

DERIVADOS QUINOLÍNICOS: COMPUESTOS SINTÉTICOS CON PROPIEDADES ANTITUMORALES SOBRE LÍNEAS DE CÁNCER HUMANO

MARLENE PERTICARA, FELIPE SOJO, FRANCISCO ARVELO, VLADIMIR KOUZNETSOV.

LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS Y BIOLOGÍA DE TUMORES, INSTITUTO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, CENTRO DE BIOCIENCIAS, ÁREA SALUD FUNDACIÓN INSTITUTO DE ESTUDIOS AVANZADO-IDEA. LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIOMOLECULAR, ESCUELA DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, A.A 678, BUCARAMANGA COLOMBIA.

TRABAJO GANADOR PREMIO DR. GUSTAVO ROJAS MARTÍNEZ. 2012

RESUMEN

OBJETIVO: El cáncer es una enfermedad multifactorial caracterizada por anormalidad en el crecimiento celular provocado por factores ambientales y múltiples cambios en la expresión de los genes. El cáncer de mama representa una de las enfermedades que más afecta a la población femenina mundial. Actualmente, se ha mostrado un auge en las investigaciones sobre compuestos extraídos de diversas plantas y origen sintético con posibles agentes antitumorales, entre los que se pueden nombrar los derivados sintéticos de quinolinas. **MÉTODO:** Realizado estudio del grupo sintético indeno (2,1-c) quinolinas y sus efectos citotóxicos sobre líneas de cáncer de mama SKBr3 y MCF-7. La evaluación de la actividad citotóxica de estos compuestos fue determinada a través del método del MTT, se calcularon los valores de concentración inhibitoria, los índices de selectividad y combinaciones con taxanos. **RESULTADOS:** Los resultados obtenidos muestran una alta selectividad de los compuestos sintéticos y natural evaluados hacia las líneas celulares MCF-7 y SKBr3 con respecto a las células control (fibroblastos dérmicos humanos); además de una interacción de tipo potenciación en la combinación de un derivado quinolínic y la droga taxano. **CONCLUSIONES:** Con todo esto se puede inferir que solo ciertos compuestos que tuvieron modificaciones químicas realizadas sobre el compuesto patrón del grupo sintético indeno(2,1-c)quinolinas mostraron una inhibición sobre la viabilidad celular sobre las líneas tumorales SKBr3 y MCF-7, conforme aumenta la dosis de los compuestos, además de evidenciar la efectividad de compuestos derivados de quinolinas como moléculas con características antineoplásicas.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, mama, quinolinas, quimioterapia, citotoxicidad, combinaciones.

SUMMARY

OBJECTIVE: The cancer is a multifactorial disease characterized by abnormal cell growth caused by environmental factors and for multiple changes in the gene expression. The breast cancer is a disease that affects the female population in worldwide. Currently, there is shown an increment in the research on compounds that we extracted from various plants and synthetic origin with potential antitumor agents, among which can be named the synthetic derivatives of the quinolines. **METHOD:** A study was performed on an group of synthetic indeno (2,1-c) quinolines and their cytotoxic effects on breast cancer cell lines SKBR3 and MCF-7 was performed. The evaluation of the cytotoxic activity of these compounds was determined through the MTT method; we were calculated inhibitory concentration values, the rates of selectivity and the drug combinations with taxanes. **RESULTS:** The results show a high selectivity of the natural and the synthetic compounds evaluated towards the cell lines MCF-7 and SKBR3 cells with respect to control (dermal fibroblasts human), besides an enhancement type interaction in the combination of a drug derivative and the quinolinic taxanes. **CONCLUSION:** With all this we can infer that only certain compounds had chemical modifications performed on the composite pattern of synthetic group indeno (2, 1-c) quinolines showed an inhibition on cell viability on tumor cell lines SKBR3 and MCF-7, with increasing dose of the compounds, also showing the effectiveness of compounds derived from the quinolines as molecules with the antineoplastic properties and his characteristics.

KEY WORDS: Cancer, breast, quinolines, chemotherapy, cytotoxicity, combinations.

Recibido: 26/04/2012 Revisado: 29/07/2012
Aceptado para publicación: 30/08/2012

Correspondencia: Dra. Marlene Peticara. Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 47114, Caracas, Venezuela. E-mail: marlenepeticara@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El tipo de neoplasia que más impacto tiene sobre la población femenina mundial es el cáncer de mama, descrita como un proceso de proliferación anormal maligna de las células epiteliales de la glándula mamaria⁽¹⁾. Para el año 1980, el cáncer de mama se encontraba como el tercer tipo de tumor maligno más común en la población femenina venezolana de acuerdo al Anuario de Epidemiología del Ministerio del Poder Popular para la Salud⁽²⁾. Como tratamiento del cáncer de mama se utilizan cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal entre otros, según el grado y la etapa de la enfermedad. En la actualidad, los taxanos (Paclitaxel) es una de las alternativas como utilización en las quimioterapias para esta neoplasia. En este momento, se están direccionando los estudios en la búsqueda de tratamientos que no sean integrales para cada tumor, sino en el diseño de cocteles de fármacos (politerapia o multiterapia), para con ello eliminar la mayor proporción de células cancerosas mediante la acción sobre múltiples blancos en las células. Las investigaciones de productos naturales o sintéticos con propiedades antitumorales han tenido un incremento en las últimas décadas, convirtiéndose en un campo interdisciplinario⁽³⁾. Uno de estos derivados naturales sintetizados y modificados químicamente son las quinolinas, las cuales presentan una amplia efectividad en diversas actividades biológicas, incluyendo actividad antimalárica⁽⁴⁾, antitumoral⁽⁵⁾, antioxidante⁽⁶⁾, y anti-micobacteriana^(7,8).

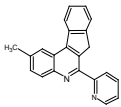
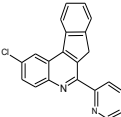
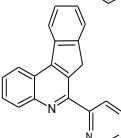
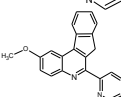
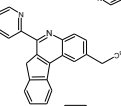
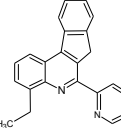
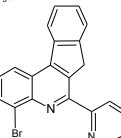
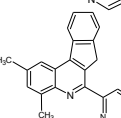
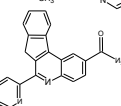
Aunque se han desarrollado un gran número de investigaciones acerca de los efectos antitumorales que presentan moléculas derivadas de quinolinas, muy pocas se han direccionado hacia la citotoxicidad sobre líneas tumorales de mama y su combinación con drogas antitumorales comerciales, como el paclitaxel.

MÉTODO

Se utilizaron dos líneas tumorales de mama: MCF-7 (sin sobre-expresión del gen HER2/c-erb-2) y SKBR3 (gen HER2/c-erb-2 sobre-expresado). Las líneas celulares de cáncer de mama se cultivaron en medio modificado de Dulbecco Eagle (DMEM; Gibco®) suplementado con suero fetal bovino al 10 % inactivado por calor (FBS, Gibco), 2 mM glutamax (Gibco), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Fibroblastos dérmicos humanos fueron utilizados como control de las células, y se obtuvieron a partir de cultivos primarios, mantenidos en DMEM suplementado con 10 % suero fetal bovino, glutamax 2 mM, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin.

El grupo de compuesto sintético fue obtenido a partir de una molécula de fenilpropano denominado trans-isoeugenol, el cual es una sustancia natural aislada por lo general de plantas de clavos de olor y canela. Partiendo de esta estructura se realizaron reacciones de ciclo-adición imino Diels-Alder (reacción de Povarov) para obtener el compuesto Cris 148 y a partir de este se realizaron modificaciones química en su estructura dando lugar a 8 moléculas. Estas 9 moléculas forman la serie indeno (2,1-*c*) quinolinas (Cuadro 1). Se utilizó el paclitaxel como control positivo; debido a su actividad citotóxica y que es actualmente utilizado en el tratamiento clínico de una variedad de neoplasias. Las concentraciones de los fármacos estudiados osciló desde 0,001 µg/mL hasta 100 µg/mL, donde los compuestos a probar se diluyeron en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), y las diluciones se realizaron con medios de cultivo celular. Como control del vehículo se incubaron las células solo con DMSO. Para todas las preparaciones de los compuestos, la concentración final de DMSO en los ensayos no supera el 1 %. La información sobre los valores de CI_{50} representa la media obtenida de al menos tres experimentos independientes. Los cultivos

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

Compuesto	Estructura química	Grupos funcionales sustituidos		Fórmula molecular (g/mol)	Peso molecular
		R1	R2		
Cris 148		-	-	C ₂₂ H ₁₆ N ₂	328
Cris 131		Cl	-	C ₂₁ H ₁₃ ClN ₂	294
Cris 142		H	-	C ₂₁ H ₁₄ N ₂	308
Cris 153		OCH ₃	-	C ₂₂ H ₁₆ N ₂ O	324
Ar 4		CH ₂ CH ₃	-	C ₂₃ H ₁₈ N ₂	322
Ar 68		H	CH ₂ CH ₃	C ₂₃ H ₁₈ N ₂	322
Ar 69		H	Br	C ₂₁ H ₁₃ BrN ₂	373
Ar 70		-	CH ₃	C ₂₃ H ₁₈ N ₂	322
Ar 71		CONH ₂	-	C ₂₂ H ₁₅ N ₃ O	337

se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % CO₂. Las células se incubaron con los compuestos respectivos durante 72 h en placas de 96 pozos.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Se utilizó el ensayo del MTT, el cual se basa en medir la capacidad de las células viables para

reducir metabólicamente una sal de tetrazolio (MTT; Sigma) para dar un producto púrpura denominado formazán. Esta reacción tiene lugar cuando las reductasas mitocondriales se encuentran activas ⁽⁹⁾. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (5x10³ células/por pozo). Después de la incubación con los compuestos se retiró el medio y las células se trataron con 100 μ L de MTT durante 3 horas a 37 °C. Posteriormente, se retira la solución de los pozos y se agregan 100 μ L DMSO para disolver los cristales de formazán. El producto de formazán solubilizado se cuantificó con la ayuda de un lector de placas de ELISA modelo TECAN *sunrise* a 570 nm.

ÍNDICE DE SELECTIVIDAD

El índice de selectividad se calculó por la relación de CI_{50} (células de control) / CI_{50} (línea de células tumorales). Un índice de selectividad mayor a 1 indica que la citotoxicidad sobre células tumorales supera a la de las células control ⁽¹⁰⁾.

CURVAS DE VIABILIDAD

Una vez obtenidos los valores de CI_{50} para cada compuesto se procedió a seleccionar aquellos compuestos con mayor actividad citotóxica sobre las líneas tumorales evaluadas. Conjuntamente; con el taxano se realizaron las curvas de crecimiento para cada uno de la siguiente manera: se sembraron 5 x10⁴ células en placas de 60 mm y se incubaron con los compuestos a una concentración equivalente a la obtenida para el CI_{50} para cada uno de los compuestos durante los períodos de incubación seleccionados: 24, 48, 72, 96 y 120 h respectivamente. Una vez cumplido cada período se realizó un ensayo de viabilidad empleando el método de exclusión del colorante azul de tripano. Dicho ensayo se realizó con un control celular para cada línea evaluada, el cual no tuvo la presencia de algún compuesto citotóxico. Las curvas de crecimiento se elaboraron mediante el uso del software *OriginPro 8* (*Origin Lab, Inc.*,

Northampton, MD[®], *EE.UU.*

COMBINACIÓN DE COMPUESTOS

Las células de ambas líneas celulares de cáncer de mama se incubaron durante 72 h con paclitaxel en combinación con los compuestos del grupo indeno (2,1-c) quinolinas que mostraron los mejores valores de citotoxicidad. La naturaleza de las interacciones entre los fármacos se analizó con la ayuda de isoblogramas ⁽¹¹⁾ y el método del efecto medio descrito por Chou y Talalay ⁽¹²⁻¹⁴⁾. Los isoblogramas se construyeron con los valores de CI_{50} de los productos involucrados en la combinación (cada compuesto representa un eje en el gráfico) y el valor de combinación entre ellos. Cuando el valor del índice de combinación (IC) se encuentra por debajo o por encima de la línea que une los CI_{50} de los dos compuestos, representan sinergismo o antagonismo, respectivamente ⁽¹¹⁾. El índice de combinación (IC), se calculó utilizando el software *CalcuSyn 2,0* (*Biosoft*[®] *Cambridge, Reino Unido*); los valores de $CI < 1$ indican sinergismo (cuanto menor sea el valor, mayor es el grado de sinergismo), $IC = 1$ indica aditividad, y $CI > 1$ indica antagonismo. Cada relación de CI está representada como la media de al menos tres experimentos independientes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar. Los valores de CI_{50} fueron determinados por una regresión no lineal de los experimentos individuales utilizando el software *Graph Pad Prism*[®] (software intuitivo para la ciencia, en San Diego, California, EE.UU).

RESULTADOS

EFFECTO CITOTÓXICO SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO POR EL GRUPO INDENO (2,1-C) QUINOLINAS

Los fármacos y compuestos sintéticos utilizados en este estudio fueron capaces de inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama, así como la de las células de control analizadas por el ensayo MTT (Cuadro 2). En todos los casos, el efecto inhibitor del crecimiento celular mostró una relación dosis-efecto con el tiempo (Figura 1). Se puede observar una clara diferencia entre el efecto obtenido en los compuestos evaluados y el control (paclitaxel) sobre las líneas tumorales de mama y las células control.

El compuesto Cris 142 del grupo indeno(2,1-*c*)quinolinas presentó la mayor actividad citotóxica en ambas líneas celulares tumorales, con valores de CI_{50} en el rango de 53 a 11 μM , siendo la línea celular MCF-7 la más sensible a este compuesto, y no presentándose actividad citotóxica en las células control. Como droga control, el paclitaxel presentó los valores de CI_{50} más bajos, en un rango de 0,01 μM a 0,76 μM , además de la selectividad más marcada para las líneas tumorales evaluadas.

Cuadro 2. Valores de concentración inhibitoria del 50 % de la población (CI_{50}) y de selectividad (IS) de los productos evaluados para cada una de las líneas tumorales de cáncer de mama y las células control. Los valores de CI_{50} se encuentran expresados en μM .

Compuesto	IC50 para las líneas tumorales y células control				
	SKBr3	control MCF-7	Fibroblastos	SKBr3	MCF-7
Cris 148	133,99 + 3,29	> 300	> 300	2,28	1,00
Cris 131	73,06 + 3,81	165,44 + 3,61	180,58 + 3,67	2,47	1,09
Cris 142	53,28 + 3,47	11,46 + 3,54	> 300	6,09	28,33
Cris 153	> 300	> 300	> 300	1,00	1,00
Ar 4	57,42 + 3,39	44,29 + 3,14	> 300	5,41	7,01
Ar 68	> 300	> 300	> 300	1,00	1,00
Ar 69	> 300	> 300	> 300	1,00	1,00
Ar 70	> 300	> 300	> 300	1,00	1,00
Ar 71	> 300	> 300	> 300	1,00	1,00
Taxano	0,01 + 1,58	0,03 + 1,46	0,76 + 1,21	65,00	21,67

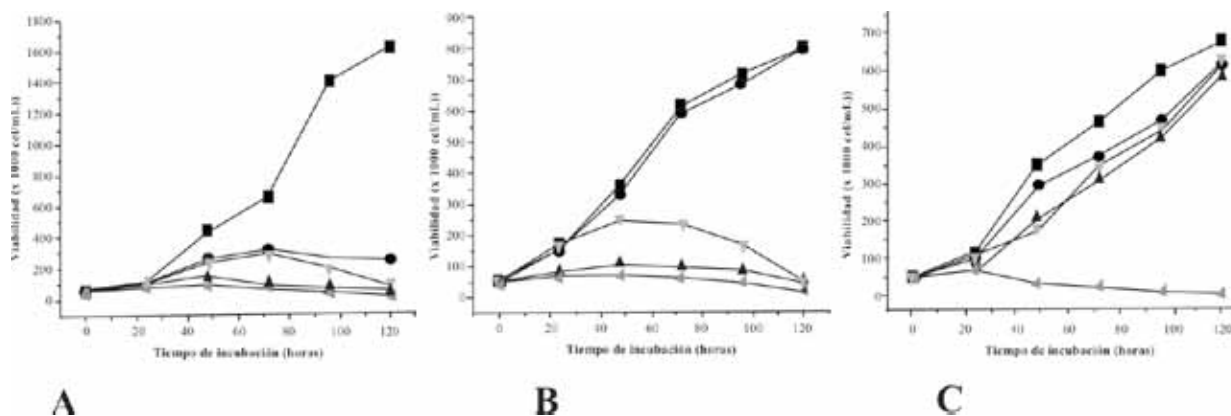


Figura 1. Efecto de los compuestos Cris 148, Cris 142 y Ar 4 del grupo sintético indeno(2,1-*c*)quinolinas y la droga antitumoral paclitaxel en la proliferación celular de las tres líneas celulares evaluadas: A) SKBr3; B) MCF-7; C) Cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos). (Leyenda: cuadrado-Control; círculo-Cris 148; triángulo hacia arriba-Cris 142; triángulo hacia abajo-Ar 4; triángulo hacia la izquierda-paclitaxel.

COMBINACIÓN DE LOS COMPUESTOS DEL GRUPO INDENO(2,1-C)QUINOLINAS Y LA DROGA PACLITAXEL

En el Cuadro 3 se presentan los valores de índice de combinación (IC) para cada combinación realizada, y en la Figura 2 se

Cuadro 3. Índices de combinación (IC) entre los compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1-c)quinolinas y la droga antitumoral paclitaxel.

Células evaluadas	Compuestos sintéticos del grupo indeno(2,1-c) quinolinas		
	Cris 148	Cris 142	Ar 4
SKBr3	10,7 x 105	4,98 x 105	71,2
MCF-7	0,35 x 105	6,1 x 10-10	4,85 x 105
Control	0,63 x 1021	1,65 x 1013	102,0 x 1021

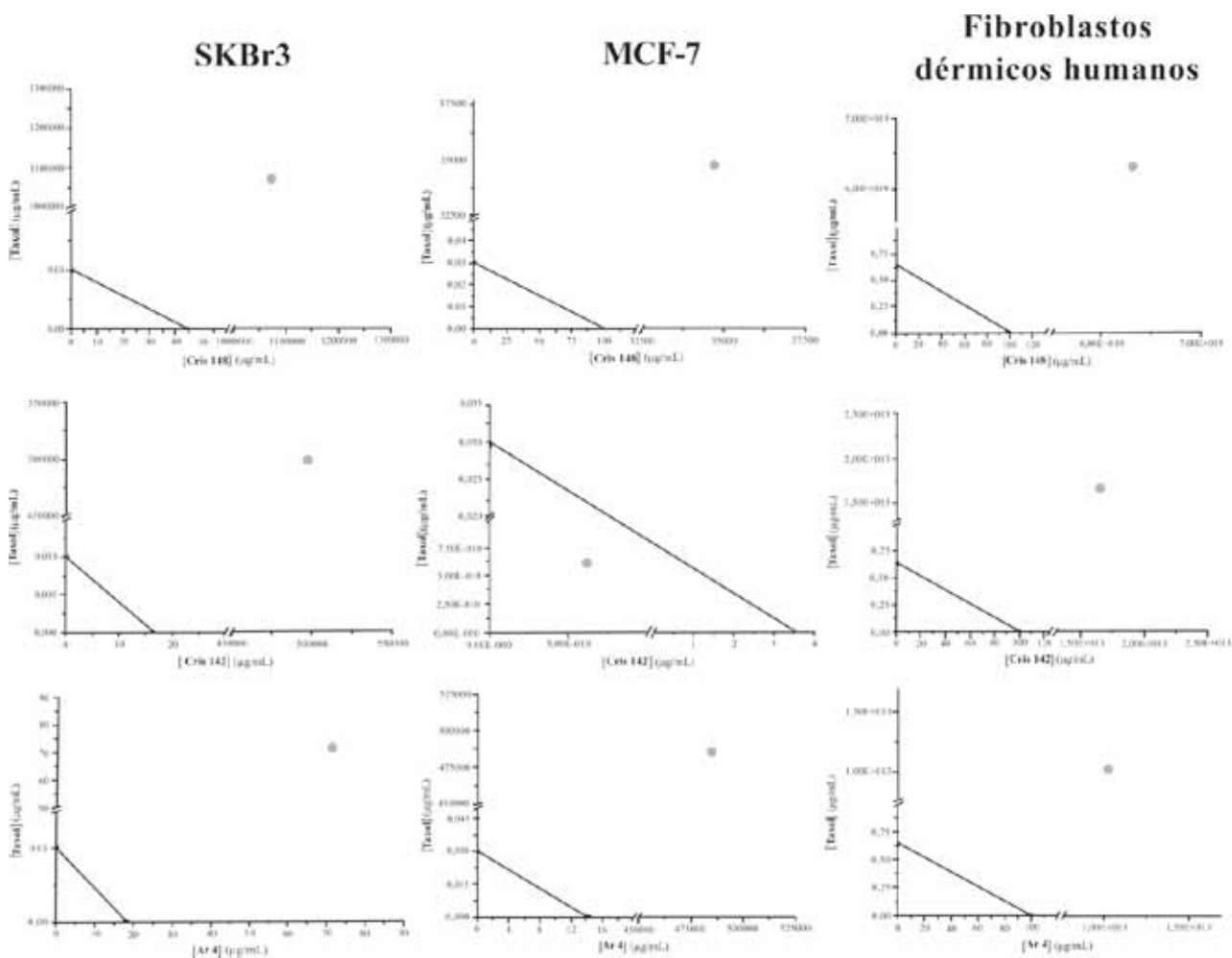


Figura 2. Isobologramas que describe la interacción del paclitaxel con los compuestos sintéticos Cris 148, Cris 142 y Ar 4. Los isobologramas se construyeron mediante la conexión de los valores de CI_{50} de la droga antitumoral paclitaxel con el CI_{50} de cada compuesto sintético. Las líneas continuas indican la línea de aditividad teórica. Los resultados por debajo de la línea de aditividad indican sinergismo y los de arriba indican antagonismo.

muestran los isoblogramas de las combinaciones con los compuestos sintéticos y la droga antitumoral paclitaxel. Todas las combinaciones realizadas mostraron un efecto antagónico en su interacción; solo la combinación Cris 142 + paclitaxel presentó un efecto sinérgico en la interacción entre estos dos compuestos.

DISCUSIÓN

El hallazgo más relevante en el presente estudio fue la obtención de compuestos derivados quinolínicos con actividades antitumorales en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SKBr3 la relación estructura-función encontrada en ellos. Particularmente; los compuestos Cris 148 y Ar 4 fueron capaces de inducir la inhibición del crecimiento en ambas líneas celulares con mayor intensidad sin afectar con ello las células control, pero la adición de taxano tiene efectos contrarios en ambos compuestos: con el compuesto Cris 142 mostró una actividad sinérgica, mientras que con Ar 4 un efecto antagónico.

Los isoblogramas, contruidos sobre la base de valores de CI_{50} , indicaron las interacciones sinérgicas o antagónicas entre los compuestos evaluados y la droga antitumoral paclitaxel en las células MCF-7, SKBr3 y la línea celular de control. Con ello se confirman los valores antagónicos de las combinaciones realizadas y la interacción sinérgica entre el compuesto sintético Cris 142 y la droga antitumoral paclitaxel. Estos resultados indican que Cris 142 podría ser un candidato más prometedor para

la terapia adyuvante del cáncer de mama. Sin embargo, hasta ahora, los compuestos del grupo indeno (2,1-c) quinolinas solo se ha utilizado en ensayos *in vitro* con fármacos y líneas celulares utilizadas en este trabajo.

Los compuestos del grupo indeno (2,1-c) quinolinas tienen una estructura química similar, con diferencias en las sustituciones de los grupos químicos específicos. En términos de eficacia citotóxica, se demostró que la presencia de un átomo de hidrógeno en la estructura Cris 142 genera una mayor actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de mama, en comparación con una sustitución por un grupo etilo (CH_2CH_3) en la estructura Ar 4.

En consecuencia; el compuesto Cris 142 presentó una actividad citotóxica en las células MCF-7 de hasta 4 veces mayor con respecto al compuesto Ar 4 y es equivalente su actividad en las células SKBr3.

Se infiere que la citotoxicidad de la mayoría de los compuestos antitumorales está mediada por su capacidad para inducir la apoptosis⁽¹⁵⁾, o el daño masivo asociado con el estrés oxidativo⁽¹⁶⁾. Las investigaciones realizadas sobre la obtención del mecanismo de la acción de los compuestos Cris 142 y Ar 4 están en curso.

Finalmente, el compuesto Cris 142 presenta un mayor margen de seguridad en cuanto a su toxicidad sobre las células normales, aunque los estudios adicionales deben llevarse a cabo con modelos *in vivo*, y más tarde la validación clínica para corroborar su eficacia como un agente en la terapéutica del cáncer de mama.

REFERENCIAS

1. Carlson R, Allred C, Anderson B, Burstein H, Carter WB, Edge S, et al. Breast Cancer. Clinical practice guidelines in oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2009;7(2):122-192.
2. Ravelo JA. Avances en el diagnóstico del cáncer de la mama. Importancia de la pesquisa y diagnóstico precoz. Reflexiones sobre el problema en Venezuela. Gac Méd Caracas. 2001;109(2):389-417.

3. Arvelo F, Suárez A, Galindo I, Compagnone R, Usubilaga A. Productos naturales en la terapéutica actual. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. 2008;5:69-72.
4. Jacquemond-Collet I, Benoit F, Mustofa C, Valentin A, Stanislas E, Mallié M, et al. Antiplasmodial and cytotoxic activity of galipinine and other tetrahydroquinolines from *Galipea officinalis*. *Planta Med*. 2002;68:68-69.
5. Wallace O, Lauwers K, Jones S, Dodge J. Tetrahydroquinoline-based selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13:1907-1910.
6. Dorey G, Lockhart B, Lestage P, Casara P. New quinolinic derivatives as centrally active antioxidants. *Bioorg Med Chem Lett*. 2000;10:935-939.
7. Vangapandu S, Jain M, Kaur S, Singh P. Ring-substituted quinolines as potential anti-tuberculosis agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;12:2501-2508.
8. Monga V, Nayyar A, Vaitilingam B, Palde P, Jhamb S, Kaur S, et al. Ring- substituted quinolines. Part 2: Synthesis and antimycobacterial activities of ring-substituted quinolinecarbohydrazide and ring-substituted quinoline-carboxamide analogues. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;12:6465-6472.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
10. Callacondo D, Quispe A, Lindo S, Vaisberg A. Actividad citotóxica del extracto etanólico de *Gnaphalium spicatum* "Keto Keto" en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2008;25:380-385.
11. Gessner PK. Isobolographic analysis of interactions: An update on applications and utility. *Toxicology*. 1995;105:161-179.
12. Chou TC, Talalay P. Analysis of combined drug effects: A new look at a very old problem. *Trends Pharmacol Sci*. 1983;4:445-450.
13. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22:27-55.
14. Chou TC. Quantization of synergism and antagonism of two or more drug by computerized analysis. En: Chou TC, Rideout DC, editores. *Synergism and antagonism in chemotherapy*. Nueva York, NY (EE. UU): Academic Press; 1991.
15. Tamm I, Schriever F, Dörken B. Apoptosis: Implications of basic research for clinical oncology. *Lancet*. 2001;2:33-42.
16. Li Q, Peng S, Sheng Z, Wan Y. Ofloxacin induce oxidative damage to joint chondrocytes of juvenile rabbits: Excessive production of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA damage. *Eur J Pharmacol*. 2010;626:146-153.