

CONTENIDO

Bioprospección de dendrímeros para el control de microorganismos de interés farmacológico ..	2
Actividad citotóxica y muerte celular inducida por híbridos de <i>2,3-difenil-2H-indazol</i> y <i>combretastatina A-4</i> en líneas tumorales humanas	6

BIOPROSPECCIÓN DE DENDRÍMEROS PARA EL CONTROL DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO

Reyna America Ruiz Arias¹, M. en C. Ricardo ngel Gutiérrez Bernal², Dr. Domingo Madrigal Peralta², Dra. Berenice Vargas Coronell¹.

¹Universidad Xochicalco Rampa Yumalinda 4850, Chapultepec Alamar, 22110 Tijuana, B.C. ²Centro de Graduados e Investigación. Instituto Tecnológico de Tijuana. Apdo. Postal 1166. Tijuana, B. C. 22000, México. Contacto: ruizariasra73@gmail.com

Resumen

Los dendrímeros son macromoléculas ramificadas de tamaños nanométricos que han sido utilizados como sensores químicos, micelas unimoleculares, imitación de la función de enzimas, almacenamiento y transporte de fármacos, lo que les confiere gran potencial para el desarrollo de áreas de interés en nanomedicina. En este trabajo se evaluó la sensibilidad bacteriana de tres dendrímeros, dos de generación cero G (0) y otro de generación uno G (1) conteniendo en su estructura grupos hidroxilo y amino. Se evaluó la solubilidad de los dendrímeros en Etanol, H₂O, Buffer de Fosfatos (PBS), Dimetilsulfóxido (DMSO) y Medio Líquido Luria Bertani (LB). La sensibilidad microbiana se efectuó en medio de cultivo líquido LB, mediante la técnica de macrodilución utilizando la cepa *Escherichia coli* (C100071) no patógena, que forma parte de la flora intestinal en los seres humanos. Observándose que la presencia de dendrímeros favorecen el crecimiento del microorganismo modelo.

Introducción

La bioprospección es definida como la búsqueda sistemática de componentes naturales y organismos completos de la biodiversidad con el fin de otorgarles un valor comercial para el desarrollo de productos.¹ La bioprospección genera productos que tienen relación con industrias como la farmacéutica, la biotecnología, la de agro insumos y la de medicina botánica; entre otras.² Los dendrímeros son polímeros que presentan una arquitectura regular bien definida y altamente ramificada y cuya originalidad radica en el hecho de que su tamaño y geometría pueden ser específicamente controladas en su síntesis, con el fin de que posean propiedades físicas y químicas prediseñadas y específicas.³ Los dendrímeros se construyen sistemáticamente, generación tras generación, a partir de un centro molecular polifuncional reactivo que actúa como núcleo central de crecimiento.⁴ La posibilidad de controlar su constitución química e incorporar diferentes grupos funcionales en posiciones específicas ha llevado a que las moléculas dendríticas ofrezcan un abanico de nuevas propiedades y aplicaciones que les confiere un importante y reconocido interés interdisciplinar en áreas tan diversas como son la química inorgánica, orgánica, analítica, la biología, el diseño de nuevos materiales, la farmacología, la nanotecnología, la microbiología, entre otros.⁵ El estudio de la sensibilidad bacteriana es una de las funciones más importantes dentro de la microbiología clínica. Dentro de los beneficios que presenta se encuentran: dirigir la terapéutica una vez que el germen es conocido y generar una base de datos que permita seleccionar los antibióticos a utilizar en un tratamiento empírico.⁶

En este proyecto, se buscó evaluar la sensibilidad microbiana de tres dendrímeros con grupos amino-alcohol, solubles en medio acuoso, utilizando como microorganismo modelo una cepa de *E. coli*

(C100071), usando la técnica de Macrodilución, las evaluaciones se realizaron por triplicado, con controles positivo y negativo, las Absorbancias se midieron por espectrofotometría a 24 y 48 h.

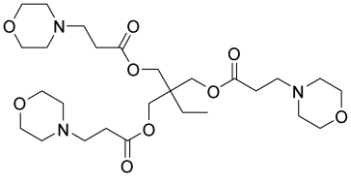
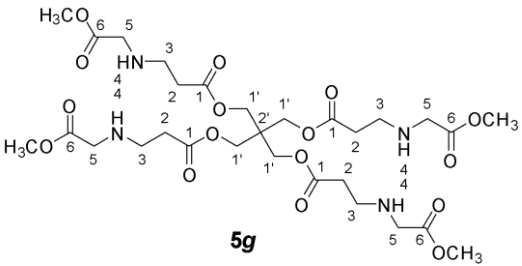
Palabras Clave: Bioprospección, Dendrímero, Sensibilidad Microbiana.

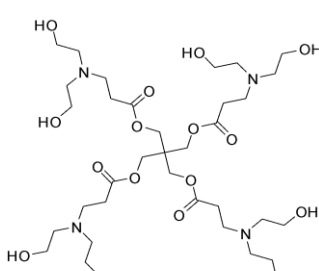
Metodología

La síntesis de dendrímeros se efectuó usando reacciones de adición de Michael de los poliacrilatos correspondientes con las aminas dietanolamina, morfolina y éster de glicina.

Para evaluación de sensibilidad microbiana, se sembró por estría un cultivo selectivo de *E.coli* C100071, no patógeno en Agar Sangre y MacConkey. A su vez, se evaluó la solubilidad de varios dendrímeros, en Etanol, H₂O, PBS DMSO y Medio Líquido LB Una vez obtenidos los resultados, se eligieron solo tres dendrímeros que fueran solubles en medio LB.

Después de obtener un cultivo puro, se ajustan al estándar de McFarland medido a 650 nm por espectrofotometría, se inocularon en medio LB, y se realizaron las diluciones por triplicado utilizando las siguientes claves para los dendrímeros: RD29, RD6J y RD251, se incubaron a 37°C.

<p>Clave:RD29</p> 	<p>bis(3-morfolinopropanoato)de 2-etil-2- (((3- morfolinopropanoil)oxi)metil)propano- 1,3-diilo</p>	<p>IR: 2955, 2853, 2808, 1738, 1110 cm⁻¹.</p>
<p>Clave:RD251</p> 	<p>bis(3-((2-metoxi-2- oxoetil)amino)propanoato)de2,2-bis(((3- ((2-metoxi-2- oxoetil)amino)propanoil)oxi)metil)propan o-1,3-diilo</p>	<p>IR: 3332, 2957, 2916, 2848, 1728, 1160 cm⁻¹</p>

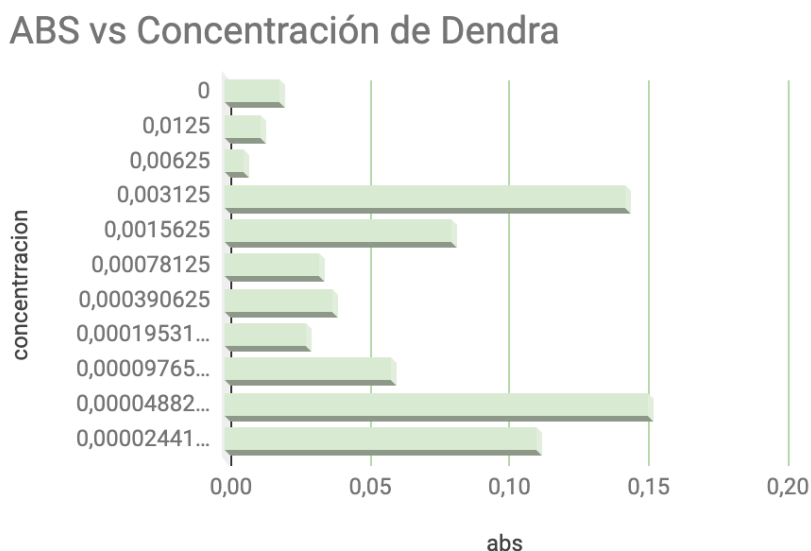
Clave: RD6J 	bis(3- (bis(2hidroxietil)amino)propanoato) de 2,2-bis(((3-(bis(2- hidroxietil)amino)propanoil) oxi)metil)propano-1,3-diilo.	IR: 3346, 2949, 2874, 1730, 1178, 1023 cm ⁻¹ .
--	---	--

Se midió absorbancia por espectrofotometría a 0, 24 y 48h.

Discusión de resultados

Se sintetizaron diferentes tipos de dendrímeros G(0) y G(1) y con grupos amino-alcohol terminales, sin embargo en las pruebas de solubilidad en medio acuoso, PBS, DMSO y Medio de Cultivo, solo se seleccionaron para esta evaluación los que fueron solubles en Medio LB, y utilizar la técnica de macrodilución para análisis de sensibilidad de los dendrímeros (RD29, RD251) y (RD6J), lo que favorece su evaluación para pruebas de susceptibilidad de microorganismos, en la siguiente gráfica se observa comparativo de las diferentes concentraciones de los dendrímeros utilizadas, donde el 0 es el control positivo, como se puede observar la presencia de los dendrímeros favorece el crecimiento del microorganismo, al ser un bacteria que forma parte de nuestra flora intestinal, lo que se desea es que se mantenga y no sea destruida por la presencia de los dendrímeros, que de acuerdo a reportes en la literatura tienen potencial como vehículos de transporte de fármacos.

Gráfico 1. Evaluación de susceptibilidad microbiana de Dendrímtero RD29



Conclusiones

Se logró la síntesis y caracterización de dendrímeros con grupos, amino, éster y amino-alcohol. En este estudio preliminar, se encontró que los dendrímeros fueron solubles en medios fisiológicos, mostrándose como potenciales materiales para posibles aplicaciones biológicas. Además, al estar en contacto el dendrímero con el microorganismo del *E. coli* no patógeno, no se observó inhibición de crecimiento, por el contrario, se observó una proliferación, al ser este microorganismo parte de flora intestinal humana, se propone a los dendrímeros como posibles vehículos para el transporte de fármacos que ayuden a mantener el equilibrio de la flora intestinal.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo al Centro de Estudios Universitarios Xochicalco Campus Tijuana y al Instituto Tecnológico Nacional de México.

Referencias

1. Castree, N. Bioprospecting: from theory to practice and back again. *Transactions of the Institute of British Geographers* **2003**, 28, 35-55.
2. Moran, K.; King, S.; Carlson, T. Biodiversity Prospecting Lessons and Prospects. *Annual Review of Anthropology* **2001**, 30, 505-526.
3. Newkome, G.R: Advances in dendritic macromolecules, *JAI Press, Connecticut*. . **1994, 1995, 1996, 2000, 2005**
4. Tomalia, A; Frechet, J.M.J Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective. *Journal of Polymer Science: PartA: Polymer Chemistry* . **2002** 40, 2719-2728.
5. Alonso, B; Casado, C; Dendrímeros: Macromoléculas versátiles con interés interdisciplinar. *Encuentros Multidisciplinares* **2016**, 54, 1-1.
6. Taroco, R., Seija, V., R Vignoli, R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. **2006**, 36, 663-663.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y MUERTE CELULAR INDUCIDA POR HÍBRIDOS DE 2,3-DIFENIL-2H-INDAZOL Y COMBRETASTATINA A-4 EN LÍNEAS TUMORALES HUMANAS

Ignacio González Sánchez¹, Jaime Pérez Villanueva², Juan Francisco Cortés Benítez², Martha Leyte Lugo², Félix Matadamas Martínez³, Juan Francisco Palacios Espinosa², Marco A. Cerbón⁴, Olivia Soria Arteché².

¹ Catedrático CONACYT comisionado a Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X), Ciudad de México 04960, México

² Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X), CDMX 04960, México.

³ Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias-Hospital Pediatría CMN siglo XXI. IMSS

⁴ Departamento de Biología Facultad de Química UNAM, Ciudad de México 04510, México

Contacto: ignacio.gonzalez.s@gmail.com (I.G.S.); jpvillanueva@correo.xoc.uam.mx (J.P.V.)

Resumen

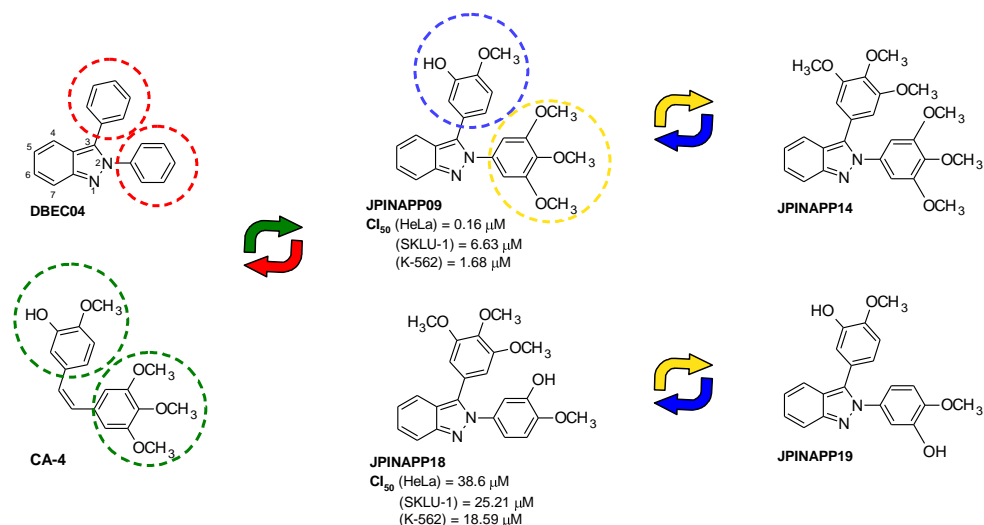
Recientemente nuestro grupo de investigación reportó la síntesis y caracterización química de híbridos entre 2,3-difenil-2H-indazol y combretastatina A-4. En este trabajo se realizaron estudios de acoplamiento molecular sobre la proteína tubulina y se evaluó la actividad citotóxica empleando el ensayo de sulforodamina B para los compuestos **JPINAPP14** y **JPINAPP19**. Además, se evaluaron los cambios morfológicos y de muerte celular por microscopia. Los resultados de acoplamiento molecular sugieren que las dos moléculas tienen una alta afinidad por el sitio de unión que comparten la colchicina y la combretastatina A-4 en la tubulina. Ambos compuestos provocaron cambios morfológicos en células HeLa a las 48 h de tratamiento. Adicionalmente, los estudios de TUNEL sugieren que **JPINAPP19** induce apoptosis en la línea celular HeLa.

Introducción

A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de muerte. De acuerdo con datos más actuales de la Organización Mundial de la Salud, se estima que el cáncer causó 8.8 millones de defunciones en el año 2012. La frecuencia y tipo de cáncer varía dependiendo de la población estudiada. Los cánceres de mayor incidencia a nivel mundial, para ambos géneros, son los de pulmón, mama, colon, próstata, hígado, cervicouterino, entre otros.¹

En la clínica oncológica, el cáncer puede tratarse de diferentes maneras dependiendo de su naturaleza y estadio de avance. Uno de los tratamientos es la quimioterapia, en la que se usan fármacos citotóxicos para matar a las células cancerosas. La frecuente generación de resistencia a esos tratamientos por parte

de las células tumorales ha impulsado la búsqueda de nuevos fármacos con mayor actividad citotóxica y menor toxicidad para el paciente.



Esquema 1. Estructura de los compuestos **JPINAPP14** y **JPINAPP19**, así como de sus precursores.

Como parte del trabajo realizado en nuestro grupo de investigación sobre la síntesis y modificación estructural de sustancias bioactivas, se encontró que el 2,3-difenil-2*H*-indazol (**DBEC04**),² presenta actividad citotóxica, en células HeLa y SKLU-1, con una CI_{50} de 125.8 y 96.43 μ M, respectivamente. En un esfuerzo por encontrar nuevas moléculas citotóxicas se propuso la síntesis y caracterización química de híbridos entre 2,3-difenil-2*H*-indazol y el producto natural citotóxico combretastatina A-4. En un reporte previo se evaluó la actividad citotóxica de los compuestos **JPINAPP09** y **JPINAPP18**, los cuales presentaron una actividad citotóxica superior al **DBEC04** (Esquema 1).³

Dado que los compuestos **JPINAPP09** y **JPINAPP18** presentaron actividad citotóxica relevante, en este estudio nos propusimos evaluar la actividad biológica de los compuestos **JPINAPP14** y **JPINAPP19**. Estas moléculas conservan el núcleo del indazol presente en el compuesto **DBEC04** y el sustituyente aromático presente en el nitrógeno 2 de los compuestos **JPINAPP09** y **JPINAPP18**, respectivamente. Dicho sustituyente se encuentra duplicado respectivamente, reemplazando el sustituyente en la posición 3 del indazol para los compuestos **JPINAPP14** y **JPINAPP19** (Esquema 1). En este trabajo se realizaron estudios de acoplamiento molecular sobre la proteína tubulina y se evaluó la actividad citotóxica empleando el ensayo de sulforodamina B para los compuestos **JPINAPP14** y **JPINAPP19**. Además, en líneas celulares humanas incubadas con **JPINAPP14** y **JPINAPP19** se evaluaron los cambios morfológicos y de muerte celular por microscopía.

Métodos

Obtención de compuestos

La síntesis y caracterización química de los compuestos aquí presentados fue reportada previamente en este foro.⁴ Brevemente, se hizo reaccionar 2-nitrobenzaldehído y la anilina sustituida adecuada por calentamiento con microondas en etanol, las iminas formadas se trataron con fosfito de trietilo a reflujo para dar los 2-fenil-2*H*-indazoles. Posteriormente, la bromación en la posición 3 del núcleo de indazol

seguido de un acoplamiento de Suzuki-Miyaura dio como resultado los compuestos **JPINAPP14** y **JPINAPP19**.

Evaluación “in silico”

El estudio de acoplamiento molecular se realizó sobre la estructura cristalográfica de la tubulina (PDB ID: 5LYJ) a partir de la base de datos de *Protein Data Bank*. A dicha estructura se le removieron las moléculas de agua, iones y ligandos, utilizando el programa *Pymol* y posteriormente fue minimizada la energía de la proteína mediante el servidor web *YASSARA*. El acoplamiento de los compuestos **JPINAPP14** y **JPINAPP19** a la tubulina se realizó en el sitio de unión a la combretastatina A-4 y colchicina empleando el programa *AutoDock* y las interacciones se generaron con el servidor *Protein-Interaction Profile*.

Actividad citotóxica

La citotoxicidad de los compuestos **JPINAPP14** y **JPINAPP19** fue evaluada en células de las líneas de cáncer cérvico-uterino HeLa, de pulmón SKLU-1 y de leucemia K-562. Las líneas celulares antes mencionadas se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y mantenidas en las condiciones estándar de cultivo (37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂). Las células fueron cosechadas y se sembraron 7 000 células/pozo en placas de 96 pozos. Después de 24 h, las células fueron tratadas con los compuestos disueltos en DMSO a una concentración final de 50µM. Los cultivos fueron incubados durante 48 h con los tratamientos. La viabilidad de las células se determinó empleando el ensayo de Sulforodamina B.⁵ Adicionalmente, los cambios en la morfología celular fueron documentados a las 48 h de tratamiento, de modo previo a la determinación de la viabilidad celular.

Fragmentación de ADN

Para evaluar la fragmentación del ADN como parte del proceso de muerte celular, se crecieron 5×10⁵ células HeLa sobre cubreobjetos en placas Petri. Después de 24 h de incubación en condiciones estándar para el cultivo celular, se administró el compuesto **JPINAPP19** a una concentración de 50 µM y se incubó durante 36 h. Al término del tratamiento, las células fueron fijadas con PFA al 4% y se realizó el marcaje por TUNEL.⁶ Las células fueron analizadas y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia NIKON ECLIPSE E600®.

Resultados y discusión

Con la finalidad de entender las interacciones de los nuevos compuestos con la diana potencial que es la tubulina, se realizaron estudios de acoplamiento molecular utilizando la estructura cristalográfica de esta proteína co-cristalizada con la combretastatina A-4. Este estudio arrojó una energía de afinidad de -8.73 kcal/mol y -9.6 kcal/mol para los compuestos **JPINAPP14** y **JPINAPP19**, respectivamente. Los dos compuestos están estabilizados por interacciones hidrofóbicas con residuos VAL181, LEU248, LEU255, ASN258, ALA316, LYS352 para **JPINAPP14** y LEU248, ALA250, LYS254, LEU255, ASN258, ALA316, LYS352 para **JPINAPP19**. Ambos compuestos son capaces de formar puentes de hidrógeno

mediante sus grupos hidroxilo o metoxilo con diferentes residuos en el sitio de unión. El compuesto **JPINAPP14** forma hidrógeno con los residuos ASP251, ALA317 y ALA354; mientras que el análogo **JPINAPP19** forma tres puentes de hidrógeno como aceptor con los residuos VAL315, ALA317 y LYS352. Sin embargo, el grupo hidroxilo del anillo unido a la posición 2 del indazol del **JAPINAPP19**, forma puentes de hidrógeno con los residuos ALA317 y ALA349. Es muy probable que, por estas dos interacciones adicionales, **JPINAPP19** tenga una mejor afinidad en el sitio de unión (Figura 1), y que el mecanismo de acción de estos compuestos pueda ser vía la alteración de la dinámica de los microtúbulos, como ha sido reportado para la combretastatina A-4.^{7,8}

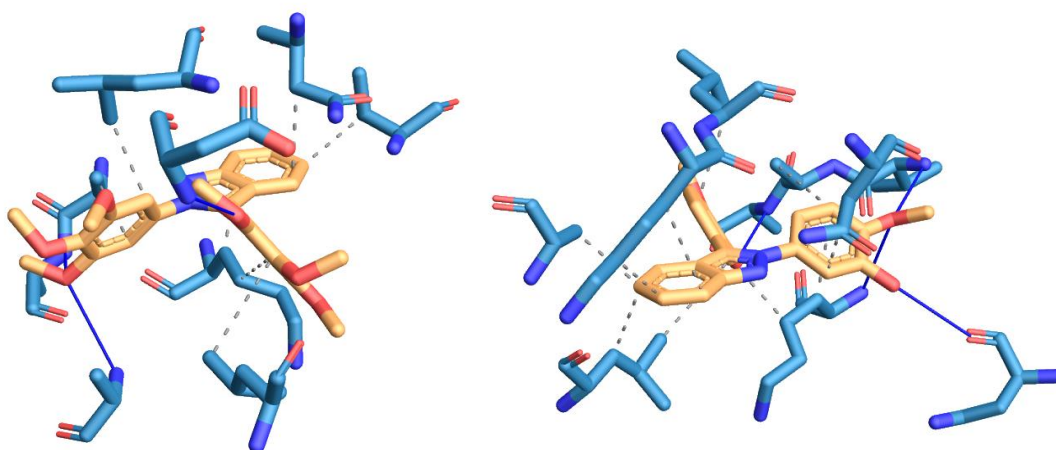


Figura 1. Modo de unión de los compuestos **JPINAPP14** (izquierda) y **JPINAPP19** (derecha) en la tubulina en el sitio de unión de a combretastatina A-4

Los resultados para la evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos se muestran en la Tabla 1. Es importante resaltar que el compuesto **JPINAPP19** tiene una mayor citotoxicidad contra las tres líneas celulares estudiadas (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad citotóxica de los híbridos administrados a 50 μ M en líneas celulares durante 48 h.

Compuesto	HeLa	SKLU-1	K-562
JPINAPP14	60.5 \pm 5.6	59.6 \pm 3.5	61.6 \pm 1.15
JPINAPP19	43.2 \pm 5.9	40.8 \pm 9.2	45.9 \pm 2.5

Los datos representan el Promedio \pm EEM, n=3

En la Figura 2 se muestran las imágenes de microscopia de campo claro, donde se aprecia que despues del tratamiento por 48 h de células HeLa con los compuestos **JPINAPP14** y **JPINAPP19** se produce un cambio en la morfología de dichas células. Se observa que el compuesto **JPINAPP14** induce un alargamiento de las células. Mientras que el compuesto **JPINAPP19** induce un cambio radical en la morfología celular, pueden observarse algunas células esféricas e incluso debrí celular, comparado con el control de vehículo donde se observa la morfología poligonal clásica de dichas células, sugiriendo una

alta citotoxicidad. En ambos casos se observa un bajo número de células, lo cual esta en concordancia con los resultados de viabilidad.

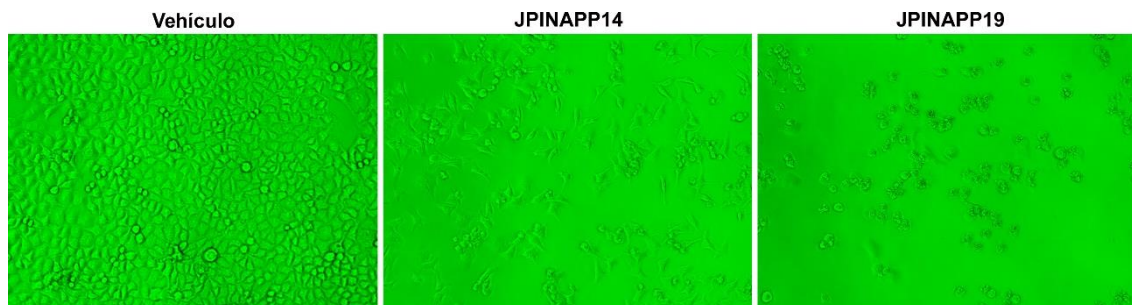


Figura 2. Cambios morfológicos en células HeLa inducidos por los compuestos a las 48 h de tratamiento. El compuesto JPINAPP14 induce un alargamiento en la morfología celular en comparación con las mismas células incubadas con DMSO como vehículo. Por otro lado, las células tratadas con **JPINAPP19** inducen grandes cambios en la morfología celular a las 48 h de tratamiento, con evidentes signos redondeamiento y muerte celular

Con el fin de obtener más información acerca del tipo de muerte celular que induce el compuesto **JPINAPP19** se realizó el ensayo de TUNEL posterior a la incubación de la línea celular HeLa por 36 h con el compuesto a una concentración de 50 μ M. Adicionalmente al marcaje de TUNEL, los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). Se demostró que **JPINAPP19** induce células positivas al TUNEL marcadas en verde. También, se pudo observar la condensación de la cromatina y la presencia de pequeños corpúsculos que pueden ser cuerpos apoptóticos. El vehículo no indujo la presencia de células positivas al TUNEL (Figura 3). Estas observaciones pueden sugerir que el compuesto **JPINAPP19** induce apoptosis en células HeLa.

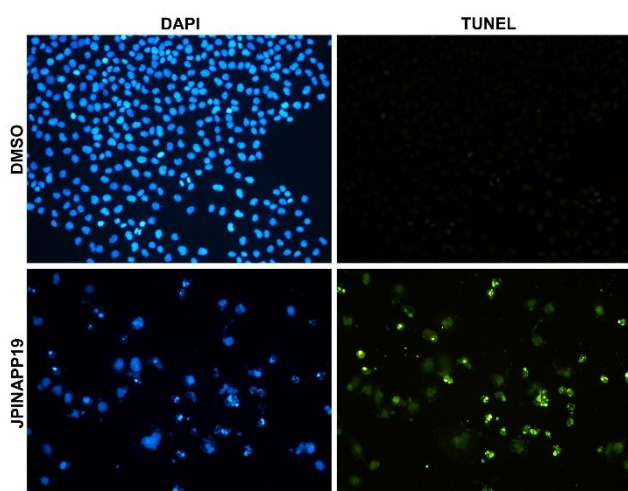


Figura 3. Fragmentación de ADN (verde) inducido por **JPINAPP19** en células HeLa desde las 36 h de tratamiento.

Conclusiones

Los resultados de acoplamiento molecular sugieren que los compuestos **JPINAPP14** y **JPINAPP19** se pueden unir a la tubulina en el sitio que lo hace la colchicina y la combretastatina A-4. Los compuestos presentan actividad citotóxica, siendo más activo el compuesto **JPINAPP19** en las tres líneas evaluadas. El ensayo de TUNEL sugiere que **JPINAPP19** induce apoptosis en células HeLa. No obstante, se requieren más estudios con el fin de poder elucidar completamente el mecanismo de acción citotóxica, así como el tipo de muerte celular inducido por los híbridos entre 2,3-difenil-2*H*-indazol y combretastatina A-4.

Referencias

- OMS Nota descriptiva. Cáncer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (acceso 28 de mayo de 2019)
- Pérez-Villanueva, J.; Yépez-Mulia, L.; González-Sánchez, I.; Palacios-Espinosa, J.; Soria-Arteche, O.; Sainz-Espuñes, T.; Cerbón, M.; Rodríguez-Villar, K.; Rodríguez-Vicente, A.; Cortés-Gines, M.; Custodio-Galván, Z.; Estrada-Castro, D., Synthesis and Biological Evaluation of 2*H*-Indazole Derivatives: Towards Antimicrobial and Anti-Inflammatory Dual Agents. *Molecules* **2017**, *22* (11), 1864.
- 53° Congreso Mexicano de Química, 37° Congreso Nacional de Educación Química 2018. Síntesis y actividad citotóxica de híbridos de 2,3-difenil-2*H*-indazol y combretastatina A-4. Jaime Pérez Villanueva, Ignacio González Sánchez, Martha Leyte Lugo, Ana perla Macías Jimenez, Juan Francisco Palacios Espinosa, Olivia Soria Arteche. Ciudad de México, México. Del 2 al 5 de octubre 2018.
- 53° Congreso Mexicano de Química, 37° Congreso Nacional de Educación Química 2018. Síntesis y actividad citotóxica de nuevos derivados de indazol análogos a combretastatina A-4. Martha Leyte Lugo, Jaime Pérez Villanueva, Ignacio González Sánchez, Juan Francisco Palacios Espinosa, Olivia Soria Arteche. Ciudad de México, México. Del 2 al 5 de octubre 2018.
- Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* **2006**, *1*, 1112–1116.
- González-Sánchez I, Solano JD, Loza-Mejía MA, Olvera-Vázquez S, Rodríguez-Sotres R, Morán J, Lira-Rocha A, Cerbón MA. Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, *46*(6); 2102-2108.
- Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliari, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A., Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49* (11), 3033–3044.
- Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D., An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. *Pharmaceutical Research* **2012**, *29* (11), 2943–2971.