		SKBr3	MCF-7	Fibroblastos			SKBr3	MCF-7	Fibroblastos
Cris 142*		16,41 ± 1,07	3,53 ± 1,09	> 100	Ar 69		> 100	> 100	> 100
Cris 131		21,48 ± 1,12	48,64 ± 1,06	53,09 ± 1,08	Ar 70		> 100	> 100	> 100
Cris 148		43,95 ± 1,08	> 100	> 100	Ar 71		> 100	> 100	> 100
Cris 153		> 100	> 100	> 100	Ácido de caracasine		18,58 ± 1,06	5,28 ± 1,04	27,93 ± 1,05
Ar 4		18,49 ± 1,09	14,26 ± 1,01	> 100	Taxol		0,01 ± 1,35	0,03 ± 1,25	0,65 ± 1,03
Ar 68		> 100	> 100	> 100	<p>* Cris 142: compuesto patrón. ** Los valores de CI₅₀ están expresados en µg/mL. Para valores de CI₅₀ en unidades µM, ver Anexo 1. *** Los valores > 100 indican que el valor de CI₅₀ se encuentra por encima del rango de concentraciones evaluados.</p>				

Los resultados presentados en la tabla 3 muestran que no todos los compuestos sintéticos tienen actividad citotóxica en las líneas evaluadas. De todos los compuestos sintéticos evaluados, el compuesto patrón Cris 142 presentó la mayor actividad citotóxica sobre las dos líneas celulares, mostrando valores de CI_{50} de $16,41 \pm 1,07$ y $3,53 \pm 1,09$ $\mu\text{g/mL}$, donde además se puede evidenciar que la línea celular MCF-7 presentó mayor sensibilidad a este compuesto en comparación a la línea celular SKBr3. Con respecto a las células control, el Cris 142 no presentó actividad citotóxica en el rango de concentraciones evaluadas en la metodología, lo que expone algún tipo de especificidad por parte del compuesto con respecto a las líneas tumorales evaluadas. Un comportamiento similar puede observarse para el compuesto Ar 4, cuyos valores de CI_{50} se encuentran en $18,49 \pm 1,09$ $\mu\text{g/mL}$ para la línea SKBr3 y $14,26 \pm 1,01$ $\mu\text{g/mL}$ para la línea MCF-7, mientras que no presentó actividad citotóxica en las células control.

Por otra parte, el compuesto Cris 131 presentó valores de CI_{50} de $21,48 \pm 1,12$ y $48,64 \pm 1,06$ $\mu\text{g/mL}$ para los dos tipos celulares tumorales estudiados (SKBr3 y MCF-7, respectivamente), mostrando una menor citotoxicidad que la presentada por el compuesto patrón (Cris 142); adicionalmente, fue el único derivado sintético que presentó actividad citotóxica para las células control. En cuanto al compuesto que presentó la menor actividad citotóxica entre los derivados sintéticos del grupo indeno(2,1-c)quinolinas que tuvieron actividad fue el Cris 148, cuyo valor de CI_{50} para la línea tumoral SKBr3 se encontró en $43,95 \pm 1,08$ $\mu\text{g/mL}$, sin presentar citotoxicidad tanto para la línea tumoral MCF-7 como para las células control.

Al comparar los resultados obtenidos para los compuestos que tuvieron actividad en las líneas celulares de cáncer de mama (Cris 131, Cris 148 y Ar 4) con respecto a la

actividad mostrada por el compuesto patrón Cris 142, se pudo observar una diferencia en los valores de concentración inhibitoria media con cada compuesto, lo que se puede deber en gran medida a las modificaciones químicas realizadas en los grupos funcionales de los radicales R_1 y R_2 de la molécula patrón (ver fig. 8). En base a estos resultados se puede deducir que la línea celular SKBr3 es más sensible a la acción de los derivados sintéticos Cris 148 y Cris 131, mientras que la línea celular MCF-7 es más sensible a Cris 142 y Ar 4. Por último, los compuestos sintéticos Cris 153, Ar 68, Ar 69, Ar 70 y Ar 71 no mostraron citotoxicidad en ninguna de las líneas tumorales de mama ni en las células control, encontrándose que sólo cuatro de los nueve derivados sintéticos estudiados presentan actividad citotóxica sobre las líneas de cáncer de mama evaluadas.

Se pueden comparar los resultados obtenidos para los derivados sintéticos analizados en este trabajo como derivados quinolínicos con lo reportado por Rasoul-Amini y colaboradores en el 2006, los cuales estudiaron la actividad antineoplásica de derivados de quinolinas en células T47D de cáncer de mama humana, obteniendo valores de CI_{50} de 100 mM. Posteriormente, Shi y colaboradores en el 2008 evaluaron la actividad antitumoral de quinolinas sustituidas en células T47D, obteniendo valores de CI_{50} en un rango de $15,6 \pm 3$ a 3732 ± 697 nM, que son relacionados con los valores de CI_{50} obtenidos en este trabajo con los derivados sintéticos indeno(2,1-*c*)quinolinas, los cuales son en un rango de 11,46 a 165,44 μ M. Todos estos trabajos evidencian la heterogeneidad en las respuestas celulares obtenidas con la utilización de compuestos derivados de quinolinas, además de su amplia gama de acción sobre diversas líneas celulares asociadas a tumores mamarios.

Un compuesto que puede ser comparado con las moléculas indeno(2,1-*c*)quinolinas utilizadas en este trabajo debido a la semejanza en sus estructuras es TAS-103 (6-[[2-

(dimethylamino)ethyl]amino]-3-hydroxy-7H-indeno[2,1-c]quinolin-7-one hydrochloride), el cual presentó un valor de CI_{50} para la línea tumoral MCF-7 de $0,052 \mu\text{M}$ (Aoyagi y col., 1999), además de demostrarse que posee actividad inhibitoria sobre las enzimas Topoisomerasas I y II (Utsugi y col., 1997; Minderman y col., 2000), induciendo apoptosis (Ohyama y col., 1999). Esto sugiere diversos mecanismos de acción para los compuestos derivados de indeno(2,1-c)quinolinas, los cuales pueden presentar una actividad intrínseca en la reparación del ADN o promoviendo la apoptosis celular según otras moléculas con estructura química similar que poseen estos blancos de acción.

Con respecto a la actividad citotóxica presentada sobre las células control, sólo una de las 9 moléculas sintéticas presentó actividad (Cris 131), con un valor de CI_{50} de $53,09 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$, lo que representa una menor sensibilidad de 1 y 2,5 veces con respecto a las líneas tumorales MCF-7 y SKBr3 respectivamente. Los otros derivados sintéticos no presentaron actividad citotóxica para las líneas tumorales evaluadas.

5.2 Evaluación citotóxica del Ácido de caracasine sobre las líneas tumorales y células control

En cuanto al Ácido de caracasine, este producto natural presentó actividad citotóxica en las líneas tumorales evaluadas (MCF-7 y SKBr3), mostrando valores de CI_{50} de $18,58 \pm 1,06$ y $5,28 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estos valores son equivalentes con lo reportado por Téllez y colaboradores (2006) donde evaluaron diversos diterpenos derivados del kaureno a partir de la planta *Espeletia killipii* (Familia Asteraceae), el cual presentó un valor de CI_{50} de $2 \mu\text{g/mL}$ para la línea celular MCF-7. Por otra parte, Suárez y colaboradores (2009) obtuvieron un valor de CI_{50} de $6,00 \pm 1,00 \mu\text{g/mL}$ para la línea

celular MCF-7 con el Ácido de caracasine extraído de la misma planta, *Croton micans*, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo son corroborados por estos autores. Para las células control (cultivo de fibroblastos), el Ácido de caracasine presentó un valor de CI_{50} de $27,93 \pm 1,05 \mu\text{g/mL}$, lo que equivale a un valor de 2 y 3 veces menor a lo obtenido para las líneas SKBr3 y MCF-7.

Comparando la citotoxicidad obtenida para las células control, por el Ácido de caracasine con el derivado sintético Cris 131 como único compuesto del grupo sintético indeno(2,1-c)quinolinas que tuvo actividad citotóxica para este cultivo, se puede observar que el compuesto natural tuvo una mayor actividad sobre el cultivo primario de fibroblastos que la presentada por el derivado sintético, con lo que se puede deducir que estas células son 2 veces más sensibles a la acción del Ácido de caracasine que del compuesto Cris 131.

5.3 Evaluación citotóxica del Taxol sobre las líneas tumorales y células control

Al comparar los resultados obtenidos por los derivados sintéticos y el producto natural con la droga antitumoral Taxol, se puede observar que ninguno de estos 10 compuestos evaluados presentó una actividad citotóxica tan marcada con referencia al Taxol, el cual obtuvo valores de CI_{50} de $0,01 \pm 1,35$; $0,03 \pm 1,25$ y $0,65 \pm 1,03 \mu\text{g/mL}$ para las líneas tumorales SKBr3 y MCF-7 y las células control, respectivamente. Estudios realizados por Liebmann y colaboradores (1993), reportaron valores de CI_{50} de 2,5 nM para la línea celular MCF-7, que al ser comparados con los resultados obtenidos en este trabajo, los derivados de indeno(2,1-c)quinolinas presentan menor actividad citotóxica (ver Anexo 1), de lo que se puede deducir que la línea tumoral MCF-7 utilizada en este trabajo es menos sensible a este fármaco, posiblemente debido al pasaje en que se utilizaron las líneas

tumorales en cada caso de estudio y su consecuente estado en el ciclo celular. De igual forma, Nagourney en 2001 realizó estudios *in vitro* utilizando Taxol sobre biopsias de un tumor sólido de mama, obteniendo valores de CI_{50} de 9,85 μM . La diferencia entre los valores de citotoxicidad obtenidas por Nagourney y los de este trabajo se fundamenta en que los cultivos primarios de tumores no sólo presentan células tumorales, sino una heterogeneidad celular (fibroblastos, queratinocitos, entre otros), por lo que los valores de citotoxicidad que se puedan obtener en un cultivo primario podrían ser mayores debido a los distintos grados de sensibilidad que presentan las diferentes células del cultivo al producto utilizado.

Con los valores de CI_{50} obtenidos en este trabajo, se puede concluir que la línea celular SKBr3 utilizada es más quimio-sensible al compuesto Taxol que la línea MCF-7, en contraposición con lo reportado por Ciardiello y colaboradores (2000), Merlin y colaboradores (2002) y Campiglio y colaboradores (2003), los cuales exponen que la sobreexpresión de la oncoproteína HER2/neu se encuentra asociada con la quimio-resistencia de compuestos taxanos contra el cáncer según estudios *in vitro* realizados. Sin embargo, Ajabnoor y colaboradores en el 2012 demostraron un aumento en la resistencia al compuesto Paclitaxel (Taxol) en pasajes secuenciales de un cultivo de células MCF-7, lo que fue explicado por la pérdida en la expresión de la proteína caspasa-7, la cual se encuentra asociada a procesos apoptóticos (Elinos-Báez y col., 2003), aunque el intervalo de CI_{50} es muy pequeño entre las dos líneas tumorales estudiadas.

5.4 Selectividad de los derivados sintéticos indeno(2,1-*c*)quinolinas y el Ácido de caracasine en las células tumorales y control

Un aspecto importante a considerar cuando se evalúa el efecto citotóxico de compuestos antitumorales es su selectividad en las células estudiadas. Esta selectividad es presentada como la relación de citotoxicidad entre las células normales y células cancerosas (Callacondo y col., 2008).

En la tabla 4 se presentan los valores de selectividad obtenidos en este trabajo, en los que se pueden observar que la línea celular SKBr3 fue la que presentó el mayor número de moléculas derivadas de quinolinas con actividad selectiva sobre ella comparado con la selectividad presentada en la línea celular MCF-7. Entre todos estos compuestos sintéticos, el Cris 142 fue el que presentó los valores más altos de selectividad para ambas líneas evaluadas, con actividad 6 y 28 veces más citotóxica sobre las células tumorales de las líneas SKBr3 y MCF-7, respectivamente, con respecto a las células control. Por otra parte, el compuesto Ar 4 mostró una alta selectividad aunque no tan marcada como la presentada por el Cris 142, con valores de 5,4 y 7 para las líneas SKBr3 y MCF-7, respectivamente.

Los índices de selectividad observados para el Ácido de caracasine son relativamente bajos, encontrándose valores de 1,5 y 2,7 para las líneas celulares SKBr3 y MCF-7 respectivamente. Badisa y colaboradores (2009) evaluaron la actividad selectiva de dos ent-kauranos diterpenoides obtenidos de *Licania michauxii*, obteniendo valores de selectividad de 1,3 y 1,8 sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7, aunque los valores de selectividad obtenidos en este trabajo son mayores.

Por otra parte, al evaluar los índices de selectividad de la droga antitumoral Taxol, se puede observar que presenta los mayores valores de selectividad de todas las moléculas estudiadas en este trabajo, con actividad hasta 22 y 65 veces más citotóxica sobre las células tumorales de las líneas SKBr3 y MCF-7, respectivamente, frente a las células normales. Esto muestra la alta selectividad que presenta este compuesto para las líneas tumorales evaluadas, posiblemente debido a que, como su blanco de acción son las tubulinas, las células tumorales poseen una alta tasa replicativa, con lo que presentan mayor dinamismo en sus microtúbulos a diferencia de las células control, por lo que son más sensibles a la acción de esta droga antitumoral.

Tabla 4. Valores de índices de selectividad de cada producto evaluado en las líneas celulares de cáncer de mama SKBr3 y MCF-7.

	SKBr3	MCF-7
Cris 148	2,28	1,00
Cris 131	2,47	1,09
Cris 142	6,09	28,33
Cris 153	1,00	1,00
Ar 4	5,41	7,01
Ar 68	1,00	1,00
Ar 69	1,00	1,00
Ar 70	1,00	1,00
Ar 71	1,00	1,00
Ácido de caracasine	1,50	2,67
Taxol	65,00	21,67

Entre los compuestos antitumorales evaluados del grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas, el Cris 142 es un compuesto clave como posible fármaco contra el cáncer de mama que tenga características compartidas con la línea tumoral MCF-7, debido a que según los valores de

citotoxicidad obtenidos entre esta línea y las células control y su consecuente índice de selectividad, se observa que el rango tóxico de acción entre estos dos cultivos es mayor que la presentada por el fármaco comercial Taxol, por lo que sería una alternativa en el tratamiento antineoplásico de mama. Esta observación no es comparable con la línea tumoral SKBr3, donde fue obtenido un valor de selectividad mayor para el fármaco comercial Taxol.

5.5 Relación estructura-actividad y características farmacológicas de las indeno(2,1-*c*)quinolinas y el Ácido de caracasine

Como se ha descrito anteriormente, la estructura molecular de los compuestos con características citotóxicas tienen una relación intrínseca con su actividad celular, dependiendo de su capacidad para interactuar con los componentes de la membrana celular o de organelos o por la estrecha relación con su receptor específico. Con todo esto se puede deducir que cualquier modificación en la estructura química del compuesto puede afectar los efectos farmacológicos que éste presente.

En cuanto al grupo de compuestos indeno(2,1-*c*)quinolinas, se ha demostrado que la naturaleza del sustituyente y su posición en el anillo de las quinolinas afecta marcadamente la actividad antitumoral de dicho compuesto (Lukevics y col. 2007). De acuerdo a estas modificaciones realizadas en el anillo de las quinolinas, se ha establecido 3 grupos estructurales:

- ✓ Grupo A: está conformado por las moléculas Cris 131, Cris 148, Cris 153, Ar 4 y Ar 71, los cuales se caracterizan porque la sustitución la presenta en la posición R_1 de la molécula patrón (Cris 142) del grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas, manteniendo en la posición R_2 un átomo de hidrógeno (ver tabla 1).
- ✓ Grupo B: está conformado por las moléculas Ar 68 y Ar 69 que se caracterizan porque la sustitución la presenta en la posición R_2 de la molécula

patrón (Cris 142) del grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas, manteniendo en la posición R₁ un átomo de hidrógeno (ver tabla 1).

- ✓ Grupo C: está conformado únicamente por la molécula Ar 70, el cual se caracteriza porque las sustituciones las presenta tanto en la posición R₁ como R₂ de la molécula patrón del grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas (ver tabla 1).

El compuesto Cris 142 (compuesto patrón de los derivados sintéticos) no posee sustituciones tanto en la posición R₁ ni en R₂, por lo que a continuación se muestra una comparación estructural y funcional de los derivados sintéticos pertenecientes al grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas con respecto a este compuesto patrón.

Como fue descrito anteriormente, el primer grupo de compuestos (grupo A) presenta sustituciones químicas en la posición R₁ de la estructura patrón (ver Fig. 8), donde el compuesto Cris 131 presenta un átomo de Cloro, lo que le confiere una menor citotoxicidad tanto en las líneas tumorales como en las células control comparado con el compuesto patrón (Fig. 11, 12 y 13), lo que representa una disminución de actividad de 1,3 y 14 veces para las líneas tumorales SKBr3 y MCF-7, respectivamente, en comparación con la molécula patrón Cris 142. Además, este compuesto (Cris 131) presentó actividad citotóxica para las células control donde el compuesto Cris 142 no presentó actividad. Así mismo, esta disminución en la citotoxicidad no tuvo repercusiones negativas sobre la efectividad máxima, ya que este compuesto presentó un incremento de un 4% en comparación con la efectividad máxima obtenida para el compuesto patrón (ver Porcentajes de citotoxicidad en el Anexo 2). Por otra parte, este mismo comportamiento, aunque más marcado, se muestra cuando en la posición R₁ de la molécula inicial se sustituye el átomo de hidrógeno por un

grupo metilo (molécula Cris 148) o un grupo etilo (molécula Ar 4), observándose una disminución en la actividad citotóxica de 1,2 a 3 veces con respecto a la molécula patrón, respectivamente (Fig. 11, 12 y 13), con ello reduciendo su efectividad máxima en 12,8 y 2,5% en comparación con la efectividad máxima obtenida para el compuesto patrón (ver anexo 2). Sin embargo, las sustituciones realizadas en la posición R₁ de la molécula patrón con un grupo metoxi para la molécula Cris 153 y un grupo amido para la molécula Ar 71, no se observó efecto positivo sobre la actividad citotóxica de estos compuestos con respecto a la molécula patrón, por lo que no se tomaron en consideración en los ensayos posteriores.

Con respecto al grupo B, el cual se encuentra conformado por las moléculas Ar 68 y Ar 69, y que presentan una sustitución del átomo de hidrógeno de la posición R₂ de la molécula patrón Cris 142 por un grupo etilo y un átomo de bromo, respectivamente, no mostraron actividad citotóxica sobre las líneas tumorales y células control. Asimismo, el grupo C se encuentra conformado por la molécula Ar 70, la cual presenta una doble sustitución, tanto en la posición R₁ como en R₂ de la molécula patrón. En ambos casos, el átomo de hidrógeno en las posiciones R₁ y R₂ de la molécula patrón (Cris 142) fue sustituido por un grupo metilo. Este compuesto no presentó actividad citotóxica sobre las líneas tumorales y células control evaluadas, por lo que, tanto el compuesto Ar 70, como el Ar 68 y Ar 69 no se tomaron en cuenta en los ensayos posteriores.

Finalmente, se puede inferir que las diferencias encontradas con respecto a los valores de CI₅₀ para los derivados sintéticos del grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas evaluados sobre las líneas tumorales de cáncer de mama SKBr3 y MCF-7, se pueden deber a las diversas modificaciones realizadas tanto en la posición R₁ como R₂ de la molécula patrón. Además,

es de resaltar que todas las sustituciones realizadas en la molécula patrón de las indeno(2,1-*c*)quinolinas estudiadas en este trabajo, disminuyeron la actividad citotóxica presentada sobre las líneas tumorales de mama MCF-7 y SKBr3.

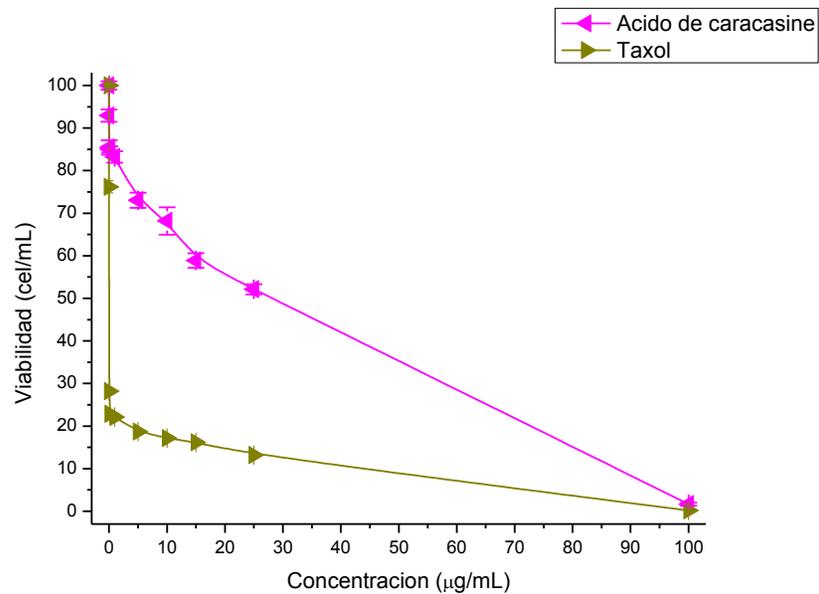
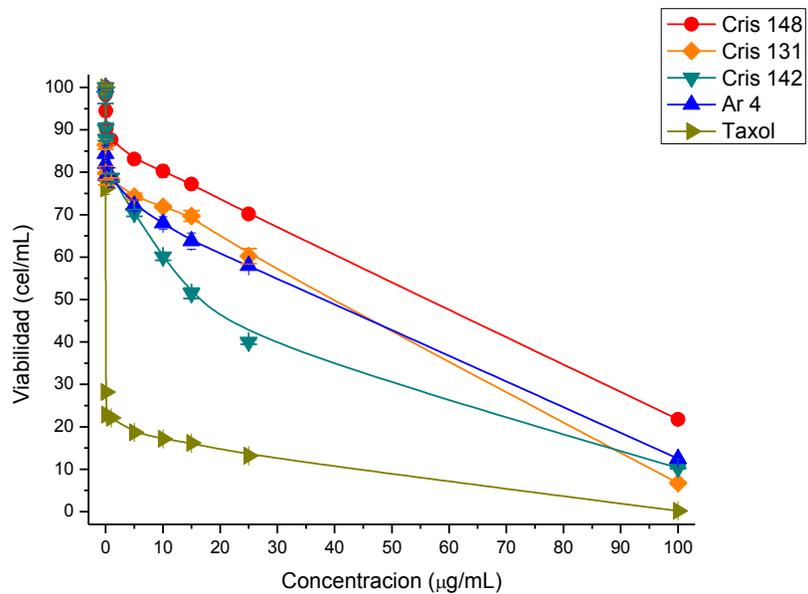


Figura 11. Curvas de viabilidad de la línea celular SKBr3 frente a los compuestos seleccionados pertenecientes al grupo indeno (2,1-*c*)quinolinas, el Ácido de caracasine y la droga antitumoral (Taxol), a las 72 horas de tratamiento.

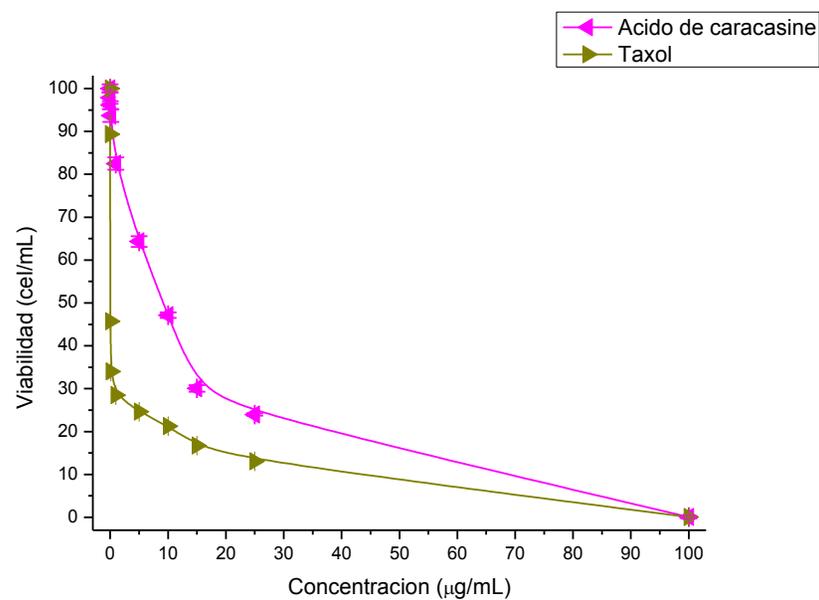
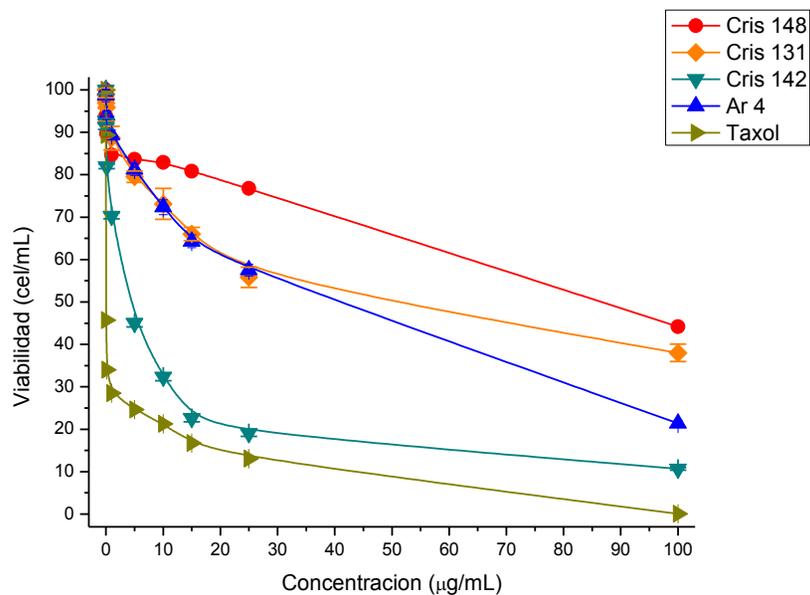


Figura 12. Curvas de viabilidad de la línea celular MCF-7 frente a los compuestos seleccionados pertenecientes al grupo indeno (2,1-*c*)quinolinas, el Ácido de caracasine y la droga antitumoral (Taxol) a las 72 horas de tratamiento.

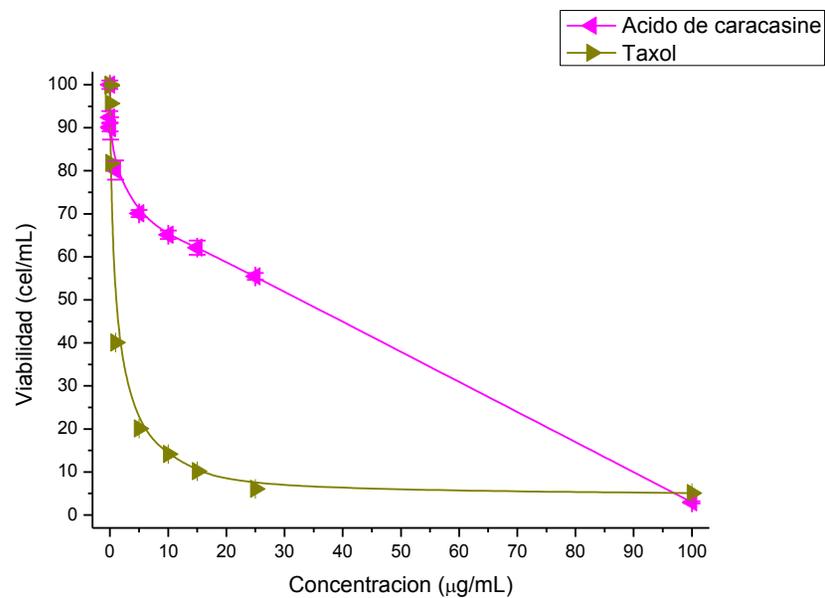
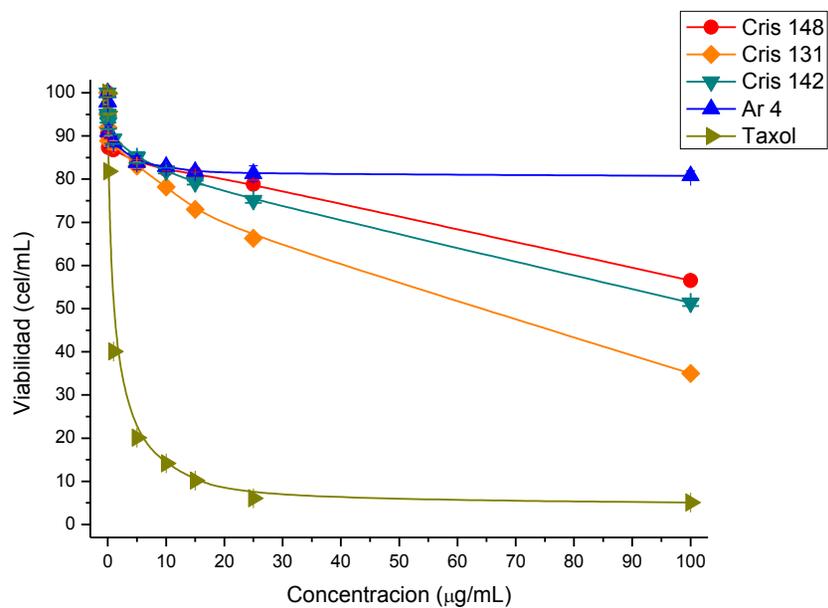


Figura 13. Curvas de viabilidad del cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos frente a los compuestos seleccionados pertenecientes al grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas, el Ácido de caracasine y la droga antitumoral (Taxol) a las 72 horas de tratamiento.

5.6 Efecto citotóxico sobre la tasa de crecimiento por las indeno (2,1-*c*)quinolinas y el Ácido de caracaine

Para la evaluación del efecto citotóxico sobre la tasa de crecimiento celular tanto de las líneas tumorales de mama como de las células control, se seleccionaron sólo los compuestos del grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas con mayor actividad citotóxica, los cuales fueron Cris 148 y Ar 4, además del compuesto patrón Cris 142, el producto natural Ácido de caracaine y la droga Taxol.

Como se puede observar en la figura 14, existen diferencias en el efecto de los compuestos sobre la proliferación celular en los diversos cultivos evaluados. En cuanto a las tendencias que presentan las curvas control de proliferación celular para cada cultivo estudiado, se observa un mayor número de células viables para la línea tumoral SKBr3 que para el cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos y la línea de cáncer de mama MCF-7. Esto puede ser explicado ya que, según lo reportado por Mannello y Papa (2003), Campiglio y colaboradores (2003) y Korkaya y colaboradores (2008), la sobreexpresión de la oncoproteína HER2/neu se encuentra relacionada con una mayor tasa de proliferación de 3 a 5 veces en aquellos tumores que lo presenten, como es el caso de la línea celular SKBr3.

Enfocando más específicamente cada curva de crecimiento con la utilización de los compuestos, en la línea celular SKBr3 se observan diferencias en las respuestas en la viabilidad celular con los tratamientos de los diversos compuestos en comparación con la curva control. La tasa de crecimiento del cultivo control es mayor a los cultivos con

tratamiento, observándose que la viabilidad de estos últimos a partir de las 72 horas de incubación se mantiene relativamente constante para esta línea celular.

En cuanto a la curva de crecimiento para la línea celular MCF-7 se observa el mismo comportamiento que el presentado con la línea celular SKBr3, aunque para el compuesto Cris 148 el aumento en la viabilidad es equivalente al cultivo control, lo que puede ser evidenciado con los valores de CI_{50} presentados en la tabla 3, donde este compuesto no presentó actividad citotóxica en el rango de concentraciones utilizados (0,001 - 100 $\mu\text{g/mL}$). Con la utilización del compuesto Ar 4, en esta línea celular no se presentó efecto en su proliferación celular durante las primeras 48; sin embargo, a partir de las 72 horas se observa un descenso en la viabilidad celular, lo que podría traducirse en que este compuesto presenta una actividad citotóxica a largo plazo sobre esta línea tumoral. Con los compuestos Cris 142, Ácido de Caracaine y Taxol, se observa que la viabilidad celular de la línea MCF-7 se mantiene constante a lo largo del tiempo, con lo que se puede inferir que estos compuestos podrían inhibir la proliferación celular sin afectar el metabolismo asociado al mantenimiento celular.

Por último, para la curva de crecimiento del cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos, las tendencias que presentan los compuestos Cris 148, Cris 142 y Ar 4 es equivalente a la curva que presentó el cultivo control, con lo que se puede deducir que estos compuestos utilizados no presentan actividad citotóxica sobre este cultivo celular, efecto que se observa con los valores de CI_{50} obtenidos; sólo el Ácido de caracaine y el Taxol fueron los que presentaron una disminución en la viabilidad, lo que es comparable con los valores de CI_{50} presentados en la tabla 3.

Como se observa en las curvas de crecimiento (Fig. 14), existen diferencias en la sensibilidad de las líneas estudiadas cuando se utilizan los diversos compuestos sintéticos, siendo la línea celular SKBr3 la más sensible. En las tres curvas de crecimiento presentadas en la figura 14 se puede observar que la droga que tuvo una mayor inhibición en la viabilidad celular fue el Taxol. Esto es explicado debido a la alta citotoxicidad presentada por este compuesto sobre los cultivos celulares estudiados, lo que es comparado con los valores de CI_{50} mostrados en la tabla 3 (0,01; 0,03 y 0,65 $\mu\text{g/mL}$ para las líneas SKBr3, MCF-7 y las células control, respectivamente).

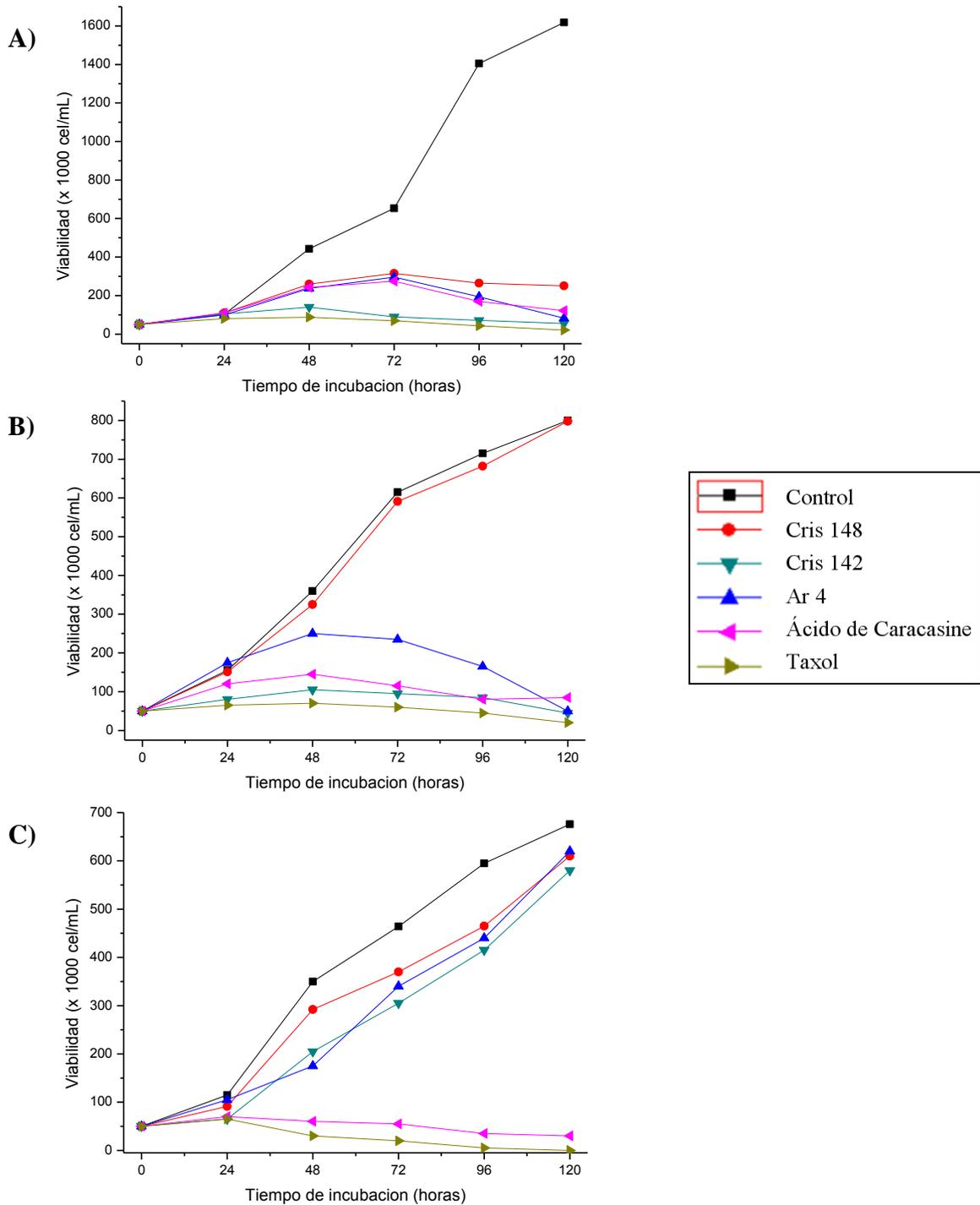


Figura 14. Efecto de los compuestos Cris 148, Cris 142 y Ar 4 del grupo sintético indeno(2,1-*c*)quinolinas, el Ácido de caracaine y la droga antitumoral (Taxol) en la proliferación celular de las tres líneas celulares evaluadas: A) SKBr3; B) MCF-7; C) Cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos, en un intervalo de 0 - 120 horas utilizando como concentración de las drogas su respectivo CI_{50} . El ensayo se realizó con un control celular para cada línea evaluada, el cual no tuvo la presencia de algún compuesto citotóxico.

5.7 Efecto citotóxico de las combinaciones entre tres compuestos del grupo indeno(2,1-c)quinolinas, el Ácido de caracasine y el fármaco antitumoral sobre las líneas tumorales y células control

Luego de describir los efectos citotóxicos, así como algunas de las propiedades farmacológicas del grupo de derivados sintéticos indeno(2,1-c)quinolinas, se continuó con la evaluación de la respuesta de las diferentes líneas tumorales de mama estudiadas frente a combinaciones con el compuesto natural Ácido de caracasine y la droga antitumoral Taxol (control positivo) Taxol. Para esta metodología, fueron seleccionados los compuestos Cris 142 (compuesto patrón), Cris 148 y Ar 4, ya que fueron los derivados sintéticos que presentaron actividad citotóxica frente a las líneas neoplásicas de mama, sin afectar de manera considerable el cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos (células control).

5.7.1 Combinaciones sobre la línea tumoral de mama SKBr3

Los índices de combinación para la línea tumoral SKBr3 son mostrados en la tabla 5, tanto para las dobles como para las triples combinaciones, observándose que la mayoría de las dobles combinaciones realizadas (derivado sintético vs. producto natural; derivado sintético vs. droga antitumoral; producto natural vs. droga antitumoral), según lo descrito por Chou y Martin (2005), generan de un *antagonismo débil a moderado* a *antagonismo fuerte a muy fuerte*, dado que los índices de combinación obtenidos son mayores a 1. El antagonismo puede ser definido como la interacción de compuestos químicos que conlleva a la disminución en la actividad intrínseca o capacidad de cada compuesto, una vez unido a su receptor, de activarlo y producir un efecto biológico, produciendo con ello un descenso

en los efectos de uno, varios o todos los compuestos involucrados en la interacción (Baños y March, 2002; Raffa y Rawls, 2008). Sólo la combinación "Cris 148 + Taxol" generó un *sinergismo muy fuerte* según la clasificación de Chou y Martin (2005), dado que el índice de combinación obtenido es menor a 0,1. El sinergismo puede ser definido como toda interacción que da lugar a un aumento del efecto de uno o más compuestos químicos (Baños y March, 2002). Con esto se puede tomar en consideración como un resultado muy prometedor para posibles avances en las poliquimioterapias de tumores mamarios comparativos con la línea celular SKBr3, es decir, que presenten una sobreexpresión de la oncoproteína HER2/neu como característica propia de esta línea celular, dado a que se pueden disminuir las dosis de los compuestos involucrados sin afectar con ello la efectividad citotóxica de los mismos.

Tabla 5. Índices de combinación entre los compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1-c)quinolinas, el Ácido de Caracaine y el Taxol obtenidos para la línea celular SKBr3.

	Compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1-c) quinolinas			Compuesto natural
	Cris 142	Cris 148	Ar 4	Ácido de caracaine
Ácido de caracaine	1,7	1,3	1,8	-
Taxol	2,2	0,00002	100	2000
Ácido de caracaine + Taxol	2,7	7,5	3000	-

Tomando en cuenta los índices de combinación reportados en la tabla 5, es evidente que las triples combinaciones realizadas (compuesto sintético + compuesto natural + fármaco antitumoral) no proporcionaron una mejor actividad que la presentada en las dobles combinaciones correspondientes, por lo que la presencia de un tercer compuesto

antitumoral en una combinación de drogas sobre la línea celular SKBr3 no ejerce un efecto positivo sobre la citotoxicidad combinada.

5.7.2 Combinaciones sobre la línea tumoral de mama MCF-7

En cuanto a la línea tumoral MCF-7, los índices de combinación, tanto para las dobles como para las triples combinaciones, son mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Índices de combinación entre los compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1-c)quinolinas, el Ácido de Caracatine y el Taxol obtenidos para la línea celular MCF-7.

	Compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1-c) quinolinas			Compuesto natural
	Cris 142	Cris 148	Ar 4	Ácido de caracatine
Ácido de caracatine	0,7	0,9	0,001	-
Taxol	1,5	0,007	20000	2,8
Ácido de caracatine + Taxol	1,2	0,002	3000	-

Las combinaciones realizadas con el derivado sintético Cris 142 (compuesto patrón), se observa que la combinación "Cris 142 + Ácido de caracatine" presento un *sinergismo débil a moderado*, mientras que las combinaciones "Cris 142 + Taxol" y "Cris 142 + Ácido de caracatine + Taxol" mostraron una interacción de tipo *antagónico*, por lo que se puede inferir que la presencia de la droga comercial Taxol en las combinaciones realizadas con este derivado sintético en la presente línea ejerce un efecto de tipo antagónico que reduce la efectividad de las otras drogas en combinación. En cuanto a las combinaciones realizadas con el derivado sintético Cris 148, tanto las dobles como la triple combinación presentaron

una interacción de tipo *cercano a aditividad a sinérgico muy fuerte*, dado que los valores se encuentran por debajo de 1, por lo que se recomienda estudios a posterior sobre la forma de acción del derivado sintético Cris 148 y su interacción con el compuesto natural y la droga comercial utilizadas en este trabajo como posibles alternativas en la terapia de cáncer de mama con características semejantes a la línea tumoral MCF-7. Por último, la combinación realizada con el derivado sintético Ar 4 y el compuesto natural Ácido de caracasine mostró una interacción de tipo *sinergismo muy fuerte*, con un índice de combinación de 0,001, mientras que al realizar la combinación con la droga comercial Taxol y la triple combinación, la interacción entre los compuestos combinados fue de tipo *antagonismo fuerte a muy fuerte*, con valores de 20000 y 3000. Igualmente, la combinación "Ácido de caracasine + Taxol" generó un *antagonismo*, con un índice de 2,8. Se puede inferir que, al igual que las combinaciones realizadas con el compuesto patrón Cris 142, la presencia de la droga comercial Taxol en las combinaciones realizadas, tanto para los derivados sintéticos Cris 142 y Cris 148 como para el compuesto natural Ácido de caracasine, en la línea celular MCF-7 ejerce un efecto de tipo antagónico que reduce la efectividad de las otras drogas en combinación.

5.7.3 Combinaciones sobre el cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos

Los índices de combinación para las células control (cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos) son mostrados en la tabla 7, tanto para las dobles como para las triples combinaciones, observándose que la mayoría de las dobles combinaciones realizadas (derivado sintético vs. producto natural; derivado sintético vs. droga antitumoral; producto

natural vs. droga antitumoral), según lo descrito por Chou y Martin (2005), generan de un *antagonismo* a *antagonismo fuerte a muy fuerte*, dado que los índices de combinación obtenidos son mayores a 1. Sólo la combinación "Ar 4 + Taxol" generó un *sinergismo fuerte* según la clasificación de Chou y Martin (2005), dado que el índice de combinación obtenido se encuentra entre 0,1 y 0,3. Se podría tomar en consideración esta combinación realizada para futuros estudios sobre el tipo de interacción que realizan a nivel celular sobre este tipo de células en cultivo y así tomar en consideración para posibles terapias.

Tabla 7. Índices de combinación entre los compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas, el Ácido de Caracaine y el Taxol obtenidos para el cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos.

	Compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1- <i>c</i>) quinolinas			Compuesto natural
	Cris 142	Cris 148	Ar 4	Ácido de caracaine
Ácido de caracaine	2,5	1,8	1,6	-
Taxol	2,8	10	0,3	3,3
Ácido de caracaine + Taxol	4,2	2,5	2,1	-

Tomando en cuenta los índices de combinación reportados en la tabla 7, las triples combinaciones realizadas (compuesto sintético + compuesto natural + fármaco antitumoral) no proporcionaron una mejor actividad que la presentada en las dobles combinaciones correspondientes, como fue observado en las combinaciones realizadas sobre la línea tumoral SKBr3.

Tomando en consideración los índice de combinación (IC) mostrados en las tablas 5, 6 y 7 para cada línea celular evaluada, los valores obtenidos en este trabajo son equivalentes con los alcanzados por Muñoz y colaboradores (2011), los cuales mostraron

valores de IC en combinaciones de compuestos derivados de tetrahydroquinolinas con Taxol en un rango de 1,2 a 56,70 sobre la línea tumoral MCF-7; 0,02 a 0,65 en SKBr3 y 0,44 a 3,35 en un cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos. Igualmente, Huang y colaboradores (2004) reportaron valores de IC en un rango de 0,39 a 0,85 en combinaciones de la droga antitumoral Taxol con otros fármacos con propiedades antineoplásicas, como Cisplatin, Carboplatin y 5-fluorouracilo, sobre carcinoma de células escamosas orales.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Las moléculas pertenecientes al grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas con sustituciones en la posición R₁ generaron una mayor actividad citotóxica sobre la viabilidad celular de las líneas tumorales SKBr3 y MCF-7.
- ✓ Las sustituciones realizadas en la molécula patrón de las indeno(2,1-*c*)quinolinas estudiadas en este trabajo, disminuyeron la actividad citotóxica presentada sobre las líneas tumorales de mama.
- ✓ Los compuestos Cris 131, Cris 142, Cris 148 y Ar 4 y el Ácido de caracaine, tienen un efecto inhibitorio dependiente sobre las células tumorales SKBr3 y MCF-7 y células control, presentando una relación dosis-respuesta.
- ✓ La citotoxicidad presentada por los compuestos sintéticos del grupo indeno (2,1-*c*)quinolinas y el compuesto natural Ácido de caracaine sobre las células control (cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos) fue menor a la obtenida sobre las líneas tumorales (SKBr3 y MCF-7).
- ✓ Al comparar los efectos citotóxicos sobre las líneas tumorales SKBr3 y MCF-7 y las células control de los compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas, se pudo establecer que la molécula Cris 142 fue la más activa, con un CI₅₀ comprendido entre 3,53 y 16,41 µg/mL para las líneas tumorales, MCF-7 y SKBr3 respectivamente, además de no presentar actividad citotóxica frente a las células control.

- ✓ El compuesto Cris 142 puede considerarse como la estructura más importante del grupo de derivados sintéticos indeno(2,1-*c*)quinolinas, presentando la mayor actividad citotóxica sobre las líneas tumorales en comparación a los otros derivados sintéticos estudiados.
- ✓ Las moléculas sintéticas Cris 148, Cris 131, Cris 142 y Ar 4 presentaron los mayores valores de selectividad hacia la acción citotóxica.
- ✓ Los compuestos Cris 142 para la línea celular SKBr3 y Ar 4 para ambas líneas tumorales (SKBr3 y MCF-7) fueron las moléculas que presentaron los mejores índices de selectividad, por lo que su actividad citotóxica es más selectiva para las líneas tumorales respectivas con respecto a las células control.
- ✓ La combinación "Ácido de caracasie + Taxol" realizada en ambas líneas tumorales y las células control tienen un efecto de tipo antagónico, al igual que todas las combinaciones realizadas con el compuesto patrón Cris 142, menos la combinación "Cris 142 + Ácido de caracaine" sobre la línea tumoral MCF-7, la cual presentó una interacción de tipo sinérgica.
- ✓ Todas las combinaciones realizadas en la línea tumoral SKBr3 presentaron una interacción de tipo antagónica. Sólo la combinación "Cris 148 + Taxol" generó un sinergismo muy fuerte sobre esta línea celular.
- ✓ La presencia de un tercer compuesto antitumoral en una combinación de drogas sobre la línea celular evaluadas, no ejerce un efecto positivo y mayor sobre la citotoxicidad al observado en las dobles combinaciones.

7. RECOMENDACIONES

Luego de la elaboración de este trabajo, se presentan las siguientes recomendaciones a tomar en consideración:

- ✓ Realizar las combinaciones secuenciales pertinentes con los compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas, el compuesto natural Ácido de caracasine y el fármaco antitumoral Taxol; esto con el objetivo de evaluar cuál es el compuesto que está realizando el efecto sinérgico o antagónico en la combinación.
- ✓ Llevar a cabo estudios en el ámbito bioquímico (proteínas y enzimas involucradas) y molecular para la evaluación del efecto citotóxico de los compuestos sobre las líneas en estudio (SKBr3, MCF-7 y cultivo de fibroblastos), así como determinar el mecanismo de muerte celular (apoptosis - necrosis) que presentan las células debido a su acción citotóxica.
- ✓ Elaborar ensayos de reversibilidad de la citotoxicidad, para evaluar el potencial efecto de eliminación intracelular de las moléculas citotóxicas, y con ello estudiar los posibles mecanismos de acción en la adquisición de la "resistencia multidroga".

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.- Ajabnoor, G.M.A.; Crook, T.; Coley, H.M. 2012. Paclitaxel resistance is associated with switch from apoptotic to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Death Dis.* **3(1)**: 1-9. ISSN: 2041-4889.

2.- Albert, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Robert, K.; Watson, J. 1994. Molecular biology of de cell. Garland Publishing Inc., tercera edición. New Cork, Inglaterra. ISBN: 0-8153-3218-1.

3.- Allevato, M. 2008. Antineoplásicos. *Act Terap Dermatol.* **31**:6-16. ISSN: 1056-8751.

4.- Alzamora, L.; Colona, E.; Acero de Mesa, N.; Galán de Mera, A.; Muñoz, D.; Linares, F.; Domínguez, M. y col. 2007. Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre líneas celulares HeLa y HT-29. *Rev Peru Biol.* **13**:219-222. ISSN: 1727-9933.

5.- Aoyagi, Y.; Kobunai, T.; Utsugi, T.; Oh-hara, T.; Yamada, Y. 1999. In vitro antitumor activity of TAS-103, a novel quinoline derivative that targets topoisomerases I and II. *Jpn J Cancer Res.* **90**:578-587. ISSN: 0910-5050.

6.- Arvelo, F.; Merentes, E.; Cotte, C. 2000. Resistencia multidroga (MRD) o pleiotropica. *Acta Cient Venez.* **51**:45-52. ISSN: 0001-5504.

7.- Arvelo, F.; Suárez, A.; Galindo, I.; Compagnone, R.; Usubilaga, A. 2008. Productos naturales en la terapéutica actual. *Memorias del Instituto de Biología Experimental.* **5**:69-72. ISSN: 1316-7510.

- 8.- Badisa, R.B.; Darling-Reed, S.F.; Joseph, P.; Cooperwood, J.S.; Latinwo, L.M.; Goodman, C.B. 2009. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Res.* **29**:2993-2996. ISSN: 0250-7005.
- 9.- Baños, J.; March, M. 2002. Farmacología ocular. UPC, segunda edición. Barcelona, España. ISBN: 84-8301-647-8.
- 10.- Blagosklonny, M.V.; Toretsky, J.; Neckers, L. 1995. Geldanamycin selectively destabilizes and conformationally alters mutated p53. *Oncogene.* **11(5)**:933-939. ISSN: 0950-9232.
- 11.- Bosetti, C.; Malvezzi, M.; Chatenoud, L.; Negri, E.; Levi, F.; La Vecchia, C. 2005. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. *Ann Oncol.* **16**:489-511. ISSN: 0923-7534.
- 12.- Boyle, P.; Levin, B. 2008. World Cancer Report. International Agency for Research on Cancer. Ginebra, Suiza. ISBN: 978-92-832-0423-7.
- 13.- Callacondo, D.; Quispe, A.; Lindo, S.; Vaisberg, A. 2008. Actividad citotóxica del extracto etanólico de *Gnaphalium spicatum* “Keto Keto” en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* **25**:380-385. ISSN: 1726-4634.
- 14.- Campiglio, M.; Somenzi, G.; Olgliati, C.; Beretta, G.; Balsari, A.; Zaffaroni, N.; Valagussa, P. y col. 2003. Role of proliferation in HER2 status predicted response to Doxorubicin. *Int J Cancer.* **105**:568-573. ISSN: 1097-0215.
- 15.- Capote, L. 2006. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev Venez Oncol.* **18(4)**:269-281. ISSN: 0798-0582.
- 16.- Capote, L. 2008. Frecuencia del cáncer en Venezuela. Fascículos coleccionables: 30 años - 30 temas de la Fundación BADAN. Tema 2.

17.- Caprio, V.; Guyen, B.; Opoku-Boahen, Y.; Mann, J.; Gowan, S.; Kelland, L.; Read, M.; y col. 2000. A novel inhibitor of human telomerase derived from 10H-indolo[3,2-*b*]quinoline. *Bioorg Med Chem Lett.* **10**:2063-2066. ISSN: 0968-0896.

18.- Carlson, R.; Allred, C.; Anderson, B.; Burstein, H.; Carter, W.B.; Edge, S.; Erban, J. y col. 2009. Breast Cancer. Clíical practice guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* **7(2)**:122-192. ISSN: 1540-1405.

19.- Chou, J.C. 1991. Quantitation of synergism and antagonism of two or more drug by computerized analysis, in Synergism and Antagonism in Chemotherapy (Chou, T.C. and Rideout, D.C. eds). Academic Press, New York.

20.- Chou, J.C.; Chou, T.C.; Talalay, P. 1984. Conservation of laboratory animals by improved experimental design, generalized equations and computer analysis. *Fed Proc.* **43**:576. ISSN: 0014-9446.

21.- Chou, J.C.; Martin, N. 2005. CompuSyn of drug combinations: PC software and user's guide: A computer program from quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC₅₀ and ED₅₀ and LD₅₀ values. ComboSyn, Paramus, NJ.

22.- Ciardiello, F.; Caputo, R.; Pomatico, G; De Laurentiis, M.; De Placido, S.; Bianco, R.; Tortora, G. 2000. Resistance to taxanes is induced by c-erbB-2 overexpression in human MCF-10A mammary epithelial cells and is blocked by combined treatment with an antisense oligonucleotide targeting type I protein kinase A. *Int J Cancer.* **85**:710-715. ISSN: 0020-7136.

23.- Compagnone, R.; Chávez, K.; Mateu, E.; Orsini, G.; Arvelo, F.; Suárez, A. 2010. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. *Rec Nat Prod.* **4**:101-108. ISSN: 1307-6167.

- 24.- Cragg, G.; Newman, D. 1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest.* **17**:153-163. ISSN: 0735-7907.
- 25.- Crespo, D. 2006. Biogerontología. Universidad de Cantabria. Cantabria, España. ISBN: 84-8102-994-7.
- 26.- Delgado, B.; Palacios, L.; Petit, H.; Barrios, G.; Tejada, A.; Pacheco, C. 2009. Carcinoma de mama en el hombre. *Rev Venez Oncol.* **21(3)**:165-168. ISSN: 0798-0582.
- 27.- Donegan, W.; Redligh, P. 1996. Breast cancer in men. *Surg Clin North Am.* **76(2)**:343-363. ISSN: 0039-6109.
- 28.- Elinos-Báez, C.M.; Maldonado, V.; Meléndez-Zajgla, J. 2003. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Méd Méx.* **139(5)**:493-499. ISSN: 0016-3813.
- 29.- Fan, S.; Smith, M.; Rivet, D.; Duba, D.; Zhan, Q.; Kohn, K.; Fornace, A. y col. 1995. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res.* **55**:1649-1654. ISSN: 0008-5472.
- 30.- Flórez, J.; Armijo, J.; Mediavilla, A. 2008. Farmacología Humana. Masson, quinta edición. Barcelona, España. ISBN: 84-458-0613-0.
- 31.- Frías, G.; Hierro, S.; Jiménez, J.; Moreno, L.; Ruiz, R. 2007. Farmacogenómica y sus aplicaciones clínicas. *Dermatología Rev Mex.* **51**:99-111. ISSN: 0185-4038.
- 32.- Fuentes, J.C.; Castro, V.; Jakupovic, J.; Murillo, R. 2004. Diterpenos y otros constituyentes de *Croton hirtus* (Euphorbiaceae). *Rev Biol Trop.* **52(1)**:269-285. ISSN: 0034-7744.
- 33.- Furones, J. 2002. Bases científicas para el desarrollo y la utilización de los medicamentos. Farmacología General. Ciencias Médicas. La Habana, Cuba.
- 34.- Giordano, S.; Buzdar, A.; Hortobagyi, G. 2002. Breast cancer in men; A population-based study. *Ann Intern Med.* **137(8)**:678-687. ISSN: 0003-4819.

- 35.- Goldman, J.; Thang, K.; Park, D.; Spiers, A.; Lowenthal, R.; Ruutu, T. 1987. Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukemia in blast-cell transformation. *Br J Haematol.* **40**:185-195. ISSN: 0007-1048.
- 36.- Goodman, L.; Gilman, A. 1996. The pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill, onceava edición. New York, EUA. ISBN: 978-00-716-2442-8.
- 37.- Gran, L.; Sandberg, F.; Sletten, K. 2000. *Oldenlandia affinis* (R&S) DC. A plant containing uteroactive peptides used in African traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* **70**:197-203. ISSN: 0378-8741.
- 38.- Guo, Y.T.; Wang, J.W. 2008. Stimulation of taxane production in suspension cultures of *Taxus yunnanensis* by oligogalacturonides. *Afr J Biotechnol.* **7(12)**:1924-1926. ISSN: 1684-5315.
- 39.- Hidalgo, M.; Eckhart, S. 2001. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer I.* **93**:178-193. ISSN: 0027-8874.
- 40.- Huang, G.C.; Liu, S.Y.; Lin, M.H.; Kuo, Y.Y.; Liu, Y.C. 2004. The synergistic cytotoxic of Cisplatin and Taxol in killing oral squamous cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* **34(9)**:499-504. ISSN: 0368-2811.
- 41.- Huguet, E.L.; McMahon, J.A.; McMahon, A.P.; Bicknell, R.; Harris, A.L. 1994. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res.* **54(10)**:2615-21. ISSN: 0008-5472.
- 42.- Isaacs, J.; Pili, R.; Qian, D.; Dalrymple, S.; Garrison, J.; Kyrpianou, N.; Björk, A. y col. 2006. Identification of ABR-215050 as lead second generation quinoline-3-

carboxamide anti-angiogenic agent for the treatment of prostate cancer. *Prostate*. **66**:1768-1778. ISSN: 0270-4137.

43.- Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J.; Thun, M. 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. **59**:225-249. ISSN: 0007-9235.

44.- Kastan, M.; Zhao, Q.; El-Deiry, W.; Carrier, F.; Jacks, T.; Walsh, W.; Plunkett, B. y col. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia telangiectasia. *Cell*. **71**:587-597. ISSN: 0092-8674.

45.- Khanna, C.; Hunter, K. 2005. Modeling metastasis *in vivo*. *Carcinogenesis*. **26(3)**:513-523. ISSN: 0143-3334.

46.- Klug, W.; Cummings, M.; Spencer, C. 2006. Conceptos de genética. Pearson Educación, octava edición. Madrid, España. ISBN: 978-84-205-5014-5.

47.- Knowles, M.; Selby, P. 2005. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press, cuarta edición. New York, EUA. ISBN: 0-19-852563-X.

48.- Korkaya, H.; Paulson, A.; Iovino, F.; Wicha, M. 2008. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*. **27(47)**:6120-6130. ISSN: 0950-9232.

49.- Kovach, J.; McGovern, R.; Cassady, I.; Swason, S.; Wald, L.; Vogelstein, B.; Sommer, S. 1991. Direct sequencing from touch preparations carcinomas: analysis of p53 mutation in breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. **83**:1004-1009. ISSN: 0027-8874.

50.- Langley, R.; Fidler, I. 2007. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev*. **28(3)**:297-321. ISSN: 0163-769X.

51.- Lau, D.; Xue, L.; Young, L.; Burke, P.; Cheung, A. 1999. Paclitaxel (Taxol): an inhibitor of angiogenesis in a highly vascularized transgenic breast cancer. *Cancer Biother Radiopharm.* **14**:31-36. ISSN: 1084-9785.

52.- Liebmann, J.E.; Cook, J.A.; Lipschultz, C.; Teague, D.; Fisher, J.; Mitchell, J.B. 1993. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumor cell lines. *Br J Cancer.* **68**:1104-1109. ISSN: 0007-0920.

53.- Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.; Krieger, M.; Scott, M.; Zipursky, L. y col. 2005. *Biología celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana, quinta edición. Buenos Aires, Argentina. ISBN: 950-06-1374-3.

54.- Lukevics, E.; Shestakova, I.; Domracheva, I.; Yashchenko, E.; Zaruma, D.; Ashaks, J. 2007. Cytotoxic di(8-quinolyl) disulfides. *Chem Heterocyc Compd.* **43(5)**:629-633. ISSN: 0009-3122.

55.- Luque, J.; Herráez, A. 2008. *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética*. Elsevier. Barcelona, España. ISBN: 978-84-8174-505-4.

56.- Malone, H. 1978. Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation in: new natural product and plant drug with pharmacology. *Wagner and Wolf Eds.* New York, EUA.

57.- Mannello, F.; Papa, S. 2003. HER2 and proliferation of wound-induced breast carcinoma. *Lancet.* **362(9383)**:527-33. ISSN: 0140-6736.

58.- Manrique, J.C.; Oriza, C.; Villanueva, K.; Zarate, S. 2005. Estudio de prefactibilidad para la instalación de una planta productora de Paclitaxel por fermentación de *Pestalotiopsis microspora*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México.

- 59.- McPherson, K.; Steel, C.; Dixon, J. 2000. ABC of Breast Diseases: Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. **321**:624-628. ISSN: 0959-8138.
- 60.- Merlin, J.L.; Barberi-Heyob, M.; Bachmann, N. 2002. *In vitro* comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin[®]) combined with paclitaxel (Taxol[®]) or docetaxel (Taxotere[®]) in HER2-expressing human breast cancer cell lines. *Ann Oncol*. **13**:1743-1748. ISSN: 0923-7534.
- 61.- Miller, K.; Sledge, G. 1999. Taxane in the treatment of breast cancer: a prodigy comes of age. *Cancer Invest*. **17**:121-136. ISSN: 0735-7907.
- 62.- Minderman, H.; Wrzosek, C.; Cao, S.; Utsugi, T.; Kobunai, T.; Yamada, Y.; Rustum, Y.M. 2000. Mechanism of action of the dual topoisomerase-I and -II inhibitor TAS-103 and activity against (multi)drug resistant cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. **45(1)**:78-84. ISSN: 0344-5704.
- 63.- Morán, D.; Jiménez, S.; Domínguez, A. 2008. Farmacogenética en oncología. *Med Clin*. **131(5)**:184-195. ISSN: 0025-7753.
- 64.- Morón, F.; Rodríguez, M.L. 2002. Farmacología General. Ciencias médicas. La Habana, Cuba. ISBN: 84-458-0613-0.
- 65.- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. **65**:55-63. ISSN: 0022-1759.
- 66.- Muñoz, A. 2008. Efecto citotóxico del grupo 2,4-diaril-tetrahidroquinolinas sustituidas y su respuesta en combinación con fármacos antitumorales sobre células de cáncer de mama humano. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

67.- Muñoz, A; Sojo, F; Kouznetsov, V; Arvelo, F. 2011. Cytotoxic effects of new 4-hydroxy-3-metoxypheyl substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline derivatives and its interaction in combination with antitumoral drug gemcitabine and paclitaxel on cellular lines of human breast cancer. *Chem Biol Interact.* **189**:215-221. ISSN: 0009-2797.

68.- Ohyama, T.; Li, Y.; Utsugi, T.; Irie, S.; Yamada, Y.; Sato, T. 1999. A dual topoisomerase inhibitor, TAS-103, induces apoptosis in human cancer cells. *Jpn J Cancer Res.* **90**:691-698. ISSN: 0910-5050.

69.- Organización Mundial para la Salud. 2005. Prevención de las enfermedades crónicas: una inversión vital: informe mundial. Ginebra, Suiza. ISBN: 92-4-156300-1.

70.- Pardo, F. 1996. Anatomía patológica. Elsevier, segunda edición. Barcelona, España. ISBN: 978-8-48-174173-5.

71.- Parkin, D.M.; Whelan, S.L.; Ferlay, J.; Storm, H. 2005. Cancer incidence in five continents, volume 1. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. ISBN: 92-832-2427-2.

72.- Popoca, J.; Aguilar, A.; Alonso, D.; Villareal, M. 1998. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* **59**:173-177. ISSN: 0378-8741.

73.- Prieto, G.; Errecalde, C.; Trotti, N. 1999. Farmacología clínica de los antineoplásicos. *Monografías de medicina veterinaria.* **19(2)**:1-8. ISSN: 0716-226X.

74.- Raffa, R.; Rawls, S. 2008. Netter. Farmacología iustrada. Elsevier Masson, edición española. Barcelona, España. ISBN: 978-84-458-1901-2.

75.- Rasoul-Amini, S.; Khalaj, A.; Shafiee, A.; Daneshtalab, M.; Madadkar-Sobhani, A.; Fouladdel, A.; Azizi, E. 2006. Anti-tumor activity of new quinoline

derivatives in human breast cancer T47D cells. *Int J Canc Res.* **2**:102-108. ISSN: 1811-9727.

76.- Ravelo, J.A. 2001. Avances en el diagnóstico del cáncer de la mama. Importancia de la pesquisa y diagnóstico precoz. Reflexiones sobre el problema en Venezuela. *Gac Med Caracas.* **109(2)**:389-417. ISSN: 0367-4762.

77.- Rowley, S.; Anderson, G. 1993. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transpl.* **11**:389-393. ISSN: 0268-3369.

78.- Ruddon, R. 2007. Cancer biology. Oxford University Press, cuarta edición. New York, EUA. ISBN: 978-0-19-517544-8.

79.- Salazar, G. 2008. Artículos de revisión bibliográfica: Farmacogenética en el tratamiento oncológico. Año 4, número 20.

80.- Sánchez, P.; Benítez, L. 2006. Procesos biomoleculares de la Resistencia a drogas. *Cancerología.* **1**:187-199. ISSN: 1033-5545.

81.- Sandoval, M.; Okuhama, N.; Clark, M.; Ángeles, F.; Lao, J.; Bustamante, S.; Miller, M. 2002. Sangre de grado Croton palanostigma induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *J Ethnopharmacol.* **80**:121-129. ISSN: 0378-8741.

82.- Shi, A.; Nguyen, T.A.; Battina, S.K.; Rana, S.; Takemoto, D.J.; Chiang, P.K.; Hua, D.H. 2008. Synthesis and anti-breast cancer activities of substituted quinolines. *Bioorg Med Chem Lett.* **18(11)**:3364 - 3368. ISSN: 0960-894X.

83.- Siddiqua, A.; Long, L.; Li, L.; Marciniak, R.; Kazhdan, I. 2008. Expression of HER-2 in MCF-7 breast cancer cells modulates anti-apoptotic proteins Survivin and Bcl-2 via the extracellular signal-related kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) signalling pathways. *BMC Cancer.* **8**:129. ISSN: 1471-2407.

- 84.- Suárez, A.; Chávez, K.; Delle-Monache, F.; Vázquez, L.; Orsini, G.; Compagnone, R. 2008a. New 3,4-seco-entkaurenes from *Croton caracasana* flowers. *Nat Prod Commun.* **3**:319-322. ISSN: 1934-578X.
- 85.- Suárez, A.; Vázquez, L.; Taddei, A.; Arvelo, F.; Compagnone, R. 2008b. Antibacterial and cytotoxic activity of leaf essential oil of *Croton malambo*. *J Essent Oil Bear Pl.* **11(2)**:208-213. ISSN: 0972-060X.
- 86.- Suárez, A.; Chávez, K.; Mateu, E.; Compagnone, R.; Muñoz, A.; Sojo, F.; Arvelo, F.; y col. 2009. Cytotoxic activity of seco-entkaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Nat Prod Commun.* **4**:1-4. ISSN: 1934-578X.
- 87.- Téllez, A.; De Castro, C.; Riveros, T.; Torrenegra, R. 2006. Efectos citotóxicos *in vitro* de extractos y fracciones de *Espeletia killipii* Cuatr. frente a líneas celulares tumorales humanas. *Braz J Pharmacogn.* **16(1)**:12-16. ISSN: 0102-695X.
- 88.- Thomas, D.B. 1993. Breast cancer in men. *Epidemiol Rev.* **15(1)**:220-231. ISSN: 0193-936X.
- 89.- Utsugi, T.; Aoyagi, K.; Asao, T.; Okazaki, S.; Aoyagi, Y.; Sano, M. Wierzba, K. y col. 1997. Antitumor activity of a novel quinoline derivative, TAS-103, with inhibitory effects on topoisomerase I and II. *Jpn J Cancer Res.* **88**:992-1002. ISSN: 0910-5050.
- 90.- Valera, G.; Ortiz, M.C.; Gutiérrez, J.; Arce, A. 1997. Cáncer de mama en hombres. *An Med Asoc Med Hosp ABC.* **42(1)**:30-33. ISSN: 0185-3252.
- 91.- Vázquez, A.; Colomer, R.; Menendez, J. 2007. Protein array technology to detect HER2 (erbB-2)-induced 'cytokine signature' in breast cancer. *Eur J Cancer.* **43**:1117-1124. ISSN: 1359-6349.

92.- Velazco, A.; Lorenzo, P.; Serrano, J.; Andrés-Trelles, F. 1993. Farmacología. McGraw-Hill Interamericana, décima sexta edición. Madrid, España.

93.- Villaescusa, L. 2006. Cultura y fármacos. Ejemplos de la naturaleza: el taxol. *Actualidad en farmacología y terapéutica*. **4(1)**:35-39. ISSN: 1698-4277.

94.- Vivas, J. 2009. Efecto citotóxico del grupo seco-kaurano en las líneas tumorales PC-3 (cáncer de próstata) y HeLa (cáncer de útero): combinación con compuestos seco-kauranos y fármacos antitumorales. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

95.- Wallace, O.; Lauwers, K.; Jones, S.; Dodge, J. 2003. Tetrahydroquinoline-Based selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Bioorg Med Chem Lett*. **13**:1907-1910. ISSN: 0968-0896.

Consultas en línea

96.- Berkeley, L. 2007. Breast Cancer Cell Lines. [en línea]. SKBr3. <http://cancer.lbl.gov/breastcancer/viewline.php?id=53> [Consulta: 24 agosto 2011]

97.- Ferlay, J.; Shin, H.R.; Bray, F.; Forman, D.; Mathers, C.; Parkin, D.M. 2008. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. [en línea]. GLOBOCAN. International Agency for Research on Cancer. Lyon, Francia. <http://globocan.iarc.fr/> [Consulta: 21 agosto 2011]

- 98.- Infodoctor. 2008. Paclitaxel. [en línea]. <http://www.infodoctor.org/www/meshd.htm?idos=18812> [Consulta: 24 agosto 2011].
- 99.- Instituto Nacional de Cáncer. 2010. Cáncer de seno (mama) [en línea]. <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno> [Consulta: 19 agosto 2011].
- 100.- Instituto Nacional de Cáncer. 2011. ¿Qué es el cáncer? [en línea]. <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es> [Consulta: 19 agosto 2011].
- 101.- Martínez, A. 2003. Aceites esenciales. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. [en línea]. <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf> [Consulta: 25 agosto 2011].
- 102.- Nagourner. R. 2001. Rational Therapeutics company. [en línea]. <http://www.rationaltherapeutics.com/files/docs/samples/Sample%20Breast.pdf> [Consulta: 03 marzo 2012].
- 103.- Paclitaxel. 2001. Paclitaxel - one of the most widely used chemotherapy agents. [en línea]. <http://www.paclitaxel.org/> [Consulta: 23 agosto 2011].
- 104.- Ziopharm Oncology. 2008. Drug candidate: Indibulin. [en línea]. http://www.ziopharm.com/clinical_zio301.php [Consulta: 23 agosto 2011]

9. ANEXOS

ANEXO 1.

Tabla 8. Resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad (CI₅₀) expresada en μM para las líneas celulares de cáncer de mama y los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos.

Compuesto	Líneas tumorales		Células control
	SKBr3	MCF-7	Fibroblastos
Cris 142	$53,28 \pm 3,47$	$11,46 \pm 3,54$	> 300
Cris 131	$73,06 \pm 3,81$	$165,44 \pm 3,61$	$180,58 \pm 3,67$
Cris 148	$133,99 \pm 3,29$	> 300	> 300
Cris 153	> 300	> 300	> 300
Ar 4	$57,42 \pm 3,39$	$44,29 \pm 3,14$	> 300
Ar 68	> 300	> 300	> 300
Ar 69	> 300	> 300	> 300
Ar 70	> 300	> 300	> 300
Ar 71	> 300	> 300	> 300
Ácido de caracasine	$58,79 \pm 3,35$	$16,71 \pm 3,29$	$88,39 \pm 3,32$
Taxol	$0,01 \pm 1,58$	$0,03 \pm 1,46$	$0,76 \pm 1,21$

ANEXO 2.

Tabla 9. Porcentajes de citotoxicidad para cada uno de los compuestos del grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas, el Ácido de Caracaine y el Taxol sobre las líneas celulares tumorales y cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos. Únicamente son presentados aquellos compuestos que tuvieron actividad citotóxica sobre los cultivos celulares evaluados.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de citotoxicidad								
	Cris 148			Cris 131			Cris 142		
	SKBr3	MCF-7	Fibroblastos	SKBr3	MCF-7	Fibroblastos	SKBr3	MCF-7	Fibroblastos
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,001	1,66	6,15	9,53	13,52	1,25	5,02	1,99	7,32	4,94
0,01	5,54	7,83	9,90	20,23	3,13	8,05	9,85	8,69	5,62
0,1	9,73	10,32	12,65	21,65	4,11	11,18	12,16	18,05	6,91
1	12,39	15,31	13,25	21,76	11,35	11,95	21,29	29,74	10,74
5	16,93	16,39	16,01	25,74	20,46	16,98	29,60	54,95	15,00
10	19,76	17,08	17,79	28,14	26,88	21,83	39,89	67,66	18,07
15	22,78	19,18	18,84	30,32	33,99	27,04	48,52	77,37	20,80
25	29,84	23,19	21,22	39,75	44,16	33,71	59,97	80,93	24,89
100	78,23	55,82	43,48	93,24	61,99	64,99	89,70	89,32	48,68

.... Continuación del Anexo 2.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de citotoxicidad								
	Ar 4			Ácido de caracaine			Taxol		
	SKBr3	MCF-7	Fibroblastos	SKBr3	MCF-7	Fibroblastos	SKBr3	MCF-7	Fibroblastos
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,001	15,61	1,33	2,20	7,06	2,17	7,57	23,81	10,67	0,27
0,01	17,96	1,33	2,27	14,56	3,88	9,79	71,82	54,29	4,36
0,1	20,84	6,01	9,02	15,02	6,31	10,13	77,16	65,97	18,18
1	21,25	10,64	11,57	16,79	17,49	19,83	77,86	71,51	59,09
5	27,84	18,77	16,18	26,96	35,69	29,92	81,30	75,36	79,87
10	31,96	27,65	17,08	31,81	52,85	34,88	82,85	78,71	85,82
15	36,24	35,71	18,25	41,11	69,94	37,89	83,79	83,25	89,82
25	42,01	42,48	18,73	47,88	76,02	44,53	86,83	86,93	93,91
100	87,48	78,59	19,21	98,34	99,96	97,03	99,84	99,96	94,91