



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

Cernimiento farmacológico de 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas, derivadas de α -aminoácidos. Algunas de sus propiedades fisicoquímicas de importancia biológica.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**DOCTOR EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN EN
MEDICINA**

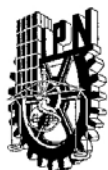
PRESENTA

M. EN F. BENJAMÍN VELASCO BEJARANO

DIRECTORES DE TESIS

**DIRECTOR
DR. JOSÉ G. TRUJILLO
FERRARA**

**CODIRECTOR
DR. RENÉ MIRANDA
RUVALCABA**



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 8 del mes de Agosto del 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis de grado titulada:

“CERNIMIENTO FARMACOLÓGICO DE 2,2-DIFENIL-1,3,2-OXAZABOROLIDIN-5-ONAS, DERIVADAS DE α-AMINOÁCIDOS. ALGUNAS DE SUS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA

Presentada por el alumno:

VELASCO BEJARANO BENJAMIN
Apellido paterno materno nombre(s)
Con registro:

A	0	2	0	3	7	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

DR. GUILLERMO MANUEL CEBALLOS REYES

PRESIDENTE DEL JURADO

DR. PEDRO LÓPEZ SÁNCHEZ

SECRETARIO DEL JURADO

DR. JOSÉ GUADALUPE TRUJILLO FERRARA

1ER. VOCAL DEL JURADO

DR. RENÉ MIRANDA RUVALCABA

2DO. VOCAL DEL JURADO

DRA. LUVIA ENID SÁNCHEZ TORRES

3ER. VOCAL DEL JURADO

DR. JOSÉ GUILLERMO PENIERRES CARRILLO

VOCAL SUPLENTE

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

M. EN C. ELEAZAR LARA PADILLA

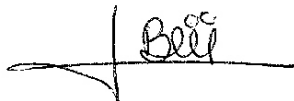


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA DE CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 15 del mes de septiembre del año 2006, el que suscribe **Benjamín Velasco Bejarano** alumno del Programa de Doctorado en Investigación en Medicina con número de registro **A020375** adscrito a la Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara y codirección del Dr. René Miranda Ruvalcaba, cede los derechos del trabajo intitulado *“Cernimiento farmacológico de 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas, derivadas de α -aminoácidos. Algunas de sus propiedades fisicoquímicas de importancia biológica”* al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o Director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección electrónica bevebe@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



BENJAMÍN VELASCO BEJARANO

Este trabajo de tesis Doctoral se realizó en el laboratorio de Bioquímica Médica II del departamento de graduados de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. José G. Trujillo Ferrara; el estudio de las propiedades apoptóticas se realizó en el Laboratorio de Inmunología de los Microorganismos del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la asesoría de la Doctora Luvia Enid Sánchez Torres.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado en Ciencias en Investigación Médica en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, durante el periodo Agosto del 2002 a agosto de 2006.

Asimismo se agradece al Programa Institucional de Formación de Investigadores por el apoyo económico otorgado durante el desarrollo experimental de esta tesis.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la comisión para realizar los estudios correspondientes al Doctorado en Ciencias en Investigación Médica.

ÍNDICE

◆ GLOSARIO	
◆ LISTA DE ESPECTROS	
◆ LISTA DE TABLAS	
◆ LISTA DE FIGURAS	
◆ LISTA DE GRAFICAS	
◆ RESUMEN	
◆ ABSTRACT	
◆ INTRODUCCIÓN	
◆ ANTECEDENTES	
❖ <i>CÁNCER</i>	11
❖ EL CÁNCER: UN PROBLEMA DE SALUD EN MÉXICO	
❖ BASES MOLECULARES DEL CÁNCER	
❖ TRATAMIENTO	
❖ APOPTOSIS	
❖ <i>HETEROCICLOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA</i>	
❖ SÍNTESIS DE 2,2-DIFENIL-1,3,2-OXAZABOROLIDIN-5-ONAS	
❖ <i>DESARROLLO DE FÁRMACOS</i>	42
❖ <i>PARÁMETROS FISISCOQUÍMICOS DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA</i>	
• Importancia de la membrana celular	48
• Constante de Partición (KD)	52
• Energía Libre de Gibbs (ΔG)	54
• Constante Hidrofóbica (π)	57

◆ JUSTIFICACIÓN	58
◆ HIPÓTESIS	59
◆ OBJETIVOS	
❖ GENERALES	61
❖ PARTICULARES	62
◆ MATERIALES Y METODOLOGÍA	
❖ EQUIPO Y MATERIALES	
❖ METODOLOGÍA QUÍMICA	
• Síntesis de 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas.	68
• Determinación del KD.	69
* Metodología para determinación de la KD experimental de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas.	
* Determinación del tiempo óptimo de agitación, empleado para la extracción.	70
* Determinación experimental de los parámetros Log P, ΔG y π .	70
❖ METODOLOGÍA BIOLÓGICA	
• Características de las líneas celulares: HCT15, K562, L5178Y.	71
• Preparación del medio de cultivo suplementado.	72
* Protocolo para el cultivo de células L5178Y.	72
* Protocolo para el cultivo de células K562.	73
* Protocolo para el cultivo de células HCT15.	74
* Preparación de los compuestos.	
• Metodología general empleada para la determinación del CI_{50} .	74

• Metodología para la determinación de Fosfatidilserina.	76
• Metodología para la determinación del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m).	77
• Metodología para la determinación de la Caspasa-3.	77
• Metodología para la determinación de la fragmentación del DNA, de células de linfoma murino L5178Y.	78
* Técnica de pico sub G_0/G_1 .	78
* TUNEL.	79
* Electroforesis de DNA.	79
• Metodología empleada para la determinación de la morfología celular.	80
• Análisis Estadístico.	82
◆ RESULTADOS	
❖ QUÍMICOS	84
❖ BIOLÓGICOS	97
◆ ANÁLISIS	120
❖ QUÍMICOS	
• 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas sintetizadas	
• Datos de KD, log P, ΔG y π .	
❖ BIOLÓGICOS	
• IC ₅₀ determinados experimentalmente	
• Evaluación de:	

-
- * Fosfatidilserina
 - * Caspasa 3
 - * Mitocondrial
 - * DNA
 - * TUNEL
 - * Electroforesis del DNA
 - * Morfología

◆ CONCLUSIONES	137
◆ REFERENCIAS	140
◆ APENDICE	

◆ GLOSARIO

DFOXB	2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
EMIE	espectrometría de masas por impacto electrónico
EMFAB	espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos
EMHR	espectrometría de masas de alta resolución
RMN ¹ H	resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³ C	resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹¹ B	resonancia magnética nuclear de boro 11
IR	espectrofotometría de absorción en el infrarrojo
ADFB	ácido difenilborínico
AIF	Factor Inductor de Apoptosis
SRO	sustancias reactivas de oxígeno
MHz	Mega Hertz
λ_{\max}	longitud de onda máxima
DL ₅₀	dosis letal 50
CI ₅₀	concentración inhibitoria 50
s	señal simple
sext	señal sextuple
d	señal doble
sa	señal ancha
dd	señal doble de doble
m	señal múltiple
<i>J</i>	constante de acoplamiento
δ	desplazamiento químico
pf	punto de fusión
ppm	partes por millón
M ^{+•}	ion molecular
eV	electrón Volts
DMSO	dimetilsulfóxido
Log P	logaritmo base 10 de la KD
KD	constante de distribución
Ψ_m	potencial de membrana mitocondrial
L5178Y	células de linfoma murino
K562	células de leucemia
HCT15	células neoplásicas de colon humano
C6	células de glioma

◆ LISTA DE ESPECTROS

	<i>Página</i>
Espectro 1.- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{11}B del compuesto 1 .	124
Espectro 2.- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del compuesto 1 .	125
Espectro 3.- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del compuesto 1 .	127
Espectro 4.- Espectro de Infrarrojo del compuesto 1 .	128
Espectro 5.- Espectro de Masas (IE) del compuesto 1 .	129

◆ LISTA DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1.- Características morfológicas y bioquímicas de células apoptóticas.	13
Tabla 2.- Hidroxifeniloxazaborolininas con actividad bactericida.	35
Tabla 3.- 2,2-Difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas, sintetizadas por Skoog.	37
Tabla 4.- α -Aminoácidos empleados y rendimientos obtenidos.	38
Tabla 5.- α -Aminoácidos usados en por Flückiger.	39
Tabla 6.- α -Aminoácidos empleados y rendimientos de reacción informados por Farfán et al.	41
Tabla 7.- Composición lipídica aproximada de diferentes membranas celulares.	47
Tabla 8.- Reactivos empleados y especificaciones.	
Tabla 9.- 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas obtenidas en medio alcalino.	
Tabla 10.- Condiciones de reacción empleadas y propiedades físicas.	
Tabla 11.- Desplazamientos químicos en <i>ppm</i> obtenidos por RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$), de los núcleos de hidrógeno, de las oxazaborolidinonas 1-18 .	
Tabla 12.- Desplazamientos químicos en <i>ppm</i> , de los núcleos de carbono y boro obtenidos por medio de RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$), de las oxazaborolidinonas 1-18 .	
Tabla 13.- Valores (ar%) <i>m/z</i> de algunos fragmentos obtenidos por espectrometría de masas mediante la técnica de impacto electrónico a 70 eV de las oxazaborolidinonas 1-18 .	

◆ LISTA DE TABLAS (*Continuación*)

- Tabla **14.-** Bandas características en cm^{-1} de algunas vibraciones fundamentales de las oxazaborolidinonas **1-18**.
- Tabla **15.-** Máximos de absorción de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas **1-18**, determinadas a 25 °C.
- Tabla **16.-** Parámetros fisicoquímicos determinados experimentalmente de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas **1-18**.
- Tabla **17.-** Viabilidad de células inducida por las DFOXB seleccionadas sobre 3 líneas celulares.
- Tabla **18.-** Valores de IC_{50} .
- Tabla **19.-** Efecto de las DFOXB seleccionadas, sobre células L5178Y teñidas con anexina V-FITC/IP.
- Tabla **20.-** Efecto de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas sobre células L5178Y a una concentración de 100 μM por 24 h.

◆ LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Fármacos antineoplásicos.
- Figura 2.- Cambios morfológicos y bioquímicos de una célula apoptótica.
- Figura 3.- Mecanismos bioquímicos de la apoptosis.
- Figura 4.- Estructura de fármacos empleados en la clínica.
- Figura 5.- Cas II-gly.
- Figura 6.- N-(2-mercaptopropionil)glicina.
- Figura 7.- Estructura de la Boromicina.
- Figura 8.- PS-341.
- Figura 9.- 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona.
- Figura 10.- Síntesis general de las 2,2-dietil-1,3,2-oxazaborolidinonas.
- Figura 11.- Estereoestructura obtenida mediante difracción de rayos X de la 2,2-difenil-4-(3-aminopropil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona.
- Figura 12.- Estabilidad hidrolítica de 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidinonas.
- Figura 13.- Modelo de membrana celular.
- Figura 14.- Transporte a través de membrana.
- Figura 15.- Mecanismo general de síntesis de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas.
- Figura 16.-
Figura 17.- Efecto de la DFOXB 1 sobre el volumen celular. FSC vs SSC dot-plot de células L5178Y, incubadas por 24 h y teñidas con Anexina-FITC y IP.
- Figura 18.- Efecto de las DFOXB 1 y 2 sobre el DNA de células L5178Y. Análisis electroforético del DNA.

Figura **19**.- Efecto causado por las DFOXB **1** y **2**, sobre células L-5178Y. Las células fueron teñidas con Giemsa después de ser tratadas por 24 h.

Figura **20**.- Fragmentos m/z propuestos a partir de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona **1**.

◆ LISTA DE GRAFICAS

- Gráfica 1.- Incidencia de cáncer en mujeres.
- Gráfica 2.- Incidencia de cáncer en hombres.
- Gráfica 3.- Cinética de extracción de la DFOXB 1.
- Gráfica 4.- Curva de concentración-efecto de los compuestos 1 y 2.
- Gráfica 5.- Histograma de la distribución del DNA de las células tratadas con 100 μ M del compuesto 1 a las 24 h.
- Gráfica 6.- Efecto de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona 1 a los tiempos de 24, 48 y 72 h.
- Gráfica 7.- Porcentaje de células apoptóticas evaluadas por anexina V.
- Gráfica 8.- Efecto de las DFOXB 1 y 2 sobre la activación de la caspasa 3
- Gráfica 9.- Efecto de las DFOXB 1 y 2 sobre el potencial de membrana mitocondrial.
- Gráfica 10.- Efecto de las DFOXB 1 y 2 sobre la distribución del DNA.
- Gráfica 11.- Efecto de las DFOXB 1 y 2 sobre el DNA de células L5178Y evaluado por la técnica de TUNEL.

◆ RESUMEN

En este trabajo de tesis primeramente se presentan y comentan los resultados correspondientes al diseño y síntesis de una serie de moléculas de la clase de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas, obtenidas a partir de la reacción entre un α -aminoácido y ácido difenilborónico, en condiciones alcalinas de reacción; éstas, en lo general, se generaron con mejores rendimientos que los reportados previamente en medio ácido. Complementariamente, se presentan los valores de los parámetros fisicoquímicos determinados para las moléculas estudiadas, en donde se observo que la molécula obtenida a partir de la glicina, presentó el mejor carácter lipofílico que el resto de la serie estudiada, así mismo se demostró que la presencia de diferentes sustituyentes en la estructura fundamental estudiada, disminuye la lipofilidad de las mismas. Finalmente, se realizó una apropiada discusión alusiva a la cuantificación del porcentaje de inhibición del crecimiento celular, encontrándose que el total de las difeniloxazaborolidinonas evaluadas dieron resultados positivos a esta prueba además se determinó la potencial actividad inductora de apoptosis de las moléculas objetivo, demostrándose que el derivado de glicina indujo apoptosis de manera significativa cuando se trataron células de linfoma murino L5178Y por 24 h a una concentración de 100 μ M. Lo anterior se confirmó por la presencia de manera significativa ($p \leq 0.05$) de fosfatidilserina externalizada, bajo potencial de membrana mitocondrial, presencia de la

caspasa 3 activa, así como fragmentación internucleosomal del DNA, además de presencia de cuerpos apoptóticos.

Por lo que la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona obtenida de glicina, es la molécula con las mejores perspectivas en cuanto a la inducción de apoptosis de la serie estudiada.

◆ **ABSTRACT**

The results of this study show that the modification of the fourth position of this ring by inserting an heterocyclic indole ring or any of the R-groups clearly decreased the observed effect in comparison with the lead compound obtained of glycine. In spite of the fact that 2,2-diphenyl-1,3,2-oxazaborolidin-5-one was more active than the other nine amino acid derivatives, the latter showed a significant concentration dependent growth inhibition of L5178Y cells. Apoptosis of this compound was quantified by flow cytometry using Annexin V to evaluate the flip-flop of phosphatidylserine, (an indicator that the cell is entering the apoptotic process), caspase 3, mitochondrial transmembrane potential, DNA fragmentation. This cell shrinkage was observed as a reduction in the FSC obtained. In conclusion, as indicated in the literature, glycine and its N-derivatives shown cyto-protective effects, as indicated in the literature. Our results confirm that the modification of both the amino and hydroxyl carboxylic groups give rise to apoptotic inducing compounds, unlike the effect of glycine alone, which acts as an apoptotic protector. Further studies are needed to clarify the mechanism of action of the active 2,2-diphenyl-1,3,2-oxazaborolidin-5-ones.

INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades que afecta a cualquier grupo social sin importar la raza, el sexo, la edad o el nivel socio-económico, es el cáncer. Al respecto, se han descrito más de un centenar de tipos diferentes de cáncer, la causa exacta del desarrollo de esta enfermedad no se conoce a ciencia cierta, aunque se tienen bien identificados algunos factores de riesgo que de alguna manera u otra la favorecen, entre los que se encuentran la edad, el sexo, los factores genéticos, además de los hormonales y nutricionales, sin dejar de lado los ocupacionales así como los ambientales, entre otros.

Se ha reconocido que el cáncer se desarrolla de una única célula progenitora genéticamente dañada. En las células cancerosas, el proceso de muerte celular programada o apoptosis el cual se define como: una forma de deceso celular caracterizada por la ejecución de un programa de muerte perfectamente sincronizado y codificado genéticamente, se encuentra inhibido.

Por otro lado, un buen número de informes en la literatura especializada, mencionan el efecto citoprotector frente a la muerte celular por apoptosis en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* de la molécula de glicina. Así mismo algunos N derivados de la glicina han demostrado tener un efecto semejante. Sin embargo, estudios farmacológicos de otra serie de derivados de la glicina en donde particularmente se ha modificado tanto el grupo hidroxilo del sistema carboxílico así como el nitrógeno del grupo amino, han exhibido actividad inductora de apoptosis en células de glioma C6.

Adicionalmente es conveniente mencionar que en los últimos 50 años, ha habido un interés creciente por las aplicaciones biológicas del átomo de boro. Por lo cual se ha aplicado en la terapia de captura de neutrones, obteniéndose buenos resultados, así mismo, se ha estudiado y demostrado que las moléculas que en su estructura incluyen enlaces del tipo B-N tienen actividad biológica interesante como insecticida, fungicida, además de herbicida, y antineoplásica.

Finalmente, la resistencia adquirida de células tumorales después de un tratamiento convencional de quimioterapia es el mayor problema que se presenta en la clínica, por lo que, el desarrollo de nuevas moléculas anticancerígenas con marcada selectividad farmacológica, bajo costo además de un menor número de reacciones adversas, ha conducido los esfuerzos de los químicos para diseñar un sin número de moléculas, las cuales puedan actuar a través de diferentes mecanismos sobre las células tumorales. También, es conveniente mencionar que, al llevar a cabo un diseño racional de moléculas las cuales puedan ser empleadas como fármacos, se deben de tener en consideración una serie de factores fisicoquímicos y estructurales, los cuales de una manera u otra pueden influenciar la respuesta biológica esperada; por lo que se hace necesario conocer sus propiedades lipofílicas, hidrofílicas, energéticas así como la contribución que los sustituyentes puedan estar aportando a las mismas.

Al respecto, en este trabajo de tesis doctoral, en primer lugar se diseñaron y sintetizaron una serie de diez y ocho moléculas de la serie de las 2,2-difenil-

1,3,2-oxazaborolidin-5-onas, las cuales comúnmente se han obtenido de la reacción entre un α -aminoácido y ácido difenilborónico, empleando condiciones de reacción ácidas; sin embargo durante esta investigación se llegó a su síntesis en condiciones alcalinas dando origen a un nuevo protocolo para su generación. En este sentido es conveniente hacer mención que se mejoraron en forma general los rendimientos de reacción con respecto a los informados previamente por otros autores. La identificación de las moléculas objetivo se realizó por medio de técnicas espectroscópicas comunes en el ámbito químico: resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{11}B , así como espectrometría de masas empleando la técnica de ionización por impacto electrónico y experimentos de alta resolución para establecer peso y composición elemental de los productos, además de la determinación de grupos funcionales por espectrofotometría de absorción infrarroja. En una segunda etapa, y empleando protocolos preestablecidos y avalados internacionalmente, se determinaron los valores de KD y Log P de la serie de compuestos estudiados, encontrándose que la difeniloxazaborolidinona obtenida a partir de la glicina, presentó los mejores valores al respecto de estos parámetros que el resto de las moléculas sintetizadas, observándose una tendencia a disminuir al incluir en su estructura grupos hidrofílicos.

Finalmente en una tercera etapa, por cierto la más importante, se hizo un estudio profundo para la determinación del carácter citotóxico de este grupo de moléculas, encontrándose que los productos exhiben en diferente

proporción efectos citotóxicos sobre las células de linfoma murino L5178Y, atribuyéndosele a la molécula generada a partir de glicina, el mayor efecto citotóxico. En este mismo contexto y de manera complementaria se valoró la actividad inductora de apoptosis de los compuestos estudiados determinándose que el derivado de glicina indujo apoptosis en células de linfoma murino L5178Y al ser tratadas con una concentración de 100 μ M por 24 h, de manera significativa. Esta evaluación se realizó mediante la cuantificación de las células tratadas con los compuestos de interés que mostraban fosfatidilserina en la superficie celular, bajo potencial de membrana mitocondrial, además de la presencia de la caspasa 3. La fragmentación internucleosomal del DNA, la cual es característica de la muerte celular vía apoptosis, se juzgó por medio de las técnicas de pico sub G₀/G₁, TUNEL y electroforesis de DNA. Complementariamente, las características morfológicas de las células que están muriendo por apoptosis, se evidenciaron al teñirse con giemsa, dada la presencia de cuerpos apoptóticos, así como una alteración contundente de la membrana celular.

Con los datos generados de la actividad apoptótica, en este trabajo de tesis, se determinó que la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona obtenida de glicina, presenta las mejores expectativas como molécula antineoplásica de manera significativa, con respecto al grupo control y al resto de las moléculas evaluadas.

ANTECEDENTES

❖ CÁNCER

El cáncer es una enfermedad que se presenta en cualquier grupo social sin importar raza, sexo, edad o nivel socio-económico.

La primera información escrita sobre el tratamiento de un paciente con cáncer data del año 1600 a.C. y se trata de un papiro egipcio que relata la primera operación quirúrgica para la extracción de un tumor sólido (De Vita et al., 1999). Hay más de cien tipos diferentes de cáncer, pero la causa exacta de esta enfermedad aun no se conoce. Sin embargo, se tienen bien identificados algunos factores de riesgo que pueden desencadenar la enfermedad. Dentro de éstos se encuentran la edad, sexo y predisposición genética.

Sin embargo, hay otras circunstancias como las hormonales, nutricionales (dietas altas en grasa, alimentos ahumados, alcohol), ocupacionales (radiólogos, deshollinador), ambientales (radiaciones ionizantes), o el estilo de vida que pueden ser eliminadas, minimizadas o controladas, permitiendo de esta manera prevenir el cáncer (De Vita et al., 1999; Cotran et al., 1995).

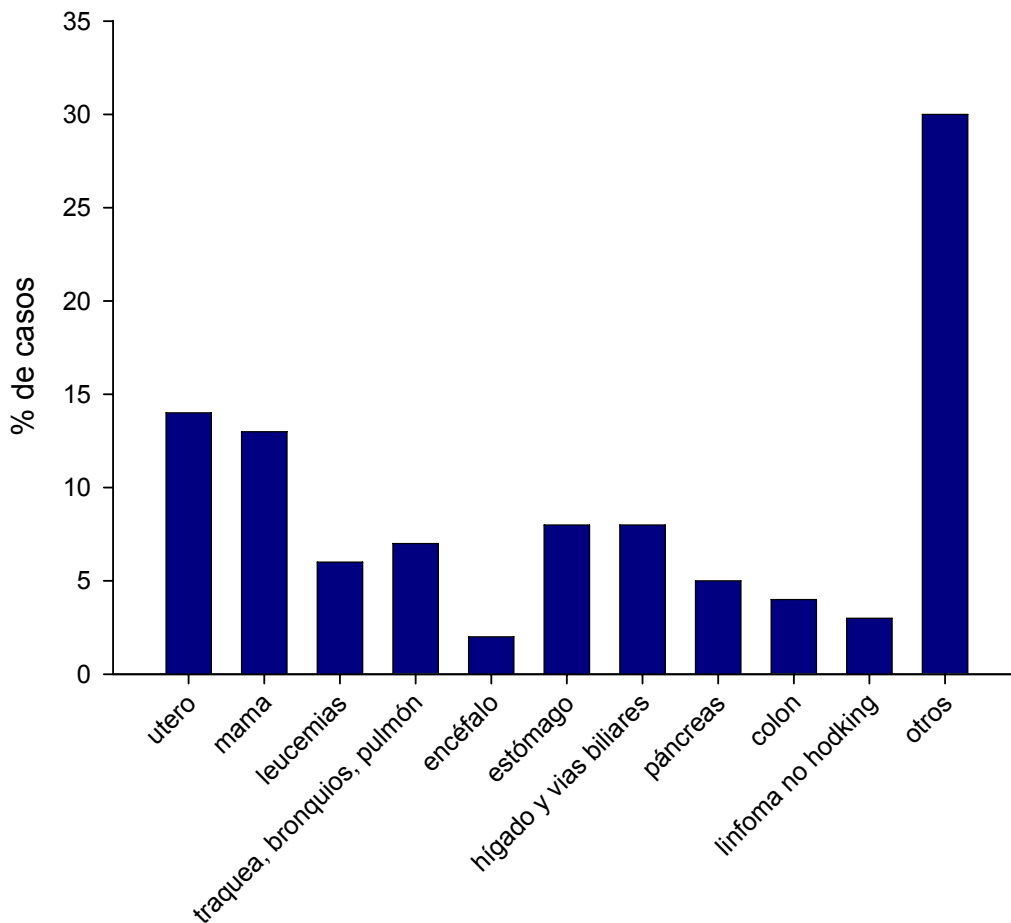
La neoplasia (que en latín significa “nuevo crecimiento”) es una anomalía en la diferenciación, maduración y control del crecimiento celular. Por lo común, las neoplasias se reconocen por la formación de masas de tejido anormal (tumores). El término *tumor* se puede aplicar a cualquier hinchazón y en este contexto, uno de los síntomas principales es la inflamación, pero se emplea con más frecuencia para denotar una neoplasia sospechada. Las

neoplasias pueden ser benignas o malignas dependiendo de varias características, principalmente por la capacidad de las neoplasias malignas de propagarse a partir del sitio de origen. Las neoplasias benignas crecen pero permanecen localizadas. Al respecto, el cáncer denota una neoplasia maligna (Chandrasoma y Taylor, 1994). Como se mencionó anteriormente, el cáncer es una enfermedad que se presenta indistintamente en cualquier persona, por lo que en nuestro país se considera un serio problema, y todos los esfuerzos encaminados a la generación de nuevas moléculas entineoplásicas cobra singular importancia.

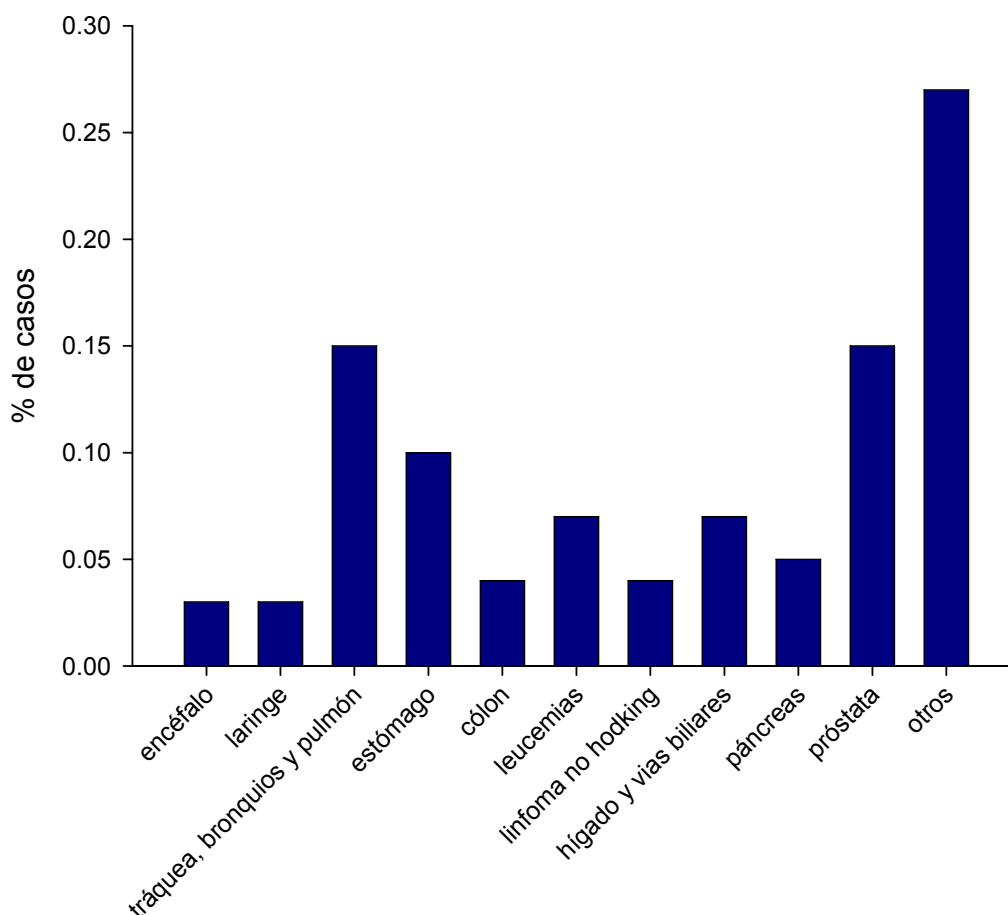
❖EL CÁNCER UN PROBLEMA DE SALUD EN MÉXICO.

En México, las defunciones causadas por el cáncer se distribuyen de acuerdo a la edad y al sexo (Gráficas 1 y 2). Es así que, entre la población de uno a cuatro años, los tumores malignos son la quinta causa de muerte (6.1 % del total de muertes); entre 5 y 14 años, este tipo de tumores representa la segunda causa de muerte (15.1 %), sólo la leucemia causa el 57.6 % de estos fallecimientos. Por otro lado, en la población entre 15 a 24 años representa la tercera causa de muerte en general (7.8 %), en los varones es la cuarta causa de muerte y en las mujeres la segunda. Asimismo, en la población de edades comprendidas entre 25 a 34 años los tumores malignos se ubican como la tercera causa de muerte en general (9.1 % de los decesos), este mismo porcentaje se presenta en la población de entre 35 a 44 años. La segunda causa de muerte es debida a los tumores

malignos en la población entre 45 a 64 años de edad. Finalmente, en la población mayor a 65 años, los tumores malignos significan la tercera causa de muerte (13.3 % del total de decesos). Por lo anterior, la investigación científica encaminada al diseño de moléculas útiles en la terapia oncogénica, en todos los ámbitos: químico, fisicoquímico, farmacológico, toxicológico etc. justifica ampliamente este tipo de investigación.



Gráfica 1.- Incidencia de casos de cáncer informados por el INEGI en el 2005, en mujeres.



Gráfica 2.- Incidencia de casos de cáncer informados por el INEGI en el 2005, en hombres.

❖ **BASES MOLECULARES DEL CÁNCER**

El cáncer es considerado como una enfermedad genética. Los tumores se desarrollan de una única célula progenitora genéticamente dañada (Chandrasoma y Taylor, 1994; Stevens y Lowe, 1997; Klug y Cummings, 1999).

Existen tres familias de genes que, cuando sufren una lesión, pueden dar origen al desarrollo del cáncer: los protooncogenes, facilitadores del crecimiento, los genes supresores, que inhiben el crecimiento tumoral, y los genes, que regulan la apoptosis. La carcinogénesis es un proceso multifactorial. Los atributos de la malignidad, es decir, la capacidad de invasión, el crecimiento excesivo y la evasión del sistema inmunitario, son rasgos que se adquieren paso a paso en un proceso que se denomina progresión tumoral. Sin embargo, ninguna alteración genética aislada es suficiente para inducir la aparición de cáncer *in vivo*. Los múltiples controles ejercidos por las tres categorías de genes (oncogenes, genes de supresión tumoral y genes reguladores de la apoptosis) deben desaparecer o alterarse para que a su vez aparezcan las células tumorales (Cotran, 1995; Klug y Cummings, 1999). Al respecto, se han desarrollado diferentes terapias con el fin de controlar y en algunos casos eliminar las células cancerosas. A continuación y de manera general se describen las aplicaciones de cada una de ellas.

❖ TRATAMIENTO

El tratamiento del cáncer es muy variable y depende del tipo, localización, tamaño del tumor y tiempo en su diagnóstico, además del estado general de salud del paciente. En algunos casos, el tratamiento a elegir consiste en la remoción directa del tumor o la eliminación o estimulación de las señales propias de la división celular. Existen por lo menos cuatro alternativas generales de tratamiento de las neoplasias, en algunos casos se hace necesario recurrir al empleo de más de una de ellas, para la adecuada erradicación del tumor: (Chandrasoma y Taylor, 1994; Stevens y Lowe, 1997).

- Cirugía. Es el primer tratamiento a elegir, para los casos donde el tumor se detecta en una etapa temprana.
- Radioterapia. Se puede usar en conjunto con cirugía o tratamientos farmacológicos y el objetivo es matar directamente a las células cancerosas por medio de radiaciones de alta energía.
- Inmunoterapia. Estos modifican la relación huésped tumor, modificando la respuesta biológica del huésped.
- Quimioterapia: Esta coadyuva y complementa sistemáticamente el tratamiento local de los cánceres de mama, colon y recto, además se emplea como parte de un procedimiento para el tratamiento inicial de

muchas otras neoplasias incluso en etapas avanzadas de cáncer de cabeza y cuello, pulmón, cervicouterino y esofágico.

Particularmente en este trabajo de tesis, se han diseñado y evaluado biológicamente una serie de moléculas que puedan ser, en un futuro empleadas como un fármaco quimioterapéutico. Hay pocos medicamentos disponibles en el mercado que presentan tantos efectos adversos como los mostrados por los fármacos antineoplásicos. Los fármacos sintetizados durante los años 1950 a 1970 y que fueron empleados en la quimioterapia oncológica, interactuaban en gran medida con el DNA o sus precursores e inhibían la síntesis de nuevo material genético o causaban daño irreparable al propio DNA (Martínez y Chacon, 2005). Los esfuerzos para mejorar y generar quimioterapéuticos cada vez más específicos, ha conducido al desarrollo de diferentes agentes anticancerígenos. En la Figura 1 se presenta de manera general los sitios de acción de algunos fármacos empleados en la terapia oncológica. Al respecto, algunos de los mecanismos de estos fármacos, tratan de favorecer el proceso apoptótico por diferentes caminos en células cancerosas en donde este proceso se encuentra inactivado por lo que el estudio de los mecanismos de activación de la apoptosis se hace necesario.

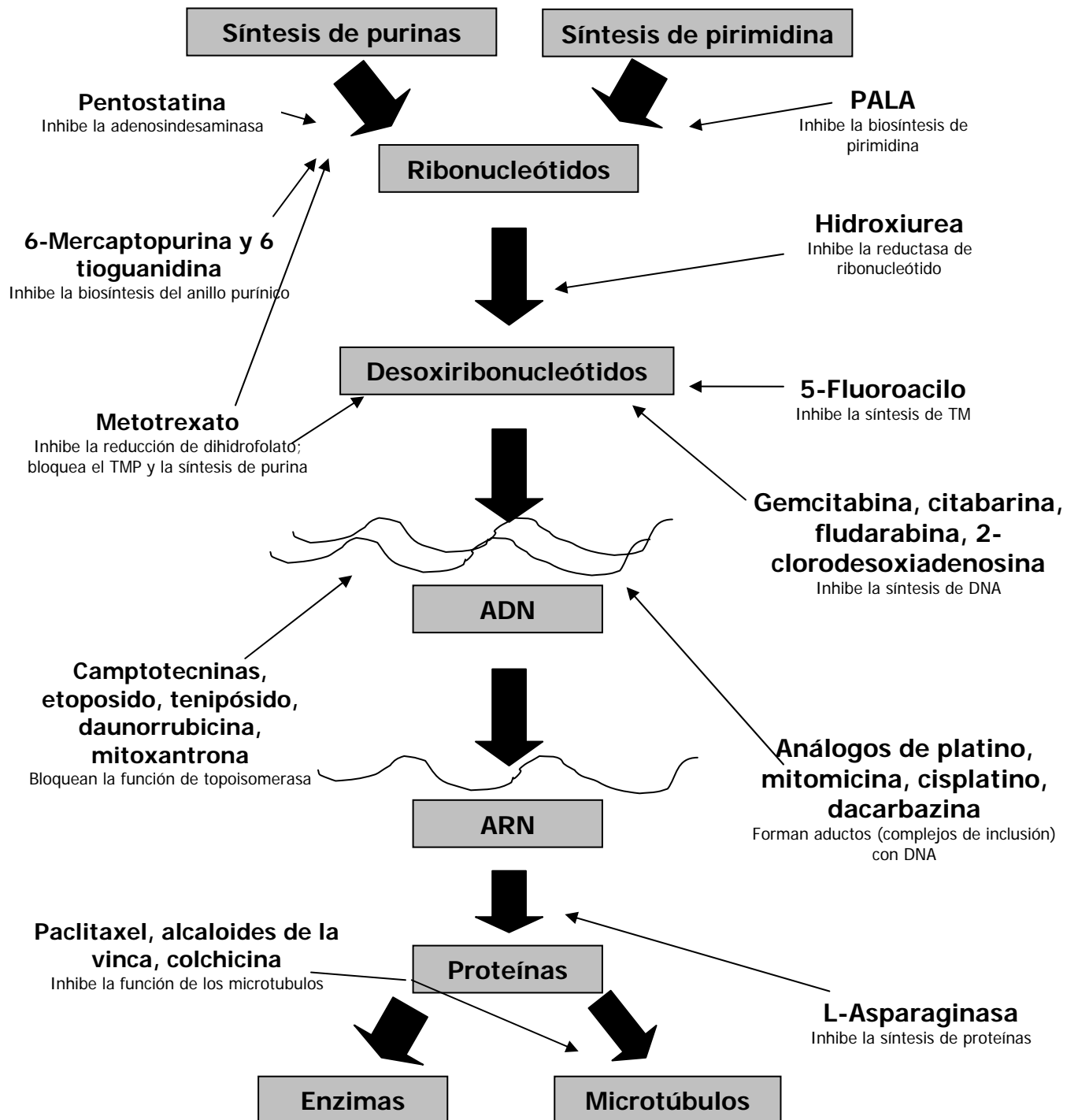


Figura 1.- Fármacos de acción antineoplásica.

❖ APOPTOSIS

De manera general, se reconocen dos tipos de muerte celular: una de ellas conocida como necrosis, la cual fue descrita desde 1858 por Virchow, y la apoptosis, la cual se describió detalladamente a partir del año de 1965. La necrosis puede definirse como un fenómeno degradativo producido por daño repentino y severo. Este fenómeno se puede desencadenar por factores como la isquemia, la hipertermia o hipotermias severas, el trauma físico o químico, así como altas concentraciones de agentes tóxicos (Mi Ja, et al., 2005; Moffatt, 2000; Masquelier, 2004; Pulido, 2003). Por otro lado, la apoptosis se define como una forma de deceso celular caracterizada por la ejecución de un programa de muerte perfectamente sincronizado con el cual cuentan todas las células y que está codificado genéticamente (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003; Evan y Vousden, 2001). Este se caracteriza, por cambios morfológicos y estructurales además de un aumento en el tamaño mitocondrial, liberación del citocromo c, condensación de la cromatina, activación de las caspasas, fragmentación internucleosomal ordenada del DNA, así como la fragmentación celular (Yuan et al., 2006; Bursch et al., 1992; Ming-Jie et al., 2004; Shakibaei et al., 2005; Schultz y Harrington, 2003). Al respecto, en la Tabla 1, se presentan las características morfológicas y bioquímicas propias del proceso apoptótico (Ramírez, 1999).

El término apoptosis deriva del griego *apo* que significa separación o derivación y *ptosis* caída. El término resalta el carácter fisiológico de la apoptosis, ya que implica que para que un organismo funcione adecuadamente no sólo debe tener la capacidad de producir nuevas células, sino también la habilidad de eliminar las que ya no cumplen con las funciones que tienen asignadas.

Tabla 1.- Características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis.

Alteraciones morfológicas.	Alteraciones bioquímicas/funcionales.
Disminución del tamaño celular.	Aumento de calcio iónico libre.
Condensación del citoplasma.	Interacción entre Bcl2/bax.
Engrosamiento del retículo endoplásmico.	Deshidratación celular.
Cambios en la membrana nuclear.	Pérdida del potencial de membrana mitocondrial.
Fragmentación nuclear.	Proteólisis.
Pérdida de estructura de la superficie celular.	Externalización de fosfatidilserina.
Formación de cuerpos apoptóticos.	Proteólisis de la lámina B.
Células aisladas.	Desnaturalización del DNA.
La célula es fagocitada rápidamente.	Fragmentación de DNA en 50-3000Kd.
No hay reacción inflamatoria.	División intranucleosomal.

La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica (Ameisen, 1996).

El proceso apoptótico se puede dividir en tres etapas: La fase de iniciación, ésta puede ser activada por diferentes señales intra o extracelulares. Las primeras son originadas por estrés biológico el cual provoca la liberación del citocromo *c* de la mitocondria, esta vía se reconoce como vía intrínseca (Dong-Ming et al., 2004). Por otro lado, algunas señales extracelulares activan este proceso, al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco, esta vía se reconoce como extrínseca (Hengartner, 2000; Nagata, 1999).

En la fase de ejecución, las células que han recibido una señal que activa la apoptosis, pierden contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular (Fig. 2 A). Los organelos citoplasmáticos permanecen intactos, sin embargo, en la mitocondria se dan cambios como la reducción del potencial transmembranal, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (Fig. 2 B) (Kroemer et al., 1997; Madeo, et al., 1999; Esteve, et al., 1999). En etapas posteriores, la cromatina se condensa manteniéndose alrededor de la envoltura nuclear y se fragmenta (Fig. 2 C). Finalmente, la célula apoptótica genera un número variable de vesículas de diferentes tamaños rodeados de membrana plasmática íntegra, que contiene

partes de de la cromatina y de los organelos celulares. A estas vesículas se les reconoce como cuerpos apoptóticos (Fig. 2 D) (Cohen, 1993).

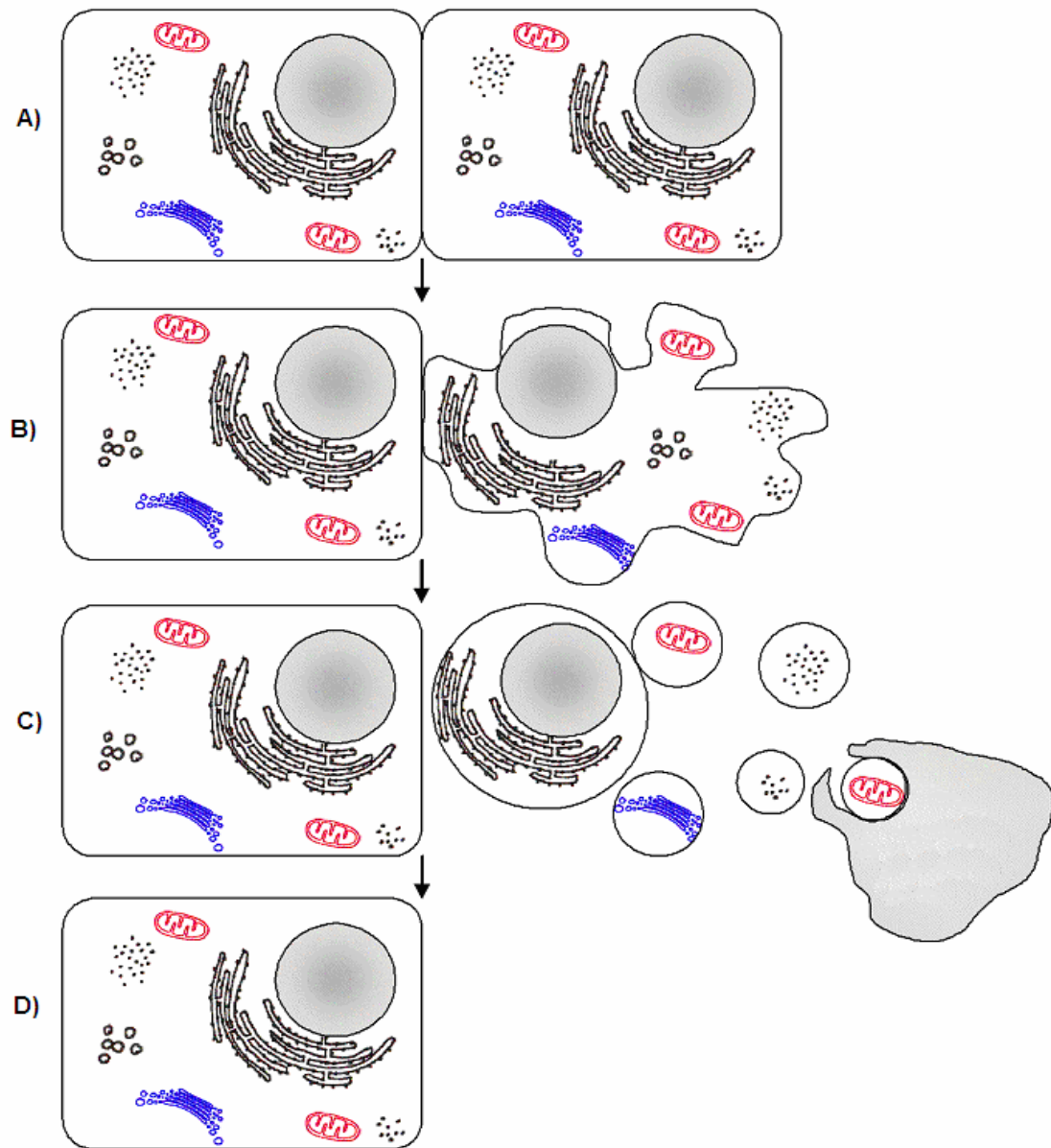


Fig. 2.- Cambios morfológicos y bioquímicos de una célula en apoptosis.

A nivel bioquímico, cuando un inductor de apoptosis llega a su célula blanco, avanza a través de ella gracias a intermediarios que dirigen dicha señal hacia la maquinaria enzimática (caspasas) responsable de los cambios que presenta la célula durante la apoptosis (Kroemer et al., 1997; Mehmet, 2000; Thornberry y Lazabnik, 1998; Vaux y Strasser, 1996). La apoptosis es mediada por la acción proteolítica de las caspasas las cuales son cisteinil proteasas (Cohen, 1997). Existen descritas 14 caspasas diferentes en mamíferos de las cuales 12 se han descrito en humanos (Nicholson, 2000). Tanto la apoptosis inducida por unión del receptor con su ligando, como la desencadenada por la liberación del citocromo *c* al citoplasma provocan la activación de estas enzimas. Las caspasas que se activan durante la muerte apoptótica, dependen del estímulo pudiendo converger en las caspasas que intervienen al final de la cascada de señalización (Cregan et al., 2004) (Fig. **3**).

Las caspasas son sintetizadas como zimógenos, por lo que requieren de un procesamiento proteolítico para volverse activas (Mehmet, 1997; Thornberry, 1998). Entre algunas de las funciones de las caspasas está la inactivación de proteínas que normalmente protegen a la célula de la muerte por apoptosis de aquellas involucradas en la reparación de ADN y de las encargadas de la organización del citoesqueleto (Kothakota, 1997), además de participar en la destrucción de la lámina nuclear (Goulet et al., 1998; Neamati et al., 1995) y de inducir la expresión de señales que las marcan para ser fagocitadas (Platt, 1998). Existen informes que indican que la familia TNF son potentes

inductores de la apoptosis mediada por caspasa en una gran variedad de células, las cuales pueden ser activadas por la transcripción del factor NF- κ B (Ashkenazi, y Dixit, 1990; Bradham et al., 1998; Xu et al., 1998).

La caspasa 3 activa, es un marcador de células en vías de apoptosis, esta caspasa consiste en un heterodímero de subunidades de 17 y 12 KDa derivadas de una proenzima de 32 KDa. Esta cisteinilproteasa es una de las más importantes dentro de la fase de ejecución de muerte celular y puede ser activada durante los estados tempranos de apoptosis y por otros miembros de la familia de las caspasas, así como por moléculas localizadas en el citoplasma, por ejemplo BCl-2 (como resultado de daño mitocondrial) y D4-GDI en el núcleo. Por otro lado, la fragmentación del ADN ha sido el sello distintivo de un proceso apoptótico (Chen et al., 2004; Deng et al., 2004). Éste primeramente se fragmenta en pedazos de 50 a 300 Kilobases y, posteriormente, en pequeños fragmentos de 180 a 200 pares de bases y múltiplos de ellos, que en un corrimiento electroforético se reconoce como patrón de escalera (Enari, 1998; Collins et al., 1997; Cohen y Duke, 1984; Pandey et al., 1997).

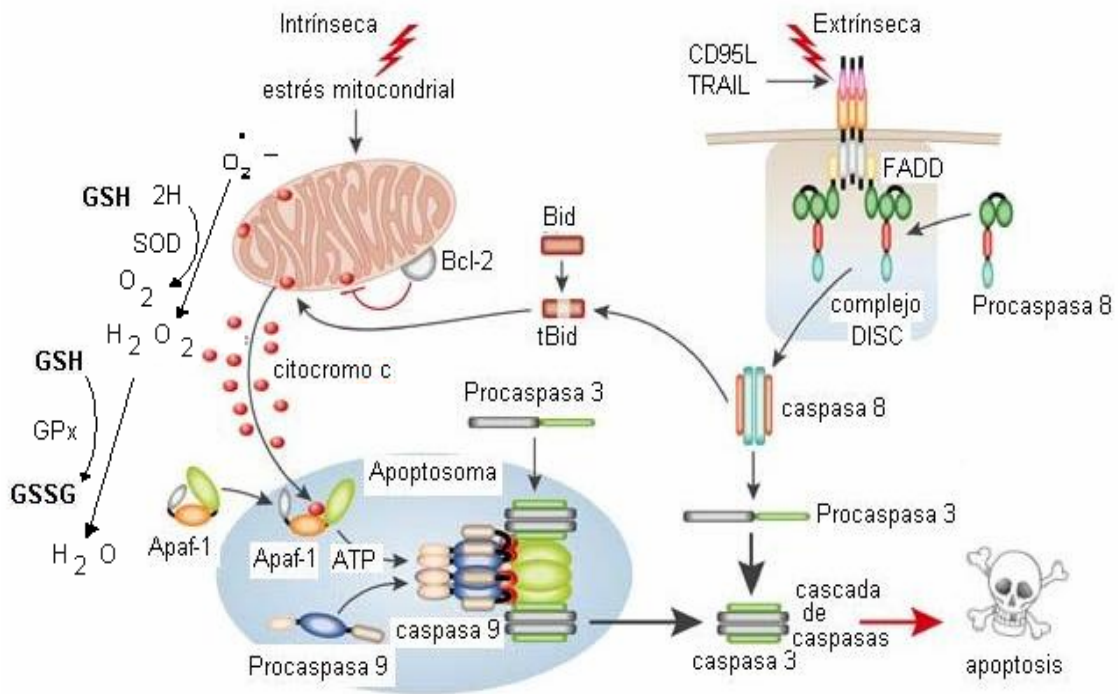


Figura 3.-Mecanismos bioquímicos de la apoptosis.

Las dos vías de activación del proceso apoptótico, tanto la extrínseca como la intrínseca, pueden confluir en la caspasa 3, la cual es común en las dos vías (Bajt, 2001). La vía extrínseca puede ejemplificarse con la señal proapoptótica que se desencadena por la unión de Fas con su ligando. FasL (CD95L) es un trímero que al unirse con Fas induce la trimerización de este. Esta unión provoca el reclutamiento del complejo DISC al dominio citoplasmático de Fas. DISC contiene proteínas adaptadoras que permiten la

unión de la pro-caspasa 8 favoreciendo su autoactivación; la caspasa 8 puede entonces activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Hengartner, 2000; Nagata, 1999). Aunado a esto, la caspasa 8 puede activar a BID (miembro de la familia pro-apoptótica Bcl-2) y ésta inducir la liberación del citocromo *c* y Apaf-1 de la mitocondria para fomentar el apoptosoma y activar también la vía intrínseca.

La vía intrínseca o mitocondrial se activa por estrés y otras señales que provocan la traslocación a la mitocondria de miembros pro-apotóticos de la familia Bcl-2, como Bax, con la posterior liberación del citocromo *c* al citosol, lo cual se acompaña de pérdida del potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. Ya en el citosol, el citocromo *c* se une a Apaf-1 y una vez unido y en presencia de dATP o ATP se forma el complejo conocido como apoptosoma. La formación del apoptosoma conduce de manera irreversible al desencadenamiento del proceso apoptótico, además recluta y activa a la pro-caspasa 9, la cual puede a su vez activar a las caspasas 3, 6 y 7 (Kroemer et al, 1998). Estas son las responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas, ya que entre sus sustratos se encuentran proteínas del citoesqueleto, de la membrana nuclear y las encargadas de la reparación del ADN, entre otras.

Aunque la muerte celular ocurre de manera constante en un organismo, las células que están muriendo por apoptosis son rara vez vistas *in situ*, debido a que son rápida y eficientemente removidas por células fagocíticas (Wyllie et

al., 1980; Cohen, 1993; Platt, 1998; Cohen et al., 1992; Savill et al., 1993). Este hecho diferencia a la apoptosis de la necrosis, ya que en esta última, hay liberación de contenido citoplasmático, lo que desencadena un proceso inflamatorio (Kerr et al., 1972).

Los fagocitos profesionales son los responsables de eliminar la mayoría de las células apoptóticas (Gregory, 2000), pero existen evidencias de que fagocitos no profesionales, como las células dendríticas, epiteliales y fibroblastos, también participan en la remoción de células apoptóticas.

Son varios los mecanismos de reconocimiento de las células apoptóticas, lo cual parece ser un evento conjunto que involucra varios receptores que pueden funcionar aislada, simultánea o secuencialmente. La existencia de más de un mecanismo de reconocimiento asegura la remoción eficiente de células apoptóticas, disminuyendo la posibilidad de que estas células liberen su contenido citoplasmático y causen daño. Un requisito esencial para que las células apoptóticas sean reconocidas y fagocitadas es la expresión de un ligando adecuado en su superficie celular y de su contraparte en el fagocito. Uno de los mecanismos de reconocimiento más ampliamente estudiado y que al parecer es una señal que siempre está presente en los linfocitos apoptóticos, es la pérdida de la asimetría de la membrana celular, la cual tiene como consecuencia la exposición en la membrana externa de moléculas de fosfatidilserina, que de manera normal está restringida a la parte interna. Se ha propuesto que la exposición de la fosfatidilserina es una

señal suficiente para inducir la fagocitosis de las células que la presentan (Fadok et al., 1992; Martin et al., 1995; Yuan et al., 2006)

Por otro lado, las células reciben constantemente señales de vida y de muerte y es el contexto celular el que determina el resultado final. De manera normal, las células tienen en su interior la maquinaria enzimática necesaria para ejecutar el programa apoptótico. Se ha considerado la posibilidad de que la señal apoptótica induce la muerte celular a través de la degradación de proteínas anti-apoptóticas que están regulando la vida de las células. Se han descrito varias moléculas que participan en la regulación y de acuerdo a su estructura se pueden agrupar en familias. Entre las más importantes se pueden citar a las proteínas de la familia de Bcl-2 a las IAPs (Proteínas inhibidoras de la apoptosis) y a las FLIP (Proteínas inhibidoras de caspasa 8).

Los miembros de la familia Bcl-2 participan en la regulación de la apoptosis al controlar la permeabilidad mitocondrial y la liberación del citocromo *c* (Hengartner, 2000; Kroemer et al., 1997). En esta familia de proteínas se encuentran moléculas pro y anti-apoptóticas. Las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-x_L) se encuentran en la membrana externa inhibiendo la liberación del citocromo *c* (Boise y Thompson, 1997), mientras que las moléculas pro-apoptóticas (Bad, BID, Bax y Bim) se localizan en el citosol y se trastocan a la mitocondria después de recibida la señal de muerte donde promueven la liberación del citocromo *c* (Yoshino et al., 2001). Las proteínas

de la familia de IAP, se encargan de la inhibición directa de las caspasas activas. Entre los miembros de esta familia se encuentran XIAP, c-IAP, y c-IAP2, las cuales tienen como función inhibir a varias caspasas (3, 7 y 9) al unirse a ellas y bloquear su actividad.

La familia FLIP, v-FLIP y c-FLIP inhiben la apoptosis inducida por los receptores Fas y TNFR1 entre otros (Thome y Tschopp, 2001).

Por otro lado, son loables los logros que se han alcanzado en la búsqueda de nuevos quimioterapéuticos útiles en la terapia antineoplásica. A continuación se describen una serie de moléculas que han presentado actividad antineoplásica, los cuales tienen estrecha relación con las moléculas estudiadas en este trabajo de tesis.

❖ HETEROCICLOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Un número importante de fármacos que se emplean en la clínica para el tratamiento de enfermedades son estructuras heterocíclicas; asimismo, este tipo de sistemas desempeñan un papel determinante en la economía celular, basta decir que en la naturaleza sistemas heterocíclicos como las purinas y pirimidinas forman parte fundamental del DNA. Particularmente, en el campo de la terapia oncológica moléculas útiles como la: isofosfamida, dacarbazina, temozolomida, 5-fluoroacilo, capecitabina, mercaptopurina, fludarabina, entre otros, tienen como estructura fundamental un sistema heterocíclico (Fig. 4).

Al respecto, en la literatura especializada existe un variado número de informes que hacen referencia a nuevas moléculas, las cuales han presentado actividad apoptótica. Es así que, la Casiopeina II-gly (CasIIgly), ha presentado actividad inductora de apoptosis cuando se trataron *in vitro* células de glioma C6 a diferentes concentraciones de CasII-gly, (generando, inhibición de la proliferación celular, incremento de ROS, traslocación de AIF, fragmentación internucleosomal de DNA, traslocación de citocromo *c* y activación de la caspasa 3 (Trejo-Solis, 2005)).

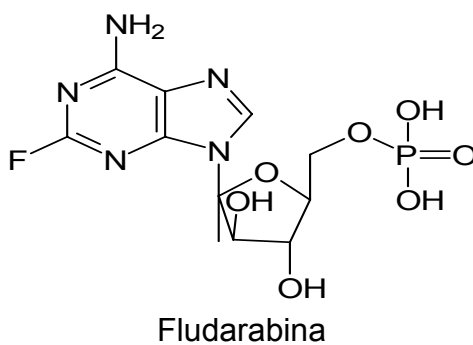
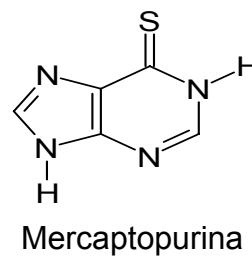
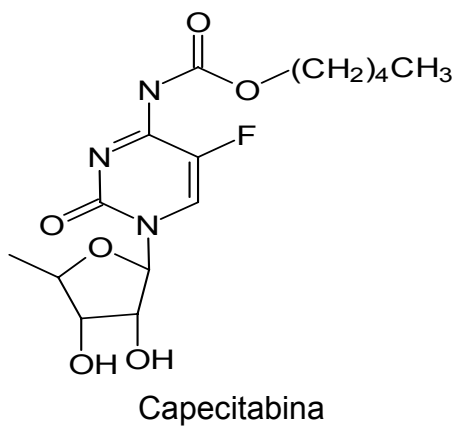
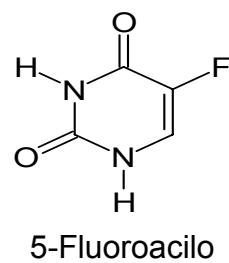
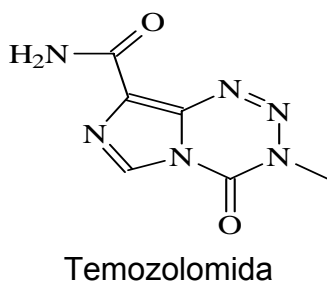
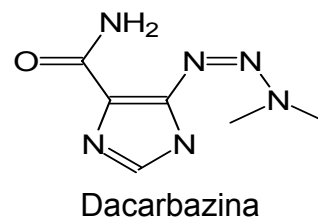
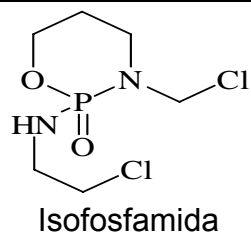


Figura 4.- Fármacos antineoplásicos empleados en la clínica.

Es importante mencionar que la Casiopeina II gly, se generó a partir de la glicina; en esta molécula, el grupo hidroxilo del sistema carboxilo, así como el grupo amino, se han modificado (Fig. 5).

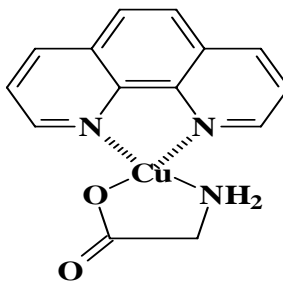


Fig. 5 Cas II-gly

Adicionalmente, la glicina ha demostrado tener actividad citoprotectora en modelos de isquemia-reperfusión tanto en rata como en perro (Weinberg et al., 1990; Nagatomi et al., 1997; Kallakuri et al., 2003). Al respecto, otros autores han evaluado este aminoácido en modelos *in vitro*, encontrando efectos antiapoptóticos (Ascher et al., 2000; Yan-Jun et al., 2000; Jacob et al., 2003; Beales y Ogunwobi, 2006). Algunos autores consideran que el efecto protector de la glicina es debido a que mantiene la integridad mitocondrial y preserva los niveles de energía, otro grupo sugiere que su efecto es debido a la inhibición de canales de cloruro (Millar y Schnellmann, 1993). Resultados semejantes han mostrado tener sus N derivados, tal es el caso de la N-(2-mercaptopropionil)glicina (Fig. 6), la cual presentó actividad cardioprotectora en el modelo de corazón-isquemia-reperfusión, esto debido

a la preservación de la función mitocondrial (Tanonaka et al., 2003; Tripathi et al., 2000), además esta molécula también presenta actividad como inhibidor de la apoptosis en modelos *in vivo*.

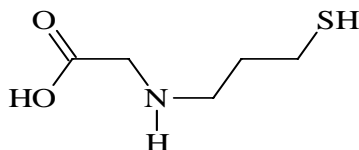


Fig. 6

Por otro lado, hay un interés creciente en la síntesis de moléculas orgánicas que incluyan en su estructura enlaces particularmente con el átomo de boro, esto debido a que moléculas que los contienen, han presentado actividad biológica interesante tales como: herbicidas, antimicóticos, bactericidas, así como su posible actividad antitumoral.

Al respecto, la boromicina (Fig. 7) un macrólido obtenido por fermentación de actinomicetos, presenta un átomo de boro que se encuentra tetracoordinado con átomos de oxígeno. Esta molécula ha demostrado tener actividad antibiótica, a tal grado que ya se encuentra comercialmente disponible (Hunt, 2002; Pache, 1969).

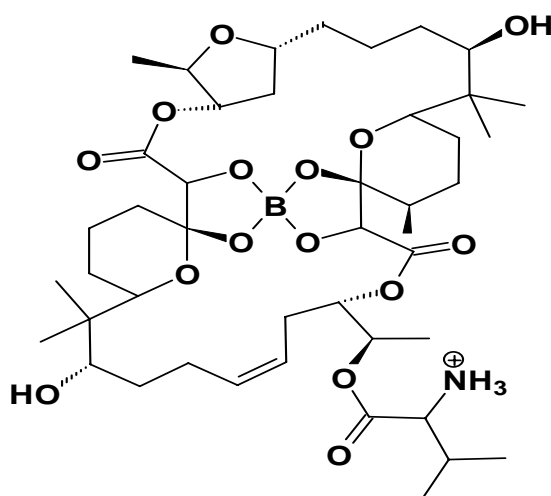


Fig. 7

Por otro lado, en 1999 se describió la actividad anticancerígena de un derivado sintético del ácido borónico denominado PS-341 (Fig. 8) (Sunwoo, 2001; Cusack, 2001), el cual es un dipéptido que ha demostrado tener la capacidad de inhibir al proteasoma, el cual al ser evaluado sobre células de carcinoma MCF-7 (Tumor de cerebro), se determinó una CI_{90} de $0.05 \mu\text{M}$ a las 24 horas de exposición.

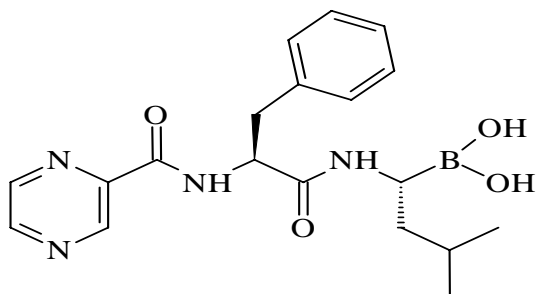
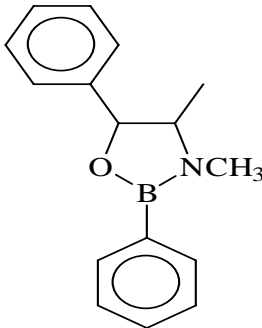
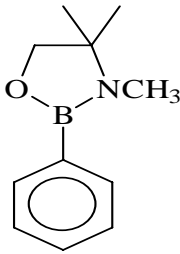
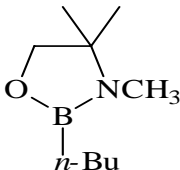
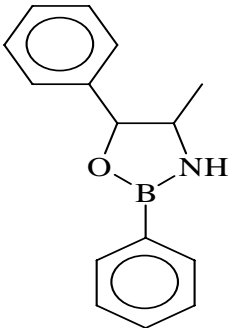
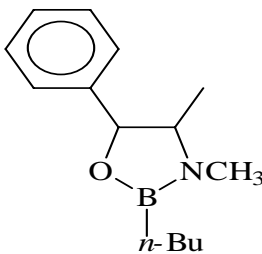
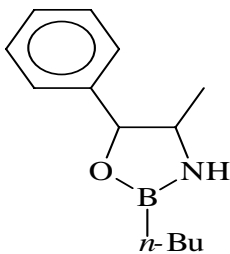
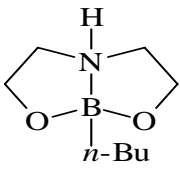
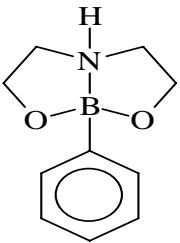


Fig. 8.- PS-341

Asimismo, en el año 2004, se informó de la actividad antibacterial que mostró una familia de hidroxifeniloxazaborolidinas, al ser evaluadas sobre una cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 27351), obteniéndose valores de concentración mínima inhibitoria. En la Tabla 2, se presentan los resultados obtenidos los cuales están expresados en mM.

Tabla 2.- Hidroxifeniloxazaborolidinas con actividad bactericida.

			
CMI 1.55 mM	CMI 6.0 mM	CMI 3.38 mM	CMI 1.33 mM
			
CMI 0.53 mM	CMI 2.83 mM	CMI 6.75 mM	CMI 6.75 mM

Al respecto y dada la dependencia tecnológica en el campo de la farmacoquímica de nuestro país, existe interés creciente entre los investigadores de generar tecnología propia para la preparación de compuestos con potencial farmacológico. Un ejemplo lo constituye la síntesis de heterociclos conocidos como 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas (Fig. 9) obtenidas a partir de la reacción entre α -aminoácidos y ácido difenilborónico, las cuales por la posible estabilidad del enlace O-B-N, constituyen compuestos atractivos para pruebas biológicas.

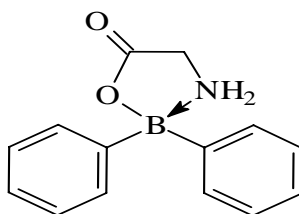


Fig. 9

❖ SÍNTESIS DE 2,2-DIFENIL-1,3,2-OXAZABOROLIDIN-5-ONAS.

En la literatura química existen informes de la síntesis tanto de 2,2-dialquil como ariloxazaborolidinonas; por ejemplo, Lang y colaboradores en 1959, sintetizaron una serie de oxazaborolidinonas a través de la reacción entre trialquilboranos y triarilboranos, empleando diferentes α -aminoácidos particularmente glicina y metionina, utilizando *o*-xileno como medio de reacción y condiciones de reflujo por un tiempo de tres horas (Fig. 10).

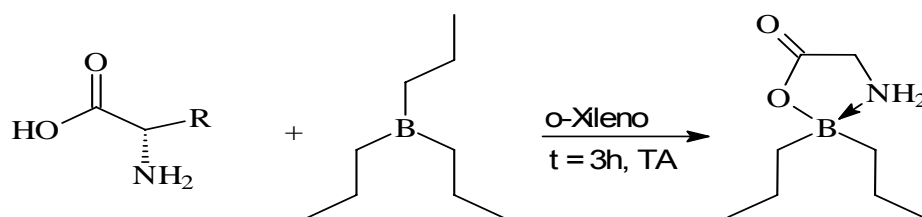
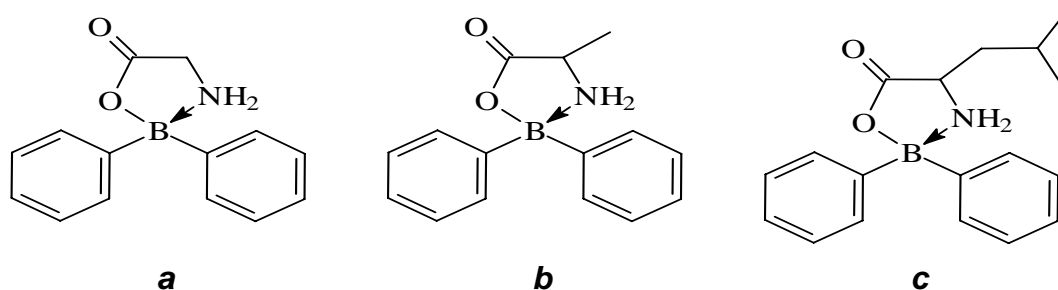


Fig. 10

En este mismo sentido, Skoog en 1964 hizo reaccionar diarilalquilborinatos con los α -aminoácidos glicina(**a**), alanina(**b**) y leucina(**c**) (Tabla 3) bajo condiciones ácidas, generando una familia de oxazaborolodionas, con rendimientos de 51 % y 88%, respectivamente.

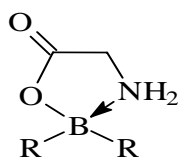
Tabla 3.- 2,2-Difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas, sintetizadas por Skoog.



Complementariamente, Shih-Hua y colaboradores en 1967 generaron una conjunto de diariloxazaborolidinonas a partir de los α -aminoácidos (% de rendimiento): glicina (48.75), serina (43.40), cisteina (51.20), treonina (12.63), valina (68.50), triptofano (40.28), histidina (45.99), bajo condiciones de reacción semejantes a las informadas por Skoog, empleando en este caso *o*-xileno como medio de reacción. Adicionalmente, Nefkens y Zwanenburg, en

1983, sintetizaron una familia de dietil y difeniloxazaborolidinonas a partir de α -aminoácidos, para lo cual se emplearon diferentes metodologías. Cuando se usaron los α -aminoácidos glicina y triptofano, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico y cisteina, se empleó trietilborano (Et_3B) en THF. Por otro lado, para la síntesis de la difeniloxazaborolidinona a partir de la L-fenilalanina, se usó el tetrafenilborato de dimetilamonio, previa pirolisis para la generación del trifenilborano. De manera análoga para la síntesis de las moléculas objetivo a partir de los α -aminoácidos fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteina, se utilizó trifenilborano y como medio de reacción THF ó DMSO ó DMF, a una temperatura entre 100 a 115 °C. Los rendimientos obtenidos que se reportaron, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.- α -Aminoácidos empleados y rendimientos obtenidos.



Glicina (R= Et, ~100%)	L-Ac. Glutámico (R= Et, ~100%; Ar, 60%)
L-Ac. Aspártico (R= Et, ~100 %; Ar 50 %)	L-Cisteina (R= Et, ~100%; Ar, 65%)
L-Triptofano (R= Ar, 50 %)	L-Lisina (R= Et, 60 %)
L-Fenilalanina (R= Ar, 70 %)	

Por otro lado, en la revista *Biomedical Mass Spectrometry* en 1984, se publicó un trabajo sobre la síntesis de una familia de

difeniloxazaborolidinonas. Éstas fueron obtenidas al hacer reaccionar el ácido difenilborínico generado a partir de un complejo del ácido difenilborínico con etanolamina, y diferentes α -aminoácidos, los cuales se encontraban previamente disueltos en una mezcla etanol:agua (1:1). La solución se calentó a una temperatura entre 60 y 70 °C durante un periodo de 15 minutos. En la Tabla 5, se muestra la serie de α -aminoácidos empleados para generar las correspondientes difeniloxazaborolidinonas.

Tabla 5.- α -Aminoácidos empleados por Flückiger et al.

Glicina	Alanina	Valina	Leucina	Fenilalanina
Prolina	Metionina	Serina	Tirosina	Treonina
Cisteina	Ac.Glutámico	Ac. Aspártico	Lisina	Asparagina
Triptofano	Histidina	Arginina		

Al respecto, Strang y colaboradores en 1989, empleando diferentes metodologías además de difenilborinatos y difenilboronatos, así como α -aminoácidos, tanto en su forma libre como de la sal correspondiente, obtuvieron una serie de difeniloxazaborolidinonas, por lo que propusieron el uso de ácido difenilborínico, en una mezcla H₂O/2-propanol/CH₃CO₂H (475/475/50) y temperatura de 65-70 °C por 10 minutos cuando se empleó el α -aminoácido en forma libre.

Asimismo, a partir de la sal sódica del ácido trifenilborínico, se genera el trifenilborano, el cual se hizo reaccionar con el α -aminoácido en su forma libre, en una disolución etanol/agua (75:25) y condiciones de reflujo.

Adicionalmente, estos investigadores sugirieron que al emplearse el α -aminoácido en forma de sal (clorhidrato), se utilice el complejo de ácido difenilborínico-etanolamina en condiciones de reacción semejante a las utilizadas con el α -aminoácido libre. Por otro lado, al reaccionar la sal sódica del tetrafenilboro, se propuso el empleo del clorhidrato del α -aminoácido seleccionado, diluido en solución de ácido clorhídrico 10 mM o 100 mM de ácido acético.

En 1992, Farfán y colaboradores, informaron de la síntesis de difeniloxazaborolidinonas, empleando el ácido 2-amidoborínico, para generar el ácido difenilborínico mediante la metodología descrita por Chremos et. al. en 1962. En este caso se usó un grupo de α -aminoácidos, los cuales se disolvieron en una mezcla etanol:agua. Las difeniloxazaborolidinonas se obtuvieron después de 5 horas de reacción a temperatura de reflujo. Los sustratos empleados, así como los rendimientos obtenidos, se muestran en la Tabla 6; es importante mencionar que también estas reacciones se realizaron en condiciones ácidas.

Tabla 6.- α -aminoácidos empleados y porcentajes de rendimientos de reacción, informados por Farfán et al.

Glicina (26 %)	Metionina (78 %)	Ac. Aspártico (17 %)	Ac. Glutámico (66 %)
Leucina (100 %)	Serina (36 %)	Treonina (58 %)	Isoleucina (88 %)
Fenilglicina (29 %)	Tirosina (21 %)	Prolina (100 %)	L-Lisina (58 %)

Por otro lado, en 1999, Trujillo, et al., informaron del estudio de rayos X realizado a una serie de difeniloxazaborolidinonas (Fig. 11) obtenidas mediante el empleo la metodología descrita por Chremos G.N. et. al. Particularmente, se empleó la L-ornitina, un α -aminoácido no proteínogénico. El rendimiento reportado al emplear este aminoácido, bajo condiciones ácidas de reacción fue del 60 %.

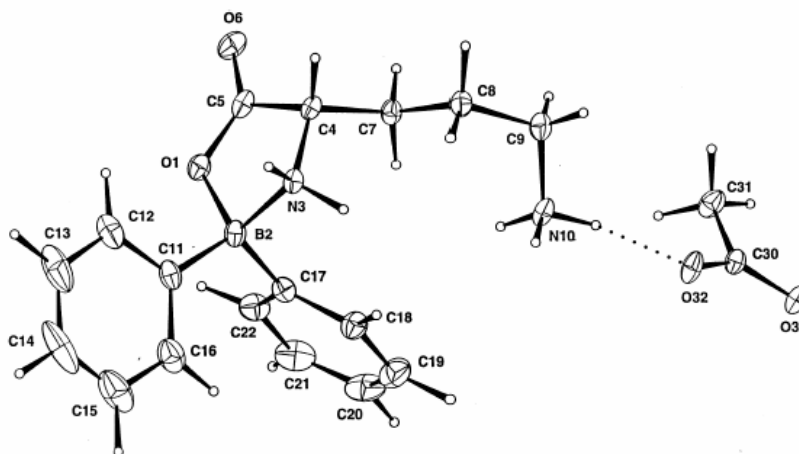


Figura 11.- Estereoestructura obtenida mediante difracción de rayos X, de la 2,2-difenil-4-(3-aminopropil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona.

Es oportuno resaltar en este momento algunas de las características químicas de las difeniloxazaborolidinonas. Al respecto se puede decir que la estabilidad hidrolítica de estas moléculas está relacionada con la distancia del enlace N-B (Fig. 12). Estudios preliminares en solución mostraron una alta estabilidad hidrolítica de las oxazaborolidinonas, lo cual puede ser explicado por el siguiente equilibrio. (Trujillo et al., 1999).

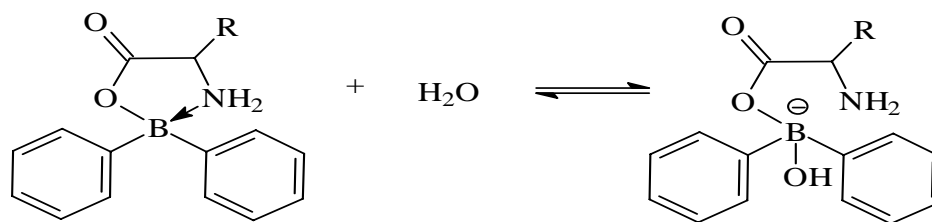


Figura 12

En base a lo anteriormente descrito, en este trabajo de Tesis, se propuso una nueva metodología para la síntesis de las moléculas objetivo, ahora empleando condiciones alcalinas de reacción, con lo cual se mejoran sustancialmente los rendimientos; sobra comentar que hasta el momento no hay informes del empleo de condiciones semejantes de síntesis; cabe recordar que todos los protocolos descritos previamente, generaban estas estructuras empleando condiciones ácidas de reacción.

❖ DESARROLLO DE FÁRMACOS

Uno de los primeros pasos en el desarrollo de nuevos medicamentos es el descubrimiento o síntesis de una molécula con fines médicos potenciales y la correlación de dicha molécula con un blanco biológico determinado, la aplicación repetida de este sistema permite identificar compuestos con mayor potencia y selectividad.

La obtención de un fármaco se lleva a cabo a través de distintas estrategias como son:

- Identificación de nuevos fármacos blanco.
- Diseño racional de fármacos basado en la comprensión de mecanismos biológicos, estructura receptora del fármaco, estructura del fármaco, propiedades fisicoquímicas del fármaco.
- Modificación química de una molécula conocida.
- Investigación de la actividad biológica de abundantes productos naturales, bancos de entidades químicas ya descubiertas y grandes bibliotecas de información sobre péptidos y ácidos nucleicos y otras moléculas orgánicas.
- Biotecnología y clonación de genes para producir proteínas y péptidos más grandes de interés biológico.

Cualquiera que se la estrategia empleada para obtener un fármaco, se debe de contar con un bioensayo que permita la detección de un gran número de compuestos bioactivos durante el cernimiento.

Una metodología que es comúnmente empleada en la detección de un potencial fármaco, es el cernimiento primario y secundario (Monks, et al., 1991). En el primero de ellos se requiere un bioensayo de gran sensibilidad que permita detectar una gran cantidad de moléculas potencialmente activas. Por otro lado, en el cernimiento secundario se detectan moléculas con actividad específica. Sin embargo, las estrategias de búsqueda o detección se han diversificado de acuerdo a las tecnologías con las que se cuenta y la filosofía del pensamiento del grupo de investigación.

El ejemplo más importante de investigación de nuevos fármacos antineoplásicos, lo constituye el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (INC). El INC cuenta con una colección de compuestos superior a los 600000.

La estrategia de búsqueda que se emplea por el INC sigue los siguientes pasos (Monga y Sausville, 2002):

- La evaluación preliminar de la actividad citotóxica de un compuesto de pruebas a una concentración en tres líneas celulares cancerosas.
- La evaluación en 60 líneas celulares de cáncer de la actividad citotóxica del compuesto a evaluar en al menos cinco concentraciones diferentes. Este esquema de trabajo permite determinar una especificidad relativa para ciertos tipos de tumores debido a la cantidad y diversidad de líneas celulares que se utilizan.

-
- La comparación del perfil farmacológico del compuesto de prueba con el perfil mostrado por agentes antineoplásicos de mecanismos de acción conocido. Esto se realiza con el fin de postular un posible mecanismo de acción del compuesto a evaluar.
 - La estimación de índices de eficacia mediante el ensayo “hollow fiber”.
 - La evaluación *in vivo* mediante el uso de modelos de tumores murinos y tumores humanos transplantados en ratones atímicos.

Esta metodología plantea ventajas y desventajas en la búsqueda de potenciales fármacos antineoplásicos, sobre todo debido a la elevada cantidad de recursos y personal capacitado. Una de las estrategias más novedosas en la búsqueda de compuestos anticancerosos es el sistema de microarreglos (Bruhn y Bohlin, 1997).

Por otro lado, el conocimiento de la estructura, las propiedades físicas y químicas de los posibles agentes farmacológicos, es una metodología empleada en muchos laboratorios de investigación para el cernimiento de moléculas con potencial actividad biológica, las cuales conducen a la propuesta de moléculas capaces de atravesar la membrana celular debido a sus propiedades de lipofilidad expresada en términos de qué tanto se distribuyen en n-octanol/agua (Log P). Adicionalmente, la generación de familias de moléculas a partir de una molécula líder, guía la investigación

para conocer el efecto que causa sobre éste, la modificación estructural realizada en la molécula líder. Por lo que se hace necesario el conocer algunos parámetros como son KD, Log P, π , ΔG de las moléculas que se pretende evaluar al incorporarlas en la mezcla octanol/agua.

❖ PARAMETROS FISICOQUÍMICOS DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA

• Membrana celular

Las membranas celulares son determinantes para la existencia de la célula, la cual está formada por una delgada capa de lípidos y proteínas, las cuales se mantienen unidas fundamentalmente por interacciones no covalentes (Fig. 13). Esta membrana es una estructura dinámica fluida y la mayoría de sus moléculas son capaces de desplazarse en el plano de la membrana (Nelson y Cox, 2001).

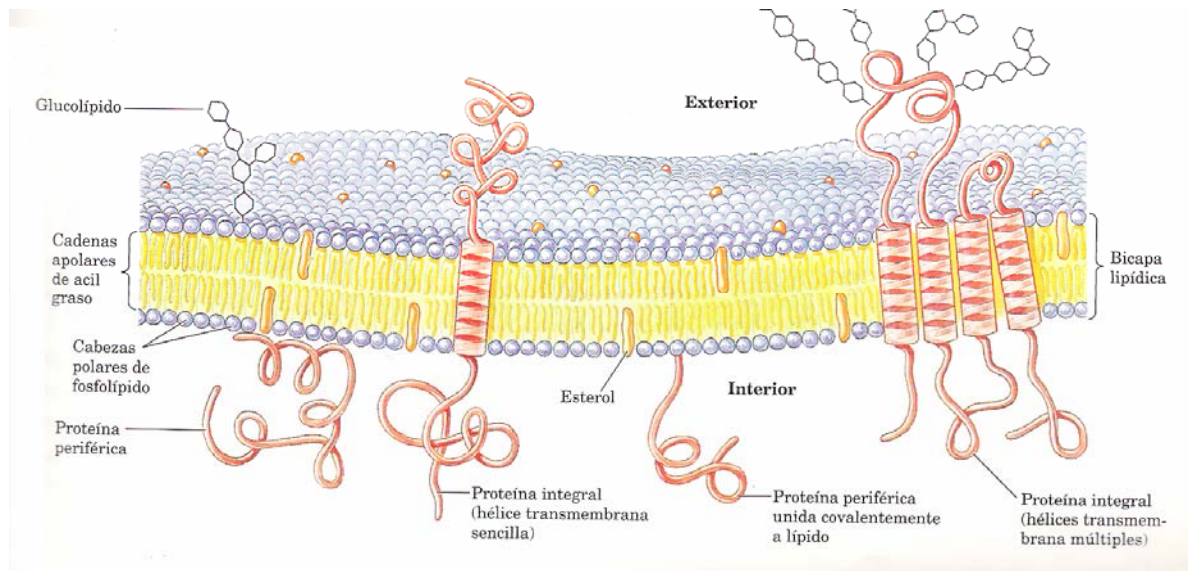


Figura 13.- Modelo de membrana celular.

Las moléculas de lípidos están dispuestas en forma de una doble capa continua de unos 5 nm de grosor y es la base universal de la estructura de la membrana celular, además, actúa de barrera relativamente impermeable al paso de la mayoría de las moléculas hidrosolubles. El porcentaje en que éstos se encuentran en la mayoría de las membranas plasmáticas de las células animales es del 50 %, siendo el resto casi todo proteínas. Todas las moléculas lipídicas en la membrana celular son anfipáticas, es decir tienen un extremo hidrofílico y un hidrofóbico (Bruce et al., 2002), (Tabla 7).

Tabla 7.- Composición lipídica aproximada de diferentes membranas celulares.

Lípido	Porcentaje de lípidos total en peso					
	Membrana Plasmática hepática	Membrana Plasmática de eritrocitos	Mielina	Mitocondria	Retículo Endoplásmico	<i>E. coli</i>
Colesterol	17	23	22	3	6	0
Fosfatidil-etanolamina	7	18	15	35	17	70
Fosfatidilserina	4	7	9	2	5	Trazas
Fosfatidilcolina	24	17	10	39	40	0
Esfingomielina	19	18	8	0	5	0
Glucolípidos	7	3	28	Trazas	Trazas	0
Otros	22	13	8	21	27	30

Los más abundantes de estos lípidos son los fosfolípidos (fosfatidilcolina, esfingomiélin, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina), los cuales tienen una cabeza polar y una cola no polar y constituyen más de la mitad de la masa de lípidos de la mayoría de las membranas. La longitud de las colas es determinante en el adecuado empaquetamiento de las cadenas lo que afecta la fluidez de la membrana.

La fluidez de la membrana celular es biológicamente importante, algunos procesos de transporte y algunas actividades enzimáticas pueden detenerse cuando la viscosidad de la bicapa se incrementa experimentalmente más allá de un nivel umbral. No sólo los fosfolípidos están presentes en la membrana, sino también hay la presencia de colesterol y glucolípidos (Nelson y Cox, 2001).

Las moléculas proteicas que normalmente se hallan disueltas en la bicapa lipídica median la mayoría del resto de las funciones de la membrana. Algunas proteínas de membrana actúan de eslabones estructurales que relacionan la membrana plasmática con el citoesqueleto y/o con la matriz extracelular de las células adyacentes, mientras que otras actúan como receptores que reciben y trasducen las señales químicas procedentes del entorno celular.

*** *Importancia de la membrana celular.***

En las células vivas, su interior está separado del medio externo por un límite llamado membrana celular o membrana plasmática. Más aún, en las células eucariotas hay una compleja compartimentalización delimitada por membranas, representada por la presencia de organelos como el núcleo, las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, cada uno con su propia membrana. Sin embargo, las membranas no son meros límites estáticos que separan unas regiones de otras, por el contrario, se trata de sistemas bioquímicos dinámicos encargados de realizar funciones, como las de producir ATP, impartir especificidad antigénica a cada tipo celular, fijar agentes reguladores (como hormonas y factores de crecimiento) y neurotransmisores normales, así como diversos compuestos psicoactivos que median la transmisión de los impulsos eléctricos en el tejido nervioso; promover el funcionamiento de diversas sustancias fotorreceptoras que captan y almacenen la energía luminosa o que translucen una señal lumínica en fenómenos químicos específicos; efectuar muchas reacciones enzimáticas y generar las condiciones patógenas que se originan con la fijación de virus y diversas toxinas a la superficie celular.

El paso (transporte) selectivo de sustancias hacia dentro o hacia fuera de las células, así como su traslado entre el citoplasma y los diversos organelos subcelulares (mitocondrias, núcleos, etc.) está determinado por las membranas y constituye una de las funciones más importantes de éstas.

Desde luego, si la biomembrana fuera una barrera impermeable por completo, la célula estaría totalmente aislada del medio y los organelos de su interior estarían incomunicados entre sí. Por el contrario, si las membranas fueran divisiones del todo permeables todas las sustancias podrían pasar indistintamente de una región a otra.

En realidad no ocurre ninguno de tales extremos, más bien, las propiedades de transporte de la membrana son intermedias, se trata de divisiones semipermeables donde algunas sustancias pueden atravesarlas, pero otras no (Bohinsky, 1991; Lash, 2005). Para comprender mejor este proceso es conveniente incluir la definición de permeabilidad que es la cantidad de soluto que cruza la membrana celular por unidad de tiempo debido a una diferencia de concentraciones y puede expresarse en las mismas unidades que la velocidad: cm/s, o mejor aun la constante de velocidad específica (Bonting y De Pont, 1981). La habilidad de un fármaco para atravesar estas membranas dependerá de sus características fisicoquímicas. La baja solubilidad de un compuesto en fase acuosa puede ser un factor limitante en biodisponibilidad, mientras que otros compuestos altamente lipofílicos son fácilmente metabolizados o unidos a proteínas. Sin embargo, una baja lipofilicidad le confiere al fármaco una pobre permeabilidad a través de membranas (Silverman, 2004; Smith y Williamn, 1983) (Fig. 14).

El transporte a través de las membranas celulares se realiza sobre todo mediante la exocitosis, la endocitosis, el movimiento mediante conductos iónicos, los transportes activos primario y secundario, además de los

procesos de difusión pasiva (Bohinsky, 1991). La difusión significa movimiento de sustancias al azar causado por los movimientos cinéticos normales de la materia (cuando las proteínas transportadoras mueven sustancias en la dirección de los gradientes químicos o eléctrico correspondientes y no se requiere aporte de energía) (Gennaro, 1999), mientras que transporte activo significa movimiento de sustancias a consecuencia de procesos químicos que imparten energía para originar el movimiento (proteínas transportadoras trasladan sustancias contra sus respectivos gradientes químicos y eléctricos) (Nelson y Cox, 2001).

El primer factor que se descubrió y era determinante en la permeabilidad por simple difusión, fue la solubilidad en lípidos de las especies permeables. Para que un fármaco pueda absorberse, tiene que atravesar las membranas, que consisten en una bicapa lipídica que, como ya se mencionó es semipermeable y está atravesada por poros.

El tamaño de la molécula influye porque al ser más grande, más difícil será atravesar la membrana, así que debe ser pequeña (moléculas de PM >300 pasan difícilmente y son lentas). Por otro lado, la liposolubilidad es la capacidad de relacionarse lo mejor posible con la bicapa lipídica. Los fármacos tienen que poder disolverse en los lípidos, aunque las moléculas liposolubles no se disolverán bien en el agua. Esto significa que tendrán una baja relación con las proteínas y no se deberán enlazar con ellas. Una molécula muy polar con muchos sustituyentes con los que pueda formar

enlaces con proteínas, se enganchará y no atravesará la membrana, como tampoco lo hará una molécula muy liposoluble sin ningún sustituyente, pues será rechazada por las proteínas. Así que deberá tener alguna función para poderse enlazar a la proteína y después puede atravesar la bicapa lipídica. La velocidad de paso a través de la membrana de una molécula liposoluble siempre es mayor que la de una polar o hidrosoluble.

* ***Constante de Partición (KD)***

Hansch (Hansch, C., 1990; Smith y Williamn, 1983) propuso que el primer paso en el proceso global de acción de un fármaco era un “*random walk*”, es decir, un proceso de difusión en el cual el fármaco efectúa su camino desde una solución diluida fuera de la célula a un sitio en particular de reconocimiento y se generará el proceso de señalización y, por lo tanto, la respuesta farmacológica. Esto implica que un fármaco debe de ser capaz de interactuar con dos diferentes ambientes, lipofílico (membranas) y acuoso (la exobiofase como el citoplasma), para poder alcanzar su sitio de acción. La liposolubilidad se mide y es expresada por el coeficiente de partición (Bonting y De Pont, 1981) que es la relación de la concentración de una sustancia presente en la fase orgánica (lípidos) y la concentración en la fase acuosa (agua), una vez que dicha sustancia alcanzó el equilibrio (Bonting y De Pont, 1981).

Al respecto, el coeficiente de partición es un indicativo de la lipofilidad o hidrofobicidad de un fármaco y se correlaciona su paso a través de las membranas lipídicas y su interacción con macromoléculas en sitios receptores (Martin y Swarbick, 1983). A mayor coeficiente de partición, mayor es la posibilidad de disolución de una molécula en la bicapa lipídica.

El coeficiente de partición (KD) se define entonces como el equilibrio de concentraciones (Ci) de una sustancia disuelta en un sistema que consista de dos solventes inmiscibles:

$$KD = \frac{C_{n\text{-Octanol}}}{C_{\text{agua}}}$$

y es diferente al coeficiente de distribución que es el coeficiente de la suma de las concentraciones de todas las especies del compuesto en un disolvente orgánico (*n*-octanol) sobre la suma de las concentraciones de todas las especies del compuesto en agua, referido obviamente a moléculas ionizables que a diferentes valores de pH presentan un comportamiento lipofílico diferente (Fig 14). De acuerdo con reacciones ácidas de disociación, se puede introducir el concepto de coeficiente de partición para la especie catiónica, la aniónica y para la especie neutra, lo que da la definición de los coeficientes de partición y de distribución para especies ionizadas y no ionizadas. Normalmente el coeficiente de partición se suele reportar en la forma de logaritmo base 10 (Log P) (Moridani et al., 2004; Leo et al., 1975).

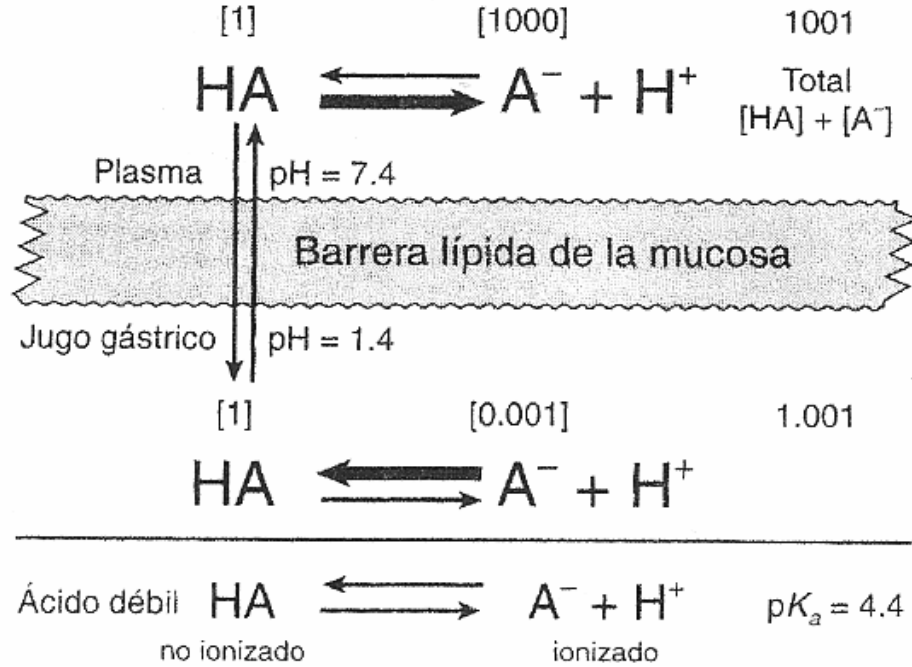


Figura 14

* **Energía libre de Gibbs (ΔG)**

La función G recibió el adecuado nombre de energía libre porque una reducción de su valor de un estado a otro ($G_f - G_i$) es una medida de la máxima cantidad de energía potencialmente disponible para realizar trabajo útil cuando el cambio ocurre a condiciones de temperatura y presión constantes. Existen otras interpretaciones de la función de energía libre. Una de particular utilidad para los sistemas químicos es que la energía libre es una propiedad termodinámica relacionada de modo directo con la energía química total del sistema y por tanto con la estabilidad química del sistema.

En este contexto, un valor de energía libre representa un sistema potencialmente inestable que, en condiciones adecuadas desciende en forma espontánea hacia un nivel inferior de energía libre, en otras palabras, un valor ΔG negativo ($\Delta G -$) corresponde a una reacción liberadora de energía, debida al cambio de un estado inestable de alto contenido de energía a un estado más estable de menor contenido de energía química. Las reacciones de este tipo se denominan exergónicas y se dice que son termodinámicamente favorables. La energía liberada puede usarse para efectuar trabajo. Por el contrario, un valor ΔG positivo ($\Delta G +$) corresponde a una reacción que consume energía, pues se trata de un cambio de estado estable de baja energía a un estado menos estable de mayor energía química. Tales reacciones se llaman endergónicas y se dice que es termodinámicamente desfavorable. Los procesos endergónicos no ocurren en forma espontánea a menos que se introduzca energía. En otras palabras, se debe realizar trabajo sobre el sistema.

Si una reacción exergónica ocurriera por si misma, la energía liberada se perdería sobre todo en forma de calor, pero si ocurriera en presencia de una reacción endergónica, la energía liberada por la reacción exergónica serviría para poner en marcha el proceso endergónico. Este tipo de comportamiento se llama acoplamiento de energía y representa el diseño básico del flujo de energía de los organismos vivos.

La condición de $\Delta G = 0$, tiene un significado especial, pues implica que los fenómenos progresivos y regresivo de un sistema de reacción reversible (uno de los cuales es exergónico y otro endergónico) ocurren a la misma velocidad y el sistema está en equilibrio, punto en el cual no hay tendencia a sufrir ningún cambio neto adicional.

La ecuación presentada anteriormente puede ser escrita en términos del coeficiente de partición y relaciona a éste con las propiedades termodinámicas:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_D$$

Donde ΔG es el cambio de energía libre necesaria para transferir una mol de soluto en agua a la membrana, ΔH y ΔS respectivamente son los cambios correspondientes en la entalpía molar parcial y la entropía, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta a 25 °C (298.15°K).

En la difusión simple, una molécula pequeña en solución acuosa se disuelve en la bicapa lipídica, la cruza y luego se disuelve en la solución acuosa del otro lado. La difusión de una molécula será proporcional a su hidrofobicidad.

La difusión a través de la membrana bajo un gradiente de concentración tiene energía libre negativa (Karp, 1998), dado que es un proceso espontáneo, las moléculas se mueven de una zona de mayor concentración a otra de menor y no se consume energía, así que ΔG tiene un valor

negativo, esto favorece mucho a la célula dado que de esta manera habrá un ahorro de energía en la misma, en contraste con el transporte activo, en el cual las proteínas transportadoras corresponden a las ATPasas, las enzimas encargadas de catalizar la hidrólisis del ATP.

*** Constante Hidrofóbica π**

De acuerdo con la metodología propuesta por Fujita (Hansch y Leo, 1979) y col en 1964, se considera que, el Log P es una propiedad aditiva-constitutiva y numéricamente igual a la suma del Log P de un compuesto de referencia, denominada comúnmente como molécula padre, más un término π , el cuál representa la diferencia de Log P de una molécula de referencia y el Log P de la molécula dada con un sustituyente en particular. Es así que el valor de π para un sustituyente puede ser definido por la siguiente relación:

$$(\pi) = \text{Log P (RX)} - \text{Log P (RH)}$$

En donde se asume que el valor de π es cero.

Dado que numerosos estudios de Hansch, han demostrado que π tiene carácter aditivo, π puede calcularse para un producto cualquiera, la ecuación para el cálculo de Log P puede describirse como:

$$\text{Log P (YRX)} = \text{Log P(HRH)} + \pi(Y) + \pi(x)$$

El valor de π , es la contribución al carácter hidrofóbico de la molécula y será determinante en el cálculo del valor de Log P y en la actividad biológica.

JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de moléculas orgánicas, las cuales muestren marcada selectividad farmacológica, bajo costo y un menor número de reacciones adversas, ha conducido a los químicos a diseñar un sinnúmero de estructuras novedosas, algunas de las cuales presentan en su estructura diferentes heteroátomos. Al respecto, existe información de heterociclos generados a partir de glicina, los cuales han mostrado tener actividad apoptótica *in vitro*. Adicionalmente, en los últimos 50 años, ha habido un interés creciente por las aplicaciones biológicas del boro, particularmente por la utilidad que ha tenido en la terapia de captura de neutrones mediante este átomo; al respecto, se sabe que moléculas que presentan en su estructura enlaces B-N muestran actividad biológica interesante (vg insecticida, fungicida, herbicida y antineoplásica entre otras). Por lo anterior, se consideró importante sintetizar una serie de heterociclos de la clase de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas, a partir de la reacción entre los correspondientes α -aminoácidos y ácido difenilborínico, las cuales presentan modificación tanto en el grupo hidroxilo del sistema carboxílico como en el nitrógeno del grupo amino, además de generarse un enlace B-N en el anillo. Lo anterior a efecto de evaluar las moléculas generadas para inducir muerte celular por apoptosis mediante diferentes protocolos usando modelos *in vitro*.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

◆ HIPÓTESIS

En la literatura del área tanto biológica como química, existe información acerca de la actividad proapoptótica que han presentado algunos derivados del α -amino ácido glicina, esto cuando se ha modificado el grupo hidroxilo del carboxilo, y el grupo amino; además, moléculas que en su estructura muestran un enlace B-N han presentado actividad biológica. Por lo que si se generan heterociclos de la clase de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas derivados de α -amino ácidos, incluida la glicina, se podrá generar una familia de moléculas con posible actividad apoptótica.

◆ OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de las moléculas objetivo, mediante diferentes protocolos experimentales para inducir apoptosis; asimismo, determinar algunas de sus propiedades fisicoquímicas (K_D , $\text{Log } P$, π , ΔG) que influyeran la actividad farmacológica de las moléculas.

◆ OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Sintetizar una serie de diez y ocho 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas, a partir de los correspondientes α -aminoácidos.

- ✓ Caracterizar los productos obtenidos mediante métodos espectroscópicos comunes como son: Resonancia Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C y ^{11}B); Espectrometría de Masas (IE, FAB); así como Espectrofotometría de Absorción (IR, UV, Vis).

- ✓ Determinar el coeficiente de reparto de las moléculas en estudio, así como su Log P, además de la energía libre de Gibbs (ΔG) asociada y la constante hidrofóbica π respectiva.

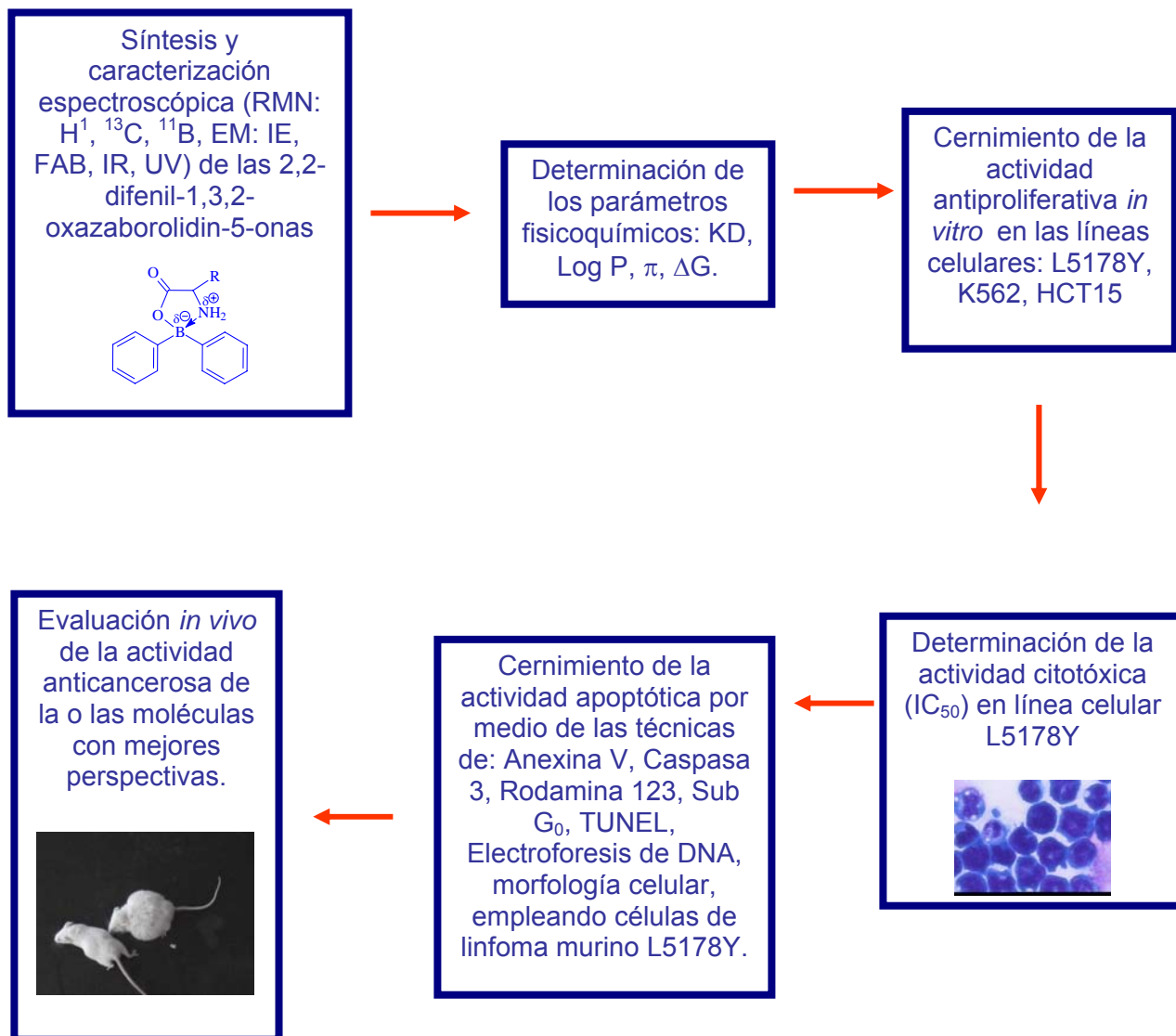
- ✓ Seleccionar, aquellas moléculas que muestren porcentajes de viabilidad celular menores al 50 %, al ser evaluadas en tres tipos de células neoplásicas: HCT15, K562 y L5178Y.

- ✓ Determinar la CI_{50} de las moléculas estudiadas en la línea celular L5178Y.

-
- ✓ Evaluar el efecto apoptótico de los compuestos sintetizados sobre las células del linfoma murino L5178Y, por medio de: viabilidad celular, translocación de fosfatidilserina (anexina V), potencial de membrana mitocondrial (rodamina 123), Caspasa 3, fragmentación de ADN (pico Sub G₀, electroforesis del DNA y TUNEL) y morfología celular.

MATERIALES Y MÉTODOLÓGIA

Estrategia experimental empleada



❖ EQUIPO Y MATERIALES

Para la adquisición de los correspondientes espectros de resonancia magnética nuclear de los diferentes núcleos estudiados, se empleó un equipo JEOL modelo FX90Q usando DMSO- d_6 como disolvente y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (^{11}B , 96 MHz) ó tetrametilsilano (^1H , 300 MHz y ^{13}C , 75 MHz) como referencia interna. Los espectros de masas se adquirieron en un espectrómetro de masas JEOL JMS-SX102A, empleando las técnicas de ionización; impacto electrónico y bombardeo con átomos rápidos. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro MSERIES usando la técnica de pastilla (KBr). Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Electrothermal 9300 y no están corregidos. Para la determinación de la KD, se empleó un agitador orbital marca 3D-ROTATOR. Los valores de absorbencia se determinaron en un espectro UV-Visible marca Perkin Elmer modelo Lambda 25, empleándose el software correspondiente. Para el análisis de las células tratadas con los compuestos, se empleó un citómetro de flujo modelo FACSCaliburTM marca Becton Dickinson. Para el corrimiento electroforético del DNA, se empleó una cámara de electroforesis conectada a una fuente de poder (voltaje 80 V). Para la obtención de las imágenes de electroforesis de DNA, se empleó un fotodocumentador modelo Epichemi Dark room marca UVP. La determinación de la morfología celular se realizó empleando un microscopio óptico marca Nikon modelo Eclipse E 600.

Los reactivos así como sus especificaciones, empleados durante la fase experimental de este trabajo de tesis, se encuentran descritos en la Tabla 8.

Tabla 8.- Reactivos empleados y especificaciones.

	Reactivo	Especificaciones
•	L α -aminoácidos	G.R., Sigma Aldrich
•	Ácido 2-amidoborínico	G.R., Sigma Aldrich
•	HCl	R. A. 36 %, Sigma Aldrich
•	Eter etílico	G. A. Sigma Aldrich
•	Bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinium (Bromuro de etidio)	G.R., Sigma Aldrich
•	Diyoduro de 3,8-diamino-5-[3-(dietilmetilamonio)propil]-6-fenilfenantridinium (Ioduro de propidio)	G.R., Sigma Aldrich
•	<i>n</i> -Octanol	G. Esp.HPLC, Sigma Aldrich
	Dimetil sulfóxido	G. B. M., Sigma Aldrich
•	Etanol	G.R., Sigma Aldrich
•	Medio de cultivo RPMI 1640	GIBCO (Life Technologies, Invitrogen California)
•	Suero fetal bovino Calificado	GIBCO (Life Technologies, Invitrogen California)
•	MEM, solución de aminoácidos no esenciales 10 mM	GIBCO (Life Technologies, Invitrogen California)
•	L-Glutamina-200mM (100X)	GIBCO (Life Technologies, Invitrogen California)
•	Penicillina y 100 μ g/mL Estreptomicina	GIBCO (Life Technologies, Invitrogen California)
•	Buffer Hepes	GIBCO (Life Technologies, Invitrogen California)
•	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT)	G.R., Sigma Aldrich
•	Rodamina 123	G. B. M., Sigma-Aldrich
•	Anti-caspasa 3 (anticuerpo policlonal de conejo)	Pharmingen
•	Kit para determinar fragmentación de DNA (TUNEL, Ap BRDU TM)	
•	Kit para tinción de Giemsa	
	Kit de detección de apoptosis Anexina V01 acoplado a FITC	CALTAG Laboratories Burlingame, CA

❖ METODOLOGÍA QUÍMICA

• Síntesis de 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas.

Experimento típico: En un matraz de bola de 250 mL, se colocaron 6.66 mmol de glicina y 5 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 8 con hidróxido de sodio al 5 %. (disolución **A**). Por otro lado, se preparó una disolución de 6.66 mmol de 2-aminoetildifenilborinato en 50 mL de etanol grado analítico y se le adicionó 1 mL de HCl concentrado y agua destilada hasta obtener una disolución blanquesina. Finalmente, se extrajo con 25 mL de éter etílico (25mLX3), la fase orgánica se juntó (disolución **B**). Las disoluciones **A** y **B** se mezclaron y se colocaron en agitación continua durante de 4 h con un intervalo de temperatura de 60-70 °C. Transcurrido el tiempo de reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida, el producto obtenido se lavó con *n*-hexano frío y se recristalizó de etanol (Fig. 15).

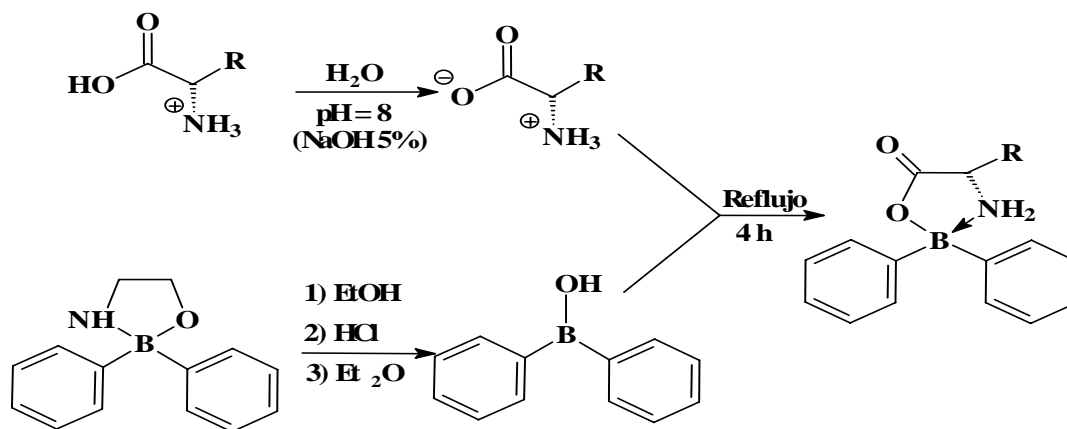


Figura 15.- Metodología general para la síntesis de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas.

Posteriormente, se calculó el rendimiento y se determinó el punto de fusión correspondiente. Una metodología semejante se empleó para la síntesis del resto de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas a partir de los siguientes α -aminoácidos: L-Isoleucina, L-Arginina, L-Ornitina, L-Leucina, L-Ácido Aspártico, L-Ácido Glutámico, L-Histidina, L-Treonina, L-Serina, L-Valina, L-Tirosina, L-Triptofano, L-Prolina, L-Metionina, L-Fenilalanina, L-Asparagina, L-Glutamina. La elucidación estructural de los derivados generados, se realizó por medio del análisis de sus datos espectroscópicos obtenidos de: resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{11}B , así como por espectrofotometría de absorción infrarroja, espectrometría de masas, espectrofotometría de absorción ultravioleta. Los resultados se encuentran descritos ampliamente en las Tablas **11**, **12**, **13**, **14**.

- **Determinación del KD**

* *Determinación del máximo de absorbencia de cada una de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas, empleando la técnica de UV-Vis.*

Se preparó una disolución de concentración 0.15 mg/mL de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas en *n*-octanol. De esta disolución se tomó un mL y se aforó con 5 mL de etanol grado espectrofotométrico hasta alcanzar un volumen final de 6 mL. Esta disolución se empleó para determinar los valores de λ_{max} de cada uno de los compuestos estudiados, por medio del análisis de la región desde 1100 hasta 190 cm^{-1} . La absorbencia determinada se adquirió cuando ésta se encontró en un intervalo entre 0.2 y 0.8 nm.

-
- * *Determinación del tiempo óptimo de agitación, que se empleó para la extracción *n*-octanol:Buffer.*

En quince tubos de ensaye lavados con Extran® y agua destilada, se colocaron un mL de agua desionizada y 5 mL del compuesto (**1-18**), el cual previamente se había disuelto en *n*-octanol. Posteriormente se formaron grupos de 3 tubos que se agitaron a los tiempos de 5, 10, 15, 20 y 25 minutos en un agitador orbital. En cada tiempo se consideró un blanco de referencia. Las muestras se dejaron reposar por 24 h. La absorbencia se determinó exclusivamente para la fase orgánica en un Espectrofotómetro UV-Visible. Finalmente, se eligió el tiempo en el que se extrajo la mayor cantidad del compuesto, es decir el correspondiente a la mayor absorbencia.

- * *Metodología empleada para la determinación de la KD experimental de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas.*

Se preparó una disolución de concentración 0.15 mg/mL, de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona correspondiente en *n*-octanol grado espectrofotométrico. Posteriormente, en un tubo de ensaye de 15 mL se adicionaron 4 mL de agua desionizada y 1 mL de la disolución previamente preparada en *n*-octanol para alcanzar un volumen final de 5 mL. Esta mezcla se agitó durante 10 minutos en un agitador orbital a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se dejó en reposo por 24 h y se separó la fase orgánica para cuantificar la concentración remanente en ésta en un

espectrómetro UV-Visible. La fórmula usada para determinar la constante de distribución fue:

$$KD = [C]n\text{-octanol} / [C]\text{Agua}.$$

Este análisis se realizó por octuplicado.

* *Determinación experimental de los parámetros Log P, ΔG y π , para cada una de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas.*

Para el cálculo de los parámetros fisicoquímicos Log P, ΔG y π , a partir del KD experimental, se emplearon las siguientes fórmulas:

- $\text{Log P} = \text{Log KD}$
- $\Delta G = -RT \text{Ln KD}$
- $\pi = \text{Log P}(P_x) - \text{Log P}(P_H)$

❖ **METODOLOGÍA BIOLÓGICA**

- **Características de las líneas celulares empleadas en este trabajo y metodologías de cultivo.**

L5178Y: Células de linfoma de origen murino, las cuales crecen en la cavidad intraperitoneal de ratones BALB/c

K562: Células neoplásicas (Eritroleucemia) de origen humano, las cuales crecen en suspensión.

HCT15: Células neoplásicas (adenocarcinoma colorectal, de origen humano, las cuales crecen de manera adherente.

-
- * *Preparación del medio de cultivo suplementado, empleado para el crecimiento de las líneas celulares.*

Para la determinación de la actividad antineoplásica de las moléculas en estudio, se emplearon las células anteriormente descritas. Éstas se hicieron crecer en un medio de crecimiento estéril preparado de la siguiente manera: Para un volumen final de un litro de RPMI 1640 con rojo de fenol, se añadieron 100 mL de suero fetal bovino descomplementado, 10 mL de mezcla de aminoácidos no esenciales (10mM), 10 mL de disolución de L-Glutamina-200mM (100X), complementariamente se adicionaron 10 mL de una mezcla de antimicótico-antibiótico (10 UI) finalmente se agregó 1 mL de buffer HEPES, toda esta preparación se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad.

- * *Protocolo empleado para el cultivo del linfoma murino L5178Y.*

Una suspensión de 2×10^6 células viables del linfoma murino L5178Y, fueron implantadas intraperitonealmente en ratones macho de la cepa singénica BALB/c. Los pies de cría se adquirieron en los laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine, EUA) y la progenie fue criada en el laboratorio de inmunología de la ENCB-IPN y mantenidos con una dieta balanceada 7012 HARLAND TEKLAND (Indianápolis Indiana, EUA) y agua *ad libitum*. Las células se dejaron hasta el desarrollo de ascitis aproximadamente 12 días después. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados por dislocación

cervical, las células de linfoma fueron retiradas de la cavidad peritoneal por succión y lavadas con PBS 1X estéril. La cantidad de células viables se determinó empleando el método de exclusión de azul tripano en un hematocitómetro. Finalmente, las células fueron resuspendidas en solución PBS 1X estéril para su posterior empleo.

* *Protocolo empleado para el cultivo de la línea celular K562.*

1×10^6 células viables K562 de fueron suspendidas en 20 mL de medio de cultivo suplementado, posteriormente se colocaron en una estufa a 37°C con atmósfera de CO_2 al 5 % y humedad relativa del 95 %, por 72 h. Por último las células se recolectaron de la botella de cultivo por centrifugación (1500 RPM/3 min) y se lavaron con PBS 1X estéril frío. La cantidad de células viables se determinó empleando el método de exclusión de azul tripano en un hematocitómetro para su posterior empleo.

* *Protocolo empleado para el cultivo de la línea celular HCT15.*

1×10^6 células viables de fueron suspendidas en 20 mL de medio de cultivo suplementado, posteriormente la botella de cultivo se colocó en una estufa a 37°C con atmósfera de CO_2 al 5 % y humedad relativa del 95 %. Las

células se recolectaron cuando tenían aproximadamente al 80 % de confluencia de la botella, posteriormente las células adherentes fueron separadas por procedimientos convencionales con una solución de tripsina-EDTA para obtener suspensiones celulares, posteriormente se lavaron con PBS 1X estéril y centrifugaron 1500 RPM por 3 minutos. La cantidad de células viables se determinó empleando el método de exclusión de azul tripano en un hematocitómetro, para su posterior empleo.

* *Preparación de los compuestos para la evaluación biológica.*

Se prepararon disoluciones de concentración 20 mM en dimetilsulfóxido grado biología molecular, de cada una de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas empleadas y se mantuvieron a -20°C.

• **Metodología general empleada para la determinación del CI_{50} *in vitro*, sobre células del linfoma murino L5178Y.**

Para el ensayo de citotoxicidad (viabilidad celular) se preparó una suspensión de células L5178Y viables, a una concentración 5×10^4 células/mL previamente cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado. Éstas se colocaron en microplacas de 96 pozos (100 μ l/pozo) y se dejaron en acondicionamiento por 2 horas en atmósfera de CO_2 al 5 % y temperatura de 37 °C. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 100 μ L/pozo de una disolución de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas a evaluar

(compuestos **1-18**) para alcanzar una concentración final decreciente de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 μM . Las células se incubaron por 24 h en atmósfera de CO_2 al 5 % y temperatura de 37 °C. Finalmente, se adicionaron 50 μL /pozo de una disolución de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoilo (MTT), (5mg/mL) la cual se dejó actuar por 4 horas más. El contenido de las placas se centrifugó a 1000 RPM por 5 minutos, el precipitado formado se disolvió con 50 μL DMSO (G.R.). La concentración de azul de formazán generado se cuantificó a 560 nm en un lector de placas de ELISA Modelo 3401. Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados son la medida de tres experimentos independientes entre si. La absorbencia detectada es directamente proporcional a la viabilidad celular, los datos de absorbencia obtenidos de la cinética, se graficaron con respecto a Ln de la concentración para determinar la CI_{50} .

- **Metodología empleada para la determinación de fosfatidilserina presente en células de linfoma murino L5178Y.**

Para esta prueba, se tomaron 1×10^6 células L5178Y tratadas y no tratadas, en un volumen de 50 μL y se siguió la metodología indicada por el proveedor del Kit para el análisis por citometría de flujo de Anexina V. (Annexin V01 conjugada con FITC, CALTAG Laboratories Burlingame, CA). Las muestras se adquirieron y analizaron en un citómetro de flujo FASCalibur (Becton

Dickinson, San José, CA) utilizando el programa CellQuestPRO. En el diagrama de puntos de tamaño vs granularidad, se delimitó la región correspondiente a las células y se adquirieron 10,000 eventos en dicha región por muestra. Los resultados se expresan como el porcentaje de células apoptóticas presentes en la muestra. Se consideró como apoptóticas tempranas aquellas células Anexina V⁺/IP⁻ y como apoptóticas tardías aquellas células Anexina V⁺/IP⁺.

• ***Metodología empleada para la determinación del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) de células de linfoma murino L5178Y.***

Para esta prueba se tomaron 6×10^5 células L5178Y tratadas y no tratadas por 24 horas, en un volumen de 50 μ L y se les adicionaron 20 μ L de una disolución de Rodamina 123 con una concentración 10,000 μ g/mL. Posteriormente, se dejaron incubar por 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Por último, se lavaron 2 veces con PBS 1X frío y se resuspendieron con PBS 1X estéril. El análisis de las diferentes poblaciones se realizó por citometría de flujo empleando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José CA). En el diagrama de puntos de tamaño vs granularidad, se delimitó la región correspondiente a las células y se adquirieron 10,000 eventos en dicha región por muestra. Los resultados

se expresan como el porcentaje de células con bajo potencial de membrana mitocondrial.

- **Metodología empleada para la determinación de la presencia de la Caspasa-3 activa en células de linfoma murino L5178Y.**

Se adquirieron 1×10^6 células L5178Y tratadas y no tratadas por 24 horas y se permeabilizaron con la solución Citofix/Citoperm del kit durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas en dos ocasiones con buffer Perm/Wash 1X. Después de retirar el sobrenadante, se agregaron 20 μL de anticuerpo anticaspasa-3 acoplado a FITC. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, las células fueron lavadas y resuspendidas con 400 μL del buffer Perm/Wash 1X. Finalmente, se adquirieron y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José CA) utilizando el programa CELLQuest Pro. En el diagrama de puntos de tamaño vs granularidad se delimitó la región correspondiente a las células en estudio y se adquirieron 10,000 eventos en dicha región por muestra. Los resultados se expresan como el porcentaje de células en apoptosis presentes en la muestra.

- **Metodologías empleadas para de determinación de la fragmentación del DNA, de células del linfoma murino L5178Y.**

- * *Técnica pico Sub G₀*

Para realizar esta determinación, se tomaron 1×10^6 células L5178Y previamente tratadas y no tratadas, posteriormente se fijaron con etanol al 70 % y se dejaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por espacio de 24 h. Posteriormente, se centrifugaron y se lavaron 2 veces con 1 mL de PBS 1X frío, después se adicionaron 500 μL de PBS 1X frío y 250 μL de Buffer de Citratos pH 7.8, esta mezcla se dejó actuar por 2 minutos y se centrifugaron a 3,000 rpm/1 min a 4°C . Finalmente se adicionaron 400 μL de una solución de 20 $\mu\text{g/mL}$ de Yoduro de Propidio y se incubaron en oscuridad por 30 min. Para la adquisición de las muestras se empleo un citómetro modelo FASC Scalibur marca Becton Dickinson, San José, CA, y para el análisis de los datos se empleó el software CELLQuestPRO. Se cuantificó el área que se encontraba por debajo del pico G_0/G_1 , obtenido del análisis del contenido de DNA. En el diagrama de puntos de tamaño vs granularidad se delimitó la región correspondiente a las células en estudio y se adquirieron 10,000 eventos en dicha región por muestra. Los datos se expresan como el % de área bajo la curva del pico Sub G_0/G_1 .

* *TUNEL*

Se tomaron 5×10^5 células L5178Y tratadas y no tratadas en un volumen de 50 μL y se siguió la metodología indicada por el proveedor del Kit para el análisis por citometría de flujo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), dUTP nick-end labeling; Fluorescein Apoptosis detection system; Apo-BRDU™ BD Pharmingen). Para la adquisición de las muestras se empleó un citómetro modelo FASC Scalibur marca Becton Dickinson, San Jose, CA, para el análisis de los datos se usó el software CELLQuestPRO. En el diagrama de puntos de tamaño vs granularidad se delimitó la región correspondiente a las células en estudio y se adquirieron 15,000 eventos en dicha región por muestra. Los datos se expresan como el porcentaje de células TUNEL positivas.

* *Electroforesis de DNA en gel de agarosa (1.8%)*

Se tomaron 5×10^6 células L5178Y en un volumen de 250 μL , previamente tratadas y no con los compuestos. Posteriormente, se adicionaron 350 μL de SSC 1X, 20 μL de SDS al 10 % y 37 μL de Proteinasa K (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron por 12 horas a 37 °C. Al término del tiempo se extrajeron 2 veces con 400 μL de una mezcla de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1), la mezcla se agitó suavemente y se centrifugó a 10,000 rpm/5 min a 4°C, el sobrenadante se retiró con puntas estériles y una vez más se le adicionaron 400 μL de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), la mezcla se agitó suavemente y se centrifugó a 10,000 rpm/5 min a 4°C. El precipitado formado se

resuspendió y se le adicionaron 10 μ L de acetato de sodio 3M y 250 μ L de etanol absoluto frío y se dejó a -20 °C por 2 horas. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 10,000 rpm/5 min a 4°C. El precipitado formado se secó en una centrifuga al vacio por 25 min. Finalmente el ADN se hidrató con 50 μ L de agua bidestilada estéril. Para realizar el corrimiento electroforético, se preparó, un gel de agarosa al 1.8 % en TBE 1X. Las muestras se disolvieron en 10 μ L de azul de bromofenol y se colocaron en los carriles correspondientes, así mismo se colocó un marcador de peso molecular de 100 kb. Los geles se corrieron 80 Volts durante 2.5 horas en un aparato de electroforesis horizontal. Por último, el gel se tiñó con una solución de Bromuro de Etidio (5 μ g/ μ L) por 10 minutos. Las imágenes de los geles se adquirieron y analizaron en un fotodocumentador modelo Epichemi Dark room UVP empleando el programa Lab Works versión 4.5.

- **Metodología empleada para la determinación de la morfología celular de las células de linfoma murino L5178Y.**

* *Tinción con Giemsa*

Con las células L5178Y previamente tratadas y no tratadas, con los compuestos a evaluar, se realizó el frotis correspondiente. Posteriormente, se fijaron con metanol y se tiñeron con el colorante de Giemsa. Para el análisis de la morfología celular se empleó un microscopio óptico marca Nikon modelo Eclipse E 600.

◆ ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos son presentados como la media \pm DS. La evaluación estadística de los datos obtenidos por citometría de flujo, se analizaron por medio de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Así mismo para el análisis de los datos de IC₅₀ y KD se empleó la prueba de *t*-student. La diferencia estadística se consideró cuando se obtuvieron valores de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

❖ RESULTADOS QUÍMICOS

• Síntesis de 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas

Empleando la metodología de síntesis previamente descrita en este trabajo de tesis, se sintetizó una serie de 18 moléculas a partir del correspondiente α -aminoácido. Al respecto, en la Tabla 9 se muestra la estructura así como el nombre sistemático correspondiente en cada caso.

Tabla 9.- 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas obtenidas en condiciones alcalinas.

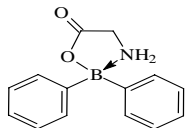
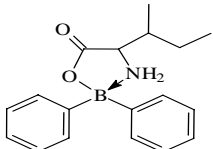
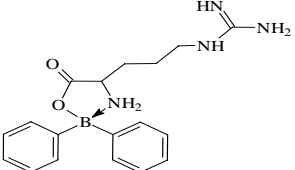
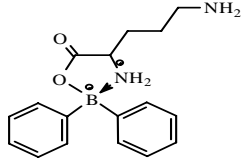
DFOXB	Estructura	Nomenclatura IUPAC
1		2,2-Difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
2		2,2-Difenil-4-(1-metilpropil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
3		2,2-Difenil-4-(3-guanidinopropil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
4		2,2-Difenil-4-(3-aminopropil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona

Tabla 9.- Moléculas obtenidas en medio alcalino (*continuación*).

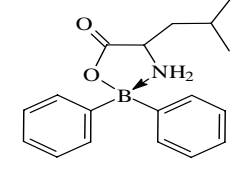
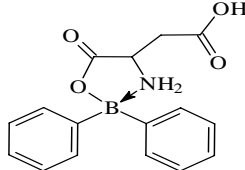
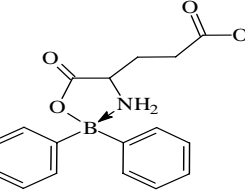
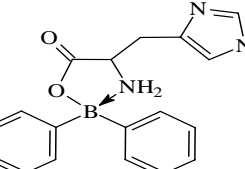
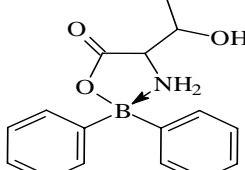
DFOXB	Estructura	Nomenclatura IUPAC
5		2,2-Difenil-4-(2-metilpropil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
6		2,2-Difenil-4-(carboximetil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
7		2,2-Difenil-4-(2-carboxietil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
8		2,2-Difenil-4-(4-1H-imidazolil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
9		2,2-Difenil-4-(1-hidroxietyl)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona

Tabla 9.- Moléculas obtenidas en medio alcalino (*continuación*).

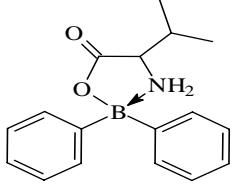
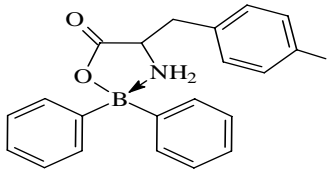
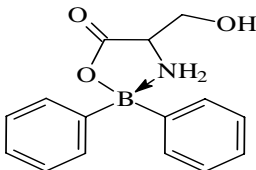
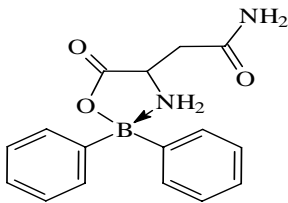
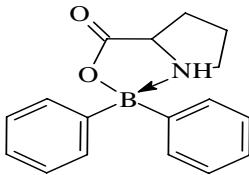
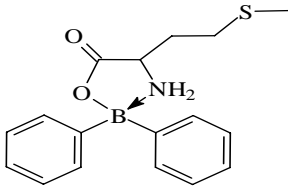
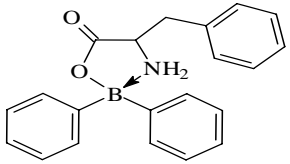
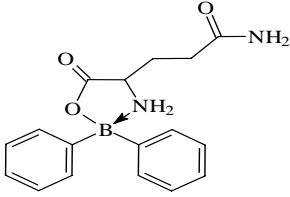
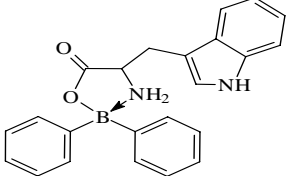
DFOXB	Estructura	Nomenclatura IUPAC
10		2,2-Difenil-4-isopropil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
11		2,2-Difenil-4-(1- <i>p</i> -hidroxifenilmetil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
12		2,2-Difenil-4-(hidroximetil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
13		2,2-Difenil-4-(2-amidoetil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
14		2,2-Difenil-pirro[1,2- <i>c</i>]-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
15		2,2-Difenil-4-(2-metiltioetil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona

Tabla 9.- Moléculas obtenidas en medio alcalino (*continuación*).

DFOXB	Estructura	Nomenclatura IUPAC
16		2,2-Difenil-4-bencil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
17		2,2-Difenil-4-(3-amidopropil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
18		2,2-Difenil-4-(3-indolil)-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona

Por otro lado, en la Tabla 10, se muestran los rendimientos obtenidos en cada una de las reacciones llevadas a cabo la síntesis de los compuestos 1-18, así como el pH empleado y el punto de fusión determinado experimentalmente (valores no corregidos).

Por medio de los datos espectroscópicos obtenidos de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C Y ^{11}B ; espectrometría de masas (IE y HR), además de espectrofotometría de absorción infrarroja (KBr), se llevó a cabo la caracterización estructural de las moléculas 1-18. (Tablas 11-14, respectivamente).

Tabla 10.- Condiciones de reacción empleadas y propiedades físicas.

DFOX B	pH	Rend* (%)	Rend** (%)	p. f.*	p. f.**
1	8.0	94	51 ^a 48.7 ^b 26 ^f	250-252	244-245 ^a 238-239 ^b 253-254 ^d 242-245 ^f
2	7.5-8.0	93	88 ^f	208-210	231-233 ^e 221-223 ^f
3	8.0-8.5	89		240-242	244-245 ^d
4	7.5-8.0	90	60 ^c	244-246	212-214 ^c
5	7.5-8.0	90	88 ^a 68.5 ^b 100 ^f	176-178	180-181 ^a 171-174 ^f
6	3.0-4.5	80	60 ^g	232-234	275 ^f 115 ^g
7	3.0-4.5	89	60 ^g	198-200	169-170 ^f 218 ^g
8	8.0	92	45.99 ^b	286-288	277-278 ^d 258-260 ^b
9	8.0	88	12.6 ^b 58 ^f	210-212	206-207 ^b 199-200 ^d 202-203 ^f
10	8.0	80	79.78 ^b	234-236	232-233 ^b
11	8.3	91	21 ^f	151-153	149-150 ^f
12	8.0	93	43.4 ^b 36 ¹⁰	210-212	224-226 ^b 212-215 ^d 259-260 ^f
13	7.5-8.0	76		230-232	225-226 ^d
14	8.0	95	100 ^f 87 ^h	254-256	300 ^d 268-269 ^f 263-265 ^h
15	7.5-8	78	78 ^f	234-236	232-235 ^d 222-224 ^f
16	8.0	65	70 ^g	230-231	242-243 ^d 230 ^g
17	8.0	83	-	235-237	263-269 ^e
18	7.5-8.0	55	-	240-242	249-250 ^d

* Experimentales; ** Reportados (^a:Skoog et al., 1964; ^b:Shin-Hua et al., 1967; ^c: Trujillo et al., 1998; ^d:Flückiger et al., 1984; ^e:Strang et al., 1989; ^f:Farfán et al., 1993; ^g: Nefkens et al., 1982 ; ^h:Rettig et al., 1977)

DFOXB	B-C ₆ H ₅				C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	¹¹ B (δppm)
	<i>i</i>	<i>o</i>	<i>m</i>	<i>p</i>							
1	147.8	131.0	127.1	126.1	172.5	42.9					4.91
2	147.9	131.2, 131.1	127.0, 127.9	126.0, 125.9	173.3	59.3	34.9	15.0	24.7	11.3	4.57
3	147.9, 147.5	131.1, 131.0	127.3, 127.0	126.0	174.1	54.6	38.5	26.9	25.3		4.98
4		131.1, 131.0	127.0	126.0, 125.9	174.1	54.4	38.1	26.6	23.9		4.81
5		131.0, 130.9	127.1, 127.0	126.0, 125.9	174.5	53.3	38.5	23.9	22.9	20.9	4.66
6	146.9		126.9	125.9	173.3	51.7	33.7	171.7			4.90
7	147.7, 147.2	130.9, 130.8	127.0, 127.9	126.9, 125.9	174.1	54.0	24.9	29.7	173.8		4.40
8	147.9	131.7, 131.4	127.9, 127.6	126.6	173.7	55.2	39.3	118	115	134.9	5.59
9		131.3, 131.2	127.1, 127.0	126.12	172.7	60.5	63.8	20.7			4.77
10		131.1, 131.0	127.1, 127.0	126.2, 126.1	172.3	57.7					4.39

11	148.1	131.2, 131.1	127.0, 126.9	126.0, 125.9	174.1	57.5	28.4	18.8	18.3		4.06	
12	148.1, 147.3	131.2, 130.8	127.1, 127.0	126.0, 125.9	173.6	57.1	34.2	<i>i</i> 127.1	<i>o</i> 130.3	<i>m</i> 115.3	<i>p</i> 156.2	3.84
13	148.3, 147.2	131.1, 130.6	127.3, 127.0	125.9, 125.9	173.9	55.8	26.1	106.6	108.7		4.32	
14		131.2, 130.9	127.2, 127.2	126.2	174.6	62.1	27.3	24.9	50.1		5.79	
15	148.3, 147.8	131.4	127.6, 126.6	125.5, 126.5	174.6	54.1	28.9	29.4	14.2		4.37	
16		131.1, 130.8	127.0, 126.9	125.9, 125.8	173.5	56.7	35.0	131.6	129.3	128.4	4.15	
17						54.8					5.2	
18		131.5, 131.4	127.6, 127.5	126.5, 126.4	174.6	54.9	25.8	31.4	174.4		3.93	

Tabla **11**.- Desplazamientos químicos en *ppm* obtenidos por RMN ¹H (DMSO-*d*₆), de los núcleos de hidrógeno de las oxazaborolidinonas **1-18**.

B-C ₆ H ₅									
DFOXB	H- _o	H- _m	H- _p	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	N-H
1	d, 7.35, J=7	t, 7.22, J=7	t, 7.16, J=7	t, 3.43, J=6					sa, 7.02
2	7.42	7.20	7.17	3.57					7.73, 6.81
3	dd, 7.41, J=7	d, 7.20	m, 7.16	sa, 3.48					s, 8.05; t, 6.78, J=9, 10
4	t, 7.41, J=7	m, 7.22	m, 7.17	s, 3.4	t, 2.73, J=7	m, 1.65- 1.75			sa, 7.98; sa, 6.79
5	d, 7.39, J=7	3d, 7.21, J=7	dd, 7.14, J= 7, 2	q, 3.42	m, 1.45- 1.62	m, 1.76- 1.87	t, 0.83, 7.46, J=7	t, 0.83, 7.46, J=7	sa 7.34; t, 6.68, J=10
6	d, 7.43, J=8	t, 7.37	t, 7.22, J=7	sext, 3.77, J=6	d, 2.78, J=6				t, 7.37; t, 6.80, J=11
7	d, 7.38, J=8	2t, 7.22, J=8	sd, 7.16, J= 7	q, 3.6, J=5	sext, 2.04, J=5; sext, 1.84, J=7.	t, 2.46, J=7			dd, 7.43, J=11; dd, 6.77, J=11, 9
8	m, 7.36	t, 7.21	d, 7.16	sa, 3.54					s, 8.20; s, 7.02
9	d, 7.42	2t 7.21, J=7	t, 7.16, J=7	sext, 3.55, J=4	m, 4.07	d, 1.19, J=7			t, 5.77, J=10

10	m, 7.43	d, 7.21	m, 7.15	m, 3.67-3.71				d, 6.67, $J=10$
11	7.47	7.22	7.15	3.4	m, 2.88	d, 1.0; d, 0.92		6.31
12	2d, 7.43, 7.40, $J=7$	t, 7.22, $J=7$; t, 7.20, $J=7$	t, 7.19, $J=7$	m, 3.57-3.60	dd, 3.04, $J=14, 3$; dd, 2.79, $J=14, 10$			
13				3.7				
14	d, 7.48, $J=8$	t, 7.25, $J=8$	t, 7.17, $J=7$	q, 4.22	m, (2.2-1.95)	q, 1.73, $J=7$	sext, 2.98, $J=5$; sext, 2.4, $J=5$	dd, 7.93
15				2.6				
16	d, 7.44, $J=12$	m, 7.25	m, 7.18	m, 3.64-3.7	t, 2.5, $J=1.4, 1.7$			
17				3.6				
18				m, 3.4				

Tabla **12**.- Desplazamientos químicos en *ppm* obtenidos por RMN ^{13}C y ^{11}B ($\text{DMSO-}d_6$), de los núcleos de carbono y boro respectivamente de las oxazaborolidinonas **1-18**.

Tabla 13.- Valores m/z (% ar) de algunos fragmentos comunes obtenidos por espectrometría de masas mediante la técnica de impacto electrónico a 70 eV para la serie de oxazaborolidinonas 1-18.

DFOXB	M ⁺ (m/z)	M-1 (m/z)	M-77 (m/z)	Otros Valores (m/z)				
1	239 (49)	238 (14)	162 (100)	161 (76)	132 (8)	105	104 (12)	77(21)
2	295 (14)	294 (7)	218 (100)	161 (41)	132 (5)	-	104 (11)	77 (6)
3	-	-	-	-	-	105 (5)		78 (100)
4	-	295 (4)	219 (100)	160 (13)	-	105 (16)	104 (8)	78 (12)
5	295 (18)	294 (9)	218 (100)	161 (19)	132 (7)	-	104	77 (6)
6	297	-	-	-	-	-	104 (15)	-
7	311 (7)	310 (3)	233 (19)	160 (16)	132 (11)	105 (44)		78 (100)
8	319 (6)		242 (100)	163 (12)	132 (1)	105 (4)	104 (3)	77(3), 78(7)
9	283 (68)	282 (32)	206 (100)	161 (68)	132 (13)	-	104 (33)	78 (30)
10	281 (13)	280 (6)	204 (85)	161 (33)	132 (6)	105	104 (9)	72 (100)
11	345 (5)	344 (19)	268 (275)	161 (3)	-	-	107 (100)	77 (6)
12	269 (12)	268 (5)	192 (21)	161 (16)	132 (6)	105 (24)	104 (14)	77(23) 78(100)
13	296 (0.6)		219 (4)	161 (4)	-	-	104 (23)	78 (100)
14	279 (13)	278 (10)	202 (100)	160 (0.6)	-	-	104 (3)	77 (78)
15	-	-	-	-	131(6),	-	-	77 (9)
16	329 (13)	328 (4)	252 (100)	160(11), 161 (5)	132 (1)	105 (14)	104 (9)	77 (8)
17	310 (12)	309 (6)	233(83)	160 (6)	132 (3)	-	104 (21)	77(12) 84(100)
18	368 (6)	367 (1)	291 (4)	-	130 (100)	-	-	77 (3)

Tabla 14.- Bandas características en cm^{-1} para las vibraciones fundamentales de las difeniloxazaborolidinonas 1-18.

DFOXB	Asignación				
	C=O (cm^{-1})	B-O (cm^{-1})	B-N (cm^{-1})	N-H (cm^{-1})	C-H (cm^{-1})
1	1723	1306	1428	2953	3076
2	1714	-	1432	2934	3069
3	1721	1311	1432	2946	3067
4	1716	-	1431	2965	3067
5	1715	1331	1431	2974	3099
6	1706	1344	1444	3072	3073
7	1708	1326	1432	2967	3104
8	1722	1333	1438	2927	3047
9	1721	1328	1436	2935	3074
10	1720	1308	1432	2973	3044
11	1736	-	-	-	-
12	1712	1292	1431	2933	3070
13	1715	-	-	-	-
14	1717	-	1430	2965	3050
15	1714	-	1431	2921	3072
16	1719	1366	1430	2929	3045
17	1709	1311	1430	2922	3050
18	1715	1326	1429	2920	3071

- **Datos de KD, Log P, ΔG y π .**

Por medio de la metodología descrita previamente, se determinaron experimentalmente los valores del KD, para cada una de las moléculas estudiadas. Siguiendo este protocolo, primeramente en la Tabla 15, se muestran los valores de máximos de absorción de las moléculas 1-18. Complementariamente, a manera de ejemplo, se presenta en la Figura 15, el espectro UV-Visible del compuesto 1, en donde se observan los máximos de absorción, obtenidos en disolución *n*-octanol-etanol empleando un espectrofotómetro UV-Visible marca Perkin Elmer modelo Lambda 25.

Tabla 15.- Máximos de absorción de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas 1-18 determinadas a 25 °C.

DFOXB	λ_{max} (nm)	DFOXB	λ_{max} (nm)
1	221	10	221
2	221	11	230
3	207	12	221
4	221	13	230
5	201	14	236
6	221	15	232
7	224	16	221
8	221	17	230
9	220	18	270

Adicionalmente, se presenta el tiempo óptimo de extracción determinado para cada una de las moléculas objetivo, obtenidos a partir de la cinética de extracción correspondiente. Así mismo es importante resaltar que el tiempo óptimo determinado, se empleo para el cálculo de la constante de distribución obtenida experimentalmente. Particularmente en la gráfica **3**, se muestra la cinética de extracción correspondiente al compuesto **1**.

En este, se observa que, la mayor absorbencia y por tanto, la mayor concentración del compuesto de interés presente en la fase orgánica se obtiene a los 10 minutos de agitación, por lo que se seleccionó este tiempo como el óptimo, este cálculo se realizó por triplicado. Cabe mencionar que una cinética de extracción semejante se realizó para el total de las moléculas estudiadas. Los valores de los tiempos de extracción del resto de las DFOXB se calcularon de la misma manera y fueron de 10 minutos.

Por otro lado, con la determinación del tiempo óptimo de agitación se procedió a calcular el KD, usando las proporciones siguientes 1:1 de la mezcla *n*-octanol:buffer, respectivamente. Es importante mencionar que se utilizó la técnica de matraz agitado recomendada en la guía OECD Europea, la cual sugiere que para esta técnica se tenga un valor de desviación estándar no mayor a 0.3 unidades de Log P, además las concentraciones de los compuestos a evaluar no deben de ser mayores a 0.01 Molar. En la Tabla **16**, se muestran los valores de KD obtenidas del promedio de 6 experimentos independientes para los compuestos **1-18**. La expresión

logarítmica base 10 de la KD, (Log P), se muestra en la misma Tabla, así como el valor de ΔG particularmente expresado en KCal^oK/mol y KJ^oK/mol, además del valor correspondiente para el parámetro π .

Tabla **16**.- Parámetros fisicoquímicos determinados experimentalmente para las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas **1-18**.

DFOXB	KD	Log P	ΔG KCal ^o K/mol	ΔG KJ ^o K/mol	π
1	30.1	1.48	-2.02	-8.43	0
2	16.6	1.22	-1.67	-6.96	-0.26
3	14.7	1.17	-1.59	-6.66	-0.31
4	4.1	0.61	-0.84	-3.50	-0.87
5	14.1	1.15	-1.57	-6.55	-0.33
6	9.5	0.98	-1.34	-5.59	-0.5
7	14.4	1.16	-1.58	-6.62	-0.32
8	10.4	1.02	-1.39	-5.8	-0.46
9	7.0	0.85	-1.15	-4.82	-0.63
10	13.0	1.11	-1.52	-6.35	-0.37
11	14.4	1.16	-1.58	-6.62	-0.32
12	13.1	1.12	-1.53	-6.37	-0.36
13	9.7	0.99	-1.35	-5.64	-0.49
14	12.3	1.09	-1.49	-6.22	-0.39
15	7.9	0.9	-1.22	-5.1	-0.58
16	16.9	1.23	-1.68	-7.01	-0.25
17	13.2	1.12	-1.52	-6.38	-0.36

❖ RESULTADOS BIOLÓGICOS

Para la evaluación de la actividad inductora de apoptosis de los compuestos **1-18**, se realizó primeramente un cernimiento, con el fin de seleccionar a aquellas moléculas que presentaron el mayor efecto sobre la viabilidad celular. Para lo cual se emplearon tres líneas celulares ATCC diferentes: K562, (una eritroleucemia), HCT15, (células de neoplásicas de Colon) y L5178Y, (células de linfoma murino). Es conveniente mencionar que para esta evaluación, se uso una concentración única de 100 μ M y un tiempo de incubación de 24 h. Posteriormente se seleccionaron aquellas moléculas que presentaron una viabilidad celular menor del 50 % en las tres líneas celulares. Los resultados se muestran en la Tabla **17**.

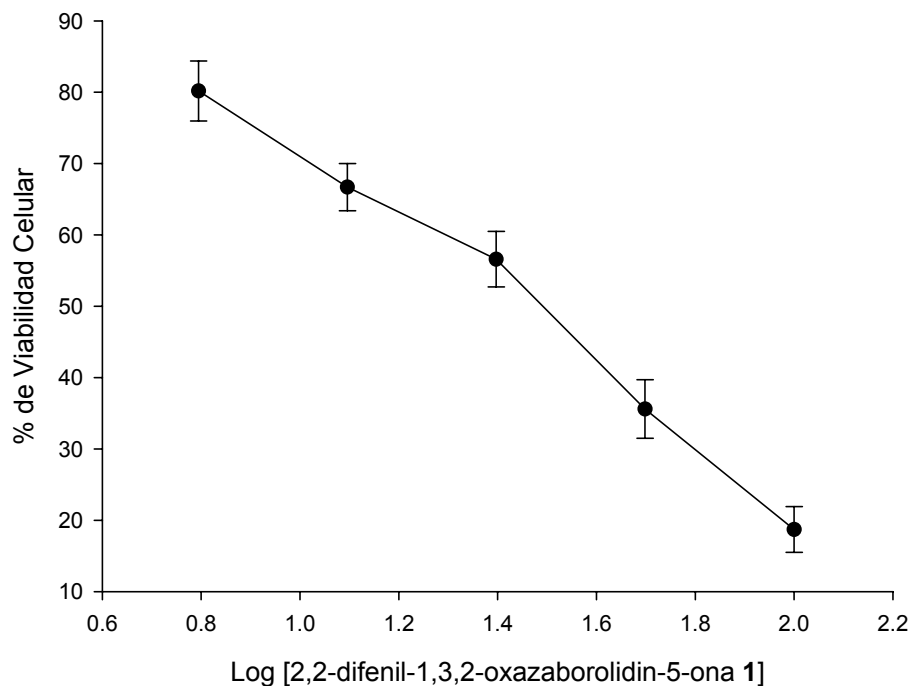
Tabla **17**.- Viabilidad celular inducida por las DFOXB, sobre 3 diferentes líneas celulares.

	Línea celular		
DFOXB	K562 (% de VC)	HCT15 (% de VC)	L5178-Y (% de VC)
1	17.53	20.82	10.90
2	18.57	33.63	13.60
3	14.37	30.86	25.77
4	40.12	33.52	36.44
5	20.23	43.70	28.66
7	22.31	44.85	59.79
10	39.97	47.25	28.55
12	15.23	45.34	36.11
14	34.01	68.57	32.02
16	21.27	33.75	65.89

Después de seleccionar las moléculas que indujeron una viabilidad menor al 50 %, se procedió a la determinación de la concentración que inhibiera el crecimiento celular al 50 %. Los resultados de esta determinación se describen a continuación.

- ***Determinación del CI_{50} in vitro, sobre células de linfoma murino L5178Y.***

Mediante el ensayo de viabilidad celular, empleando el método modificado de Mosmann MTT, se determinaron los valores de inhibición del crecimiento celular al 50 %, en células de linfoma murino L5178Y a un tiempo de 24. Este método evalúa la actividad enzimática, que en las células viables tiene la capacidad de reducir el MTT a una forma insoluble conocida como formazán. La concentración de esta última es proporcional al porcentaje de células viables. Con los valores de viabilidad celular, se construyó una curva concentración-viabilidad empleando un intervalo de concentraciones desde 6.26 a 100 μ M. Al graficar el log de la concentración vs porcentaje de viabilidad celular (gráfica 4), se observa que existe una relación concentración-efecto con un coeficiente de correlación de 0.96. Empleando este tipo de gráfica, se pudo determinar la concentración necesaria para lograr un efecto al 50 %. En la Tabla 18, se presentan los valores de IC_{50} para el total de las moléculas evaluadas, éstos se encuentran expresados en concentración μ M.



Grafica 4.- Curva de concentración-efecto del compuesto 1. Las células L5178Y fueron tratadas con las concentraciones 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μM por 24 h. La viabilidad celular fue determinada por el método colorimétrico de Mossmann. Los resultados son expresados como porcentaje de Viabilidad celular, cada punto es el promedio de tres experimentos independientes, $p \leq 0.05$.

El compuesto que presentó el valor más pequeño de CI_{50} fue 1 con $22.47 \pm 0.2 \mu\text{M}$ y consecuentemente el mayor efecto sobre las células tratadas, por otro lado, las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas que mostraron el menor efecto sobre la viabilidad celular fueron la 6, 8 y 11 las

cuales se generaron a partir de L-Ac. Aspártico, L-Histidina y L-Tirosina, respectivamente con valores mayores a 200 μM .

Tabla **18**.- Valores de IC_{50} de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas.

DFOXB	IC_{50} (μM)	DFOXB	IC_{50} (μM)
Glicina (1)	22.47 \pm 0.2	L-Histidina (8)	> 200
L-Isoleucina (2)	42.73 \pm 1.8	L-Treonina (9)	127.6 \pm 2.5
L-Arginina (3)	30.93 \pm 1.1	L-Valina (10)	38.65 \pm 0.6
L-Ornitina (4)	44.52 \pm 0.9	L-Tirosina (11)	>200
L-leucina (5)	47.85 \pm 1.4	L-Serina (12)	48.77 \pm 0.4
L-Ácido Aspártico (6)	>200	L-Prolina (14)	75.11 \pm 2.5
L-Acido Glutámico (7)	102.73 \pm 1.9		

Con las 9 moléculas las cuales se seleccionaron por presentar valores de IC_{50} en un intervalo entre 0-100 μM , se realizó una segunda evaluación para identificar aquellas que presentaron la mayor inducción de apoptosis; para lo cual se empleó la técnica de Anexina V ya que es útil en la determinación de la presencia de fosfatidilserina, estructura que se ha reconocido está presente en una etapa temprana del proceso apoptótico. Los resultados de las determinaciones se muestran en la Tabla **19**, y están expresados como el porcentaje de células positivas y negativas tanto a Anexina V como a Yoduro

de Propidio. Además, se presentan los valores de % de apoptosis para células tratadas con el vehículo (DMSO) y células tratadas con Dimetildiamida (DMD) compuesto empleado como control positivo, en este protocolo, debido a su capacidad de oxidar al glutatión reducido al correspondiente disulfuro, que en las células L5178Y se encuentra aumentado (Kosower et al., 1969). Adicionalmente, y a manera de ejemplo, en la Fig. 17 se muestra el dot-plot obtenido por citometría de flujo particularmente del compuesto 1, así como del control cuando fueron teñidas con Anexina V-FITC/IP.

Tabla 19.- Efecto sobre células L5178Y tratadas con las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas, a una concentración de 100 μ M por 24 h y teñidas con Anexina V-FITC/IP.

DFOXB	Anexina V-FITC/IP		
	A ⁻ , IP ⁻ (vivas)	(A ⁺ -IP ⁻) + (A ⁺ , IP ⁺) (apoptóticas)	Necróticas
1	81.78	17.7 \pm 1.7	0.53
2	90.41	7.0 \pm 2.1	2.54
3	89.07	10.7 \pm 1.9	0.17
4	87.07	10.9 \pm 0.8	2.06
5	90.96	8.3 \pm 2.6	0.70
7	93.00	6.9 \pm 1.2	0.03
10	87.21	12.3 \pm 1.1	0.45
12	89.25	9.3 \pm 1.7	1.37
14	93.46	6.4 \pm 2.1	0.10
Células control	92.40	7.2 \pm 1.6	0.34
DMSO	92.97	6.1 \pm 1.3	0.93
DMD	74.49	25.2 \pm 2.1	0.23

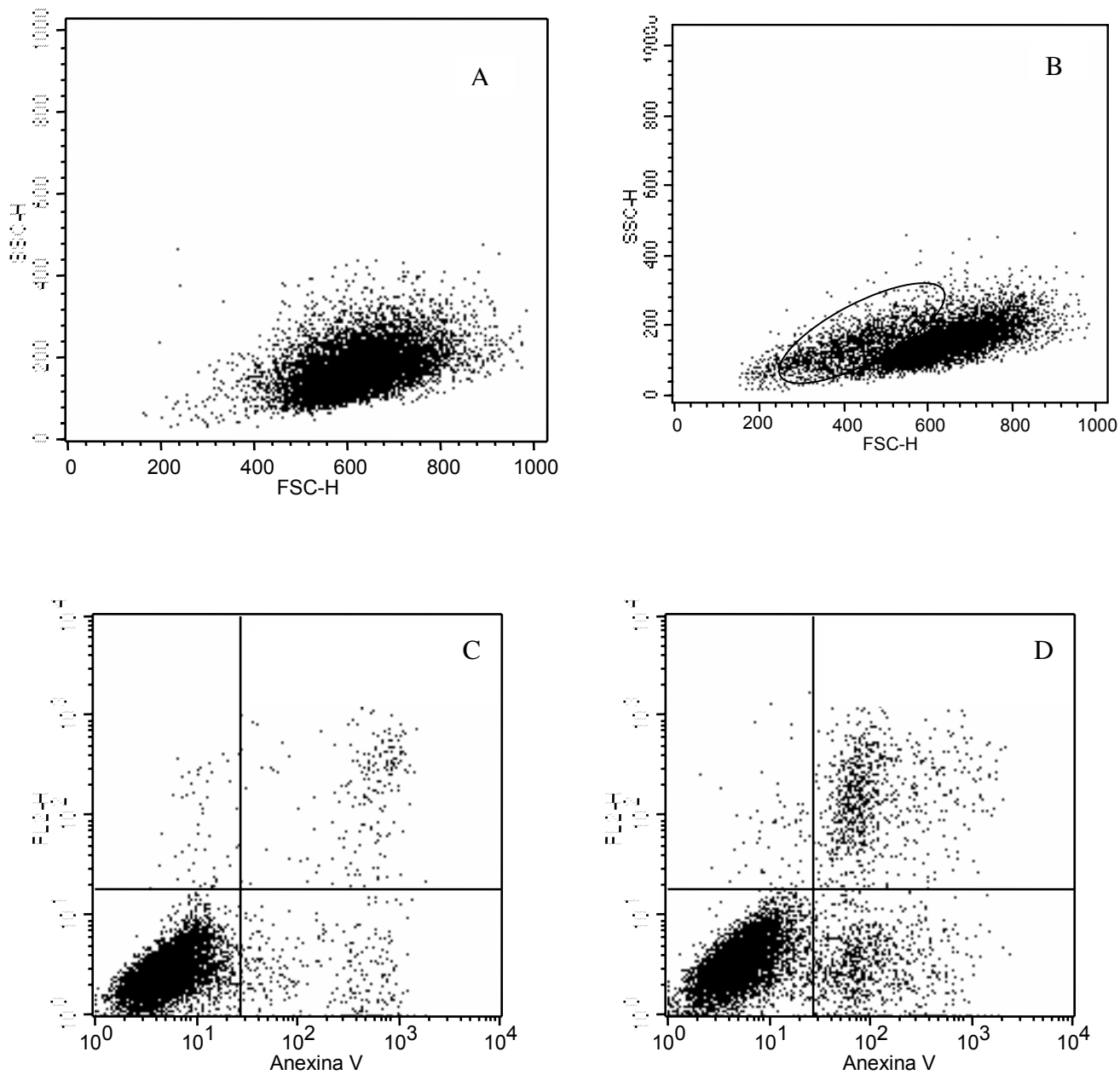
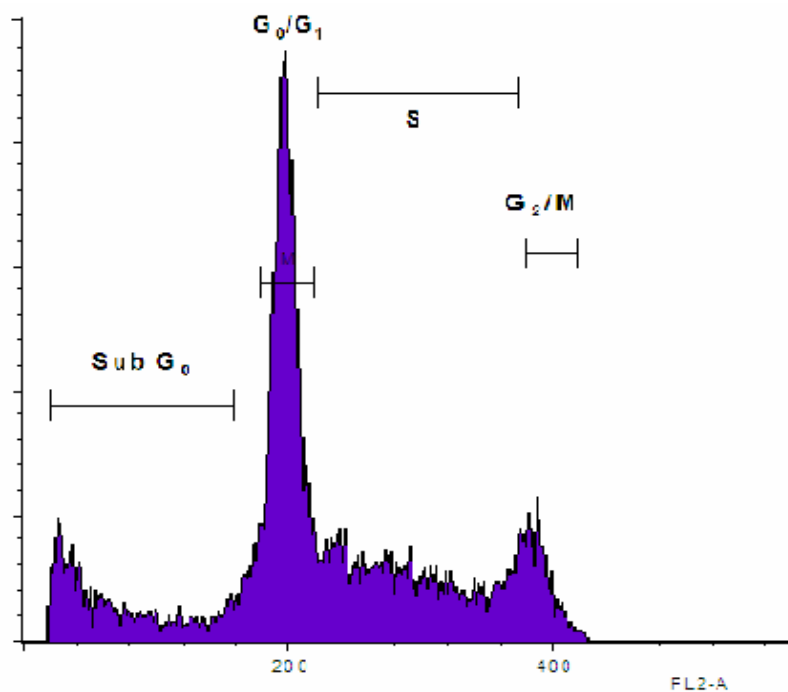


Fig. 17.- Efecto causado por el compuesto 1. Análisis citofluorométrico de de células L5178Y incubadas por 24h y teñidas con Anexina-FITC y IP: A y B (dot-plot de FSC vs SSC), C y D (dot-plot de FL1-H vs. FL2-H). A y C (Células control) y B y D (tratadas con 1, a una concentración de 100 μ M).

En la figura **15 B** (dot-plot SSC vs FSCH), se encuentran delimitadas por un óvalo las células apoptóticas, lo cual se confirmó al evaluarlas por medio de la metodología de anexina V. Al respecto, en las imágenes **15 C** y **D**, se muestran las poblaciones de células en apoptosis tanto temprana como tardía las cuales fueron tratadas con el compuesto **1**.

Para corroborar los hallazgos obtenidos al evaluar la presencia de FS usando Anexina V, se procedió a analizar, el DNA presente en las células tratadas con las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas seleccionadas, por lo que se cuantificó el porcentaje de células que se encontraron en cada una de las fases del ciclo celular. El histograma de la distribución de DNA, (gráfica **5**), mostró la presencia de un pico por debajo de la fase G_0/G_1 , el cual se consideró como un indicativo de células en apoptosis. El porcentaje de células que se localizan por debajo del pico G_0/G_1 , son apoptóticas. En la Tabla **20**, se presentan los porcentajes de células L5178Y que se ubican en cada una de las fases del ciclo celular, al ser tratadas con 100 μ M de cada una de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas estudiadas a un tiempo de 24 h. Los datos se adquirieron por medio de citometría de flujo, empleando el software FASCalibur, el análisis de las mismas se realizó empleando el programa CELLQuesPro.



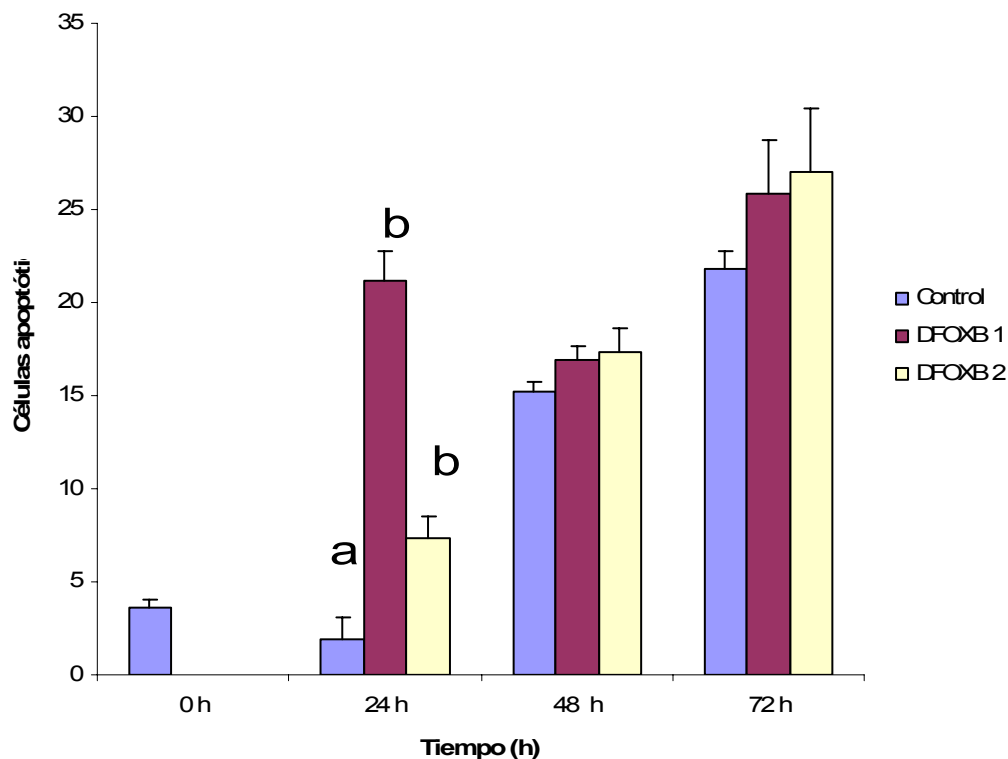
Gráfica 5.- Histograma de la distribución del DNA de las células tratadas con 100 μ M del compuesto 1 a las 24 h.

Tabla 20.- Efecto de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas sobre el ciclo celular de células de linfoma murino L5178Y.

DFOXB	Fases del ciclo celular			
	G_0/G_1	S	G_2/M	sub G_0/G_1
1	39.72	31.23	7.52	21.22 \pm 4.2
2	47.16	30.27	7.64	7.30 \pm 2.9
3	49.48	30.07	7.81	4.79 \pm 2.4
4	53.38	29.38	6.75	3.78 \pm 1.3
5	46.49	30.36	10.36	5.29 \pm 2.6
7	57.05	28.71	5.73	2.79 \pm 1.3
10	46.58	32.53	8.59	4.70 \pm 2.2
12	46.17	29.60	9.26	6.13 \pm 1.4
14	57.04	30.04	3.90	2.43 \pm 1.2
Control	52.47	33.04	7.19	1.94 \pm 1.8
DMSO	58.82	28.70	3.42	2.79 \pm 2.1
DMD	46.58	27.24	7.30	13.02 \pm 2.2

Como se puede observar en la Tabla **20** las células tratadas con los compuestos **1** y **2**, a la concentración 100 μM por 24 h, presentaron las mayores diferencias (estadísticamente significativas con respecto a las células control $p \leq 0.05$ (Kruskal-Wallis)), en la determinación del pico sub G_0/G_1 , considerando que tanto la molécula 1 como la 2 presentaron los mejores valores de Log P y que ambas inducen apoptosis en el modelo empleado, se seleccionaron ambas para continuar con el estudio.

Para conocer el tiempo adecuado para llevar a cabo la evaluación de los compuestos seleccionados, se realizó una cinética empleando tres diferentes tiempos 0, 24, 48 y 72 h, posteriores al tratamiento. El parámetro que se consideró evaluar fue el pico sub G_0 , se empleó una dosis de 100 μM , tanto del compuesto **1** como del **2** (Gráfica **6**).

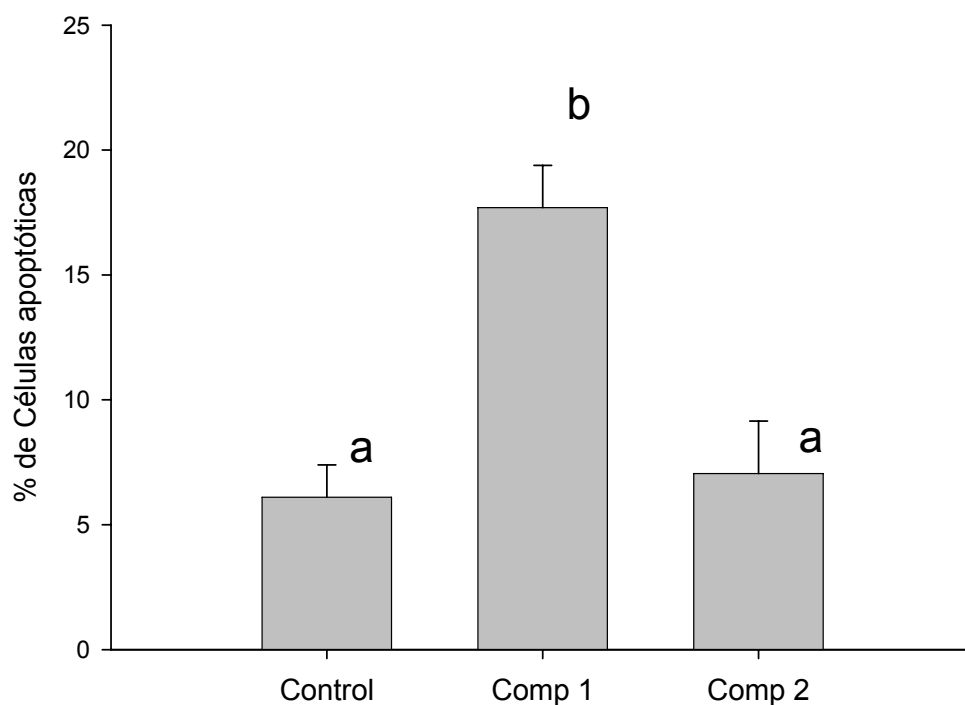


Gráfica 6.- Efecto de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas **1** y **2** sobre células de linfoma murino L5178Y con respecto al tiempo. Se presentan los resultados de la evaluación del pico sub G_0/G_1 determinado en células tratadas y no tratadas a una concentración de 100 mM con las moléculas en estudio durante los tiempos de 24, 48 y 72 h. Literales diferentes $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis, cada punto es la media \pm DE, $n=4$.

De los datos mostrados en la gráfica anterior, se determinó que el tiempo de 24 h de tratamiento fue significativamente diferente con respecto a las células control, no así en los tiempos de 48 y 72 h. Por lo anterior, se fijó este tiempo para hacer el resto de las evaluaciones.

- **Externalización de Fosfatidilserina**

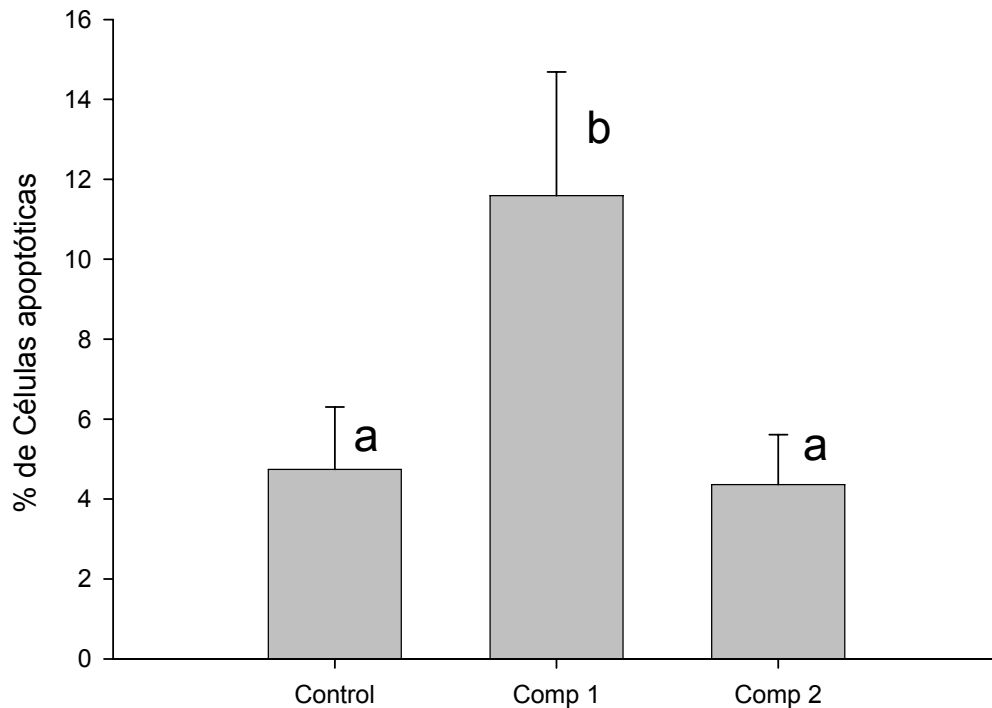
La detección de la presencia de fosfatidilserina en las células tratadas con los compuestos **1** y **2**, se determinó mediante anexina V (Tabla **19**). En este análisis se consideraron positivas las regiones de AV⁺-IP⁻ y AV⁺-IP⁺, (células en apoptosis temprana y tardía, respectivamente). En la gráfica **7**, se observa diferencia significativa entre los porcentajes de células apoptóticas tratadas con **1** y las células control, no así con las células tratadas con **2**.



Gráfica **7**.- Efecto de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas sobre células de linfoma murino L5178Y. Se presentan los valores de % de células de células apoptóticas. Los valores en cada punto, son el promedio de 4 determinaciones independientes evaluadas a las 24 horas posteriores a la administración del compuesto y son significativamente diferentes con respecto al control a la concentración de 100µM. Literales diferentes $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis, cada punto es la media \pm DE, $n = 4$.

- ***Determinación de la actividad de Caspasa-3***

La presencia de la caspasa 3 activa, es un indicador indiscutible de que el mecanismo de muerte celular por apoptosis se encuentra en ejecución. Los valores fueron adquiridos mediante citometría de flujo empleando el kit correspondiente para la detección de esta enzima. Se emplearon células tratadas por 24 h con los compuestos **1** y **2**, sí como células tratadas con DMSO. En la gráfica **8**, se presentan los promedios de los valores adquiridos de cuatro experimentos independientes por duplicado. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante la correspondiente prueba no paramétrica (Kruskar-Wallis), se utilizó una p de significancia de ≤ 0.05 . En la gráfica **8**, se observa que sólo existe diferencia significativa entre el compuesto **1** y las células control. No se observó diferencia entre las células tratadas con el compuesto **2** y las control.

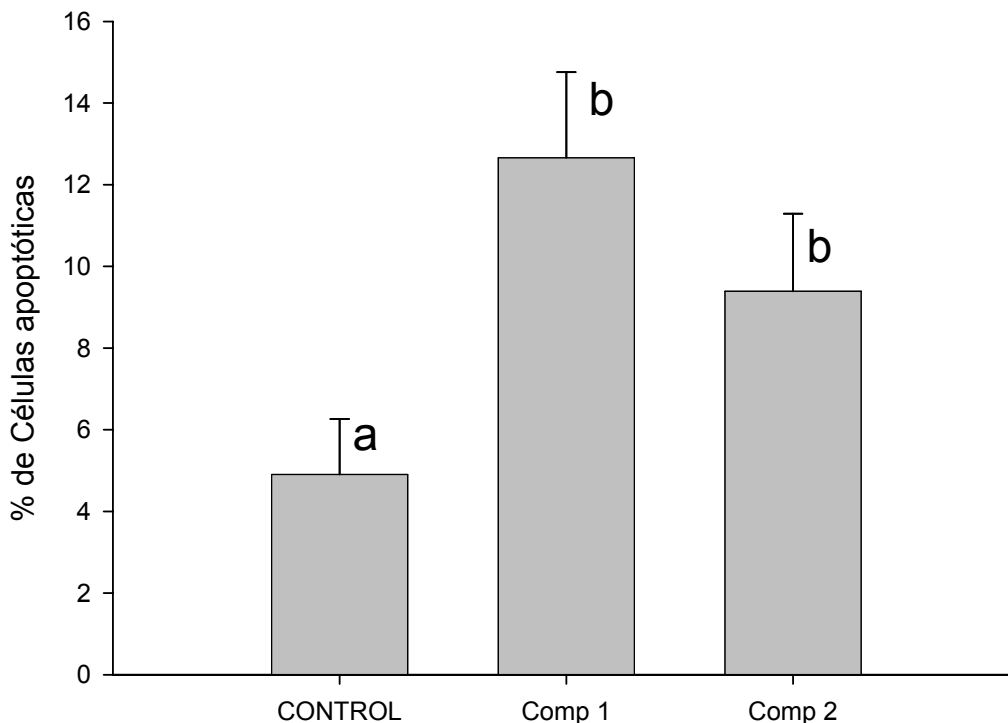


Gráfica 8.- Efecto de las DFOXB 1 y 2 sobre la activación de la caspasa 3. Los valores son el promedio de 4 experimentos independientes evaluados a las 24 h posteriores a la administración del compuesto. Literales diferentes $p \leq 0.05$ Kruskal-Wallis, cada punto es la media \pm DE, $n = 4$.

- **Determinación del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m)**

Se sabe que las células que han puesto en marcha el proceso apoptótico, presentan una alteración del potencial de trabajo normal de la mitocondria, en donde una de sus características principales es la traslocación del citocromo *c* al espacio intracelular y la consiguiente activación de las caspasas 3 y 8 cuando éste se ha modificado de manera irreversible.

Por medio de la tinción de células con rodamina 123, y su posterior análisis por citometría de flujo, se puede conocer cuál es la situación por la que atraviesa la membrana mitocondrial. En la gráfica **9**, se presentan los resultados de cuatro determinaciones por duplicado e independientes entre sí, del potencial de membrana mitocondrial evaluado en células de linfoma murino L5178Y, tratadas con los compuestos **1** y **2** a una concentración 100 μ M por 24 h y teñidas con rodamina 123. Los valores están expresados como el porcentaje de células que presentaron bajo potencial de membrana mitocondrial. Como se observa en la gráfica **9**, tanto el compuesto **1** como el **2** indujeron de manera significativa, una disminución del potencial de membrana mitocondrial en células tratadas con respecto a las células control. ($p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis).



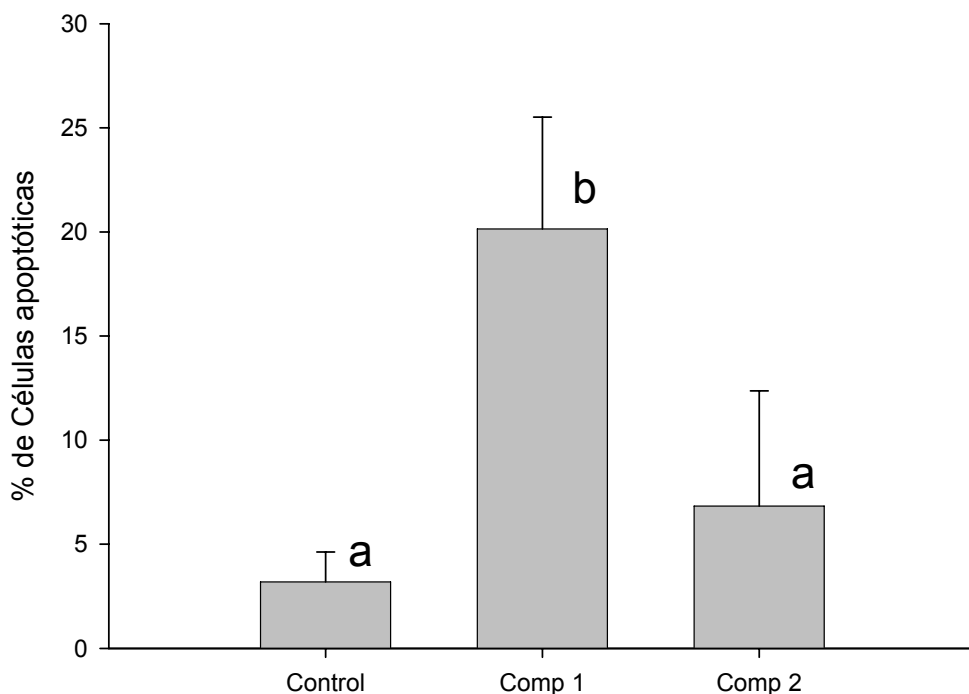
Gráfica 9.- Efecto de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas **1** y **2** sobre el potencial de membrana mitocondrial. Los valores son el promedio de 4 experimentos independientes, evaluados a las 24 h posteriores a la administración del compuesto. Literales diferentes $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis, cada punto es la media \pm DE, $n = 4$.

- **Análisis del DNA, de células del linfoma murino L5178Y.**

* Técnica de pico sub G_0/G_1 .

En la gráfica **10**, se presentan los porcentajes de células que se localizaron por debajo del pico G_0 , en el histograma de distribución del DNA adquirido mediante citometría de flujo; en la misma gráfica, se observa que existe

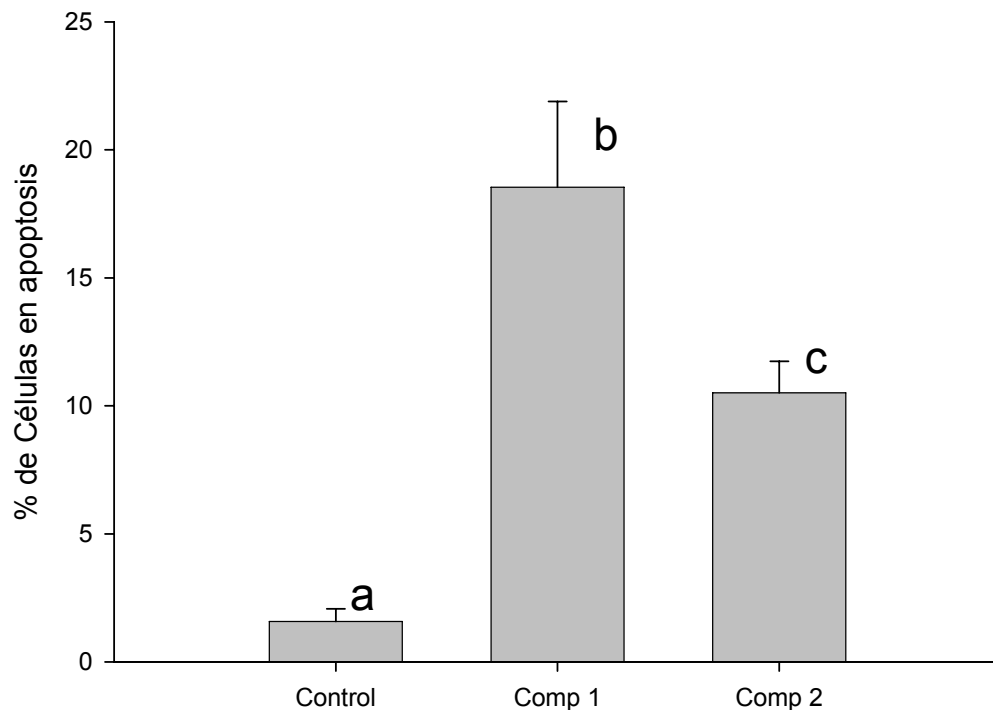
diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en cuanto a la respuesta observada en las células tratadas con **1** y **2** con respecto a las células que sólo se trataron con DMSO.



Gráfica **10**.- Efecto de las DFOXB **1** y **2** sobre la distribución del DNA. Los valores de cada punto, son el promedio de 4 experimentos independientes evaluados a las 24 h posteriores a la administración del compuesto a una concentración de $100\mu\text{M}$. Literales diferentes $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis, cada punto es la media \pm DE, $n = 4$.

* TUNEL

Para consolidar aun más la propuesta de trabajo de que las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas **1** y **2** inducen la muerte celular por apoptosis, se evaluó la fragmentación internucleosomal del DNA en células L5178Y tratadas y no tratadas con los compuestos a analizar. Este se realizo mediante citometría de flujo, usando la técnica conocida por sus siglas en ingles TUNEL. Para lo cual se usaron células L5178Y tratadas con una concentración de 100 μ M de los compuestos **1** y **2** por 24 h, así como células control. En la gráfica **11**, se presentan los porcentajes de células tratadas que fueron positivas a la prueba de TUNEL, en donde se observa que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a células no tratadas, la cual se determinó mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Los valores mostrados son el promedio de cuatro experimentos independientes por duplicado.



Gráfica 11.- Efecto de las DFOXB 1 y 2 sobre el DNA de células de linfoma murino L5178Y. Las células tratadas y no tratadas, se tiñeron con el kit de TUNEL y se analizaron por citometría de flujo. Literales diferentes $p \leq 0.05$, Kruskal-Wallis, cada punto es la media \pm DE, $n = 4$.

* **Electroforesis de DNA**

Posteriormente a la incubación por 24 h de células L5178Y con una concentración $100\mu\text{M}$ de los compuestos 1 y 2, se procedió a la extracción del DNA presente en éstas, para lo cual se empleó la metodología previamente descrita en Materiales y Métodos. Posteriormente, una cantidad

de DNA fue disuelta en 10 μ L de una solución de carga, para finalmente ser depositada en los pozos formados previamente en el gel agarosa (1.8 %). Después de 2.5 horas de corrimiento electroforético, el gel se tiñó con una disolución de Bromuro de Etidio en PBS 1X por 10 minutos, finalmente se adquirieron las imágenes correspondientes. En la Figura **18** se muestra a manera de ejemplo, la imagen adquirida de un gel de agarosa, en donde se han colocado de izquierda a derecha: marcador de peso molecular (100 pb); DNA de células tratadas con DMSO; DNA de células L5178Y tratadas con DFOXB 1; DNA de células L5178Y tratadas con DFOXB 2. En la imagen se observa la presencia de un patrón de escalera típico de una fragmentación internucleosomal inducida por un proceso de muerte celular por apoptosis.

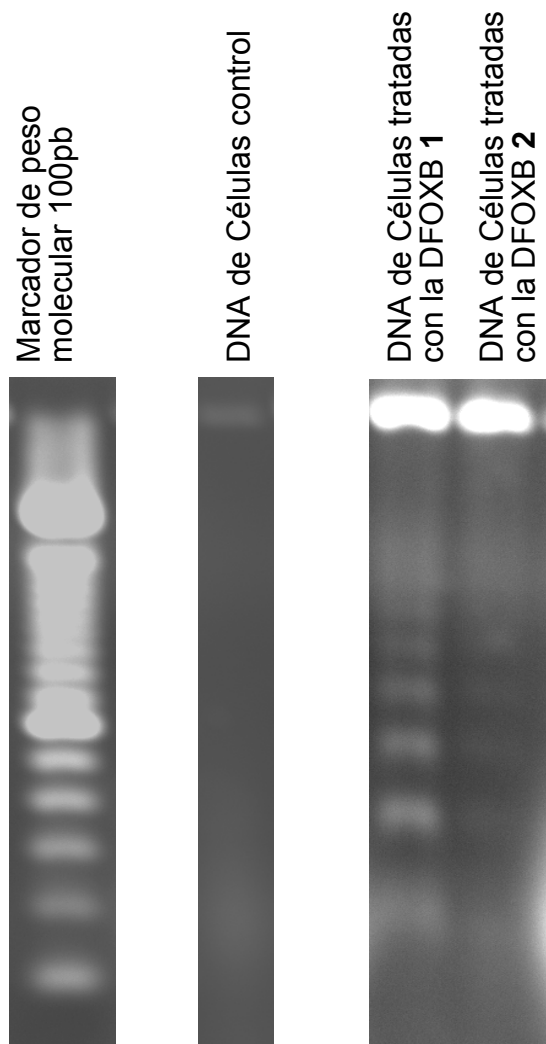
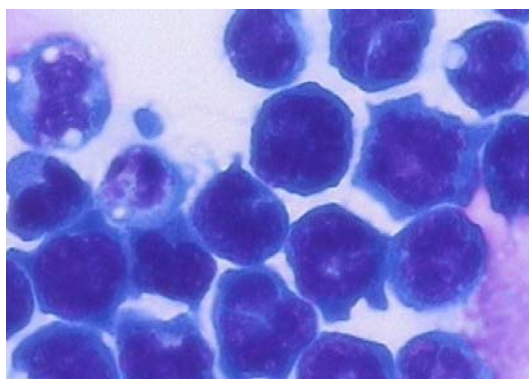


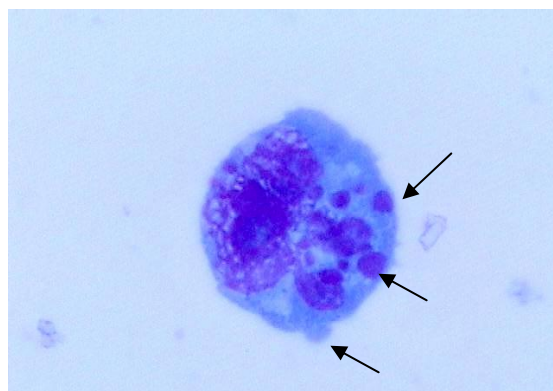
Figura 18.- Efecto de las DFOXB 1 y 2 sobre el DNA de células L5178Y. Análisis de la fragmentación de DNA después de 24 h de tratamiento con los compuestos 1 y 2. El DNA fue extraído y analizado por electroforesis en gel de agarosa (1.8 %) y teñido con Bromuro de Etidio.

- **Morfología de las células de linfoma murino L5178Y.**

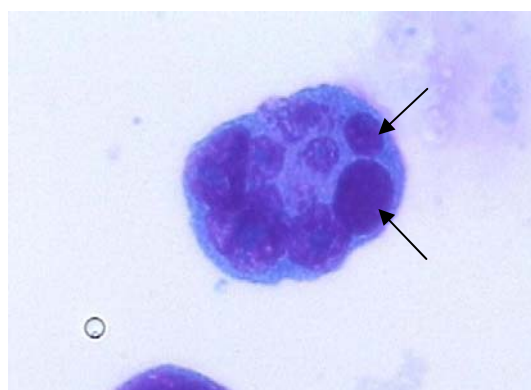
Los cambios morfológicos que experimentan las células que han transitado por la muerte por apoptosis, son de los últimos procesos antes de la disgregación de la pared celular. En este punto aparecen acúmulos dentro de la célula los cuales son fragmentos de cromatina condensada, y organelos celulares, a los que se le llama cuerpos apoptóticos. Finalmente y para confirmar que las células L5178Y tratadas con los compuestos **1** y **2** están muriendo por apoptosis, se determinó la presencia de cuerpos apoptóticos dentro de las mismas. A continuación se muestran las imágenes de células de linfoma murino L5178Y sin tratamiento (Fig **19** A) así como de células tratadas con los compuestos **1** (Fig **19** B) y **2** (Fig **19** C) a 100 μ M después de 24 h de incubación con los mismos, las cuales se adquirieron empleando un microscopio óptico marca Nikon Eclipse E 600 con una ampliación de 40X y 100 X. En el caso de las células tratadas con las DFOXB **1** y **2** se observa, la presencia de corpúsculos teñidos de color violeta en el interior de la célula, los cuales se consideraron según su aspecto y distribución como cuerpos apoptóticos.



A



B



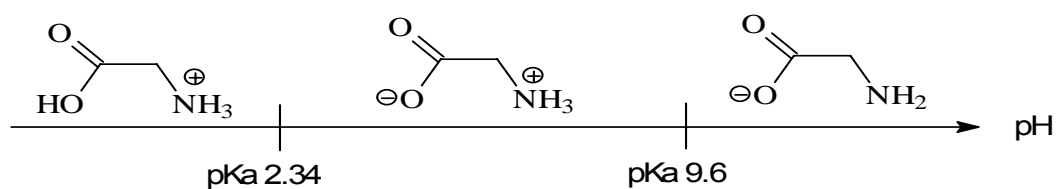
C

Figura **19**.- Efecto causado por las DFOXB **1** y **2**, sobre células L-5178Y. Las células fueron teñidas con Giemsa después de ser tratadas por 24 a una concentración de 100 μ M. A: células control; B: células tratadas con **1**; B: Células tratadas con **2**. Las flechas indican la presencia de cuerpos apoptóticos.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

❖ ANÁLISIS QUÍMICO

Como se mostró previamente en la sección de Resultados, en el presente trabajo de tesis, se sintetizó una serie de 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas (Tabla 9), a partir de la reacción entre diferentes α -aminoácidos y ácido difenilborónico esto bajo condiciones alcalinas de reacción (pH 7.5-8.5). Al respecto se hace necesario mencionar que, con el empleo de las condiciones de acidez antes referidas se mejoraron de manera general los rendimientos con respecto a los obtenidos en condiciones ácidas de reacción. En la literatura se hace referencia a que cuando un amino ácido se disuelve en agua, se forma un ion bipolar o zwitterion, este zwitterion puede actuar como un ácido o como una base. Al respecto los aminoácidos pueden presentar diferente carga neta dependiendo del pH al cual se encuentra disueltos, particularmente para el aminoácido glicina las estructuras que se han propuesto son las siguientes:



Como se puede observar a un valor de pH muy bajo, menor a 2.34 la especie iónica que predomina tiene carga neta +1 debido a que se encuentra totalmente protonada. En un intervalo de pH entre 2.34 y 9.6 se favorece la formación de la forma iónica bipolar la cual presenta carga neta 0 y en valores de pH por arriba de 9.6 se favorece la forma iónica con carga neta -1. En la metodología aquí propuesta, el pH empleado se mantuvo en un intervalo entre 7.5 y 8.5, manteniendo al aminoácido en un porcentaje mayor al 50 % de su forma iónica bipolar y en un porcentaje menor con carga neta -1, lo que de alguna manera favoreció la reacción con el ácido difenilborínico. Lo anterior se observó al obtenerse mejores rendimientos de reacción con respecto a los previamente informados en la literatura para condiciones ácidas (Skoog et al., 1964; Shin-Hua et al., 1967; Trujillo et al., 1998; Flückiger et al., 1984; Strang et al., 1989; Farfán et al., 1993; Nefkens et al., 1982; Rettig et al., 1977). Particularmente las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidinonas obtenidas de los α -aminoácidos Ácido aspártico y Ácido glutámico no se pudieron obtener con esta metodología, por lo cual se generaron en condiciones ácidas, es así que se puede proponer que esta metodología se puede emplear para la mayoría de los α -aminoácidos a excepción de aquellos que presenten características ácidas.

Por otro lado, por medio del uso de los datos espectroscópicos obtenidos de las técnicas de resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C Y ^{11}B , así como por espectrometría de masas (IE y HR), además de espectrofotometría de

absorción infrarroja (KBr), se llevó a cabo la caracterización estructural de las moléculas **1-18**, las cuales previamente habrían sido sintetizadas.

A continuación y a manera de ejemplo particular, se describe el estudio realizado para la caracterización estructural del compuesto **1** (Fig. **9**). Un formato de análisis semejante se empleó para el resto de las moléculas de esta serie.

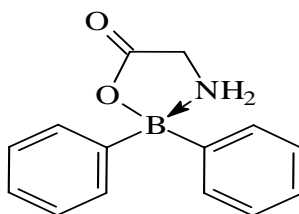
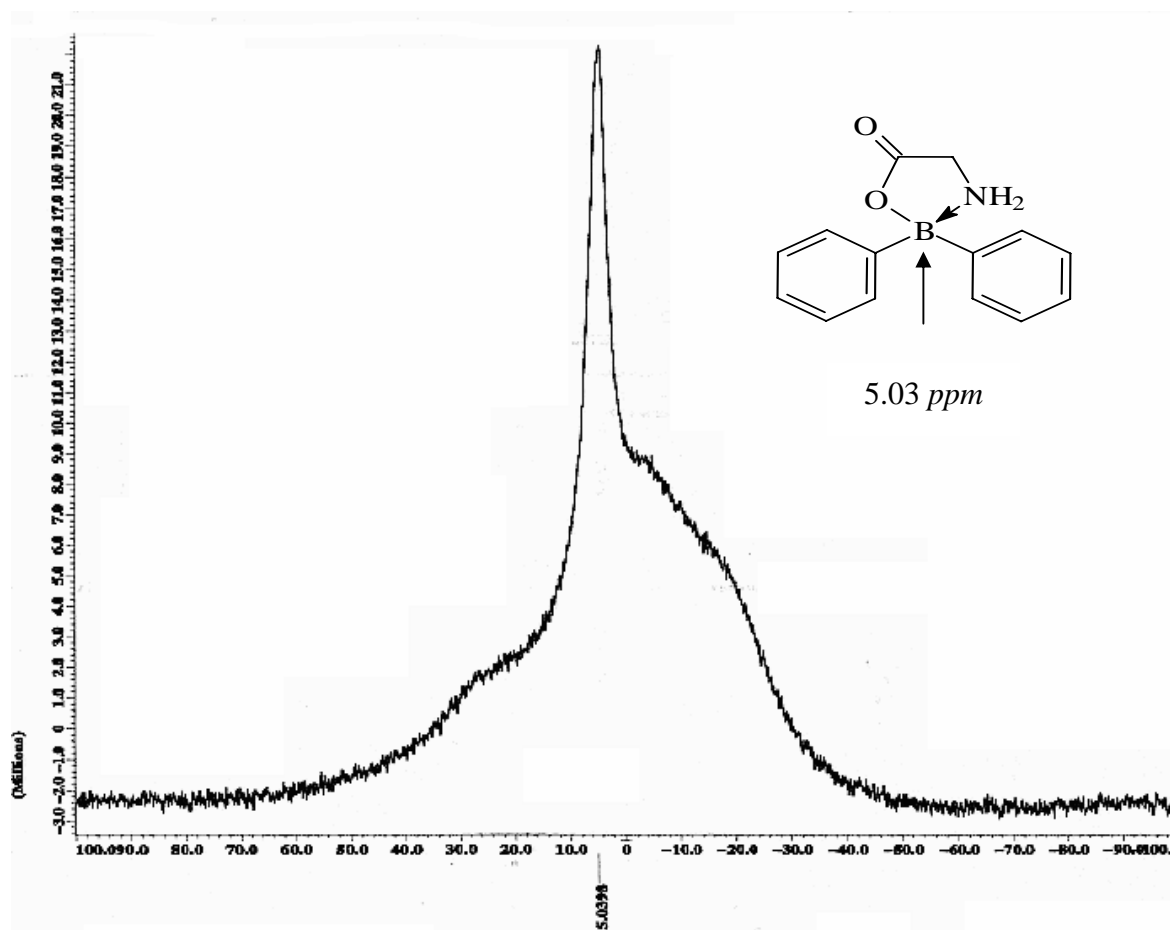


Figura **9**

El compuesto **1** presentó un intervalo de fusión de 241-243 °C (Tabla **10**). En el espectro de resonancia magnética nuclear de ^{11}B (Espectro **1**), del compuesto **1**, se presenta una señal simple ancha centrada en 5.039 ppm, (Tabla **12**) la cual es consistente para la presencia de un núcleo de boro tetracoordinado, lo que confirmaría la presencia del sistema cíclico esperado. En este caso, el núcleo de boro se encuentra unido por un lado al átomo de oxígeno del ácido carboxílico y por el otro al átomo de nitrógeno del grupo amino pertenecientes ambos al α -aminoácido empleado. Una banda en 1358 cm^{-1} en el espectro correspondiente de IR (KBr) (Espectro **4**) confirmó la presencia del enlace B-O, asimismo, en este espectro se observa una banda

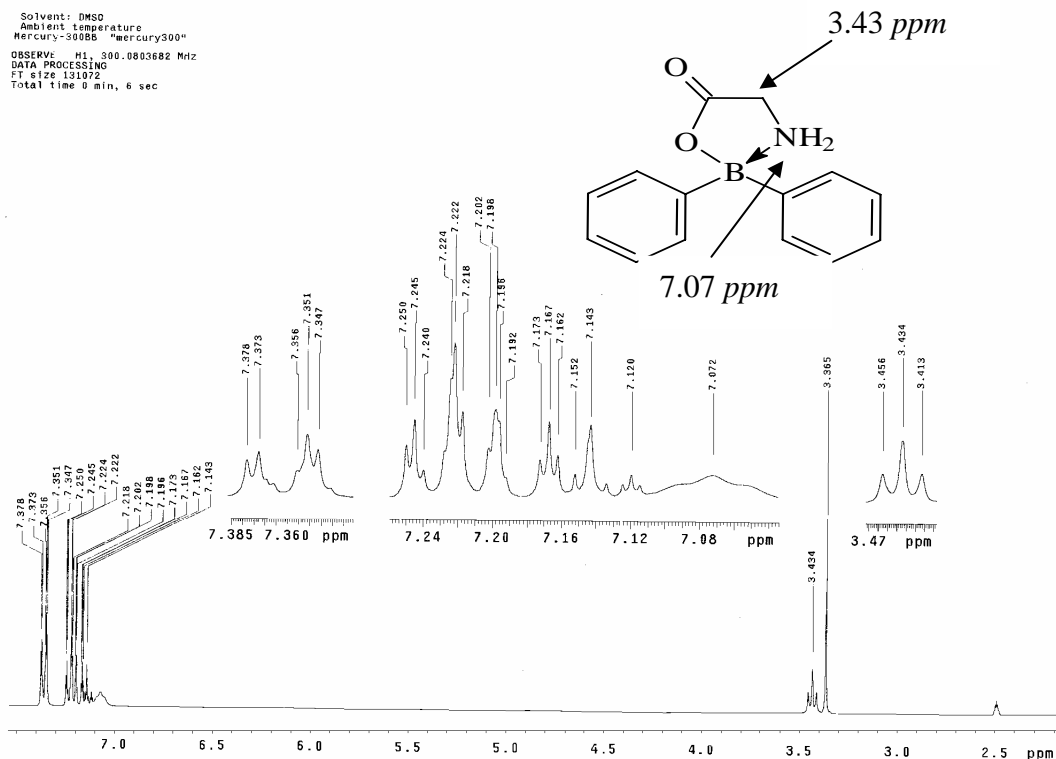
en alrededor de 1428 cm^{-1} que es típica para la vibración B-N. Complementando la idea de la tetracoordinación del boro, es conveniente mencionar que este átomo se encuentra unido a dos anillos aromáticos, los cuales provienen del ácido difenilborónico empleado. Por otro lado, los valores obtenidos experimentalmente para el desplazamiento en ppm del núcleo de boro, son adecuados para este tipo de sistemas heterocíclicos, esto al ser comparados con algunos sistemas semejantes previamente informados en la literatura (Farfán et al., 1992).



Espectro 1.- Espectro de RMN ^{11}B , de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona 1, obtenido a 80 MHz, empleando $\text{DMSO-}d_6$ y $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$.

Adicionalmente, en el espectro de RMN¹H (Espectro **2**), se presenta una señal triple en 3.43 ppm con una constante de acoplamiento (J) de 6 Hz, la cual integra para 2 protones asignados inequívocamente a los protones metilénicos de la posición 4; una señal ancha en 7.02 ppm que integra para dos protones, se asignó a los protones del nitrógeno de la posición 3 en el anillo de la oxazaborolidinona **1**.

En 7.37 ppm aparece una señal doble con una constante de acoplamiento de 7 Hz, la que se asignó a los protones de la posición *orto* de los anillos aromáticos, así mismo, en 7.22 ppm se localiza una señal triple con una $J = 7$ Hz asignada a los protones de la posición *meta* y finalmente en 7.16 ppm aparece un señal triple con $J = 7$ Hz la cual se asignó a los 2 protones de la posición *para* del sistema aromático. La presencia del sistema aromático se corroboró por IR al observarse bandas en un intervalo entre 2587-2319 cm⁻¹ asignada a la vibración del enlace C-H.



Espectro 2.- Espectro de RMN de ^1H de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona **1**, obtenido a 300 MHz, empleando DMSO- d_6 y TMS.

Por otro lado, en el espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (Espectro **3**), aparece un señal simple a campo bajo en 172.5 ppm, la cual fue asignada al núcleo de carbono del sistema carbonílico de la posición 5 en la estructura fundamental. La presencia de este grupo funcional, se confirmó al observarse una banda intensa en 1720 cm^{-1} en el correspondiente espectro de Infrarrojo. Una señal simple en 147.8 ppm se asignó al carbono de la posición *ipso* de los sistemas aromáticos presentes en la oxazaborolidinona **1**, adicionalmente, las señales en 131.0, 127.1 y 126.1 ppm se asignaron a los carbonos de las posiciones *orto*, *meta* y *para* de los

sistemas aromáticos. Finalmente, la señal en 42.9 ppm, se asignó al carbono metilénico de la posición 4 en el anillo fundamental en estudio. Para el caso de la molécula **1**, existe la presencia de dos átomos de hidrógeno en la posición 4 (Fig. **9**), no así para el resto de los derivados en donde sólo existe uno ya que el otro ha sido substituido por la cadena correspondiente en cada aminoácido (Tabla **9**), lo cual induce la formación de un centro asimétrico en las moléculas **2-18**. Un punto importante a destacar, es la presencia de un par de señales simples en aproximadamente 146-147 ppm, que se observaron en los espectros de RMN¹³ C obtenidos, para el resto de las moléculas estudiadas (Fig. **9 A**), no así para el compuesto **1**. Esta señal se asignó al carbono *ipso* del anillo aromático que está directamente unido al átomo de boro.

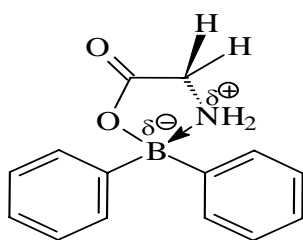


Fig. **9**

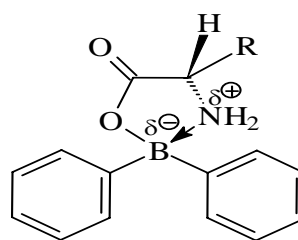
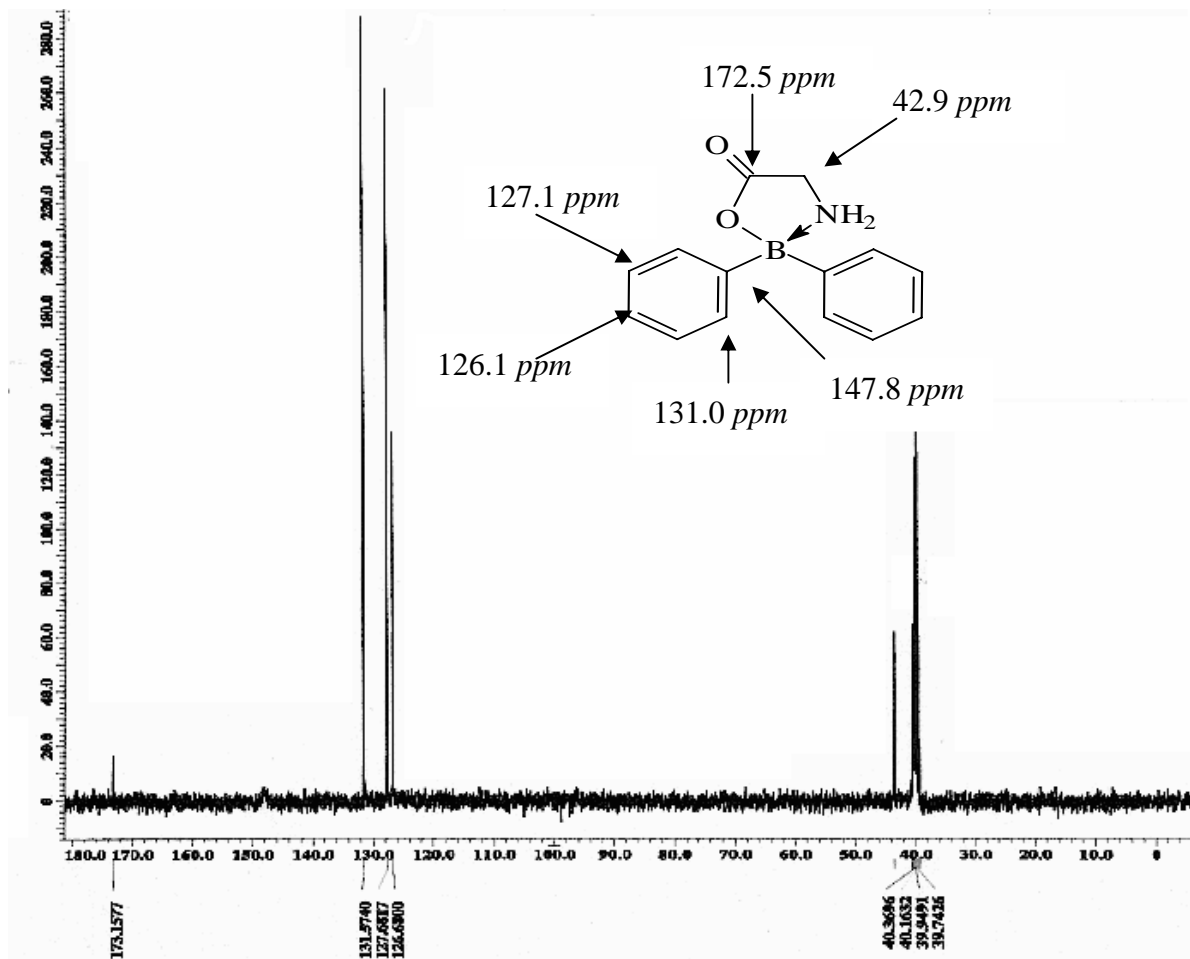
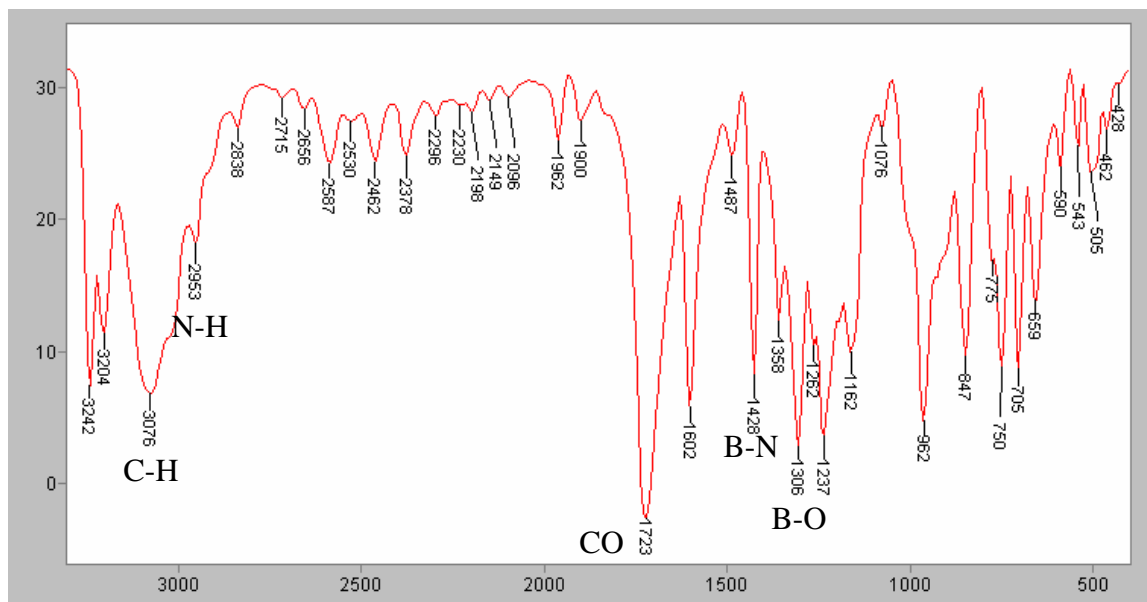


Fig. **9 A**



Espectro 3.- Espectro de RMN de ^{13}C de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona 1, adquirido a 80 MHz, empleando $\text{DMSO-}d_6$, TMS



Espectro **4**.- Espectro de absorción en el infrarrojo de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona **1**, empleando KBr.

Por otro lado, en el espectro de masas adquirido de la molécula **1** (Espectro **5**), por medio de la técnica de impacto electrónico a 70 eV, se observó un fragmento de relación m/z 239 (49% ar), el cual corresponde al ión molecular y es consistente con el peso molecular esperado para la molécula objetivo. En el mismo espectro, se presenta un fragmento de m/z 162, con el 100 % de abundancia relativa, el cual se propone se genera a partir de la pérdida de [M-77], además de un fragmento de relación m/z 211 atribuido a la pérdida de 28 unidades a partir de $M^{+\bullet}$ (Fig. **20**).

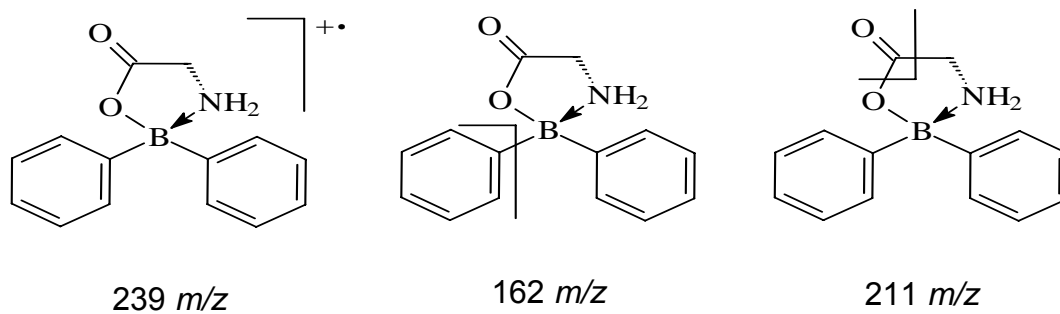
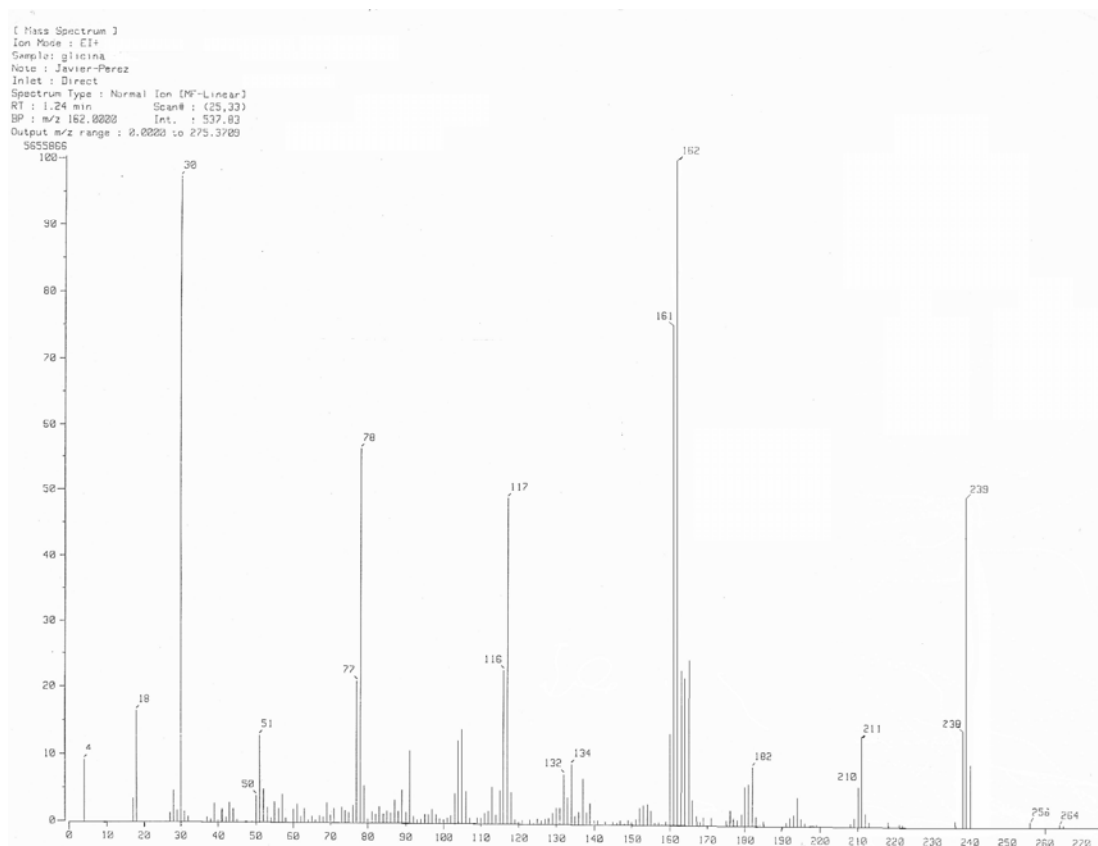


Figura 20.- Fragmentos m/z propuestos para la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona 1.



Espectro 5.- Espectro de masas obtenido por IE a 70 eV, de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona 1.

Es conveniente mencionar que los datos espectroscópicos adquiridos por las diferentes técnicas, tanto de la molécula **1** como del resto de los compuestos estudiados, se compararon con los informados en la literatura.

Por otro lado, con respecto a la determinación de los parámetros fisicoquímicos de interés en este trabajo de tesis, es conveniente recordar que el valor del KD indica el número de veces que la molécula en estudio es más soluble en la fase orgánica con respecto a la acuosa, por lo que después de obtener experimentalmente este valor para la serie de 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas estudiadas se determinó que las moléculas **1**, **2**, **3**, **5**, **7**, **11** y **12** presentaron una mejor distribución en la fase *n*-octanólica, esto es, exhibieron mayor carácter lipofílico, por el contrario las moléculas que mostraron tener menor lipofilidad fueron las consideradas como **4** y **15** (Tabla **16**). Aunado a esto en la misma Tabla **16** se muestran los valores de Log P de la serie estudiada, evidenciándose que la mayoría de ellas pudieran atravesar la membrana celular, esto último con base al valor del Log P, el cual es un parámetro de la afinidad relativa de una sustancia por los lípidos versus agua: cuanto mayor es el valor del coeficiente de partición de una sustancia, más liposoluble es y a mayor liposolubilidad la penetración de dicha sustancia a través de la membrana es más rápida (Gennaro, 1998; Leo et al, 1975). Referente a la determinación del parámetro π , se considero

al compuesto **1**, como la molécula padre, es importante mencionar que esta molécula fue la que presentó el valor mayor de KD y consecuentemente de Log P y al resto de las moléculas como derivadas. Al respecto, se observó que algunos de los sustituyentes en posición 4 del anillo fundamental de oxazaborolidinona, los cuales se pueden considerar como no polares, son los que contribuyen mayormente a la lipofilicidad de la serie de moléculas estudiadas, por el contrario sustituyentes con características polares como son el grupo: hidroxilo, amino y guanidino, desfavorecen la lipofilicidad.

❖ ANÁLISIS BIOLÓGICO.

Como se describió en los objetivos, el propósito de evaluar las moléculas previamente generadas sobre tres tipos de células de diferente estirpe, fue el de seleccionar aquellos compuestos que indujeran viabilidad celular menor al 50 % por lo menos en dos tipos de células. Por lo que al analizar los resultados obtenidos mediante el método colorimétrico de Mosmann, a las 24 horas posteriores a la administración de los compuestos **1-18**, se decidió seleccionar a las moléculas **1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12,14 y 16** ya que estas cumplían en su mayoría con el requisito establecido (Tabla **17**). Complementariamente, con los valores generados de la evaluación de los compuestos es posible proponer que existe una cierta selectividad de las células empleadas hacia las moléculas analizadas. Es conveniente

mencionar que se seleccionó a las células de linfoma murino L5178Y por ser las que mostraron una mayor sensibilidad a las moléculas evaluadas. Posteriormente, se determinó el valor de la concentración que inhibe el crecimiento celular al 50 % (IC_{50}) empleando células L5178Y. Al respecto se observa que los compuestos **1**, **3** y **11**, son los que presentaron los valores más bajos de concentración 22.47 ± 0.2 , 30.93 ± 1.1 y 38.65 ± 0.6 μM respectivamente, por lo que se podría proponer que estos son los más potentes dentro de la serie estudiada. La mayoría del resto de las moléculas evaluadas presentaron valores de IC_{50} que van desde 42 hasta 75 μM aproximadamente y solo dos de ellos **7** y **9** están por arriba de 100 μM y **6**, **8** y **11** presentan valores mayores a 200 μM , lo que pone de manifiesto, el efecto que el sustituyente de la posición 4 dentro del anillo de la 1, 3,2-oxazaborolidin-5-ona tiene sobre la actividad biológica.

Posteriormente, el conjunto de moléculas seleccionadas fueron evaluadas en su propiedad inductora de apoptosis, para lo cual se emplearon dos parámetros relacionados con este proceso: externalización de fosfatidilserina y presencia del pico sub G_0 . Al respecto, al evaluar la presencia de la fosfatidilserina (FS) en las células L5178Y tratadas por 24 horas con los compuestos previamente seleccionados, mediante el empleo de anexina V-FITC/IP y citometría de flujo, se observa que en los dot-plot adquiridos hay una población que presenta un menor tamaño con respecto a las células

control (Fig. 17). Este proceso de encogimiento es común en las células que están muriendo por apoptosis y no por necrosis. Adicionalmente se detectó que esta población de células presentan fosfatidilserina en su membrana celular externa y que además al adicionar IP se observó que se encontraban en diferentes estadios de apoptosis (temprana y tardía). Cabe recordar que se ha considerado que la fosfatidilserina se presenta en estados tempranos de muerte celular por apoptosis. A este respecto sólo la molécula **1** presento una diferencia significativa con respecto al control. Por otro lado, al analizar la distribución del DNA en las células tratadas con los compuestos estudiados, se observó que tanto **1** como **2** mostraron inducir la formación del pico sub G₀ con mejores resultados que el resto de la serie, al ser comparados con las células control (gráfica 5).

Considerando al conjunto de resultados hasta este momento reunidos y después de su análisis, se decidió continuar con la evaluación sólo con las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas **1** y **2** obtenidas de los α -aminoácidos glicina e isoleucina respectivamente, debido a que: ambas mostraron el mejor carácter lipofílico (evaluado por el KD y Log P), los dos compuestos inducen la presencia del pico sub G₀ y el compuesto **1** de manera significativa ($p \leq 0.05$) induce la externalización de fosfatidilserina en las células tratadas. El resto de las moléculas estudiadas no serán discutidas en

este momento debido a que presentaron valores de actividad apoptótica estadísticamente no significativas con respecto al control.

Por otro lado, el tiempo de tratamiento que se empleó para llevar a cabo la evaluación de las células L5178Y tratadas con los compuestos seleccionados, fue elegido después de realizar una cinética de viabilidad empleando una concentración de 100 μ M a los tiempos de 24, 48 y 72 h respectivamente. El tiempo en que tanto el compuesto **1** como el **2** mostraron una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la viabilidad celular evaluada, con respecto a la viabilidad de las células control, fue a las 24 h, un efecto no significativo se observó a las 48 como a las 72 h. Lo anterior puede ser debido al modelo experimental empleado, cabe hacer mención que las células de linfoma murino L5178Y no son una línea celular inmortal y que al paso del tiempo encontrándose fuera del peritoneo de ratón, su sobrevivencia se ve disminuida.

Para confirmar que las células estaban muriendo por apoptosis, se evaluaron algunos otros parámetros importantes que denotan este proceso, como lo es, el potencial de membrana mitocondrial. En este sentido, al analizar mediante citometría de flujo, células L5178Y tratadas y no tratadas con los compuestos **1** y **2**, se observó que una población de éstas, presentaba un potencial mitocondrial menor con respecto a las células control (gráfica **9**), condición que provocaría que se reubicara el citocromo *c* en el espacio extracelular, con la consiguiente activación de las caspasas propias del proceso

apoptótico. Tanto las DFOXB 1 y 2 indujeron de manera significativa la disminución del potencial de membrana mitocondrial. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la actividad de las caspasas en las células denota un punto en el cual las células se encuentran en pleno proceso de muerte celular por apoptosis, por lo que se hace necesario determinar la presencia de este tipo de enzimas. Específicamente en este trabajo de tesis se identificó la presencia de la caspasa 3, ya que esta es una caspasa efectora y se encuentra tanto en procesos apoptóticos por vía intrínseca como extrínseca, para lo cual se tiñieron células L5178Y con anticaspasa 3 y se analizaron por citometría de flujo, revelando que la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona 1 inducía de manera significativa la presencia de caspasa 3 activa a las 24 horas de tratamiento a una concentración de 100 μ M (gráfica 8). No se observó un efecto semejante con la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona 2 ya que ésta, presentó un valor no significativo con respecto a las células control, lo que llevaría a proponer que, posiblemente esta molécula requiera un mayor tiempo para inducir la activación de la vía de las caspasas y particularmente la caspasa 3, independientemente de que favorezca la disminución del potencial de membrana mitocondrial. Un fenómeno que ocurre como consecuencia de la activación y ejecución del proceso apoptótico es la fragmentación internucleosomal ordenada del DNA para generar fragmentos pesados o fragmentos de 180 a 200 pb. Esta fragmentación puede ser confirmada y evaluada por medio de diferentes

protocolos, particularmente en este trabajo de tesis se empleo la técnica del pico sub G_0 , la cual cuantifican la cantidad de DNA presente en la célula, así como la fragmentación del mismo.

Al respecto, al obtener el histograma de la distribución del DNA mediante citometría de flujo, de células del linfoma murino L5178Y tratadas y no tratadas con las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas **1** y **2**, se observo que ambas indujeron la presencia de un porcentaje de células que presentaban una cantidad de DNA menor a $2N$, la cual fue determinada por la aparición de un pico por debajo del correspondiente a G_0/G_1 localizado en 200 en el dot-plot correspondiente. Es importante mencionar que no se observo de manera significativa el arresto de alguna de las fases del ciclo celular (gráfica **5**), por lo que se puede proponer que estas moléculas no tienen efectos citostáticos sobre la célula.

Complementariamente, al emplear el protocolo correspondiente para la técnica de TUNEL, ya que el reactivo empleado en esta técnica, se une selectivamente a los residuos terminales de los fragmentos generados por escisión del DNA durante el proceso apoptótico y ser analizados mediante citometría de flujo, se confirmo que las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas **1** y **2** estudiadas, inducían fragmentación del DNA de manera significativa ($p \leq 0.05$ Kruskal Wallis) en las células tratadas. Al respecto y para confirmar que se había llevado la fragmentación internucleosomal del DNA, se procedió a separar estos fragmentos por medio de electroforesis en gel de agarosa.

Como se describió previamente en Materiales y Métodos, se emplea el DNA extraído tanto de células previamente tratadas y no tratadas, para posteriormente realizar una separación electroforética del DNA, la posterior tinción con bromuro de etidio permitió visualizar una serie de marcas dispuestas a manera de escalera en el gel correspondiente, las cuales se atribuyeron a los fragmentos del DNA (Fig. **18**). Este patrón de escalera se ha reconocido como un marcador contundente de la muerte celular inducida por apoptosis, con lo cual se confirma que las DFOXB **1** y **2** inducen apoptosis en células de linfoma murino L5178Y.

Finalmente, una característica morfológica que presentan las células apoptóticas y que fue una de las primeras evidencias visuales que se reconocieron de este proceso, es la presencia de pequeños corpúsculos teñidos de color morado (Giemsa) dentro de células que han perdido la forma regular de su citoesqueleto, los cuales corresponden a fragmentos tanto de cromatina condensada, como de organelos celulares recubiertos de parte de la membrana celular los cuales son conocidos como cuerpos apoptóticos. Como se observa en la Figura **19** que corresponden a imágenes adquiridas de células tratadas con los compuestos estudiados **1** y **2**, se distinguen sin lugar a dudas este tipo de fenómeno, además de observarse la pérdida de la morfología propia de células de linfoma murino L5178Y. En la Figura **19 B** se denotan además pequeñas elongaciones de la membrana celular conocidas como blebbing propias del proceso apoptótico.

Con las evidencias anteriormente mostradas y reconociendo en las células de linfoma murino L5178Y, la presencia de señales propias del proceso apoptótico, se propone que las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidinonas **1** y **2** inducen muerte celular por apoptosis, la primera de ellas por una vía dependiente de caspasas y la segunda por una vía independiente.

Adicionalmente, el resto de las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas **3-18**, las cuales demostraron que no activan el proceso apoptótico, se sugiere pueden ser empleadas para la terapia oncogénica de captura de neutrones por boro, dado que no mostraron efectos citotóxicos ni apoptóticos de manera significativa.

CONCLUSIONES

-
- Las condiciones alcalinas empleadas en las síntesis de las correspondientes 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas (DFOXB) obtenidas a partir de la reacción entre α -aminoácidos y el ácido difenilborónico, en forma general mejoraron los rendimientos con respecto a los informados previamente en la literatura especializada.
 - La DFOXB generadas de glicina e L-isoleucina, presentaron los valores más altos de los parámetros fisicoquímicos calculados: KD, Log P, ΔG y π , de la serie de moléculas estudiadas.
 - La DFOXB obtenida de glicina fue el compuesto que presentó el valor más bajo de CI_{50} evaluado sobre las células L5178Y.
 - Las DFOXB obtenidas de los α -aminoácidos glicina e L-isoleucina, indujeron la muerte de células L5178Y por apoptosis, al ser tratadas con una concentración 100 μ M por 24 h. Lo anterior se confirmó por:
 - a) La identificación de fosfatidilserina en el exterior de la membrana celular (anexina V-FITC/IP).

-
- b) Adicionalmente, tanto la DFOXB generada de glicina como la de L-isoleucina, disminuyeron de manera significativa, el potencial de membrana mitocondrial de las células tratadas evaluado por Rodamina 123.
- c) Se observó que la DFOXB obtenida de glicina, induce apoptosis por un mecanismo dependiente de caspasa 3, mientras que la DFOXB generadas a partir de la L-isoleucina lo hace por un mecanismo independiente.
- d) La aparición de cuerpos apoptóticos, teñidos por Giemsa en células tratadas.
- e) La presencia de un patrón de escalera, cuando se realizó un corrimiento electroforético del DNA de células tratadas, adicionalmente se evaluó y confirmó, la fragmentación internucleosomal del DNA empleando la prueba de TUNEL .

REFERENCIAS

-
- ≈ Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. **2002**. *Biología Molecular de la Célula*. 3 ed., Ed. Omega, Barcelona España.
- ≈ Ameisen J.C. 1996. The origin of programmed cell death. *Science* 272, 278-279.
- ≈ Ascher, E., Hanson, J.N., Cheng, W., Hingorani, A., Scheinman, M., **2001**. Glycine preserves function and decreases necrosis in skeletal muscle undergoing ischemia and reperfusion injury. *Surgery* 129, 231-235.
- ≈ Ashkenazi, A. y Dixit, V.M. **1990**. Death receptors signaling and modulation. *Science* 281, 1395-1308.
- ≈ Bajt, M.L., Vonderfecht, S.V., Jaeschke, H., **2001**. Differential protection with inhibitors of caspase-8 and caspase-3 in murine models of tumor necrosis factor and Fas receptor-mediated hepatocellular apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 175, 243-252.
- ≈ Beales, I.L.P., Ogunwobi, O., **2006**. Glycine-extended gastrin inhibits apoptosis in colon cancer, via separate activation of Akt and JNK pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology* 247, 140-149.
- ≈ Bohinsky, R. C., **1991**. *Bioquímica*, 5 ed, Ed. Addison Wesley Iberoamérica, EUA, 440-447.

-
- ≈ Boise, L.H., Thompson, C.B., **1997**. Bcl-x_L can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. Proceedings of National Academic of Science U.S.A. 94, 3759-3764.
- ≈ Bonting, S.L., De Pont, J.J., **1981**. Membrane transport, Vol. 2, Ed. Elsevier-North Holland, Biomedical Amsterdam.
- ≈ Bradham, C.A., Quian, T., Streetz., K., Trautwein, C., Brenner, D.A., Lemasters, J.J., **1998**. The mitochondrial permeability: transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and citocromo c release. Molecular Cell Biology 18, 6353-6364.
- ≈ Brown, H., Gupta, A.K., **1988**. Boroxazolidones derived from a-amino acids and borinic or boronic esters. A simple procedure for upgrading borinates and boronates to materials of high optical purity. Journal of Organometallic Chemistry 341, 73-81.
- ≈ Bursh, W., Oberhammer, F., Schulte-Hermann, R., **1992**. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. TIPS 13, 245-255.
- ≈ Chandrasoma, P., Taylor, C.R., **1994**. Patología General, Ed. El manual Moderno, México D.F., 281-296.
- ≈ Chen, C.J., Makino, S., **2004**. Murine coronavirus replication induces cell cycle arrest in G0/G1 phase. Journal of Virology 78(19), 10410-10419.

-
- ≈ Chremos, G.N., Weidmann, H., Zimmerman, H.K., **1961**. Preparation and storage of diplenyborinic acid and its anhydride. *Journal Organic Chemistry* 26, 1683.
- ≈ Cohen, G.M., 1997. Caspases: the execution of apoptosis. *Biochemistry Journal* 326, 1-16.
- ≈ Cohen, J.J. **1993**. *Apoptosis* 14, 126-130.
- ≈ Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., Stellins, K.S., **1992**. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annual Reviews Immunology* 10, 267-293.
- ≈ Collins, J.A., Schandl, C.A., Young, K.K., Vesely, J., Willingham, M.C. **1997**. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *Journal Histochemistry Cytochemistry* 45, 923-934.
- ≈ Cotran, R.S., Khmer, V., Robbins, S.L. **1995**. *Patología Estructural y Funcional*. 5 ed., Ed. Interamericana/Mc Graw-Hill, Madrid, 290.
- ≈ Cregan, S.P., Dawson, V.L., Slack, R.S., **2004**. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23, 2785-2796.
- ≈ Cusack, J.C., Liu, R., Houston, M., Abendroth, K., Elliot, P.J., Adams, J., Baldwin, A., **2001**. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: Implications for systemic nuclear Factor- κ B inhibition. *Cancer Research* 61, 3535-3540.

-
- ≈ De Vita, V.T., Hellman, S., Rossenberg, S.A., **1999**. *CANCER Principios y Práctica de Oncología Vol 1*, 5 ed., Ed. Panamericana, Madrid, 3-99.
- ≈ Deng, L.W., Chiu, I., Strominger, J.L. **2004**. MLL 5 protein forms intranuclear foci, and overexpression inhibits cell cycle progression. *Proceedings of National Academic of Science U.S.A.* 101(3), 757-762.
- ≈ Dong-Ming, H., Ya-Ching, S., Chi, W., Yao-Ting, H., Fan-Lu, K., Che-Ming, T., Jih-Hwa, G., **2004**. Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in human prostate cancer PC-3 cells.
- ≈ Enari, M., **1998**. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- ≈ Esteve, J.M., Mompo, J., Garcia de la Asunción, J., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Viña, J.R., Viña, J., Pallardo, F.V., **1999**. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies *in vivo* and *in vitro*. *FASEB Journal* 13, 1055-1064.
- ≈ Evan, G.I., Vousden, K.H., **2001**. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.
- ≈ Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A. Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M., **1992**. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by magrophages. *Journal Immunology* 148, 2207-2216.

-
- ≈ Farfán, N., Silva, D., Santillan, R., **1993**. NMR studies of 1,1-diphenylboroxazolidone derivatives of α -aminoacids. *Heteroatom Chemistry* 4(6), 533-536.
- ≈ Flückiger, R., Henson, E., Hess, G., Gallop, P., **1984**. Mass spectral and HPLC analysis of biological compounds with diphenylborinic acid. *Biomedical Mass Spectrometry* 11,611-615.
- ≈ Gennaro, A.R. **1999**. Remington FARMACIA, Tomo 1. 19 ed, Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1046-1050.
- ≈ Goulet, D.I., Curvalin, J.C., Buendia, B. **1998**. A chromatin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at late stages of apoptosis. *Journal Cell Sciences* 111, 1441-1451.
- ≈ Gregory, C.D. **2000**. CD14-dependent clearance of apoptotic cells; relevance to the immune system. *Current Opin Immunol* 12, 27-34.
- ≈ Hansch, C., **1990**. *Comprehensive Medicinal Chemistry. The rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Applications of Chemical Compounds*, Ed. Pergamon Press, 589-643.
- ≈ Hansch, C., Leo, A., **1979**. *Substituent Constant for Correlations Analysis in Chemistry and Biology*, Ed. Willey-Interscience, EUA, 177-203.
- ≈ Hengartner, M.O. **2000**. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-776.

-
- ≈ Hunts, C., **2002**. Boron-binding Biomolécules: a key to understanding the beneficial physiologic effects of dietary boron from prokaryotes to human. Ed. Kluwer Academic Publishers, New York, 21-36.
- ≈ Jacob, T., Ascher, E., Hingorani, A., Kallakuri, S., **2003**. Glycine prevents the induction of apoptosis attributed to mesenteric ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Surgery* 134(3), 457-466.
- ≈ Kallakuri, S., Ascher, E., Pagala, M., Gade, P., Hingorani, A., Scheinman, M., Mehraein, K., Jacob, T., **1998**. Protective effect of glycine in mesenteric ischemia and reperfusion injury in a rat model. *Journal of Vascular Surgery* 38, 1113-1120.
- ≈ Karp, G., **1998**. *Biología Celular y Molecular*, Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México, 142-143.
- ≈ Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., **1972**. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. Journal Cancer* 26, 239-257.
- ≈ Klug, W.S., Cummings, M.R., **1999**. *Conceptos de Genética*. 5 ed. Ed. Printice Hall, Madrid.
- ≈ Kothakota, S., **1997**. Caspase-3 generated fragments of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.
- ≈ Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wartheim, B., Correa, W.S., 1969. Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to

the disulfide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 37, (4), 593-596.

≈ Kroemer, G., Dallporta, B., Resche, M., **1998**. The mitochondrial death/live regulator in a apoptosis and necrosis. *Annual Reviews Physiology* 60, 619-642.

≈ Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S.A., **1997**. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 18, 44-51.

≈ Lang., K., Nuetzel, K., Schubert, F., **1963**. Organic boron-nitrogen compounds. *Chemical Abstracts* 58, 1488.

≈ Lash, L.H., **2005**. Special Issue: Membrane transporters in toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204, 197.

≈ Leo, A., Jow, P.Y.C., Silipo, C., Hansch, C. **1975**. Calculation of Hydrophobic constant (Log P) from π and f constants. *Journal of Medicinal Chemistry* 18(9), 865-868.

≈ Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., Fröhlich, K., **1999**. Oxigen Stress: A regulator of apoptosis in yeast. *145(4)*, 757-767.

≈ Martin, A., Swarbick, J., **1983**. *Physical Pharmacy. Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, 3 ed., Ed. Lea & Febiger, EUA.

-
- ≈ Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P. McGahon, A.J., Rader, J.A. Van scie, R.C., LaFace, D.M., Green, D.R., **1995**. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal Experimental Medicine* 182, 1545-1546.
- ≈ Masquelier, M., Qi Fang, Z., Gruber, Astrid, Vitols, S., **2004**. Relationship between daunorubicin concentration and apoptosis induction in leukemic cells. *Biochemical Pharmacology* 67, 1074-1056.
- ≈ Mi Ja, C., Walker, P.A., Brown, R.W., Hogstrand, C., **2005**. Zinc-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 205, 225-236.
- ≈ Martínez, R., Chacón-García, L., **2005**. The search of DNA-intercalator as antitumoral drugs: what it worked and did not work. *Current Medicinal Chemistry* 12, 127-151
- ≈ Miller, G.W., Schnellmann, R.G., **1993**. Cytoprotection by inhibition of chloride channels: The mechanism of action of glycine and strychnine. *Life Sciences* 53(15), 1211-1215.
- ≈ Ming-Jie, L., Wang, Z., Hai-Xia, L., Rong-Cong, W., Yan-Ze, L., Qing-Yu, W., **2004**. Mitochondrial dysfunction as an early events in the process of apoptosis induced by woodfordin I in human leukemia K562 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 194, 141-155.
- ≈ Moffatt, J., Hashimoto, M., Kojima, A., Kennedy, D.O., Murakami, A., Koshimizu, K., Oshigashi, H., Matsui-Yuasa, I., **2000**. Apoptosis

induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation. *Carcinogenesis* 21(12), 2151-2157.

- ≈ Monga, M., Sausville, E. A., **2000**. Developmental therapeutics program the NCI: molecular target and drug discovery process. *Leukemia* 16, 520-526.
- ≈ Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M., **1991**. Feasibility of a high-flux anticancer drugs screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83(11), 757-767.
- ≈ Moridani, M.Y., Siraki, A., Chevaldina, T., Scobie, H., O'Brien, P., **2004**. Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* 147, 297-307.
- ≈ Nagata, S. **1999**. Fas Ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* 33, 29-55.
- ≈ Nagatomi, A., Sakaida, I., Matsumura, Y., Okita, K., **1997**. Cytoprotection by glycine against hypoxia-induced injury in cultured hepatocytes. *Liver* 17(2), 57-62.
- ≈ Neamati, N., Fernández, A., Wright, S., Kiefer, J., McConkey, D.J., **1995**. Degradation of laminin B1 precedes oligonucleosomal DNA

fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *Journal Immunology* 154, 3788-3795.

≈ Nelson, D. L., Cox, M. M., **2001**. *Lehninger Principios de Bioquímica*, 3 ed., Ed. Omega, España, 389-430.

≈ Nelson, D.L., Cox, M.M., **2001**. *Lehninger Principios de Bioquímica*, 3 ed., Ed. Omega, España, 389-430.

≈ Nicholson D.W. **2000**. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407, 810-816.

≈ OECD guidelines for the testing of chemicals, Partition Co-efficient (n-1-octanol/water): slow-stirring method. **2003**. Official Journal Partition Coefficient. Dir 92/69/eec(O.J. L 389 A).

≈ Pache, W., Zähler, H., **1969**. Metabolic products of microorganisms 77. Information studies on the mechanism of action of boromycin. *Archives of Microbiology* 67(2), 156-165.

≈ Pandey, S., Walker, P.R., Sikorska, M., **1997**. Identification of a novel 97 Kda endonuclease capable of internucleosomal DNA cleavage. *Biochemistry* 36, 711-720.

≈ Platt, N., Da silva, R.P. Gordon, S., **1998**. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends. Cell Biology* 8, 365-372.

≈ Product Properties Test Guidelines: OPPTS 830.7550 (Partition Coefficient,(n-Octanol/Water), Shake Flash Method, **1996**. United

States Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101).

- ≈ Pulido, M.D., Parrish, A.R., **2003**. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutation Research* 533, 227-241.
- ≈ Sánchez-Torres, L.E., Diosdado, F., **2003**. Apoptosis: the phenomenon and its determination. *Técnica Pecuaria en México* 41(1), 49-62.
- ≈ Sanmartín, C., Echeverría, M., Mendivil, B., Cordeu, L., Cubedo, E., García-Foncillas, J., Font, M., Palop, J.A., **2005**. Synthesis and biological evaluation of new symmetrical derivatives as cytotoxic agents and apoptosis inducers. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 13, 2031-2044.
- ≈ Savill, J., Fadok, V., Henson, P., Haslett, C., **1993**. Phagocyte recognition of cell undergoing apoptosis. *Immunology Today* 14, 131-136.
- ≈ Schultz, D.R., Harrington, W.J., **2003**. Apoptosis: Programmed cell death at molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 32, 345-369.
- ≈ Shakibaei, M., Schulze-Tanzil, G., Takada, Y., Aggarwal, B., **2005**. Redox regulation of apoptosis by members of the TNF superfamily. *Antioxidants Redox Signaling* 7 (3), 482-496.

-
- ≈ Shih-Hua, T., Kuo-Min, C., Shih-Lu, T., Chia-Chun, L., Shih-Lin, C. **1967**. Antitumor agents. Mixed anhydrides of diaryl borinic and amino acids (37990m). Chemical Abstracts, 66, 3632.
- ≈ Silverman, B.R., **2004**. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, Ed. Elsevier, EUA, 8-65.
- ≈ Skoog, I.H., **1964**. Reaction of alkyl borinates with α -amino acids. Journal Organic Chemistry 29, 492-493.
- ≈ Smith, H.J., Williamn, H., **1983**. Introduction to the Principles of Drugs Design, Ed. Wright PSG, Bristol, Inglaterra, 228-230.
- ≈ Stevens, A., Lowe, J., **1997**. Anatomía Patológica, Ed. Harcourt Brace, Madrid, 34-56.
- ≈ Strang, C.J., Henson E., Okamoto, Y., Paz, M.A., Gallop, P.M., 1989. Separation and determination of α -amino acids by boroxazolidones formation. Analytical Biochemistry 178, 276-286.
- ≈ Sunwoo, J.B., Chen, Z., Dong, G., Yeh, N., Bancroft, C.C., Sausville, E., Adams, J., Elliot, P., Van Waes, C., **2001**. Novel proteasoma inhibitors PS-341 inhibits activation of nuclear factor- κ B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. Clinical Cancer Research 7, 1419-1428.
- ≈ Tanonaka, K., Iwai, T., Motegi, Kanataka, M., Takeo, S., **2002**. Effects of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine on mitochondrial function in ischemic-reperfusion heart. Cardiovascular Research 57(2), 416-425.

-
- ≈ Thome, M., Tschopp, J., **2001**. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nature* 1, 50-54.
- ≈ Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Sánchez-Torres, L., García-Mora, I., Márquez-Rosado, L., Sánchez, A., Moreno-García M.E., Cruz, A., Bravo-Gómez, M. E., Ruiz-Ramírez, L., Rodríguez-Enriquez, S., Sotelo, Julio., **2005**. Cas Ilgly induces apoptosis in glioma C6 cells In Vitro and In Vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms *Neoplasia*, 7(6), 563-574.
- ≈ Tripathi, Y., Hegde, B.M., Rai, Y.S., Raghuvver, C.V., **2000**. Effect of N-2-mercaptopropionylglycibe in limiting myocardial reperfusion injury following 90 minutes of ischemia in dogs. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 44, 290-296.
- ≈ Trujillo, J., Höpfl, H., Castillo, D., Santillan, R., Farfán, N., **1998**. X-ray crystallographic study of boroxazolidones obtained from L-ornithine, L-methionine, kainic acid and 2,6-pyridinedicarboxylic acid. *Journal of Organometallic Chemistry* 571, 21-29.
- ≈ Weinberg, J.M., Davis, J.A., Abarzua, M., Kiani, T., Kunkel, R., **1990**. Protection by glycine of proximal tubules from injury due to inhibitors of mitochondrial ATP production. *American Journal Physiology* 258, 1127-1140.
- ≈ Xu, Y., Bialik, S., Jones, B.E., Limuro, Y., Ktsis, R.N., Srinivason, A., Brenner, D.A., Czaja, M.J., **1998**. NF-kappa B inactivation converts a

hepatocyte cell lines THF-alpha response from proliferation to apoptosis. *American Journal Physiology* 275, c1058-c1066.

≈ Yan-Jun, Z., Kenichi, I., Hajime, H., Tsuneo, K., Yoshiyuki, T., Nobuhiro, S., **2000**. Glycine prevents apoptosis of rat sinusoidal endothelial cells caused by deprivation of vascular endothelial growth factor. *Hepatology* 32(3), 542-546.

≈ Yoshino, T., Kishi, H., Nagata, T., Tsukada, K., **2001**. Differential involvement of p38 MAP kinase pathway and Bax translocation in the mitochondria-mediated cell death in TCR- and dexamethasone-stimulated thymocytes. *European Journal Immunology* 31, 2702-2708.

≈ Yuan, X., Wu, J., Shan, Y., Yao, Z., Dong, B., Chen, B., Zhao, Z., Wang, S., Chen, J., Cong, Y., **2006**. SARS coronavirus 7a protein blocks cell cycle progression at G₀/G₁ phase via the cyclin D3/pRb pathway. *Virology* 346, 74-78.