

102



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION ANTINEOPLASICA IN VITRO DE CUATRO CASIOPEINAS EMPLEANDO LINEAS TUMORALES MURINAS Y HUMANAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA : LAURA CECILIA ROMERO DE LIRA



MEXICO, D. F.

279332

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: LENA RUIZ AZUARA
- Vocal INES FUENTES NORIEGA
- Secretario MARIA ISABEL GRACIA MORA
- 1er. Suplente FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
- 2do. Suplente MABEL CECILIA TINOCO MENDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Unidad de Experimentación Animal.

Conjunto "E". Facultad de Química. UNAM

ASESOR DEL TEMA:



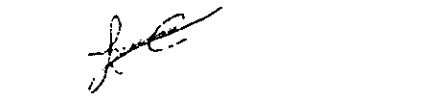
M. en C. MARÍA ISABEL GRACIA MORA

SUPERVISOR TÉCNICO:



Q.F.B. CELEDONIO GÓMEZ RUIZ

SUSTENTANTE:



LAURA CECILIA ROMERO DE LIRA

A MIS PADRES:

Por su cariño, ejemplo y dedicación en todo momento.

A MIS HERMANOS:

Por el apoyo de siempre

EN MEMORIA DE HERMELINDA DÁVALOS:

Por enseñarme a amar esta profesión

A MIS PROFESORES:

Por compartir sus conocimientos y parte de su vida en sus alumnos

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS:

Por ser parte importante en mi vida, por todas las experiencias compartidas

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A Isabel: por todo el apoyo, la confianza y la amistad que siempre supo darme en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Lena Ruiz: por la oportunidad de poder participar en este proyecto de investigación.

A Celedonio: por toda la asesoría y ayuda en todo momento.

Al grupo de trabajo en la Unidad de Experimentación Animal (Lucía, Mabel, Héctor, Marisol, Fabiola): y particularmente en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos por hacer de este proyecto de tesis toda una realidad.

Al enorme grupo de trabajo e Investigación sobre Casiopeínas: por hacerme sentir parte del grupo y por ayuda en todo momento. Gracias por unas Jornadas de trabajo arduas y amenas.

Al apoyo financiero brindado por: Fundación UNAM y CONACYT

Al INCAn: por permitirnos hacer parte de las investigaciones en sus instalaciones y por proporcionarnos algunas de las líneas en estudio.

A las personas que padecieron Cáncer y que a pesar del tiempo una parte de ellas permanece viva (en forma de una línea celular), ayudando a la investigación en beneficio de otras personas.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
--------------	---

CAPITULO II

GENERALIDADES	3
2.1 El Cáncer	3
2.1.1 Nomenclatura	5
2.1.2 Metástasis	8
2.1.3 Factores que originan el Cáncer	9
2.2 Tratamientos antineoplásicos	12
2.2.1 Quimioterapia	12
2.3 Casiopeínas	15
2.4 Diagrama de flujo para la evaluación de compuestos antineoplásicos	18

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis	19
3.2 Objetivos	20
3.2.1 Objetivo general	20
3.2.2 Objetivos particulares	20

CAPÍTULO IV

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Cultivo de líneas celulares <i>in vitro</i>	21
4.1.1 Generalidades de la línea celular HeLa	22
4.1.2 Generalidades de la línea celular SiHa	23
4.1.3 Generalidades de la línea celular B16	24

4.1.4 Generalidades de la línea celular LL	25
4.2 Reactivos y materiales	
4.2.1 Materiales	26
4.2.2 Equipo	26
4.2.3 Reactivos	27
4.3 Metodología	
4.3.1 Descongelamiento de las células	33
4.3.2 Obtención del cultivo Stock	33
4.3.3 Tripsinización	33
4.3.4 Cuantificación de células	34
4.3.5 Ensayo de inhibición de la proliferación	34
4.3.6 Tinción con SRB y lectura	35
4.3.7 Determinación de la CI50 inducida por los fármacos	35

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados de los ensayos de inhibición de la proliferación en CaCU	36
5.1.1 Porcentajes de sobrevivencia de la línea HeLa	36
5.1.2 Porcentajes de sobrevivencia de la línea SiHa	36
5.1.3 Porcentajes de sobrevivencia de la línea InBl	36
5.2 Concentraciones Inhibitorias medias para las líneas de CaCU	40
5.3 Resultados de los ensayos de inhibición para las líneas B16 y LL	42
5.3.1 Porcentajes de sobrevivencia de la línea B16	42
5.3.2 Porcentajes de sobrevivencia de la línea LL	42
5.4 Concentraciones inhibitorias medias para B16 y LL	45

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES	46
--------------	----

CAPÍTULO VII**ANEXOS**

6.1 Análisis de datos por Probit	48
----------------------------------	----

CAPÍTULO VIII**REFERENCIAS**

	53
--	----

RELACIÓN DE TABLAS**Tabla No.**

1.	Características diferenciales de células normales y malignas	4
2.	Nomenclatura tumoral	6
3.	Metástasis	7
4.	Estadios clínicos	7
5.	Familias de Casiopéinas	16
6.	Inhibición de la proliferación en la línea HeLa	36
7.	Inhibición de la proliferación en la línea SiHa	36
8.	Inhibición de la proliferación en la línea InBl	36
9.	Concentraciones Inhibitorias medias para CaCU	40
10.	Inhibición de la proliferación en la línea B16	42
11.	Inhibición de la proliferación en la línea LL	42
12.	Concentraciones Inhibitorias medias para B16 y LL	45
13.	Análisis de datos por Probit	48

RELACIÓN DE FIGURAS

1.	Mecanismo de acción del Cisplatino	14
2.	Diagrama de flujo para la evaluación de un compuesto antineoplásico	18
3.	Efecto de los Fármacos sobre el cultivo de la línea de CaCU HeLa	36
4.	Efecto de los Fármacos sobre el cultivo de la línea de CaCU InBl	37
5.	Efecto de los Fármacos sobre el cultivo de la línea de CaCU SiHa	38
6.	Efecto de los Fármacos sobre el cultivo de la línea de melanoma B16	43
7.	Efecto de los Fármacos sobre el cultivo de la línea carcinoma LL	44

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El cáncer o neoplasia maligna, es un conjunto de enfermedades que pueden ocurrir en cualquiera de los tejidos corporales y que se caracterizan por la proliferación desordenada e incontrolada de células que, por su morfología y funcionalidad, no son susceptibles a las señales de control de las demás células del organismo. Este crecimiento incontrolado sin restricciones tales como la limitación por contacto y pérdida del anclaje, permite que las células invadan tejidos adyacentes y frecuentemente sean capaces de producir crecimiento a distancia (metástasis) (1).

Debido a que el cáncer constituye hoy día un problema de salud pública, no sólo en México sino en todo el mundo (hay estimados 5.9 millones de nuevos casos por año mundialmente), la búsqueda de fármacos anticancerígenos está justificada, ya que muchos de los tumores son refractarios o se vuelven refractarios a los fármacos existentes resultando entonces conveniente tener mayores opciones terapéuticas, sin perder de vista en la búsqueda opciones menos tóxicas y con mayor espectro de acción. Conscientes de lo anterior, un grupo de investigadores de la Facultad de Química, encabezados por la Dra. Lena Ruiz llevó a cabo el diseño, síntesis y caracterización de un conjunto de compuestos de coordinación con cobre como centro metálico, que han mostrado actividad antineoplásica en diversos sistemas de prueba. Dichos compuestos han sido patentados por la UNAM y registrados con el nombre de Casiopeínas (2)

En este trabajo se evalúa la actividad antineoplásica de cuatro Casiopeínas, empleando diversas líneas celulares humanas de Cáncer cérvicouterino: Hela, InBl. y Sila, además de líneas celulares murinas: melanoma B16 y Carcinoma de pulmón de Lewis *in vitro*, a través de la evaluación de la supervivencia celular con la incorporación de sulforrodamina-B mediante un método colorimétrico.

CAPÍTULO II

GENERALIDADES

2.1 EL CÁNCER

El cáncer puede definirse como la pérdida de la regulación metabólica, debida a alteraciones en el genoma celular que afectan la expresión o función de genes que controlan el crecimiento y diferenciación celular.

Es un problema global y no, como a veces se piensa, limitado a las naciones industrializadas. Hay estimados 5.9 millones de nuevos casos por año mundialmente. Sin embargo, hay una gran variación en los patrones de ocurrencia de cáncer en diferentes regiones del mundo.

En 1991, las muertes debidas a cáncer ocuparon el segundo lugar, sólo superadas por las enfermedades cardíacas, causando 2.3 millones de los 11 millones de muertes reportadas a la Organización Mundial de Salud.

De acuerdo con Kundson, las causas del cáncer pueden ser clasificadas en los siguientes grupos:

- a) Predisposición genética
- b) Factores ambientales (ocupacionales, dieta, fármacos, contaminantes)
- c) Factores ambientales interaccionando con predisposiciones genéticas
- d) Factores desconocidos.

De acuerdo a datos epidemiológicos se pronostica que en los Estados Unidos, una de cada tres personas padecerá algún tipo de cáncer en su vida, que dos de cada tres

familias se verán afectadas con un enfermo y que una de cada cuatro personas morirá por cáncer (2).

En un organismo pluricelular existe una estructura jerárquica que debe ser mantenida, las células que integran un tejido normal se caracterizan por tener rasgos, que al malignizarse se pierden o modifican:

Tabla No. 1. Características diferenciales de células normales y malignas

<i>CELULAS MALIGNAS</i>	<i>CELULAS NORMALES</i>
No respetan la división de funciones en el tejido	Respetan una división de funciones dentro del tejido
Son inmortales	Tienen tiempo de vida limitado
Pérdida de la inhibición por contacto	Presentan inhibición por contacto
Proliferación descontrolada	Su proliferación es controlada
Pérdida de la organización	Su citoesqueleto tiene organización determinada
Hay diferenciación errónea	Células diferenciadas
Uso de vías anaerobias en la generación de energía	Uso de vías convencionales en la generación de energía
Se hacen independientes de anclaje	Las células tienen "dependencia al anclaje"

Lo que diferencia a una neoplasia benigna (también llamada tumor benigno) de una neoplasia maligna o cáncer, es el hecho de que, en la primera, la formación tumoral está delimitada por una pared o cápsula que la separa del tejido circundante, y así permanece, casi siempre, indefinidamente. En cambio, la neoplasia se maligniza y se habla de un cáncer cuando las células tumorales no están formando una estructura bien circunscrita y local, sino que, por el contrario, pueden migrar, atravesar la membrana basal del tejido original y

trasladarse mediante el torrente sanguíneo o linfático a órganos remotos que puede colonizar o invadir.

2.1.1 Nomenclatura

Un tumor recibe nombre de acuerdo al tejido con el cual tiene más similitudes, aunque este criterio sólo puede ser aplicado a tumores benignos, dado que las formas malignas no se asemejan a tejidos normales. Así, por ejemplo se denomina fibroma al tumor originado de tejido conectivo; mixoma, si es tejido conectivo mucoso; lipoma, cuando es tejido graso, etc.

Por su origen histológico, los tipos de cáncer se clasifican en carcinomas (que son los más frecuentes) si se derivan de la malignización de epitelios; sarcomas, si son el resultado de la transformación maligna de células de tejidos conectivos o de sostén; leucemias y linfomas, si son malignizaciones de células hematopoyéticas.

El cáncer es un trastorno celular con concreción histológica. El diagnóstico de un cáncer es en última instancia un diagnóstico histológico. Diagnosticar un cáncer es decir, frente a una laminilla con un corte histológico de un tumor, si ha habido o no rompimiento de la membrana basal e infiltración en otro tejido por las células de ese tumor.

Tabla No. 2. Nomenclatura tumoral

<i>TEJIDO</i>	<i>TUMOR BENIGNO</i>	<i>TUMOR MALIGNO</i>
<i>CONECTIVO</i>	FIBROMA	FIBROSARCOMA
<i>CONECTIVO GRASO</i>	LIXOMA	LIXOSARCOMA
<i>TEJIDO GRASO</i>	LIPOMA	LIPOSARCOMA
<i>CUERDA DORSAL</i>	CORDOMA	SARCOMA NEUROGÉNICO
<i>CELULAS PIGMENTADAS</i>	MELANOMA	MELANOMA MALIGNO
<i>ENDOTELIO</i>	ENDOTELIOMA	ENDOTELIOMA MALIGNO
<i>EPITELIAL</i>	PAPILOMA	PAPILOMA MALIGNO
<i>GLÁNDULAS</i>	ADENOMA	ADENOCARCINOMA
<i>OSEO</i>	OSTEOMA	SARCOMA OSTEOGÉNICO
<i>MUSCULAR LISO</i>	LEIOMIOMA	LEIOMIOSARCOMA
<i>MUSCULAR ESTRIADO</i>	RABDOMIOMA	RABDOMIOSARCOMA

Además de existir ésta clasificación de las neoplasias malignas, también, dentro de cada tipo de ellas, existe una clasificación de acuerdo al grado de progresión de la enfermedad

Tabla No. 3. Metástasis

T= Tumor primario	N= Nodo Linfático Regional	M= Metástasis a distancia
T0 = No evidente	N0 = Nodo Linfático Regional	M0 = No hay evidencia
T1 = Tumor pequeño o menor de 2 cm	N1 = Afectación unilateral	M1 = Presencia de metástasis
T2 = Tumor entre 2 y 5 cm. Con invasión mínima	N2 = Afectación bilateral	
T3 = Tumor mayor de 5 cm. Invasivo	N3 = Determinar a) Ausencia de metástasis b) Presencia de metástasis	
T4 = Muy invasivo		

Con éstas observaciones clínicas, se clasifica en estadios clínicos bien definidos o etapas:

Tabla No. 4. Estadios clínicos

ETAPA	CARACTERÍSTICAS
I	T1N0M0, T2N0M0
II	T1N1M0, T2N1M0
III	T1N2M0, T2N2M0, T3N0-3M0, T4N0-3M0, cualquiera Nb
IV	Cualquiera M1

2.1.2 Metástasis

La habilidad de células cancerígenas para invadir otros tejidos y diseminarse a otras partes del cuerpo donde pueden generar nuevos tumores (metástasis) es la mayor propiedad que lleva a la muerte del huésped.

La metástasis comprende una compleja serie de acontecimientos que implican interacciones entre las células malignas del tumor originario y células normales del organismo. Se han establecido las etapas secuenciales que pueden llevar a la colonización a distancia (3):

- 1) Extensión a los tejidos circundantes
- 2) Penetración en las cavidades y vasos del cuerpo
- 3) Desprendimiento de las células tumorales para su desplazamiento a otras zonas
- 4) Reinvasión del tejido en el punto de parada
- 5) Alteración del nuevo tejido en orden a facilitar la supervivencia, vascularización y desarrollo tumoral de las células tumorales.

En estos momentos se está obteniendo información muy valiosa relacionada con esta cadena de procesos, se ha descubierto el gen MN23 (murino) equivalente a un gen en el cromosoma 17q del humano, que parece ser un gene supresor de metástasis, la expresión de este gene se ve disminuida en tumores altamente metastásicos. Entre los objetivos perseguidos por diversos grupos de investigación está la posibilidad de incrementar la expresión de este gene en tumores para impedir su capacidad metastatizante.(3).

Ciertas observaciones clínicas denotan que determinados tipos de tumores primarios encierran una tendencia a metasuzar de un modo preferente, en algunos órganos. Así los

carcinomas de mama tienden a diseminarse por el cerebro y pulmones; los tumores pulmonares desarrollan frecuentemente metástasis en el cerebro y glándulas suprarrenales y el carcinoma de próstata lo hace en el hueso(3)

2.1.3. Factores que originan el cáncer

Se acepta, que las causas del cáncer se dividan en dos grandes grupos: las exógenas o ambientales, asociadas al 80-90% de todos los casos padecidos por los seres humanos, y las endógenas, a las que se debe el 10-20% restante (2).

En mayor o menor medida colaboran, entre otros, el uso cotidiano de medicamentos variados, aditivos alimenticios, cosméticos, plaguicidas, productos industriales y del hogar, el tabaquismo activo o pasivo, la ingestión de bebidas alcohólicas, de estimulantes o ambos; la variada exposición ocupacional y los alimentos incluidos o excluidos de la dieta. Las radiaciones ionizantes o no ionizantes también son factores exógenos del cáncer pero de naturaleza física. Elementos etiológicos de naturaleza biológica son los virus y las infecciones crónicas microbiológicas. A demás de que diversas observaciones epidemiológicas han permitido conocer el papel del estrés, la depresión y la angustia en la generación de el padecimiento.

Las causas endógenas, a las que parece deberse la menor proporción de los tumores malignos, pueden ser de dos tipos, espontáneas y hereditarias.

Ya sean ambientales o endógenas, el factor común que parece agrupar todas las etiologías de las neoplasias malignas es el "blanco" sobre el que actúan: el material genético, es decir, el ADN.

El proceso mediante el cual se convierte una célula normal en una célula maligna, nunca ocurre en un sólo paso, y no puede ser atribuida a la mutación de un sólo gene. Debe haber una serie de cambios en las propiedades de las células que originen la formación del tumor alterando los controles de proliferación, diferenciación, o ambos (carcinogénesis), se trata de un proceso complejo que transcurre a lo largo del tiempo y a través de diferentes etapas. La evidencia general de varios pasos en carcinogénesis viene de una serie de observaciones clínicas, epidemiológicas y de experimentos de laboratorio.

En los años setenta y ochenta, un investigador inglés, Slaga, trabajando con su modelo de inducción de cáncer por compuestos químicos en piel de ratón, observó que algunos compuestos inducían el cáncer por sí mismos, mientras que otros necesitaban la aplicación de compuestos auxiliares para la aparición del tumor. Slaga interpretó los resultados postulando que la carcinogénesis es un proceso que transcurre a través de diferentes etapas. Hizo una división operativa experimental del proceso en las etapas de iniciación, promoción y progresión (1).

Desde entonces, se habla de iniciación como un daño permanente y transmisible en el ADN de una célula que si no se repara, se fija como mutación, quedando la célula "iniciada". No es un daño "crítico" para la malignización, es decir, la célula iniciada no se ve conducida inevitablemente a una transformación maligna. Este cambio sólo ofrece una ventaja selectiva a la célula que lo tiene. La frecuencia con la que ocurre el evento inducido químicamente puede ser de 1 en 10 000. Los agentes iniciadores son, por definición, compuestos genotóxicos, o sea, que pueden interactuar con el ADN y dañarlo.

La promoción es un proceso que aún no se comprende en toda su complejidad. En esta etapa ocurre una expansión clonal, que puede ser reversible (hiperplasia), a partir de la célula que se inició. Ésta es la etapa en que se forma propiamente la neoplasia. Las células promovidas que constituyen el colon tumoral siguen siendo todavía células benignas (4).

La progresión tumoral es, finalmente, la adquisición por la neoplasia del carácter maligno. Se explica mediante la aparición secuencial de subpoblaciones cada vez más aberradas genéticamente y de una heterogeneidad celular incrementada dentro del clon neoplásico. Los cambios genéticos progresivos y acumulativos que se presentan son, entre otros, aneuploidía, pérdida de alelos y amplificación génica. El rasgo distintivo de esta etapa terminal es la capacidad de escapar, invadir y colonizar o metastatizar órganos distantes.

En el ser humano, las observaciones epidemiológicas han permitido estimar en aproximadamente 10-20 años de duración del proceso de carcinogénesis, desde la exposición primera del agente iniciador hasta la aparición del cáncer.

El modelo de Slaga es el más sencillo que se ha propuesto, pero otros investigadores han considerado necesaria la introducción de una etapa intermedia entre la célula iniciada y la promoción, a este estadio se le llama preneoplásico y se ha definido como un estado celular cualitativamente distinto al de la célula iniciada, que precede al desarrollo de tumores, en el cual se observan cambios fenotípicos variados, dependiendo del tejido, éstos cambios parecen ser principalmente citoplasmáticos.

Otra de las observaciones clínicas frecuentemente encontrada es que los tumores adquieren cada vez un fenotipo más maligno, lo que podría interpretarse como la acumulación de mutaciones y de subpoblaciones celulares.

Hay buena evidencia directa para algunos tipos individuales de cáncer que algunos cambios son necesarios para la expresión completa del fenotipo maligno. Un ejemplo muy claro es el del linfoma de Burkitt (LB) que es una consecuencia rara de la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV), donde se ve que en los lugares donde se padece más frecuentemente aparece una co-infección con malaria, llevando a la inmunosupresión no específica que permite la proliferación de células transformadas con la activación de un oncogene.

2.2. TRATAMIENTOS ANTINEOPLÁSICOS

Durante muchos años el tratamiento del cáncer se ha realizado a través de tres procedimientos principales los cuales son: el tratamiento quirúrgico, la radioterapia y la quimioterapia. Actualmente se han descubierto y desarrollado nuevas formas entre las que se encuentran la inmunoterapia, hormonaterapia, crioterapia y los que se encuentran en fase experimental como la terapia génica, los fotosensibilizadores, radiosensibilizadores y radioprotectores, la radioterapia con partículas densamente ionizantes y la radioterapia intraoperatoria.

2.2.1. Quimioterapia

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. Es ésta la principal ventaja y el principal inconveniente ya que los compuestos no pueden discriminar entre células neoplásicas y otras células normales del organismo con alto índice reproductivo (5). 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 (6).

Hace 500 años ya existía el concepto del tratamiento del cáncer con fármacos, se sabe que con este propósito se empleaban preparaciones de plata, zinc o mercurio (7). En 1865 se documentó el uso del tratamiento sistemático en neoplasias malignas administrando arseniato de potasio a pacientes con leucemia y observando efectos positivos. 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. En la quimioterapia actual existen 44 compuestos aprobados para su uso en humanos (8), (10)

Actualmente existen numerosos fármacos tanto de origen orgánico y algunos de origen inorgánico que son utilizados en la quimioterapia del cáncer. Sin embargo, entre los de origen inorgánico, existe uno que revolucionó en este ámbito y cuyo descubrimiento fue azaroso, se trata del *cis*-diamino-dicloro-platino (II), conocido comercialmente como Cisplatino, un compuesto de coordinación que ejerce su efecto antineoplásico interactuando con el ADN al igual que un análogo de él que presenta la misma efectividad pero que resulta menos tóxico, el carboplatino. No obstante muchos tumores son totalmente refractarios al Cisplatino, ha estimulado el diseño, la síntesis y la evaluación de muchos nuevos agentes en la búsqueda de compuestos con toxicidad reducida y diferentes propiedades biológicas.

La evidencia experimental acumulada para el Cisplatino a través del tiempo ha propuesto que compuestos de coordinación que satisfagan los siguientes postulados tienen potencial antineoplásico (38):

- ◆ Estos complejos deben intercambiar rápidamente sólo algunos ligantes en reacciones con moléculas biológicas.
- ◆ Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante en la especie viva.
- ◆ Son necesarios dos ligantes *cis* monodentados (o bien uno bidentado) como grupos saliente. Los isómeros *trans* son inactivos
- ◆ Las velocidades de intercambio de estos ligantes se encuentran en un intervalo específico de labilidad.
- ◆ Los ligantes no intercambiables en la molécula deben estar fuertemente enlazados.

El hecho de que haya tumores refractarios al Cisplatino y su toxicidad estimulan la búsqueda de compuestos con las siguientes características ideales:

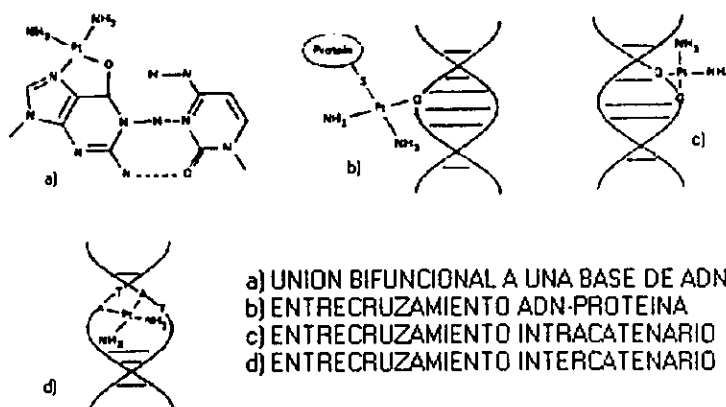
- ◆ Ausencia de resistencia cruzada al Cisplatino

- ◆ Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el Cisplatino no ha demostrado efectos terapéuticos
- ◆ Disminución de efectos eméticos y renales (tóxicos directos en general)
- ◆ Sinergismo en terapias combinadas
- ◆ Bajo potencial oncogénico

La principal toxicidad del Cisplatino incluye: toxicidad renal dosis-limitante, náusea y vómito, mielosupresión, ototoxicidad, y disminución de los electrolitos séricos. El uso intensivo de hidratación intravenosa cuya consecuencia es la diuresis, ha disminuido la gravedad de la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino. El número de efectos secundarios menores continúa incrementando conforme incrementa la experimentación clínica del fármaco. Estos incluyen ahora la tinitus, sordera, neuropatía periférica e hipomagnesemia.

Los compuestos de platino (II) tales como el Cisplatino reaccionan con nucleófilos para formar productos de adición; el Cisplatino es bifuncional en el sentido de que cada molécula tiene dos sitios de reacción con nucleófilos. En este respecto, el Cisplatino y sus derivados se asemejan a los agentes alquilantes bifuncionales como las mostazas nitrogenadas. Como éstas, el Cisplatino puede reaccionar con una variedad de sitios moleculares en la célula, pero la reacción más significativa desde el punto de vista biológico es probablemente con el ADN(38).

Figura No.1. Mecanismo de acción del Cisplatino



2.3. CASIOPEÍNAS

La búsqueda de fármacos anticancerígenos está justificada, ya que muchos de los tumores son refractarios o se vuelven refractarios a los fármacos existentes resultando entonces conveniente tener mayores opciones terapéuticas, sin perder de vista en la búsqueda opciones menos tóxicas y con mayor espectro de acción. Conscientes de lo anterior, un grupo de investigadores de la Facultad de Química, encabezados por la Dra. Lena Ruiz llevó a cabo el diseño, síntesis y caracterización de un conjunto de compuestos de coordinación con cobre como centro metálico, que han mostrado actividad antineoplásica en diversos sistemas de prueba. Dichos compuestos han sido patentados por la UNAM (2) y registrados con el nombre de Casiopeínas. Por añadidura, el hecho de que en México exista la necesidad de importación de los fármacos incrementando su costo, haciendo en ocasiones inaccesible la opción a un gran número de pacientes con las consecuencias éticas que esto implica, justifica aún más el tener mayores opciones y más accesibles.

En el diseño y síntesis de los compuestos se eligió como centro metálico en cobre (II). Con respecto a los ligantes, se considera la capacidad quelante y el grado de hidrofobicidad e hidrofiliidad de los mismos. Estas características se reflejan en las propiedades que estos compuestos presentan, en términos de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad, de tal manera que se lleva a cabo una interacción de los compuestos con el ADN, entre otras posibilidades de mecanismo de actividad. En la esfera de coordinación, las Casiopeínas presentan un ligante bidentado del tipo diimina (N-N) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o donador (O-O) (11). Estos compuestos han sido clasificados en siete grandes grupos I, II, III, IV, V, VI y VII cuyas fórmulas generales se muestran a continuación:

Tabla No.5. Familias de Casiopeínas

<i>Cu</i>	<i>N-O</i>	<i>Péptido</i>	<i>O-O</i>
<i>Difenilfenantrolina</i>	CASIOPEÍNA I	CASIOPEÍNA I	CASIOPEÍNA III
<i>4,7-dimetilfenantrolina</i> <i>fenantrolina</i>	CASIOPEÍNA II	CASIOPEÍNA II	CASIOPEÍNA III
<i>5-R-fenantrolina</i>	CASIOPEÍNA V	CASIOPEÍNA V	CASIOPEÍNA III
<i>Terametilfenantrolina</i> <i>Dimetil-difenilfenantrolina</i>	CASIOPEÍNA VII	CASIOPEÍNA VII	CASIOPEÍNA III
<i>5,6-dimetilfenantrolina</i>	CASIOPEÍNA VI	CASIOPEÍNA VI	CASIOPEÍNA III
<i>Dimetilbipiridina</i> <i>Bipiridina</i>	CASIOPEÍNA IV	CASIOPEÍNA IV	CASIOPEÍNA III

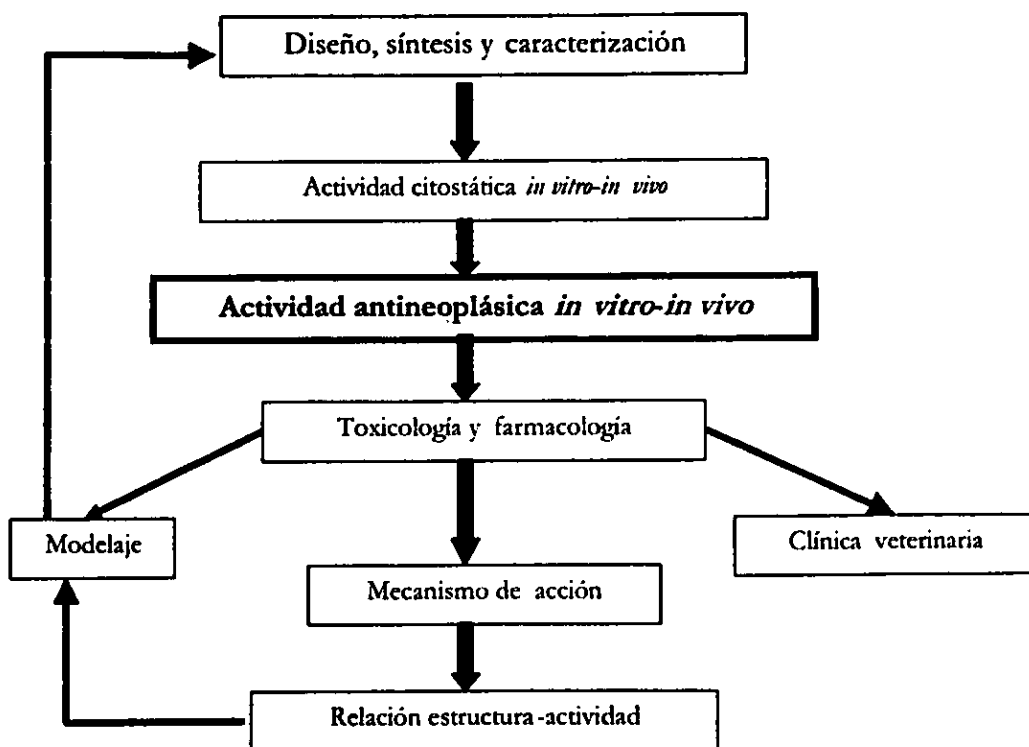
	Fármacos empleados en este trabajo
--	------------------------------------

Hasta la fecha se han sintetizado cerca de 100 Casiopeínas, las cuales están caracterizadas químicamente y en proceso de caracterizarse con detalle fisicoquímicamente (12).

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), Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) y otras colaboraciones a nivel internacional.

2.4. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA EVALUACIÓN DE UN COMPUESTO ANTINEOPLÁSICO

Figura No. 2. Diagrama De Flujo Para La Evaluación De Un Compuesto Antineoplásico



CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Las Casiopeínas serán capaces de disminuir la proliferación celular en al menos alguna de las líneas celulares a prueba; el modelo utilizado para este estudio será lo suficientemente sensible para mostrar diferencias de selectividad y grado de actividad de las Casiopeínas en estudio frente a las líneas celulares empleadas para así poder establecer una relación estructura-actividad cualitativa.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo General

- ◆ Evaluar la actividad antineoplásica de cuatro Casiopeínas en diversa líneas celulares tumorales murinas (melanoma B16 y carcinoma de pulmón de Lewis) y humanas de carcinomas cérvico-uterinos (HeLa, InBl, Siha) obteniendo así un modelo de cernimiento y de correlación estructura-actividad cualitativo.

3.2.2. Objetivos Particulares

- ◆ Establecer un sistema de prueba para la evaluación de la inhibición de la proliferación celular.
- ◆ Demostrar que las Casiopeínas en estudio muestran actividad en el sistema de prueba.
- ◆ Establecer la magnitud de la actividad de cada Casiopeína en las diversas líneas tumorales al calcular la Concentración Inhibitoria media (CI50)
- ◆ Evaluar la posible selectividad en la actividad de cada Casiopeína hacia una o varias líneas celulares.
- ◆ Aportar información sobre la actividad de las Casiopeínas con el fin de cooperar con la investigación de fármacos antineoplásicos que se realiza dentro de la Facultad de Química.

CAPÍTULO IV

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Cultivo de líneas celulares tumorales *in vitro*

Las células que se encuentran dentro de un organismo pueden crecer debido a que reciben todos los nutrientes necesarios para su desarrollo. Las células tumorales pueden crecer *in vitro* empleando un medio de cultivo que contenga todos los elementos necesarios para su crecimiento, como son: una fuente de carbono, como la glucosa, una fuente de nitrógeno y cofactores, aminoácidos esenciales y vitaminas, así como oligoelementos y factores de crecimiento que aporta el suero fetal bovino. Además existen células que requieren de ciertos factores especiales que deben ser adicionados al medio para el crecimiento adecuado.

De acuerdo a la procedencia y al tipo de subcultivo se clasifican en:

1. Cultivo primario: es aquel que se obtiene directamente del tejido animal; está constituido por células bien diferenciadas cuya permanencia en cultivo es corta.
2. Cultivo secundario: se obtiene a partir de un cultivo primario, se comporta de la misma forma que éste.
3. Cepa celular: se trata de un cultivo celular bien caracterizado. Consta básicamente de tres fases: inicio, reproducción (división celular) y muerte.
4. Línea celular: Se refiere a una estirpe celular, que se divide aceleradamente, y que muestra un tiempo de vida indefinido, es decir, que es inmortal bajo condiciones de cultivo establecidas.

En el presente trabajo se seleccionaron las líneas celulares B16 (melanoma murino), I.L. (carcinoma de pulmón de Lewis, murino), HeLa, Siha, e InBl (carcinoma cervicouterino humano) para detectar la actividad antineoplásica de cuatro Casiopeínas.

4.1.1. Generalidades de la Línea Celular HeLa (Carcinoma epitelioide de cérvix humano)

HeLa fue la primera línea celular epitelioide de tipo aneuploide derivada de un tejido humano y mantenida continuamente por una serie de cultivos celulares. Fue aislada en 1951 de un carcinoma de cérvix de una mujer negra de 31 años de edad (Cancer Res. 12:264,1952). Una reexaminación reciente de las muestras originales efectuadas por Jones et al., (Obstet. Gynecol. 38:945-949,1971) diagnosticaron el tumor como un adenocarcinoma. Desde su origen, esta ha sido una de las líneas celulares más estudiadas. Después de varios congelamientos y recultivos, la línea fue reactivada en noviembre de 1961 por la American Type Culture Collection. La línea fue sometida a aproximadamente 76-88 pases y fue considerada muy similar a las características descritas en los estudios clásicos de Scherer, Syverton y Grey (J. Exp. Med. 97:695,1953).

Datos generales de las células HeLa:

- ◆ Número de subcultivos seriados en el tejido de origen: Desconocido; 90-102 desde el cultivo recibido por W. F. Scherer en 1952.
- ◆ Características de crecimiento de células descongeladas: Un inóculo de $0.5-1.0 \cdot 10^5$ células viables/7mL en medio de cultivo a 37°C, con una atmósfera de 5% de dióxido de carbono y 95% de aire, se multiplica aproximadamente 15 veces en 7 días.
- ◆ Morfología: Tipo epitelial.
- ◆ Cariología Distribución de frecuencia cromosómica en 50 células: $2n=4$

CELULAS:	1	5	2	5	9	13	8	3	1	1	1	1
CROMOSOMAS:	70	78	79	80	81	82	83	84	85	86	147	164

Hay un cromosoma telocéntrico en 98% de las células, 100% de aneuploidía en 1385 células examinadas. Han sido reportados en la literatura 4 marcadores cromosómicos característicos de HeLa: M1 es un arreglo de brazo largo y centrómero del cromosoma 1 y el brazo largo del cromosoma 3; M2 es una combinación del brazo corto del cromosoma 3 y el brazo largo del cromosoma 5; M3 es un isocromosoma del brazo corto del cromosoma 5; M4 consiste en el brazo largo del cromosoma 11 y un brazo del cromosoma 19.
- ◆ Marcadores cromosómicos de HeLa: Una copia de M1, una copia de M2, 4-5 copias de M3 y 2 copias de M4 reveladas por patrones de bandeado G
- ◆ Esterilidad: Resultaron negativas las pruebas para Micoplasma, bacterias y hongos.

- ◆ Especie: Confirmada como humana con pruebas de inmunofluorescencia.
- ◆ Susceptibilidad a virus: Es susceptible a poliovirus tipo 1 y adenovirus tipo 3.
- ◆ Transcriptasa reversa: No detectada
- ◆ Isoenzimas: G6PD tipo A
- ◆ Proporcionada por: W. F. Scherer, Departamento de Microbiología, Cornell University School of Medicine, Nueva York, N. Y.
- ◆ Preparada y caracterizada por: Child Research Center of Michigan, Detroit, MI, y ATCC, Rockville, MD.
- ◆ Medio de cultivo: D_MEM suplementado con glutamina, HEPES, insulina, aminoácidos no esenciales, antibiótico-antimicótico y 10% de suero fetal bovino.

4.1.2. Generalidades sobre la Línea Celular SiHa (Carcinoma escamoso de cérvix humano)

El medio más común para su propagación es el Eagle's MEM con aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio, suplementado con el 10% de suero fetal bovino.

Esta línea se estableció a partir de fragmentos de la muestra del tejido primario obtenido en la cirugía de una paciente japonesa (F. Field, *et al.*, 135: 543-545, 1970). Las células fueron colocadas en matraces de cultivo con medio esencial de Eagle's con 20% de suero fetal bovino. Como se hace comúnmente, se observaron las muestras a los 7-10 días y se observó que solamente las muestras de ésta paciente (1-10) proliferaron para producir una línea celular. Las observaciones al microscopio electrónico revelan la presencia de desmosomas típicos y abundantes tonofilamentos en el citoplasma. Un cultivo de un número desconocido de pases fue depositado en la ATCC en 1973 por Y. Ito. En 1975 se detectó y eliminó contaminación por micoplasmas.

Datos generales de las células SiHa

- ◆ Datos del paciente: 55-años, Sexo femenino, raza mongoloide
- ◆ Crecimiento como: Monocapa, transfiriéndose 1:10 semanalmente.
- ◆ Morfología: Tipo epitelial

- ◆ Citopatología *In vitro*: (P19) Células no diferenciadas de carcinoma
- ◆ En ratón desnudo: Forma un carcinoma epidermoide pobremente diferenciado, Grado III
- ◆ Número de subcultivos seriados a partir del tejido de origen: Desconocido
- ◆ Medio de congelamiento: Medio de cultivo 95% y DMSO 5%, libre de antibióticos.
- ◆ Viabilidad: 97%
- ◆ Medio de cultivo: Medio mínimo esencial Eagle's con aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio 85% y 15% de suero fetal bovino.
- ◆ Isoenzimas: PGM₃, 1; PGM₁, 1; ES D, 2; AK1, 1; ME-2, 1; GLO-1,2; G6PD, B
- ◆ Frecuencia fenotípica: 0.0003
- ◆ Esterilidad: Las pruebas para microplasma, bacterias y hongos fueron negativas.
- ◆ Especie: Confirmada como humana por análisis de isoenzimas.

4.1.3. Generalidades sobre la línea celular de melanoma murino B16

Actualmente hay dos procedimientos usados para aislar poblaciones de células con capacidades metastásicas diferentes a las de la población original. En un principio las células tumorales son seleccionadas *in vivo*. Éstas células son inoculadas subcutáneamente o inoculadas por vía intravenosa a los ratones, y se deja que ocurra la metástasis. Las lesiones metastásicas son después recolectadas y estas células se usan para repetir el procedimiento. El proceso se repite por varias veces. Éste procedimiento fue originalmente utilizado para obtener la línea celular B16-F0 que se seleccionó del melanoma murino B16. Se ve una incrementada capacidad metastásica aunque no resultó en un marcado crecimiento preferencial por un órgano particular. El otro procedimiento ha sido la selección *in vitro* de un fenotipo en particular.

El melanoma B16 ha sido repetidamente pasado en animales y cultivos por varias ocasiones, las observaciones de heterogeneidad metastásica de ésta línea puede ser un artefacto resultante de la longevidad de la línea. Con esta línea y otras se ha demostrado que las líneas recientemente obtenidas no son menos heterogéneas que las de mayor tiempo, en cuanto a su capacidad metastásica.

El melanoma B16 tiene proliferación adecuada en medio de Eagle's modificado (D-MEM) adicionado del 10% de suero fetal bovino, con crecimiento en monocapa.

4.1.4. Generalidades sobre la línea de Carcinoma de Pulmón de Lewis (LL)

- ◆ Número de pases de cultivo: 9; PDL 7 en ATCC
- ◆ Medio de propagación: Medio modificado de Eagle con 4.5 g/L de glucosa (90%) y 10% de suero fetal bovino.
- ◆ Información adicional: La línea celular del Carcinoma de Pulmón de Lewis se estableció a partir del pulmón de ratón de la cepa C57BL que desarrolló carcinoma a partir de la inoculación de el carcinoma primario de Lewis. Los nódulos metastásico se recolectaron y clonaron in vitro. Estas células se duplican en 21 horas, son altamente metastásicas en ratones C57BL y es sensible al metotrexato. Esta línea es ampliamente utilizada como modelo de estudio de metástasis y para conocer los mecanismos de acción de agentes quimioterapéuticos.

4.2. REACTIVOS Y MATERIALES:

4.2.1. MATERIALES

Matraces de cultivo	COSTAR
Microplacas de 96 pozos	COSTAR
Pipetas serológicas desechables estériles	COSTAR
Tubos de centrifuga desechables estériles (15mL)	COSTAR
Criotubos	COSTAR
Filtro μ star LB 0.22 μ m, no pirogénico	COSTAR
Pipetas Pasteur de Vidrio	
Matraces kitasato	
Matraces volumétricos	
Frascos de vidrio (Contenedores para reactivos)	
Hematocitómetro (Cámara de Neubauer)	

4.2.2. EQUIPO

Campana de flujo laminar
Microscopio invertido
Microscopio óptico
Lector de microplacas
Pipetor automático
Centrífuga
Baño a 37°C
Incubadora a 37 \pm 2°C y 5% de CO ₂
Refrigerador a 4°C
Termómetro
Autoclave
Bomba de vacío
Tanque de Nitrógeno líquido
Balanza analítica

4.2.3. REACTIVOS**PARA EL CULTIVO DE LAS CÉLULAS:**

Medio D-MEM	GIBCO
Suero fetal bovino	SIGMA
Antibiótico-antimicótico: Penicilina G sódica, Sulfato de estreptomina y anfotericina B	GIBCO

PARA LAVADO DE LAS CÉLULAS EN LA CAJA DE CULTIVO (PBS)

Cloruro de sodio	BAKER
Fosfato monobásico de potasio	SIGMA
Fosfato dibásico de sodio	BAKER
Cloruro de potasio	MERCK

PARA DESPRENDER LAS CÉLULAS DE LA CAJA DE CULTIVO**PBS-EDTA**

Cloruro de sodio	BAKER
Fosfato monobásico de potasio	SIGMA
Fosfato dibásico de sodio	BAKER
Cloruro de potasio	MERCK
EDTA (sal disódica dihidratada)	BAKER

TRIPSINA

SIGMA

MEDIO DE CONGELAMIENTO:

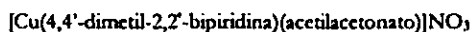
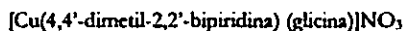
Suero fetal bovino	SIGMA
Dimetilsulfóxido	MALLINCKRODT
Nitrógeno líquido	

REACTIVOS PARA LECTURA DE RESULTADOS

Sulforrodamina-B	SIGMA
Tris(hidroximetil)aminometano (Tris-base)	MERCK
Ácido acético	

FÁRMACOS

Se escogieron las siguientes Casiopeínas con el propósito de observar el efecto del ligante cargado (N-O) u (O-O), con la misma diimina:



Con el propósito de ver el efecto de la diimina se comparan las casiopeínas con el mismo ligante cargado (acetilacetato) y se modifica la diimina



La cuarta Casiopeína se eligió para observar el efecto del aumento de asimetría en la estructura.

Fármaco	Nombre Trivial
$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{glicina})]\text{NO}_3$	Casiopeína IV
$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$	Casiopeína III-I
$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$	Casiopeína III-E
$[\text{Cu}(5\text{-NO}_2\text{-1,10-fenantrolina})(\text{serina})]\text{NO}_3$	Casiopeína V
ABIPLATIN (Cisplatino)	Cisplatino

MEDIO D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*)

Composición: mg/L

◆ Sales inorgánicas

CaCl ₂ (anhidro)	200.00
Fe(NO ₃)·9H ₂ O	0.10
KCl	400.00
MgSO ₄	97.67
NaCl	6400.00
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125.00

◆ Otros componentes	
D-Glucosa	4500.00
Rojo de fenol	15.00
◆ Aminoácidos	
L-Arginina·HCl	84.00
L-Cistina·2HCl	62.57
L-Glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-Histidina·HCl·H ₂ O	42.00
L-Isoleucina	105.00
L-Leucina	105.00
L-Lisina·HCl	146.00
L-Metionina	30.00
L-Fenilalanina	66.00
L-Serina	42.00
L-Treonina	95.00
L-Triptofano	16.00
L-Tirosina·2Na·2H ₂ O	103.75
L-Valina	94.00
◆ Vitaminas	
D-Pantotenato de calcio	4.00
Cloruro de colina	4.00
Ácido Fólico	4.00
i-Inositol	7.20
Niacinamida	4.00
Piridoxal·HCl	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina·HCl	4.00

Este medio ya se obtiene preparado comercialmente, solamente debe ser suplementado con el 10% de suero fetal bovino a medida que se va utilizando. El medio debe conservarse en refrigeración.

Como control de contaminación es recomendable incubar una alícuota del medio a 37°C durante dos días. Si al término de este tiempo hay turbidez en el medio y vira el indicador a color amarillo, es señal de que hay contaminación.

PREPARACIÓN DE PBS

Para preparar 1L de PBS:

NaCl	8.015 g.
KCl	0.224 g.
KH ₂ PO ₄	0.272 g.
Na ₂ HPO ₄	1.136 g.

- Disolver las sales anteriores en 900 mL de agua desionizada.
- Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1N o con NaOH 1N
- Adicionar agua desionizada hasta completar un volumen de 1 L.
- Repartir la solución en alícuotas y esterilizar por autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in² y 121° C.
- Guardar la solución a temperatura ambiente, o bien, en refrigeración.

PREPARACIÓN DE PBS-EDTA

Para preparar 1L de PBS-EDTA:

NaCl	8.000 g
KH ₂ PO ₄	0.240 g.
Na ₂ HPO ₄	1.440 g.
KCl	0.200 g.
EDTA (sal disódica dihidratada)	0.372 g.
Agua desionizada c.b.p.	1.00 L

- Disolver las sales anteriores en 900 mL de agua desionizada.
- Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1N
- Adicionar agua desionizada hasta completar un volumen de 1L
- Repartir la solución en alícuotas y esterilizar por autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in² y 121°C.
- Guardar la solución a temperatura ambiente, o bien, en refrigeración.

PREPARACIÓN DE PBS-ALBÚMINA

Para preparar 1L de solución.

NaCl	8.000 g
KH ₂ PO ₄	0.240 g.
Na ₂ HPO ₄	1.440 g.

KCl	0.200 g.
Albúmina	2.500 g.

- Disolver las sales en 400 mL de agua desionizada.
- Adicionar la albúmina a la solución, con agitación moderada disolver la albúmina evitando la formación de espuma.
- Adicionar agua desionizada hasta completar el volumen de 1L.
- Esterilizar por filtración con membrana.
- Guardar la solución alicuotada en congelación.

PREPARACION DE LA SOLUCIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO

Para 1L de solución

Ácido acético	10.0 mL
Agua desionizada c.b.p.	1 L

- A un volumen de aproximadamente 400 mL de agua desionizada adicionar el ácido acético, mezclar para homogeneizar
- Adicionar agua desionizada hasta completar el volumen de 1L

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SULFORRODAMINA-B

Para 1 L de solución:

Sulforrodamina-B	4.00 g.
Ácido acético al 1% c.b.p.	1 L.

- Disolver la sulforrodamina en un volumen pequeño de ácido acético preparado como se mencionó con anterioridad, agitar hasta disolución, mezclar.
- Adicionar ácido acético al 1% hasta completar el volumen a 1L.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRIS-BASE

Tris(hidroximetil)aminometano	1.2114 g.
Agua destilada c.b.p.	1 L.

- Colocar el reactivo en un matraz volumétrico de un litro, con un volumen pequeño de agua destilada, agitar hasta disolución.
- Adicionar agua destilada hasta completar el volumen, agitar para homogeneizar la disolución

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRIPSINA AL 2.5%

Tripsina 2.50 g.

PBS c.b.p. 100 ml

- a) Disolver la Tripsina con un volumen pequeño de PBS, preparado como se mencionó con anterioridad, agitar moderadamente.
- b) Llevar al volumen con PBS
- c) Esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μm . Alicuotar y conservar en congelación.

4.3 METODOLOGÍA

4.3.1. DESCONGELAMIENTO DE LAS CÉLULAS

Las células se encuentran originalmente en los criotubos, para proceder al descongelamiento de las células, se debe tener la campana de flujo laminar estabilizada, encendida al menos 30 minutos antes de iniciar el trabajo y tener un baño de agua a 37°C, se saca el criotubo del tanque con Nitrógeno líquido y se introduce cuidadosamente al baño, en la campana de flujo laminar se prepara un tubo con 10 ml de medio D-MEM (tanto el medio como el tubo deben estar estériles), en cuanto se observa el descongelamiento, se pasa la suspensión celular al tubo ya preparado y se centrifuga durante 10 min. a 2000 rpm, el sobrenadante se desecha y el paquete celular se vuelve a resuspender en medio para un lavado, se centrifuga nuevamente y se elimina el sobrenadante, el paquete celular se resuspende en una pequeña cantidad de medio de cultivo y se procede a la siembra en los matraces de cultivo.

4.3.2. OBTENCIÓN DEL CULTIVO STOCK A CONFLUENCIA

Las células después de haber sido lavadas se colocan en matraces de cultivo de 25 cm², con 5ml de medio de cultivo adicionado con 10% de suero fetal bovino (4.5 ml de D-MEM y 0.5 ml de SFB), éste cultivo se incuba a 37°C ± 2° C y 5% de CO₂. Se debe revisar diariamente el cultivo para estimar el porcentaje de confluencia, si aún no se ha alcanzado al menos el 70%, se cambia el medio de cultivo cada 48 horas.

Si el medio de cultivo vira a color amarillo y se observa turbio es un indicador de contaminación microbiológica, aunque la coloración amarilla también se puede deber a que el cultivo ya se encuentre a confluencia y por ello acidificó el medio.

4.3.3. TRIPSINIZACIÓN

Una vez que se obtiene el cultivo Stock a confluencia se aspira el medio de cultivo de la caja, se lava con 5 ml de PBS estéril que después también será aspirado, posteriormente se adicionan 3 ml de PBS-EDTA y 2 ml de la solución de Tripsina (24), se agita hasta que, al microscopio se observen las células desprendidas de la superficie y separadas individualmente. Se para la reacción de la Tripsina adicionando 5 ml de PBS-Albúmina, ésta suspensión se coloca en un tubo y se procede a centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se desecha y el paquete celular se resuspende en 1 ml de medio de cultivo.

4.3.4. CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS

El uso de la cámara de Neubauer y la cuantificación de viabilidad con azul tripano ha sido muy utilizada y recomendada por su sencillez y por dar muy buenos resultados (24,25).

Se debe limpiar cuidadosamente la superficie del hematocitómetro con una solución de isopropanol al 70% y se deja secar.

Por separado en un tubo Eppendorf se colocan 20µL de la suspensión de células y 80µL de solución de azul tripano, se mezcla perfectamente y se transfiere cuidadosamente a las dos secciones de la cámara. Se coloca el Hematocitómetro en el microscopio óptico utilizando el objetivo de 10X, y se procede a contar el número de células, teñidas y no teñidas por mm², para que el conteo sea más preciso se recomienda que la cuenta sea de entre 100 y 500 células por mm², la cuenta se repite en las otras secciones y después se hacen los cálculos correspondientes a la viabilidad y a el número de células por mL de suspensión.

$$C = \bar{N} * 10^4$$

Donde:

C = Células por mililitro

\bar{N} = Promedio de células contadas

10⁴ = Factor de conversión de la cámara

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{(\text{Tot} - \text{Teñ})}{\text{Tot}} * 100$$

Donde:

Tot = Total de células contadas

Teñ = Células teñidas

4.3.5. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN (20, 28, 29)

A partir del cultivo Stock a confluencia obtenido del pase correspondiente para cada línea celular, se prepara una dilución celular de 10⁶ células/ml del cual se agregará un volumen de 20 µl a cada pozo de la microplaca para tener 2*10⁴ células/pozo, En los pozos donde se colocan las células ya debe haber 100µl de medio adicionado con SFB. En seguida se incubarán a 37° C y 5% de CO₂ por 24 horas para que se recuperen de la tripsinización. Al término de las 24 horas se aspira el medio y se adicionan 90µl de medio con SFB y 10µl de cada una de las concentraciones de fármacos (Casiopéinas y Cisplatino), los fármacos se agregan inmediatamente después de preparadas las disoluciones para evitar la degradación de los compuestos, y se incuban por 24 horas. Después se aspira el medio y se fijan las células con

100µl de ácido tricloroacético al 10% durante una hora a 4° C. Se lavan 5 veces con agua y se dejan secar a temperatura ambiente. De aquí pasan a la tinción.

4.3.6. TINCIÓN CON SULFORRO DAMINA-B Y LECTURA

Se adicionan 100µl de la solución de sulforrodamina-B a cada uno de los pozos con células, y se dejan en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavan 4 veces con ácido acético al 1%, cuidando aspirar completamente el ácido en cada lavado. Se dejan secar a temperatura ambiente, el colorante que ha sido incorporado por las células se solubiliza con 100µl de Tris base 10mM (pH 10.5) durante 5 minutos y con agitación mecánica suave. Finalmente el colorante celular se lee en un lector de microplacas a 564 nm.

4.3.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA (CI50) INDUCIDA POR LOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICAS.

Se determina en cada línea y Casiopeína la capacidad para inducir el 50% de inhibición de la capacidad proliferativa, así como de muerte celular inducida. Se considerará la proliferación celular máxima (100%) de los cultivos control. Se utiliza el programa Probit (Log Probit Analysis by Maximum Likelihood) donado por los laboratorios Novartis.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**5.1 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN EN CARCINOMA CÉRVICO -UTERINO.**

5.1.1 Porcentajes de sobrevivencia de la línea celular HeLa expuesta a las concentraciones de fármacos durante 24 horas, comparando con un cultivo control en las mismas condiciones sin la adición de fármacos.

Tabla No. 6. Inhibición de la proliferación en la línea HeLa

CONCENTRACION (ppm)	IV	V	III-I	III-E	Cis-Pt
0.01	99	90	94	96	90
0.10	85	88	87	90	86
1.00	68	83	81	82	81
10.00	67	69	50	69	74

5.1.2 Porcentajes de sobrevivencia celular de la línea SiHa expuesta a las concentraciones de los fármacos a prueba.

Tabla No. 7. Inhibición de la proliferación en la línea SiHa

CONCENTRACION (ppm)	IV	V	III-I	III-E	Cis-Pt
0.01	52	62	54	67	93
0.10	31	47	30	59	80
1.00	26	39	21	33	56
10.00	24	6	8	21	46

5.1.3 Porcentajes de sobrevivencia celular de la línea InBl expuesta a las concentraciones de los fármacos a prueba.

Tabla No. 8. Inhibición de la proliferación en la línea InBl

CONCENTRACION (ppm)	IV	V	III-I	III-E	Cis-Pt
0.01	100	100	93	98	92
0.10	99	100	81	92	88
1.00	91	94	65	54	80
10.00	80	76	33	28	35

Figura No. 3

Efecto de los Fármacos sobre el cultivo de la línea de CaCU HeLa

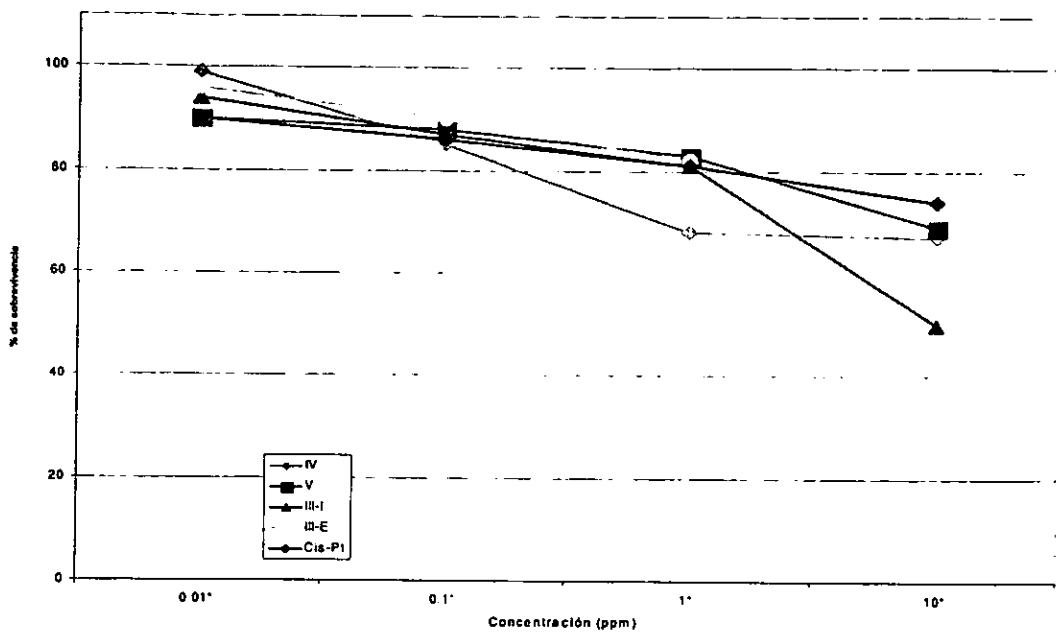


Figura No. 4

Efecto de los fármacos sobre el cultivo de la línea de CaCU InBI

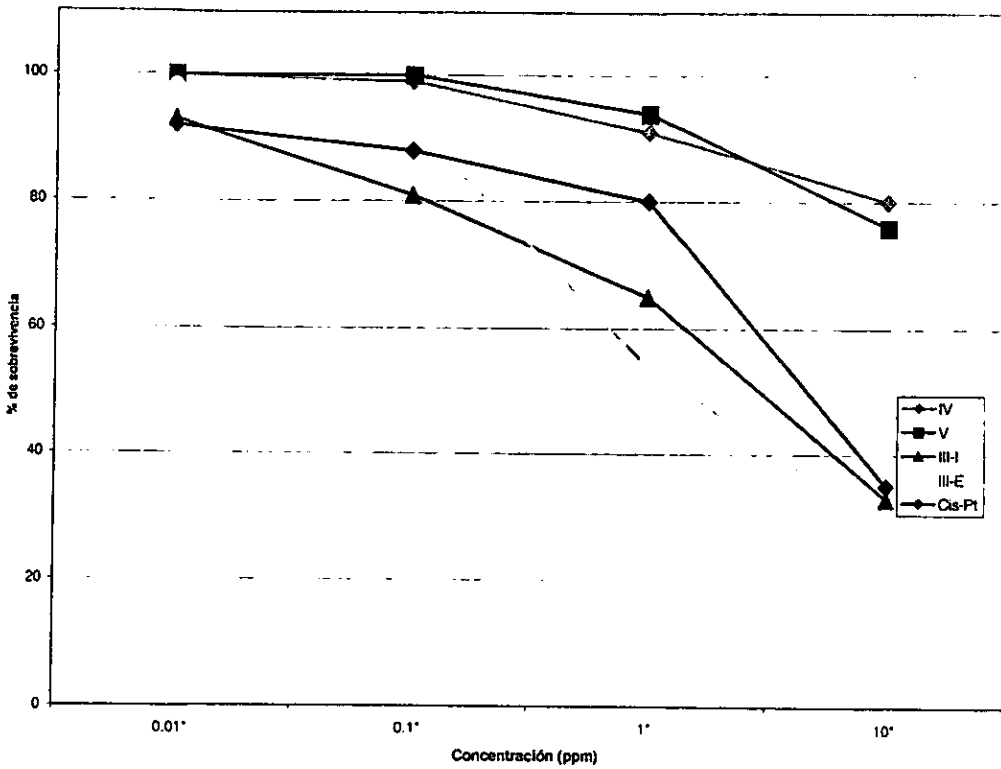
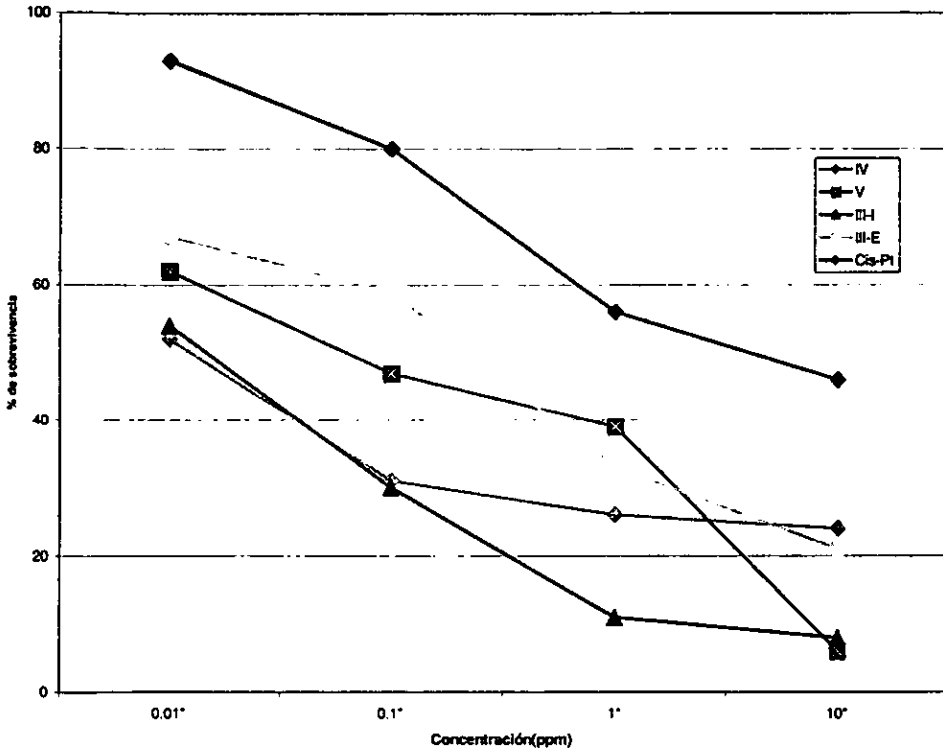


Figura No. 5

Efecto de los fármacos sobre el cultivo de la línea de CaCU SIHa



5.2. CONCENTRACIONES INHIBITORIAS MEDIAS OBTENIDAS CON LOS DATOS ANTES MENCIONADOS Y EL ANÁLISIS CON EL PROGRAMA PROBIT (LOG PROBIT ANALYSIS BY MAXIMUM LIKELIHOOD) (VER LAS TABLAS DE ANÁLISIS EN EL ANEXO)

Tabla No.9. Concentraciones Inhibitorias medias para carcinoma cérvico-uterino

CASIOPEINA	HeLa (ppm)	SiHa (ppm)	InBl (ppm)
IV	34.65	0.0049	138.28
V	1274.69	0.0667	49.44
III-I	16.84	0.0122	2.64
III-E	35.83	0.1505	1.93
Cis-Pt	11582.87	4.0016	5.62

Como se puede observar de los resultados expuestos, las Casiopeínas son especialmente selectivas a la línea celular de carcinoma cérvico-uterino SiHa, al igual que el Cisplatino que fue utilizado como fármaco control ya que es el que se usa preferencialmente para el tratamiento de CaCU por lo que, al parecer, las Casiopeínas en estudio son más selectivas a células del tipo escamoso (SiHa) que a células de tipo epitelioide (HeLa, InBl), las concentraciones inhibitorias medias son muy pequeñas, comparándolas con las obtenidas con los mismos fármacos en las otras dos líneas celulares de prueba e inclusive contra el Cisplatino, por lo que en cualquiera de ellas se tiene una opción mucho más potente que éste, especialmente con las Casiopeína IV y III-I quienes tienen como donador diimina la (4,4-dimetil-2,2'-bipiridina) y sólo varían en el donador (N-O) (O-O) presentando mayor actividad la Casiopeína IV con donador (O-O) acetilacetato.

En la línea celular HeLa todas las Casiopeínas de prueba mostraron mayor actividad que el Cisplatino por lo que se consideran también como una buena propuesta que deberá seguirse investigando con la probabilidad de obtener una terapia más efectiva que la que actualmente se tiene, nuevamente las Casiopeínas que presentan mayor actividad son la Casiopeína III-I y la Casiopeína IV, con donador (4,4-dimetil-2,2'-bipiridina) aunque aquí la de mayor actividad es la que presenta donador (N-O) glicina.

En la Línea celular InBl tiene el comportamiento de las Casiopeínas es muy distinto al que se tiene en SiHa y HeLa, las concentraciones inhibitorias son mucho mayores, no así para el Cisplatino y nuevamente una de las Casiopeínas que presenta mayor actividad es la Casiopeína III-I aunque la IV, que se esperaba que tuviera una actividad mayor que la del

fármaco control no la tuvo, la Casiopeína con CI50 menor en este caso fue la Casiopeína III-E que al igual que la III-I tiene como donador (O-O) el acetilacetato; La explicación a esto es que en la molécula una parte (el donador N-N) es responsable de la magnitud de la actividad, mientras que la otra (donador (O-O) u (N-O)) es la responsable de la selectividad de los fármacos hacia las líneas celulares (39).

En los tres casos, la Casiopeína III-I está entre los dos fármacos (de los investigados en este trabajo) con mayor actividad inhibitoria de la proliferación, además de que el valor de CI50 fue siempre menor que el del Cisplatino por lo que se tiene como una de las mejores opciones para continuar con investigaciones más profundas, al menos hasta el momento.

Según los resultados, el grado de actividad de una molécula será mayor en cuanto se tenga como donador (N-N) una molécula neutra, simétrica y con alta densidad electrónica (bipiridina) pero que no sea tan alta como la de una fenantrolina.

Debe destacarse que en estos estudios no se está tomando en cuenta ningún factor metabólico, y que las Casiopeínas, en su estado original son las que presentan estos grados de actividad, a demás de que se ha demostrado por otros estudios que permanecen estables en soluciones acuosas durante varios días (9) por lo que un posible efecto de degradación se descarta.

5.3. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN EN MELANOMA MURINO B16 CARCINOMA DE PULMÓN DE LEWIS (LL).

5.3.1. Porcentajes de sobrevivencia celular de la línea B16 expuesta a las concentraciones de los fármacos a prueba.

Tabla No.10. Inhibición de la proliferación en la línea B16

CONCENTRACION (ppm)	IV	V	III-I	III-E	Cis-Pt
0.01	99	100	100	96	94
0.10	97	97	99	90	93
1.00	96	94	97	82	89
10.00	73	90	93	59	58

5.3.2. Porcentajes de sobrevivencia celular de la línea LL expuesta a las concentraciones de los fármacos a prueba.

Tabla No.11. Inhibición de la proliferación en la línea LL

CONCENTRACION (ppm)	IV	III-I	III-E	Cis-Pt
0.01	96	100	100	100
0.10	87	94	98	97
1.00	81	93	75	82
10.00	79	90	74	80

Figura No. 6

Efecto de los fármacos sobre el cultivo de melanoma murino B16

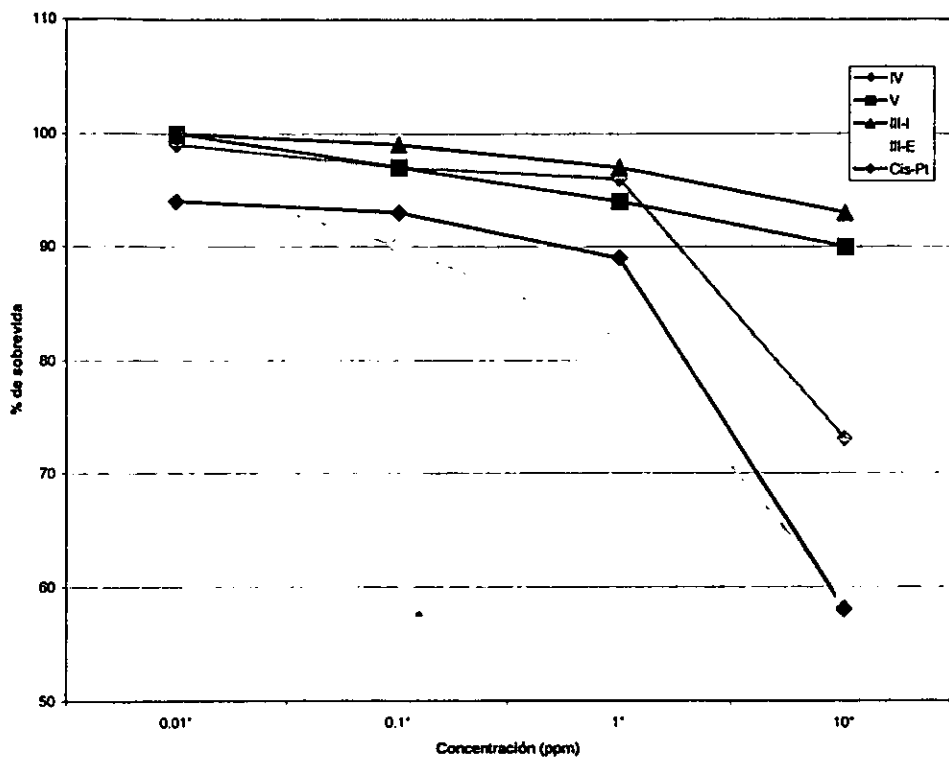
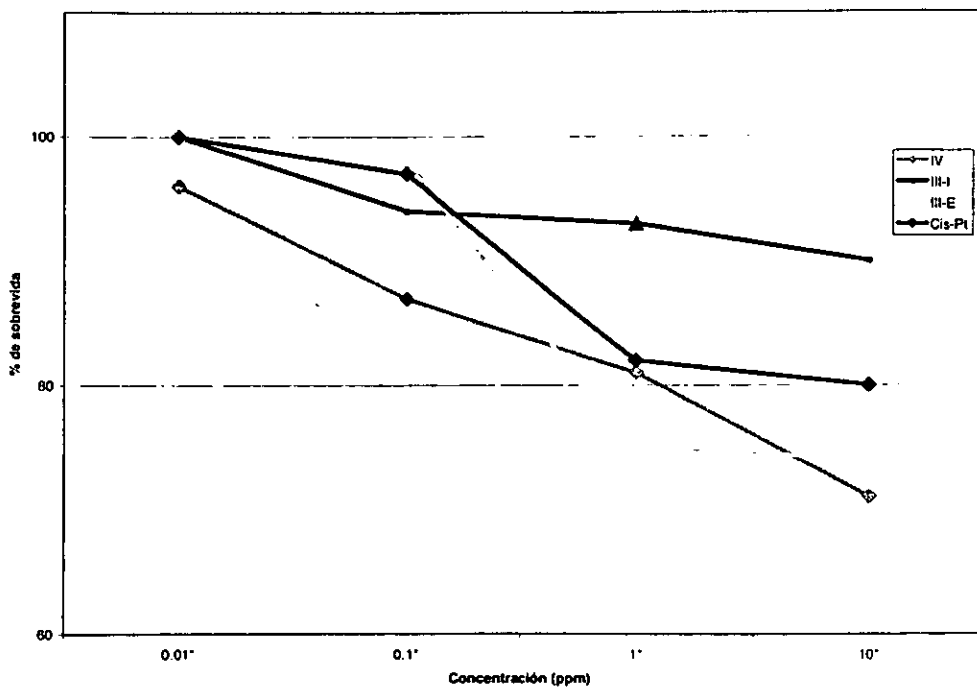


Figura No. 7

Efecto de los Fármacos sobre el cultivo de células de carcinoma de Pulmón de Lewis (LL)



**5.4 CONCENTRACIONES INHIBITORIAS MEDIAS
CALCULADAS PARA LOS CULTIVOS DE MELANOMA B16 Y
CARCINOMA DE PULMÓN DE LEWIS (LOG PROBIT ANALYSIS
BY MAXIMUM LIKELIHOOD)**

Tabla No. 12. Concentraciones Inhibitorias medias para B16 y LL

CASIOPEINA	B16 (ppm)	LL (ppm)
IV	126.33	285.38
V	10960.07	-
III-I	10761.52	19885.5 *10 ⁵
III-E	35.83	51.68
Cis-Pt	55.71	188.24

¹²³ Las concentraciones inhibitorias medias de los cultivos de melanoma y carcinoma murino obtenidos con las Casiopeínas a prueba son mucho mayores a las obtenidas en los cultivos de carcinoma cérvico-uterino, esto es de esperarse por su similitud estructural al Cisplatino que también presenta este efecto. En ambos casos (melanoma y carcinoma de pulmón) solamente una de las Casiopeínas presenta actividad mayor que la del Cisplatino y es la Casiopeína III-E, nuevamente el ligante (O-O) acetilacetato es, al parecer, el responsable de la selectividad ya que la siguiente Casiopeína (en orden decreciente de actividad) es la Casiopeína IV.

En el caso de la Casiopeína 5-Nitro-(serina) no presenta actividad inhibitoria de la proliferación para el carcinoma de pulmón de Lewis, por lo que su concentración inhibitoria media no puede ser calculada.

En este ensayo se utilizó Cisplatino a pesar de no ser el fármaco de elección primaria para este tipo de padecimiento, sin embargo era el fármaco disponible en el momento y con el que esperamos una similitud en la actividad por su analogía estructural, observamos que su concentración inhibitoria media es alta, y los compuestos que tengan el mismo valor o uno superior, no serán efectivos en el tratamiento del padecimiento, al menos no directamente, tal vez se puedan utilizar si en un proceso de metabolismo sufren una activación que los haga efectivos en carcinomas pulmonares o en melanoma.

En ambos casos se trata de líneas celulares altamente metastásicas por lo que su tratamiento se complica, se ha propuesto que algunos de los mecanismos de resistencia a los fármacos se adquieren cuando la población se heterogeniza debido a la alta tasa de crecimiento, las células mutadas resistentes al fármaco son las que sobreviven y se va desarrollando la población resistente, por ello, se explica la baja actividad de las Casiopeínas y del Cisplatino.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Las Casiopeínas, después de este estudio, continúan como un recurso prometedor en el tratamiento del cáncer, se ha demostrado que son una opción, ya que en muchos de los casos presenta mayor actividad inhibitoria de la proliferación celular que el fármaco utilizado como control (Cisplatino) además la toxicidad aguda de las 4 casiopeinas evaluadas es menor que la de éste (9).

Son en especial eficientes en líneas celulares de Carcinoma cérvico-uterino (SiHa, HeLa e InB) al igual que el Cisplatino, aunque también presentan actividad inhibitoria en carcinoma de pulmón de Lewis y Melanoma murino (de pequeña magnitud).

Las Casiopeínas que resultaron más activas son:

- Casiopeína III-I: $[\text{Cu}(4,4\text{-dimetil-}2,2'\text{-bipiridina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$
- Casiopeína IV $[\text{Cu}(4,4\text{-dimetil-}2,2'\text{-bipiridina})(\text{glicina})]\text{NO}_3$
- Casiopeína III-E $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-}1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$

Por lo que se concluye que por parte del ligante (N-N) se establece el grado de actividad de la molécula, al parecer las moléculas son más activas mientras sean en esta porción simétricas y con un menor tamaño (bipiridinas en lugar de fenantrolinas) y por el lado del ligante (N-O) u (O-O) se establece el grado de selectividad de las moléculas por las distintas líneas celulares, siendo mayor la selectividad, en el caso de carcinomas cérvico-uterinos por los ligantes tipo aminoacidatos como la glicina y la serina, especialmente la glicina (probablemente por su tamaño, la serina tiene un mayor impedimento estérico) y en el caso del carcinoma de pulmón y el melanoma murino, por moléculas de tipo (O-O) como el acetilacetato.

Se observa que la actividad tanto de las Casiopeínas como del Cisplatino es baja para las líneas celulares altamente metastásicas y que en este caso son las murinas (Carcinoma de pulmón de Lewis y melanoma murino B16).

La línea celular en la que se presenta mayor actividad es SiHa, carcinoma cérvico-uterino de tipo escamoso y no epitelial por lo que en este punto también se demuestra la alta selectividad de los compuestos (de las cuatro Casiopeínas evaluadas en esta oportunidad).

Es importante mencionar que las Casiopeínas no son simétricas, como lo establecen los postulados de Rosenber, sin embargo han demostrado actividad antineoplásica en diversos sistemas de prueba.

En ninguno de los estudios aquí mencionados se tomaron en cuenta efectos metabólicos que pueden activar o disminuir la actividad de los compuestos de prueba por lo que se sugieren como siguientes pasos:

- Evaluación de la actividad antineoplásica siguiendo la misma metodología pero agregando fracción microsomal S9 para estimar el grado de actividad de compuestos metabolizados.
- Evaluación de la actividad antineoplásica *in vivo* utilizando ratones (desnudos para el caso de líneas celulares humanas).
- Evaluación de la toxicidad crónica de las Casiopeínas en estudio.
- Continuar con estudios clínicos veterinarios en pequeñas especies
- Proponer mecanismos de acción a través de una relación estructura-actividad cuantitativa.

CAPITULO VII

ANEXOS

6.1. Tabla No. 13. Análisis de datos por Probit

CARCINOMA CERVICOUTERINO HeLa

Casiopcina	Dosis	Respuesta	Respuesta Neta	Esperado	Chi cuadrada	
IV	0.01	1	1	4.99	3.36	
	0.10	15	15	11.88	0.93	
	1.00	32	32	23.70	3.81	
	10.00	33	33	40.09	2.09	
	CL50 = 34.65					
	CL90 = 19613.75					
M = 0.46497 ± 0.073 *CIEV = 15.73						
B = 4.284088 ± 0.076 *CIEV = 1.78						
Chi cuadrada total = 10.18779 Grados de libertad = 2						
Número de ciclos: 4						
Factor de heterogeneidad = 5.093894						
V	0.01	10	9.99	8.33	0.37	
	0.10	12	12	13.33	0.15	
	1.00	17	17	20.00	0.56	
	10.00	31	31	28.42	0.33	
	CL50 = 1274.69					
	CL90 = 67.43 *10 ⁶					
M = 0.270988 ± 0.069 *CIEV = 25.59						
B = 4.158472 ± 0.077 *CIEV = 1.86						
Chi cuadrada total = 1.404801 Grados de libertad = 2						
Número de ciclos: 3						
Factor de heterogeneidad = 0.702401						
III-I	0.01	6	6	4.61	0.44	
	0.10	13	13	12.26	0.05	
	1.00	19	19	26.11	2.62	
	10.00	50	50	45.30	0.89	
	CL50 = 16.84					
	CL90 = 4768.47					
M = 0.521997 ± 0.069 *CIEV = 25.59						
B = 4.158472 ± 0.077 *CIEV = 1.86						
Chi cuadrada total = 4.35989 Grados de libertad = 2						
Número de ciclos: 3						
Factor de heterogeneidad = 2.000253						
III-E	0.01	4	4	3.43	0.10	
	0.10	10	9.99	9.54	0.02	
	1.00	18	18	21.30	0.62	
	10.00	31	31	38.83	0.20	
	CL50 = 35.83					
	CL90 = 11297.92					
M = 0.512244 ± 0.078 *CIEV = 15.21						
B = 4.203877 ± 0.078 *CIEV = 1.86						
Chi cuadrada total = 0.9697156 Grados de libertad = 2						
Número de ciclos: 3						
Factor de heterogeneidad = 0.484858						
Cis-Pt	0.01	10	9.99	9.85	0.002	
	0.10	14	14	14.06	0.00	
	1.00	19	19	19.36	0.008	
	10.00	26	26	25.72	0.003	
	CL50 = 11582.867					
	CL90 = 12022.536					
M = 0.212760 ± 0.068 *CIEV = 32.08						
B = 4.135384 ± 0.078 *CIEV = 1.88						
Chi cuadrada total = 0.0152678 Grados de libertad = 2						
Número de ciclos: 2						
Factor de heterogeneidad = 0.007634						

CARCINOMA CERVICOUTERINO SiHa

<i>Casiopina</i>	<i>Dosis</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Respuesta Neta</i>	<i>Esperado</i>	<i>Chi cuadrada</i>
IV	0.01	48	48	53.05	1.02
	0.10	69	69	62.73	1.68
	1.00	74	74	71.67	0.27
	10.00	76	76	79.43	0.72
	CI.50 = 0.004922				
CI.90 = 703.253174					
M = 0.248303 ± 0.059 *%CEV = 23.99					
B = 5.573053 ± 0.075 *%CEV = 1.34					
Chi cuadrada total = 3.689909 Grados de libertad = 2					
Número de ciclos: 4					
Factor de heterogeneidad = 1.844954					
I'	0.01	38	38	33.61	0.865
	0.10	53	53	53.60	0.014
	1.00	61	61	72.71	6.914
	10.00	94	94	86.82	4.506
	CI.50 = 0.066669				
CI.90 = 20.685032					
M = 0.513699 ± 0.063 *%CEV = 12.35					
B = 5.604149 ± 0.079 *%CEV = 1.41					
Chi cuadrada total = 12.3012 Grados de libertad = 2					
Número de ciclos: 4					
Factor de heterogeneidad = 6.150599					
III-I	0.01	46	46	48.09	0.1747
	0.10	70	70	69.09	0.039
	1.00	89	89	85.19	1.152
	10.00	92	91.99	94.42	1.107
	CI.50 = 0.012239				
CI.90 = 2.698926					
M = 0.546217 ± 0.071					
B = 6.044503 ± 0.095					
Chi cuadrada total = 2.4734 Grados de libertad = 2					
Número de ciclos: 4					
Factor de heterogeneidad = 1.2367					
III-E	0.01	33	33	30.14	0.38
	0.10	41	41	46.87	1.384
	1.00	67	66.99	64.18	0.346
	10.00	79	79	78.96	0.0001
	CI.50 = 0.150553				
CI.90 = 118.925812					
M = 0.441747 ± 0.060 *%CEV = 13.70					
B = 5.363254 ± 0.074 *%CEV = 1.38					
Chi cuadrada total = 2.11789 Grados de libertad = 2					
Número de ciclos: 3					
Factor de heterogeneidad = 1.058945					
Gr-Pr	0.01	7	7	8.67	0.351
	0.10	20	20	20.09	0.000
	1.00	44	44	37.63	1.726
	10.00	54	54	58.24	0.740
	CI.50 = 4.001658				
CI.90 = 1118.456909					
M = 0.523222 ± 0.066 *%CEV = 12.72					
B = 4.684895 ± 0.072 *%CEV = 1.53					
Chi cuadrada total = 2.818459 Grados de libertad = 2					
Número de ciclos: 3					
Factor de heterogeneidad = 1.409229					

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CARCINOMA CERVICOUTERINO InBI

<i>Casiopina</i>	<i>Dosis</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Respuesta Neta</i>	<i>Esperado</i>	<i>Chi cuadrada</i>
IV	0.01	0	0	0.21	0.21
	0.10	1	1	1.47	0.15
	1.00	9	9	3.89	0.70
	10.00	20	20	21.45	0.12
	CI.50 = 138.284744				
CI.90 = 9703.149414					
M = 0.693339 ± 0.037 *%CEV = 5.32					
B = 3.515717 ± 0.11 *%CEV = 3.41					
Chi cuadrada total = 1.179549 Grados de libertad = 2					
Número de ciclos: 4					
Factor de heterogeneidad = 0.589775					
V	0.01	0	0	0.014	0.000
	0.10	0	0	0.408	0.410
	1.00	6	6	4.813	0.307
	10.00	24	24	24.779	0.032
	CI.50 = 49.44				
CI.90 = 995.05					
M = 0.981775 ± 0.19 *%CEV = 129.59					
B = 3.336791 ± 0.16 *%CEV = 4.93					
Chi cuadrada total = 0.7500015 Grados de libertad = 2					
Número de ciclos: 5					
Factor de heterogeneidad = 0.375001					
III-I	0.01	7	7	6.23	0.10
	0.10	19	19	18.35	0.02
	1.00	35	35	39.44	0.82
	10.00	67	67	64.29	0.32
	CI.50 = 2.643835				
CI.90 = 275.853577					
M = 0.634152 ± 0.070 *%CEV = 11.06					
B = 4.732239 ± 0.073 *%CEV = 1.54					
Chi cuadrada total = 1.275616 Grados de libertad = 2					
Número de ciclos: 3					
Factor de heterogeneidad = 0.004918					
III-B	0.01	2	2	1.63	0.08
	0.10	8	8	11.48	1.19
	1.00	46	46	39.50	1.77
	10.00	72	72	74.82	0.42
	CI.50 = 1.93				
CI.90 = 45.05					
M = 0.935091 ± 0.087 *%CEV = 9.31					
B = 4.733664 ± 0.078 *%CEV = 1.65					
Chi cuadrada total = 3.465511 Grados de libertad = 2					
Número de ciclos: 3					
Factor de heterogeneidad = 1.732755					
Cis-Pr	0.01	8	8	4.20	3.59
	0.10	12	12	13.58	0.21
	1.00	20	20	31.88	6.50
	10.00	65	65	56.26	3.10
	CI.50 = 5.62				
CI.90 = 611.20					
M = 0.628458 ± 0.074 *%CEV = 11.80					
B = 4.529001 ± 0.074 *%CEV = 1.64					
Chi cuadrada total = 13.40865 Grados de libertad = 2					
Número de ciclos: 5					
Factor de heterogeneidad = 6.704323					

CARCINOMA DE PULMÓN DE LEWIS

<i>Carboplatina</i>	<i>Dosis</i>	<i>Respuesta</i>	<i>Respuesta Neta</i>	<i>Esperado</i>	<i>Chi cuadrada</i>
IV	0.01	4	4	5.44	0.40
	0.10	13	13	10.68	0.56
	1.00	19	19	18.84	0.002
	10.00	29	29	30.01	0.05
	CI.50 = 285.38 CI.90 = 1026357.50 M = 0.359968 ± 0.072 %CEV = 20.49 B = 4.116127 ± 0.079 %CEV = 1.91 Chi cuadrada total = 1.018352 Grados de libertad = 2 Número de ciclos: 3 Factor de heterogeneidad = 0.509176				
III-I	0.01	0	0	0.001	0.002
	0.10	6	6	5.74	0.012
	1.00	7	7	7.53	0.041
	10.00	10	9.99	9.72	0.009
	CI.50 = 1988548992 CI.90 = 29594*10 ⁴ M = 0.139545 ± 0.13 %CEV = 94.77 B = 3.702437 ± 0.16 %CEV = 4.31 Chi cuadrada total = 0.0619271 Grados de libertad = 2 Número de ciclos: 3 Factor de heterogeneidad = 0.061927				
III-E	0.01	0	0	1.04	1.05
	0.10	2	2	4.56	1.51
	1.00	25	25	14.32	9.30
	10.00	26	26	32.86	2.13
	CI.50 = 51.68 CI.90 = 5893.77 M = 0.622254 ± 0.097 %CEV = 15.62 B = 3.933858 ± 0.089 %CEV = 2.28 Chi cuadrada total = 13.99718 Grados de libertad = 2 Número de ciclos: 4 Factor de heterogeneidad = 6.998589				
Cis-Pr	0.01	0	0	1.10	1.11
	0.10	3	3	3.97	0.24
	1.00	18	18	11.15	4.74
	10.00	20	20	24.73	1.20
	CI.50 = 188.24 CI.90 = 46111.45 M = 0.535768 ± 0.099 %CEV = 18.61 B = 3.781279 ± 0.094 %CEV = 2.48 Chi cuadrada total = 7.30177 Grados de libertad = 2 Número de ciclos: 5 Factor de heterogeneidad = 3.650885				

MELANOMA B16

Casiopelna	Dosis	Respuesta	Respuesta Neta	Esperado	Chi cuadrada	
IV	0.01	1	1	0.39	0.95	
	0.10	3	3	2.21	0.28	
	1.00	4	4	8.65	2.73	
	10.00	27	27	23.75	0.58	
	CI.50 = 126.33					
	CI.90 = 11894.49					
M = 0.648484 ± 0.12		*-CEV = 18.61				
B = 3.637205 ± 0.107		*-CEV = 2.95				
Chi cuadrada total = 4.553767		Grados de libertad = 2				
Número de ciclos: 5						
Factor de heterogeneidad = 2.276884						
V	0.01	0	0	0.74	0.74	
	0.10	3	3	2.10	0.39	
	1.00	6	6	5.16	0.14	
	10.00	10	9.99	11.01	0.10	
	CI.50 = 10960.07					
	CI.90 = 16349602					
M = 0.403316 ± 0.12		*-CEV = 29.75				
B = 3.370680 ± 0.11		*-CEV = 3.42				
Chi cuadrada total = 1.384882		Grados de libertad = 2				
Número de ciclos: 5						
Factor de heterogeneidad = 0.692441						
III-I	0.01	0	0	0.19	0.19	
	0.10	1	1	0.80	0.05	
	1.00	3	3	2.68	0.04	
	10.00	7	7	7.33	0.02	
	CI.50 = 10761.52					
	CI.90 = 5082223					
M = 0.478651 ± 0.17		*-CEV = 34.94				
B = 3.070138 ± 0.15		*-CEV = 4.96				
Chi cuadrada total = 0.3001983		Grados de libertad = 2				
Número de ciclos: 4						
Factor de heterogeneidad = 0.150099						
III-E	0.01	4	4	3.43	0.10	
	0.10	10	9.99	9.54	0.02	
	1.00	18	18	21.30	0.62	
	10.00	41	41	38.83	0.20	
	CI.50 = 35.83					
	CI.90 = 11297.92					
M = 0.512244 ± 0.078		*-CEV = 15.21				
B = 4.203877 ± 0.078		*-CEV = 1.86				
Chi cuadrada total = 0.9697156		Grados de libertad = 2				
Número de ciclos: 3						
Factor de heterogeneidad = 0.484858						
Cis-Pr	0.01	6	6	3.07	2.88	
	0.10	7	7	8.52	0.30	
	1.00	11	11	19.17	4.31	
	10.00	42	42	35.48	1.86	
	CI.50 = 55.71					
	CI.90 = 20405.59					
M = 0.499258 ± 0.079		*-CEV = 16.02				
B = 4.128322 ± 0.080		*-CEV = 1.94				
Chi cuadrada total = 9.337755		Grados de libertad = 2				
Número de ciclos: 4						
Factor de heterogeneidad = 4.668878						

CAPITULO VII

REFERENCIAS:

1. Torrell Kourí, M., Villa Treviño, S. Bases Genéticas del Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología, Fondo de Cultura Económica. México, 1998.
2. Ruiz Azuara, L. Dirección General de Inventiones, Marcas y Desarrollo Tecnológico. SECOFI. Registros Num. 18801-120579 y 18802-120580
US Patent Re 35, 458, Feb 18 (1997)
US Patent Number Ap 21 (1992) 5, 107,005
No. De registro 5 576 326, Nov 19,1996
No, de registro 35 458, Feb. 18, 19996 EEUU
3. Santos, E., Rodríguez,J., El Cáncer. Libros de Investigación y ciencia. Scientific American, Ed. Prensa Científica, España, 1985.
4. Vile, Richard G. Editor.Introduction to the molecular Genetics of Cancer,John Wiley and sons Inc. Imperial Cancer Research Fund, London, 1992
5. Helfand S.C., Principles and Applications of Chemotherapy. *Vet. Clin for North Am. An. Prac.*; (1990), 20:987-1013.
6. Powis G., Hacker M.P., The Toxicity of Anticancer Drugs. Pergamon Press, USA, 1991
7. Rosenberg B., Van Camp L., Truska J.G. and Mansour V.H., Platinum Compounds: a new class of potent antitumor agents. *Nature* (1969) 22,26, 385-386.
8. Borek Carmia, "Antioxidants and Cancer". *Science and Medicine*, (1997), 4:6, 52-53.
9. Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas. MEMORIAS. Unidad de Seminarios Ignacio Chávez, 1996. Trabajos A.5 (Estudio de la estabilidad de las Casiopeínas II y III en soluciones fisiológicamente compaables); E. 5 F 2 (Evaluación de actividad antineoplásica y farmacocinética básica de la Casiopeína III en gatos con leucemia viral)

- Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Trabajos B1 (Estudio comparativo del efecto de los sustituyentes periféricos en la estructura de las Casiopeínas empleando diversos modelos *In vitro* e *in vivo*);
10. Schnitzer R.J., Hawking F., Experimental Chemotherapy: Chemotherapy of Neoplastic Diseases Part II, Academic Press Inc., N.Y., 1967, p.p. 46,53.
 11. Ruiz Azuara L., Moreno Esparza R., Gasque L., Martínez A., Ferrer G., Redón R., Solans S., Estudio Estructural de las Casiopeínas”, Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas (memorias), México D.F., 1996, p.p. 2-3.
 12. Ruiz-Ramírez L., De La Rosa M.E., Gracia Mora I., Mendoza A., Pérez G., Ferrer-Sueta G., Breña M., Gutiérrez P., Pimentel E., Cruces M., Natarajan A.T. Casiopeínas, Metal Based-Drugs, a New Class of Antineoplastic and Genotoxic Compounds. *J. Of Inorganic Biochemistry*, 59 (2-3) (1995) 206.
 13. Fidler I. J., Hart I., Biological diversity in metastatic neoplasm: origins and implications. *Science* 1982; 217:998
 14. Kolberg R. J., Casting a wider net to catch cancer cures. *J. National Institute of Health Research*. 1990; 2:82
 15. Boyd J. D., Reviewers report progress in new drug prescree system development. *Cancer letters*. 1989; 15:1
 16. Boyd J.D., National Cancer Institute planning to switch drug development emphasis from compound to human cance-oriented strategy. *Cancer Letters* 1984; 10:1
 17. Chabuer B. A., In defense of cell-line screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 1991. 82:1083
 18. American Type Culture Collection. Catalogue of Cell Lines and hibridomas. 7th. Edition. 1992.
 19. Hoffman R.M., In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis and prognosis. *J. Clin. Lab. Ana.* 1991; 51:133.

20. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 1998; 48:589
21. Ruiz-Ramírez L., Gracia Mora I., Moreno Esparza R., et al. Desarrollo de nuevos compuestos de coordinación como agentes quimioterapéuticos. 1er Simposium, La Química en la Universidad Nacional Autónoma de México. Depto. De Química Inorgánica y Nuclear. Facultad de Química, UNAM. Abril, 1992, (Memorias, pp 53-77)
22. Gracia Mora I. Evaluación antineoplásica in vivo. Cáncer y Quimioterapia. Perspectivas en México. Departamento de Química Inorgánica y Nuclear. Facultad de Química, UAM. Junio 1992: (Memorias, pp 58-61)
23. Ruiz-Ramírez L., Gracia Mora I., Moreno Esparza R., et al. The antitumor activity of several transition metal complexes *Journal of Inorganic Biochemistry* 1991; 43:2 (Abstract)
24. Worthington Biochemical Corporation. Tissue Dissociation Guide. Freehold, New Jersey.
25. McAteer, J., Douglas, W.H.J., MONOLAYER CULTURE TECHNIQUES *Methods in Enzymology.* Vol LVIII, 1979. Academic Press
26. Ruiz-Ramírez L., Gracia Mora I., Moreno-Esparza R., et al. Cernimiento primario por medio de ensayos in vivo del efecto antineoplásico de nuevos compuestos de coordinación. *Rev. Soc. Qui. Mex.* 1990; 34:5 (Memorias p.264)
27. Ruiz-Ramírez L., Gracia Mora I., et al. Antineoplastic effect of several transition metal complexes. Fourth Chemical Congress of North America, New York, NY August 25-30, 1991 (Memorias)
28. Skehan P., Storeg R., Scudiero D., Monks A., et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening *Journal of the National Cancer Institute* 1990;82:1107.
29. Rubinstein L.V., Shoemaker R. H., Paull K.D., et al. Comparison of In Vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated With a Tetrazolium Assay Versus a Protein Assay Against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines *Journal of the National Cancer Institute* 1990;82:1113.

30. Michael F. Press Gynecologic Cancers *Cancer(Supplement)* 1998;83:1751
31. Age distribution of Cervical Cancer *Stat Bite, Journal of the National Cancer Institute* 1998;90:1510
32. Miller A.B., Programas de detección del cáncer cervicouterino, Capítulo 2. Organización Mundial de Salud.
33. Campling B.G., Pym J., Baker H.M., Cole S.P.C., Lam Y.M., Chemosensitivity testing of small cell cancer using the MTT assay.
34. Twentyman P.R., Luscombe M., A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity *British Journal of Cancer* 1987;56:279
35. Johnson R., Screening Methods in Antineoplastic Drug Discovery *Journal of the National Cancer Institute* 1990;82:1082
36. Chabner B., In Defense of Cell-Line Screening *Journal of the National Cancer Institute (editorial)* 1990;82:1083
37. Cohen H.J., Cancer and the Functional Status of the Elderly *Cancer* 1997;80:1883.
38. Rosenberg, G., Van Camp, L., et. al. The inhibition of growth or cell division in E. Coli by different ionic species of Platinum (IV) complexes. *J. Biol. Chem.*, 1967; 242:1347-1352.
39. Bravo Gómez, Ma. Elena., Tesis de Licenciatura. Evaluación antineoplásica de compuestos de coordinación de Cobre (Casiopeínas) en modelo tumoral murino. Septiembre, 1997