

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA IN VITRO DE  
DERIVADOS DE TETRAHIDROQUINOLINAS E ISOXAZOLES EN CÉLULAS DE  
CÁNCER DE CUELLO UTERINO (HeLa).

JENIFFER VIVIANA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTA DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA (GIBIM)  
BUCARAMANGA, SANTANDER  
2015

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA IN VITRO DE  
DERIVADOS DE TETRAHIDROQUINOLINAS E ISOXAZOLES EN CÉLULAS DE  
CÁNCER DE CUELLO UTERINO (HELA).

PRESENTADO POR:  
JENIFFER VIVIANA RAMÍREZ HERNÁNDEZ  
2091636

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
QUÍMICO (A).

DIRECTORA:  
DRA. STELIA CAROLINA MÉNDEZ SÁNCHEZ

CO- DIRECTORA:  
MSC. YENNY BUENO DUARTE

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTA DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA (GIBIM)  
BUCARAMANGA, SANTANDER  
2015

**A mis padres (Miguel y Martha) y a mi novio Leonardo**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios quien siempre me ha dado fuerzas para superar cualquier tipo de obstáculo.

A mis padres, miguel Ramírez y Martha Hernández, quienes me han acompañado y ayudado, pese a las duras circunstancias que se han presentado, sin perder la esperanza de que logre alcanzar mis metas y finalizar cada etapa en mi vida.

A mi novio Leonardo, por su cariño y porque ha sido un gran apoyo para mí.

También agradezco a la profesora Stelia y a mi codirectora Yenny quienes me tuvieron mucha paciencia durante el desarrollo de esta investigación y al profesor Herminsul por aceptar calificar esta tesis.

Y finalmente a la universidad y a las personas que han contribuido de alguna u otra forma a la culminación de esta etapa, por permitirme conocer, compartir y aprender de ustedes.

Gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>14</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 EL CÁNCER EN LA MUJER: ASPECTOS GENERALES Y ESTADÍSTICAS</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 APOPTOSIS Y EL CÁNCER</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2.1 Apoptosis.</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2.2 Genes y proteínas involucrados en el desarrollo del cáncer.</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3. CÁNCER DE CÉRVIX</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3.1 Generalidades del cáncer de cérvix.</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3.2 Estadísticas del cáncer de cérvix.</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3.3 Virus del papiloma humano y cáncer de cérvix: oncogenes y proteínas implicados en el ciclo celular y la apoptosis.</b> .....	<b>23</b>
<b>1.3.4 Células HeLa: oncogenes, proteínas y morfología.</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3.5 Tratamiento y quimioterapia en el cáncer de cérvix.</b> .....	<b>26</b>
<b>1.4. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NUEVOS COMPUESTOS SINTÉTICOS</b> .....	<b>28</b>
<b>1.4.1 Importancia y ejemplos de compuestos orgánicos en la quimioterapia.</b> .....	<b>28</b>
<b>1.4.2 Tetrahydroquinolinas e isoxazoles y sus aplicaciones.</b> .....	<b>29</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1. Objetivo general.</b> .....	<b>36</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>36</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>37</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1. CULTIVO CELULAR</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1.1 Proceso de descongelamiento de células HeLa.</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1.2 Proceso de mantenimiento de las células HeLa.</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1.3 Congelamiento de las células.</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2.1 Prueba de reducción de MTT.</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2.2 Prueba con cristal violeta o metil violeta.</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3. LIBERACIÓN DE CITOCROMO C</b> .....	<b>41</b>
<b>4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>41</b>

<b>4.4.1 Análisis de ANOVA.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4.2 Análisis de Tukey.....</b>	<b>42</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1.1 Prueba de reducción de MTT.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1.2 Prueba con cristal violeta.....</b>	<b>57</b>
<b>5.2. LIBERACIÓN DE CITOCROMO C .....</b>	<b>59</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>7. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Valores de CC50 para los dos ensayos preliminares de 24 y 48 horas del MTT. ....	44
<b>Tabla 2.</b> Compuestos con CC <sub>50</sub> <75 $\mu$ M con el nombre UIPAC. ....	48
<b>Tabla 3.</b> Valores de CC50 de FM42 con respecto al tiempo ....	57
<b>Tabla 4.</b> Cantidad de proteína (albumina) cuantificada. ....	60

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fases y puntos de control del ciclo celular.....	17
<b>Figura 2.</b> Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis rhApo2L/TRAIL.....	19
<b>Figura 3.</b> Anillo de quinolina.....	29
<b>Figura 4.</b> Análogos THQs con marcada actividad biológica.....	30
<b>Figura 5</b> Estructura base de las tetrahydroquinolinas-3-carbonitrilos (23-41) y los análogos a la estructura, el compuesto 4-anilino-6,7-dialcoxi-3-quinolinecarbonitrilo (I) y 4-anilino-7-tienil-3-quinolinacarbonitrilo (II).....	31
<b>Figura 6</b> Estructuras de los agentes antitumorales más activos 3b, 6b, 7b y 8b.....	32
<b>Figura 7-</b> Tetrahydroquinolinas números 37-50 sintetizadas en la investigación de Hassan M. Faidallah, donde los compuesto 39, 40, 42, 45 y 46 mostraron actividad antitumoral. ....	33
<b>Figura 8</b> Ejemplos de estructuras de isoxazoles y similares.....	34
<b>Figura 9.</b> Estructuras de los derivados de tetrahydroquinolinas e isoxazoles con su respectivo código.....	38
<b>Figura 10.</b> Placa de 96 pozos con la prueba de reducción del MTT.....	43
<b>Figura 11.</b> Híbridos comparados en los grupos A, B, C y D.....	45
<b>Figura 12.</b> Compuestos híbridos con disustituciones.....	46
<b>Figura 13.</b> Compuestos con similitud en el segmento isoxazol.....	47
<b>Figura 14.</b> Compuestos con similitud en el segmento isoxazol.....	47
<b>Figura 15.</b> Potencial electrostático de los derivados a) FM24 y b) FM42.....	49
<b>Figura 16.</b> Densidad electrónica de las moléculas a) FM24 y b) FM42.....	50
<b>Figura 17.</b> Cambios en la morfología de las células HeLa con los derivados FM24 y FM42.....	51
<b>Figura 18.</b> Potencial electrostático de los derivados a) FM50 y b) FM53.....	52
<b>Figura 19.</b> Densidad electrónica de las moléculas a) FM50 y b) FM5.....	52
<b>Figura 20.</b> Cambios en la morfología de las células HeLa con los derivados FM50y FM53.....	53
<b>Figura 21.</b> Potencial electrostático de los derivados a) FM50 y b) FM47.....	54
<b>Figura 22.</b> Densidad electrónica de las moléculas a) FM50 y b) FM47.....	55
<b>Figura 23.</b> Cambios en la morfología de las células HeLa con los derivados FM50 y FM47.....	55
<b>Figura 24.</b> Prueba de reducción con MTT a diferentes tiempos con el híbrido FM42.....	56
<b>Figura 25.</b> Curva de calibración de cristal violeta.....	58
<b>Figura 26.</b> Efecto antiproliferativo del compuesto FM42.....	59
<b>Figura 27.</b> Curva para cuantificación de proteínas con el método de Bradford.....	60
<b>Figura 28.</b> Efecto del compuesto sobre la liberación de citocromo C en células HeLa.....	61
<b>Figura 29.</b> Cambios morfológicos de las células HeLa durante la liberación de citocromo C.....	62

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A 1.</b> Nombre UIPAC de los derivados de tetrahydroquinolinas e isoxazoles y la numeración experimental empleada para cada compuesto. ....	74
<b>Anexo A 2.</b> Porcentaje de viabilidad obtenido de la prueba con MTT en FM24 y FM42.....	75
<b>Anexo A 3.</b> Porcentaje de viabilidad obtenido de la prueba con MTT en FM45 y FM47.....	75
<b>Anexo A 4.</b> Porcentaje de viabilidad obtenido de la prueba con MTT en FM50 y FM53.....	76

## RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA IN VITRO DE DERIVADOS DE TETRAHIDROQUINOLINAS E ISOXAZOLES EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO (HELA).

**AUTOR:** JENIFFER VIVIANA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

**PALABRAS CLAVES:** CITOCROMO C, CÁNCER DE CÉRVIX, TETRAHIDROQUINOLINAS, ISOXAZOLES, APOPTOSIS, CICLO CELULAR, ENSAYO DE MTT.

### DESCRIPCIÓN:

El cáncer es una serie de enfermedades que se produce por la proliferación incontrolada de células que han evadido diferentes controles del ciclo celular (Massagué 2009). Según Globocan, el cáncer de cérvix, es el quinto a nivel mundial y el segundo en Latinoamérica y el caribe, de acuerdo con la tasa de mortalidad del cáncer en mujeres.(Ferlay et al. 2013). Actualmente, existen diferentes tipos de tratamiento, como la quimioterapia y radioterapia, que es una de las más utilizadas. Sin embargo, los fármacos empleados son muy costosos y provocan efectos secundarios severos.(Piedra Sánchez 2004) Con el fin de identificar nuevos compuestos con potencial farmacológico, en este trabajo se evaluó el efecto de compuestos híbridos tetrahydroquinolinas-isoxazoles sobre las células HeLa, para así determinar la actividad anticancerígena de estos compuestos orgánicos.

Para comprobar la actividad anticancerígena de los híbridos de tetrahydroquinolinas e isoxazoles, se realizaron ensayos de viabilidad mediante el método del MTT descrito por Mossman (1983)(Mosmann 1983) a diferentes concentraciones de cada compuesto, ensayos de proliferación con cristal violeta de acuerdo a Brasaemle y Attie (1988) y de cuantificación de citocromo C liberado(Noletto et al. 2009; Appaix et al. 2000), estas pruebas se complementaron con análisis estadísticos ANOVA y Tukey y análisis morfológico.

De la serie de híbridos de tetrahydroquinolinas e isoxazoles, evaluados a 24 y 48 horas de tratamiento, se encontró que 6 de los compuestos poseen concentraciones citotóxicas cincuenta por ciento de viabilidad(CC50) menores a 100  $\mu$ M, donde el compuesto FM42 es el derivado con mejor resultado, con un valor de CC50 de 29,15  $\mu$ M, similar al cisplatino y la doxorubicina.(Bejjanki et al. 2013; Prabhu et al. 2012) Además este derivado se destacó por su capacidad de inducción de apoptosis puesto que se dio un notable aumento de la liberación del citocromo C en un tiempo de tratamiento de 12 horas con respecto al control.

## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF THE ANTICANCER ACTIVITY IN VITRO DERIVATIVES OF TETRAHYDROQUINOLINES AND ISOXAZOLES IN CANCER OF THE CERVIX (HELA) CELLS.

**AUTHOR:** JENIFFER VIVIANA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

**KEY WORDS:** CYTOCHROME C, CERVICAL CANCER, TETRAHYDROQUINOLINES, ISOXAZOLES, APOPTOSIS, CELL CYCLE, MTT ASSAY.

### DESCRIPTION:

Cancer is a series of illnesses that are caused by the uncontrolled proliferation of cells that have evaded different cell cycle controls(Massagué 2009). According to Globocan, cancer of the cervix is the fifth in the world and the second in Latin America and the Caribbean, in accordance with the rate of cancer mortality in women (Ferlay et al. 2013). Currently, there are different types of treatment such as chemotherapy and radiation therapy, which is one of the most widely used. However, the drugs used are very costly and cause severe side effects(Piedra Sánchez 2004). Therefore, in this study evaluated the effect of the hybrid compounds tetrahydroquinolines-isoxazoles on the HeLa cells to determine the anti-cancer activity of these organic compounds.

To check the anti-cancer activity of the hybrids compounds of tetrahydroquinolines-Isoxazoles, viability tests were conducted using the MTT method described by Mossman (1983)(Mosmann 1983) with different concentrations of each compound, proliferation assays with crystal violet according to Brasaemle and Attie (1988) and quantification of cytochrome C released(Noleto et al. 2009; Appaix et al. 2000), these tests are complemented with statistical analysis ANOVA and Tukey, and morphological analysis.

The series of hybrids compounds tetrahydroquinolines- Isoxazoles, were evaluate at 24 and 48 hours of treatment, it was found that 6 of the compounds have a good anti-cancer activity, where the compound FM42 is the derivative with best result, with a value of CC50 similar to cisplatin and doxorubicin.(Bejjanki et al. 2013; Prabhu et al. 2012) In addition this derivative is highlighted by its ability to induction of apoptosis as it gave a significant increase in the release of cytochrome C in a treatment time of 12 hours with respect to the control.

## INTRODUCCION

El cáncer está compuesto por células neoplásicas, es decir, células con comportamiento anormal, que han desarrollado ciertas capacidades; entre ellas la inhibición de la apoptosis, presentan mutaciones genéticas, que permiten la proliferación descontrolada y diseminación de las células en los tejidos sanos (Meza-junco, Montaña-loza, and Aguayo-gonzález 2006). Esta enfermedad es de interés mundial, debido a sus altas tasas de incidencia y mortalidad. (Diestro Tejeda, Serrano Velasco, and Gómez-Pastrana Nieto 2007; Sánchez Sánchez 2012) Existen diferentes factores de riesgo, relacionados con el cáncer, tales como; fumar, la obesidad, la presencia de agentes infecciosos, el alcohol y la radiación. (Camargo Bohórquez, Ma. Constanza Wiesner Ceballos, Díaz Cuspoca, and Tovar Murillo 2004)

Anualmente mueren en el mundo cerca de 8.2 millones de personas a causa del cáncer, de las cuales aproximadamente 266.000 fallecimientos son ocasionados por el cáncer de cérvix, es por ello, que se han empleado, distintos métodos para tratar esta enfermedad, entre los que se encuentran la radioterapia, cirugías y quimioterapias. (Cano González et al. 2009; Ferlay et al. 2014) Este tipo de cáncer, se desarrolla en dos lugares: 1) en las paredes del útero y 2) en la zona de conexión de la vagina con el útero, conocida como cuello uterino. (Sánchez Sánchez 2012)

La quimioterapia es uno de los tratamientos más aplicados a todos los tipos de cáncer, en él se emplea diferentes clases de fármacos como son: cisplatino, epirubicina, carboplatino y la bleomicina; usados durante varios años en esta terapia, sin embargo la efectividad de los fármacos frente a la enfermedad, suele variar con respecto a la etapa del cáncer y el estado del paciente. Además pueden causar efectos secundarios como alopecia, diarrea, vómitos, náuseas y efectos emocionales. (Cano González et al. 2009; Piedra Sánchez 2004)

El cáncer de cérvix es una enfermedad cuyas tasas de incidencia y mortalidad se incrementan anualmente, esto impulsa la continua búsqueda de nuevos medicamentos para su tratamiento, por ejemplo las tetrahydroquinolinas e isoxazoles, que son compuestos orgánicos con un anillo heterocíclico y se obtienen por síntesis orgánica, aunque sus estructuras son tomadas de fuentes naturales,

estos compuestos despiertan el interés por su actividad anticancerígena demostrada en diferentes investigaciones.(Alqasoumi et al. 2010; Al-Said et al. 2010; Diana et al. 2010; Faidallah et al. 2013; Faidallah and Rostom 2013; Ghorab, Ragab, and Hamed 2009; Kovács et al. 2012; Kumbhare et al. 2012; Ratnakar Reddy et al. 2014)

Durante el desarrollo de este trabajo de grado, se usaron derivados híbridos de tetrahydroquinolinas e isoxazoles, sintetizados y caracterizados por el laboratorio de química orgánica y biomolecular (LQOBio) de la Universidad Industrial de Santander, y su capacidad citotóxica en células cancerígenas fue evaluada en células HeLa (células humanas de adenocarcinoma de cérvix).

Para determinar si los derivados de tetrahydroquinolinas e isoxazoles aquí evaluados tienen capacidad citotóxica, se realizaron varias pruebas como el estudio del efecto de estos compuestos híbridos sobre la viabilidad mediante la reducción de MTT, proliferación de células de cáncer de cérvix (HeLa) con la tinción de cristal violeta, y la detección de la liberación de citocromo C y se complementó con análisis morfológico y estadístico.

Los insumos y equipos necesarios para realizar estas pruebas, están disponibles en el grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM) de la Universidad Industrial de Santander (UIS)

## **1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE**

### **1. 1 EL CÁNCER EN LA MUJER: ASPECTOS GENERALES Y ESTADÍSTICAS**

Millones de mujeres anualmente mueren por cáncer. Según Globocan 2012, las tasas de mortalidad más representativas para esta población son causadas por el cáncer de mama, colorrectal, pulmón, cuello uterino y de estómago. Para el cáncer de cérvix, se ha estimado que en el 2020, el número de muertes aumente en aproximadamente un 19% y la incidencia en un 16% a nivel mundial, cifras que en definitiva son alarmantes para la humanidad. (Ferlay et al. 2013)

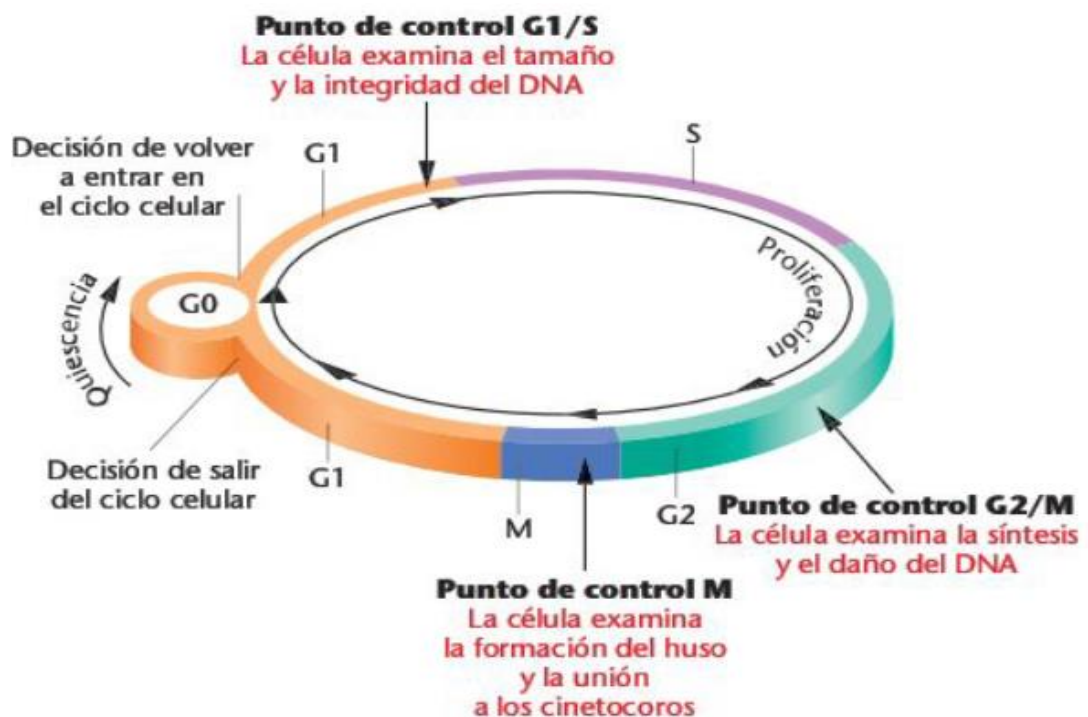
Los factores de riesgo más relevantes de los anteriores tipos de cáncer son: el sobrepeso, ingerir grandes cantidades de alcohol, la edad, mutaciones genéticas presentes en el historial familiar del paciente, la alimentación, inicio de relaciones sexuales a temprana edad, la inestabilidad de pareja sexual, infecciones con VPH (virus del papiloma humano), lesiones previas en las áreas donde se desarrolla el cáncer y el consumo de tabaco. (Lamarca Lete, Molina Villaverde, López González, et al. 2013; Lamarca Lete, Molina Villaverde, Navarro Expósito, et al. 2013; Bravo M et al. 2013; Marzo-Castillejo, Cierco Peguero, and del Cura González 2005; Menacho-miguel, Jime, and Miro 2014; Amaro et al. 2004; Gutiérrez and Fontán 2009)

El cáncer es una serie de enfermedades que se producen por la proliferación descontrolada de células que han evadido diferentes controles del ciclo celular, lo cual es atribuido a alteraciones genéticas que posteriormente, generan una neoplasia que se expande hacia los tejidos sanos y luego a órganos cercanos al área afectada. En el cáncer de cuello uterino, por ejemplo, el incremento celular se encuentra en la parte inferior del útero llamado cuello uterino y se extiende hacia el exterior del sistema reproductor femenino. (Abad et al. 2003; Sanabria Negrín 2009; Massagué 2009)

## 1.2 APOPTOSIS Y EL CÁNCER

Durante la progresión del cáncer, la proliferación de células anómalas es estimulada por cambios en el ciclo celular, que es una secuencia de etapas controladas donde se regula los procesos de mantenimiento, crecimiento y la duplicación celular. Principalmente en los humanos, se diferencian cuatro grandes fases que son: G1, S, M y G2 (**figura 1**). Es importante destacar la existencia de una fase estacionaria (G0), en la que ingresan las células debido a diferentes factores ambientales. Una vez la célula sale de G0, pasa a G1, donde puede reiniciar el ciclo o dirigirse a muerte celular programada, según la función que realice la proteína p53. (Karp 2009; Alberts et al. 2010)

**Figura 1.** Fases y puntos de control del ciclo celular.



**Fuente:** *Conceptos de Genética*. (Klug, Cummings, and Spencer 2006).

### ***1.2.1 Apoptosis.***

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso mediado por una secuencia de proteínas las cuales se activan gracias a la aparición de una serie de señales de muerte tales como una lesión en el ADN, el incremento de niveles de oxidación en la célula y la carencia de señales de crecimiento como las hormonas. Durante la secuencia se puede apreciar varios cambios en la morfología celular como la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos. (Boticario Boticario and Cascales Angosto 2011; Pazo Cid et al. 2013)

El proceso de apoptosis es caracterizado por la intervención de proteasas como las caspasas, proteasas de cisteína con residuo de aspartato D que actúan como precursor enzimático inactivo, las cuales se dividen en dos grandes grupos las caspasa iniciadoras que se activan por auto-proteólisis luego de la señal apoptótica y las caspasa ejecutoras que son activadas por las iniciadoras. (Boticario Boticario and Cascales Angosto 2011)

#### ***1.2.1.1 Fases de la apoptosis.***

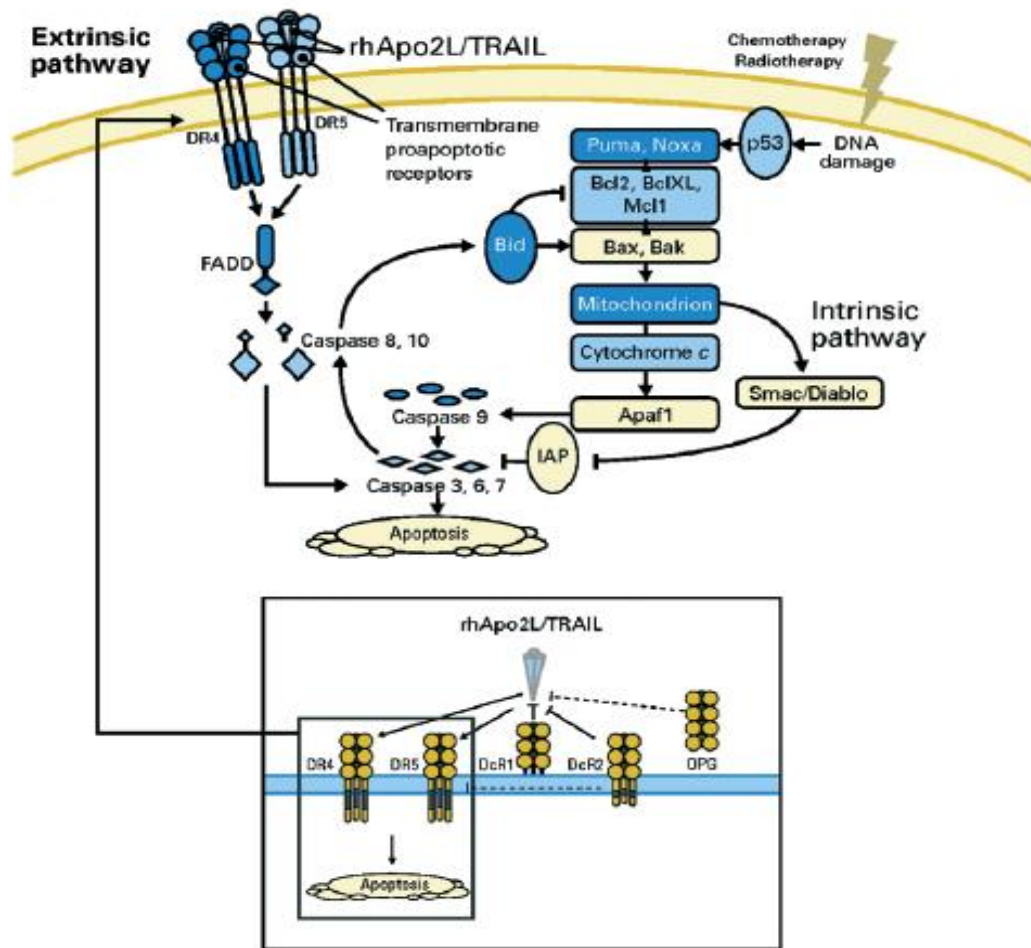
Durante el proceso de muerte programada se destacan tres fases, la fase efectora, una etapa sin retorno, caracterizada por el incremento de los iones calcio y la activación de caspasas y endonucleasas que provocan alteraciones en el tamaño celular, la fase de degradación donde se destruye proteínas y ácidos nucleicos y aparecen los cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por los macrófagos, en la fase de eliminación. (Boticario Boticario and Cascales Angosto 2011)

#### ***1.2.1.2 Vías de la apoptosis.***

Existen dos vías por las que se puede dar la apoptosis, la vía intrínseca activada por daños en el ADN o lesiones inducidas por quimioterapia y radioterapia, esta ruta es iniciada en la mitocondria, liberándose proteínas como citocromo C y smac/diablo. La secuencia continua con la unión de citocromo C a Apaf-1, un factor promotor de la apoptosis que activa la caspasa 9 y posteriormente las caspasas 3, 6 (caspas ejecutoras). Durante el proceso, la proteína p53, activa proteínas proapoptóticas como PUMA y Noxa que inhiben Bcl2 y McL1 activando así a Bax y

Bak tal como se muestra en la **figura 2.**(Boticario Boticario and Cascales Angosto 2011)

**Figura 2.** Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis rhApo2L/TRAIL.



**Fuente:** Apoptosis, Cáncer & Co. (Pazo Cid et al. 2013).

La segunda vía es la extrínseca, que es activada por factores externos de las células que activan receptores proapoptóticos (PARAs), como Apo2L/TRAIL o FasL, que se unen a DR4 y DR5 o FAS que son receptores de muerte celular, posteriormente es impulsado FADD para que active la caspasa 8 provocando la activación de las caspasas ejecutoras. Al mismo tiempo que esto ocurre, también es activada Bid que

estimula la liberación de citocromo C activando de manera indirecta la vía intrínseca. (Boticario Boticario and Cascales Angosto 2011)

### ***1.2.2 Genes y proteínas involucrados en el desarrollo del cáncer.***

Los genes que han sufrido mutaciones, como los oncogenes, a los que se les atribuye la aparición del cáncer, o también pueden ser genes reguladores positivos como los protooncogenes, en los que se encuentra las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclina o reguladores negativos como los supresores tumorales, como los INK4 (inhiben complejos Cdk/G1 o Cdk4/D de la fase G1, ejemplo de ello es la p16) y los CIP (actúan como inhibidores de Cdk 1,2,4 y 6 y los más conocidos son p21,p27 y p53), que durante el proceso sufrieron algún tipo de alteración. (Alberts et al. 2010; Boticario Boticario and Cascales Angosto 2011)

La proteína p53, es una de las proteínas que desempeñan un papel muy importante en el control, ya que esta es la que impulsa a la célula a iniciar apoptosis, una vez se ha detectado una lesión en el ADN y este no pueda ser reparado, por ello su mutación, facilita el desarrollo del cáncer, pues, se desactiva la regulación de p53, permitiendo que las células vivan pese al daño genético. La alteración recesiva del gen supresor TP53 que codifica a p53 está en una tasa mayor al 50% de los diferentes cánceres. (Alberts et al. 2010; Burgués Gasió et al. 2005)

Otra proteína que por cambios genéticos puede desencadenar el cáncer es la pRb mutada, debido a que el gen Rb que la codifica presenta alteraciones. Normalmente pRb es una proteína que regula el ciclo celular mediante la liberación de E2F de su cdk de unión, sin embargo, si el pRb se encuentra mutado permitirá que la secuencia del ciclo celular continúe de forma inadecuada, estimulando la proliferación de células cancerígenas, este tipo de anomalía se ha visto presente en cáncer como pulmón, mama, vejiga además en el retinoblastoma. (Alberts et al. 2010; Zapardiel Gutiérrez et al. 2009)

No obstante, la proliferación de células anormales no solo es promovida mediante las mutaciones de las proteínas anteriormente nombradas, existen genes involucrados en procesos adjuntos al ciclo celular e inhibidores cuya acción está relacionada directa o indirectamente con la actividad de otras proteínas, por ejemplo

el p16, una proteína que inactiva el pRb al evitar su fosforilación, pero la carencia de p16 es uno de los principales factores que facilitan el crecimiento de tumores. (Vallmanya Llena et al. 2006)

La proteína p21 también es un inhibidor que se relaciona con p53, ya que p53 activa p21 que a su vez no permite la fosforilación de pRb deteniendo el ciclo celular en G1, por lo que al bajar la expresión de p53, la actividad de p21 se ve directamente afectada, dejando que pRb sea fosforilada y la E2F se libere de manera descontrolada evitando la apoptosis. Este es un mecanismo muy importante para la progresión de células cancerosas en el carcinoma de vejiga. (Vallmanya Llena et al. 2006; Zapardiel Gutiérrez et al. 2009)

Anteriormente se han nombrados varios tipos de proteínas y genes que afectan el ciclo celular en general, pero también existe otras proteínas, como la telomerasa, cuyo aumento, genera que se reconstruyan con mayor efectividad los telómeros; esto en conjunto con una serie de mutaciones otorgan a las células pre tumorales la característica de elevar el número de replicaciones y a su vez aumentar el nivel mutacional provocando la formación de células cancerígenas, tal como ha sido detectado en el 85% de los cáncer. (Boticario Boticario and Cascales Agosto 2011)

En la apoptosis, los oncogenes son los responsable de disminuir la capacidad de dirigir a la célula a una muerte programada, ejemplos de estos son el Tp53, Bcl2 y el gen retinoblastoma, el aumento o disminución de estos genes ocasionan el desequilibrio de la regulación celular ocasionando errores como eliminación de células normales y proliferación de las anómalas. (Bordón Rodríguez et al. 2007) La mutaciones en p53 en relación a la apoptosis genera que se transactive genes como c-Myc y MDR1 promoviendo la proliferación celular, resistencia a fármacos y evasión las señales de estrés celular. (Bordón Rodríguez et al. 2007)

La reducción de la proteína Bax es una de las principales causas la inhibición de la apoptosis en células cancerígenas ya que, esta proteína regula la apertura del poro de la membrana mitocondrial, por lo tanto un bajo nivel de Bax evita la liberación del citocromo C independiente de que el potencial de membrana o el pH se desequilibren en las células. (Bordón Rodríguez et al. 2007)

### **1.3. CÁNCER DE CÉRVIX**

#### ***1.3.1 Generalidades del cáncer de cérvix.***

El cáncer de cuello uterino, es una enfermedad asociada a diferentes factores de riesgo, siendo el virus de papiloma humano (VPH) el más relevante. La correlación entre el padecimiento y el virus ha sido estudiada desde la década de los 80, cuando fue mencionada por primera vez por el doctor Harald Zur Hausen. (López Saavedra and Lizano Soberón 2010)

Es importante la detección precoz del virus del VPH en pacientes con células anómalas en el cuello uterino, esto se ha logrado con mayor eficiencia, en países desarrollados como EEUU y países europeos, (Luengo Matos and van den Eynde 2004) mediante métodos de cribado. (Schmolling Guinovart et al. 2002; Redondo Horcajo et al. 2000; Borràs and Iglesias 1994) En Latinoamérica, se realizan como pruebas de diagnóstico, la colposcopia y la citología, en donde se valora el exocervix y el endocervix. Sin embargo, es menos efectivo, ya que no se suelen implementar estudios de control en mujeres infectadas, debido a falta de recursos o por que los tratamientos y procedimientos de prevención, son poco asequibles en regiones apartadas a centros de salud. (Almonte et al. 2010; Lobo Álvarez 2012)

#### ***1.3.2 Estadísticas del cáncer de cérvix.***

Entre los estudios realizados se puede ver, que en 1960 con respecto a una cantidad de 100.000 mujeres estandarizadas según la edad, las tres regiones a nivel mundial con mayor tasa tanto de incidencia, como en mortalidad fueron; el caribe, américa central y el este de África. (Diestro Tejeda, Serrano Velasco, and Gómez-Pastrana Nieto 2007) Las estadísticas en el 2008, muestran que el cáncer causó cerca de 227.899 muertes de mujeres a nivel mundial, por lo que el cáncer de cérvix, se convierte en el séptimo cáncer con mayor tasa de mortalidad, afectando principalmente a países subdesarrollados. (Diestro Tejeda, Serrano Velasco, and Gómez-Pastrana Nieto 2007; Sánchez Sánchez 2012) Según estudios puede darse en mujeres entre los 15 a los 50 años de edad dependiendo de su inicio temprano de la sexualidad y tomando el recorrido y desarrollo de la enfermedad. (Diestro Tejeda, Serrano Velasco, and Gómez-Pastrana Nieto 2007)

En Latinoamérica, las tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de cérvix, son mayores en: Nicaragua, Honduras, El Salvador, Bolivia, Paraguay y Perú presentándose de 35 a 40 casos con respecto a la incidencia y de 16 a 20 muertes por cada 100.000 mujeres, estas cifras representan el 13 y 12 % en relación a las tasas a nivel mundial respectivamente, según los datos registrados en el año 2008. (Almonte et al. 2010) Por esto, se han implementado las medidas de prevención de la enfermedad, con el fin de disminuir la tasa de mortalidad y así lograr realizar tratamientos en una etapa temprana del cáncer. (Hausen 2011)

En Colombia, las estadísticas han cambiado favorablemente ya que en el 2008, la incidencia fue de aproximadamente 23 casos y 10 muertes en un estándar de 100.000 mujeres, mientras que en el 2012 las tasas fueron de 18,7 y 8 respectivamente. Sin embargo se estima que para el 2015, las cifras aumenten a 20,3 % de nuevos casos y 8,8 % de fallecimientos. (Almonte et al. 2010; Ferlay et al. 2014) Los datos relacionados con el cáncer se han convertido en una razón prioritaria para establecer la necesidad de crear tratamientos específicos a las mujeres que padecen la enfermedad, teniendo en cuenta que se manifiesta de diversas maneras según sea la evolución del cáncer y el estado del paciente. (Almonte et al. 2010)

### ***1.3.3 Virus del papiloma humano y cáncer de cérvix: oncogenes y proteínas implicados en el ciclo celular y la apoptosis.***

El VPH, es el principal causante del cáncer cervical en más del 96% de mujeres con neoplasia cervical intraepitelial, se ha encontrado la presencia del virus, al igual que en el 93% de casos con cáncer de cérvix invasivo. (García et al. 2008) El virus de papiloma humano que ataca desde aves hasta mamíferos suele ser benigno, sin embargo existen 58 de los 100 diferentes tipos de VPH que son malignos y que pueden generar cáncer. (Concha R 2007) Los más perjudiciales y letales son los números 16 y 18. (Lobo Álvarez 2012; Vázquez Márquez et al., n.d.; Sánchez Sánchez 2012; Serrano, Pérez, and Díaz 2004)

Este virus se caracteriza por producir una serie de proteínas que son oncogénicas de tipo débil desde E1 a E8 y fuertes como lo son el L1 y L2, además, una región larga de control, siendo estas proteínas las verdaderas causantes del cáncer de cuello uterino en las mujeres que poseen algún(os) de los factores de riesgos

anteriormente mencionados. (Serrano, Pérez, and Díaz 2004; López Saavedra and Lizano Soberón 2010)

Las principales proteínas que facilitan la proliferación de células cancerígenas son E6 y E7 del VPH de alto riesgo, las cuales degradan dos proteínas de gran importancia en la regulación del ciclo celular, que son p53 y la proteína de retinoblastoma. La expresión de estas oncoproteínas se beneficia por la pérdida de E2 en la célula, que está encargada de detener la transcripción viral. (Sánchez Sánchez 2012)

La oncoproteína E6 facilita que células tumorales evadan la muerte celular y puedan proliferarse, ya que al formar un complejo con p53 a través de E6AP, conlleva a la degradación de p53 por la ruta de la ubiquitina-proteosoma, a su vez son inhibidas proteínas proapoptóticas como Bax y Bak, lo que estimula la inhibición del mecanismo de muerte programada.(Alberts et al. 2010)

Otro elevador de la carga viral es E7, que contribuye al incremento de mutaciones durante la duplicación celular al mantener el estímulo mitótico celular, ya que al unirse con proteínas fosforiladas de la familia del retinoblastoma interrumpiendo la actividad de regulación de pRb, razón por la cual, es liberado el gen E2E, importante en la síntesis del ADN, además es un inhibidor de proteínas p21 y p27 lo que causa el desequilibrio de la función del punto de control del inicio.(Fernández et al. 2013; Lagunas-Martínez, Madrid-Marina, and Gariglio 2010; Sánchez Sánchez 2012)

El VPH-16, estimula la expresión de otra proteína con carga viral que es E5, que tiene un papel clave en la inhibición de la muerte celular programada, ya que impide que la apoptosis se desarrolle por medio de la vía extrínseca, al deteriorar el receptor CD95 y dañar la formación del disco TRAIL modificando la membrana celular. (Lagunas-Martínez, Madrid-Marina, and Gariglio 2010)

#### **1.3.4 Células HeLa: oncogenes, proteínas y morfología.**

Además de las proteínas y genes nombrados anteriormente, existen otras moléculas que también intervienen en la progresión de las células cancerígenas y

que son específicas para la línea cancerígena estudiada (Células HeLa), las cuales son la base fundamental en esta investigación; ejemplos de oncogenes en HeLa, son la quinasa dependiente de ciclina 3 (Cdk3) y la subunidad del citocromo C oxidasa cuyo aumento facilita la transición de las fase G1 a la S. (Jaluria et al. 2007)

La sobreexpresión de proteínas fosfatasa como Cdc2, Cdc25, ciclinas A, B y E y la Cdc 42 en interacción con CIP4 causan que se desintegre la alta regulación del ciclo celular en la fase G2 y aumentan la agresividad de las células tumorales en su actividad proliferativa. Adicionalmente la expresión de la proteína ADN-PK interviene en la salida del punto de control G2/M independiente de lesiones en el ADN.(Muschel 2002)

En relación con la apoptosis, se han mencionado varias proteínas implicadas en la carencia del proceso, también hay otras que su sobre expresión constituyen un aporte significativo a evitar la muerte programada, como la endoplasmína una proteína perteneciente al retículo endoplasmático la cual es una chaperona en el transporte de proteínas secretadas y además tiene actividad antiapoptótica, y el antígeno CD44 que se encuentra en la membrana plasmática, que media la interacción con la matriz celular, es un importante receptor del crecimiento tumoral. (Garay Baquero 2010)

También existen oncoproteínas que están estrechamente relacionadas con la aparición de alteraciones morfológicas en las células, a las que se le atribuye ciertas características de las células HeLa, un ejemplo es la modificación de AD024 una proteína que normalmente tiene como función, regular la organización de microtúbulos y la integridad de los cinetocoros, pero en presencia de mutaciones causan alteraciones en la división celular lo que conduce al desarrollo de células binucleadas al finalizar la mitosis. (Kittler et al. 2004)

Durante la citocinesis también existen oncoproteínas y oncogenes como SNRPA1 y SNRPB (codifican proteínas), SNW1 (que interacciona con oncoproteínas SKI), DHX8 (exporta el ARNm desde el núcleo) y la importina-b que al tener modificaciones generan desorganización en el núcleo, como por ejemplo, aparición de dos o más nucléolos, o la carencia de estos últimos y la no condensación de la cromatina en la interfase.(Kittler et al. 2004)

Por esto, la morfología en cultivo secundario de células epiteliales HeLa se caracteriza por tener membranas alargadas y poligonales, con un tamaño cercano de 20 a 30  $\mu\text{m}$ , pero pueden llegar a poseer un tamaño de hasta 50  $\mu\text{m}$ , además sus núcleos son centrales y con varios nucléolos y su proporción en relación con el citoplasma es 1:2. En algunos estudios se ha podido determinar que la composición de proteínas en la membrana plasmática es del 6% en relación con la cantidad total, constituida principalmente por enzimas. (Garay Baquero 2010; Gutiérrez P, Hidalgo V, and Madrigal B 1995)

### ***1.3.5 Tratamiento y quimioterapia en el cáncer de cérvix.***

#### ***1.3.5.1 Tratamientos en cáncer de cérvix.***

Dependiendo del estado físico, la edad, la histología, morfología y evolución del cáncer en el paciente se puede tener tres tipos de tratamientos: quirúrgicos, radioterapia y quimioterapia. En la mayoría de los casos, se emplean combinándose en distintas formas. (Lobo Álvarez 2012) Los quirúrgicos se pueden clasificar como se muestran a continuación. (García et al. 2008)

##### ***1.3.5.1.1 Tratamientos destructivos.***

Son tratamientos que solo se pueden realizar a pacientes con la lesión visible, sin cambios en el epitelio glandular, sin enfermedad invasiva y sin diferencias entre la citología e histología. Para estos casos se usa cirugías, laserterapia y quimio-radiación. (Fidalgo et al. 2011; Lobo Álvarez 2012)

##### ***1.3.5.1.2 Tratamientos escisionales.***

Se emplean en pacientes con una progresión de la lesión del 30-50 %, en estos se extirpa la zona de lesión y se puede sacar tejido para realizar un estudio histológico. Las técnicas quirúrgicas son: conización con láser CO<sub>2</sub> y conización con bisturí frío. (García et al. 2008; Lobo Álvarez 2012).

### **1.3.5.1.3 Tratamientos “see and treat”.**

Este solo se indica a mujeres con citología HSIL y colposcopia con cambios mayores. En este procedimiento se emplea una exéresis (extirpación del órgano) antes de conocer su histología. (Lobo Álvarez 2012) Actualmente, se están estudiando varias vacunas que pueden ser profilácticas (virus como partículas obtenidas a partir de L1) y terapéuticas (péptidos derivados de los oncogenes E6 y E7) que atacarían al virus VPH impidiendo la aparición del cáncer y otras infecciones que se atribuyen a este virus. Para el caso de las radioterapias que se realizan como métodos únicos y en algunos casos, combinada con la quimioterapia, estos se hacen con rayos x, y en ocasiones generan efectos secundarios como vómitos y náuseas y otros que dependen de la zona donde se implementen. (Alameda González and de Lorenzo-Cáceres Ascanio 2008)

### **1.3.5.2 Quimioterapia en cáncer de cérvix.**

La quimioterapia, no es una técnica reciente, ya que las primeras veces que se empleó fue después de la segunda guerra mundial, debido a que la explosión de contenedores con gas mostaza, contaminó a cientos de marinos llevándolos a padecer leucopenia y posteriormente, a la muerte, es desde ese momento que sustancias de síntesis químicas empiezan a ser consideradas, como posibles medicamentos para tratar personas con algún tipo de tumor maligno o aquellas con células cancerígenas.(Piedra Sánchez 2004)

Esta técnica es de gran importancia, ya que se puede realizar de forma sistémica, es decir, permitiendo que el medicamento viaje por el cuerpo y llegue a las células malignas, con el fin de detener su ciclo celular o una fase específica del mismo. (Cano González et al. 2009). Además, este método puede mezclarse con otros tratamientos locales, según la necesidad del paciente, la primera de forma neoadyuvante, es decir, antes de una cirugía y de la radioterapia en caso de que sea un tumor local, la adyuvante, para destruir células tumorales residuales y así prolongar la vida en un cáncer avanzado.(Piedra Sánchez 2004)

Se ha podido ver, que en tumores del cáncer de cérvix menores a 2cm, la quimioterapia, genera buenos resultados siempre y cuando se use de manera neoadyuvante, junto con métodos como, la radiación terapéutica y cirugías, las quimio-

radioterapias, radio-quimioterapias e incluso la realización de quimioterapias después de una histerectomía radical; estas son combinaciones que han mostrado resultados mejores a los obtenidos por cada técnica de forma individual.(Lobo Álvarez 2012)

#### **1.4. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NUEVOS COMPUESTOS SINTÉTICOS**

##### ***1.4.1 Importancia y ejemplos de compuestos orgánicos en la quimioterapia.***

Actualmente, entre los fármacos empleados en la quimioterapia, con mejores resultados están: el cisplatino, considerado como el más efectivo, usado con el fin de reducir el volumen del tumor, y al ser empleado, en quimioterapias intensivas más de dos veces por semana, disminuyendo la probabilidad de metástasis.(Green et al. 2005) En quimio-radioterapias, también se utilizan, el carboplatino como derivado (CBDCA), el 5-fluouracilo (5-FU), la hidroxiurea (HU), y la mitomicina-C (MMC) con respuestas positivas entre el 20 al 30% de los casos, en diferentes combinaciones o en forma individual. (Marsiglia 2001) En cuanto a quimioterapias neo-adyuvantes se emplean la vincristina y bleomicina, que son seguidas por las radioterapias y se finaliza el tratamiento con la cirugía, como la histerectomía radical tipo III, con el fin de a extender la vida del paciente.(Dueñas et al. 2000)

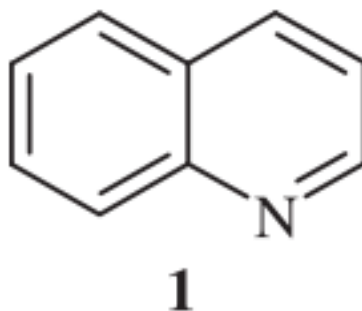
En algunos casos, los pacientes de quimioterapias, no logran resistir la toxicidad que poseen los fármacos empleados, causándoles la muerte. Lo que ha llevado a que las investigaciones se estén centrando en descubrir un verdadero compuesto que evite la proliferación de las células anormales en el cuerpo. Para ello, actualmente se han sintetizado varias familias de compuestos, como las tetrahydroquinolinas e isoxazoles, que en principio fueron aislados de fuentes naturales y que poseen muchas propiedades, entre ellas están la capacidad de actuar como agentes antitumorales y anticancerígenos.(Hervin and Jaimes 2009; Kaur et al. 2014; Muñoz et al. 2012; Martínez Bonilla 2012)

## 1.4.2 Tetrahydroquinolinas e isoxazoles y sus aplicaciones.

### 1.4.2.1 Tetrahydroquinolinas y algunos de sus derivados.

Las tetrahydroquinolinas, son sustancias derivadas de las quinolinas, éstas últimas a su vez, son moléculas heterocíclicas aromáticas que contienen un nitrógeno tal como se ve en la **figura 3**. (Marella et al. 2013) Además, es importante, resaltar que los núcleos de las quinolinas, tienen muchos beneficios biológicos entre los que están, posibles actividades antibacteriales, antiinflamatorias, antimaláricas, antiasmáticas, antifúngicas, analgésicas, hipertensores, amebicidas, antiprotozoarias, antialérgicas, antimicrobianas, antivirales e incluso anticancerígenas, por lo que en la última década, se consideren como compuestos importantes en las investigaciones bioquímicas, biomédicas y orgánicas. (Martínez Bonilla 2012; Marella et al. 2013)

**Figura 3.** Anillo de quinolina.



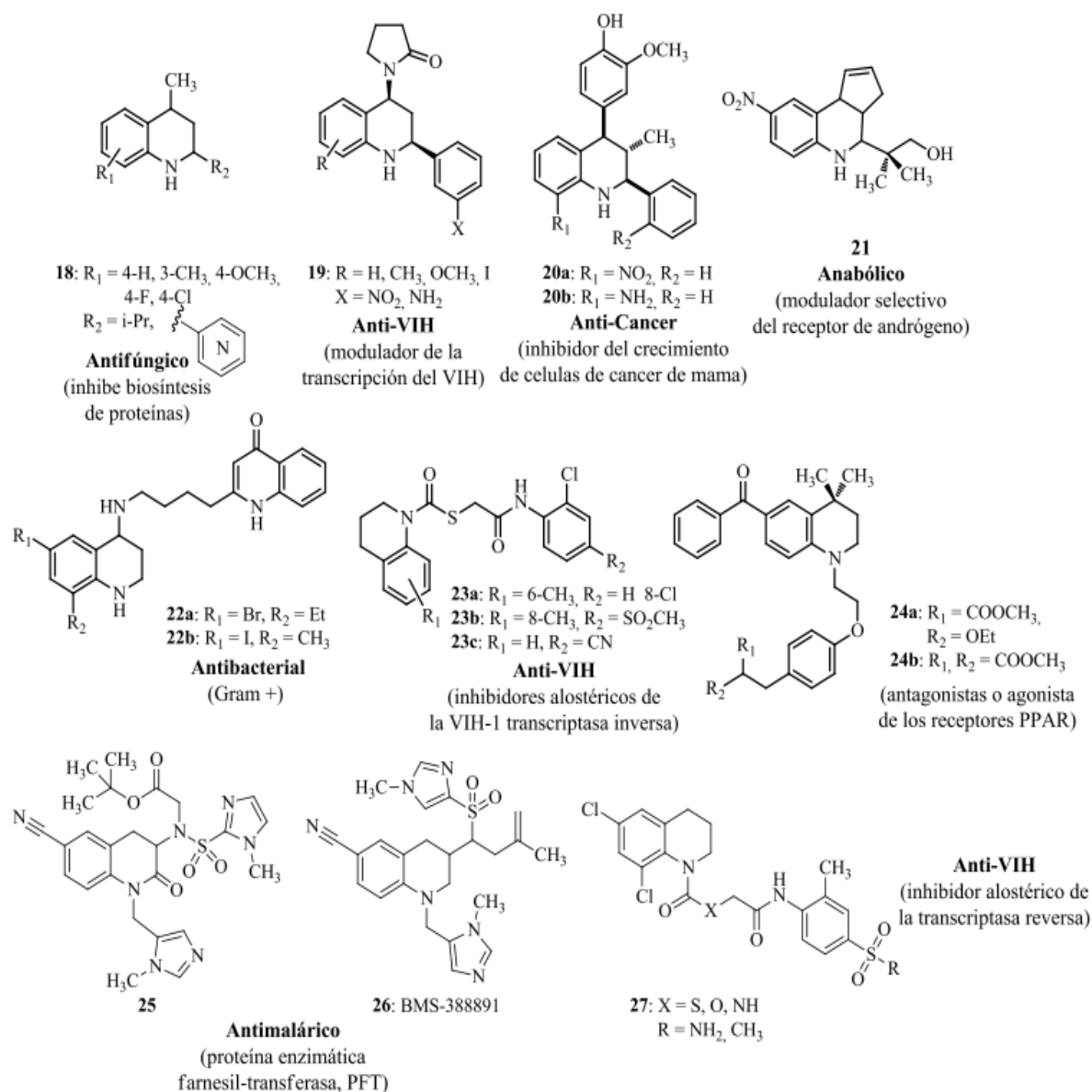
**Fuente:** Quinoline: A Versatile Heterocyclic. (Marella et al. 2013)

Los derivados de quinolinas, son sustancias que se pueden encontrar en la naturaleza, sin embargo, la purificación de compuestos aislados, desde fuentes animales o vegetales es compleja y su aplicación genera reacciones no deseadas, haciendo que las tetrahydroquinolinas sintéticas sean apreciadas como posibles fármacos y además, se investigan para conocer nuevos efectos metabólicos. (Romero Bohórquez, Merchan Arenas, and Ouznetsov 2007)

Algunos ejemplos de tetrahydroquinolinas se observan en la **figura 4**, detallándose que los compuestos presentes en esta imagen, poseen el mismo anillo básico

quinolínico y diferentes sustituyentes, que les otorga a cada molécula una propiedad específica, que es de interés para la creación de distintos tipos de fármacos. (Martínez Bonilla 2012)

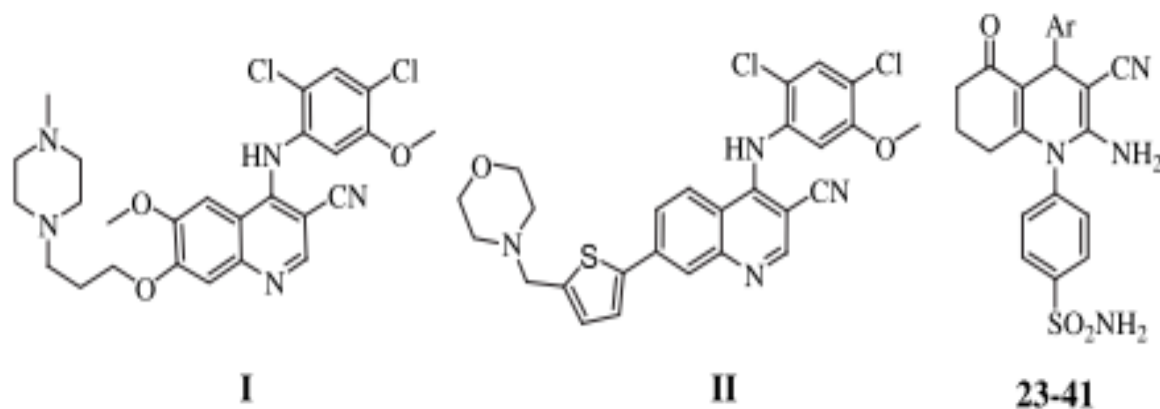
**Figura 4.** Análogos THQs con marcada actividad biológica.



**Fuente:** Generación De Una Quimioteca De Nuevas 4-Amidil-2-Metil-1,2,3,4-Tetrahydroquinolinas Potencialmente Bioactivas Usando El Concepto De Síntesis Combinatoria En Fase Líquida. (Martínez Bonilla 2012).

Estudios realizados muestran que los sustituyentes en una posición específica en las tetrahydroquinolinas, pueden generar una actividad, antitumoral o anticancerígena, igual o mejor que los compuestos que actualmente se usan en quimioterapias de los diferentes tipos de cáncer, un ejemplo, es la síntesis de una nueva serie de tetrahydroquinolinas de 3- carbonitrilos, con grupos arilos variados en la posición 4, un grupo biológicamente activo como la sulfonamida en la posición 1, un grupo ciano en la posición 3 y un grupo amino libre en la posición 2, tal como se ilustra en la **figura 5**, con el fin de mostrar que algunos de estos derivados tienen una actividad antitumoral superior al agente doxorubicina empleado en la leucemia de Hodgkin. (Alqasoumi et al. 2010)

**Figura 5** Estructura base de las tetrahydroquinolinas-3-carbonitrilos (23-41) y los análogos a la estructura, el compuesto 4-anilino-6,7-dialcoxi-3-quinolinacarbonitrilo (I) y 4-anilino-7-tienil-3-quinolinacarbonitrilo (II).



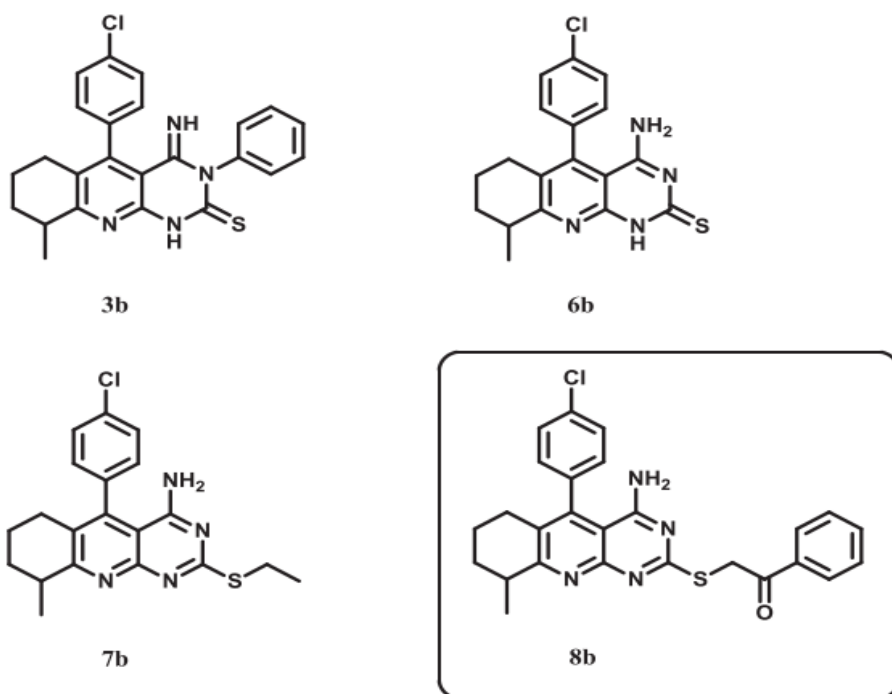
**Fuente:** *Discovering Some Novel Tetrahydroquinoline Derivatives Bearing the Biologically Active Sulfonamide Moiety as a New Class of Antitumor Agents* (Alqasoumi et al. 2010)

Alqasoumi y sus colaboradores, 2010, sintetizaron tetrahydroquinolinas- 3- carbonitrilos conformada por 19 moléculas, donde los sintéticos 32, 25, 41, 35, 33 y 37, evidenciaron una actividad citotóxica mayor que el agente doxorubicina sobre las células de carcinoma Ehrlich Ascitis (EAC), dado que la posición y el tipo de sustituyente fue determinante para la actividad del anillo aromático, ya que grupos tienilos y metóxilos reflejan un mayor efecto antitumoral que los grupos hidroxilo y furilos en la posición para del compuesto.(Alqasoumi et al. 2010)

En complemento a la investigación de Alqasoumi, se sintetizaron tetrahidroquinolinas con tres nuevos sustituyentes, 1) Ar = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH-2, 2) Ar = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl-2 y 3) Ar = C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>-3,4, resaltándose al primer sustituyente como el único grupo con actividad citotóxica sobre la línea celular (EAC) .(Al-Said et al. 2010)

La serie de derivados del 2-amino-3-ciano-8-metil-4-sustituido-5, 6, 7,8-tetrahidroquinolinas, constituida por 14 moléculas con dos sustituyentes diferentes en la posición 4, fueron empleados para la determinación de una posible actividad antitumoral en diferentes líneas celulares pertenecientes al cáncer de ovarios, leucemia, pulmón, colon, melanoma, cáncer CNS, mama, renal, de próstata, y células NCI-60, donde el sintético 8b demostró una inhibición del crecimiento mayor al 60% en la en casi todas las líneas celulares, excepto el cáncer de ovarios y CNS, mientras que 1a, 2b, 3b, 4a, 4b, 7a y 7b muestran actividades moderadas entre un rango del 38.8-50.0%, en la **figura 6** se pueden observar las estructuras de algunos agentes antitumorales .(Faidallah and Rostom 2013)

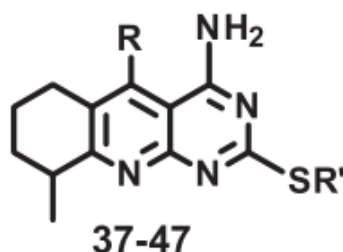
**Figura 6** Estructuras de los agentes antitumorales más activos 3b, 6b, 7b y 8b.



**Fuente:** *Synthesis and Biological Evaluation of Some Novel Tetrahydroquinolines as Anticancer and Antimicrobial Agents.* (Faidallah and Rostom 2013).

En complemento a la serie, Hassan M. Faidallah y sus colaboradores, 2013, en otro estudio generado a partir de la misma base estructural de tetrahydroquinolina, sintetizaron 51 nuevas moléculas de las cuales cinco mostraron una marcada actividad antitumoral en líneas de cáncer de mama, hígado y colon (**figura 7**), sobresaliendo el 39 y 40 al manifestar una mejor actividad citotóxica, ya que tienen un tiometilo en la posición 2 aumentando considerablemente la capacidad de inducir apoptosis. (Faidallah et al. 2013)

**Figura 7**-Tetrahydroquinolinas números 37-50 sintetizadas en la investigación de Hassan M. Faidallah, donde los compuesto 39, 40, 42, 45 y 46 mostraron actividad antitumoral.



- 37: R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; R' = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
 38: R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; R' = CH<sub>2</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>  
 39: R = 4-BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; R' = CH<sub>3</sub>  
 40: R = 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; R' = CH<sub>3</sub>  
 41: R = 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; R' = CH<sub>2</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>  
 42: R = 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; R' = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
 43: R = 4-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; R' = CH<sub>3</sub>  
 44: R = 4-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; R' = CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>  
 45: R = 2-Thienyl; R' = CH<sub>3</sub>  
 46: R = 2-Thienyl; R' = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
 47: R = 2-Thienyl; R' = CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

**Fuente:** Synthesis and Biological Evaluation of Some Novel Tetrahydroquinolines as Anticancer and Antimicrobial Agents. (Faidallah et al. 2013)

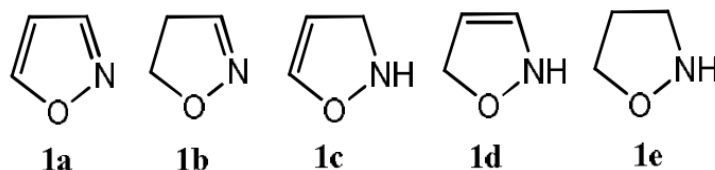
Algunas tetrahydroquinolinas simples y fusionadas también pueden presentar actividad antitumoral, como se ve en la investigación realizada por Ghorab y colaboradores, empleando dos series en la línea de cáncer de mama (MCF7), en donde la tetrahydroquinolina que mostró mejor actividad fue la del compuesto N'-(3-ciano-4,7,7-trimetil-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydroquinolin-2-il) -N-(4-(N-(5-

metil-isoxazol-3-il ) sulfamoil) fenil) formimidamida al tener una sulfonamida sustituida con el anillo de metil-isoxazolilo. (Ghorab, Ragab, and Hamed 2009)

#### 1.4.2.2 Isoxazoles y algunos de sus derivados.

Los isoxazoles al igual que las tetrahydroquinolinas, son compuestos heterocíclicos muy utilizados en la industria farmacéutica, a diferencia de los derivados de las quinolinas, estos tienen un anillo en el que se encuentra tanto un átomo de nitrógeno como uno de oxígeno, dándole estabilidad al compuesto, ejemplos de dichos núcleos se pueden ver en la **figura 8**. (Kumar and Jayaroopa 2013)

**Figura 8** Ejemplos de estructuras de isoxazoles y similares.



**Fuente:** *Isoxazoles: Molecules With Potential Medicinal Properties.*(Kumar and Jayaroopa 2013).

Los isoxazoles también pueden ser utilizados como fármacos con funciones terapéuticas, como antibacteriales, antifúngicos, antitumorales, anti-tuberculosos y anticancerígenos. (Kumar and Jayaroopa 2013) También pueden tener actividad citotóxica isoxazoles con más de dos sustituyentes como 3, 4, 5-trisustituidos isoxazoles. (Shailaja, Manjula, and Vittal Rao 2011) Mostrando claramente, que la evaluación de estos compuestos en distintos ámbitos bioquímicos, es esencial para el descubrimiento de potenciales inductores de apoptosis a células anormales e inhibidores del virus del papiloma humano y bacterias que actualmente, son problemáticas de la salud humana a nivel mundial.

En los isoxazoles también se han realizado una serie de estudios para determinar una posible actividad anti-proliferativa en líneas celulares ginecológicas humanas, en los que se ha encontrado que los derivados de los isoxazoles con grupos

halógenos suelen tener mejor actividad citotóxica junto con aquellos que poseen la unión de un grupo nitrilo en posición para, en el anillo aromático sustituyente del isoxazol, mientras que los isoxazoles insaturados carecen totalmente de la capacidad de inhibir el crecimiento de células malignas. (Kovács et al. 2012)

Para otros tipos de isoxazoles, como por ejemplo, la serie obtenida a partir de derivados de fenilbenzotiazoles, trabajados en tres líneas celulares como el adenocarcinoma de pulmón, cáncer de colon y de mama, han demostrado una actividad citotóxica, con  $CC_{50}$  entre 10,78 a 27,52  $\mu\text{M}$ . (Kumbhare et al. 2012)

El compuesto 3-3'-Isoxazol-3,5-diyl bis(5-metoxi-1-metil-1H-indol), que fue probado en 29 diferentes líneas celulares de cáncer entre las que se encuentra cáncer de ovario, melanoma, pancreático, pulmón, colon; entre otros, con actividad citotóxica a una concentración de 17.4  $\mu\text{g/mL}$ , manifestando que la presencia de un metóxilo en la estructura química favorece la inducción de apoptosis en células de carcinoma humano. (Diana et al. 2010)

Los isoxazoles fusionados, como crómenos cis- fusionados con pirano [4,3-c] isoxazoles, probados en cuatro líneas celulares cancerígenas, MDA-MB-231, MCF-7, A549 y HeLa, demostraron actividad citotóxica específica a una línea celular, por ejemplo, los compuestos con sustituyentes mono-metilos aromáticos y nitrones heterocíclicos muestran actividad anticancerígena en células HeLa. (Bejjanki et al. 2013)

Los isoxazoles funcionalizados, son una alternativa como un prometedor fármaco, ya que pueden disminuir la viabilidad de las células en minutos, además la presencia de un flúor, un cloro o un grupo nitro en la posición 4 en el fenilo del anillo triozazol, aumenta la actividad antitumoral en células de cáncer de pulmón, próstata, mama, cérvix y colon. (Ratnakar Reddy et al. 2014)

Dado lo anterior se demuestra claramente que tanto fusionados o independiente las tetrahydroquinolinas y los isoxazoles pueden generar una actividad citotóxica en diferentes líneas celulares cancerígenas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general.**

Evaluar la toxicidad in vitro de compuestos híbridos tetrahydroquinolinas-isoxazoles sobre células cancerígenas de cuello uterino

### **2.2. Objetivos específicos**

Evaluar el efecto de los compuestos híbridos tetrahydroquinolinas-isoxazoles sobre la viabilidad y proliferación de células cancerígenas de cuello uterino.

Determinar el mecanismo de inducción de muerte celular responsable de la toxicidad de los compuestos híbridos tetrahydroquinolinas-isoxazoles

### **3. HIPÓTESIS**

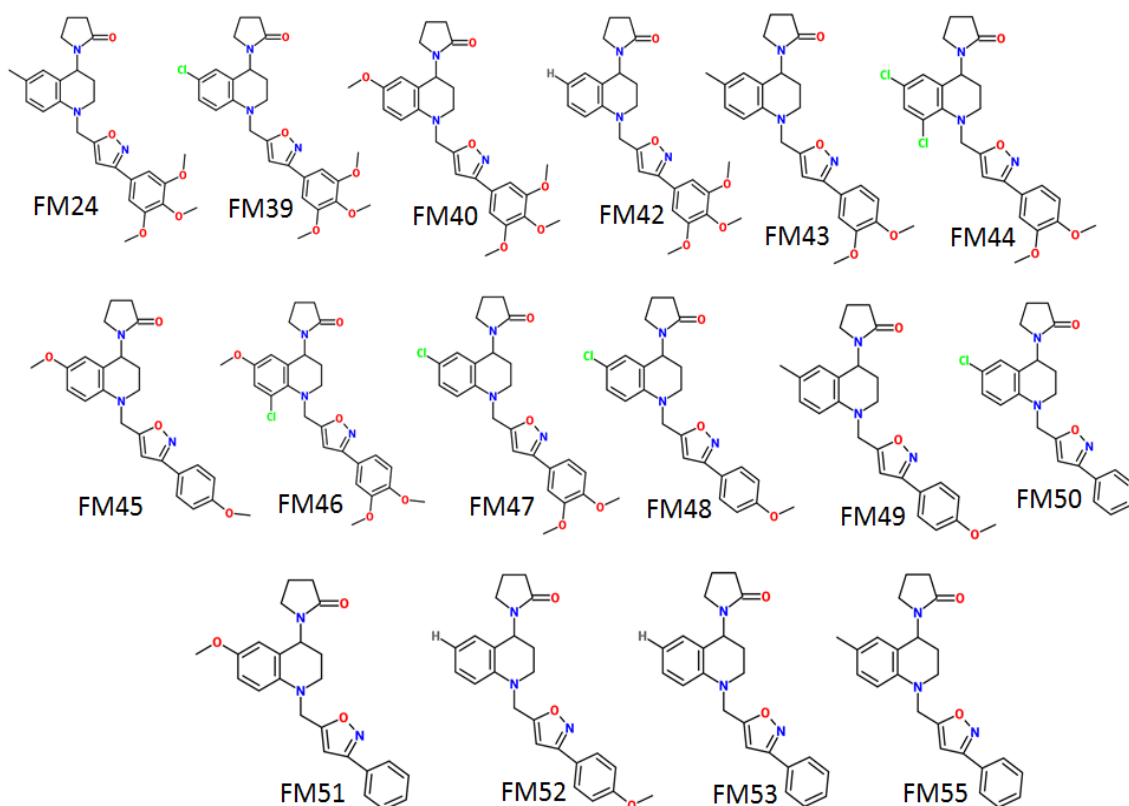
Teniendo en cuenta los diferentes estudios realizados en la síntesis y elaboración de compuestos orgánicos como tetrahydroquinolinas e isoxazoles y según los antecedentes mostrados con respecto a las aplicaciones que pueden tener estos fármacos, se propone la siguiente hipótesis: los derivados de tetrahydroquinolinas e isoxazoles poseen actividad anticancerígena contra cáncer de cuello uterino y sus células precursoras como las células HeLa.

## 4. METODOLOGÍA

Para evaluar la actividad anticancerígena de los híbridos de tetrahydroquinolinas e isoxazoles, se realizaron una serie de ensayos con el fin de determinar los compuestos con efecto citotóxico sobre la línea tumoral HeLa, y posteriormente se realizó un estudio de proliferación y liberación de Citocromo c a un derivado específico. Se analizó cada resultado mediante ANOVA y test de comparación múltiples de Tukey.

Los compuestos heterocíclicos, derivados de tetrahydroquinolinas e isoxazoles, fueron sintetizados por el laboratorio de química orgánica y biomolecular (LQOBio), y se muestran en el anexo 1 y en la **figura 9** a continuación:

**Figura 9.** Estructuras de los derivados de tetrahydroquinolinas e isoxazoles con su respectivo código. Las estructuras de los derivados fueron diseñadas con el programa ChemSketch 11.02.



## **4.1. CULTIVO CELULAR**

Las células que se trabajaron en la presente investigación son células de cáncer de cuello uterino o cérvix (HeLa).

### ***4.1.1 Proceso de descongelamiento de células HeLa.***

Es importante tener en cuenta que la línea celular HeLa se tiene conservada mediante criogenización con nitrógeno líquido a  $-180^{\circ}\text{C}$ . Las células fueron descongeladas y trasladadas al frasco de cultivo celular con medio EMEM suplementado con 10 % de SFB y  $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina, el cual se encontraba a  $37^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se permitió que se adhirieran las células durante 3 horas. Se extrajo el medio y se agregó medio de crecimiento. Finalmente se incubó en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , bajo una atmósfera de presión, y una concentración de  $\text{CO}_2$  del 5%. (Gil-Loyzaga 2011; Unchern 1999)

### ***4.1.2 Proceso de mantenimiento de las células HeLa.***

#### ***4.1.2.1 Repique en monocapa y recuento celular.***

Se descartó el medio de cultivo del frasco, luego fue agregada la tripsina y se homogenizó la monocapa pipeteando enérgicamente y se tomó cantidad necesaria según los resultados del conteo celular. (Gil-Loyzaga 2011; Unchern 1999)

Se colocó una muestra de la solución con células en la cámara de Neubauer. (Unchern 1999) Se calculó las células por mililitro de suspensión, luego se multiplicó por el volumen inicial para calcular el número total de células. Una vez obtenido el número de células por mililitro, se procedió a sembrar otro frasco de 25 o  $40\ \text{cm}^2$  estéril con medio suplementado y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de gas que contiene 5%  $\text{CO}_2$ . (Gil-Loyzaga 2011; Da Silva et al. 2014; Rodríguez 2008)

#### **4.1.2.2 Cambio de medio.**

Para el mantenimiento del cultivo celular, se debe realizar un cambio de medio una vez cada 2-3 días en función de la densidad celular alcanzada en los recipientes de cultivo y el cambio de pH del medio. (Unchern 1999; Gil-Loyzaga 2011)

#### **4.1.3 Congelamiento de las células.**

Las células se soltaron con tripsina-EDTA, y se pusieron  $1 \times 10^6$  células/criovial, en una solución que contenía 10% DMSO, 50% SFB y 40% de medio de cultivo EMEM. La solución de congelación se puso en un microtubo, durante aproximadamente 12 horas a baja temperatura ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) y pasado este tiempo, se trasladó cada vial al nitrógeno líquido donde pueden permanecer por un periodo de tiempo prolongado. (Unchern 1999)

### **4.2. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR**

#### **4.2.1 Prueba de reducción de MTT.**

Se realizó ensayos de viabilidad mediante el método del MTT, en el que se plaquearon 10.000 células/pozo en una placa de 96 pozos durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  con una corriente  $\text{CO}_2$  al 5%, posteriormente se trataron las células con los compuestos del estudio, pasado este tiempo de tratamiento, se retiró el medio y se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de MTT (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de HBBS) y se dejó por 3 horas en incubación y se añadió DMSO. Finalmente, se determinó la absorbancia a 580 nm en un espectrofotómetro uv-vis. (Mosmann 1983)

#### **4.2.2 Prueba con cristal violeta o metil violeta.**

Con este ensayo se determinó el efecto en la proliferación celular. Se cultivó 5000 células/pozo en una placa de 96 pozos en condiciones similares a la prueba de MTT, después de un día de incubación se retira el medio sobrenadante de cada pozo y se trató con un nuevo medio con los compuestos.

Una vez terminado el tiempo de tratamiento, fue retirado el medio y lavado con PBS (solución tampón) y se fijaron las células a la superficie con metanol durante 10 minutos, posteriormente fue agregado 50  $\mu$ L de solución de cristal violeta durante 2 minutos. Finalmente las células fueron lavadas nuevamente con PBS y a cada pozo se le incorporo 200  $\mu$ L de citrato de sodio. La lectura de absorbancia fue realizada a 550 nm. (Noletto et al. 2009)

### **4.3. LIBERACIÓN DE CITOCROMO C**

Se plaquearon  $1 \times 10^6$  células/ caja de Petri y se incubaron durante 24 horas, luego se trataron con los compuestos. Después se soltaron las células con tripsina, posterior a esto se centrifugaron las células suspendidas y se lavaron con PBS, de manera que se mantuvieran a un volumen final de 1mL. Se dividió el precipitado en dos porciones, una alícuota de 30  $\mu$ L fue separada para la cuantificación de la proteína. (Bradford 1976)

Después de extraer la alícuota anterior, la solución restante del precipitado obtenido, fue centrifugada a 4500 xg durante 15 minutos. Posteriormente el precipitado fue resuspendido en 1mL de la solución de TRIS en HCl 85.55 mM a un pH de 7,2, EGTA 7.89 mM y sacarosa 0,146 mM junto con digitonina 10 $\mu$ mol/L y fue llevado a incubación por 30 min a 4 °C. Luego de la incubación la suspensión celular fue centrifugada a 10000 xg por un período de 30 minutos el sobrenadante fue filtrado con la ayuda de una membrana de poliestireno con diámetro de poro de 200 nm y se determinó su absorbancia a 414nm. Finalmente se calculó la concentración de citocromo c liberado.(Appaix et al. 2000)

### **4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

#### ***4.4.1 Análisis de ANOVA.***

En el análisis estadísticos de ANOVA dado que los ensayos se realizaron en triplicado y con duplicados de cada experimento, de cada conjunto de datos se halló el promedio y la desviación estándar, utilizando el software Microsoft excel.(Díaz Portillo, Fernández del Barrio, and Parede Salido 1997)

#### ***4.4.2 Análisis de Tukey.***

Una vez los resultados son analizados por ANOVA, se realizó un test de comparación múltiples de Tukey, que consiste en comparar las desviaciones obtenidas desde el ANOVA en grupos con el mismo número de datos para así determinar que mediadas tienen diferencias significativas con relación al promedio con la desviación estandar:(Moncada Jiménez 2005) Para este análisis, se empleó el programa STATISTICA 8.0.550 con valores p menores a 0,05.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

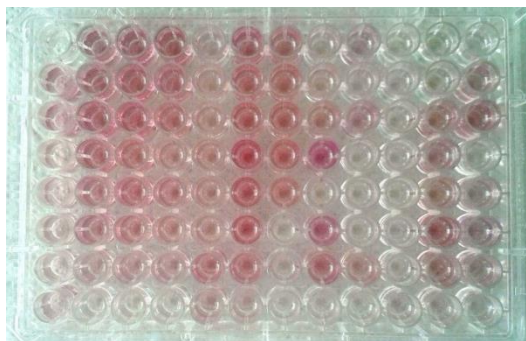
### 5.1. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

#### 5.1.1 Prueba de reducción de MTT.

La prueba de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), consiste en la reducción del colorante de tetrazolio MTT, al reaccionar con la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, produciendo cristales de formazan, generando un cambio de coloración amarilla a púrpura, gracias a la solubilización de los cristales con el DMSO (dimetilsulfoxido), para la posterior lectura a 580 nm. (Escobar M and Aristizábal G 2010; Olivares Rueda 2014)

Inicialmente se realizó un ensayo de reducción de MTT con los 16 compuestos de las líneas de híbridos de tetrahydroquinolinas e isoxazoles (denominados como A1-A16 de acuerdo como se muestra en el **anexo A1** que se encuentra en el anexo) a dos tiempos de tratamiento (24 y 48 horas) y con cuatro concentraciones de cada derivado (5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ). Cada ensayo se hizo por triplicado de cada compuesto y se realizaron dos ensayos independientes. En la **figura 10**, se presenta una de las placas con la prueba de MTT una vez retirado el colorante y adicionado DMSO, los pozos cuya tonalidad rosa es más fuerte, son los que tienen un porcentaje de viabilidad más alto ya que el número de células es mayor.

**Figura 10.** Placa de 96 pozos con la prueba de reducción del MTT. La absorbancia fue medida a 580 nm después de 24 y 48 horas de tratamiento con concentraciones de 5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de cada compuesto.



La viabilidad celular se determinó mediante la **ecuación 1.**(Escobar M and Aristizábal G 2010)

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{\text{Abs de pozos tratados-blanco}}{\text{Abs pozos control-blanco}} * 100 \quad \text{Ecuación 1. (Escobar M and Aristizábal G 2010)}$$

Para cada compuesto y tiempo de tratamiento se calculó la CC<sub>50</sub> es decir, la concentración en la que se reduce la viabilidad celular en un 50 %, en la **tabla 1**, se observa que 9 de los 16 compuestos poseen efecto citotóxico sobre la línea cancerígena HeLa, con valores de CC<sub>50</sub> menores de 100 µM.

**Tabla 1.** Valores de CC<sub>50</sub> para los dos ensayos preliminares de 24 y 48 horas del MTT.

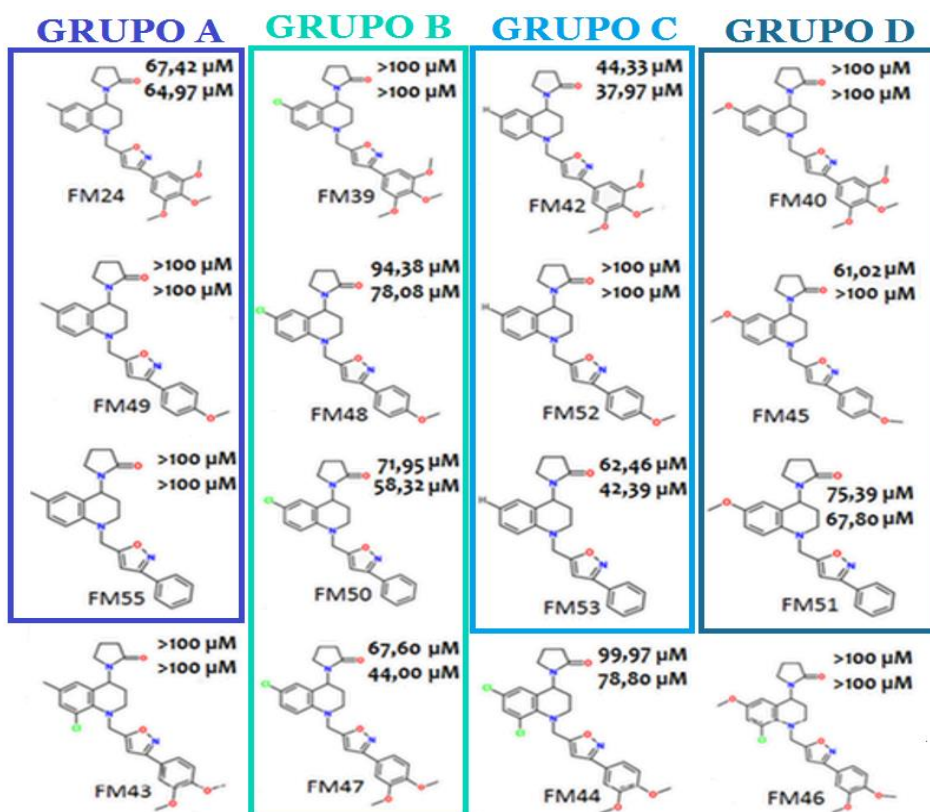
<b>Compuesto</b>	<b>CC<sub>50</sub> (µM) a 24 h</b>	<b>CC<sub>50</sub> (µM) a 48 h</b>
FM24	67,42	64,97
FM39	>100	>100
FM40	>100	>100
FM42	44,33	37,97
FM43	>100	>100
FM44	99,97	78,80
FM45	61,02	>100
FM46	>100	>100
FM47	67,60	44,00
FM48	94,38	78,08
FM49	>100	>100
FM50	71,95	58,32
FM51	75,39	67,80
FM52	>100	>100
FM53	62,46	42,39
FM55	>100	>100

Con los resultados obtenidos mediante la prueba de reducción de MTT para 24 y 48 horas de tratamiento, es posible establecer una relación entre la estructura de los derivados y el valor de CC<sub>50</sub>, ya que el aumento de esta concentración implica una disminución en el efecto citotóxico del híbrido sobre la línea celular HeLa.

Por ejemplo, en la **figura 11**, se señalan cuatro grupos, cada uno corresponde a derivados que se asemejan en el segmento de tetrahydroquinolina, en el grupo A, la

THQ tiene un sustituyente metilo en el la posición C6 del anillo, mientras que en los grupos B, C y D el sustituyente es cloro, hidrógeno y metóxilo respectivamente. A su vez cada compuesto se diferencia por el número de sustituyentes tipos metóxilo en el arilo del isoxazol.

**Figura 11.** Híbridos comparados en los grupos A, B, C y D. La imagen muestra los derivados con los valores de  $CC_{50}$  a 24 y 48 horas de tratamiento, agrupados según el segmento tetrahydroquinolinico.

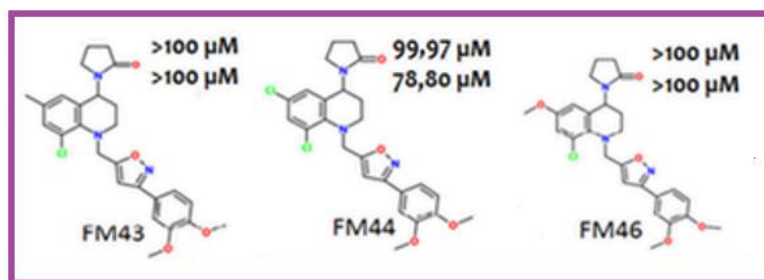


En el grupo A mostrado en la **figura 11**, se observa que el único derivado con un efecto citotóxico significativo es FM24, esto puede deberse, a que en estos híbridos la sustitución de un metilo en el anillo tetrahydroquinolinico solo favorece la capacidad citotóxica si el arilo del isoxazol presenta una triple sustitución de metóxilos.

Por su parte, en los grupos B; C y D, cada uno de estos contienen dos híbridos con efecto citotóxico, sin embargo los compuestos FM45 y FM51 tienen valores de  $CC_{50}$  altos en comparación a los constituyentes de B y C, lo que podría estar relacionado con la presencia de un metóxilo en el anillo de la tetrahydroquinolina que disminuye la capacidad anticancerígena de estos derivados.

En la **figura 12** se observan los derivados que poseen sustituciones en el carbono C6 y C8 de la tetrahydroquinolina, sin embargo estos compuestos no tienen valores de  $CC_{50}$  interesantes, por lo que se consideran inactivos, dado a que la presencia de disustituciones posiblemente afectan negativamente la actividad anticancerígena.

**Figura 12.** Compuestos híbridos con disustituciones. La imagen muestra los derivados quienes difieren por los sustituyentes en el carbono C6 de la tetrahydroquinolina.



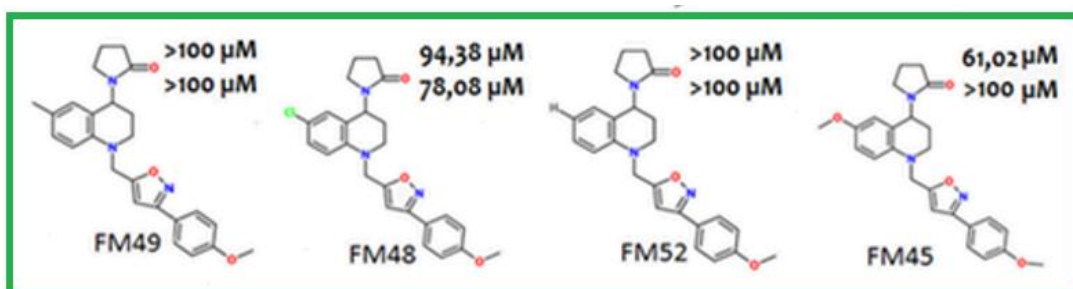
También se pueden relacionar los híbridos con respecto al segmento de isoxazol, como se ve en la **figura 13**, donde se muestran cuatro compuestos con tres sustituyentes metóxilos en el anillo del isoxazol. En esta comparación se observa que dos de los derivados tienen menor efecto citotóxico (FM39 y FM40), esto puede deberse a que la presencia de sustituyentes donantes de electrones por resonancia como el cloro y el metóxilo, no favorecen la capacidad anticancerígena en comparación a otros donantes de electrones, además como se puede apreciar que el potencial anticancerígeno incrementa cuando el sustituyente en la tetrahydroquinolina es de menor tamaño, como el hidrógeno.

**Figura 13.** Compuestos con similitud en el segmento isoxazol. La imagen muestra los derivados FM24, FM39, FM42 y FM40 quienes difieren entre sí por los sustituyentes en la tetrahidroquinolina.



Del mismo modo, en la **figura 14** se muestra cuatro compuestos que se asemejan en el segmento del isoxazol. Sin embargo, estos compuestos presentan muy bajo efecto citotóxico, lo cual se puede atribuir a la posición *para* del sustituyente metóxilo del isoxazol, y al comparar con el resto de los derivados, se puede estimar que el aumento del número de sustituyentes metóxilos en posición *meta* probablemente contribuye de manera positiva a la capacidad anticancerígena de cada híbrido.

**Figura 14.** Compuestos con similitud en el segmento isoxazol. La imagen muestra el valor de CC<sub>50</sub> para compuestos con metóxilo en posición *para* con respecto al isoxazol.



Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de esta investigación, es determinar los derivados que pueden ser utilizados como posibles nuevas alternativas de tratamiento, de los diez compuestos con efecto citotóxico se eligieron los compuestos con el menor CC<sub>50</sub> (ver **tabla 2**), ya que estos compuestos son los que generan un mejor efecto anticancerígeno. En los **anexo A2-A4** presentes en los

anexos se pueden observar la disminución de la viabilidad celular en HeLa con respecto a la concentración de los diferentes compuestos.

**Tabla 2.** Compuestos con el menor  $CC_{50}$  con el nombre UIPAC.

<b>Compuesto</b>	<b><math>CC_{50}</math> <math>\mu</math>M 24 horas</b>	<b><math>CC_{50}</math> <math>\mu</math>M 48 horas</b>	<b>Nombre UIPAC</b>
FM24	67,42	64,97	5-((6'-metil-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)isoxazol
FM42	44,33	37,97	5-((4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)isoxazol
FM45	61,02	>100	3-(4-metoxifenil)-5-((6'-metoxi-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol
FM47	67,60	44,00	5-((6'-cloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoxazol
FM50	71,96	58,32	5-((6'-cloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(fenil)isoxazol
FM53	62,46	42,39	3-(fenil)-5-((4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol

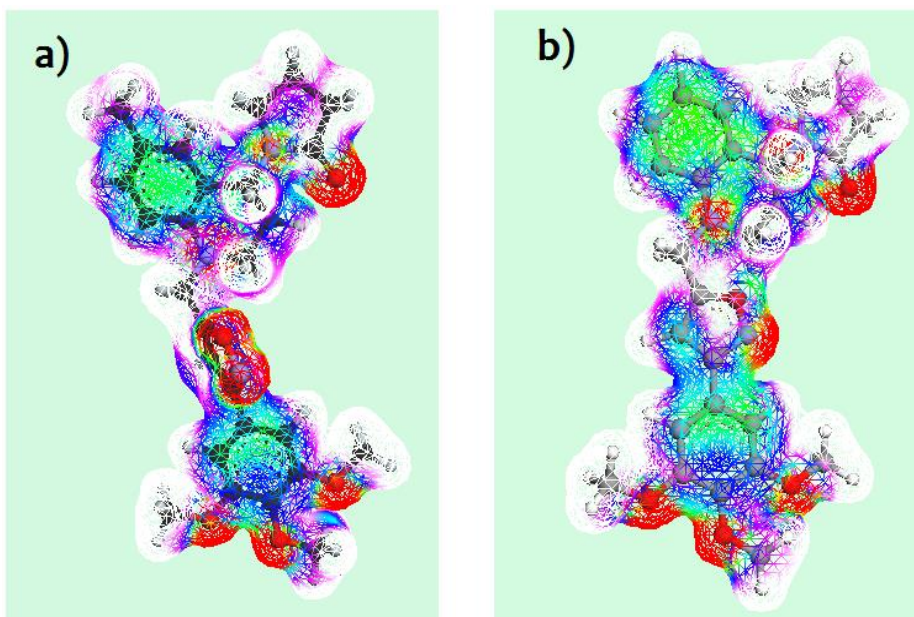
Estos compuestos con actividad citotóxica, evidencian que para la línea celular HeLa, hay un efecto dependiente de la dosis, como se menciona en investigaciones realizadas en diferentes familias de compuestos. (Palanisamy et al. 2013; Prabhu et al. 2012) Sin embargo, este ensayo mostró que la actividad anticancerígena también está ligada al tiempo de duración del tratamiento de forma similar a lo reportado en la literatura para otras líneas celulares. (Farm and Fisiologia 2009)

Los seis compuestos nombrados en la **tabla 2**, muestra claramente que el efecto citotóxico se ve influenciado por el cambio o eliminación de un determinado sustituyente en cada segmento funcional, ya que los compuestos con un sustituyente cloro del anillo tetrahydroquinolinico poseen un efecto citotóxico menor en comparación con los otros derivados. Asimismo, el aumento de metóxilos en el isoxazol, induce de manera positiva la actividad antitumoral en células HeLa.

Al comparar los resultados de los seis compuestos estudiados, se puede observar que en los tratamientos de 24 y 48 horas, el compuesto FM42 presenta mayor efecto citotóxico sobre las células HeLa. Por el contrario, los compuestos FM47 y FM50 presentan el efecto citotóxico sobre la línea celular analizada, otro aspecto a destacar es que el compuesto FM45 en el tratamiento de 48 horas, no posee una actividad citotóxica significativa porque su  $CC_{50}$  es mayor a 100, por lo tanto, no es comparable con los demás compuestos, dado que su actividad puede verse afectada por la presencia de una mezcla racémica y/o por el tiempo de vida media del híbrido.

La relación de los híbridos FM24 y FM42, donde su estructura molecular consiste en 3 sustituyentes del tipo metóxilo en el arilo unido al segmento isoxazol y difieren en los sustituyentes en la posición seis del anillo tetrahydroquinolinico, ya que el primer derivado, tiene un sustituyente metilo en la THQ, este hace que la actividad citotóxica sea menor en comparación con FM42, es posible que el aumento del tamaño del sustituyente no genere una respuesta positiva en la inducción de la actividad citotóxica.

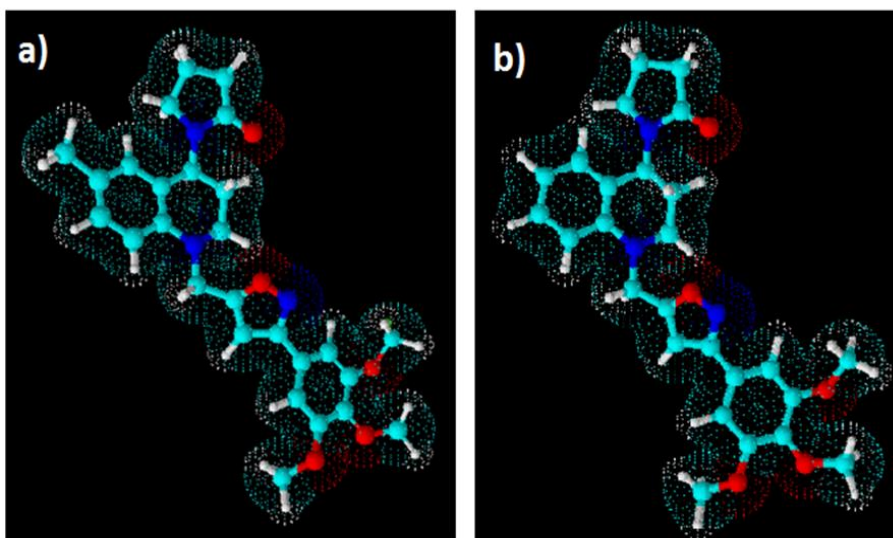
**Figura 15.** Potencial electroestático de los derivados a) FM24 y b) FM42. El potencia electrostático de los derivados FM24 y FM42 fue determinado con el programa Argus Lab.4.01.



En la **figura 15** se pueden observar la diferencia del potencial electrostático y la densidad electrónica en la **figura 16** entre los derivados FM42 y FM24. (López, Ensuncho, and Robles 2013)

También se puede apreciar como la ausencia del metilo en el carbono C6 en el segmento tetrahydroquinolinico del compuesto FM42, genera un aumento de las regiones con potencial positivo proporcionándole a la molécula mayor capacidad de recibir ataques nucleofílicos, lo que permite generar la hipótesis de la existencia de un incremento de las interacciones entre las hebras de ADN con el híbrido mencionado, y por consiguiente mejora el efecto citotóxico en las células HeLa en comparación con FM24. (López, Ensuncho, and Robles 2013)

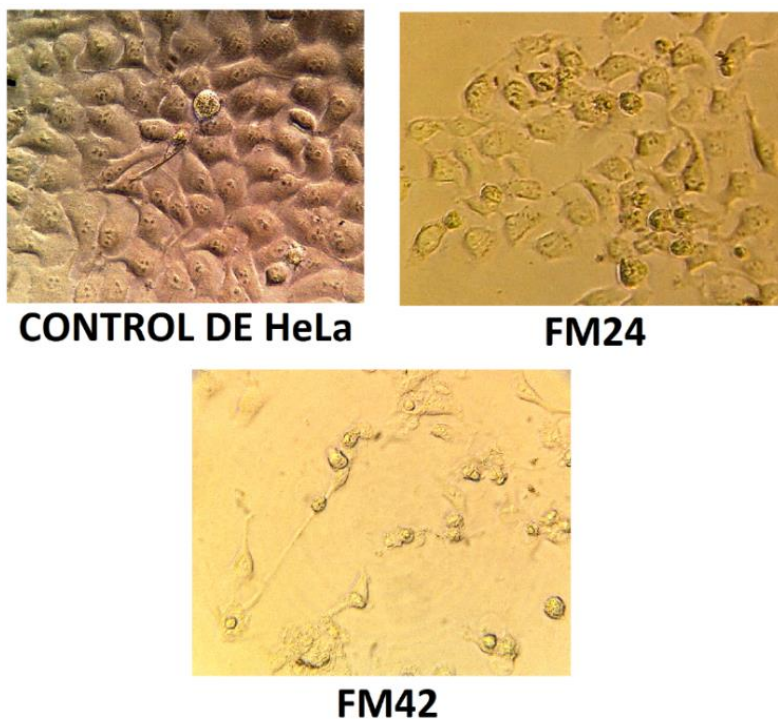
**Figura 16.** Densidad electrónica de las moléculas a) FM24 y b) FM42 La densidad electrónica de los derivados FM24 y FM42 fue determinada con el programa ACD/ChemSketch 11.02.



La diferencia en la actividad citotóxica de los dos compuestos, también se evidencia en la **figura 17**, en la cual se muestran los cambios morfológicos de ambos derivados a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , evidenciando la disminución de la cantidad de células con respecto al tiempo de tratamiento, como también, la deformación de las membranas celulares y la pérdida de la diferenciación de los

componentes celulares, siendo más representativo en el derivado FM42 que en el FM24.

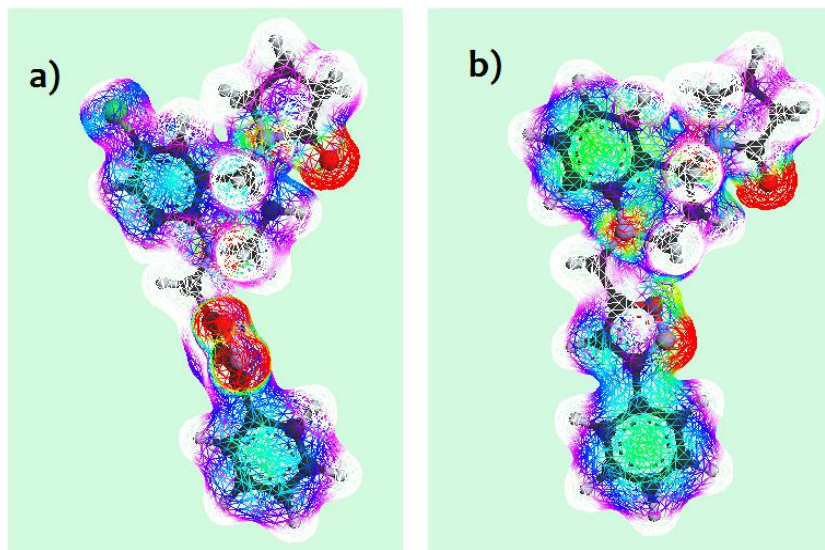
**Figura 17.** Cambios en la morfología de las células HeLa con los derivados FM24 y FM42. Micrografías de comparación de las células HeLa en presencia de los compuestos FM24 y FM42 a 100 $\mu$ M con respecto al control durante la prueba de MTT, tomadas en un microscopio invertido a un objetivo de 40x.



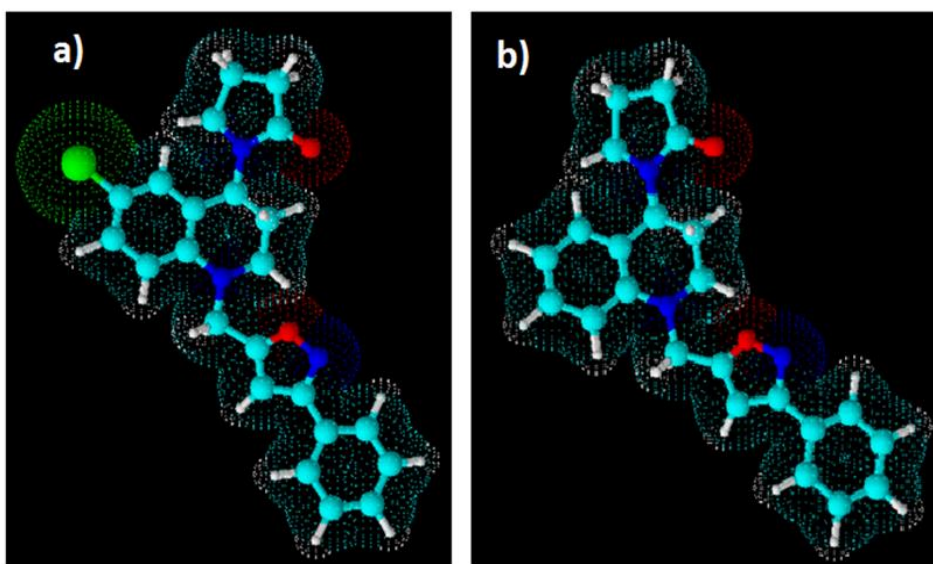
Siguiendo con el mismo método de comparación planteado anteriormente, los compuestos FM50 y FM53, coinciden en tener un grupo benceno unido al isoxazol, pero para el primer caso, el segmento de la tetrahydroquinolina, tiene un sustituyente cloro y el segundo un hidrogeno, como se ha visto el sustituyente aceptor de electrones en la molécula disminuye el efecto citotóxico, sin embargo, la diferencia del CC<sub>50</sub> es muy leve, lo que nos permite estimar que el efecto citotóxico está influenciado por el isoxazol, pues, aun cuando espacialmente el cloro proporciona un número menor de regiones con potencial positivo en la molécula, es notorio que la falta de grupos dadores de electrones como los metóxilos en el isoxazol genera una disminución considerable del potencial citotóxico, en la **figura 18** se ve el

cambio de potencial electrostático y la densidad electrónica (**figura 19**) de las dos moléculas.

**Figura 18.** Potencial electrostático de los derivados a) FM50 y b) FM53. El potencial electrostático de los derivados FM50 y FM53 fue determinado con el programa Argus Lab.4.01.

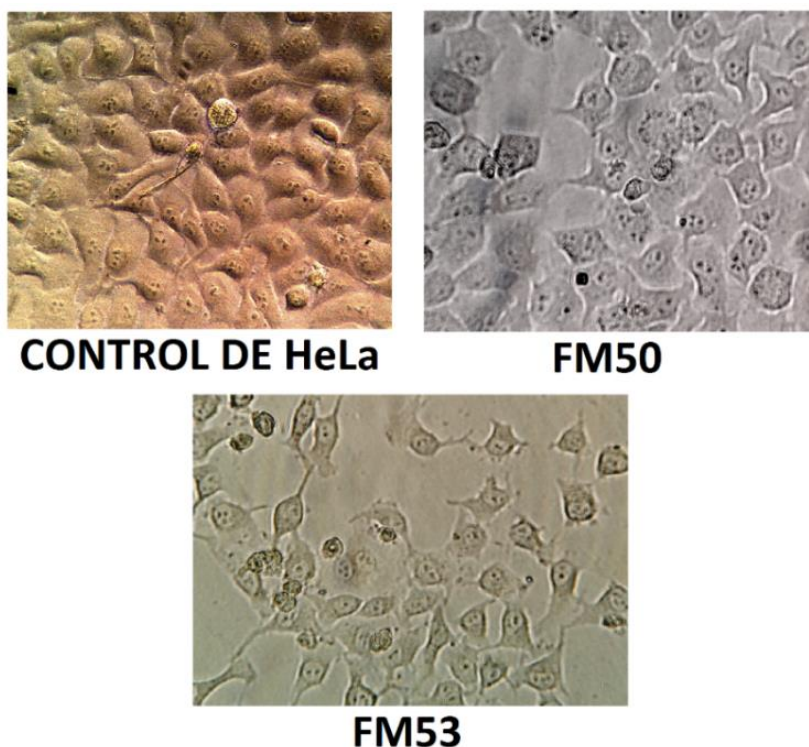


**Figura 19.** Densidad electrónica de las moléculas a) FM50 y b) FM5. La densidad electrónica de los derivados FM50 y FM53 fue determinado con el programa ACD/ChemSketch 11.02.



Así mismo, se observa cambios los morfológicos débiles comparando ambos compuestos, aunque si hay una diferencia relevante en el estado de las células tratadas con respecto a las pertenecientes al control, Observado en la **figura 20**.

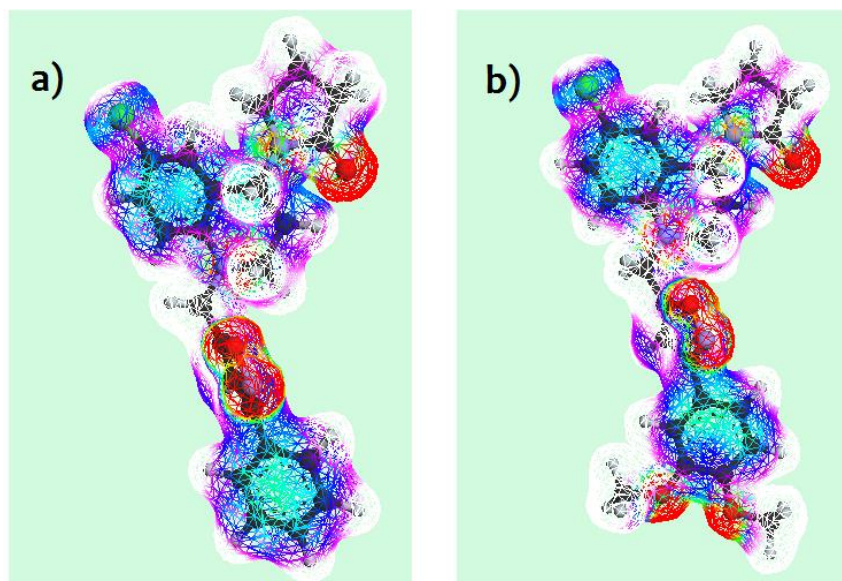
**Figura 20.** Cambios en la morfología de las células HeLa con los derivados FM50y FM53. Micrografías de comparación de las células HeLa en presencia de los compuestos FM50 y FM53 a 100 $\mu$ M con respecto al control durante la prueba de MTT, tomadas en un microscopio invertido a un objetivo de 40x.



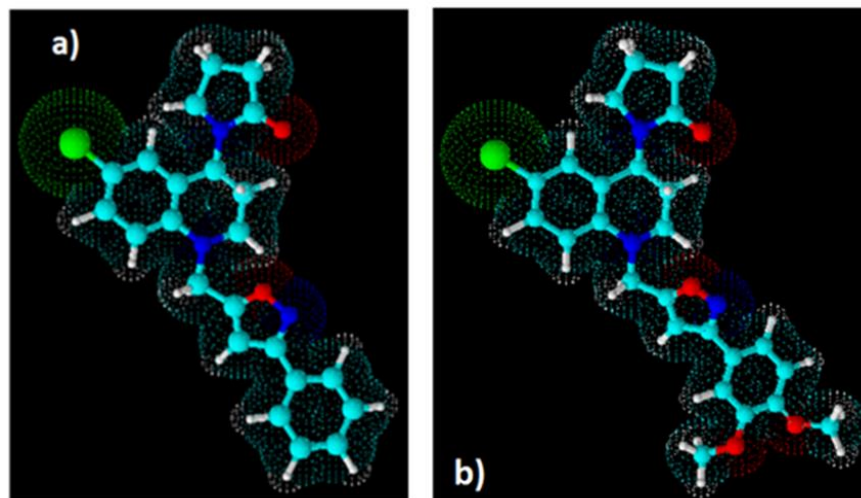
Los compuestos FM50 y FM47, son derivados con el mismo segmento tetrahydroquinolinico, de forma similar a la pareja de híbridos FM42 y FM53. En otras investigaciones se ha referenciado que los arilos sin sustituyentes proporcionan menor actividad anticancerígena en comparación con los halógenos como el cloro. (Prabhu et al. 2012; Parthiban et al. 2011; Kuo, Wu, and Kuo 2006; Kovács et al. 2012) Como se ha visto en los resultados, el grupo arilo tiene mejor citotoxicidad sin sustituyente que en presencia de un átomo de cloro de manera contraria a otros autores. Sin embargo cada pareja entre si difieren en el valor de CC50, esto se debe a que la funcionalización del isoxazol genera un cambio en la capacidad anticáncer dependiendo del número de sustituyentes de este grupo (metóxilo).

En cuanto a los sustituyentes en el arilo del isoxazol, se ha visto que el aumento de grupos metóxilos es un factor que se relaciona directamente con la actividad citotóxica en contrario a otras investigaciones, (Kovács et al. 2012; Hatae et al. 2015) ya que el grupo metóxilo al ser atrayente de electrones tiende a desplazar la densidad electrónica hacia su centro electronegativo que es el oxígeno, lo que produce el incremento de regiones potencialmente positivas que pueden ser claves en la interacción del híbrido con la célula, así que a medida que aumentan los sustituyentes mayor es el efecto citotóxico. (López, Ensuncho, and Robles 2013) En la **figura 21** se ve como el desplazamiento del potencial electrostático favorece la actividad de los dos grupos metóxilos (FM50) sobre el arilo sin sustituyentes (FM47) y en la **figura 22** la densidad electrónica y en la **figura 23** se muestran los cambios morfológicos de estos compuestos.

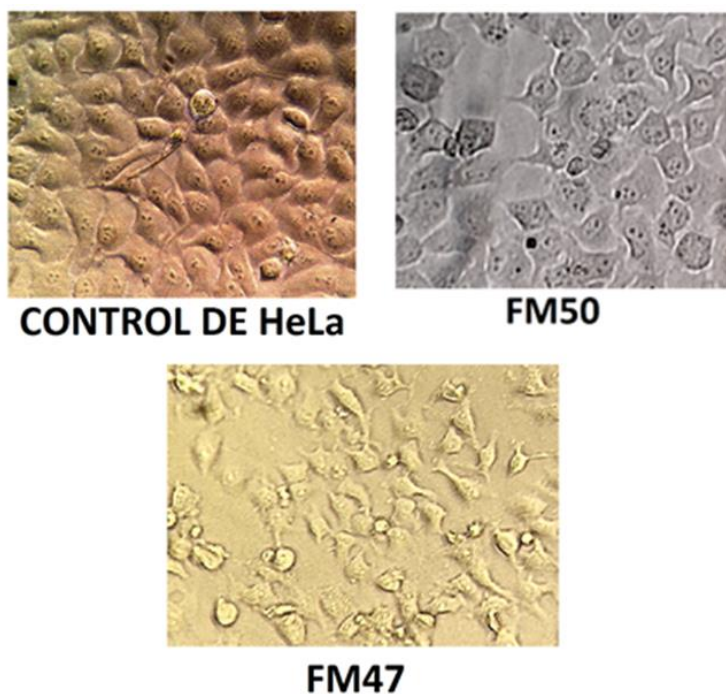
**Figura 21.** Potencial electrostático de los derivados a) FM50 y b) FM47. El potencial electrostático de los derivados FM50 y FM47 fue determinado con el programa Argus Lab.4.01.



**Figura 22.** Densidad electrónica de las moléculas a) FM50 y b) FM47. La densidad electrónica de los derivados FM50 y FM47 fue determinado con el programa ACD/ChemSketch 11.02.



**Figura 23.** Cambios en la morfología de las células HeLa con los derivados FM50 y FM47. Micrografías de comparación de las células HeLa en presencia de los compuestos FM50 y FM47 a  $100\mu\text{M}$  con respecto al control durante la prueba de MTT, tomadas en un microscopio invertido a un objetivo de 40x.

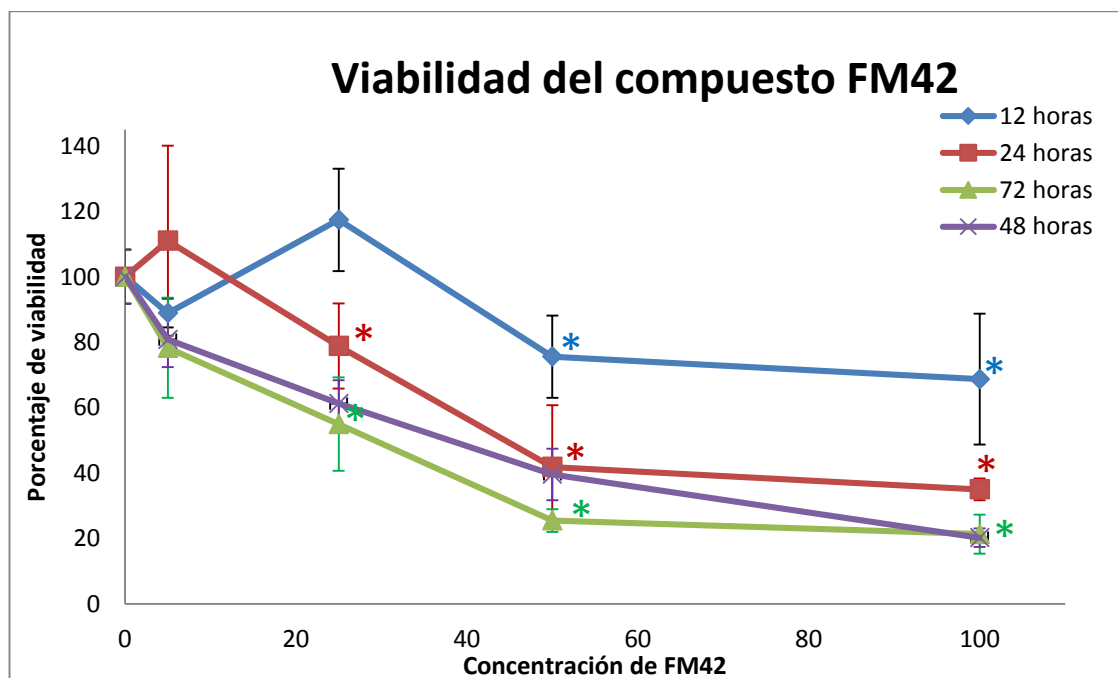


Con base en los resultados presentados se eligió el compuesto con el menor valor de  $CC_{50}$ , ya que este es el híbrido con mejor actividad anticancerígena.

### 5.1.1.1 Efectos citotóxico del híbrido FM42.

Se complementaron los datos de viabilidad para el compuesto FM42, con la realización del ensayo a 12 y 72 horas de tratamiento, en el **figura 24**, se evidencia una clara disminución de cantidad porcentual de células metabólicamente viables con respecto al control. Los asteriscos en el grafico representan los valores que tienen diferencias significativas con respecto al control según lo establecido en la prueba de Tukey.

**Figura 24.** Prueba de reducción con MTT a diferentes tiempos con el híbrido FM42. La determinación de la viabilidad con la prueba de MTT se midió a 580nm después de 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento, empleando 5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de FM42, la prueba se realizó por triplicata con duplicado. El porcentaje de viabilidad fue calculado con respecto al control.



En la **Figura 24** también se observa como a medida que el tiempo aumenta el porcentaje de viabilidad se hace menor en las concentraciones más altas y a su vez, el valor  $CC_{50}$  decrece paulatinamente tal como se muestra en la **tabla 3**, varias de estas concentraciones son estadísticamente significativas y están señaladas con un asterisco en la **figura 24**. Lo anterior demuestra que el efecto citotóxico está ligado a la duración del tratamiento, además permite ver que el mejor  $CC_{50}$  es 37,97  $\mu\text{M}$ , que en comparación con la doxorubicina y el cisplatino con  $CC_{50}$  de 21 y 28,42  $\mu\text{M}$  (Prabhu et al. 2012; Palanisamy et al. 2013) respectivamente, el derivado FM42 posee buena actividad citotóxica sobre las células HeLa.

**Tabla 3.** Valores de  $CC_{50}$  de FM42 con respecto al tiempo

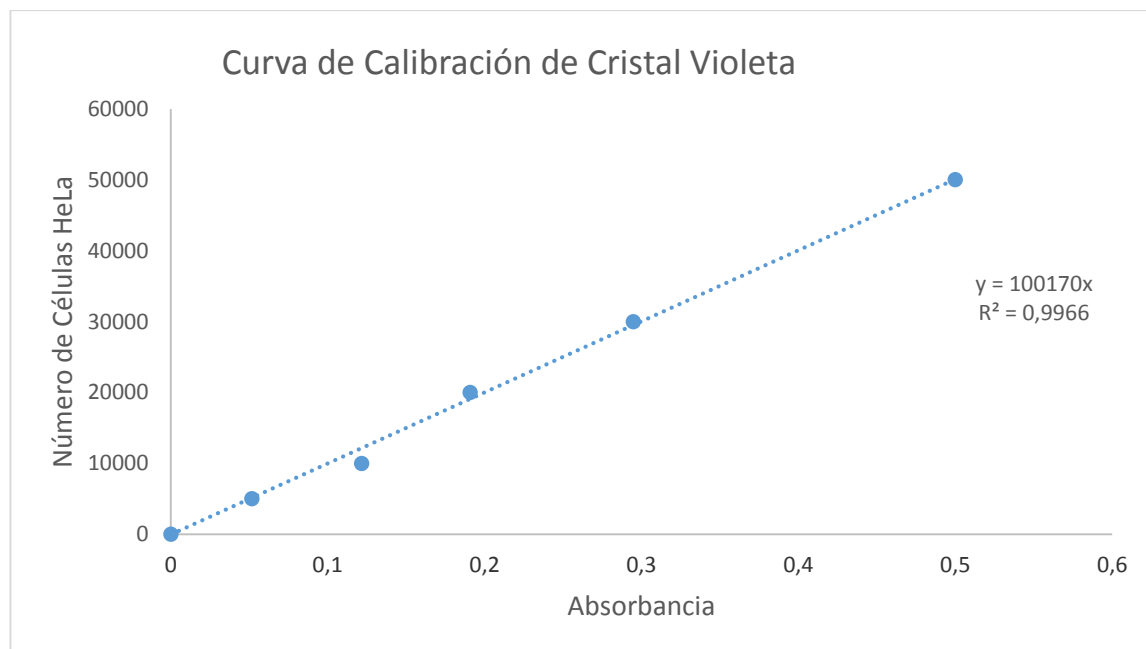
Tiempo de tratamiento (horas)	$CC_{50}$ $\mu\text{M}$
12	197,24
24	44,39
48	37,97
72	29,15

### 5.1.2 Prueba con cristal violeta.

Mediante la realización de este ensayo se busca determinar un efecto anti-proliferativo de los compuestos en las células adheridas a la superficie de cultivo, empleando cristal violeta, un tinte que se introduce en las membrana celular de células viables. Se plaqueo inicialmente con 5000 células por pozo en concentraciones de 5 y 25  $\mu\text{M}$  del compuesto FM42 con 48 horas de tratamiento, donde se determina el número de células con respecto al control en función de una curva de calibración. (Ballester 2006)

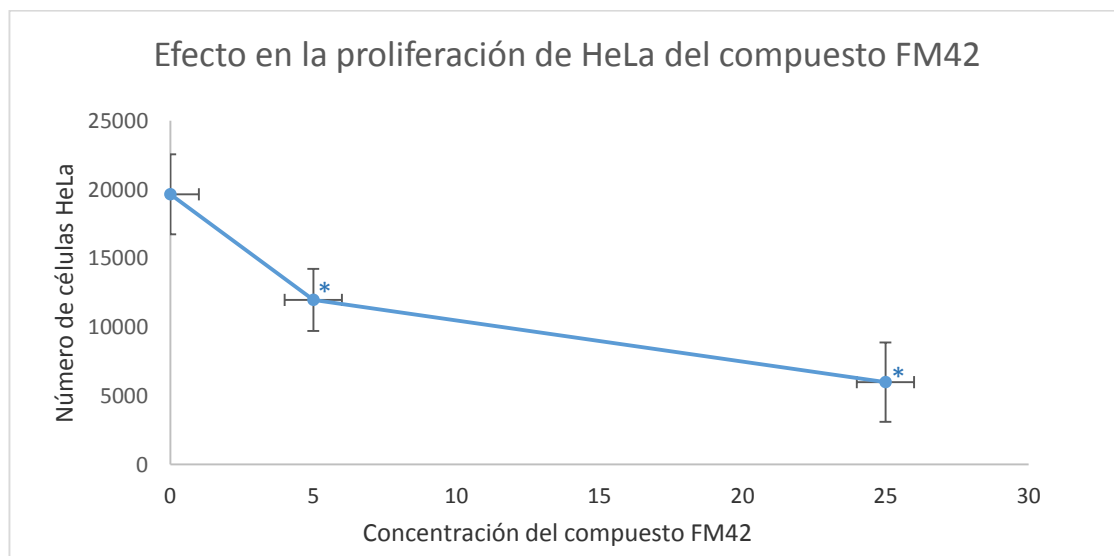
Al igual que en la reducción con MTT, el ensayo se hizo por triplicado y se le aplicó ANOVA seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey para determinarlas diferencias estadísticamente significativas. A continuación en la **figura 25** se muestra la curva de calibración con cristal violeta la cual se empleó para cuantificar el número de células viables que se tiñeron al final del ensayo de proliferación.

**Figura 25.** Curva de calibración de cristal violeta. La curva se midió a 550 nm después de 12 horas de plaqueo empleando cinco diferentes cantidades de células (5000, 10000, 20000, 30000 y 50000 células por pozo).



Con relación al efecto antiproliferativo del derivado FM42, se encontró que para un tiempo de tratamiento de 48 horas, este compuesto tiene una actividad antiproliferativa marcada pues la disminución de células con respecto al control para 5 y 25  $\mu\text{M}$  es de 39,1 y 69, 5% respectivamente, tal como se puede apreciar en la **figura 26**.

**Figura 26.** Efecto antiproliferativo del compuesto FM42. La determinación de la proliferación con la prueba de cristal violeta se midió a 550nm después de 48 horas de tratamiento, empleando 5 y 25  $\mu\text{M}$  de FM42, la prueba se realizó por triplicata con duplicado. El número de células fue calculado a partir de la curva de calibración y los valores de absorbancia obtenidos.



La inhibición del crecimiento celular del FM42 sobre las células HeLa, puede estar muy influenciada con el desplazamiento de la densidad electrónica, que posiblemente tenga un papel importante en el efecto antiproliferativo al igual que la dosificación del compuesto, basándose en la hipótesis de que un daño en el ADN implicaría la activación de la proteína supresora p53 que llevaría a la apoptosis. (Boticario Boticario and Cascales Angosto 2011; López, Ensuncho, and Robles 2013; Palanisamy et al. 2013) A nivel clínico esto es importante, ya que ayudaría al control del crecimiento y expansión del cáncer, manteniendo la enfermedad en el mismo estadio.

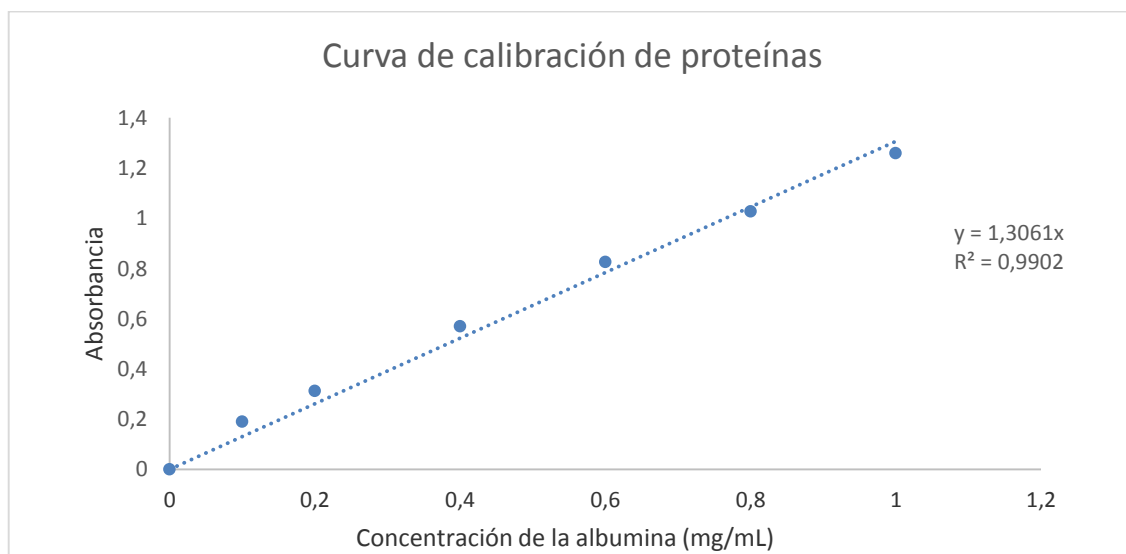
## 5.2. LIBERACIÓN DE CITOCROMO C

Este ensayo es empleado para la cuantificación del citocromo c liberado con el fin de comprobar si el efecto citotóxico del derivado FM42 sobre las células HeLa es producto de la inducción de apoptosis, para ello se trataron las células durante 12

horas con una concentración de compuesto de 25  $\mu\text{M}$ , complementando los datos con análisis morfológico. (Appaix et al. 2000).

Para cuantificar el citocromo C es necesario establecer una relación con la cantidad de proteína total, por medio de una curva calibración realizado con el método de Bradford. (Bradford 1976) En el **figura 27** se muestra la curva de calibración para cuantificación de proteínas y en la **tabla 4** se dan las cantidades de proteínas totales.

**Figura 27.** Curva para cuantificación de proteínas con el método de Bradford. La curva de calibración de proteínas se realizó empleado el reactivo de Bradford y una secuencia de patrones con albumina a concentraciones de 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mg/mL y se midió a 595nm.

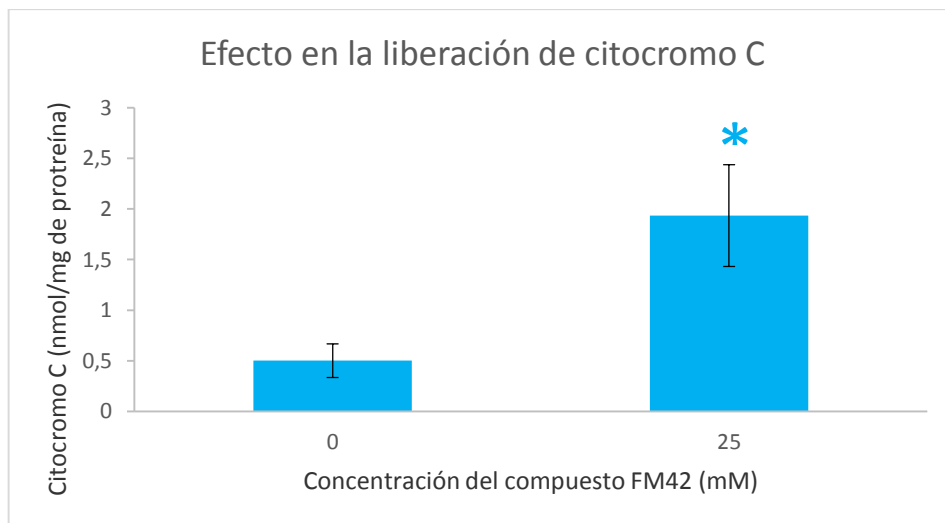


**Tabla 4.** Cantidad de proteína (albumina) cuantificada.

Compuesto	Concentración de proteína (mg/mL)
Control	0,0996
Tratamiento	0,0614

Con este método se pudo evidenciar la liberación de citocromo C tanto en los controles como en las células tratadas, pero como se muestra en la **figura 28**, la concentración de citocromo C cuantificado es mayor del doble en las células con FM42 que en el control, lo que implica un efecto del derivado sobre el aumento de esta proteína mitocondrial.

**Figura 28.** Efecto del compuesto sobre la liberación de citocromo C en células HeLa. La liberación de citocromo c se midió a 414 nm después de 12 horas de tratamiento, utilizando 25  $\mu$ M de FM42. Las condiciones experimentales se describen en la metodología. Los valores se calcularon de acuerdo  $\epsilon$  100 mmol 1.L.cm<sup>-1</sup> citocromo c a 414 nm. Los resultados se expresan como nmol de citocromo c liberado en comparación con el control

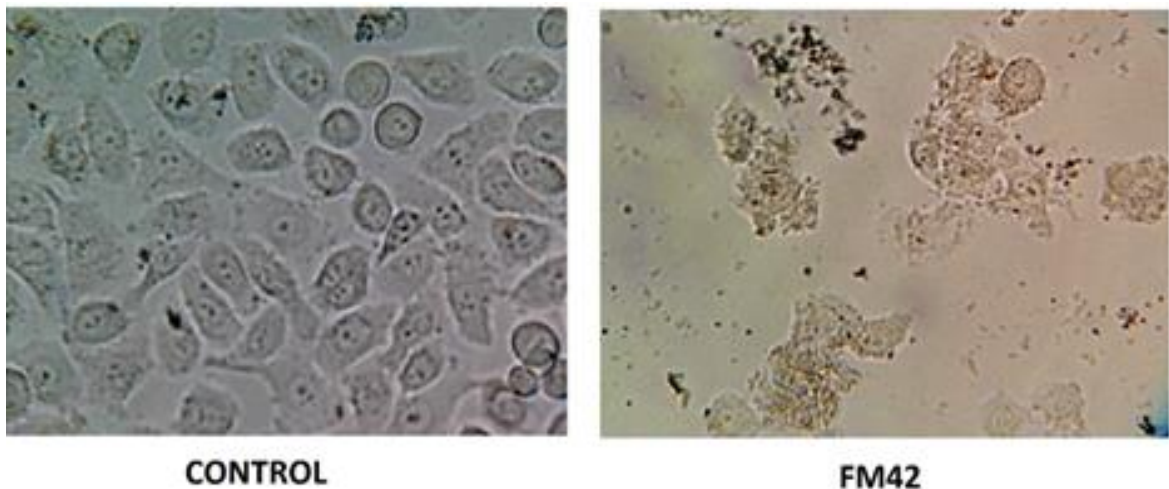


Al aumentarse los niveles de citocromo C liberado, se estimula la inducción de apoptosis al activar Apaf 1, lo que genera una reacción en cascada de las caspasas ayudando a disminuir la viabilidad y proliferación celular del carcinoma epitelial HeLa.

Además de la liberación del citocromo también se presentaron varios cambios morfológicos que se pueden apreciar en la **figura 29**, donde se observa el cambio en la membrana de las células de cada uno de los experimentos con respecto al control, además de la formación de cuerpos en forma de protuberancias en la célula

y una pérdida de la diferenciación de los principales orgánulos celulares, como lo es el núcleo celular.

**Figura 29.** Cambios morfológicos de las células HeLa durante la liberación de citocromo C. Las micrografías de comparación de las células HeLa en presencia de FM42 con respecto al control durante la prueba de liberación de citocromo C, tomadas en un microscopio invertido a un objetivo de 40x.



Este aumento de citocromo C permitió determinar que el mecanismo de muerte celular es por apoptosis ya que está caracterizada por la liberación de esta proteína. Además de la presencia de cuerpos apoptóticos que son el resultado de la fase degradativa de la apoptosis. (Boticario Boticario and Cascales Angosto 2011; Pazo Cid et al. 2013)

La muerte programada está constituida por dos vías intrínseca y extrínseca y dado que la activación de tBid puede provocar la progresión de la vía intrínseca, la cuantificación del citocromo C no es suficiente para determinar la vía de apoptosis que estimula el híbrido FM42. Sin embargo, es posible estimar como hipótesis que la ruta activada por el derivado es la intrínseca ya que una de las propiedades que le otorgan la actividad cancerígena es que presenta una gran cantidad de sitios con potencial positivo, lo cual estimula la interacción con la célula (ADN) y esto puede conducir al daño del ADN, lo que produce una respuesta apoptótica y la posterior activación dicha ruta apoptótica. (Boticario Boticario and Cascales Angosto 2011; Pazo Cid et al. 2013; López, Ensuncho, and Robles 2013)

## 6. CONCLUSIONES

Los híbridos de tetrahydroquinolinas e isoxazoles tienen una potencial actividad anticancerígena que ha sido comprobada en esta investigación puesto que de los 16 derivados que constituyen la serie, seis poseen un efecto citotóxico significativo.

Se puede concluir que el compuesto híbrido FM42, presenta un efecto citotóxico significativo (CC50 44,33  $\mu$ M a 24 horas de exposición), lo cual refleja que esta sustancia tiene un alto potencial para ser considerado una posible nueva alternativa de tratamiento contra el cáncer de cuello uterino.

En el ensayo de citocromo C, se comprobó que el mecanismo de acción de la actividad anticancerígena es la apoptosis, dado que las células en presencia de FM42 aumentó significativamente la liberación de esta proteína con respecto al control.

## 7. RECOMENDACIONES

Es importante continuar los estudios de actividad anticancerígena, especialmente del derivado FM42 como alternativa de tratamiento, por ello es necesario generar una comparación de la actividad de los compuestos, con una línea celular normal y específicamente células de cuello uterino.

Además de los cambios morfológicos mostrados durante la experiencia, es adecuado complementar las imágenes obtenidas con ensayos de tinción que permitan apreciar de una manera más clara cada cambio de la línea celular HeLa en comparación con la línea celular uterina normal.

En relación con la prueba de liberación de citocromo C es recomendable disminuir el tiempo de tratamiento para determinar de manera temprana la liberación de esta proteína y establecer con mayor precisión la vía de apoptosis empleada por el compuesto FM42.

A parte de los sustituyentes en los anillos aromáticos de estos híbridos estudiados, también es importante investigar otros grupos que le aporten un poder anticancerígeno a la molécula, como un ejemplo de ello, podrían usarse otros halógenos (Br y F) o grupos más voluminosos como el isopropilo o los etóxilo.

Durante la investigación, se vio claramente la necesidad de complementar el ensayo de citocromo C con otras pruebas, como la determinación de otras proteínas, especialmente las caspasas 8, 9 y 10 para diferenciar cuál de las rutas de la apoptosis es la activada por el compuesto derivado de tetrahydroquinolina e isoxazol (FM42).

Para comprobar la hipótesis planteada durante la experiencia es importante realizar una prueba tipo cometa en la que se confirme la presencia de daño en el ADN realizado por el derivado al entrar a la célula HeLa.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abad, Albert, José Luis Manzano, Beatriz Cirauqui, and Eva Martínez-Balibrea. 2003. "Biología Molecular Del Cáncer Colorrectal." *Cirugía Española* 73 (1). Elsevier: 9–17. doi:10.1016/S0009-739X(03)72083-1.
- Alameda González, César, and Antonio de Lorenzo-Cáceres Ascanio. 2008. "Vacuna Contra El Papilomavirus Humano: Actitud Ante Una Consulta Sobre Una Novedad Terapéutica." *Atención Primaria* 40 (4). Elsevier: 205–8. doi:10.1157/13118064.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2010. *Biología Molecular de La Célula*. Edited by Mercè Durfort i Coll and Miquel Llobera i Sande. Quinta Ed. Barcelona, España: Ediciones Omega S.A.
- Almonte, Maribel, Raúl Murillo, Gloria Inés Sánchez, José Jerónimo, and Jorge Salmerón. 2010. "Nuevos Paradigmas Y Desafíos En La Prevención Y Control Del Cáncer de Cuello Uterino En América Latina." *Salud Pública de México*. 52 (6): 1–16.
- Alqasoumi, Saleh I., Areej M. Al-Taweel, Ahmed M. Alafeefy, Mostafa M. Ghorab, and Eman Noaman. 2010. "Discovering Some Novel Tetrahydroquinoline Derivatives Bearing the Biologically Active Sulfonamide Moiety as a New Class of Antitumor Agents." *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (5). Elsevier Masson SAS: 1849–53. doi:10.1016/j.ejmech.2010.01.022.
- Al-Said, Mansour S, Mostafa M Ghorab, Saleh I Al-Qasoumi, Ebaa M El-Hossary, and Eman Noaman. 2010. "Synthesis and in Vitro Anticancer Screening of Some Novel 4-[2-Amino-3-Cyano-4-Substituted-5,6,7,8-Tetrahydroquinolin-1-(4H)-Yl]benzenesulfonamides." *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (7). Elsevier Masson SAS: 3011–18. doi:10.1016/j.ejmech.2010.03.030.
- Amaro, F., O. Cardoso, N. Mejías, D. Ávila, C. Sifonte, L. Osorio, and I. Varcasia. 2004. "Comportamiento de Algunos Factores de Riesgo Asociados a La Aparición de Lesiones Precancerosas de Cérvix." *Progresos de Obstetricia Y Ginecología* 47 (7). Elsevier: 317–22. doi:10.1016/S0304-5013(04)76012-4.
- Appaix, F, M Minatchy, C Riva-Lavieille, J Olivares, B Antonsson, and V a Saks. 2000. "Rapid Spectrophotometric Method for Quantitation of Cytochrome c Release from Isolated Mitochondria or Permeabilized Cells Revisited." *Biochimica et Biophysica Acta* 1457 (3): 175–81.
- Ballester, Isabel. 2006. *Relación Estructura-Actividad de Los Flavonoides Como Agentes Antiinflamatorios Intestinales*.

- Bejjanki, Naveen Kumar, Akkaladevi Venkatesham, Jyothi Madda, Nagaiah Kommu, Sujitha Pombala, C. Ganesh Kumar, Kothakonda Rajendra Prasad, and Jagadeesh Babu Nanubolu. 2013. "Synthesis of New Chromeno-Annulated Cis-Fused pyrano[4,3-C]isoxazole Derivatives via Intramolecular Nitrene Cycloaddition and Their Cytotoxicity Evaluation." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 23 (14). Elsevier Ltd: 4061–66. doi:10.1016/j.bmcl.2013.05.060.
- Bordón Rodríguez, Elisa, Marta Lloret Sáez-Bravo, Beatriz Pinar Sedeño, Agustín Rey, and Pedro C Lara Jiménez. 2007. "Apoptosis Y Proteínas Reguladoras En Cáncer de Cérnix Uterino Elisa." *BioCancer Research Journal*, no. 1cic.
- Borràs, J. M ;, and X. Iglesias. 1994. "Cribado Del Cáncer de Cuello de Útero." *Medicina Clínica* 102 (1): 80–84.
- Boticario Boticario, Consuelo, and María Cascales Angosto. 2011. *Innovaciones En Cáncer*. Edited by Bravo Murillo. Cuarta Edi. Madrid, España.: Universidad Nacional Educación a Distancia.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72: 248–54. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bravo M, María Eugenia, Octvio Peralta M, Paulina Neira V, and Laura Itriago G. 2013. "Prevención Y Seguimiento Del Cáncer de Mama, Según Categorización de Factores de Riesgo Y Nivel de Atención." *Revista Médica Clínica Las Condes* 24 (4): 578–87. doi:10.1016/S0716-8640(13)70198-6.
- Burgués Gasión, J. P., J. L. Pontones Moreno, C. D. Vera Donoso, J. F. Jiménez Cruz, and M. Ozonas Moragues. 2005. "Mecanismos Del Ciclo Celular Y La Apoptosis Implicados En Las Resistencias a Los Fármacos de Uso Intravesical En El Cáncer Superficial de Vejiga." *Actas Urológicas Españolas* 29 (9). Elsevier: 846–59. doi:10.4321/S0210-48062005000900007.
- Camargo Bohórquez, Ma. Constanza Wiesner Ceballos, Carolina, Martha Cecilia Díaz Cuspoca, and Sandra Lourdes Tovar Murillo. 2004. *El Cáncer. Aspectos Básicos Sobre Su Biología, Clínica, Prevención, Diagnóstico Y Tratamiento*. Edited by María Clara Ucrós Escallón. Ministerio de La Protección Social Instituto Nacional de Cancerología E.S.E. Primera ed. Ministerio de la Protección Social Instituto Nacional de Cancerología E.S.E.
- Cano González, M<sup>a</sup> Antonia, Ángela Díaz Barroso, Esther Fernández Fernández, Carmen García García, Eulalia Gutiérrez García, and Azucena Menéndez Suárez. 2009. *Quimioterapia. Guía Para Pacientes*. Edited by SESPA. Gráficas C. Asturias, España.: Servicio de salud del principado de Asturias.
- Concha R, Marcela. 2007. "Diagnóstico Y Terapia Del Virus Papiloma Humano." *Revista Chilena de Infectología* 24 (3): 209–14.

- Da Silva, Andréia Maria, Gislayne Christianne Xavier Peixoto, José Artur Brillhante Bezerra, Thiberio De Souza Castelo, Erika Aparecida Araújo Santos, and Alexandre Rodrigues Silva. 2014. "Relações Entre a Câmara de Neubauer a Espectrofotometria Utilizadas Para a Determinação Da Concentração Espermática de Catetos ( Pecari Tajacu )." *Ciência Rural, Santa Maria*. 44 (8): 1494–99.
- Diana, Patrizia, Anna Carbone, Paola Barraja, Gerhard Kelter, Heinz Herbert Fiebig, and Girolamo Cirrincione. 2010. "Synthesis and Antitumor Activity of 2,5-bis(3-Indolyl)-Furans and 3,5-bis(3-Indolyl)-Isoxazoles, Nortopsentin Analogues." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 18 (12). Elsevier Ltd: 4524–29. doi:10.1016/j.bmc.2010.04.061.
- Díaz Portillo, J, M.T. Fernández del Barrrio, and F. Parede Salido. 1997. *Aspectos Básicos de Bioquímica Clínica*. Edited by S.A FER, S.A Edigrafos, and S.L Rústica-Hilo. Primera Ed. Madrid, España.: Díaz de Santos, S.A.
- Diestro Tejeda, M. D., M. Serrano Velasco, and F. Gómez-Pastrana Nieto. 2007. "Cáncer de Cuello Uterino: Estado Actual de Las Vacunas Frente Al Virus Del Papiloma Humano (VPH)." *Oncología (Barcelona)* 30 (2): 42–59. doi:10.4321/S0378-48352007000200002.
- Dueñas, Alfonso, Aida Mota, Carlos López-Graniel, Gilberto Solorza, Aarón González, Luz María Hinojosa, Alejandra Sánchez-Navarro, Jaime De la Garza, and Alejandro Mohar B. 2000. "Quimioterapia Neoadyuvante En Pacientes Con Carcinoma Epidermoide de Cérvix Estadio IB2 Y IIA . Resultados Preliminares de Un Estudio Aleatorizado." *Revista Del Instituto Nacional de Cancerología*. 46 (1): 21–27.
- Escobar M, Linamaría, and Fabio a. Aristizábal G. 2010. "Aplicación de Un Método Fluorométrico Para Evaluar La Proliferación Celular En Líneas Celulares Tumorales." *Vitae* 17 (2): 173–80.
- Faidallah, Hassan M., and Sherif a F Rostom. 2013. "Synthesis, in Vitro Antitumor Evaluation and DNA-Binding Study of Novel Tetrahydroquinolines and Some Derived Tricyclic and Tetracyclic Ring Systems." *European Journal of Medicinal Chemistry* 63. Elsevier Masson SAS: 133–43. doi:10.1016/j.ejmech.2013.02.006.
- Faidallah, Hassan M., Alaa A. Saqer, Khalid A. Alamry, Khalid A. Khan, and Abdullah M. Asiri. 2013. "Synthesis and Biological Evaluation of Some Novel Tetrahydroquinolines as Anticancer and Antimicrobial Agents." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 1 (12): 12. doi:10.1002/ardp.201000188.
- Farm, Facultat D E, and C I a Departament D E Fisiologia. 2009. "Facultat de Farmàcia Departament de Fisiologia (farmàcia)." *Molecular Nutrition & Food Research*.
- Ferlay, J, I Soerjomataram, M Ervik, R Dikshit, S Eser, C Mathers, M Rebelo, DM Parkin, D Forman, and F Bray. 2013. "GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]." *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer*.

- Ferlay, J, I I Soerjomataram, R Dikshit, S Eser, C Mathers, M Rebelo, D M Parkin, D Forman, and F Bray. 2014. "Cancer Incidence and Mortality Worldwide : Sources , Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012." *International Journal of Cancer* 136 (5): 76. doi:10.1002/ijc.29210.
- Fernández, B. Castelo, a. Redondo Sánchez, C. Gómez Raposo, and P. Cruz Castellanos. 2013. "Cáncer de Cérvix Y Endometrio." *Medicine (Spain)* 11 (27). Elsevier: 1649–58. doi:10.1016/S0304-5412(13)70519-5.
- Fidalgo, J. Alejandro Pérez, Ana Hernández Machancoses, Víctor Martín González, and Andrés Cervantes. 2011. "Treatment of Cervical Cancer: The Importance of a Multidisciplinary Team Approach." *Clinical and Translational Oncology* 13 (7): 431–33. doi:10.1007/s12094-011-0678-x.
- Garay Baquero, Diana Jazmín. 2010. "EFECTO DEL SISTEMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO DIANA." Universidad Nacional De Colombia.
- Garcia, E., J. M. Bosch, A. Covisa, and D. Atero. 2008. *Guía Clínica de La Patología Cervical*.
- Ghorab, Mostafa M., Fatma a. Ragab, and Mostafa M. Hamed. 2009. "Design, Synthesis and Anticancer Evaluation of Novel Tetrahydroquinoline Derivatives Containing Sulfonamide Moiety." *European Journal of Medicinal Chemistry* 44 (10). Elsevier Masson SAS: 4211–17. doi:10.1016/j.ejmech.2009.05.017.
- Gil-Loyzaga, Pablo E. 2011. *Cultivo de Células Animales Y Humanas. Aplicaciones En Medicina Regenerativa*. Edited by Marian González. Primera ed. Madrid, España.: Vision Libros.
- Green, J, J Kirwan, J Tierney, C Vale, P Symonds, L Fresco, C Williams, and M Collingwood. 2005. "Concomitant Chemotherapy and Radiation Therapy for Cancer of the Uterine Cervix." *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, no. 3: CD002225. doi:10.1002/14651858.CD002225.pub2.
- Gutiérrez, Ignacio Zapardiel, and José Schneider Fontán. 2009. "¿Sabemos Qué Causa El Cáncer de Mama? Influencia Actual de Los Diferentes Factores de Riesgo." *Progresos de Obstetricia Y Ginecología* 52 (10). Elsevier: 595–608. doi:10.1016/S0304-5013(09)72628-7.
- Gutiérrez P, Dolores, Teresa de Jesús Hidalgo V, and Eduardo. Madrigal B. 1995. "Estudio Citológico Y Citoquímico En Cultivo de Células HeLa Tratadas Con Acetato de Plomo." *Revista de Patología Clínica*.
- Hatae, Noriyuki, Erina Fujita, Saori Shigenobu, Sayumi Shimoyama, Yuhsuke Ishihara, Yuhki Kurata, Tominari Choshi, Takashi Nishiyama, Chiaki Okada, and Satoshi Hibino. 2015. "Antiproliferative Activity of O4-Benzo[c]phenanthridine Alkaloids against HCT-116 and HL-60 Tumor Cells."

- Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25 (14). Elsevier Ltd: 2749–52. doi:10.1016/j.bmcl.2015.05.031.
- Hausen, Harald Zur. 2011. “Progreso En La Prevención Del Cáncer Cervicouterino: Informe de Cervical Cancer Action.” [http://www.maternoinfantil.org/archivos/smi\\_D427.pdf](http://www.maternoinfantil.org/archivos/smi_D427.pdf).
- Hervin, John, and Bermúdez Jaimes. 2009. “Cicloaductos de La Reacción Imino Diels-Alder de Tres Componentes (benzaldehídos, Anilinas Y.”
- Jaluria, Pratik, Michael Betenbaugh, Konstantinos Konstantopoulos, and Joseph Shiloach. 2007. “Enhancement of Cell Proliferation in Various Mammalian Cell Lines by Gene Insertion of a Cyclin-Dependent Kinase Homolog.” *BMC Biotechnology* 7: 71. doi:10.1186/1472-6750-7-71.
- Karp, Gerald. 2009. *Biología Celular Y Molecular. Conceptos Y Experimentos*. Edited by Juan Roberto Palacios Martínez, Javier De León Fraga, Camilo Heras, Armando Ruiz Calderón, Norma García Carbajal, and Eleazar Maldonado. Quinta Edi. México D.F, México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A.
- Kaur, Kamalneet, Vinod Kumar, Anil Kumar Sharma, and Girish Kumar Gupta. 2014. “Isoxazoline Containing Natural Products as Anticancer Agents: A Review.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 77 (July 2015): 121–33. doi:10.1016/j.ejmech.2014.02.063.
- Kittler, Ralf, Gabriele Putz, Laurence Pelletier, Ina Poser, Anne-Kristin Heninger, David Drechsel, Steffi Fischer, et al. 2004. “An Endoribonuclease-Prepared siRNA Screen in Human Cells Identifies Genes Essential for Cell Division.” *Nature* 432 (7020): 1036–40. doi:10.1038/nature03159.
- Klug, William S., Michael R. Cummings, and Charlotte A. Spencer. 2006. *Conceptos de Genética*. Edited by Miguel Martín-Romo, Marta Caicoya, José A. Clares, and José A. Hernán. Octava Edi. Madrid, España.: Pearson Education, S.A.
- Kovács, Dóra, Zalán Kádár, Gergő Mótyán, Gyula Schneider, János Wölfling, István Zupkó, and Eva Frank. 2012. “Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Some Novel 17-Isoxazoles in the Estrone Series.” *Steroids* 77 (11): 1075–85. doi:10.1016/j.steroids.2012.05.003.
- Kumar, K Ajay, and P Jayaroopa. 2013. “ISOXAZOLES: MOLECULES WITH POTENTIAL MEDICINAL PROPERTIES.” *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL, CHEMICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES* 3 (2): 294–304.
- Kumbhare, Ravindra M., Umesh B. Kosurkar, M. Janaki Ramaiah, Tulshiram L. Dadmal, S. N C V L Pushpavalli, and Manika Pal-Bhadra. 2012. “Synthesis and Biological Evaluation of Novel Triazoles and Isoxazoles Linked 2-Phenyl Benzothiazole as Potential Anticancer Agents.” *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 22 (17). Elsevier Ltd: 5424–27. doi:10.1016/j.bmcl.2012.07.041.

- Kuo, Chen-Yuan, Ming-Jung Wu, and Yao-Haur Kuo. 2006. "Synthesis and Antitumor Activity of Cis-dichloroplatinum(II) Complexes of 1-(2-Aminophenyl)-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines." *European Journal of Medicinal Chemistry* 41 (8): 940–49. doi:10.1016/j.ejmech.2006.03.011.
- Lagunas-Martínez, a., V. Madrid-Marina, and P. Gariglio. 2010. "Modulation of Apoptosis by Early Human Papillomavirus Proteins in Cervical Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1805 (1). Elsevier B.V.: 6–16. doi:10.1016/j.bbcan.2009.03.005.
- Lamarca Lete, a., R. Molina Villaverde, J.L. López González, and M. Álvarez-Mon Soto. 2013. "Cáncer Colorrectal." *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 11 (25). Elsevier: 1519–25. doi:10.1016/S0304-5412(13)70488-8.
- Lamarca Lete, a., R. Molina Villaverde, F. Navarro Expósito, and M. Álvarez-Mon Soto. 2013. "Cáncer de Estómago." *Medicine (Spain)* 11 (25). Elsevier: 1512–18. doi:10.1016/S0304-5412(13)70487-6.
- Lobo Álvarez, Rosabel. 2012. "Valor de La Radioterapia Postoperatoria En El Cáncer de Cérnix." Madrid, España.: Universidad Complutense De Madrid.
- López, Jesús M., Adolfo E. Ensuncho, and Juana Robles. 2013. "Estudio Teórico de La Reactividad Química Y Biológica de Cisplatino Y Algunos Derivados Con Actividad Anticancerosa." *Informacion Tecnologica* 24 (3): 3–14. doi:10.4067/S0718-07642013000300002.
- López Saavedra, Alejandro, and Marcela Lizano Soberón. 2010. "Cáncer Cérvicouterino Y El Virus Del Papiloma Humano: La Historia Que No Termina." *Cancerología* 1: 1–25.
- Luengo Matos, S, and a Muñoz van den Eynde. 2004. "Uso de La Citología de Cribado de Cérnix Y Factores Relacionados Con El Uso de La Prueba En España." *Atención Primaria* 33 (5). Elsevier: 229–34. doi:10.1157/13059170.
- Marella, Akranth, Om Prakash Tanwar, Rikta Saha, Mohammad Rahmat Ali, Sandeep Srivastava, Mymoona Akhter, Mohammad Shaquiquzzaman, and Mohammad Mumtaz Alam. 2013. "Quinoline: A Versatile Heterocyclic." *King Saud University Saudi Pharmaceutical Journal* 21 (1). King Saud University: 1–12. doi:10.1016/j.jsps.2012.03.002.
- Marsiglia, Hugo. 2001. "Nuevos Abordajes Del Cáncer de Cervix, Localmente Avanzado." *Revista Colombiana de Cancerología* 6 (1): 20–22.
- Martínez Bonilla, CARLOS ANDRÉS. 2012. "Generación De Una Quimioteca De Nuevas 4-Amidil-2-Metil-1,2,3,4- Tetrahydroquinolinas Potencialmente Bioactivas Usando El Concepto De Síntesis Combinatoria En Fase Líquida." Universidad Industrial De Santander.
- Marzo-Castillejo, M., P. Cierco Peguero, and I. del Cura González. 2005. "Prevención Del Cáncer de Cérnix." *Atención Primaria* 36 (6). Elsevier: 328–33. doi:10.1157/13079868.

- Massagué, Joan. 2009. "Evolución Y Metástasis Del Cáncer." *SEBBM* 160: 22–25.
- Menacho-miguel, Antonio, Ana E Jime, and Antonio Miro. 2014. "' Ticos Y Riesgo de ca ´ Ncer de Pulmo ´ N : Un Estudio de Polimorfismos Gene," no. x. doi:10.1016/j.medcli.2013.07.034.
- Meza-junco, Judith, Aldo Montaña-loza, and Álvaro Aguayo-gonzález. 2006. "Bases Moleculares Del Cáncer." *Revista de Investigación Clínica* 58 (1): 56–70.
- Moncada Jiménez, José. 2005. *Estadística Para Ciencias Del Movimiento Humano*. Edited by Juan Carlos Fallas Z. Primera Ed. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Mosmann, T. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2): 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Muñoz, Arturo, Marlene Peticara, Felipe Sojo, Diego R. Merchan Arenas, Josue S. Bello Forero, Alirica Suarez, and Gustavo Benaim. 2012. "Tetrahydroquinolinas : Compuestos de Origen Sintéticos Con Propiedades Antitumorales Sobre Líneas de Cáncer Humano Tetrahydroquinolinas : Compuestos de Origen Sintéticos Con Propiedades Antitumorales Sobre Líneas de Cáncer Humano." *Memorias Del Instituto de Biología Experimental* 6: 77–80.
- Muschel, Ruth J. 2002. "Gene Expression Pro®ling of HeLa Cells in G1 or G2 Phases," 1934–42. doi:10.1038/sj/onc/1205264.
- Noletto, Guilhermina Rodrigues, C. L O Petkowicz, a. L R Mercê, Miguel Daniel Nosedá, Stelia Carolina Méndez-Sánchez, Fany Reicher, and M. B M Oliveira. 2009. "Two Galactomannan Preparations from Seeds from Mimosa Scabrella (bracatinga): Complexation with oxovanadium(IV/V) and Cytotoxicity on HeLa Cells." *Journal of Inorganic Biochemistry* 103 (5). Elsevier Inc.: 749–57. doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.01.018.
- Olivares Rueda, Amparo. 2014. "Disminución de Los Efectos Genotóxicos, Citotóxicos Y Radiosensibilizante de Bisfosfonatos Mediante Antioxidantes: Un Modelo Experimental." Instituto Universitario de Investigación en Envejecimiento. <http://nadir.uc3m.es/alejandro/phd/thesisFinal.pdf>.
- Palanisamy, Pandaram, Samson Jegan Jennieffer, Packianathan Thomas Muthiah, and Sudalaiandi Kumaresan. 2013. "Synthesis, Characterization, Antimicrobial, Anticancer, and Antituberculosis Activity of Some New Pyrazole, Isoxazole, Pyrimidine and Benzodiazepine Derivatives Containing Thiochromeno and Benzothiepino Moieties." *RSC Advances* 3 (42): 19300. doi:10.1039/c3ra42283f.
- Parthiban, Paramasivam, Ramjee Pallela, Se Kwon Kim, Dong Ho Park, and Yeon Tae Jeong. 2011. "Synthesis of Polyfunctionalized Piperidone Oxime Ethers and Their Cytotoxicity on HeLa Cells." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 21 (22). Elsevier Ltd: 6678–86. doi:10.1016/j.bmcl.2011.09.063.

- Pazo Cid, R A, Alejandro Álvarez, A Cebollero de Miguel, M.J Agustín, and L Martínez Lostao. 2013. "Apoptosis, Cáncer & Co." *Revista Internacional de Grupos de Investigación Oncológica*. 1 (1): 23–28.
- Piedra Sánchez, Fernando. 2004. "Evolución En La Terapéutica Hospitalaria Del Cáncer." Universidad Complutense De Madrid Facultad.
- Prabhu, Padmavathi P., T. Panneerselvam, C. S. Shastry, A. Sivakumar, and Sushant S. Pande. 2012. "Synthesis and Anticancer Evaluation of 2-Phenyl Thiaolidinone Substituted 2-Phenyl Benzothiazole-6-Carboxylic Acid Derivatives." *Journal of Saudi Chemical Society*. King Saud University, 6–10. doi:10.1016/j.jscs.2012.02.001.
- Ratnakar Reddy, K., P. Sambasiva Rao, G. Jitender Dev, Y. Poornachandra, C. Ganesh Kumar, P. Shanthan Rao, and B. Narsaiah. 2014. "Synthesis of Novel 1,2,3-Triazole/isoxazole Functionalized 2H-Chromene Derivatives and Their Cytotoxic Activity." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 24 (7). Elsevier Ltd: 1661–63. doi:10.1016/j.bmcl.2014.02.069.
- Redondo Horcajo, a.M., a. Guerra Merino, G. Pinedo Garrido, and R. García Aranda. 2000. "Prevención Del Cáncer de Cérvix. Comparación de La Calidad de La Muestra Según Utilicemos Bastoncillo O Cepillo Cervical." *Atención Primaria* 26 (1). Elsevier: 38–41. doi:10.1016/S0212-6567(00)78604-5.
- Rodríguez, Manuel Rodríguez. 2008. "Virus Del PaPiloma Humano." *Andalucia*.
- Romero Bohórquez, Arnold R., Diego R. Merchan Arenas, and Vladímir V. Ouznetsov. 2007. "Reacción De Imino Diels-Alder De Tres Componentes Con Precursores." *Scientia et Technica Año XIII* 33 (33): 91–95.
- Sanabria Negrín, José G. 2009. "Virus Del Papiloma Humano." *Revista de Ciencias Médicas de Pinar Del Río* 13 (4): 23.
- Sánchez Sánchez, María Eva. 2012. "Infección Del Virus Papiloma Humano Y Cáncer De Cuello Uterino: Distribución De Genotipos En Mujeres Conizadas Por Lesión Escamosa Intraepitelial De Alto Grado (Cin 2-3) Y Análisis De Los Cofactores De Cáncer De Cérvix En Málaga." Universidad De Málaga.
- Schmolling Guinovart, Y., J.J. Barquín Solera, a. Zapata Ingelmo, R. Merino Segovia, B. Rodríguez Martínez, and E. León González. 2002. "Anomalías Citológicas de Cérvix Y Lesiones Precancerosas Subsecuentes En Un Área Sanitaria." *Atención Primaria* 29 (4). Elsevier: 223–29. doi:10.1016/S0212-6567(02)70548-9.
- Serrano, Ro, Cju Pérez, and La Díaz. 2004. "Factores de Riesgo Para Cáncer de Cuello Uterino." *Revista Colombiana de Obstetricia ...* 55 (2): 146–60. [http://fecolsog.org/userfiles/file/revista/Revista\\_Vol55No2\\_Abril\\_Junio\\_2004/v55n2a07.PDF](http://fecolsog.org/userfiles/file/revista/Revista_Vol55No2_Abril_Junio_2004/v55n2a07.PDF)

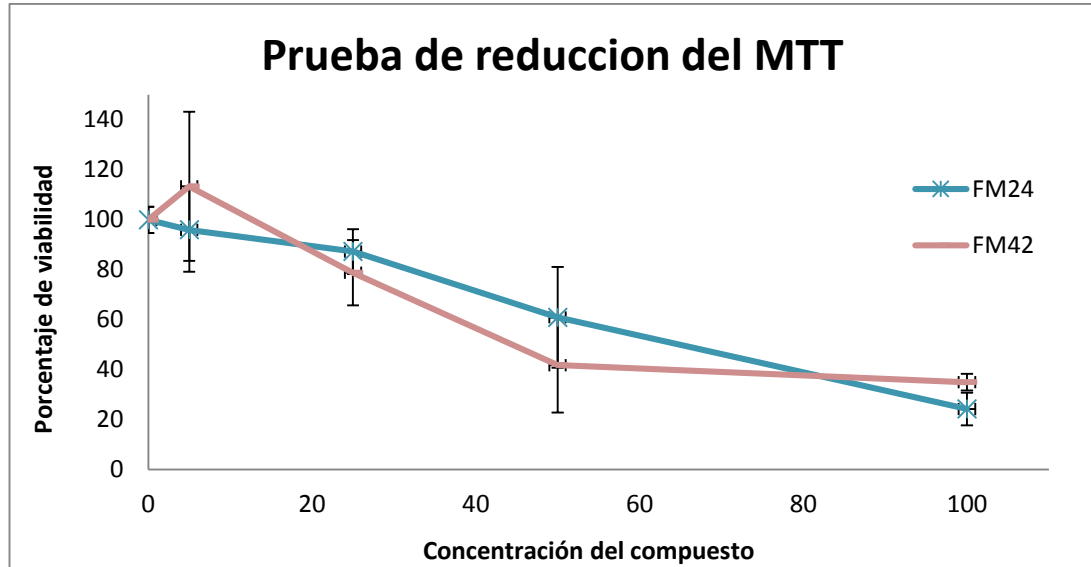
- Shailaja, M, A Manjula, and B Vittal Rao. 2011. "Synthesis of Novel 3, 5-Disubstituted-4,5-Dihydroisoxazoles and 3,4,5- Trisubstituted Isoxazoles and Their Biological Activity." *Indian Journal of Chemistry* 50 (B): 214–22.
- Unchern, Surachai. 1999. "Basic Techniques in Animal Cell Culture." *Drug Delivery*, 1–30.
- Vallmanya Llena, F R, A Laborda Rodríguez, J Lloreta Trull, R Cortadellas Angel, J Placer Santos, and A Gelabert Mas. 2006. "Expresión Inmunohistoquímica de p53, p21, p16 Y Ciclina D1 En El Cáncer de Vejiga Superficial. Estudio En Un Soporte de Tissue Microarray." *Immunohistochemical Expression of p53, p21, p16, and Cyclin D1 in Superficial Bladder Cancer. A Tissue Microarray Study* 30 (8). Elsevier: 754–62. doi:10.4321/S0210-48062006000800003.
- Vázquez Márquez, Angela, JulioCésar González Aguilera, Francisca de la Cruz Chávez, Angel Miguel Almirall Chávez, and Rubilselda Valdés Martínez. n.d. "Factores de Riesgo Del Cáncer de Cérvix Uterino Risk Factors of Cervicouterine Cancer." *Ginecología*.
- Zapardiel Gutiérrez, I., S. Herrero Gámiz, E. Pérez Carbajo, and J. Schneider Fontán. 2009. "Factores Moleculares Pronósticos Relacionados Con El Control Del Ciclo Celular En El Cáncer de Mama. Situación Actual." *Clínica E Investigación En Ginecología Y Obstetricia* 36 (1): 19–24. doi:10.1016/j.gine.2008.09.001.

## ANEXOS

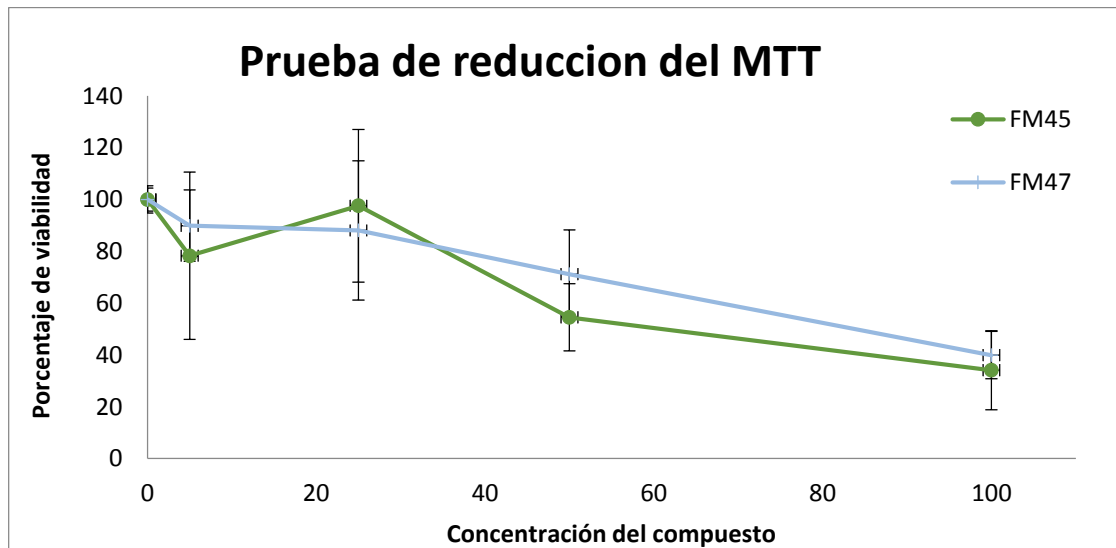
**Anexo A 1.** Nombre UIPAC de los derivados de tetrahydroquinolinas e isoxazoles y la numeración experimental empleada para cada compuesto.

Nombre IUPAC	Peso Molecular	Código	No.
5-((6'-metil-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)isoxazol	477,5g	FM24	A1
5-((6'-cloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)isoxazol	498,0g	FM39	A2
5-((6'-metoxi-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)isoxazol	493,5g	FM40	A3
5-((4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)isoxazol	463,5g	FM42	A4
3-(3,4-dimetoxifenil)-5-((6'-metil-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol	447,6g	FM43	A5
5-((6',8'-dicloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoxazol	468,1g	FM44	A6
3-(4-metoxifenil)-5-((6'-metoxi-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol	433,5g	FM45	A7
5-((8'-cloro-6'-metoxi-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)isoxazol	463,6g	FM46	A8
5-((6'-cloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(3,4-dimetoxifenil)isoxazol	433,3g	FM47	A9
5-((6'-cloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(4-metoxifenil)isoxazol	438,9g	FM48	A10
3-(4-metoxifenil)-5-((6'-metil-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol	418,4g	FM49	A11
5-((6'-cloro-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)-3-(fenil)isoxazol	407,9g	FM50	A12
3-(fenil)-5-((6'-metoxi-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol	403,4g	FM51	A13
3-(4-metoxifenil)-5-((4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol	404,4g	FM52	A14
3-(fenil)-5-((4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol	373,5g	FM53	A15
3-(fenil)-5-((6'-metil-4'-(2''-oxopirrolidin-1''-il)-3',4'-dihidroquinolin-1'(2H)-il)metil)isoxazol	387,5g	FM55	A16

**Anexo A 2.** Porcentaje de viabilidad obtenido de la prueba con MTT en FM24 y FM42



**Anexo A 3.** Porcentaje de viabilidad obtenido de la prueba con MTT en FM45 y FM47



**Anexo A 4.** Porcentaje de viabilidad obtenido de la prueba con MTT en FM50 y FM53

