

13  
2ef.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“EVALUACION ANTINEOPLASICA DE COMPUESTOS  
DE COORDINACION DE COBRE (*Casiopéinas*)  
EN MODELO TUMORAL MURINO”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
MARIA ELENA BRAVO GOMEZ



264648

MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

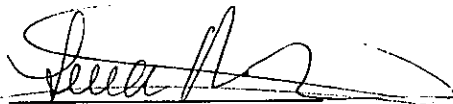
JURADO ASIGNADO:

- PRESIDENTE: PROF. MANDOKI WEITZNER JUAN JOSÉ
- VOCAL: PROF. RODRIGUEZ PEREZ MARTHA
- SECRETARIO PROF. RUIZ AZUARA LENA
- 1<sup>ER</sup>. SUPLENTE: PROF. VAZQUEZ ALVAREZ ANA MARIA
- 2<sup>DO</sup>. SUPLENTE: PROF. PONCE MONTER HECTOR ANTONIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA,  
DEPTO. QUÍMICA INORGÁNICA, LAB. 210 Y BIOTERIO PG.  
622 38 14 Y 622 53 47.

ASESOR DEL TEMA:



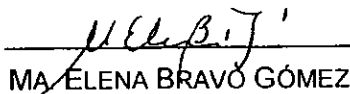
DRA. LENA RUIZ AZUARA

SUPERVISOR TÉCNICO:



M.V.Z. MABEL TINOCO MÉNDEZ.

SUSTENTANTE:



MA. ELENA BRAVO GÓMEZ

---

## **Agradecimientos:**

Dr. Lena Ruiz: Gracias por su empeño y dedicación para transmitirme sus conocimientos, por su apoyo constante y entusiasmo para animarme a continuar hacia delante y conseguir mis metas. La quiero muchísimo, trabajar junto a usted es una de las mejores experiencias que he tenido.

M. en C. Isabel Gracia: Gracias por tu tiempo y tu amistad, tus aportaciones a este trabajo son invaluableles.

M.V.Z. Mabel Tinoco: Gracias por tu valiosa ayuda y cooperación incondicional, por dedicarme tu tiempo y experiencia en el trabajo experimental.

M. en C. Armando Marín B.: Gracias por tu ayuda constante en el laboratorio, por cada una de las muchas dudas que me aclaraste, por cada conocimiento que compartiste conmigo y sobre todo por ser mi amigo, apoyarme y confiar en mí. Tu sabes bien que tu colaboración en este trabajo fue fundamental.

Ma. Aurora Gómez de la Fuente: Por tu apoyo constante para alcanzar mis objetivos y por hacerme saber lo importante que es planear el futuro. Gracias por todo tu cariño.

Angel M., Jorge Luis Z., Hector R., Lucía y Juan Carlos A.K.: Por ayudarme a realizar mi trabajo cada vez que lo necesite, por ser excelentes compañeros y amigos.

A todos mis amigos y compañeros de generación: Por todos los momentos que compartimos; cada una de las clases, exámenes y desveladas fueron más divertidas gracias a ustedes.

Fundación UNAM: Por el apoyo económico que recibí durante el desarrollo de esta Tesis.

---

---

## ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Justificación	2
Capítulo I: Antecedentes y marco teórico	5
A. El cáncer	5
B. Tratamientos antineoplásicos	7
C. Quimioterapia	8
D. Proyecto "Desarrollo de Anticancerígenos y Casiopeínas"	10
E. Esquemas de cernimiento y protocolos de evaluación	18
F. Protocolo de evaluación del <i>National Cancer Institute</i>	21
G. Línea Tumoral Melanoma B16	23
H. Cepa Murina C57BL/BJ	23
Capítulo II: Objetivos e Hipótesis	26
Capítulo III: Material y Método	28
A. Fármacos	28
1. Síntesis	28
2. Caracterización	29
2.1 Espectrometría de infra-rojo	29
2.2 Análisis Elemental	30
2.3 Espectrofotometría Uv-Vis.	30
3.4 Determinación del punto de descomposición	31
B. Animales	31
C. Determinación de la dosis letal 50 (DL <sub>50</sub> )	31
D. Línea tumoral Melanoma B16 y Transplante tumoral	32
1. Transplante tumoral	33

---

---

E. Evaluación antineoplásica	33
F. Tratamiento de resultados y Análisis estadístico	35
1. Porcentaje de incremento en peso (IP)	35
2. Índice de sobrevida (ILS)	36
3. Tratados/Control (T/C)	37
4. Análisis estadístico en función de sobrevida; <i>Logrank</i>	37
5. Análisis estadístico en función de peso (IP)	39
Capítulo IV: Resultados y análisis de resultados.	43
A. Síntesis y Caracterización	43
B. Toxicidad Aguda (DL50)	47
C. Evaluación Biológica	48
1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	49
2. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]	53
3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO <sub>3</sub>	57
4. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)sala]NO <sub>3</sub>	60
5. [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)sala]NO <sub>3</sub>	64
6. [Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	67
D. Resumen de resultados	71
Capítulo V: Conclusiones	74
Apéndice I: Espectros Uv-visible.	78
1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	78
2. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]	79
3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO <sub>3</sub>	80
4. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)sala]NO <sub>3</sub>	81
5. [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)sala]NO <sub>3</sub>	82
6. [Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	83

---

---

Apéndice II: Espectros IR.	85
1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	85
2. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]	85
3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO <sub>3</sub>	86
4. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)sala]NO <sub>3</sub>	86
5. [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)sala]NO <sub>3</sub>	87
6. [Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	87
Apéndice III: Dosis letal 50	89
1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	89
2. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]	89
3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO <sub>3</sub>	90
4. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)sala]NO <sub>3</sub>	90
5. [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)sala]NO <sub>3</sub>	91
6. [Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	91
Apéndice IV: Análisis Estadístico	93
1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	93
2. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]	96
3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO <sub>3</sub>	99
4. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)sala]NO <sub>3</sub>	102
5. [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)sala]NO <sub>3</sub>	105
6. [Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	108
Referencias	112

---

## **Evaluación antineoplásica de compuestos de coordinación de Cobre (Casiopéinas) en modelo tumoral murino.**

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación incontrolada de células aberrantes e inmaduras. Actualmente en México el cáncer ocupa el segundo lugar en las causas de muerte en la población<sup>(4)</sup>. Entre los tratamientos útiles para atacar esta serie de enfermedades se encuentra la quimioterapia. En 1969 el descubrimiento por Rosenberg de la actividad citostática del compuesto *cis*-diamino-dicloro-platino(II), marca el inicio de investigaciones encaminadas a encontrar quimioterapéuticos inorgánicos efectivos.

Actualmente existen numerosos fármacos antineoplásicos tanto de origen orgánico como inorgánico, sin embargo, la existencia de tumores refractarios a estos tratamientos, la elevada toxicidad de los existentes y su costo elevado estimulan la búsqueda de nuevas moléculas que mejoren las características mencionadas. Particularmente en México la necesidad de importación de estos productos incrementa su costo, lo cual los hace inaccesibles a algunos sectores de la población; por lo que el desarrollo de productos antineoplásicos con tecnología mexicana adquiere prioridad.

Lo anterior llevó al desarrollo de una familia de compuestos de coordinación de cobre (II) como centro metálico, que en la esfera de coordinación presenta un ligante bidentado del tipo diiminas (N,N) y otro que puede ser aminoacidato (N,O) o donador (O,O). A esta familia de compuestos se les denomina CASIOPEINAS® (7). Los complejos estudiados de esta familia han demostrado tener actividad citostática, citotóxica y antineoplásica (15,16,17,19,45,46), lo cual motiva a continuar estos estudios con otras moléculas de la misma familia.

El presente trabajo estudió la posible actividad antineoplásica *in vivo* sobre el modelo tumoral murino Melanoma B16 de seis Casiopéinas seleccionadas con base a resultados obtenidos en estudios previos. Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos internacionales de evaluación del Cancer Chemotherapy National Service Center perteneciente al National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, E.U.A<sup>(13)</sup>.

A pesar de que el objetivo principal de este estudio es la evaluación de actividad antineoplásica empleando como variable de respuesta la sobrevida, el trabajo se complementó con la caracterización por IR, espectroscopía Uv-vis, análisis elemental y punto de descomposición de cada uno de los compuestos a evaluar, ya que es fundamental para correlacionar los resultados con exactitud sus estructuras y características.

Los resultados obtenidos se correlacionaron con las actividades que ya han sido determinadas para otras Casiopéinas en la misma línea tumoral. Así mismo se analizó la relación estructura-actividad y su posible correlación con la actividad superóxido-dismutasa observada en otros experimentos.



## 2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la longevidad que está alcanzando el hombre y quizá en función de los contaminantes a los que se enfrenta, se ha encontrado que la incidencia de cáncer presenta una alarmante tendencia a ocupar los primeros lugares de morbilidad y mortalidad en el mundo.(33)

Dentro de las formas de tratamiento del cáncer se puede mencionar a la quimioterapia como una opción clave y a menudo exitosa.(1,5,23). No obstante todavía existe un gran número de tipos de cáncer que se consideran incurables y otros tantos se tornan refractarios a los tratamientos quimioterapéuticos, por lo que la incorporación de nuevos fármacos es un amplio campo de trabajo.

El origen de los fármacos puede ser a partir de productos naturales o bien sintéticos, los cuales pueden clasificarse a su vez, como compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos.(47)

Estos últimos son un número muy reducido de fármacos. En la quimioterapia del cáncer existen 44 compuestos aprobados para su uso, de ellos sólo dos, el cisplatino y el carboplatino son fármacos inorgánicos a base de platino(47), y ninguno de los 44 son de tecnología nacional.

En nuestro país, el problema de la terapia contra el cáncer cobra una mayor importancia ya que como se mencionó, la quimioterapia existente se desarrolla en el extranjero, lo cual inevitablemente acrecenta aún más su costo haciendo inaccesible el tratamiento para algunos sectores de la población.

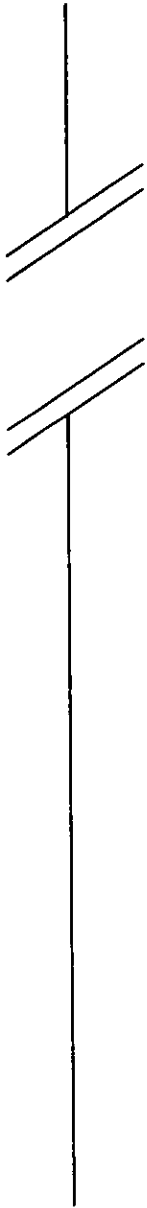
Debido a esto, a finales de la década de los 70's, en la Facultad de Química (UNAM) se inició un proyecto encaminado al desarrollo de fármacos antineoplásicos a base de metales de transición, de preferencia esenciales biológicamente, con el propósito de

disminuir toxicidad y costo. Una segunda premisa de trabajo fue sintetizar una familia de compuestos con variantes estructurales tales que permitieran la selectividad tumoral.

De esta forma se diseñó la familia de compuestos Casiopeínas® cuyo centro metálico es el cobre. Algunos compuestos de esta familia han demostrado tener actividad antineoplásica en ensayos basados en protocolos internacionales<sup>(15,16,17)</sup>; por lo cual es necesario y justificado el seguir evaluando su actividad y selectividad tumoral.

En el presente trabajo se evaluó la actividad de seis Casiopeínas® con variantes estructurales con la finalidad de relacionar estos resultados con los que previamente se han obtenido en otros ensayos de compuestos pertenecientes a la misma familia, y analizar la relación existente entre la estructura y la actividad biológica ya que de esta forma se podrá, en un futuro hacer predicciones acerca de la molécula que podría ser más efectiva y de menor toxicidad en función de sus características estructurales.

El desarrollo de tratamientos efectivos y poco riesgosos a los cuales pueda tener acceso la población nacional es siempre un esfuerzo justificado dada la importancia de este grupo de enfermedades no sólo en México sino en el mundo entero.



---

# CAPÍTULO I

---

*Antecedentes y Marco teórico*

## **I. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO**

En los países desarrollados las principales amenazas contra la vida son las enfermedades cardíacas, el cáncer, la arteroesclerosis, la artritis y la combinación de bronquitis y enfisema pulmonar, que atacan con mayor fuerza después de los 50 años de vida. Existen características particulares del modo de vida urbano e industrial que favorecen dichas enfermedades.(1,20,33)

Particularmente en el caso del cáncer, mucho se ha comentado acerca de su incidencia y su alarmante tendencia a ocupar los primeros lugares de morbilidad y mortalidad en el mundo(21,23,33,41,43). Estadísticamente es la segunda causa de mortalidad de América, especialmente en las personas mayores de 40 años.(4,21)

### **A. El Cáncer.**

Este grupo de enfermedades ha existido desde los orígenes del ser humano, ha sido descrita en pinturas y escritos de civilizaciones muy antiguas, incluso se han hallado lesiones neoplásicas en huesos de dinosaurios. Se ha informado su existencia en prácticamente todos los vertebrados, algunos invertebrados, e incluso plantas.(5)

Actualmente se reportan alrededor de 5.9 millones de casos nuevos anualmente en todo el mundo(33); es por esto que es una de las causas más importantes de mortalidad en la población mundial.

El cáncer, médicamente llamado neoplasia maligna, es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal de un tejido, las principales características de las células cancerosas son:

- Cambios en el crecimiento de células transformadas,
- Toleran alta densidad celular,
- Independencia de factores exógenos de crecimiento,
- Pérdida de la inhibición por contacto,
- Independencia en el anclaje,
- Tumorigenicidad.

El tejido neoplásico compete por el suministro de energía y nutrición con las células y tejidos normales. Todas las neoplasias dependen del portador en cuanto a su nutrición, del aporte vascular y en algunos casos soporte endocrino.(33,43)

El cáncer se presenta cuando, mediante un estímulo, una célula pierde los mecanismos para regular su crecimiento, continuando así su proliferación y propagación en forma incontrolable, para finalmente destruir al organismo.(43)

Existen diferentes factores que originan la formación de cáncer, siendo principalmente de carácter xenobiótico(55). La evidencia más directa para la carcinogenicidad a partir de dichos factores es un incremento en la incidencia de cáncer en animales expuestos. Diferentes causas no relacionadas entre sí pueden ser el estímulo que provoca el desarrollo del cáncer. Estos factores son entre otros virus, radiación ionizante y ultravioleta, una gran variedad de agentes químicos y la presencia de productos de oncogenes. Se ha visto que estos factores pueden llegar a causar daño al ADN de las células produciendo cambios en su estructura, lo cual provoca que no exista respuesta a las señales que controlan su crecimiento y reproducción.(33)

Actualmente, se cuenta con una vasta información sobre las causa y los diferentes tipos de cáncer, dónde se originan, su comportamiento y su pronóstico, pero desafortunadamente su tratamiento; el cual es un factor importante para aumentar el pronóstico y calidad de vida de cualquier ser vivo, aún no es óptimo.

## **B. Tratamientos Antineoplásicos.**

Durante muchos años el tratamiento del cáncer se ha basado en tres tipos de procedimientos, los cuales son: el tratamiento quirúrgico, radioterapia y quimioterapia.(5,50) En la actualidad se han descubierto y se están utilizando otras formas que son la inmunoterapia, la hipertermia, la hipotermia, la hormonoterapia, así como otros que se encuentran en fase experimental como la terapia génica, la utilización de fotosensibilizadores, terapia de radiosensibilizadores y radioprotectores, la radioterapia con partículas densamente ionizantes y la radioterapia intraoperativa.(57,39)

La cirugía es el tratamiento más antiguo contra el cáncer y hasta hace poco tiempo era la única modalidad para curar esta enfermedad. En la actualidad esta vía es útil solamente cuando el tumor es sólido y depende del sitio anatómico en donde se encuentre. Sin embargo, cuando se presenta metástasis o el tumor no se encuentra en un sitio anatómico operable, es necesario recurrir a otros tipos de tratamientos como lo son la radioterapia y la quimioterapia; o bien, la combinación de dos o más para potencializar la efectividad de los mismos y mejorar los pronósticos.(3,23)

El tratamiento de una neoplasia maligna con radioterapia se basa en detener o erradicar a las células malignas por medio de radiaciones que son producidas a partir de núcleos atómicos radioactivos, pero su utilidad disminuye cuando las células neoplásicas se diseminan a otros sitios del organismo y establecen nuevos focos de crecimiento (metástasis).(39)

La quimioterapia consiste en la utilización de compuestos químicos. Este tipo de terapia ha presentado resultados alentadores dado que los compuestos químicos pueden influir en todos los sitios de una enfermedad metastásica después de ser administrados. Siendo esto último simultáneamente la principal ventaja y desventaja; ya

que estos compuestos no discriminan entre células neopásicas y células normales con alto índice reproductivo. (10,25)

La inmunoterapia consiste en utilizar al sistema inmune o a sus componentes para controlar o destruir a las células cancerígenas a través de su estimulación con la utilización de diferentes agentes inmunoterapéuticos de origen biológico o sintético. (39)

La hipertermia se basa en aumentar la temperatura de todo el cuerpo o solamente de ciertas regiones que presentan crecimiento tumoral. Existe evidencia de que la parte interna de un tumor presenta un pH bajo, poca disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, por lo tanto su inactivación es más rápida cuando existe un aumento en la temperatura corporal o local. Por otra parte, se ha visto que el calor acentúa los efectos de radiación y de muchos agentes quimioterapéuticos por medio de diferentes mecanismos. (57,39)

Los fotosensibilizadores, radioprotectores, radiosensibilizadores y la radioterapia intraoperativa se utilizan en forma conjunta con la radiación para potencializar su efecto sobre las células tumorales. (57,39)

A pesar de lo prometedores que pueden ser los nuevos tratamientos, aún dependen de pruebas terapéuticas para investigar su eficacia en el humano; además están desarrollados y enfocados a potencializar el efecto de las terapias tradicionales, por lo cual la quimioterapia, radioterapia y la cirugía siguen siendo los tratamientos más útiles contra el cáncer.

### **C. Quimioterapia.**

En 1898, Paul Ehrlich descubrió el primer agente alquilante (arsfenamina), 50 años después de ser descubierto comenzó a ser aplicado en el tratamiento de neoplasias en humanos. (38)

La búsqueda de nuevos fármacos que presenten un efecto positivo en el tratamiento anticancerígeno ha llevado al desarrollo de una amplia variedad de compuestos.

Una clase de compuestos que han llamado la atención son aquellos que presentan un centro metálico, los cuales incluyen mercurio, arsénico, oro y platino. Hace 500 años ya se empleaban preparaciones de plata, zinc y mercurio para el tratamiento del cáncer,<sup>(41)</sup> sin embargo el uso de fármacos en un tratamiento sistemático en neoplasias malignas no se documentó sino hasta 1865 por Lissauer.

A pesar de que varios compuestos con diferente centro metálico han demostrado actividad citostática, aquellos que son de platino han tenido los mejores resultados.<sup>(42)</sup>

En 1965, el Dr. Barnett Rosenberg, un biofísico, que investigaba el efecto de la corriente eléctrica en la motilidad bacteriana descubrió que el agente *cis*-diaminodichloroplatino II (DDP) inhibía la motilidad y el crecimiento bacteriano. Para 1969, en estudios siguientes se estableció la actividad antitumoral del cisplatino en modelos tumorales animales experimentales.<sup>(44)</sup> En 1972 el cisplatino fue sometido por el National Cancer Institute a pruebas clínicas,<sup>(14, 42)</sup> y finalmente en 1983 el DDP se convirtió en uno de los compuestos anticancerígenos más utilizados.<sup>(38)</sup>

Actualmente existen numerosos fármacos antineoplásicos, tanto de origen orgánico como inorgánico, sin embargo la existencia de tumores refractarios a estos compuestos, la elevada toxicidad y el costo de los mismos siguen siendo las principales desventajas en la quimioterapia.<sup>(40)</sup>

En general, los principales efectos tóxicos que produce un agente quimioterapéutico son, en forma aguda: anorexia, vómito, diarrea, supresión funcional de la médula ósea y del sistema inmune, así como anafilaxia y cambios en el sistema urinario. De forma crónica se presentan daños principalmente en el corazón.<sup>(40)</sup>



Por lo anterior, es necesaria la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes que tengan características mejores que las de los existentes.

#### **D. Proyecto “Desarrollo de Anticancerígenos” y Casiopeínas.**

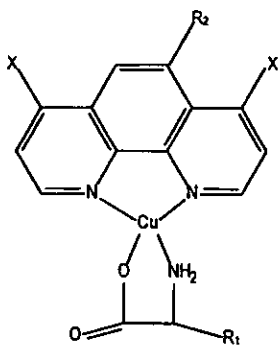
En la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz Azuara, se han diseñado y sintetizado un nuevo grupo de compuestos de coordinación que reciben el nombre de CASIOPEINAS®, las cuales son moléculas con potencial antineoplásico.<sup>(15,16,17)</sup>

Las Casiopeínas son una familia de compuestos de coordinación de cobre (II) como centro metálico que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diimina (N,N) y otro que puede ser aminoacidato (N,O) o donador (O,O).<sup>(7)</sup> Estos compuestos han sido clasificados en cuatro grandes grupos I, II, III, y IV; cuyas fórmulas generales se muestran en la figura 1.

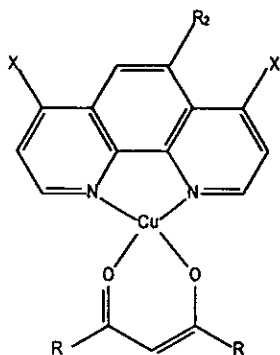
Hasta la fecha se han sintetizado cerca de 100 Casiopeínas, las cuales están en proceso de caracterizarse con detalle fisicoquímicamente.<sup>(48)</sup>

Algunas Casiopeínas han sido estudiadas más a fondo y han sido sometidas a múltiples pruebas de acuerdo con las normas internacionales de evaluación de fármacos con potencial anticancerígeno y los resultados han demostrado que estas moléculas tienen actividad citostática, citotóxica, y antineoplásica, lo cual motiva a continuar con estos estudios en otras moléculas de la misma familia.<sup>(15,16,45)</sup>

Figura 1

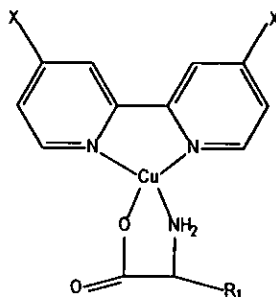


X = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (Familia I)  
 X = CH<sub>3</sub> (Familia II)  
 = aminoácidos esenciales  
 (gli, val, leu, isoleu, etc.)



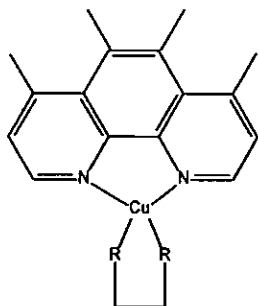
**Familia III**  
 X = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>  
 R = NO<sub>2</sub>, Me

= Acetilacetonato,  
 Salicilaldehidato.



**Familia IV**  
 X = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

= aminoácidos  
 esenciales.

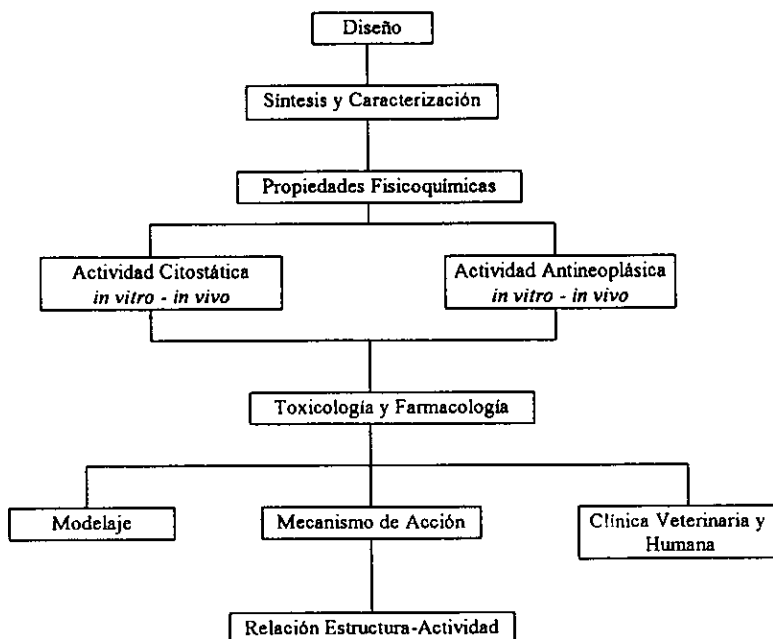


**Familia V**  
 = a.a. esenciales.  
 Salicilaldehidato,  
 Acetilacetonato.

El desarrollo de Casiopeínas es un proyecto multidisciplinario integrado por equipos de trabajo de diferentes instituciones: Facultad de Química (UNAM), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), Facultad de Medicina (UNAM), Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), Instituto de Fisiología Celular (UNAM), Centro para la Innovación Tecnológica (UNAM), Insitituto Nacional de Cancerología(INCan), Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares(ININ) y otras colaboraciones a nivel internacional.

El esquema de trabajo de este proyecto se plantea a continuación:

### DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL DESARROLLO DE FARMACOS

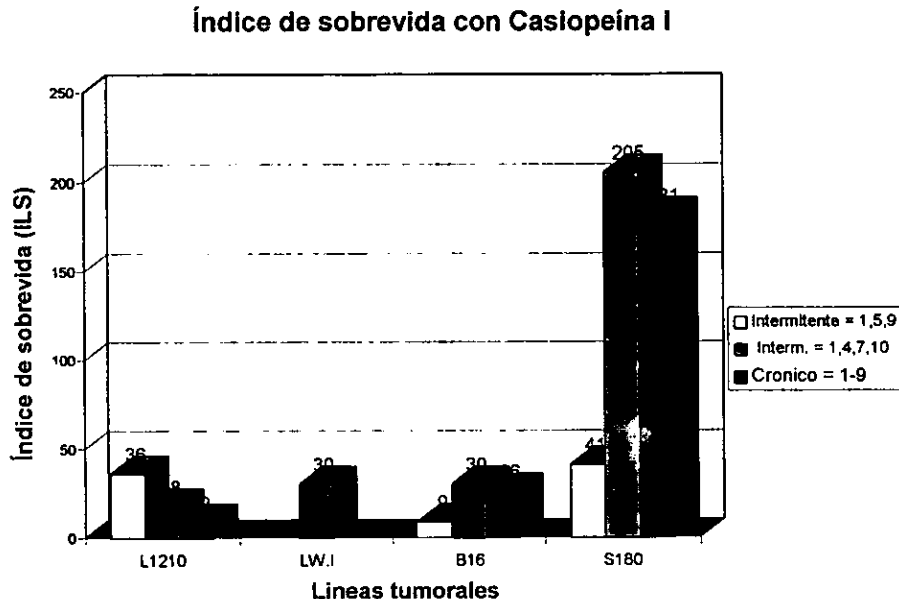


Dado que la familia de compuestos Casiopeínas es muy grande, a la fecha sólo algunas de ellas han sido estudiadas a fondo, obteniéndose resultados bastante alentadores en el ámbito clínico veterinario<sup>(11, 48)</sup>. Entre los estudios realizados se encuentran los siguientes:

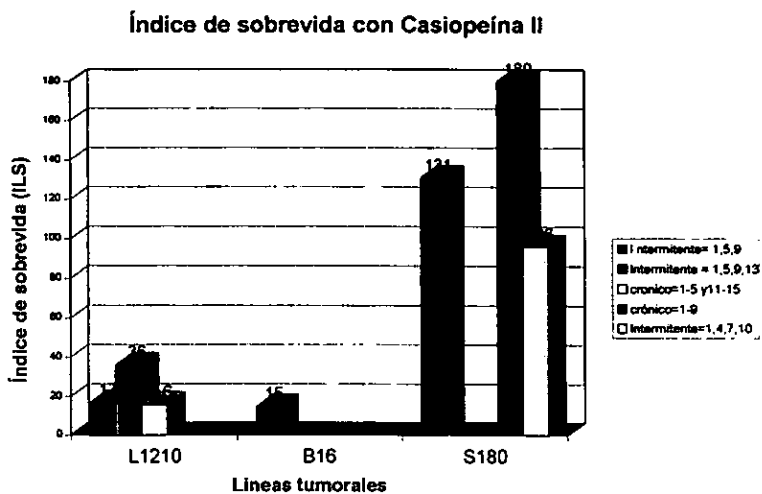
1. Determinación de propiedades fisicoquímicas: Se han realizado pruebas de estabilidad con respecto al pH y se encontró que esta clase de compuestos son estables en disolución acuosa a fuerza iónica y temperatura constante, a pH aproximadamente de 7 durante siete días. Por otra parte se encontró que las Casiopeínas® no pueden ser administradas por vía oral debido a que son inestables al pH's ácidos como el estomacal.<sup>(48)</sup>
2. Evaluación citostática *in vitro* en cultivo de linfocitos humanos sanos, con resultados comparables e incluso superiores a la mayoría de los quimioterapéuticos de uso comercial.<sup>(37,45)</sup>
3. Evaluación antineoplásica *in vitro* empleando líneas tumorales recomendadas por los protocolos internacionales y clones tumorales humanos de cáncer cérvico-uterino de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), obteniéndose resultados comparables a la actividad de la Mitomicina C y Cisplatino.<sup>(19)</sup>
4. Evaluación citostática *in vivo* empleando el método de intercambio de cromátidas hermanas en el ratón. Este tipo de experimentos se encuentran en una fase inicial, pero los resultados que se obtengan nos darán indicio no sólo de su actividad citostática, sino también sobre su mecanismo de acción.
5. Pruebas de potencial mutagénico *in vitro*. Estas pruebas hasta el momento han mostrado una baja actividad mutagénica, y cabe mencionar que algunos de los fármacos han mostrado una marcada actividad bactericida.<sup>(6)</sup>

6. Pruebas para evaluar mutaciones somáticas en *Drosophila melanogaster*. Los resultados de los ensayos mutagénicos *in vitro* e *in vivo* muestran ligera actividad mutagénica de estos compuesto.(6)
7. Pruebas de actividad antineoplásica *in vivo* empleando los modelos tumorales murinos recomendados por el National Cancer Institute, USA. Los resultados en este panel de evaluación son muy alentadores ya que algunas Casiopeínas sobrepasan por mucho los requerimientos exigidos por los protocolos internacionales e incluso, dependiendo de la Casiopeína de elección así como del esquema de tratamiento y dosis empleada, se han logrado remisiones totales y sobrevidas que van hasta un 200% (ver gráficas 1, 2 y 3).(15,48)

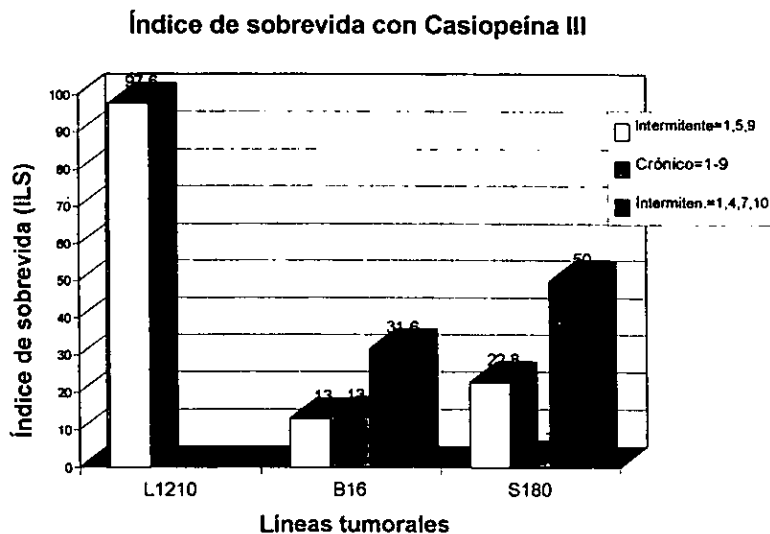
Gráfica 1. Porcentaje de sobrevida con Casiopeína I en diferentes líneas tumorales empleando diferentes esquemas de tratamiento.



**Gráfica 2. Porcentaje de sobrevida con Casiopeína II en diferentes líneas tumorales empleando diferentes esquemas de tratamiento**



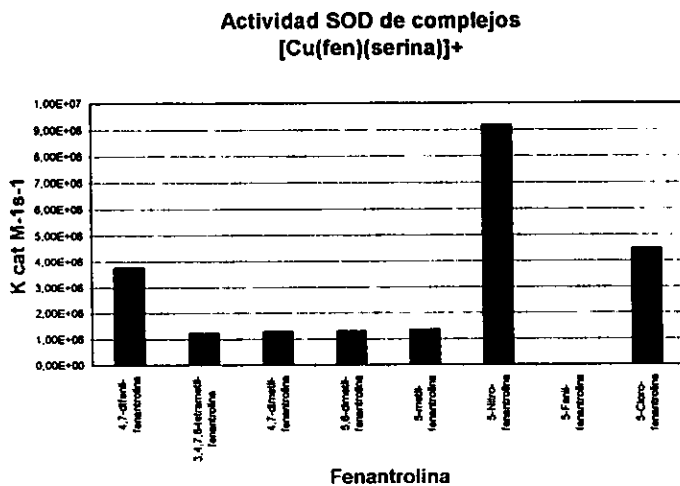
**Gráfica 3. Porcentaje de sobrevida con Casiopeína III en diferentes líneas tumorales empleando varios esquemas de tratamiento.**



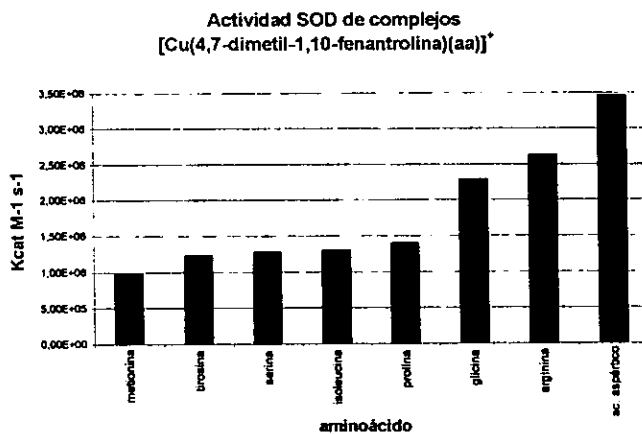
8. Interacción de estos compuestos con ADN lineal y superenrollado evaluada a través de electroforesis en gel.(49)
9. Biodistribución de Casiopeína I, II y III en ratones y ratas. Este trabajo nos permitió conocer la concentración del compuesto en los órganos blanco. Los resultados obtenidos a partir de las muestras en ratones indican que los órganos como mayor concentración en los tres compuestos son bazo y riñón.(24)
10. Cardiotoxicidad y ototoxicidad. Estas pruebas se encuentran en el inicio de su desarrollo y han sido diseñadas para poder determinar el efecto de las casiopeínas en órganos de suma importancia donde otros fármacos con base metálica como el Cisplatino han mostrado una toxicidad marcada.
11. Estudios anatómo-histológicos en ratones. Estos estudios toxicológicos han revelado que las lesiones producidas en los órganos de los animales tratados con Casiopeínas son moderadas, lo cual nos hace pensar que estos cambios pueden llegar a ser reversibles una vez suspendida la aplicación del compuesto o mediante terapia neoadyuvante.(56)
12. Estudios de estabilidad de Casiopeínas en soluciones fisiológicamente compatibles. Este estudio revelará de que forma puede administrarse esta clase de compuestos.
13. Estudios de la actividad superóxido dismutasa (SOD) de las Casiopeínas. Este sistema enzimático cataliza *in vivo* la dismutación de superóxido a agua con una velocidad de  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y se encuentra inhibido en las células tumorales, por lo que se piensa que interviene en la prevención del desarrollo de la neoplasia. Este estudio ha revelado que las Casiopeínas tienen cierta capacidad para imitar la actividad de esta enzima con velocidades de catálisis dentro del intervalo de  $10^6$  a  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , por lo que se piensa que éste es un probable mecanismo de acción de estos compuestos. (ver gráficas 4 y 5).

14. Estudios de Genotoxicidad de Casiopeínas: El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad citotóxica y genotóxica en cultivo primario de hepatocitos de rata y líneas tumorales murinas (trabajo en proceso).

Gráfica 4. Actividad Superóxido dismutasa de complejos de Cobre manteniendo el donador N-O constante (serina) y variando los donadores N-N.



Gráfica 5. Actividad Superóxido Dismutasa de complejos de Cobre manteniendo el donador N-N constante (4,7-dimetil-1,10-fen) y variando el donador N-O





Los resultados en cada uno de estos estudios han sido alentadores y nos han guiado a pensar en su posible uso en el ámbito clínico, incluso se planea iniciar estas pruebas clínicas en 1998.

Lo anterior motiva a continuar estos estudios con otros compuestos de la misma familia, de tal forma que se puedan correlacionar resultados y analizar las relaciones entre la estructura química y las actividades antineoplásica y tóxica, con la finalidad de encontrar la mejor opción de esta familia de compuestos para el tratamiento adecuado y eficaz de las neoplasias malignas.

### **E. Esquemas de Cernimiento y Protocolos de Evaluación<sup>(13)</sup>**

El interés y la necesidad de encontrar nuevas moléculas con actividad antineoplásica que puedan tener mejores características a las ya existentes, dió origen a la regulación del cernimiento y pruebas de evaluación de actividad antitumoral por parte de organismos internacionales como el Cancer Chemotherapy National Service Center perteneciente al National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, E.U.A.

El principal propósito de estos programas de cernimiento es seleccionar compuestos que sean activos en la práctica clínica. Fundamentalmente el sistema cernimiento debe tener las siguientes características:

- Debe ser capaz de identificar a un agente como de interés potencial
- Debe ser cuantitativo en la determinación de la actividad del agente en el sistema en el cual haya sido ensayado.

- Debe discernir si el compuesto merece más desarrollo o es conveniente detener el estudio de esa molécula.
- Debe ser confiable y significativo para la clínica.

Tomando en cuenta estas características los protocolos de evaluación antes mencionados proponen las siguientes etapas para la evaluación del potencial antineoplásico.<sup>(13)</sup>

## **1. CERNIMIENTO PRIMARIO**

### **1.1. Prueba inicial:**

En esta etapa se debe demostrar que las moléculas candidatas tienen alguna actividad biológica deseable. Esto puede involucrar un efecto citostático o citotóxico *in vitro* o *in vivo*, un efecto bioquímico diseñado, o alguna otra prueba.

En estos sistemas la prueba debe ser finalizada si el agente que se evalúa no satisface adecuadamente los criterios de actividad.

### **1.2. Confirmación de la actividad:**

En este punto se debe determinar si la actividad observada es reproducible y es suficiente en magnitud para continuar el estudio. Para lograr esto se deben llevar a cabo pruebas en donde los requerimientos para actividad sean progresivamente incrementados.

## **2. CERNIMIENTO SECUNDARIO**

En esta segunda etapa se caracteriza detalladamente a el fármaco en el sistema de prueba inicial, es decir, se determina una relación detallada de dosis-respuesta y la influencia de diferentes esquemas de tratamiento, rutas de administración, y vehículos.

## **3. CERNIMIENTO TERCARIO**

Esta etapa corresponde a la investigación preclínica. Es en este momento en donde se debe acumular toda la información necesaria sobre las características farmacológicas y toxicológicas del fármaco previas al inicio de las fases clínicas de investigación.

En general se requiere implementar métodos para el control analítico de la pureza del compuesto, estudios de solubilidad en soluciones fisiológicas aceptables, formulaciones tentativas, pruebas de estabilidad en dichas formulaciones, estudios de compatibilidad suero-plasma, pruebas de hemoaglutinación o actividad hemolítica, pruebas de daño local al tejido y pirogenicidad de la formulación, estudios toxicológicos profundos a través de observaciones fisiológicas, farmacológicas, bioquímicas, hematológicas, histoquímicas e histológicas, estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos.

## **4. FASES CLINICAS**

Una vez que se ha determinado que un compuesto cumple con todas las características de actividad farmacológica necesaria, su toxicidad es aceptable y se ha reunido suficiente información confiable y reproducible sobre sus propiedades, entonces puede ser sometido a las pruebas clínicas.

La etapa de evaluación clínica comprende tres fases, en cada una de ellas se deben obtener resultados satisfactorios para poder ascender a la siguiente:

- Fase I: En esta fase se estudia la toxicología y dosis óptimas en pacientes terminales con cáncer.
- Fase II: En esta etapa se estudia si la actividad antitumoral es significativa, se efectúan análisis estadísticos evaluando el riesgo-beneficio y se identifica el espectro tumoral.
- Fase III: Se compara la actividad de el fármaco evaluado y su espectro con otros fármacos y tratamientos establecidos. Si satisface las características requeridas o mejora para cierta clase de neoplasias algunas propiedades (actividad, costo, toxicología) de los tratamientos existentes entonces será incluida en el régimen terapéutico.

#### **F. Protocolo de Evaluación del National Cancer Institute<sup>(13)</sup>**

Los modelos animales de enfermedades neoplásicas son el punto inicial para la evaluación de nuevos fármacos sin poner en riesgo a pacientes humanos. El National Cancer Institute ha realizado numerosos estudios para seleccionar y adecuar modelos animales de experimentación para las evaluaciones antineoplásicas de nuevos agentes que sean altamente predictivos y correlacionables con la actividad terapéutica en humanos, estableciendo las siguientes líneas celulares como adecuadas para estos ensayos:

- Modelos con alta predictibilidad en tumores sólidos: Carcinoma de pulmón de Lewis, Carcinoma RL(67,173,49), Carcinoma AKATOL, Sarcoma 37, Miosarcoma ISM, Sarcoma osteogénico de Ridway, Melanoma B16.

- Modelos con buena analogía con tumores tipo linforeticular: Leucemia linfoide L1210, Leucemia linfocítica P388.
- Modelos con especificidad directa para tumores humanos: Adenocarcinoma 755, Adenocarcinoma de Walker 256, Sarcoma ascítico de Yoshida, Carcinoma ascítico de Ehrlich, Plasmocitoma MOPC406, Plasmocitoma ADJ/PC6.

Así mismo se ha establecido una ruta de evaluación incrementando progresivamente los criterios de aceptación y la predictibilidad para tumores humanos, esta ruta se resume a continuación:

- Evaluación primaria: Se emplea Leucemia linfocítica P388, la prueba se acepta como positiva si el índice de sobrevivencia de los grupos tratados es mayor en un 25% con respecto al grupo control (aqueí que no recibe tratamiento). En caso contrario se detiene el ensayo para ese fármaco.
- Evaluación secundaria: Se emplea Melanoma B16, Leucemia linfoide L1210, y Carcinoma MX-1 de células infiltradas (xenotransplante de humano a ratón desnudo). Si los resultados son positivos en al menos un modelo se continúa con el ensayo, considerando como positivo aquellos ensayos en donde se obtenga un índice de sobrevivencia mayor o igual al 20% con respecto al grupo control.
- Evaluación terciaria: Se emplea Adenocarcinoma de colon (Co 38), Carcinoma de pulmón de Lewis (LL) y Carcinoma Cx-1 (xenotransplante de pulmón de humano a ratón desnudo).

### **G. Línea Tumoral Melanoma B16**

La línea tumoral empleada en este trabajo fué Melanoma B16, la cual es tumorigénica y metastásica en ratones singénicos C57BL/6J. Esta línea se desarrolló espontáneamente en la piel de la base de la oreja de un ratón de la cepa mencionada. Tiene características ectodérmicas y endodérmicas, y su haplotipo es H-2<sup>b</sup>.(8, 29, 6)

El Melanoma crece de células pigmentadas (melanocitos) en la capa exterior de la piel y en membranas mucosas (epidermis). En el humano usualmente inicia como una lesión en la piel, ocasionalmente aparece en otras partes del cuerpo como el ojo, boca o vagina. Esta clase de tumores es común en personas de tez blanca o de ascendencia Norte-Europea, generalmente las personas de piel oscura no lo presentan.(35, 51)

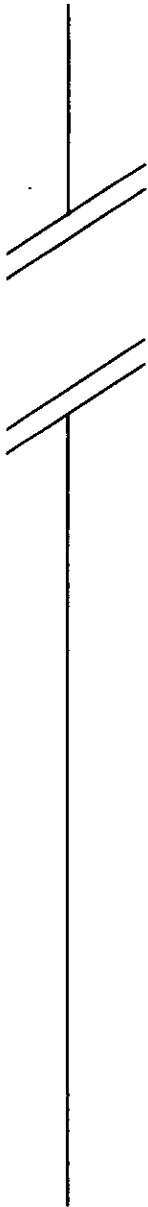
En experimentos previos con esta línea tumoral, se encontró que los ratones machos C57BL/6J inoculados subcutáneamente con Melanoma B16 ( $1 \times 10^6$  células) tienen un promedio de vida de 25 días después de la inoculación, y un porcentaje de incremento en peso al día de la muerte alrededor del 20%.(31)

### **H. Cepa Murina C57BL/BJ**

Esta cepa de ratones tiene la característica de ser singénica. Para obtener animales de este tipo genético es necesaria la cruce de individuos emparentados entre sí al menos por 20 generaciones volviéndolos homocigóticos en un 98.7% de su genoma, incluyendo la región del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA en el humano y H-2<sup>b</sup> en el ratón).(9, 29)

Su duración de vida es de 1000 días como máximo, con un promedio de 827 días para machos y 818 días para hembras.. Su haplotipo es H-2<sup>b</sup>.(29)

El empleo de esta clase de animales que son genéticamente idénticos ofrece la ventaja de reducir al máximo la variabilidad genética entre individuos dándole mayor confiabilidad a los experimentos en los cuales sean usados. Además, dado su haplotipo H-2<sup>b</sup>, se garantiza el crecimiento de la línea tumoral Melanoma B16, de esta manera el efecto antitumoral está restringido solamente al fármaco evaluado.



---

## CAPÍTULO II

---

*Objetivos e Hipótesis*



## A. OBJETIVOS

### 1. Objetivo General:

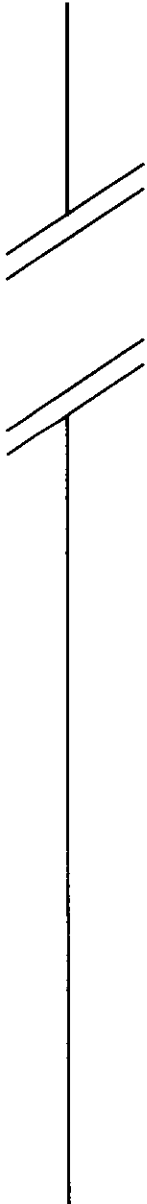
Evaluar la actividad antineoplásica de seis compuestos pertenecientes a la familia de las Casiopeínas® (compuestos de coordinación de cobre) *in vivo* en el modelo tumoral murino Melanoma B16 siguiendo el protocolo internacional establecido por el National Cancer Institute.

### 2. Objetivos Particulares:

- Sintetizar y caracterizar por Espectroscopia Uv-vis, IR, análisis elemental y punto de descomposición a seis compuestos de la familia de las Casiopeínas.
- Evaluar la toxicidad aguda (Dosis Letal 50) de cada uno de estos compuestos, y analizar la relación estructura-actividad tóxica.
- Analizar la relación estructura-actividad antineoplásica de estas seis Casiopeínas® y las que ya han sido evaluadas previamente en la misma línea tumoral con el mismo esquema de tratamiento.
- Correlacionar la actividad antineoplásica evaluada con la actividad SOD de estos compuestos.

## B. HIPÓTESIS

Si miembros de la familia de compuestos casiopeínas han mostrado actividad antineoplásica considerable, entonces esperamos que los seis compuestos que se evaluarán presenten, en función de sus diferencias estructurales, grados variables de esta actividad.



---

## CAPÍTULO III

---

*Material y Método*

### III. MATERIAL Y MÉTODO

#### A. FÁRMACOS

Se evaluó la actividad antineoplásica de los siguientes compuestos:

- [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(serinato)]NO<sub>3</sub>
- [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(aspartato)]
- [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>
- [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(salicilaldehído)]NO<sub>3</sub>
- [Cu(5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina)(serinato)]NO<sub>3</sub>
- [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(salicilaldehído)]NO<sub>3</sub>

#### 1. Síntesis.

Para sintetizar estos compuestos se requiere como reactivos:

- Solución de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> • 5H<sub>2</sub>O 1M de preparación reciente.
- Ligantes diiminas: fenantrolinas o bupiridinas.
- Ligantes donadores N-O ó donadores O-O: L-aminoácidos, salicilaldehidato, ó acetilacetato
- Disolventes: EtOH, MeOH grado R.A. y H<sub>2</sub>O destilada
- NH<sub>4</sub>OH solución acuosa diluída 1:4.

La síntesis se realiza en solución empleando el disolvente adecuado para cada reactivo. La fenantrolina o bupiridina seleccionada se disuelve en MeOH o EtOH según sus características y en ocasiones es necesario la aplicación de calor moderado.

Con agitación constante se agrega el  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  1M. en cantidad estequiométrica y finalmente el donador N,O ó O,O previamente disuelto. Los aminoácidos se disuelven en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, y dependiendo del caso, en ocasiones también es necesaria la aplicación de calor o bien un incremento moderado del pH con  $\text{NH}_4\text{OH}$  acuoso; cuidando de no superar el pKa del grupo amino. Los donadores O,O; salicilaldehído y acetilacetato son líquidos a temperatura ambiente, por lo que son adicionados al medio de reacción directamente.

Posteriormente se ajusta el pH de medio de reacción entre 9 y 10 con Hidróxido de amonio en solución acuosa 1:4. Se evapora los disolventes a presión reducida y a una temperatura no mayor a  $40^\circ\text{C}$ . Finalmente se filtra el producto y se purifica por recristalización empleando disolventes grado R.A. adecuados para cada caso.

## 2. Caracterización

Los compuestos se caracterizaron por espectrometría de infra-rojo, análisis elemental, determinación del punto de descomposición, y espectrofotometría UV-Visible. Para estas determinaciones se emplearon los siguientes instrumentos de análisis:

### 2.1. Espectrometría de Infra-rojo: Nicolet 740 FT-IR Spectrometer.

El instrumento se calibra corriendo un blanco de gas nitrógeno. Para realizar este análisis se preparó una mezcla sólida en bromuro de potasio, la cual se empastilló y posteriormente se leyó de  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  en el instrumento antes citado. Este estudio se realizó de forma cualitativa, es decir, no se cuantificó la cantidad de muestra agregada a cada pastilla. Los espectros obtenidos se analizaron para inferir si se obtuvo la síntesis del compuesto deseado.

## **2.2. Análisis elemental:**

Este análisis requiere de una muestra entre 0.1 y 0.3 mg del compuesto a analizar. Esta pequeña cantidad de muestra se coloca en una cápsula de estaño que debe sellarse perfectamente para que no quede aire en el interior, ya que de ser así existe un error considerable en la determinación. El equipo se calibra mediante una curva patrón de sulfacetamida. Se requiere de 15 minutos por muestra para analizar Carbono, Nitrógeno, e Hidrógeno. Los resultados se compararon con los calculados teóricamente y se dedujo la posible fórmula molecular y el peso molecular de cada uno de los compuestos.

## **2.3. Espectrofotometría Ultravioleta - Visible: Hewlett Packard 8452A, Diode Array Spectrophotometer.**

Se determinaron los máximos de absorbancia y los coeficientes de extinción molar en solución acuosa de cada uno de los compuestos estudiados. Para lo cual se utilizó un blanco de agua destilada y se prepararon soluciones acuosas a diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos, adecuándolas en cada caso para que la absorbancia permaneciera en el intervalo de 0.2 a 0.8 unidades de absorbancia.

Los espectros se leyeron en el intervalo de longitud de onda de 190 a 820 nm, y los datos obtenidos se trataron mediante un análisis de regresión lineal en las longitudes de onda que presentaron los máximos de absorbancia, la pendiente corresponde al coeficiente de extinción molar.

#### 2.4. Determinación del punto de descomposición: Büchi 535, Melting Point.

Una de las características de los compuestos evaluados es su particular coloración azul o verde, el punto de descomposición se toma como la temperatura a la cual la muestra se torna de color café - negro.

### B. ANIMALES

Se emplearon ratones machos de la cepa singénica C57BL/6J con peso promedio de  $23 \text{ g} \pm 3\text{g}$  y de 12 a 15 semanas de edad.

Los animales permanecieron en la Unidad de Experimentación Animal (UEA) del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, en donde se mantuvieron en condiciones ambientales controladas: temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa 50-60%, ciclos luz-obscuridad 12/12 h, aire filtrado mediante filtros Heppa con  $3\mu\text{m}$  de diámetro de poro y 18 recambios del volumen total de aire por hora.<sup>(30,60)</sup>

Se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* que consistió en Nutricubos Purina Ralston y agua purificada por osmosis inversa y acidificada con HCl hasta pH 2.5 para el control de parásitos gastrointestinales.<sup>(22,32)</sup>

### C. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL<sub>50</sub>)

La Dosis letal 50 hizo posible diseñar la evaluación antineoplásica empleando dosis iniciales más cercanas a la óptima y que no comprometan el experimento por toxicidad aguda del compuesto.<sup>(1)</sup>

Previo a la determinación de la  $DL_{50}$ , se realizó una estimación aproximada de la dosis máxima tolerada mediante un perfil farmacológico, para lo cual se emplearon grupos de 2-4 ratones de la cepa C57BL/6J sin importar el sexo y se les administró dosis logarítmicas de *Casiopéina* (3, 10, 30, 100, 300 mg/Kg).

Con base en estos resultados se seleccionaron de 5 a 6 dosis cercanas entre sí dentro de un intervalo en donde se esperaba encontrar la  $DL_{50}$ , y se administraron a grupos de 5 ratones machos que se mantuvieron en observación durante 14 días. Al finalizar este periodo se hizo un recuento del número de individuos muertos y vivos en cada uno de los grupos. Con estos resultados se calculó la  $DL_{50}$  exacta mediante el método gráfico, correlacionándolos en una gráfica dosis-respuesta cuantil, donde la respuesta se consideró como el número de individuos muertos y vivos por cada dosis.<sup>(59)</sup>

#### D. LÍNEA TUMORAL MURINA MELANOMA B16 Y TRANSPLANTE TUMORAL

Para la evaluación antineoplásica se empleó la línea tumoral melanoma B16. Esta línea tumoral después de adquirida comercialmente permaneció congelada en medio mínimo esencial Eagle's con 10% de suero fetal bovino y 5% DMSO.

Antes de inocularla *in vivo* las células se descongelaron a temperatura ambiente, se lavaron con PBS (Physiological Buffered Solución) y se trataron con una solución acuosa al 0.25% tripsina y 0.02% EDTA durante 3 minutos a 37°C, posteriormente se sembraron en medio mínimo esencial Eagle's con 10% de suero fetal bovino y se incubaron a 37°C durante una semana<sup>(2)</sup>. Al término de ese tiempo las células se lavaron y resuspendieron con PBS para inocularlas subcutáneamente en la región inguinal de uno o varios ratones C57BL/6J de 12-15 semanas de edad<sup>(29,61,13)</sup>. A partir de este momento la línea celular se mantuvo *in vivo*. Para su adecuada preservación cada 14 días se sacrificó al ratón portador, se extrajo la masa tumoral y se inoculó en otro ratón de la misma cepa y edad <sup>(61)</sup>(ver metodología para transplante).

Según los protocolos mediante este método de preservación la línea celular tiene una viabilidad en condiciones genéticas adecuadas para experimentar de 3 - 4 meses.<sup>(61)</sup>

### **1. Transplante Tumoral:**

El transplante de la línea tumoral murina Melanoma B16 se llevó a cabo por inoculación subcutánea en la región inguinal de los individuos de experimentación y preservación. El inóculo se preparó de la siguiente forma:

Se extrajo la masa tumoral cuidadosamente de un ratón portador, se lavó con PBS estéril, se pesó un gramo de tumor y se colocó en una caja de petri con 10 ml de PBS. El tumor fue disgregado con agujas cutter, esta suspensión celular se filtró y se homogenizó mediante agitación en vortex.<sup>(13)</sup>

A la suspensión ya homogenizada se le aplicó una prueba de viabilidad celular mediante una tinción vital con colorante azul tripano, para lo cual se realizó una dilución de la suspensión tumoral 1:1. Las células se contaron en cámara de Neubauer en cuadrícula para glóbulos blancos. El inóculo se estandarizó a  $1.0 \times 10^6$  células/mL.<sup>(13)</sup>

A cada ratón se le administró un inóculo equivalente a  $5.0 \times 10^5$  células (0.5 mL) por vía subcutánea en la región inguinal.<sup>(13)</sup>

## **E. EVALUACIÓN ANTINEOPLÁSICA**

La evaluación de la probable actividad antineoplásica de cada uno de los compuestos se realizó siguiendo los protocolos de evaluación internacionales del National Cancer Institute<sup>(13)</sup>.



Para realizar este ensayo se emplearon 80 ratones machos C57L/6J, los cuales se distribuyeron de forma aleatoria en grupos de 10 animales cada uno, bajo el siguiente esquema:

- **Grupo control negativo:** Este grupo se integró por 10 individuos de experimentación que recibieron el inóculo tumoral y no recibieron tratamiento alguno. De esta forma se pudo evaluar la duración del tiempo de vida y el incremento en peso en condiciones normales de desarrollo tumoral.
- **Grupo control positivo:** Este grupo experimental se integró por 10 individuos que reciben el inóculo tumoral y tratamiento con Ciclofosfamida sodica en su presentación comercial (Genoxal) en una dosis de 50 mg /Kg siguiendo un esquema de tratamiento crónico durante 9 días, el cual inicia a las 24 horas de la inoculación del tumor. Este fármaco tiene actividad antineoplásica conocida, y sirve para validar el método de evaluación.
- **Seis grupos de experimentación:** Este grupo esta integrado por individuos que reciben el inóculo tumoral y son tratados con la Casiopeína a evaluar, empleando una dosis equivalente a 1/8 de la DL<sub>50</sub> previamente determinada, bajo un esquema de tratamiento crónico durante 9 días iniciando 24 horas después de la inoculación del tumor. Con este grupo evaluamos si la Casiopeína empleada tiene alguna acción que altere el crecimiento tumoral y por tanto en el retraso de la fecha de muerte con respecto al grupo control negativo.

Esta distribución de los grupos nos permite evaluar de manera confiable la probable actividad antineoplásica.

En todos los casos las soluciones para administrar se prepararon empleando como disolvente H<sub>2</sub>O destilada y desionizada previamente filtrada por un microfiltro con

especificación de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Las soluciones se prepararon a una concentración adecuada para cada uno de los compuestos, de tal forma que la dosis administrada a cada ratón estuviese contenida en un volumen de 0.2-0.5 mL como máximo.

Después de los nueve días de tratamiento los ratones permanecen en observación hasta su muerte.

Las variables de respuesta que se registran a lo largo de la evaluación son peso corporal (diario) y día de muerte. Con estos dos datos se evalúa la actividad de la Casiopeina mediante cálculos matemáticos que permiten evaluar estadísticamente los datos y conocer otros parámetros derivados de los evaluados. (Ver tratamiento de resultados).

## **F. TRATAMIENTO DE RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos registrados durante los experimentos no tienen por sí solos significado útil para evaluar la efectividad del tratamiento con Casiopeina, por lo cual debe emplearse la estadística, para poder concluir con cierto grado de confianza si los tratamientos empleados fueron eficaces o no. A continuación se describe el tratamiento matemático efectuado a cada uno de los datos obtenidos.

### **1. Porcentaje de incremento en peso (%IP):**

Este parámetro es calculado con el peso corporal diario de los individuos pertenecientes a cada grupo. Se considera que todo incremento en el peso corporal de

los individuos con respecto a su peso inicial es debido al crecimiento de la masa tumoral. El incremento en peso es definido de la siguiente forma:

$$\%IP = \frac{X_y - X_0}{X_0} * 100\%$$

Donde:

$X_0$  = Peso corporal promedio del grupo el día cero

$X_y$  = Peso corporal promedio del grupo el día y

y = Cualquiera de los días durante el tiempo de ensayo.

## 2. Porcentaje de sobrevida (%ILS del inglés: Increased Life Span):

Llamamos sobrevida al retardo en la fecha de muerte con respecto al grupo control negativo de al menos un día. El índice de sobrevida se calcula de acuerdo a la siguiente definición:

$$ILS = \left[ 100 * \frac{\text{Promedio de sobrevida de el grupo T}}{\text{Promedio de duración de vida de el grupo C}} - 100 \right]$$

Donde:

T = grupo x, ( x puede ser cualquiera de los grupos)

C = grupo control negativo

Considerando sobrevida como:

$$\text{Sobrevida} = t_T - t_C$$

Donde:

$t_T$  = Promedio de la duración de la vida de el grupo x.

(x puede ser cualquiera de los grupos).

$t_C$  = Promedio de la duración de la vida de el grupo control  
negativo

El criterio de aceptación para considerar la evaluación efectiva en cuanto a actividad antineoplásica para esta línea celular es obtener un ILS mayor o igual a 20%.

### 3. Tratados/Control (T/C):

Este parámetro se puede evaluar tanto en peso como en sobrevida. Definido como:

$$T/C = X_t/X_c$$

Donde:

$X_t$  = Promedio en peso o sobrevida del grupo t.

(t puede ser cualquiera de los grupos)

$X_c$  = Promedio en peso corporal o duración de vida del grupo  
control negativo.

### 4. Análisis estadístico en función de sobrevida: Logrank.

Esta prueba estadística se emplea cuando hay datos "censurados" para comparar dos tratamientos en función de sobrevida. El procedimiento para realizarla incluye la

construcción de una tabla en donde se puede apreciar claramente las fechas de deceso de los individuos pertenecientes a cada grupo.

La tabla se construye de la siguiente forma:

t	individuos totales	evento	e	r	individuos de A	individuos de B	individuos de C	PA	PB	PC

Donde:

t = Tiempo de ensayo en días. (periodo en que se realiza)

Individuos totales = sumatoria de los individuos sobrevivientes de todos los grupos al día t durante el periodo que se realiza.

Evento = se califica como positivo (+) si ocurrió algún evento el día t y como negativo si no ocurrió (-).

e = no. de eventos ocurridos durante el periodo t

r = individuos en riesgo al día t

Individuos de A, B, C = No. de individuos en riesgo del grupo A, B o C al día t

PA, PB, PC = Cálculo de la probabilidad de muerte (A,B ó  $C \cdot (\text{evento}/r)$ )

Con base en la hipótesis de nulidad  $PA=PB=PC$ .

Una vez construida esta tabla se debe obtener la sumatoria de las columnas PA, PB y PC, con este resultado final se realiza una prueba de (ji-cuadrada)  $\chi^2$ , donde se compara parejas de resultados con el objeto de analizar si la diferencia de sobrevivencia de dos grupos es estadísticamente significativa. Las hipótesis se plantean de la siguiente manera:

Ha = Existe diferencia entre las sobrevivencias de los grupos con diferentes tratamientos.

Ho = No existe diferencia entre las sobrevivencias de los grupos con diferentes tratamientos.

La  $\chi^2$  se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum [(O_i - E_i)^2 / E_i]$$

Donde:

$O_i$  es el valor observado, y  $E_i$  es el valor de probabilidad esperado el cual se considera como la sumatoria obtenida para cada grupo.

El valor crítico de  $\chi^2$  se obtiene de tablas considerando los grados de libertad igual a uno, ya que se están comparando parejas de datos; y se utiliza un nivel de confianza del 0.95, la hipótesis nula se rechaza si  $\chi^2_{\text{calculada}} > \chi^2_{\text{tablas}}$ .

### 5. Análisis estadístico en función del incremento en peso. (%IP)

Para analizar los resultados en función del porcentaje de incremento en peso se emplea una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para el día 5 y el día 15 del experimento, se escogen estos días debido a que posterior a estas fechas ya no se cuenta con la población muestral completa.

Ya que se considera al porcentaje de incremento en peso como un índice para evaluar el crecimiento tumoral, esta prueba se hace con el objeto de analizar si existen diferencias significativas entre el crecimiento tumoral de un grupo con respecto a otro a un día en específico, de esta forma se puede también evaluar si el tratamiento está dando resultado.

Se trabaja bajo las siguientes hipótesis:

$H_a$  : al menos una  $\mu_j$  es diferente

$H_o$  :  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

Para realizar la ANOVA se construye la siguiente tabla:

Fuente de variación	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Cuadrado de la media (CM)	Razón de varianza (F calculada)
Tratamientos	$\sum_{j=1}^k n_j (X_j - X_{..})^2$	$k - 1$	$SC_{trat.}/gl_{trat.}$	$CM_{trat.}/CM_{error}$
Error	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - X_j)^2$	$N - k$	$SC_{error.}/gl_{error.}$	
Total	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - X_{..})^2$	$N - 1$		

El valor crítico de F se obtiene de tablas empleando los grados de libertad calculados y un nivel de confianza de 0.95, la hipótesis nula se rechaza si el valor calculado de F es mayor que el valor obtenido de tablas.

ANOVA nos dice si al menos uno de los tratamientos es diferente, sin embargo para saber cuál de ellos es el diferente es necesario realizar un análisis de comparaciones múltiples mediante la prueba de diferencia verdaderamente significativa de Tukey, por medio de la cual se comparan todas las parejas de grupos posibles y se determina cuáles de ellas presentan diferencias estadísticamente significativas en sus medias de incremento en peso.

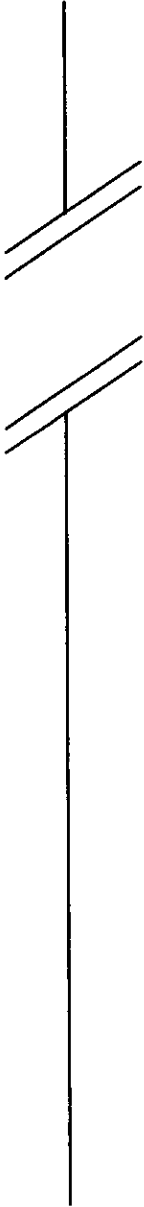
La prueba de Tukey utiliza un solo valor con el cual se comparan todas las diferencias. Este valor llamado DVS (diferencia verdaderamente significativa), esta dado por la expresión:

$$DVS = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{CM_{error}}{n}}$$

Donde  $\alpha$  es el nivel de significación elegido,  $k$  el número de medias en el experimento,  $N$  el número total de observaciones en el experimento,  $n$  el número de observaciones en el tratamiento,  $CM_{error}$  el cuadrado medio del error de la tabla de ANOVA y  $q$ , que se obtiene consultando las tablas de Tukey con  $\alpha, k$  y  $N-k$

Se calculan todas las diferencias posibles entre las parejas de medias y cualquier diferencia que proporcione un valor absoluto que exceda de la DVS se considera como significativa.





---

## **CAPÍTULO IV**

---

*Resultados y Análisis de Resultados*

## IV. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

### A. Síntesis y Caracterización

Tabla 1.0 Resultados globales de la caracterización de cada Casiopeína sintetizada. Los números que aparecen en las columnas Uv-vis e IR corresponden a la localización de los espectros en los apéndices I y II respectivamente.

Compuesto sintetizado	Uv-vis.	IR	P.descomposición °C
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	5	4	171.2
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]	6	5	210.0
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO <sub>3</sub>	3	2	158.0
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) salal]NO <sub>3</sub>	2	1	182.0
[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)salal]NO <sub>3</sub>	4	3	160.0
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	1	6	230.0

Se sintetizarón mediante los procedimientos descritos los compuestos de coordinación que se citan en la Tabla 1.0, en donde además aparecen los análisis mediante los cuales se caracterizarón y los resultados que se obtuvieron para cada uno.

Del análisis de los espectros de infra-rojo (ver Apéndice II), se puede afirmar que los compuestos requeridos se sintetizarón con éxito, ya que aparecen todas las bandas características que identifican a cada estructura.

Algunas bandas muy particulares de esta familia de compuestos son:

- Banda en 1384 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la presencia de Nitrato;

- Banda de estiramiento del enlace C=O del carbonilo que se encuentra desplazada debido a la coordinación con el metal hacia  $1600\text{ cm}^{-1}$ , la cual es una zona poco habitual para su localización.
- Banda característica de anillos aromáticos debido al enlace C=C entre  $1450$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$
- Finalmente las bandas que caracterizan a cada uno de los ligantes de forma particular.

En la tabla 2.0 se pueden observar las bandas principales que permitirán identificar a cada una de las Casiopeínas.

Tabla 2.0 Principales bandas presentes en los espectros de IR.

Compuesto sintetizado	Bandas presentes en IR
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	1607 cm <sup>-1</sup> C=O (serina) 1525 cm <sup>-1</sup> C=C aromáticos (fenantrolina) 1384 cm <sup>-1</sup> NO <sub>3</sub> 3387 cm <sup>-1</sup> O-H (serina) 868 cm <sup>-1</sup> C-H aromático(fenantrolina) 3040 cm <sup>-1</sup> metilos (fenantrolina)
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]	1638 cm <sup>-1</sup> C=O (asp) 1525 cm <sup>-1</sup> C=C aromáticos (fenantrolina) 3380 cm <sup>-1</sup> N-H (asp) 864 cm <sup>-1</sup> C-H aromáticos (fenantrolina)
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO <sub>3</sub>	1577 cm <sup>-1</sup> C=O (acac) 1520 cm <sup>-1</sup> C=C aromáticos (fenantrolina) 1375 cm <sup>-1</sup> NO <sub>3</sub> 869 cm <sup>-1</sup> C-H aromáticos (fenantrolina) 3047 cm <sup>-1</sup> metilos (fenantrolina)
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) salal]NO <sub>3</sub>	1613 cm <sup>-1</sup> C=O (salal) 1518 cm <sup>-1</sup> C=C aromáticos 1384 cm <sup>-1</sup> NO <sub>3</sub> 864 cm <sup>-1</sup> C-H aromáticos (fenantrolina) 3051 cm <sup>-1</sup> metilos (fenantrolina)
[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)salal]NO <sub>3</sub>	1615 cm <sup>-1</sup> C=O (salal) 1520 cm <sup>-1</sup> C=C aromáticos 1385 cm <sup>-1</sup> NO <sub>3</sub> 3074 cm <sup>-1</sup> metilos (bipi)
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	1603 cm <sup>-1</sup> C=O (serina) 3326 cm <sup>-1</sup> O-H (serina) 1385 cm <sup>-1</sup> NO <sub>3</sub> 1517 cm <sup>-1</sup> C=C aromáticos (fenantrolina)

Los compuestos sintetizados presentan en sus espectros de IR las bandas correspondientes a los grupos funcionales esperados en su estructura. El caso particular de [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp] no presenta la banda del nitrato ( $1384\text{ cm}^{-1}$ ), lo cual implica que durante la síntesis el ácido aspártico se desprotonó en sus dos grupos carboxilos, y esta especie dibásica neutraliza la carga positiva del Cobre por lo que no existe contra-ión para este complejo, esta es una característica estructural muy particular de esta Casiopeína, ya que en general todas son sales de nitrato.

Estos resultados pueden ser comprobados mediante el análisis elemental, con base en el cual se calcularon las fórmulas mínimas y pesos moleculares de cada Casiopeína. (Ver Tabla 3.0)

**Tabla 3.0 Resultados del Análisis elemental. Fórmulas mínimas y pesos moleculares calculados.**

Compuesto sintetizado	Análisis elemental	%Teóricos	Fórmula mínima	P.M. g/mol
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	%N 11.48; %C 40.69; %H 3.92	%N 11.39; %C 41.51; %H 4.92	CuC <sub>17</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> H <sub>18</sub> •3H <sub>2</sub> O	491.94
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]	%N 9.00; %C 45.94; %H 4.10	%N 8.99; %C 46.28; %H 5.40	CuC <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> H <sub>16</sub> •3.5H <sub>2</sub> O	467.03
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO <sub>3</sub>	%N 8.23; %C 47.86; %H 4.38	%N 8.79; %C 47.73; %H 5.07	CuC <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> H <sub>19</sub> •2.5H <sub>2</sub> O	478.01
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)sala]NO <sub>3</sub>	%N 7.35; %C 47.49; %H 3.23	%N 7.97; %C 47.86; %H 4.78	CuC <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> H <sub>17</sub> •4H <sub>2</sub> O	526.99
[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)sala]NO <sub>3</sub>	%N 9.49; %C 50.60; %H 3.89	%N 9.36; %C 50.83; %H 4.27	CuC <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> H <sub>17</sub> •H <sub>2</sub> O	448.96
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	%N 15.06; %C 38.67; %H 2.84	%N 15.10; %C 38.83; %H 3.04	CuC <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> H <sub>13</sub> •0.5H <sub>2</sub> O	463.89

Los porcentajes encontrados para C, H y N no difieren en forma significativa de los calculados teóricamente, lo cual indica que además de haber obtenido el compuesto adecuado, este se encuentra lo suficientemente puro para continuar las pruebas tanto de caracterización como de evaluación biológica.

Por otra parte una característica de las Casiopeínas es su descomposición a temperaturas entre 130 y 250°C. El punto de descomposición es particular para cada compuesto, característica que puede ser empleada para hacer una identificación (ver Tabla 1.0).

Respecto a los espectros Uv-vis (apéndice I), tenemos que en todos los casos se presenta un máximo de absorción en el visible debido a las transiciones de los orbitales *d-d* del cobre, y varios máximos en la zona del Ultravioleta debido a las transferencias de carga Metal-Ligante. Todos los complejos que contienen 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina tienen máximos de absorción en 210 nm y 274 nm con diferentes coeficientes de absorptividad. (Tabla 4.0).

Tabla 4.0 Longitudes de onda con máxima absorción y coeficientes de absorptividad Uv-vis.

Compuesto sintetizado	Coefficientes de absorptividad UV $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Coefficientes de absorptividad visible $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	$E_{210\text{nm}}=30626.95$ $E_{274\text{nm}}=28823.89$	$E_{610\text{nm}}=54.6057$
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]	$E_{210\text{nm}}=29884.59$ $E_{274\text{nm}}=30384.96$	$E_{594\text{nm}}=60.7521$
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO <sub>3</sub>	$E_{210\text{nm}}=44867.83$ $E_{274\text{nm}}=35395.13$	$E_{592\text{nm}}=68.7169$
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) salal]NO <sub>3</sub>	$E_{210\text{nm}}=34030.94$ $E_{274\text{nm}}=32631.74$	$E_{384\text{nm}}=2067.47$
[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)salal]NO <sub>3</sub>	$E_{208\text{nm}}=47960.87$ $E_{254\text{nm}}=16148.16$ $E_{298\text{nm}}=14517.04$ $E_{306\text{nm}}=15142.04$	$E_{382\text{nm}}=2672.48$
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	$E_{204\text{nm}}=48852.78$ $E_{276\text{nm}}=27645.03$	$E_{614\text{nm}}=54.0192$

Como se mencionó con anterioridad, el objetivo de llevar a cabo esta caracterización fué en primer término comprobar mediante IR y análisis elemental que el producto obtenido de la síntesis es realmente la Casiopeína que se esta buscando y de cierta forma confirmar que se encuentra suficientemente pura después de la recristalización; y en segundo término recopilar información química y física de cada uno de estos compuestos ya que es fundamental conocer con exactitud que Casiopeína se esta evaluando para correlacionar resultados y tener reproducibilidad.

Una vez realizados los análisis para caracterizar a las Casiopeínas sintetizadas se continuó con las pruebas biológicas.

### B. Toxicidad Aguda (Dosis Letal 50)

En la siguiente tabla se muestran los resultados de dosis letales obtenidos para cada Casiopeína ® en ratones C57BL/6J. Las gráficas Dosis-Respuesta Cuantil sobre las cuales fueron calculados estos datos se encuentran en el Apéndice III.

Tabla 5.0 Dosis Letales

Compuesto	DL <sub>20</sub> (mg/Kg)	DL <sub>50</sub> (mg/Kg)	DL <sub>80</sub> (mg/Kg)
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	10.06	10.52	11.06
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]	9.01	9.50	10.01
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO <sub>3</sub>	7.38	10.03	13.62
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) salal]NO <sub>3</sub>	5.80	5.90	6.00
[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)salal]NO <sub>3</sub>	13.97	15.44	16.91
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	16.99	17.49	17.99

Estos resultados permitieron calcular la dosis a administrar de cada Casiopeína ® durante la evaluación biológica. En un esquema de tratamiento crónico como lo es el que se usó para este trabajo, las dosis diarias administradas deben ser 1/8 de la DL<sub>50</sub>. En la Tabla 6.0 se encuentran las dosis que se administraron, debe observarse que en todos los casos estas son mucho menores incluso a la DL<sub>20</sub>, lo cual permite tener confiabilidad en que los individuos experimentales tolerarán las dosis ensayadas y no morirán durante la evaluación por toxicidad aguda de los compuestos.

Tabla 6

Compuesto	Dosis administradas.
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	1.3 y 2.6 mg/Kg
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]	1.17 y 2.35 mg/Kg
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO <sub>3</sub>	1.34 mg/Kg
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) salal]NO <sub>3</sub>	0.72 mg/Kg
[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)salal]NO <sub>3</sub>	2.03 mg/Kg
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)ser]NO <sub>3</sub>	2.22 y 4.44 mg/Kg

### C. Evaluación Biológica

Los resultados de esta evaluación se presentan en seis secciones, una para cada compuesto, en las cuales se muestran las gráficas de porcentaje de incremento en peso, día promedio de muerte e índice de sobrevivencia para cada grupo experimental, así como la discusión de cada una. Los análisis estadísticos que permitieron evaluar la confiabilidad y relación de los resultados se anexan en el apéndice IV.

## 1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO<sub>3</sub>

### 1.1 T/C calculado en peso al día 1,5 y 11

Tabla 7 T/C calculado par los días 1,5 y 11

Día de evaluación	Control positivo	[Cu(dime-fen)ser]NO <sub>3</sub> 1.3 mg/Kg	[Cu(dime-fen)ser]NO <sub>3</sub> 2.6 mg/Kg
1	98.11	98.65	102.75
5	92.21	89.17	89.17
11	88.33	90.09	90.01

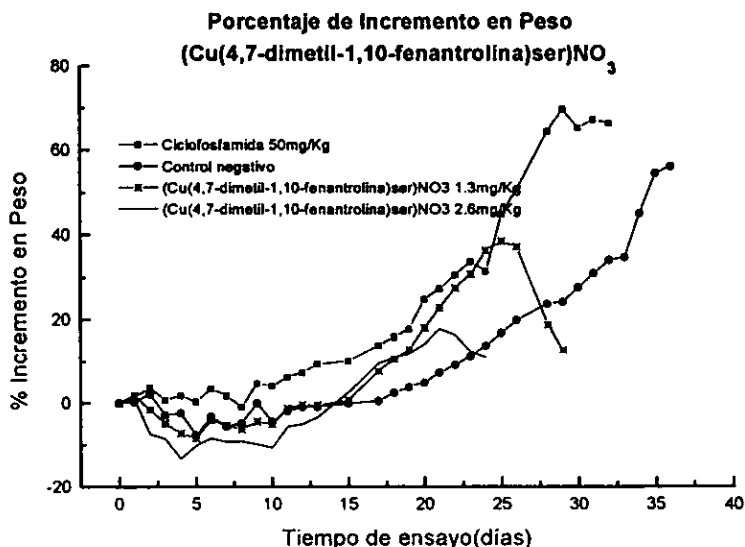
El valor de T/C al día 1 en todos los casos es muy cercano a 100 lo cual indica que los grupos son homogéneos en cuanto a peso. A medida que avanza el ensayo, los valores se alejan de 100 y se hacen más pequeños por lo que se infiere que el grupo control negativo está aumentando de peso corporal debido a que el crecimiento tumoral es más rápido que en el resto de los grupos.

Cabe hacer notar que el valor más pequeño es para el control positivo, lo que indica que de cierta forma que es el grupo en el cual el crecimiento tumoral es más lento. T/C es muy similar para los grupos tratados con Casiopeína a pesar de la diferencia de dosis



## 1.2 Porcentaje de incremento en peso

Gráfica 1



### 1.2.1 Análisis en función del incremento en peso:

Tabla 8. Promedio de %IP y Desviación estándar al día 5 y 15

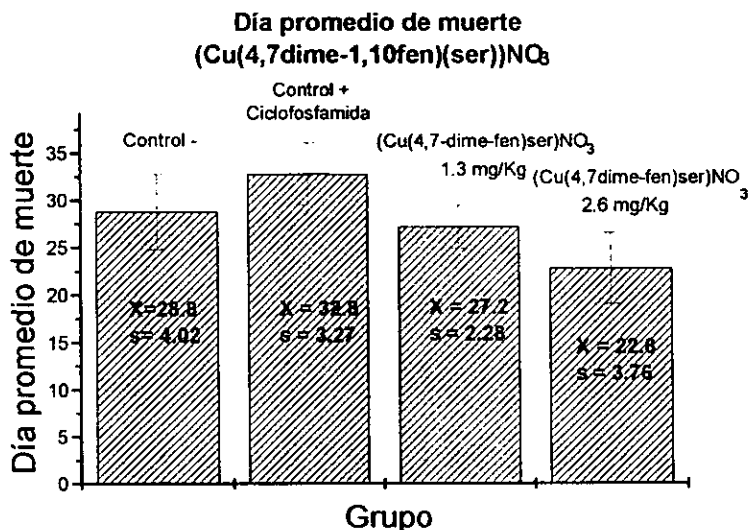
Grupo	Promedio %IP día 5	Desviación estándar	Promedio %IP día 15	Desviación estándar
Control negativo	1.78	2.30	9.93	3.42
Control positivo	-2.40	1.18	-0.18	2.86
[Cu(dime-fen)ser]NO <sub>3</sub> 1.3 mg/Kg	-7.95	2.00	0.64	4.53
[Cu(dime-fen)ser]NO <sub>3</sub> 2.6 mg/Kg	-13.36	2.41	2.89	3.18

La prueba de ANOVA y Tukey aplicada al día 5 revela que en todos los casos las diferencias entre las medias se consideran significativas, lo cual quiere decir que cada tratamiento esta provocando un efecto característico en el crecimiento tumoral que es observable aún en fechas tan tempranas como lo es el día 5.

Para el día 15 de evaluación las diferencias entre las medias de %IP son significativas en todos los casos, excepto en la comparación entre el control positivo y la Casiopeína a la dosis de 1.3 mg/Kg; ambos grupos reportan un porcentaje de incremento en peso muy cercano a cero, sin embargo, se observa (gráfica 1) que a partir del día 15 el peso corporal de los grupos tratados con casiopeína se eleva rápidamente incluso por encima del control negativo.

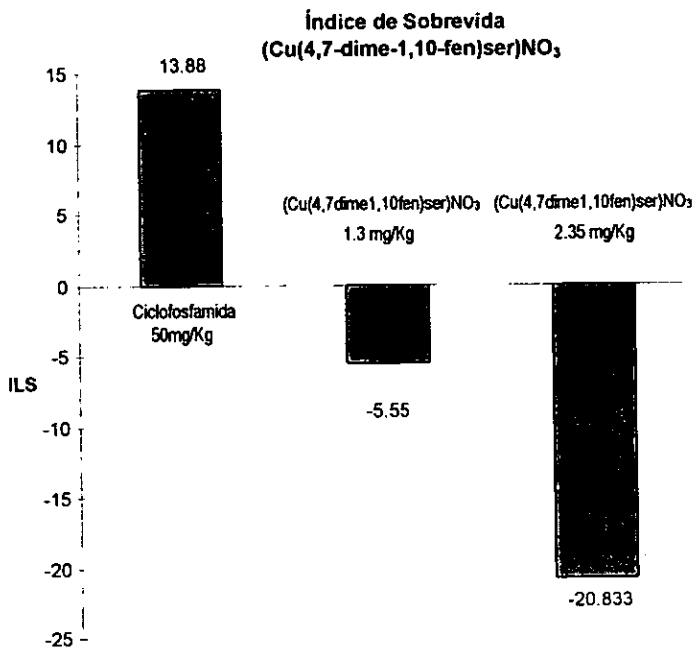
### 1.3 Índice de sobrevida

Gráfica 2



La gráfica 2 muestra que existen diferencias en la fecha promedio de muerte de los diferentes grupos, así mismo, se observa que las desviaciones estándar para estos promedios son pequeñas, lo cual da confiabilidad a la evaluación. Con base en estos datos se calcula el índice de sobrevivida (ILS) para cada grupo, los cuales se reportan en la gráfica 3.

Gráfica 3



Los grupos que recibieron tratamiento con Casiopeína presentan sobrevividas negativas proporcionales a la dosis. Pensamos que este efecto se presenta debido a toxicidad crónica del compuesto. La comparación de las sobrevividas a través de el análisis de Logrank revela que no existe evidencia estadística para afirmar que la Casiopeína produce sobrevividas superiores a la de los animales no tratados.

Pensamos que se están presentando efectos tóxicos, lo cual implica que, en caso de que el compuesto tenga cierta actividad como antitumoral, esta se ve opacada por su toxicidad a las dosis evaluadas.

## 2 [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]

### 2.1 T/C calculado en peso al día 1,5 y 11

Tabla 9 T/C calculado par los días 1,5 y 11

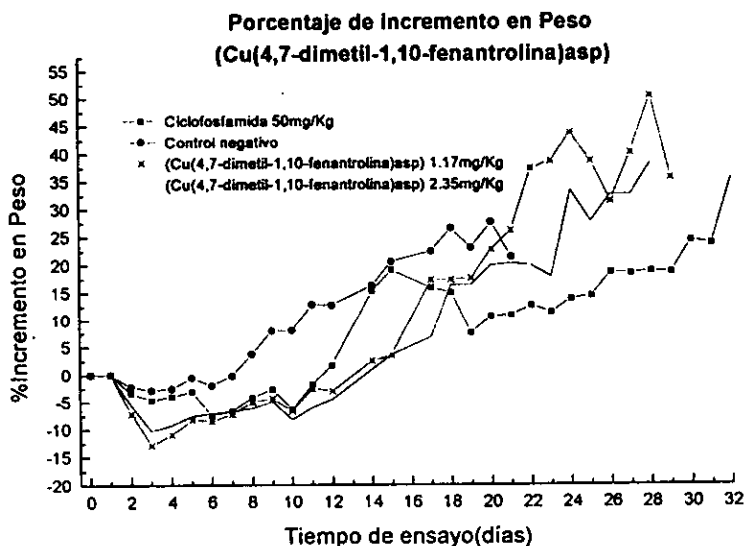
Día de evaluación	Control positivo	[Cu(dime-fen)asp] 1.17 mg/Kg	[Cu(dime-fen)asp] 2.35 mg/Kg
1	100.93	95.38	95.89
5	99.41	87.20	89.35
11	87.45	82.45	81.52

Nuevamente observamos que los valores T/C para el día 1 son cercanos a  $100 \pm 5\%$ , lo cual nos habla de que los grupos son homogéneos en cuanto a peso al inicio del experimento; esta condición es fundamental para considerar que el experimento es confiable, ya que parte del seguimiento del desarrollo tumoral, y en consecuencia de la evaluación de actividad antiantineoplásica, esta basada en la relación existente entre el crecimiento tumoral y el incremento de peso corporal.

Conforme el ensayo avanza los valores T/C van decreciendo, lo cual es interpretable como un aumento en peso de mayor proporción en el grupo control negativo, debido a un desarrollo tumoral más rápido. Los valores más bajos son los que presentan los grupos tratados con Casiopeína.

## 2.2 Porcentaje de incremento en peso

Gráfica 4



### 2.2.1 Análisis en función del incremento en peso

Tabla 10. Promedio de %IP y Desviación estándar al día 5 y 15.

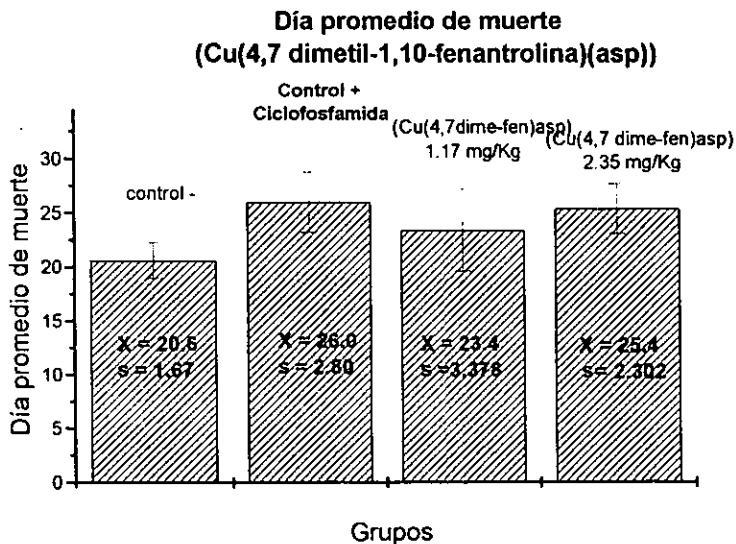
Grupo	Promedio %IP al día 5	Desviación estándar	Promedio %IP al día 15	Desviación estándar
Control negativo	-2.79	0.60	23.12	5.17
Control positivo	-4.70	2.39	14.80	3.95
[Cu(dime-fen)asp] 1.17 mg/Kg	-12.84	3.02	3.48	11
[Cu(dime-fen)asp] 2.35 mg/Kg	-10.22	2.55	3.60	4

Al día 5 existe un decremento acentuado en el peso corporal promedio de los grupos tratados con Casiopeína; las pruebas estadísticas (apéndice IV) indican que son superiores a los decrementos de los grupos controles. Atribuimos estas diferencias a la toxicidad del compuesto, ya que durante el periodo de administración los animales pertenecientes a los grupos administrados con Casiopeína presentaron decaimiento y falta de apetito, a lo cual puede atribuirse el descenso en el peso corporal.

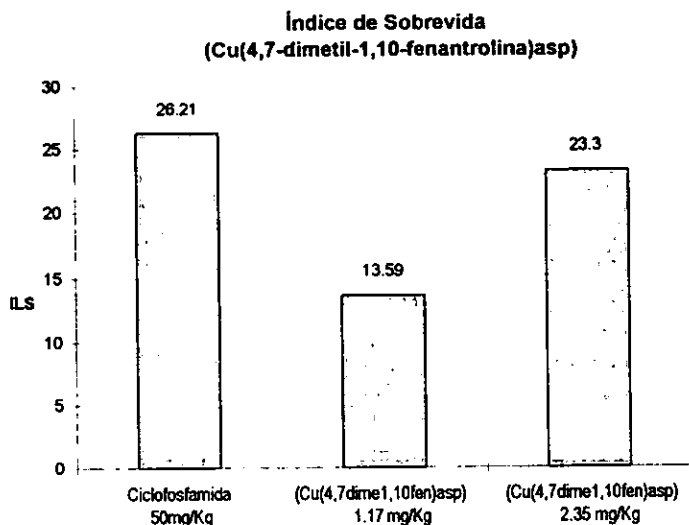
Mientras el ensayo avanza las diferencias entre los grupos control positivo y negativo se manifiestan. Para el día 15 las diferencias entre las medias de cada grupo control y las medias de los grupos tratados con Casiopeína se consideran significativas, sin embargo, no existe evidencia estadística para afirmar que la variación promedio del peso corporal de los grupos tratados con Casiopeína son diferentes entre sí. El incremento en peso de los grupos tratados con Casiopeína es muy pequeño para esta fecha.

### 2.3 Índice de sobrevivida

Gráfica 5



Gráfica 6



A pesar de que se obtuvieron buenos índices de sobrevida para ambas dosis de [Cu(4,7-dime-fen)asp] (ver gráfica 6), estadísticamente la diferencia del índice de sobrevida del grupo tratado con la dosis de 1.17 mg/Kg y la correspondiente al control negativo no es significativa; por el contrario la dosis de 2.35 mg/Kg sí presenta sobrevida diferente con respecto a los dos grupos controles.

En la gráfica 6 puede apreciarse que existe una relación directamente proporcional entre el incremento de sobrevida y el incremento de la dosis de Casiopeína administrada, lo cual sugiere la evaluación posterior de una dosis un poco más alta

### 3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO<sub>3</sub>

#### 3.1 T/C calculado en Peso al día 1,5 y 11

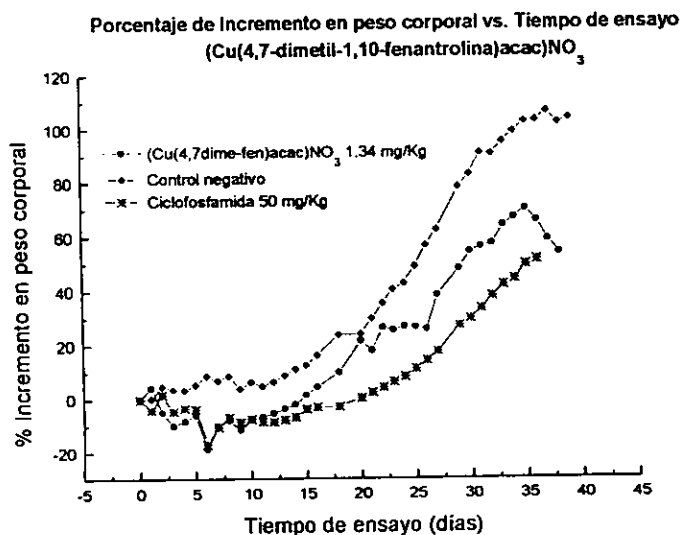
Tabla 11 T/C calculado par los días 1,5 y 11

Día de evaluación	Control positivo	[Cu(dime-fen)acac]NO <sub>3</sub> 1.34 mg/Kg
1	104.6	103.7
5	98.24	97.43
11	91.06	94.87

Los grupos son homogéneos al inicio del experimento. Conforme avanza el ensayo los valores decrecen, indicando que el aumento de peso en el grupo control negativo es mayor que en los grupos restantes, así mismo el incremento de peso es mayor en el grupo tratado con casiopeína que en el grupo control positivo.

#### 3.2 Porcentaje de incremento en peso

Gráfica 7





En esta gráfica puede observarse que el incremento de peso es más rápido en el grupo control negativo que en los otros dos grupos. Así mismo se registra decrementos en el peso corporal promedio de los grupos tratados durante el periodo de administración (los primeros nueve días); posterior a esta fecha los grupos comienzan a incrementar su peso corporal, siendo más rápido en el grupo tratado con [Cu(4,7-dime-fen)acac]NO<sub>3</sub>

### 3.2.1 Análisis en función del incremento en peso

Tabla 12. Promedio de %IP y desviación estándar al día 5 y 15.

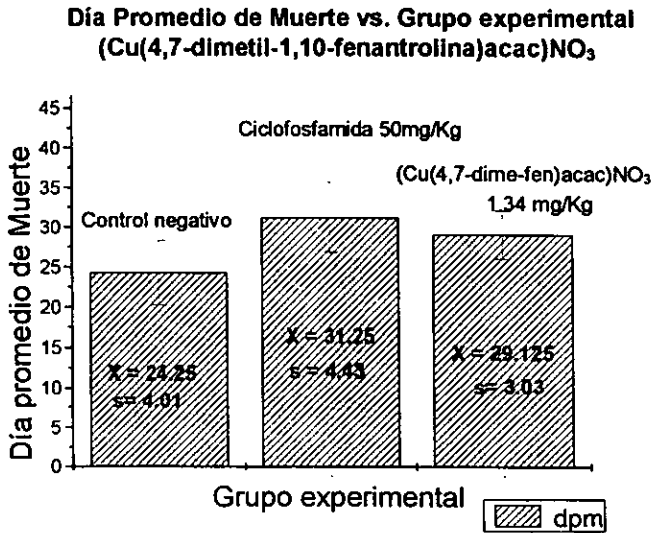
Grupo	Promedio %IP al día 5	Desviación estándar	Promedio %IP al día 15	Desviación estándar
Control negativo	3.22	2.01	11.71	5.17
Control positivo	-3.38	1.81	-6.88	1.25
[Cu(4,7-dime-fen)acac]NO <sub>3</sub> 1.34 mg/Kg	-8.26	2.85	-2.53	2.19

Las prueba estadística ANOVA y la de Tukey realizadas en función del incremento en peso permiten afirmar que existe evidencia suficiente para considerar que las variaciones de peso corporal son características para cada grupo, lo cual indica que el desarrollo tumoral se llevó a cabo con diferente velocidad en cada uno.

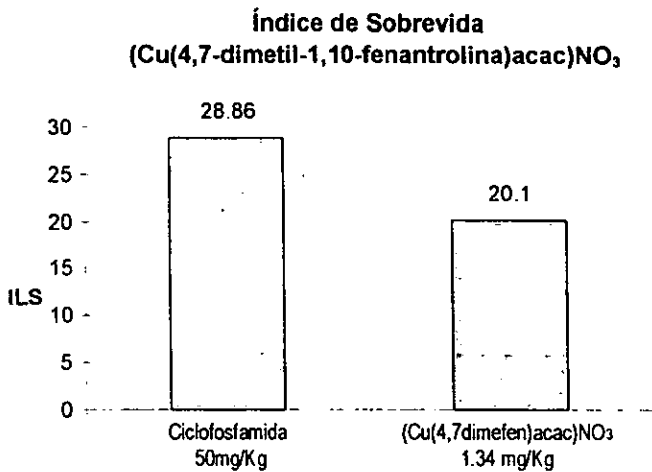
Por otra parte, cabe hacer notar que al día 15 ninguno de los dos grupos tratados ha recuperado totalmente su peso inicial, sin embargo, el incremento de peso corporal fue más rápido en el grupo tratado con Casiopeína.

3.3 Índice de sobrevida

Gráfica 8



Gráfica 9



El índice de sobrevida (ILS) es bueno tanto para el grupo control positivo como para el grupo tratado, existe evidencia estadística para considerar estos resultados diferentes al periodo de vida de el control negativo (Apéndice IV); sin embargo el valor de ILS experimental para el grupo tratado con  $[\text{Cu}(4,7\text{-dime-fen})\text{salal}]\text{NO}_3$  (20.1 %) no es suficiente para que este compuesto pase a la siguiente etapa de evaluación ya que es necesario un valor mayor o igual a 20 % en esta línea tumoral.

#### 4. $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})\text{salal}]\text{NO}_3$

##### 4.1 T/C calculado en Peso al día 1,5 y 11

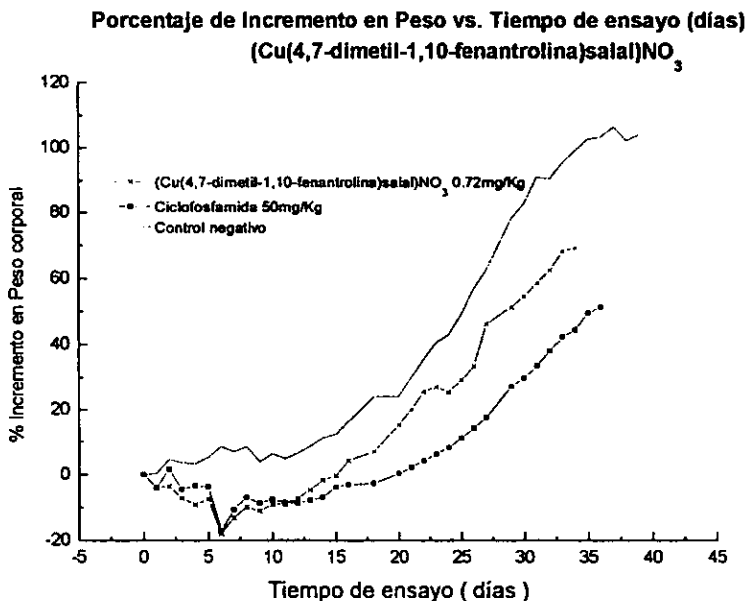
Tabla 13 T/C calculado par los días 1,5 y 11

Día de evaluación	Control positivo	$[\text{Cu}(\text{dime-fen})\text{salal}]\text{NO}_3$ 0.72 mg/Kg
1	104.6	103.09
5	98.24	99.39
11	91.06	96.55

El índice T/C al día 1 demuestra que existe homegenicidad en el peso corporal de los individuos de experimentación. Se observa la misma tendencia que en casos anteriores, esto es, el índice decrece conforme aumenta la fecha de evaluación debido a que el crecimiento tumoral y por tanto el incremento de peso es mayor y más rápido en el grupo control negativo que en el resto.

## 4.2 Porcentaje de Incremento en peso

Gráfica 10



Se observa en esta evaluación la misma tendencia que en casos anteriores; el peso corporal de los animales que reciben tratamiento con Ciclofosfamida o bien con la Casiopeína evaluada desciende durante los días de administración, posterior al día 9 comienzan a recuperar peso y a incrementarlo de forma más gradual que en el caso de el grupo que no recibe tratamiento alguno. Como se ha venido mencionando la interpretación de esta tendencia deja ver que el desarrollo tumoral en los grupos que reciben cualquiera de los dos tratamientos es menos agresivo.

Así mismo es evidente que el incremento en peso del grupo tratado con [Cu(4,7-dimefenantrolina)sala]NO<sub>3</sub> es más rápido comparado con el grupo control positivo.

## 4.2.1 Análisis en función del incremento en peso

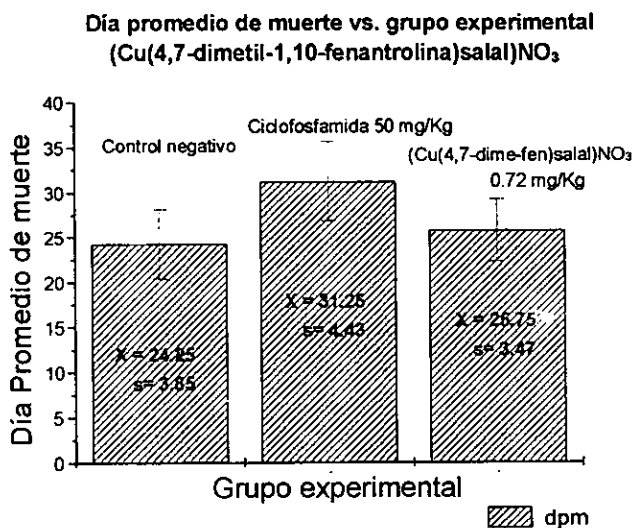
Tabla 14. Promedio de %IP y Desviación estándar al día 5 y 15

Grupo	Promedio %IP al día 5	Desviación estándar	Promedio %IP al día 15	Desviación estándar
Control negativo	3.22	2.01	11.71	2.17
Control positivo	-3.78	1.81	-6.88	1.25
[Cu(4,7-dime-fen)sala]NO <sub>3</sub> 0.72 mg/Kg	-8.16	3.94	-1.80	3.61

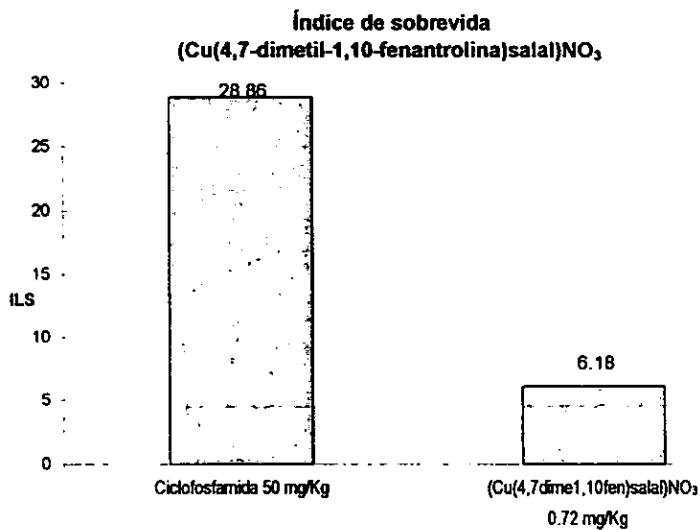
El tratamiento estadístico aplicado a estos resultados revela que al día 15 el incremento en peso de los grupos control positivo y el tratado son similares, por el contrario existe diferencia considerable con respecto al grupo control negativo.

## 4.3 Índice de Sobrevida

Gráfica 11



Gráfica 12



Como se puede observar en la gráfica 12 el índice de sobrevida del grupo experimental tratado con [Cu(4,7-dimetil-1,10-fen)salaI]NO<sub>3</sub> es muy pequeña; por lo que era de esperarse que no existiesen diferencias significativas en cuanto a %ILS entre el grupo control negativo y este grupo experimental, lo cual pudo ser comprobado mediante el análisis estadístico.

5. [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)sala]NO<sub>3</sub>

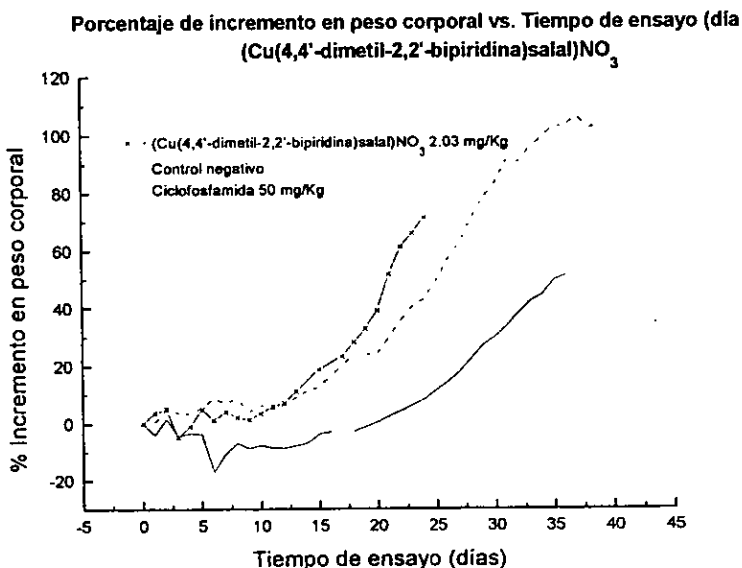
5.1 T/C calculado en peso al día 1, 5 y 11

Tabla 15 T/C calculado par los días 1,5 y 11

Día de evaluación	Control positivo	[Cu(4,4'dime-bipy)sala]NO <sub>3</sub> 2.06 mg/Kg
1	104.6	95.01
5	98.24	91.07
11	91.06	92.14

5.2 Porcentaje de Incremento en peso

Gráfica 13



La gráfica muestra que el incremento de peso del grupo control negativo se da de forma semejante que en el grupo tratado con  $[\text{Cu}(4,4'\text{-dime-bipy})\text{salal}]\text{NO}_3$ ; por lo que se infiere que el crecimiento tumoral también es comparable, esta tendencia debe ser comprobada mediante las pruebas estadísticas adecuadas.

### 5.2.1 Análisis en función del incremento en peso

Tabla 16. Promedio de %IP y desviación estándar al día 5 y 15

Grupo	Promedio %IP al día 5	Desviación estándar	Promedio %IP al día 15	Desviación estándar
Control negativo	3.22	2.01	11.71	5.17
Control positivo	-3.38	1.81	-6.88	1.25
$[\text{Cu}(4,4'\text{-dime-bipy})\text{salal}]\text{NO}_3$ 2.06 mg/Kg	-1.09	3.20	11.05	4.50

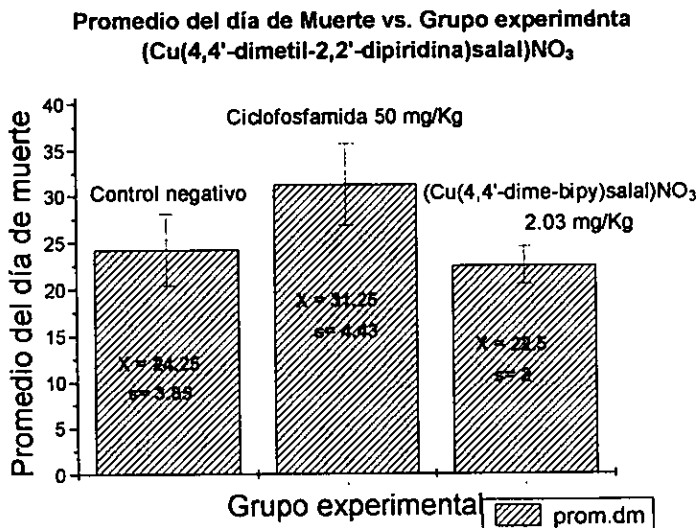
A pesar de haber encontrado similitud de el incremento en peso entre el grupo control positivo y el tratado con Casiopeína; así como diferencia de ambos con respecto al control negativo al día 5 de evaluación, consideramos que hasta ese momento no se pueden hacer diagnósticos fidedignos sobre la eficacia de los tratamientos en el desarrollo tumoral. El decremento de peso registrado tanto por el grupo control positivo como por el grupo tratado con Casiopeína probablemente se debe al stress causado por la administración de los compuestos.

Por otra parte al día 15 de evaluación se encontró que estadísticamente el incremento en peso del grupo control negativo y del tratado con Casiopeína es similar, por lo cual deducimos que el tratamiento no está alterando el desarrollo tumoral en forma notable.

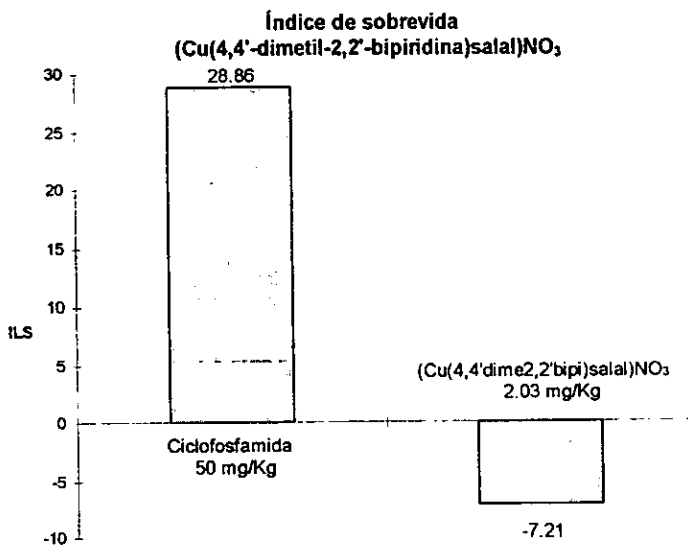


5.3 Índice de Sobrevida

Gráfica 14



Gráfica 15



A pesar de que se obtuvo una sobrevida negativa para el grupo tratado con [Cu(4,4'-dimetil-bipiridina)sala]NO<sub>3</sub> las estadísticas tanto en IP como en ILS indican que no hay diferencias significativas con respecto al grupo control negativo, por lo cual esa sobrevida negativa puede atribuirse al azar y no a la toxicidad del compuesto.

Estas conclusiones estadísticas concuerdan con lo observado en la gráfica 13, en donde el incremento de peso en el grupo que no recibe tratamiento es comparable con el tratado con Casiopeína, lo cual se interpreta como un desarrollo tumoral en ambos grupos con ritmo de crecimiento semejante.

## 6. [Cu(5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina)ser]NO<sub>3</sub>

### 6.1 T/C calculado en peso al día 1, 5 y 11

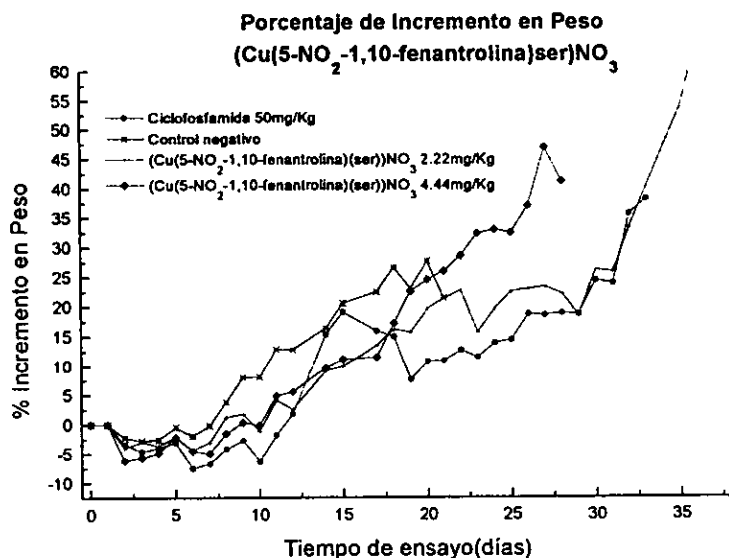
Tabla 17 T/C calculado par los días 1,5 y 11

Día de evaluación	Control positivo	[Cu(5-NO <sub>2</sub> -fen)ser]NO <sub>3</sub> 2.22 mg/Kg	[Cu(5-NO <sub>2</sub> -fen)ser]NO <sub>3</sub> 4.44 mg/Kg
1	100.93	96.61	95.16
5	99.41	96.23	91.86
11	87.45	88.99	87.05

Los valores de T/C al día 1 son cercanos a 100  $\pm$  5% lo cual indica homogeneidad en los grupos. Respecto al resto de los valores para los días 5 y 11 se observa la misma tendencia que ya se ha comentado anteriormente, los valores decrecen al aumentar el tiempo de ensayo debido a que los individuos del control negativo incrementan más rápidamente su peso corporal debido al crecimiento tumoral. Los valores al día 11 son muy simiarses en los tres grupos comparados.

## 6.2 Porcentaje de Incremento en peso

Gráfica 16



### 6.2.1 Análisis en función del incremento en peso

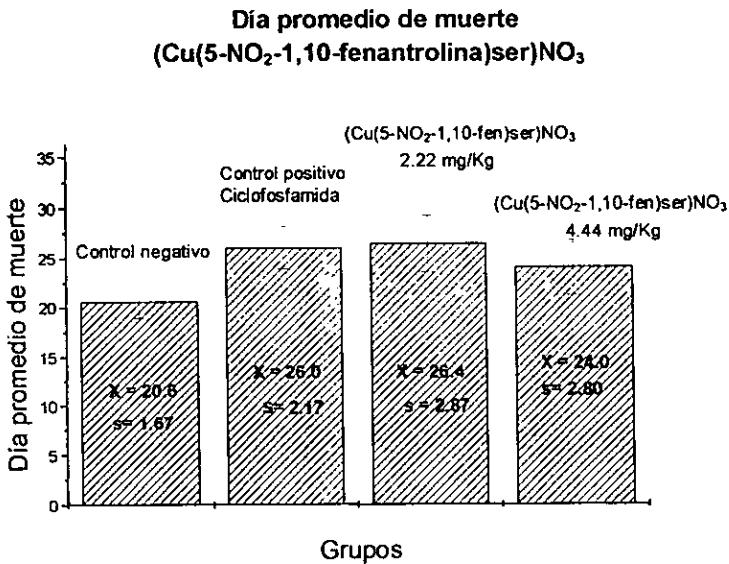
Tabla 18. Promedio de %IP y desviación estándar al día 5 y 15.

Grupo	Promedio %IP al día 5	Desviación estándar	Promedio %IP	Desviación estándar
Control negativo	-2.79	0.60	23.12	5.17
Control positivo	-4.70	2.39	14.80	3.95
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -fen)salal]NO <sub>3</sub> 2.22 mg/Kg	-2.16	1.61	14.64	3.31
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -fen)salal]NO <sub>3</sub> 4.44 mg/Kg	-5.73	1.53	16.06	4.19

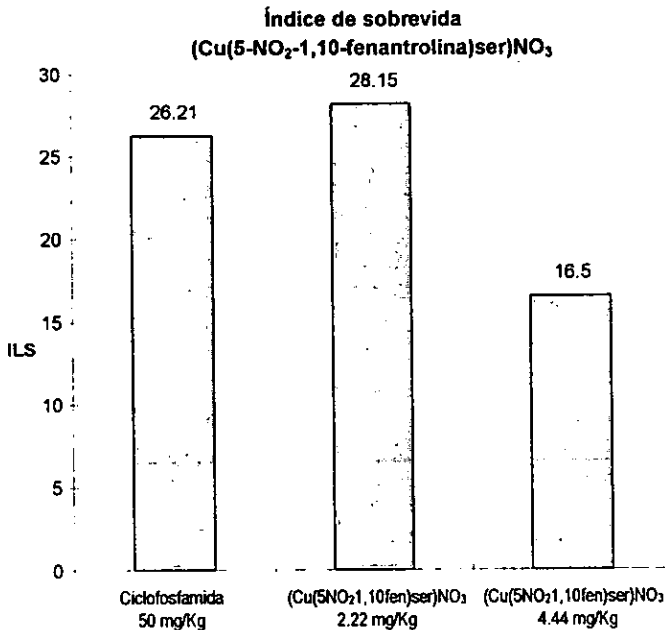
Dado que los resultados de %IP al día 15 de los grupos que reciben tratamiento difieren estadísticamente de aquel que no recibió tratamiento alguno, se infiere entonces que los tratamientos en cierta medida están deteniendo el crecimiento tumoral lo cual, como se observará más adelante, se refleja en los ILS registrados para cada grupo.

### 6.3 Porcentaje de Sobrevida

Gráfica 17



Gráfica 18



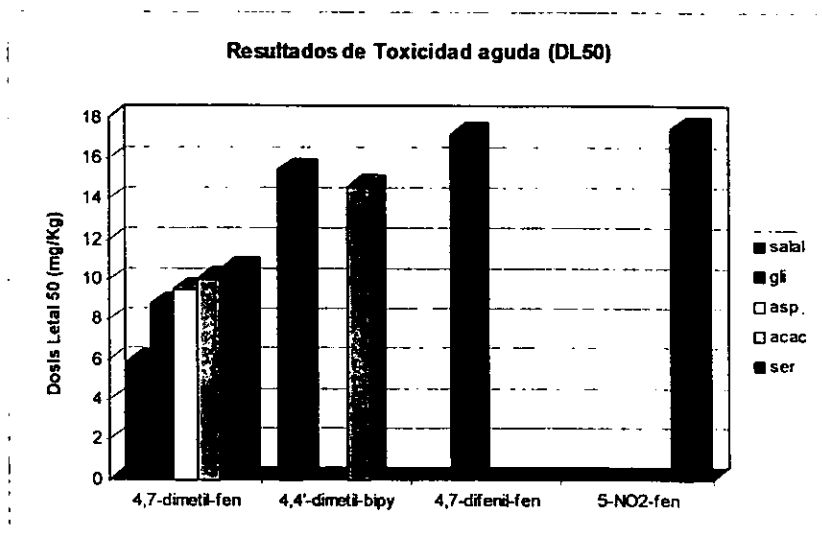
La gráfica 18 muestra que las sobrevidas que se obtuvieron para ambas dosis de Casiopeína son altas. La dosis 2.22 mg/Kg de [Cu(5-NO<sub>2</sub>-fen)ser]NO<sub>3</sub> presentó una sobrevida superior al 25 % requerido por los protocolos internacionales para considerar a una molécula como candidato a pruebas clínicas. Este resultado pudo ser comprobado mediante el análisis estadístico correspondiente (apéndice IV)

## D. Resumen de resultados

Tabla 19 Resumen de resultados de toxicidad aguda en mg/Kg de todas las casiopéinas evaluadas. Los valores que están marcados con un asterisco fueron determinados en estudios previos.

	salal	gli	asp	acac	ser
4,7-dimetil-fen	5.90	8.8*	9.50	10.027	10.52
4,4'-dimetil-bipy	15.44	-	-	14.6*	-
4,7-difenil-fen	-	17.2*	-	-	-
5-NO <sub>2</sub> -fen	-	-	-	-	17.49

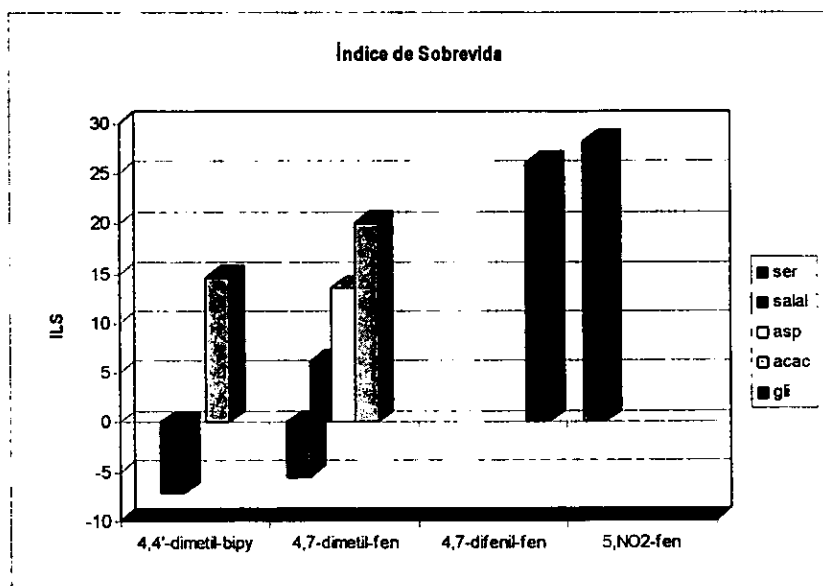
Gráfica 19

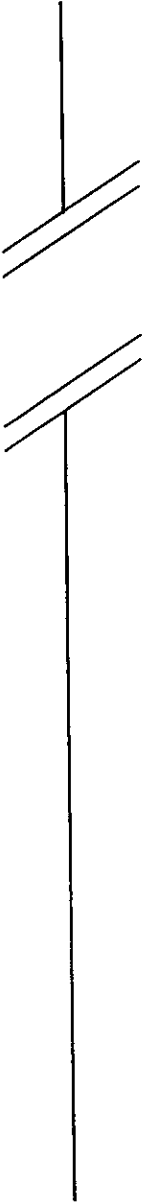


**Tabla 20 Resultados de ILS de la evaluación antineoplásica para un esquema de tratamiento crónico en Melanoma B16 con dosis equivalentes a 1/8 de la DL50. Los valores marcados con un asterisco fueron determinados en estudios previos**

	gli	ser	salal	asp	acac
4,4'-dimetil-bipy	-	-	-7.21	-	14.60*
4,7-dimetil-fen	-	-5.55	6.18	13.59	20.10
4,7-difenil-fen	26*	-	-	-	-
5-NO <sub>2</sub> -fen	-	28.15	-	-	-

**Gráfica 20.**





---

## CAPÍTULO V

---

*Conclusiones*



## V. CONCLUSIONES

Mediante la evaluación antineoplásica se pudo comprobar que esta familia de compuestos tiene actividad antitumoral en diferentes grados según su estructura.

De los seis compuestos evaluados solo dos,  $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})\text{acac}]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(5\text{-NO}_2\text{-1,10-fenantrolina})\text{ser}]\text{NO}_3$ , presentan actividad suficiente para ascender a la siguiente etapa de cernimiento, siendo el  $[\text{Cu}(5\text{-NO}_2\text{-1,10-fenantrolina})\text{ser}]\text{NO}_3$  el más activo.

A pesar de que los cuatro compuestos restantes no registraron la actividad suficiente, debe considerarse el evaluarlos en otros esquemas de tratamiento con diferentes dosis empleando Melanoma B16 y otras líneas Tumorales, ya que se ha visto que a menudo el esquema de tratamiento crónico evaluado en la línea tumoral Melanoma B16 es donde esta familia de compuestos muestra las menores actividades (ver antecedentes y marco teórico).

Por otra parte tomando en cuenta los valores obtenidos tanto en estos ensayos como en estudios previos se encontraron las siguientes relaciones entre la estructura química, su efecto tóxico y su actividad antineoplásica

*Toxicidad aguda:*

- Manteniendo constante en la estructura de el donador por Oxígeno O,O (salal ó acac), y variando el donador por Nitrógeno N,N; se encontró que la apertura del anillo fenantrolínico disminuye la toxicidad, es decir:

Toxicidad de  $[\text{Cu}(4,7\text{-dime-fen})(\text{O},\text{O})]\text{NO}_3 >$  Toxicidad de  $[\text{Cu}(4,4'\text{-dime-bipy})(\text{O},\text{O})]\text{NO}_3$

- Manteniendo constante el donador N,O y variando el donador N,N se encontró que el cambio de los sustituyentes metilo en la fenantrolina por fenilos o bien por un sustituyente NO<sub>2</sub> en la posición 5 implica la disminución de la toxicidad.

Toxicidad: [Cu(4,7-dime-fen)(N,O)]NO<sub>3</sub> > [Cu(4,7-difenil-fen)(N,O)]NO<sub>3</sub> ≈ [Cu(5-NO<sub>2</sub>-fen)(N,O)]NO<sub>3</sub>

- Por el contrario si ahora se mantiene constante el donador N,N (4,7-dime-fen) y se varían los donadores N,O se encuentra que la toxicidad es similar en todos los casos.
- Nuevamente manteniendo constante el donador N,N y variando el donador O,O, se encontró que la toxicidad de la estructura que contiene salal es mucho mayor en comparación a la que contiene acac; este hecho se atribuye a que la estructura del primer compuesto es mucho más planar. Por tanto:

Toxicidad [Cu(N,N)(gli)]NO<sub>3</sub> ≈ [Cu(N,N)(ser)]NO<sub>3</sub> ≈ [Cu(N,N)(asp)]NO<sub>3</sub> ≈ [Cu(N,N)(acac)]NO<sub>3</sub> <<< [Cu(N,N)(salal)]NO<sub>3</sub>

Donde: N,N = 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina.

#### *Actividad antineoplásica:*

- Para el mismo donador N,N (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina):

Actividad antineoplásica: [Cu(N,N)(ser)]NO<sub>3</sub> < [Cu(N,N)(salal)]NO<sub>3</sub> < [Cu(N,N)(asp)]NO<sub>3</sub> < [Cu(N,N)(acac)]NO<sub>3</sub>

- Para el mismo donador N,O (serina):

Actividad antineoplásica: [Cu(4,7-dime-fen)(N,O)]NO<sub>3</sub> <<< [Cu(5-NO<sub>2</sub>-fen)(N,O)]

- Para el mismo donador O,O (acac ó salal)

Actividad antineoplásica:  $[\text{Cu}(4,4'\text{-dime-bipy})(\text{O},\text{O})]\text{NO}_3 < [\text{Cu}(4,7\text{-dime-fen})(\text{N},\text{O})]\text{NO}_3$

*Relación actividad SOD y actividad antineoplásica:*

Se encontró que las tendencias de actividad antineoplásica entre los compuestos se conservan de forma similar a lo observado en su actividad SOD

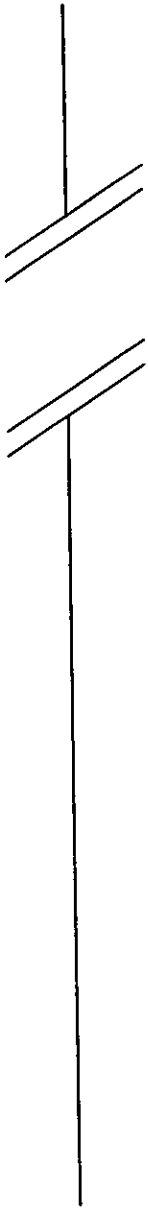
$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{ser})]\text{NO}_3 < [\text{Cu}(5\text{-NO}_2\text{-1,10-fenantrolina})(\text{ser})]\text{NO}_3$

$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{ser})]\text{NO}_3 < [\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{asp})]\text{NO}_3$

Con base en estas observaciones se pueden hacer predicciones para optimizar las estructuras eligiendo las menos tóxicas y las más activas, y de esta forma plantear nuevas hipótesis de trabajo.

Dado que la toxicidad de las Casiopeínas esta regida aparentemente por el donador N,N; se debe encaminar las evaluaciones hacia las moléculas que contengan 5-NO<sub>2</sub>-fenantrolina en su estructura ya que estas presentan como ventajas el ser las menos tóxicas y las más activas. Así mismo sugiero la elección de acetilacetato como segundo ligante por presentar las mejores sobrevidas de los compuestos evaluados.

Respecto a la relación entre la actividad SOD y la actividad antineoplásica de estos compuestos considero necesario para establecer relaciones más confiables evaluar antineoplásicamente más compuestos.



---

# APÉNDICE I

---

*Espéctros Uv-Vis.*

Espectro Uv-vis 1. (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser)NO<sub>3</sub>

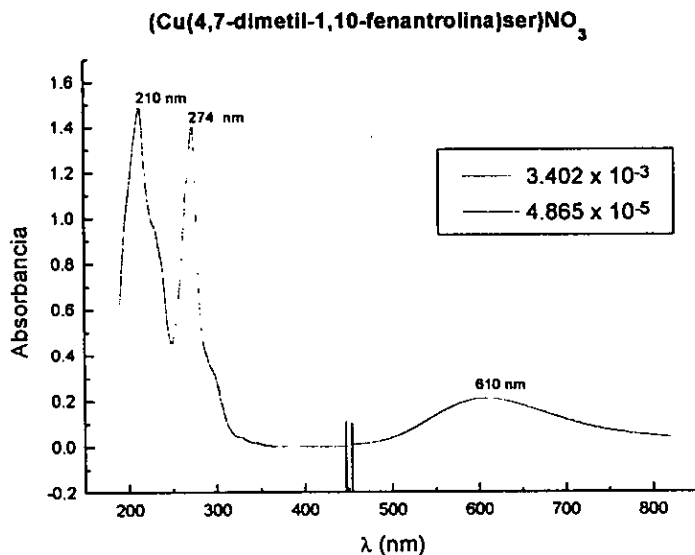


Tabla No. 1. (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser)NO<sub>3</sub>

Longitud de onda	Coficiente de absortividad	Datos de la Regresión Lineal
210	29884.59 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A=0.09219 B=29884.59 R=0.99998
274	30384.59 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A= 0.03516 B= 30384.59 R= 0.99822
594	60.75210 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A=-0.01263 B=60.75210 R= 0.99991

Espectro Uv-vis 2. (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp)

(Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp)

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

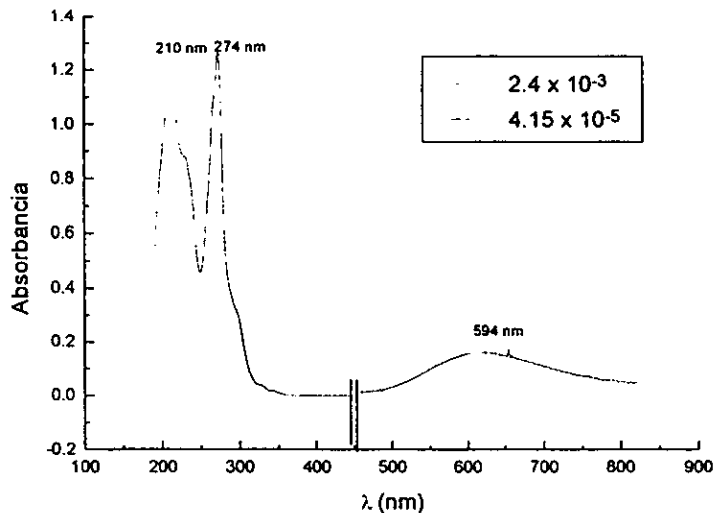


Tabla No. 2. (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp)

Longitud de onda	Coefficiente de absortividad	Datos de la Regresión Lineal
210	29884.59 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A=0.09219 B=29884.59 R=0.99998
274	30384.59 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A= 0.03516 B= 30384.59 R= 0.99822
594	60.75210 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A=-0.01263 B=60.75210 R= 0.99991

Espectro Uv-vis 3. (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acetilacetionato)NO<sub>3</sub>

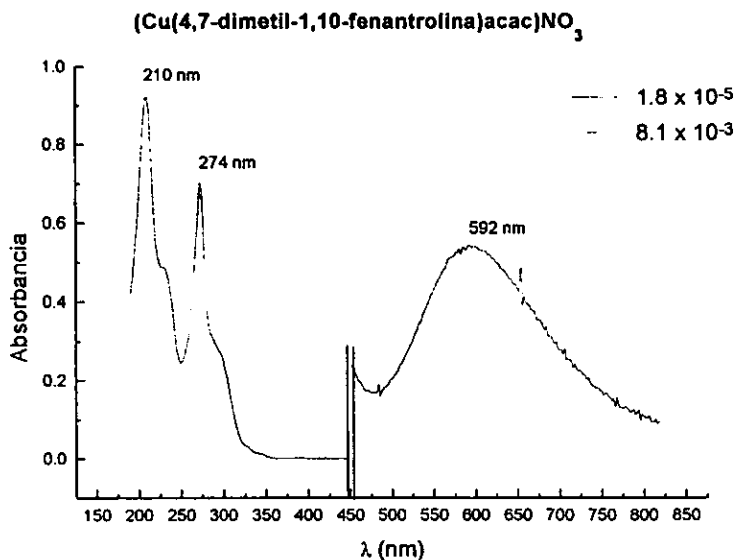


Tabla No. 3. (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acetilacetionato)NO<sub>3</sub>

Longitud de onda	Coefficiente de absortividad	Datos de la Regresión Lineal
210	44867.836 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A=0.09519 B=44867.836 R=0.99898
274	35395.139 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A= 0.04916 B= 35395.13 R= 0.99922
592	68.71698 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A=-0.01263 B=68.71698 R= 0.99991

Espectro Uv-vis. 4. (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)salicilaldehido)NO<sub>3</sub>

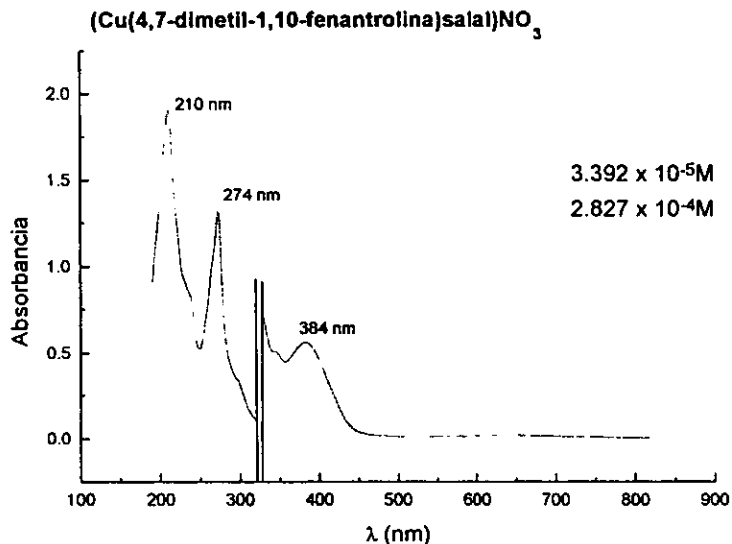


Tabla No. 4 (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)salicilaldehido)NO<sub>3</sub>

Longitud de onda	Coefficiente de absortividad	Datos de la Regresión Lineal
210	34030.946 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A= 0.69001 B= 34030.94 R= 0.99002
274	32631.740 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A = 0.14055 B= 32631.74 R= 0.99301
384	2067.4742 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A= -0.03652 B=2067.474 R= 0.99971



Espectro Uv-vis. 5: (Cu(4,4-dimetil-2,2-bipiridina)(salicilaldehido))NO<sub>3</sub>

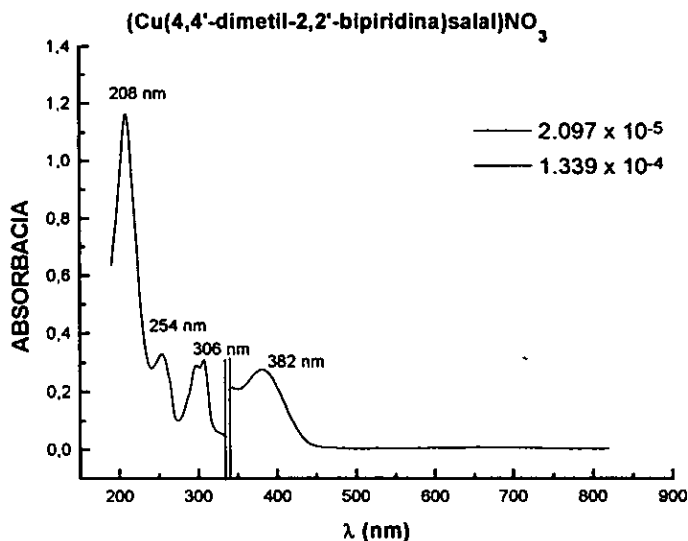


Tabla No. 5: (Cu(4,4-dimetil-2,2-bipiridina)(salicilaldehido))NO<sub>3</sub>

Longitud de onda	Coefficiente de absorptividad	Datos de la Regresión Lineal
208	47960.868 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A= 0.10277 B= 47960.868 R=0.99676
254	16148.156 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A= 0.00299 B= 16148.156 R= 0.99014
298	14517.037 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A= 0.0023 B= 14517.037 R= 0.98706
306	15142.036 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A=0.00347 B=15142.036 R= 0.98712
382	2672,482 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A=-0,05915 B=2672,48174 R=0,99869

Espectro Uv-vis 6. (Cu(5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina)serinato)NO<sub>3</sub>

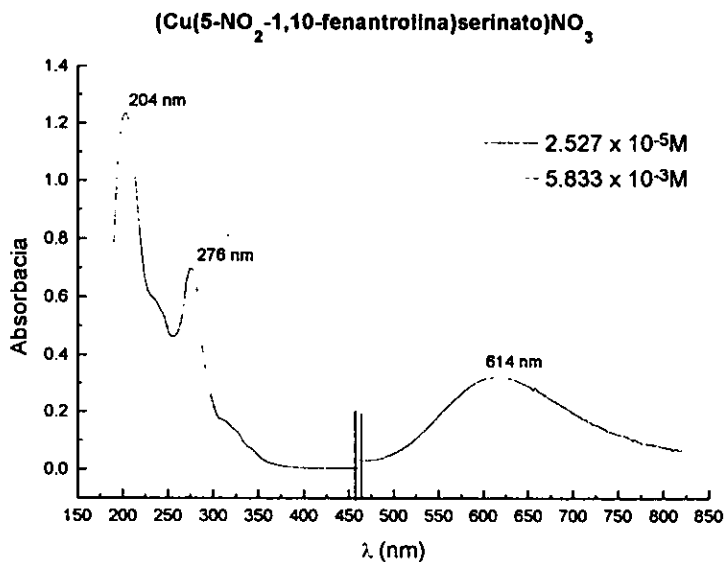
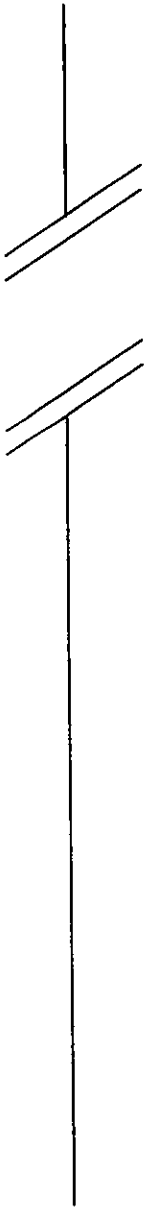


Tabla 6. (Cu(5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina)serinato)NO<sub>3</sub>

Longitud de onda	Coefficiente de absorptividad	Datos de la Regresión Lineal
204 nm	48852.78 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A=0.00032 B= 48852.78 R=0.9989
276 nm	27645.03 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A= 4.5 x 10 <sup>-5</sup> B= 27645.03 R=0.9997
614 nm	54.01925 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	A=0.00722 B=54.01925 R=0.9999



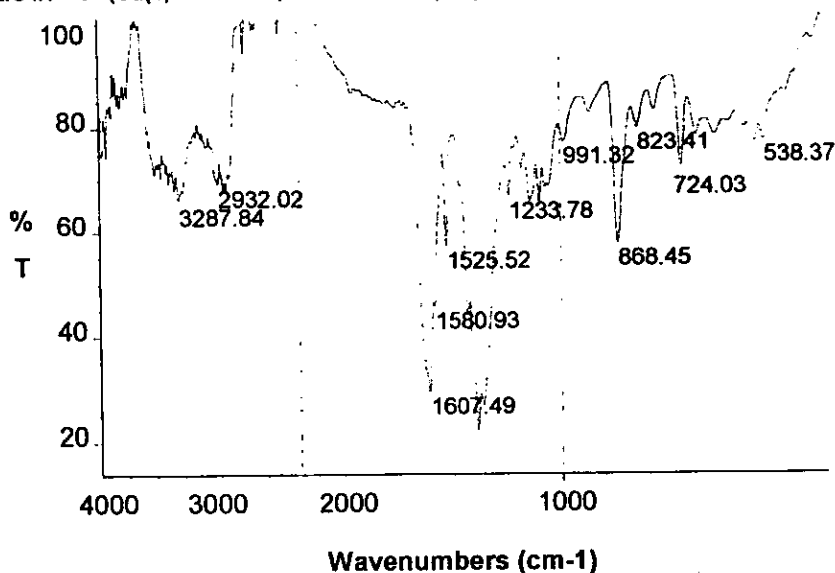
---

## APÉNDICE II

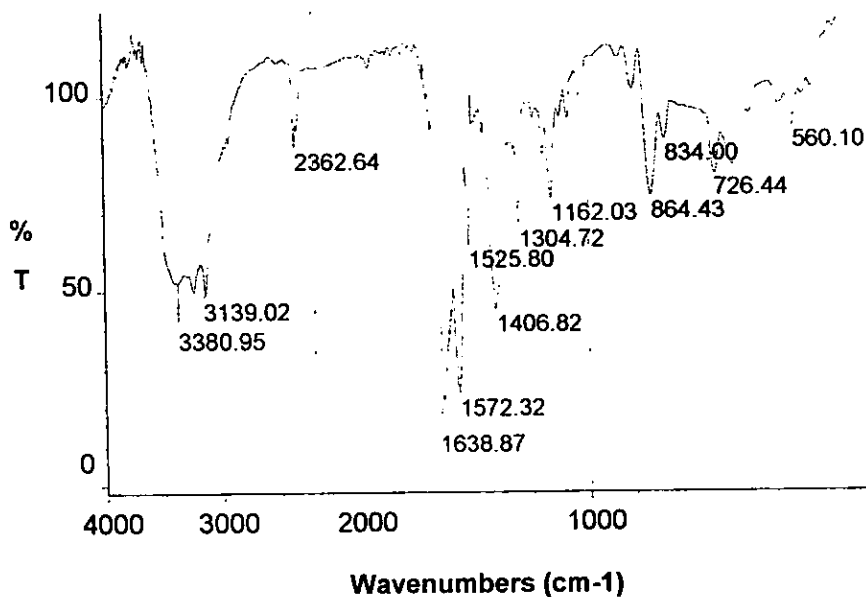
---

*Espéctros IR*

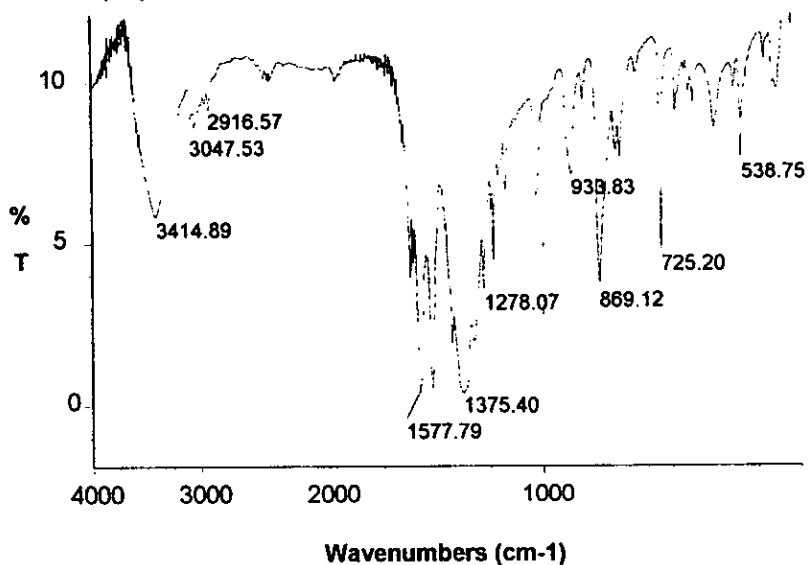
Espectro IR - 1 (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser)NO<sub>3</sub>



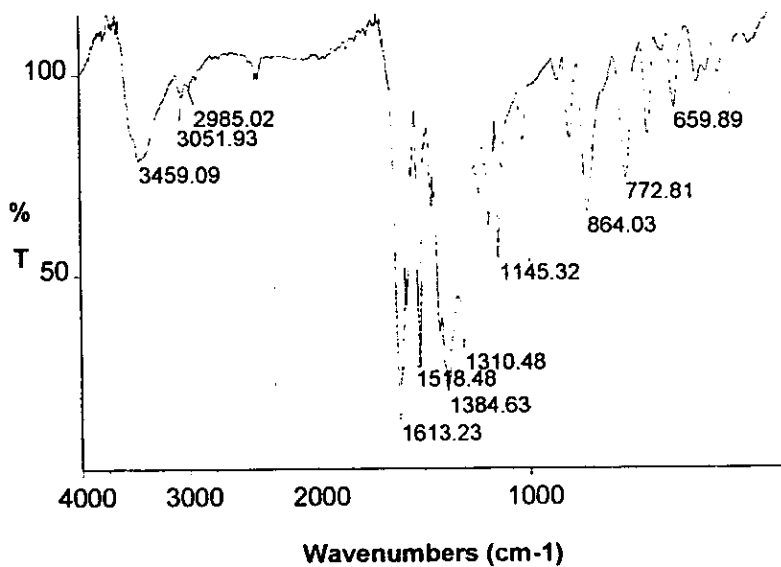
Espectro IR - 2 (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp)



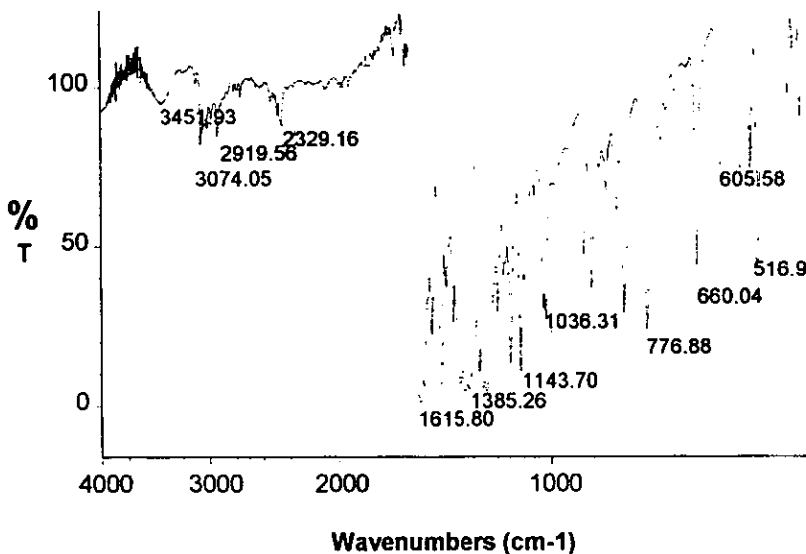
Espectro IR - 3 (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac)NO<sub>3</sub>



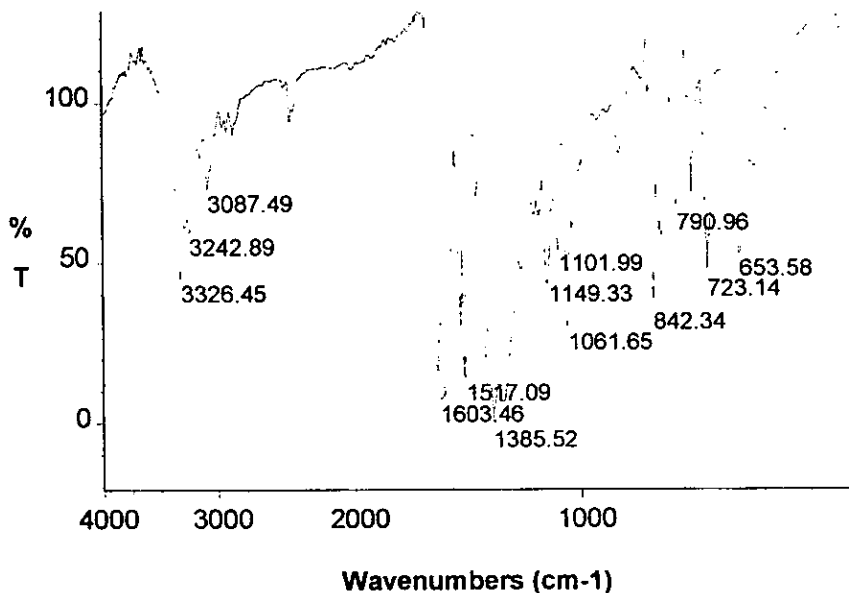
Espectro IR - 4 (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)sala)NO<sub>3</sub>



Espectro IR - 5 (Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)salat)NO<sub>3</sub>



Espectro IR - 1 (Cu(5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina)ser)NO<sub>3</sub>





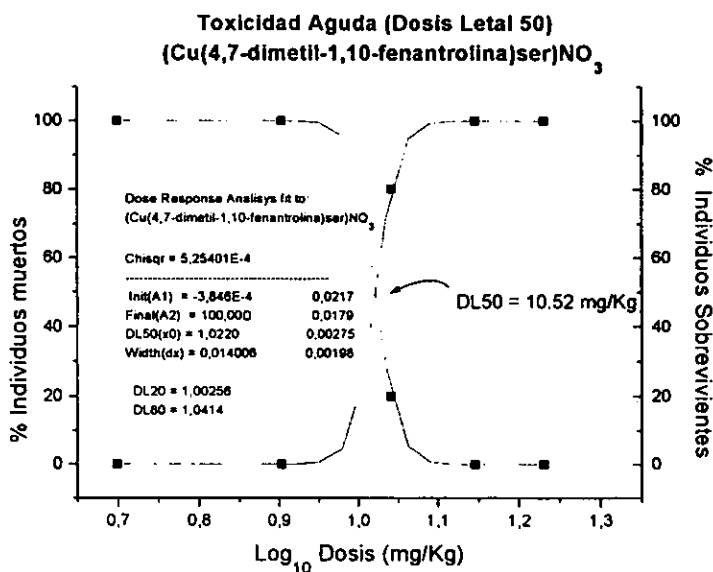
---

## APÉNDICE III

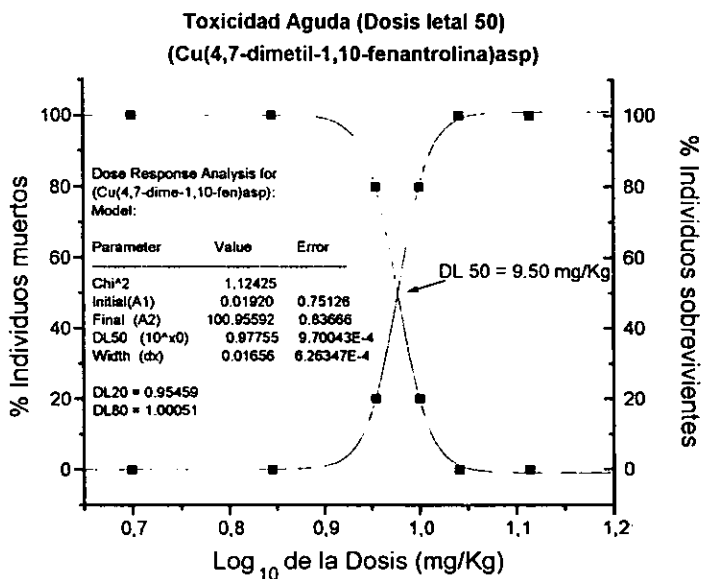
---

*Dosis Letal 50*

Gráfica 1

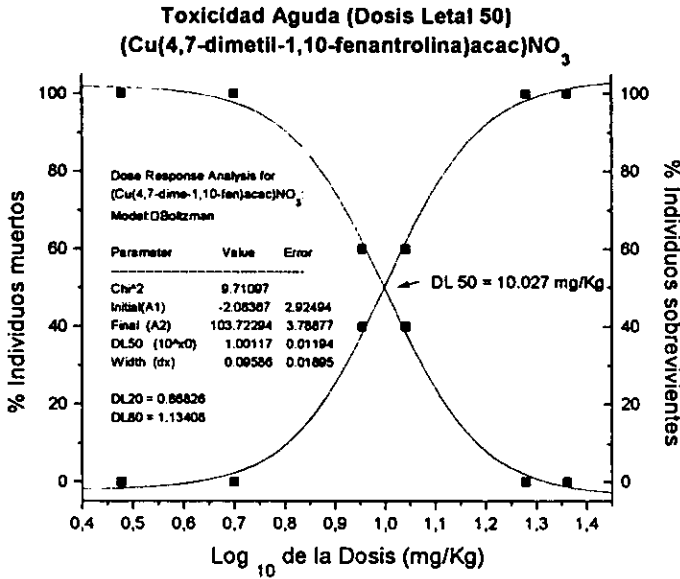


Gráfica 2

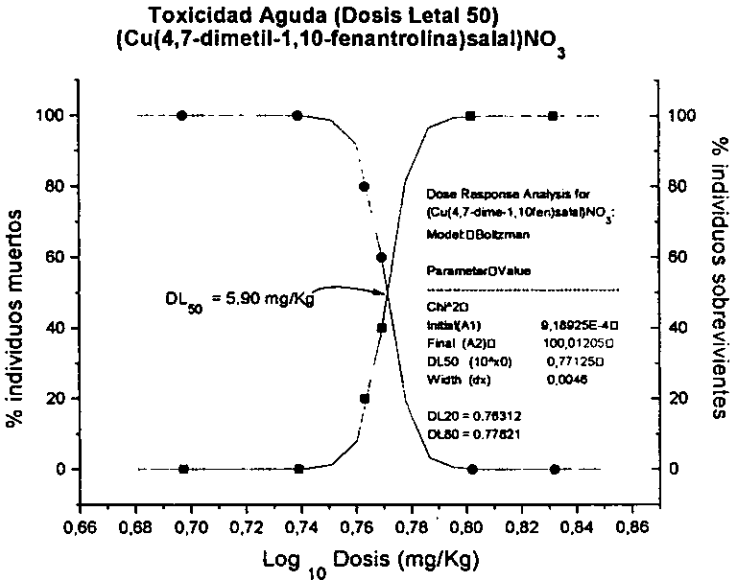




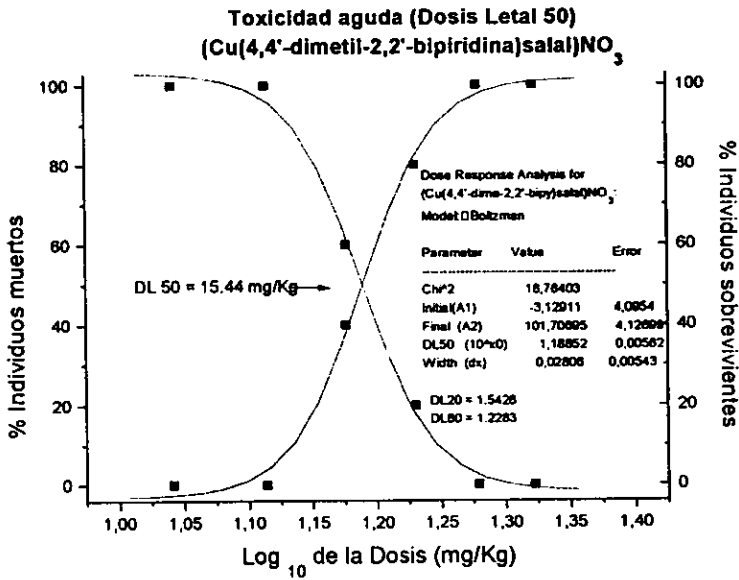
Gráfica 3



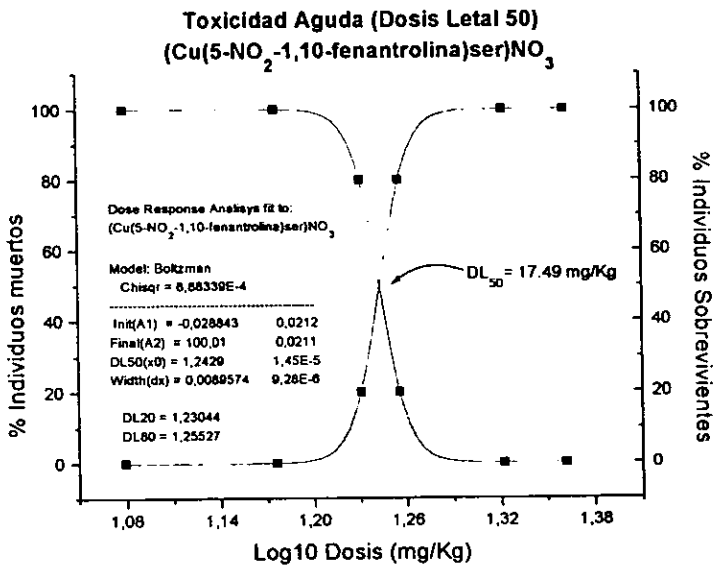
Gráfica 4

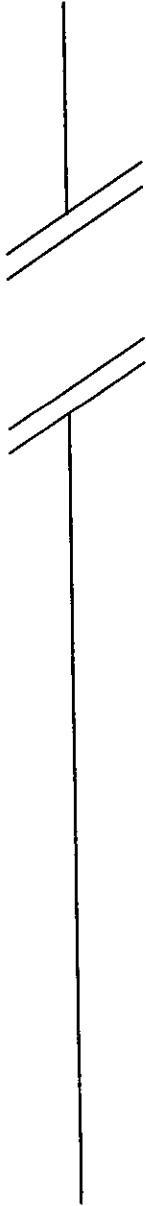


Gráfica 5



Gráfica 6





---

## APÉNDICE IV

---

*Estadística*

**1.0 [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)ser]NO<sub>3</sub>**

**1.1 Análisis estadístico en función del incremento en peso.**

*1.1.1 Análisis al día 5*

**Tabla 1. ANOVA al día 5.**

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	651.27	3	217.09	52.71
Error	65.9	16	4.12	
Total	717.17	19		

$F_{0.995,(3,16)} = 6.30$

F calculada (52.71) > 6.30

Existen diferencias significativas de %IP entre los grupos.

Con base en estos resultados se realiza la prueba de Tukey.

**Tabla 2 Valor absoluto de la diferencia entre las medias de %IP de cada grupo al día 5.**

	X <sub>cn</sub>	X <sub>cp</sub>	X <sub>1.3 mg/Kg</sub>	X <sub>2.6 mg/Kg</sub>
X <sub>cn</sub>	-	4.18	9.73	15.14
X <sub>cp</sub>	-	-	5.55	10.96
X <sub>1.3 mg/Kg</sub>	-	-	-	5.41
X <sub>2.6 mg/Kg</sub>	-	-	-	-

DVS<sub>0.95,(4,21)} = 3.59</sub>

En todos los casos las diferencias entre las medias se consideran significativas.

1.1.2 Análisis al día 15

Tabla 3. ANOVA al día 15.

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	316.56	3	105.52	7.80
Error	216.58	16	13.54	
Total	533.14	19		

$F_{0.995,(3,16)} = 6.30$

F calculada (7.80) > 6.30

Existen diferencias significativas de %IP entre los grupos.

Con base en estos resultados se realiza la prueba de Tukey:

Tabla 4 Valor absoluto de la diferencia entre las medias de %IP de cada grupo al día 15.

	X <sub>cn</sub>	X <sub>cp</sub>	X <sub>1.3 mg/Kg</sub>	X <sub>2.6 mg/Kg</sub>
X <sub>cn</sub>	-	10.11	9.29	7.04
X <sub>cp</sub>	-	-	0.82	3.07
X <sub>1.3 mg/Kg</sub>	-	-	-	2.25
X <sub>2.6 mg/Kg</sub>	-	-	-	-

DVS<sub>0.95,(4,21)} = 1.64</sub>

Las diferencias entre las medias de %IP son significativas en todos los casos, excepto en la comparación entre el control positivo y la Casiopeina a la dosis de 1.3 mg/Kg.

1.2 Análisis estadístico en función de Sobrevida (Logrank)

Tabla 5 Resumen de el análisis de logrank. Solamente aparecen los días en que ocurrió algún evento. CN= Control negativo; CP= Control positivo; A = (Cu(dimetil-fen)ser)NO<sub>3</sub> 1.3 mg/Kg y B= (Cu(dimetil-fen)ser)NO<sub>3</sub> 2.6 mg/Kg

t	Ind.totales	evento	e	r	CN	CP	A	B	PCN	PCP	PA	PB
0	20	1	0	20	5	5	5	5	0.25	0.25	0.25	0.25
17	19	2	1	19	5	5	5	4	0.5263	0.5263	0.5263	0.4211
23	17	2	3	17	5	5	5	2	0.5882	0.5882	0.5882	0.2352
24	15	2	5	15	4	5	4	2	0.5333	0.6666	0.5333	0.2667
25	13	1	7	13	3	5	4	1	0.2308	0.3846	0.3077	0.0769
26	12	1	8	12	3	5	3	1	0.2500	0.4167	0.25	0.0833
27	11	3	9	11	3	4	3	0	0.8181	1.0909	0.8181	0
28	8	1	12	8	3	4	1	0	0.375	0.5	0.125	0
30	7	2	13	7	3	4	0	0	0.8571	1.1429	0	0
31	5	1	15	5	1	4	0	0	0.2	0.8	0	0
32	4	2	16	4	1	3	0	0	0.5	1.5	0	0
33	2	1	18	2	0	2	0	0	0	1.0	0	0
34	1	1	19	1	0	1	0	0	0	1.0	0	0
37	0		20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\Sigma=$									5.1288	9.8662	3.3986	1.3332
											$\Sigma$ total	19.7268

Se procede ahora a realizar la prueba de  $\chi^2$

$$\chi^2 \text{ calculada} = 14.9523 > \chi^2_{(3, 0.99)} = 11.34 \quad p < 0.01$$

Existe evidencia estadística para afirmar que las curvas de vida de los grupos comparados son diferentes.

## 2 [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)asp]

### 2.1 Análisis estadístico en función del incremento en peso

#### 2.1.1 Análisis al día 5

Tabla 7. ANOVA al día 5.

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	329.26	3	109	20.20
Error	86.93	16	5.43	
Total	416.19	19		

$$F_{0.995, (3, 16)} = 6.30$$

$$F \text{ calculada (20.20)} > 6.30$$

Existen diferencias significativas de %IP entre los grupos.

Con base en estos resultados se realiza la prueba de Tukey:

Tabla 8 Valor absoluto de la diferencia entre las medias de %IP de cada grupo al día 5.

	$X_{cn}$	$X_{cp}$	$X_{1.3 \text{ mg/Kg}}$	$X_{2.6 \text{ mg/Kg}}$
$X_{cn}$	-	1.91	10.05	7.43
$X_{cp}$	-	-	8.14	5.52
$X_{1.3 \text{ mg/Kg}}$	-	-	-	2.62

$$DVS_{0.95,(4,21)} = 4.12$$

$$X_{cn} = X_{cp} \neq X_{1.3 \text{ mg/Kg}} = X_{2.6 \text{ mg/Kg}}$$

2.1.2 Análisis al día 15

Tabla 9. ANOVA al día 15.

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	1362.14	3	454.05	10.13
Error	717.29	16	44.83	
Total	2079.43	19		

$$F_{0.995,(3,16)} = 6.30$$

$$F \text{ calculada } (10.13) > 6.30$$

Existen diferencias significativas de %IP entre los grupos.

Con base en estos resultados se realiza la prueba de Tukey.

Tabla 10 Valor absoluto de la diferencia entre las medias de %IP de cada grupo al día 15

	$X_{cn}$	$X_{cp}$		
$X_{cn}$	-	8.32	19.64	19.52
$X_{cp}$	-	-	11.32	11.2
$X_{1.3 \text{ mg/Kg}}$	-	-	-	0.12

$$DVS_{0.95,(4,21)} = 2.99$$

$$X_{cn} \neq X_{cp} \neq X_{1.3 \text{ mg/Kg}} = X_{2.6 \text{ mg/Kg}}$$



2.2 Análisis estadístico en función de sobrevida (Logrank)

Tabla 11 Resumen de el análisis de logrank. Solamente aparecen los días en que ocurrió algún evento. CN= Control negativo; CP= Control positivo; A = [Cu(dimetil-fen)asp].1.17mg/Kg y B= [Cu(dimetil-fen)asp] 2.35 mg/Kg

t	Ind.totales	Evento	e	r	cn	cp	A	B	Pcn	Pcp	PA	PB
0	20	1	0	20	5	5	5	5	0.25	0.25	0.25	0.25
17	19	1	1	19	4	5	5	5	0.2105	0.2632	0.2632	0.2632
18	18	2	2	18	4	5	4	5	0.4444	0.5556	0.4444	0.5556
19	16	1	4	16	3	4	4	5	0.1875	0.25	0.25	0.3125
20	15	4	5	15	2	4	4	5	0.5333	1.0667	1.0667	1.3333
21	11	1	9	11	0	4	2	5	0	0.4444	0.2222	0.5556
22	10	1	10	10	0	4	2	4	0	0.4	0.2	0.4
23	9	2	11	9	0	3	2	4	0	0.6667	0.4444	0.8889
24	7	1	13	7	0	3	1	3	0	0.4286	0.1429	0.4286
25	6	2	14	6	0	3	1	2	0	1.0	0.3333	0.6667
26	4	1	16	4	0	2	0	2	0	0.5	0	0.5
29	3	1	17	3	0	2	0	1	0	0.6667	0	0.3333
30	2	1	18	2	0	2	0	0	0	1.0	0	0
32	1	1	19	1	0	1	0	0	0	1.0	0	0
35	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\Sigma=$									1.6257	8.4919	3.6171	6.4877
											$\Sigma$ total=	20.2224

Se procede ahora a realizar la prueba de  $\chi^2$

$\chi^2$  calculada = 10.4137 >  $\chi^2_{(3, 0.98)}=9.84$  p<0.02

Existe evidencia estadística para afirmar que las curvas de vida de los grupos comparados son diferentes.

3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)acac]NO<sub>3</sub>

3.1 Análisis estadístico en función del incremento en peso

3.1.1 Análisis al día 5

Tabla 13. ANOVA al día 5.

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	530.81	2	265.41	51.61
Error	108.00	21	5.14	
Total	638.81	23		

$F_{0.995,(2,21)} = 6.89$

F calculada (51.61) > 6.89

Existen diferencias significativas entre %IP de los grupos.

Con base en estos resultados se realiza la prueba de Tukey

Tabla 14 Valor absoluto de la diferencia entre las medias de %IP de cada grupo al día 5.

	X <sub>cn</sub>	X <sub>cp</sub>	X <sub>1.34 mg/Kg</sub>
X <sub>cn</sub>	-	6.6	11.48
X <sub>cp</sub>	-	-	4.88
X <sub>1.34 mg/Kg</sub>	-	-	-

DVS<sub>0.95,(3,21)} = 2.869</sub>

$X_{cn} \neq X_{cp} \neq X_{1.34 \text{ mg/Kg}}$

## 3.1.2 Análisis al día 15

Tabla 15. ANOVA al día 15.

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	1527.34	2	763.67	68.92
Error	232.68	21	11.08	
Total	1760.01	23		

$$F_{0.995(2,21)} = 6.89$$

$$F \text{ calculada } (68.92) > 6.89$$

Con base en estos resultados se realiza la prueba de Tukey

Tabla 16 Valor absoluto de la diferencia entre las medias de %IP de cada grupo al día 15.

	$X_{cn}$	$X_{cp}$	$X_{1.34 \text{ mg/Kg}}$
$X_{cn}$	-	18.61	14.26
$X_{cp}$	-	-	4.35
$X_{1.34 \text{ mg/Kg}}$	-	-	-

$$DVS_{0.95,(3,21)} = 4.213$$

Todos los grupos presentan diferencias significativas en %IP al día 15

3.2 Análisis estadístico en función de sobrevivida (Logrank)

Tabla 17 Resumen de el análisis de logrank. Solamente aparecen los días en que ocurrió algún evento.

CN= Control negativo; CP= Control positivo; A = [Cu(dimetil-fen)acac]NO<sub>3</sub> 1.34 mg/Kg

t	Ind.totales	evento	e	r	cn	cp	A	Pcn	Pcp	PA
0	24	1	0	24	8	8	8	0.3333	0.3333	0.3334
6	23	1	1	23	7	8	8	0.3043	0.3478	0.3478
19	22	1	2	22	6	8	8	0.2727	0.3636	0.3636
21	21	2	3	21	5	8	8	0.4762	0.7619	0.7619
23	19	1	5	19	4	8	7	0.2105	0.4211	0.3684
24	18	1	6	18	3	8	7	0.1667	0.4444	0.3889
25	17	2	7	17	3	8	6	0.3529	0.9412	0.7059
26	15	2	9	15	2	8	5	0.2667	1.0667	0.6666
27	13	3	11	13	1	8	4	0.2308	1.8461	0.9231
28	10	3	14	10	1	6	3	0.3	1.8	0.9
31	7	1	17	7	0	4	3	0	0.5714	0.4286
33	6	1	18	6	0	3	3	0	0.5	0.5
35	5	1	19	5	0	3	2	0	0.6	0.4
36	4	1	20	4	0	2	2	0	0.5	0.5
37	3	2	21	3	0	2	1	0	1.3333	0.6667
39	1	1	23	1	0	1	0	0	1.0	0
40	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0
$\Sigma =$								2.9141	12.8308	8.2550
								$\Sigma \text{ total} =$		23.9999

Se procede ahora a realizar la prueba de  $\chi^2$

$$\chi^2 \text{ calculada} = 11.8015 > \chi^2_{(2, 0.99)} = 9.21 \quad p < 0.01$$

Existe evidencia estadística para afirmar que las curvas de vida de los grupos comparados son diferentes.

#### 4. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)salal]NO<sub>3</sub>

##### 4.1 Análisis estadístico en función del incremento en peso

##### 4.1.1 Análisis al día 5

Tabla 19. ANOVA al día 5.

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	522.58	2	2.61.29	34.38
Error	159.61	21	7.60	
Total	682.19	23		

$$F_{0.995,(2,21)} = 6.89$$

$$F \text{ calculada } (34.38) > 6.89$$

Con base en estos resultados se realiza la prueba de Tukey

Tabla 20 Valor absoluto de la diferencia entre las medias de %IP de cada grupo al día 5.

	X <sub>cn</sub>	X <sub>cp</sub>	X <sub>0.72 mg/Kg</sub>
X <sub>cn</sub>	-	6.6	11.38
X <sub>cp</sub>	-	-	4.78
X <sub>0.72 mg/Kg</sub>	-	-	-

$$DVS_{0.95,(3,21)} = 3.4893$$

Conclusión: Al día 5 IP control positivo  $\neq$  IP control negativo  $\neq$  IP [Cu(4,7-dimefen)salal]NO<sub>3</sub>

## 4.1.2 Análisis al día 15

Tabla 21. ANOVA al día 15.

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	1478.39	2	739.19	25.73
Error	603.31	21	28.73	
Total	2081.70	23		

$$F_{0.995,(2,21)} = 6.89$$

$$F \text{ calculada (25.73)} > 6.89$$

Existen diferencias significativas entre %IP de los grupos.

Tabla 22 Valor absoluto de las diferencias entre las medias de %IP de cada grupo al día 15.

	$X_{cn}$	$X_{cp}$	$X_{0.72 \text{ mg/Kg}}$
$X_{cn}$	-	18.59	13.51
$X_{cp}$	-	-	5.08
$X_{0.72 \text{ mg/Kg}}$	-	-	-

$$DVS_{0.95,(3,21)} = 6.7843$$

Conclusión: Al día 15 de ensayo se encontró que: IP control negativo  $\neq$  IP control positivo = IP [Cu(4,7-dime-fen)sala]NO<sub>3</sub>

4.2 Estadística en función de sobrevivida (Logrank)

Tabla 23 Resumen de el análisis de logrank. Solamente aparecen los días en que ocurrió algún evento.  
 CN= Control negativo; CP= Control positivo; A = [Cu(4,7-dimetil-fen)sala]NO<sub>3</sub>. 0.72 mg/Kg

t	Ind.totales	evento	e	r	cn	cp	A	Pcn	Pcp	PA
0	24	1	0	24	8	8	8	0.3333	0.3333	0.3333
6	23	2	1	23	7	8	8	0.6087	0.6956	0.6956
16	21	2	3	21	6	8	7	0.5714	0.7619	0.6667
19	19	2	5	19	5	8	6	0.5214	0.8421	0.6316
21	17	2	7	17	4	8	5	0.4706	0.9412	0.5882
23	15	1	9	15	3	8	4	0.2	0.5333	0.2667
24	14	1	10	14	2	8	4	0.1428	0.5714	0.2857
25	13	2	11	13	2	8	3	0.3077	1.2308	0.4615
27	11	2	13	11	1	7	3	0.1818	1.2727	0.5455
28	9	3	15	9	1	6	2	0.3333	2.0	0.6667
31	6	2	18	6	0	4	2	0	1.3333	0.6667
35	4	2	20	4	0	3	1	0	1.5	0.5
37	2	2	22	2	0	2	0	0	2.0	0
40	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0
$\Sigma =$								3.6759	14.0156	6.3082
									$\Sigma$ total=	23.9997

Se procede ahora a realizar la prueba de  $\chi^2$

$$\chi^2 \text{ calculada} = 10.0637 > \chi^2_{(2, 0.99)} = 9.21 \quad p < 0.01$$

Existe evidencia estadística para afirmar que las curvas de vida de los grupos comparados son diferentes.

## 5. [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)salal]NO<sub>3</sub>

### 5.1 Análisis estadístico en función del incremento en peso.

#### 5.1.1 Análisis al día 5

Tabla 25. ANOVA al día 5.

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	179.87	2	89.93	15.38
Error	122.82	21	5.85	
Total	302.69	23		

$$F_{0.995,(2,21)} = 6.89$$

$$F \text{ calculada (15.38)} > 6.89$$

Con base en estos resultados se realiza la prueba de Tukey

Tabla 26. Valor absoluto de las diferencias entre las medias de %IP de cada grupo al día 5.

	X <sub>cn</sub>	X <sub>cp</sub>	X <sub>2.06 mg/Kg</sub>
X <sub>cn</sub>	-	6.6	4.31
X <sub>cp</sub>	-	-	2.29
X <sub>2.06 mg/Kg</sub>	-	-	-

$$DVS_{0.95,(3,21)} = 3.061$$

Conclusión:

Al día 5 de ensayo se encontró que: IP control negativo ≠ IP control positivo = IP [Cu(4,7-dime-fen)salal]NO<sub>3</sub>



5.1.2 Análisis al día 15

Tabla 27. ANOVA al día 16.

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	1781.25	2	890.63	55.01
Error	339.97	21	16.19	
Total	2121.22	23		

$F_{0.995,(2,21)} = 6.89$

F calculada (55.01) > 6.89

Con base en estos resultados se realiza la prueba de Tukey.

Tabla 28. Valor absoluto de las diferencias entre las medias de %IP de cada grupo al día 15.

	$X_{cn}$	$X_{cp}$	$X_{2.06 \text{ mg/Kg}}$
$X_{cn}$	-	18.659	0.66
$X_{cp}$	-	-	17.93
$X_{2.06 \text{ mg/Kg}}$	-	-	-

DVS  $_{0.95,(3,21)} = 5.1015$

Conclusión:

Al día 5 de ensayo se encontró que: IP control negativo = IP [Cu(4,4'-dimepiridina)salal]NO<sub>3</sub> ≠ IP control positivo

5.2 Análisis estadístico en función de sobrevivencia (Logrank).

Tabla 29. Resumen de el análisis de logrank. Solamente aparecen los días en que ocurrió algún evento. CN= Control negativo; CP= Control positivo; A = [Cu(4,4'-dime-bipiridina)sala]NO<sub>3</sub> 2.06 mg/Kg

t	Ind.totales	evento	e	r	cn	cp	A	Pcn	Pcp	PA
0	24	1	0	24	8	8	8	0.3333	0.3333	0.3333
6	23	1	1	23	7	8	8	0.3044	0.3478	0.3478
19	22	2	2	22	6	8	8	0.5455	0.7273	0.7273
20	20	2	4	20	6	8	6	0.6	0.8	0.6
21	18	3	6	18	5	8	5	0.8333	1.3333	0.8333
23	15	1	9	15	5	8	2	0.3333	0.5333	0.1333
24	14	3	10	14	4	8	2	0.8571	1.7143	0.4286
25	11	2	13	11	3	8	0	0.5455	1.4545	0
27	9	3	15	9	3	6	0	1.0	2.0	0
28	6	3	18	6	2	4	0	1.0	2.0	0
31	3	1	21	3	0	3	0	0	1.0	0
35	2	1	22	2	0	2	0	0	1.0	0
37	1	1	23	1	0	1	0	0	1.0	0
40	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0
$\Sigma =$								6.3524	14.2438	3.4037
								$\Sigma_{total} =$		23.9999

Se procede ahora a realizar la prueba de  $\chi^2$

$$\chi^2 \text{ calculada} = 11.5072 > \chi^2_{(2, 0.99)} = 9.21 \quad p < 0.01$$

Existe evidencia estadística para afirmar que las curvas de vida de los grupos comparados son diferentes.

## 6. [Cu(5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina)ser]NO<sub>3</sub>

### 6.1 Análisis estadístico en función del incremento en peso

#### 6.1.2 Análisis al día 5

Tabla 31. ANOVA al día 5.

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	41.29	3	13.76	4.99
Error	44.09	16	2.76	
Total	85.38	19		

$$F_{0.995,(3,16)} = 6.30$$

$$F \text{ calculada } (4.99) < 6.30$$

No existen diferencias significativas entre las medias de IP al día 5

#### 6.1.2 Análisis al día 15

Tabla 32. ANOVA al día 15.

	SC	g.l.	CM	F calculada
Tratamientos	542.12	3	180.71	15.34
Error	188.43	16	11.78	
Total	730.55	19		

$$F_{0.995,(2,21)} = 6.30$$

$$F \text{ calculada } (15.34) > 6.30$$

Con base en estos resultados se procede a realizar el análisis de Tukey.

Tabla 33. Valor absoluto de las diferencias entre las medias de %IP de cada grupo al día 15.

	$X_{cn}$	$X_{cp}$	$X_{2.22 \text{ mg/Kg}}$	$X_{4.44 \text{ mg/Kg}}$
$X_{cn}$	-	12.32	12.48	11.06
$X_{cp}$	-	-	0.16	1.26
$X_{2.22 \text{ mg/Kg}}$	-	-	-	1.42

$$DVS_{0.95,(4,21)} = 6.078$$

Conclusión:

Al día 5 de ensayo se encontró que: IP control negativo  $\neq$  IP control positivo = IP [Cu(5-NO<sub>2</sub>-fenantrolina)ser]NO<sub>3</sub> 2.22 mg/Kg = IP [Cu(5-NO<sub>2</sub>-fenantrolina)ser]NO<sub>3</sub> 4.44 mg/Kg

6.2 Análisis estadístico en función de sobrevivida (Logrank).

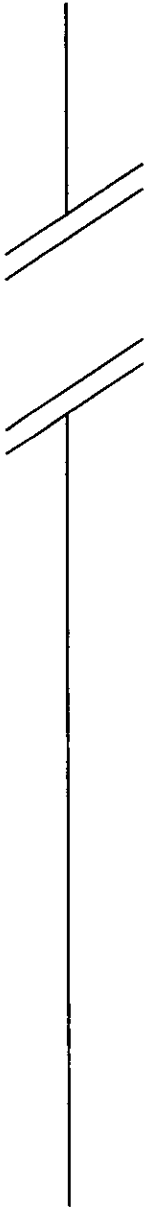
Tabla 34. Resumen de el análisis de logrank. Solamente aparecen los días en que ocurrió algún evento. CN= Control negativo; CP= Control positivo; A = [Cu(5-NO<sub>2</sub>fen)ser]NO<sub>3</sub>. 2.22 mg/Kg y B= [Cu(5-NO<sub>2</sub>fen)ser]NO<sub>3</sub>. 4.44 mg/Kg

t	Ind.totales	evento	e	r	cn	cp	A	B	Pcn	Pcp	PA	PB
0	20	1	0	20	5	5	5	5	0.25	0.25	0.25	0.25
17	19	2	1	19	4	5	5	5	0.4211	0.5263	0.5263	0.5263
18	17	3	3	17	3	5	5	4	0.5294	0.8823	0.8823	0.7059
19	14	3	6	14	2	4	4	4	0.4286	0.8571	0.8571	0.8571
20	11	1	9	11	0	3	4	4	0	0.2727	0.3636	0.3636
21	10	1	10	10	0	3	4	3	0	0.3	0.4	0.3
22	9	1	11	9	0	3	4	2	0	0.3333	0.4444	0.2222
23	8	1	12	8	0	3	3	2	0	0.375	0.375	0.25
24	7	1	13	7	0	2	3	2	0	0.2857	0.4286	0.2857
25	6	2	14	6	0	2	2	2	0	0.6667	0.6667	0.6667
26	4	1	16	4	0	1	2	1	0	0.25	0.5	0.25
29	3	1	17	3	0	1	2	0	0	0.3333	0.6667	0
32	2	1	18	2	0	1	1	0	0	0.5	0.5	0
35	1	1	19	1	0	0	1	0	0	0	1.0	0
41	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\Sigma =$									1.6291	5.8338	7.8607	4.6775
											$\Sigma \text{ total} =$	20.00

Se procede ahora a realizar la prueba de  $\chi^2$

$\chi^2$  calculada = 8.7729 >  $\chi^2_{(3, 0.95)} = 7.82$      $p < 0.05$

Existe evidencia estadística para afirmar que las curvas de vida de los grupos comparados son diferentes.



---

## REFERENCIAS

---

---

**VII. REFERENCIAS**

1. Bush Harris. Preclinical Methodology for the Selection of Anticancer Agents: Methods in Cancer Research, Vol. I Chapter VII. *Academic Press*. (1967)
2. Cellbank Home Page. [www.ijcjb.html](http://www.ijcjb.html)
3. Cerotti P.A. Research on Carcinogenesis and Anticarcinogenesis. *Intern Cancer News* (5),10-12. (1987).
4. Cisneros de Cárdenas Ma. Teresa. Salud Públicas de México, Vol. No. 4; Julio-Agosto (1987). pp. 299-312.
5. De la Garza S.J., Gallardo R.D. , Adel A.A. y Juarez S.P. Semblanza Histórica de los Agentes Antineoplásicos. Cáncer y Quimioterapia. (memorias). México, D.F. 1992; Pp. 21-33 *Sociedad Química de México, Facultad de Química, Instituto Nacional de Cancerología*. México (1992).
6. De la Rosa, M.E. and Gracia, M.I. Mutagenic Activity of Casiopeína in Drosophila. Xth. EEMS Meeting. (memories). York, Inglaterra. 1990, 22-27. *Academic Press*, U.S.A. (1990).
7. Dirección General de Invenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico. (SECOFI) Registros Número 18801-120579 y 18802-120580. U.S.A. Patent Number 5-107,005. (1992), C.E.E. (en trámite); Japón (en trámite).
8. Foster M. and Thomson L. Histocompatibility relations of mouse melanoma B16-Genetics. Pp. 64-221 (1970).
9. Foster, H.Small, H. The mouse in biomedical research. *Academic Press*; (1981).

10. Fried F. Some Milestones in the Development in Cancer Chemotherapy. En: Pratt W. et al. *The Anticancer Drug*. Oxford University Press. New York Pp. 12-19 (1979).
11. García Nieto R., Mendoza-Díaz G., Arias Sergio, Gracia-Mora Y., Nieto María, y Consenza M. Actividad Biológica de Complejos Mixtos de Cu(II). *Sociedad Química de México*. Vol 34. Septiembre Octubre de 1990.
12. García Nieto Rosa Ma., Gracia-Mora I., Cosenza Isela, Mendoza-Díaz Guillermo, Arias Sergio, Nieto María, Ruiz-Ramírez Lena. Algunos Estudios Preliminares de la Actividad Biológica de Complejos Mixtos de Cu(II) con Fármacos de la Familia del Ácido Nalidíxico y Ligantes Donadores N-N. *Sociedad Química de México*. Vol 34, Septiembre-October de 1990.
13. Geran, Greenberg, Macdonald and Abbott: Protocols for in vivo Screening Systems. *National Cancer Institute*. (1987).
14. Gianni Sava. Tumor Animal Models Used for Evaluating the Antineoplastic Activity for Platinum Coordination Complexes. *Inorganica Chimica Acta*. 137m 39-44 (1987).
15. Gracia-Mora I. y Ruiz-Ramírez L. Antineoplastic Effect of Several Transition Metal Complexes. Fourth Chemical Congress of North América. (memories); New York 1991; Pp. 25-30. *Academic Press*, U.S.A. (1991).
16. Gracia-Mora I., Ruiz-Ramírez L., et al. The Antitumor Activity of Several Transition Metal Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry; an Interdisciplinary Journal*. Vol 43; 2-3, (1991). *Oxford United Kingdom*, de. ELSEVIER. Pp. 615.



17. Gracia-Mora I., Ruiz-Ramírez L., et al. Trabajo 26. Antineoplastic Effect of Several Transimition metal Complexes; Fourth Chemical Congress of North America, 25-30, August. N.Y. (1991).
18. Gómez, D.E. Determinación de Toxicidad Aguda de la Casiopeína® I en perros. Tesis de licenciatura; *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México*. México, D.F. (1992)
19. Gómez-Ruiz C., Ruiz-Ramírez L. y Gracia-Mora I. Quimiosensibilidad in vitro en Células de Cáncer Cérvico-Uterino por Efecto de Casiopeínas® I, II y III. Las Jornadas Médicas en Cáncer. (memorias). México, D.F. (1993); *Instituto Nacional de Cancerología*. México (1993).
20. Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Eight edition. *Mc. Graw-Hill*. (1993). Pp. 49-83,1202-1263.
21. Guy de The. Sobre la pista del cáncer. Protagonistas de la Ciencia. *Ediciones Castell Mexicana, S.A. CONACYT*. (1987).
22. Hall E.H. an White, W.J. and Lang C.N. Acidification of drinking water: its effects on selected biologic phenomena in male mice. *Lab. Anim. Sc.*, 30: 634-651 (1980).
23. Harris Busch. Methods in Cancer Research. Vol. 1, *Academic Press*; 1973-251. (1967).
24. Hecht, A.M., Guevara, F.L., Ruiz-Ramírez, L., Gracia-Mora, I., Sumano, L.H., Saldívar, L., Tinoco, M.M. y Quiroz, R.G. Farmacocinética de Medicamentos Antineoplásicos en ratón. VII Congreso Nacional Estudiantil de Investigación en el Área de Salud. (memorias) México, D.F. (1994).

- 
25. Helfand, S.C. Principles and Applications of Chemotherapy. *Vet. Clin. of North Am. Small An. Prac.*, 20, 987-1013 (1990).
26. Helmut Siegel. Metals Ions in Biological Systems; Vol. II; *Mercel Dekker Inc.*; U.S.A. (1980).
27. Huerta, C.M. Evaluación Antineoplásica de Nuevos Complejos de Coordinación Empleando el Modelo Tumoral Murino Sarcoma S 180. Tesis de licenciatura Q.F.B., *Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana*. (1992).
28. Huges M. The Inorganic Chemistry of Biological Processes. (1980).
29. Kallman Robert F. Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Therapy. *Pergamon Press*. (1987)
30. Lomelí, F.C. Temperatura Macroambiental no Controlada en Instalaciones no Convencionales para Animales de Laboratorio. Memorias IV Congreso de AMEAL A.C. Querétaro, Qro. 1987.
31. Mayet C.M. Cernimiento Antineoplásico de Nuevos Compuestos de Coordinación Empleando el Modelo Tumoral Murino Melanoma B16. Tesis de licenciatura. Q.F.B. *Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana*. (1991).
32. Mcpherson, C.W. Reduction of *Pseudomona aeruginosa* and Coliform Bacteria in Mouse Drinking Water Following Treatment with Hydrochloric Acid or Chlorine. *Lab. Anim. Care.*, 13: 737-744. (1963).
33. Mendelsohn J. Principios básicos de las neoplasias. En: Harrison, Isselbacher, Wilson, Brawnwald, Fauci and Kasper. *Principios de Medicina Interna*. Interamericana. *Mc. Graw-Hill*. Madrid (1996). Vol I., Pp. 2089-2104

34. Mengle-Glaw L., y H.O. Mc. Devitt. Genetic and Expression of Mouse Antigens. *Ann. Rev. Immunol.* 3: PP. 365-396, (1985).
35. Melanoma. *Cancer Society of New Zealand*. Department of Dermatology, Waikato Hospital; Hamilton New Zealand. (1997). [www.melanomacontents.a.html](http://www.melanomacontents.a.html).
36. Methods of Development of New Anticancer Drugs; *National Cancer Institute*. Monograph; U.S.A. (1982). Pp. 147-156.
37. Ostrosky P., Ruiz-Ramírez L., Montero R., Moreno R., et al. La Cinética de Proliferación Celular y el Índice Mitótico de Linfocitos en Cultivo como Parámetro de la Identificación de Actividad Citostática. VIII Congreso Latinoamericano de Genética. La Habana, Cuba. Octubre. (1987).
38. Owen, L.N. Therapeutics in Practice Cancer Chemotherapy. *Vet. Rec.*, 118: Pp. 364-366 (1986).
39. Page, R.L. and Thorall, D.E. Clinical Indications and Applications of Radiotherapy and Hyperthermia. *Vet. Clin. of North Am. Small An. Prac.*, 20: Pp. 1025-1091. (1990).
40. Powis, G. and Hacker, M.P. The Toxicity of Anticancer Drugs. *Pergamon Press*, U.S.A., (1991).
41. Pratt W. and Ruddon R.W. The cancer problem: The anticancer drugs. *Oxford University Press*. New York. (1979). Pp. 3-11
42. Prestayko Archie W., Crooke Stanley T. and Carter. Cisplatin currents status and new developments. *Academic Press*. U.S.A. (1980).

43. Robbins Stanley L, Ramzi S. Cotran and Vinay Kumar. Patología Estructural y Funcional. 5ta Edición. *Mc Graw-Hill Interamericana*. Madrid-España (1996). Pp. 271-340.
44. Rosenberg B., Van Camp. L., Truska J.G. and Mansour V.H. Platinum Compounds a New Class of Potent Antitumor Agents. *Nature* 22(26) 385-386. (1969).
45. Ruiz-Ramírez L. Cytostatic effect of Some New Complexes. Symposium on Transition Metal Nucleotic Acid Chemistry Metal Complexes and Drugs (memories). New York 1986; 100-103. *Academic Press*, U.S.A. (1987).
46. Ruiz-Ramírez Lena, Díaz David, Escalante Sigfrido, Gracia-Mora Isabel, Lomeli Ciro. Cernimiento Primario por Medio de Ensayos in vivo del Efecto Antineoplásico de Nuevos Complejos de Coordinación. *Sociedad Química de México*. Vol. 34. septiembre-October de 1990.
47. Ruiz-Ramírez L. Naturaleza Química y Clasificación de los Agentes Quimioterapéuticos. Cáncer y Quimioterapia (memorias). México, D. F. 1992, Pp. 13-20, *Sociedad Química de México, Facultad de Química, Instituto Nacional de Cancerología*. México (1992).
48. Ruiz-Ramírez L. and Gracia-Mora I. Design, Synthesis, Characterization an in vivo Antineoplastic Test of a New Drug: Casiopeína. 4th. International Conference of Anticancer Research (memories). Creta, Grecia. 1992. *Olympus Scientist*, Grecia (1992).
49. Ruiz-Ramírez L., Gracia-Mora I., Moreno-Esparza R., Cirigo C., Tovar A. and García-Carrancá A. Study of the Interaction Between Several Cooper (II) Complexes of the Casiopeína's Family with DNA. Latin American Inorganic Chemistry Meeting

- (memories). Santiago de Compostela, 1993, Pp. 158 *Latin-American Inorganic Chemistry Meeting*. Santiago de Compostela, Spain (1993).
50. Santas E., Rodriguez J. El Cáncer. Segunda edición; *Prensa Científica*; España. (1986).
51. Sober Arthur J., and Koh Haward K. Melanoma y otras lesiones cutáneas pigmentadas. En: Harrison, Isselbacher, Wilson, Brawnwald, Fauci and Kasper; *Principios de Medicina Interna. Interamericana Mc. Graw-Hill*. Madrid (1996). Vol I, Pp. 2152-2157.
52. Solans X., Ruiz-Ramírez L., Martínez, L., Gasque, L., and Moreno-Esparza R. Mixed Chelate Complexes II. Structures of (L-Alaninato)(aqua)(2,2'-bipyridine)copper (II) Nitrate Monohydrate and Aqua (2,2'-bipyridine)(L-tyrosinato)copper (II) Chloride Trihydrate. *Acta Crystallographica. C*. 48, Pp. 1785-1788 (1992).
53. Solans X., Ruiz-Ramírez L., Martínez A., Gasque L. and Moreno-Esparza R. Mixed Chelate Complexes. III. Structures of L-Alaninato (aquea)(4,7-diphenil-1,10-phenanthroline)copper (II) Nitrate Monohydrate and Aquea (4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)glycinato)copper (II) Nitrate Monohidrate. *Acta Crystallographica. C*. 49, Pp.890-893 (1993)
54. T.L. Cunliffe-Beamer y E.P. Les. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. Chapter 18. *The Laboratory Mouse*. 6a. Edición. Segunda parte. (1986).
55. Tannock Ian F. and Hill Richard P. The Basic Science of Oncology. *Pergamon Press*. (1987).

56. Thomas C. Spiro. Nucleic Acid-Metal Ion Interactions. John Wiley & Sons Inc. (1980).
57. Thompson, J.M., Gorman, N.T., Blechen, N.M., Owen, L.N. and Whire, R.A.; Hyperthermia and Radiation in the Management of Canine Tumors. *J. Small Anim. Pract.*, 28: Pp. 457-477 (1987).
58. Tinoco Mendez M.C. Administración de Casiopeína I por Vía Intraperitoneal. Estudio Anatómo-Histológico en Ratones. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1994).
59. Toxicité aigüe. Détermination de la DL50 Chez La Souris. Méthode de Litchfield et Wilcoxon. *J. Pharmacol.* (Paris), Supplément au No. 3 souris, 1,3,407-414. (1970).
60. Trevor B. Poole. The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals. Edited for UFAW. 6th. edition. Longman Scientific and Technical. Great Britain, (1987).
61. V. Riley. Seattle and Wash. Genetic and Immunologic Approaches to Transplantable Mouse Melanomas. En: Foster M. Herman J. and L. Thomson. Pigmen Cell: Mechanism in Pigmentation. Vol. I. Pp. 390-398 (1973).
62. Vincent T. Devita Jr., Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg. Principal & Practice of Oncology; Lippincott. U.S.A. (1982).
63. White, R.J. Microbiological Models as Screening Tools for Anticancer Agents: Potencial and Initiation. *Ann. Rev. Microbio.* 36: Pp. 415-433. (1982).

- 
64. Zahid H. Siddik, Mervyn Jones, Frances E. Boxal and Kenneth R. Harrap.  
Comparative Distribution and Excretion of Carboplatin and Cisplatin in Mice. *Cancer  
Chemother Pharmacol.* 21: 19-24. (1988).