



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INFLUENCIA DEL METABOLISMO EN LA ACTIVIDAD
ANTIPROLIFERATIVA Y APOPTOTICA DEL QUELATO
MIXTO DE COBRE CASIOPEINA III-ia® EN TRES LINEAS
TUMORALES Y EN LINFOCITOS HUMANOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C A
P R E S E N T A :
LIDIA ROSA BARRON SOSA



MEXICO, D.F.

AÑO 2006



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.

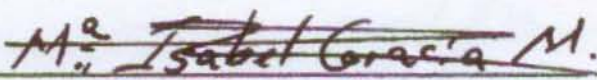
JURADO ASIGNADO:

- Presidente: Prof. Ruiz Azuara Lena
- Vocal: Prof. Castellanos Román Luz Del Carmen
- Secretaria: Prof. Gracia Mora María Isabel
- 1er. Suplente: Prof. Torres Márquez María Eugenia
- 2do. Suplente: Prof. Gómez Ruiz Celedonio


SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA DEPTO. QUÍMICA INORGÁNICA, LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS, UNIDAD DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (UNEXA) EDIF. "E", FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
5622 53 47.

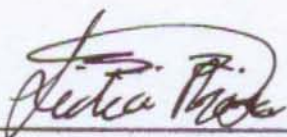
ASESOR DEL TEMA:


M. en C. María Isabel Gracia Mora

SUPERVISOR TÉCNICO:


Q. F. B. Celedonio Gómez Ruiz

SUSTENTANTE:


Lidia Rosa Barrón Sosa

Agradecimientos

M. en C. Isabel Gracia : Muchas gracias por compartirme tus conocimientos, no solo los académicos, por el tiempo que has dedicado a éste trabajo el cual es invaluable, por tu paciencia y confianza, por brindarme tu amistad, y por haberme permitido formar parte de éste gran grupo de investigación.

Dra. Lena Ruiz: Gracias por todos los conocimientos que me trasmitió desde las aulas, durante el desarrollo de ésta tesis, por el tiempo que le dedico a este trabajo el cual es también invaluable y por todo el apoyo que me ha brindado desde que la conocí.

Q.F.B. Celedonio Gómez Ruiz: Gracias por compartirme sus conocimientos, su amistad y por el tiempo dedicado a este trabajo, es usted un buen maestro.

Armando, mil gracias por todo el apoyo que me has brindado desde que te conocí, por compartirme tus conocimientos, por tu paciencia, sobre todo por haberme motivado a concluir mis estudios, por estar siempre a mi lado en las buenas y en la malas, parte de éste logro va dedicado a ti, T.A.N.A.

A mis Padres, por no haber perdido la confianza en mi, por todo su apoyo y motivación, mil gracias. A mis sobrinos Zullith, Monsse, Onzalé, Yaretzi, por que me acompañaron en mis desvelos, haciéndolos mas gratos con sus risas.

A Mabel, Marisol, Lucía, Paquito, Héctor, por la ayuda que me brindaron cuando la necesite, por haber hecho muy amena mi estancia en la UNEXA, y por ser muy buenos compañeros y por brindarme su amistad, mil gracias.

A F. Carvallo, Dra. Elia R, M. en C. Ernesto R, Dra. Graciela Tapia por toda la ayuda que me brindaron cuando la necesite y por compartirme sus conocimientos, muchas gracias.

A Nalle, Saraí, Ana, Lore, por brindarme su amistad y por ser buenas compañeras.

A Marisela, Lucy, Aly, Miriam, Caro, Mireya, Fabián, por los momentos que pasamos durante la carrera y por su invaluable amistad.

Gracias al apoyo económico otorgado por los proyectos CONACYT G35012-N, CONACYT SALUD C01-7677 Y PAPIIT IN206303.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción

1.1 Cáncer	1
1.1.1 Factores de Riesgo	2
1.1.2 Cáncer de Cérvix	3
1.1.3 Cáncer de Mama	4
1.1.4 Cáncer de Pulmón	5
1.2 Quimioterapia	6
1.2.1 Fármacos de Base Metálica	9
1.2.2 Compuestos con metales esenciales	10
1.3 Apoptosis	11
1.3.1 Caracterización Morfológica	12
1.3.2 Fase de iniciación	13
1.3.3 Fase de ejecución	14
1.3.3.1 La Familia Bcl2	15
1.3.3.2 Caspasas	15
1.3.4 Fase de eliminación	17
1.3.5 Apoptosis y su asociación a enfermedades	17
1.4 Necrosis	18
1.5 Biotransformación de Fármacos	19
1.5.1 Microsomas	21
1.5.2 Citocromo P-450	22
1.6 Técnicas Auxiliares Utilizadas en la Detección de Apoptosis	23
1.6.1 Detección de apoptosis por la técnica de TUNEL	23
1.6.2 Detección de la activación de caspasas	23
1.6.3 Inmunohistoquímica	24

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Casiopeínas	26
2.1.1 Casiopeína III-ia	27
2.1.3 Mecanismo de acción y Modelaje	28
2.1.4 Pruebas de Cernimiento, Primario y Secundario	30
2.1.5 Ensayos Farmacológicos	31
2.1.6 Toxicología	32
2.2 Hipótesis y Objetivos	33

Capítulo 3. Metodología

3.1 Material, equipo, reactivos y soluciones	35
3.2 Descongelamiento de líneas celulares	35
3.2.1 Obtención del cultivo stock a confluencia	37
3.2.2 Tripsinización	37
3.2.3 Cuantificación de Células	38
3.2.4 Ensayo de Inhibición de la Proliferación	38
3.2.5 Tinción con Sulforrodamina-B y Lectura	39
3.3 Líneas celulares: HeLa, MCF7, y SK-LU-1	39
3.4 Preparación de la fracción microsomal	42
3.5 Aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica	42
3.6 Inmunohistoquímica	43
3.7 TUNEL	43

Capítulo 4 Resultados y Análisis de Resultados	
4.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media	46
4.1.1 Línea Celular HeLa	46
4.1.2 Línea Celular MCF7	49
4.1.3 Línea celular SK-LU-1	52
4.1.4 Linfocitos humanos aislados	56
4.2 Evaluación Inmunohistoquímica de los anticuerpos Bcl2, Bax, Caspasa 3 y Ki-67	56
4.2.1 Línea Celular HeLa	56
4.2.2 Línea Celular MCF7	61
4.2.3 Línea Celular SK-LU-1	64
4.2.4 Linfocitos Humanos Aislados	68
4.3 Determinación de apoptosis por TUNEL	71
4.3.1 Línea Celular HeLa	71
4.3.2 Línea Celular MCF7	73
4.3.3 Línea Celular SK-LU-1	74
4.3.4 Linfocitos Humanos Aislados	75
Capítulo 5. Discusión y Conclusiones	
5.1 Ensayo de inhibición de la Proliferación con Sulforrodamina B	78
5.2 Inmunohistoquímica	78
5.3 TUNEL	79
Bibliografía	84
Anexo 1	88

TABLA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADN-PK	Ácido desoxirribonucleico fosfato kinasa
ANT	Traslocador de Adenina Nucleótido
ATP	Adenina Trifosfato
ARN	Ácido Ribonucleico
Apaf-1	Factor activador de proteasas apoptóticas
ATCC	American Type Culture Collection
CaCu	Carcinoma Cérvico-Uterino
FDA	Food and Drug Administration
FAD	Dinucleótido Adenine Flavina
FMN	Mononucleótido de Flavina
Fas	Ligante activador de apoptosis
HBSS	Solución Balanceada de Hanks
NCI	Nacional Cancer Institute U. S.A
OFM	Oxidasas de Función Mixta
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SFB	Suero Fetal Bovino
SOD	Super Óxido Dismutasa
VPH	Virus de Papiloma Humano
VDCAT	Canal Aniónico Dependiente de Voltaje

Capítulo 1.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento y desarrollo de los organismos vivos depende de la división y multiplicación de sus células. Cuando una célula se divide, la información genética contenida en su ADN debe duplicarse de manera precisa y luego las copias se transmiten a cada célula hija.

Las células proliferan aumentando su contenido de moléculas y organelos (crecimiento en masa o tamaño) duplicando y segregando sus cromosomas, para posteriormente dividirse en dos células hijas que son genéticamente iguales. La proliferación celular tiene lugar de un modo controlado de acuerdo a las necesidades generales del organismo. Por lo que la regulación del ciclo celular es decisiva para el desarrollo normal de los organismos multicelulares; la pérdida de esta lleva en última instancia al cáncer, una enfermedad muy conocida que mata una de cada seis personas en los países industrializados (1).

1.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad compleja resultado de errores genéticos, se caracteriza por la proliferación descontrolada y autónoma de las células y con la potencialidad de invasión a distancia de otros órganos o tejidos.

Las células tumorales muestran un número de características que las diferencian de las células normales: 1) no dependen de factores de crecimiento como las células normales o bien porque son capaces de secretar sus propios factores de crecimiento para estimular su proliferación en un proceso llamado estimulación autócrina, o por que los receptores de los factores de crecimiento en la superficie están alterados de tal forma que el enlace de dichos factores no es necesario ya para estimular la proliferación; 2) las células normales requieren contacto con la superficie en un ambiente extracelular para ser capaces de crecer mientras que las tumorales son independientes de anclaje; 3) las células normales responden a las presencia de otras células, y en cultivo formarán una monocapa debido a una inhibición por contacto mientras que las células tumorales carecen de ésta y frecuentemente crecen sobre o bajo otras células; 4) las células tumorales son menos adhesivas que las células normales; 5) las células normales detienen la proliferación una vez que alcanzan cierta densidad y las células tumorales continúan proliferando (2).

De acuerdo con las estadísticas oficiales, las neoplasias malignas ahora constituyen la segunda causa de muerte en la población mexicana (3).

De acuerdo con la Secretaría de Salud Pública los porcentajes de defunciones por cáncer a nivel nacional (Grafico 1) fueron los siguientes: bronquios y pulmón 11.3 %, estómago 9.1 %, cáncer cérvico uterino 8.4%, hígado 7.6 %, próstata 7 %, mama 6.4 %, páncreas 4.8 %, colon 3.8 %, No específico 2.8%, Leucemia linfocítica 2.7 % (3).

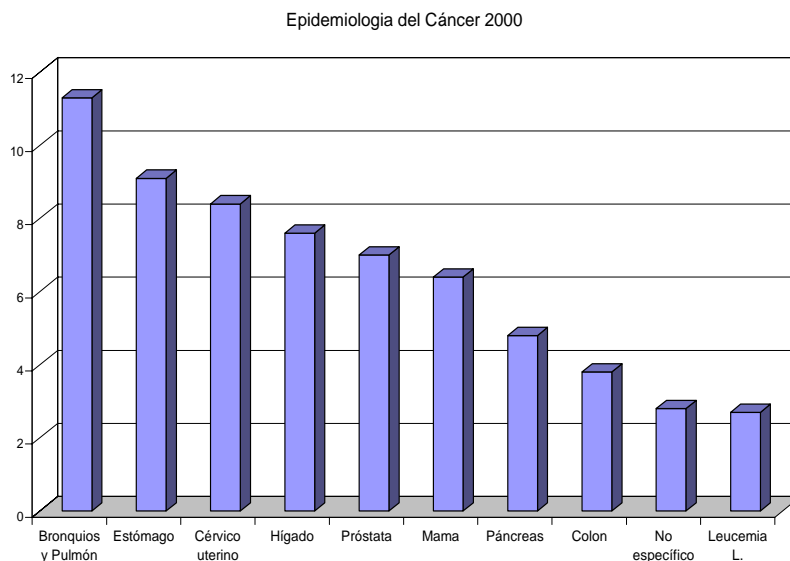


Grafico1. Porcentajes de defunciones por cáncer a nivel nacional.

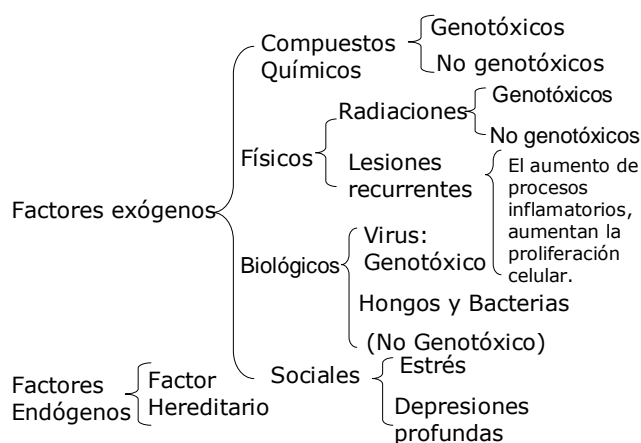
Es importante mencionar que en mujeres los porcentajes de defunciones por cáncer cérvico uterino ocupó el primer lugar, el de mama el segundo, el de bronquios y pulmón el quinto; ocupando éste en hombres el primer lugar por lo que se consideran un problema de salud pública.

1.1.1 Factores de Riesgo

Los factores que originan el cáncer se pueden dividir en dos grandes grupos: los factores exógenos que conforman un 80- 90 % de los casos y los factores endógenos (factor hereditario) que forman el 10-20 % restante.

Los factores exógenos se dividen en cuatro grupos: compuestos químicos, factores físicos, biológicos y sociales; éstos a su vez se clasifican en genotóxicos, es decir, que causan daño al material genético de la célula (ADN), o no genotóxicos; los cuales actúan al nivel de factores que estimulan la proliferación celular, ya que al aumentar la

capacidad proliferativa de las células también se aumenta la probabilidad de que ocurran mutaciones en el ADN que deriven en cambios en la diferenciación celular.



Cuadro IV. Principales Factores de Riesgo.

1.1.2. Cáncer de Cérvix

El virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo del cáncer cérvico-uterino, al estar presente en el 95 por ciento de los casos. El VPH se transmite por contacto sexual, infecta el tejido del cuello de la matriz y produce alteraciones celulares que a lo largo pueden degenerar en cáncer. El proceso desde que aparecen las primeras anomalías hasta que se desarrolla el cáncer dura varios años, de allí que se puede prevenir. A pesar de los esfuerzos del Programa de Prevención y Control del Cáncer Cérvico-Uterino, en los últimos diez años la mortalidad ha aumentado entre uno y dos por ciento (3).

Los factores de riesgo que se asocian al padecimiento son el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, múltiples compañeros sexuales, la multiparidad (muchos hijos) y el tabaquismo.

Cuando se aplican tratamientos en las primeras etapas de desarrollo de este tipo de cáncer, el cien por ciento de las mujeres sanan. Dependiendo del tamaño y las características del tumor, este se trata con cirugía, radioterapia o ambos procedimientos. Sin embargo, conforme avanza el cáncer las posibilidades de curación van disminuyendo (4).

1.1.3. Cáncer de Mama

El cáncer de mama es un proceso degenerativo de la glándula mamaria, que generalmente se manifiesta con la presencia de un nódulo firme, pequeña protuberancia que puede detectarse al tacto. No es doloroso al principio, puede moverse o estar adherido a la piel, pero a medida que avanza posibilita retracción de la piel o el pezón, ulceración, dolor y enrojecimiento. Los factores de riesgo asociados con los tumores mamarios son el empleo de hormonas, antecedentes familiares, el no tener hijos, la ausencia de lactancia, ingesta excesiva de grasas o de alcohol, así como con la falta de ejercicio.

Aunque en México, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte a nivel nacional, llega a ser la primera causa de muerte en pacientes de entre 45 y 55 años de edad. La edad promedio de estas pacientes es menor a la reportada en países como Estados Unidos y Europa, donde el padecimiento se presenta a partir de los 55 años. Si bien es cierto que también lo padecen algunos hombres, actualmente en el Instituto Nacional de Cancerología-México se atiende alrededor de 600 mujeres con cáncer mamario al año, y la demanda se ha incrementado, pues anteriormente se atendía anualmente a un promedio de 400 féminas.

Al igual que otros tipos de cáncer, se trata con cirugía, radiaciones y quimioterapia. Los procedimientos se utilizan aisladamente o en combinación, dependiendo de la dimensión y de las características del tumor. Sin embargo, una de las principales limitaciones de las drogas convencionales es su toxicidad, ya que también atacan a las células normales.

En algunos casos, aunque la paciente sea sometida a cirugía, también se le da un tratamiento de quimioterapia, radioterapia u hormonoterapia; por ejemplo, cuando se conserva la mama se le somete a radiaciones.

El padecimiento es curable cuando el tumor es pequeño, y las medidas terapéuticas son menos efectivas mientras más avanzado sea el tumor, por lo que es muy importante el diagnóstico temprano. En la mayoría de los casos, las alteraciones mamarias se pueden detectar oportunamente a través del auto examen, es decir, hay que revisarse los senos desde que empiezan a crecer, cada mes de preferencia al día 5 ó 6 del ciclo estral para identificar cualquier tipo de cambio (4).

1.1.4 Cáncer de Pulmón

El cáncer de pulmón consiste en un crecimiento anormal de las células del mismo. La enfermedad se produce habitualmente en las paredes internas de los bronquios, y al crecer puede obstruir el paso del aire y alterar la respiración. Por este motivo, produce generalmente falta de aire, ahogo y fatiga.

Existen dos tipos principales de cáncer de pulmón: el cáncer de células pequeñas o microcítico y el cáncer de células no pequeñas (no microcítico o broncogénico). También existe otro tipo, mucho más infrecuente, que tiene características de los dos y que se denomina carcinoma mixto de células grandes y pequeñas.

1.1.4.1. Tipos De Cáncer De Pulmón

El cáncer de pulmón se clasifica por el tipo de célula que produce el tumor. El 90% de ellos son de células pequeñas o de células no pequeñas.

El Cáncer de pulmón de células pequeñas, recibe este nombre por el tamaño de las células vistas a microscopio; todavía se desconoce las células a partir de las que se origina, se relaciona con el hábito de fumar y se estima que alrededor del 20% de todos los tipos de cáncer son de células pequeñas; éstas se multiplican rápidamente y se pueden formar grandes tumores; además su capacidad de extenderse a otros órganos es mayor. Las metástasis suelen afectar a los siguientes órganos: ganglios linfáticos, huesos, cerebro, glándulas suprarrenales e hígado. El tumor primario generalmente se origina cerca de los bronquios y se expande hacia el centro de los pulmones.

Carcinoma de células escamosas o epidermoide: es el más frecuente de todos y se relaciona directamente con el tabaco. Alrededor del 30% de todos los cánceres son de este tipo. Suele iniciarse en los tubos bronquiales. Se desarrolla por etapas que suelen evolucionar en varios años.

Adenocarcinoma: se presenta en un 40% de los tipos de cáncer de pulmón. Suele comenzar en los tubos bronquiales más pequeños. Se encuentra en la región externa del pulmón. Aunque con frecuencia aparece en más de un sitio del pulmón, tiene mejores perspectivas que otros tipos de cáncer. Es el tipo más frecuente en las personas que no fuman (4).

El tratamiento para estos pacientes consiste en una combinación de varias técnicas que son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Cada una de ellas será más eficaz que el resto según sea el tipo de cáncer y la etapa en la que se encuentre. De hecho, el tratamiento depende de cuatro circunstancias: del tipo y el grado de diseminación del tumor, del estado de salud del paciente y del estado funcional de los diversos sistemas del organismo (corazón, hígado, riñón, neurológico etc.). (El mundo salud.com).

1.2 Quimioterapia

Paul Ehrlich acuñó el término "quimioterapia" para el uso de un reactivo químico de composición conocida en el tratamiento de parásitos. De 1903 a 1915 su atención se consagró al desarrollo de agentes quimioterapéuticos, de forma muy parecida a lo que hacemos en la actualidad para identificar fármacos anticancerosos. Ehrlich dio énfasis al valor de modelos animales, usando animales enfermos para estudiar los efectos de los fármacos. Alrededor de 1900, tales modelos existieron para las enfermedades infecciosas, infectándose ratones con el bacilo de la tuberculosis y con neumococos, ratones y ratas con *Trypanosomas*, y conejos con sífilis. Después con la ayuda de la química orgánica y el apoyo de la industria farmacéutica, Ehrlich pudo sintetizar una serie grande de compuestos de arsénico, encontrando que el número 606 era activo, no sólo contra las infecciones de *Trypanosoma*, sino además contra la sífilis del conejo. Esta droga se llamó el salvarsán (el salvador del hombre) y era la primera sustancia química sintética que mostró ser eficaz contra las enfermedades parasitarias humanas.

La habilidad de curar el cáncer depende de muchas variables debido a su propia etiología. La necesidad de quimioterapia se evidenció ya que el cáncer rara vez es un proceso localizado, difícilmente controlable completamente por medios locales, así pues, la quimioterapia del cáncer empezó como el tratamiento de metástasis. La hipótesis de que podría usarse compuestos químicos en el tratamiento del cáncer se recibió con gran entusiasmo debido al uso ya exitoso de sustancias químicas sintéticas y de productos naturales contra las infecciones bacterianas y parasitarias comunes así como contra la tuberculosis.

Es importante mencionar que hay dos tipos de fármacos usadas para el tratamiento de cualquier enfermedad, aquéllos que suprimen los síntomas pero no hacen nada para suprimir la causa de enfermedad y aquellos que producen cura. Los fármacos usados en

contra de la malaria son consideradas el comienzo de la terapia curativa. No obstante, la posibilidad que la quimioterapia pudiera curar el cáncer se tomó con gran pesimismo.

Al principio del siglo XX con un enfoque más optimista, se considera a Paul Ehrlich, como el padre de la quimioterapia, él decidió dar un paso adelante en este campo, incluso el interés y optimismo en su laboratorio dedicado a la investigación en cáncer, tenía el lema "Abandone toda esperanza todo aquel que entre aquí", su esfuerzo se consumió en 1898 cuando descubrió al primer agente alquilante, no obstante, pasaron casi 50 años antes de que éste fuera aplicado como tratamiento de enfermedades neoplásicas en el humano.

El tratamiento del cáncer comenzó a finales del siglo XIX con tres trabajos, el primero fue el desarrollo de la cirugía encabezado por Halsted en 1894, proponiendo la disección en-bloque particularmente para mastectomías radicales. Al mismo tiempo, Roentgen descubrió los Rayos X y proporcionó una segunda opción a los médicos para el tratamiento del cáncer *in situ*. El tercer adelanto tuvo sus raíces en el trabajo de Paul Ehrlich con el uso de modelos en roedor, lo que sirvió de base a George Clowes del "Roswell Park Memorial Institute" en Búfalo, para desarrollar a principios de 1900's, líneas endogámicas de ratones capaces de portar tumores trasplantados. Estos modelos y otros han servido para la comprobación del potencial antineoplásico de agentes quimioterapéuticos potenciales.

El primer compuesto citotóxico ('venenoso para ciertos tipos de células') no se empleó precisamente con fines médicos. El gas mostaza se utilizó por primera vez como arma militar durante la Primera Guerra Mundial, y estudiado después más en profundidad durante la Segunda Guerra. En 1945, después de que varios militares fueran expuestos accidentalmente a esta sustancia se descubrió que sus niveles de glóbulos blancos eran sorprendentemente bajos. Esta observación llevó a los científicos a pensar en la capacidad de este agente para matar células, por lo que se comenzó su uso como medicamento oncológico con enfermos de linfomas, precisamente una variedad de la enfermedad relacionada con los glóbulos blancos, fue entonces cuando la quimioterapia del cáncer comenzó en serio (5).

Cada fármaco funciona con mecanismos diferentes, de manera que unos son capaces de 'envenenar' directamente a las células malignas dañando su ADN, mientras que otros desencadenan una reacción del sistema inmune para que éste sea capaz de reconocerlas como 'elementos extraños' y ordene su ejecución. En otros casos, la actividad o reposo de las células enfermas depende de su reacción a las hormonas que

produce el organismo humano naturalmente. En este caso, el fármaco se dirige a anular los efectos de las hormonas del paciente.

El mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. La acción de los diferentes citostáticos varía según la dosis a la que se administren. Debido a su inespecificidad afecta a otras células y tejidos normales del organismo, sobre todo si se encuentran en división activa.

Los agentes empleados en las terapias oncológicas pueden dividirse en varias categorías en función de cómo funcionan y cómo afectan a las células malignas. Conociendo en qué momento del ciclo celular actúan y qué actividad concreta bloquean para frenar la multiplicación de la enfermedad, los científicos pueden decidir qué fármaco actuará mejor sobre cada tipo de tumor, si deben combinarse varios de ellos para lograr una mayor eficacia, si se puede emplear conjuntamente con algún otro tipo de medicamento e incluso cuándo debe administrarse para lograr el efecto deseado.

- **Agentes alquilantes (cisplatino, carboplatino, clorambucil, busulfán):** estos actúan directamente sobre el ADN para evitar que las células enfermas sigan reproduciéndose. Son eficaces en el tratamiento de leucemias crónicas, linfomas no Hodgkin, así como para quienes padecen la enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple y ciertos tumores de pulmón, mama y ovario.
- **Nitrosureas (carmustina o lomustina, por ejemplo):** este segundo grupo de fármacos actúa de forma similar a los agentes alquilantes, entorpeciendo la actividad de las enzimas encargadas de reparar el ADN. Se emplean generalmente en el tratamiento de tumores cerebrales o de melanomas malignos.
- **Antimetabolitos:** se trata de agentes que se combinan con el ADN para modificar la estructura de las células, de manera que éstas mueren al no poder seguir reproduciéndose normalmente. Este tipo de fármacos, entre los que se incluyen, por ejemplo, 5-fluoracilo o el metoxato, se administra a enfermos que padecen tumores de mama, ovario o bien en el tracto gastrointestinal y también a pacientes que padecen leucemia crónica.

- **Antibióticos antitumorales (doxorrubicina, mitoxantrona etc):** no funcionan igual que los antibióticos empleados en el caso de infecciones, sino que por su mecanismo de acción alteran la membrana que rodea a las células y bloquean el proceso por el que las células se multiplican.
- **Inhibidores mitóticos:** desde el paclitaxel hasta el docetaxel, estas sustancias derivan de productos naturales y son capaces de frenar el proceso de reproducción celular así como la acción de las enzimas responsables de la reproducción celular.
- **Inmunoterapia:** en este grupo se incluyen todos aquellos medicamentos capaces de estimular el sistema inmune del propio paciente para que éste sea capaz de reconocer y combatir las células enfermas. Algunos expertos los consideran una forma diferente de tratamiento al margen de la quimioterapia. La primera evidencia de "inmunoterapia" data de principios del siglo XX (6), cuando William Cloey, un cirujano neoyorquino apreció una regresión espontánea del sarcoma entre aquellos de sus pacientes que habían padecido previamente una infección bacteriana.

1.2.1 Fármacos de Base Metálica

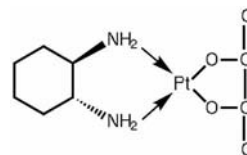
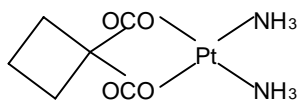
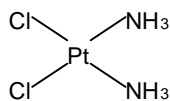
Compuestos de platino

En la historia, a menudo el azar ha sido el causante de nuevos descubrimientos, en la medicina no ha habido excepción, el primer fármaco antineoplásico metálico fue el cisplatino, y se descubrió sin buscarlo. Barnett Rosenberg en la Universidad Estatal de Michigan estaba interesado en el estudio del huso mitótico en la división celular y la fuerza magnética, examinando el efecto de campos eléctricos en las células en crecimiento. El estudio fue hecho en la bacteria *Escherichia coli*, y se usaron electrodos de platino, observándose una inhibición de la división celular. Los extensos estudios para el entendimiento de este hecho llevaron a la conclusión que se formó el $(\text{NH}_4)_2[\text{PtCl}_6]$ y se convirtió a $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, más tarde se sintetizó el compuesto, no obstante la síntesis fue reportada desde 1844 por Michele Peyrone. Después de este descubrimiento, en el "National Cancer Institute" (NCI), U.S.A., se probaron cuatro compuestos de platino, $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, $[\text{PtCl}_2\text{en}]$, $[\text{PtCl}_4(\text{NH}_3)_2]$, $[\text{PtCl}_4\text{en}]$. El cisplatino cubrió todas las etapas y entró a los ensayos clínicos en 1971 mostrando ser activo contra un rango de tumores, particularmente el testicular y el ovárico (5). A pesar de

esta actividad, varios efectos colaterales tóxicos severos fueron mostrados por la terapia del cisplatino como: vómito, náusea, ototoxicidad, neuropatía y nefrotoxicidad, últimamente este efecto fue reducido por el uso de manitol lo que induce diuresis post-hidratación intravenosa. El uso de diuréticos osmóticos e hidratación permite incluso aumentar las dosis. El éxito del tratamiento de cáncer testicular y de ovario llevó a la aprobación de este compuesto como un medicamento por la "FDA" en 1978, y a la aprobación británica en 1979. Ahora al cisplatino se usa extensamente y abre la búsqueda de nuevas drogas en el campo de la química medicinal inorgánica.

Muchos más compuestos de platino se han sintetizado y a finales de los 90s se registraron el carboplatino y oxaliplatino, ampliamente usados en la actualidad.

Considerado los compuestos que se usan en la clínica como agentes antineoplásicos, podemos ver que sólo 3 de 46 son compuestos de base metálica: cisplatino (CDDP), carboplatino y oxaliplatino. Sin embargo, desde la aparición del CDDP en el mercado, algunos grupos de investigación han empezado a desarrollar compuestos similares, principalmente aquéllos basados en Platino y Paladio.



Cisplatino

Carboplatino

Oxaliplatino

1.2.2. Compuestos con metales esenciales

Un acercamiento más innovador es el uso de compuestos basado en metales esenciales. El uso de metales esenciales en la terapia del cáncer se limitó a la activación de drogas como la bleomicina, por hierro y cobre. Estudiando compuestos AuDPPE, se observó la formación de CuDPPE en el suero, un informe por Dhubhghaill, Sadler y Kuroda, 1990, sugirió que el cobre puede funcionar para transportar DPPE o recíprocamente ese DPPE podrían transportar el cobre(I) al sitio designado, o que la molécula de CuDPPE entera es necesaria para la actividad (5).

1.3. *Apoptosis*

La supervivencia de un organismo multicelular depende de un sofisticado balance entre la vida y la muerte de sus células. Esta última puede ocurrir mediante al menos, dos procesos esencialmente diferentes llamados: *apoptosis* y *necrosis*. Es importante mencionar que en general el efecto antitumoral de un fármaco anticancerígeno es medido en términos de la habilidad que tiene para inducir muerte celular por apoptosis en tumores (7).

La palabra *apoptosis* deriva del griego *apo* que significa separación o derivación y *ptosis*, caída. Este término se utilizaba en la antigua Grecia para describir la caída de los pétalos de las flores y la caída otoñal de las hojas de los árboles; resalta el carácter fisiológico de la apoptosis, ya que implica que para que un organismo funcione adecuadamente, no sólo debe tener la capacidad de producir nuevas células, sino también la habilidad de eliminar aquellas que ya no son capaces de cumplir con la función que tienen asignada (8).

Las primeras descripciones para este fenómeno las realizó William Councilman en 1890, quien señala la presencia de cuerpos acidófilos vacuolados en hígado de pacientes con fiebre amarilla. Más tarde Robert Schröder en 1914 describe la presencia de partículas con cromatina picnótica en las glándulas endometriales dos o tres días antes del inicio de la menstruación. Es hasta 1965 que se hace la descripción detallada de esta forma de muerte celular y se sientan las bases para el estudio formal de este fenómeno; sin embargo es hasta 1972 cuando Kerr J.F.R. Willy y Curre dan el nombre de *apoptosis* a este tipo de muerte celular (9). La cual se define **como una forma de deceso celular caracterizada por un conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula concluyendo con su muerte de una forma ordenada y silenciosa que está codificada genéticamente** (10).

La muerte celular apoptótica es una estrategia esencial para proteger el equilibrio homeostático de los sistemas vivos; es un proceso en el que la célula programa su propia muerte, también llamada "suicidio celular", ésta afecta sólo a células individuales o aisladas y no se asocia a inflamación (8), juega un papel determinante en la eliminación de células dañadas o peligrosas para el organismo (células infectadas con virus, células del sistema inmune, células con daño en el ADN, células cancerosas) y también ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis y la renovación tisular, es necesaria para un adecuado proceso de división celular (mitosis)

en estructuras en desarrollo, ya que al remover células no deseadas permite un adecuado balance para la manutención de un número celular óptimo. Determinados hechos celulares pueden ser explicados por trastornos en la regulación de los genes responsables de la apoptosis, como es el caso de la transformación y la progresión tumoral (10).

1.3.1. Caracterización morfológica

La célula que ha recibido una señal que le induce apoptosis Fig. 1(A), pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular Fig. 1(B, C). Los organelos citoplasmáticos permanecen intactos, sin embargo en la mitocondria se dan cambios como la reducción del potencial de membrana, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno (11) En etapas posteriores la cromatina se condensa y se fragmenta Fig. 1 (D). Finalmente la célula genera un número variable de vesículas de diferentes tamaños rodeados de membrana plasmática íntegra, que contienen parte de la cromatina y de los organelos celulares. Estas vesículas se conocen como cuerpos apoptóticos (12); Fig. 1(E) los cuales son rápidamente fagocitados por células vecinas. Por lo tanto, una de las consecuencias fisiológicas más relevantes de la muerte por apoptosis es que no se libera material intracelular al medio intersticial (13).

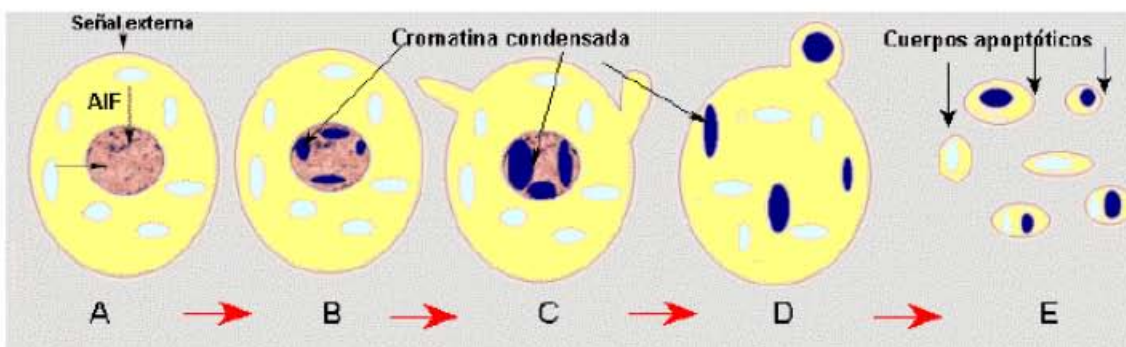


Figura 1. Secuencia de los eventos morfológicos que ocurren durante la muerte celular por apoptosis.

Es importante destacar que este tipo de muerte está restringida a células individuales y nunca resulta en la muerte de células vecinas en las que no se haya activado el programa de muerte (12,14).

El proceso apoptótico puede dividirse en tres etapas: la primera es la **fase de iniciación**, en la cual la célula recibe el estímulo que la lleva a la muerte, la segunda es la **fase de ejecución**, donde se dan la mayor parte de cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis y por último la **fase de eliminación**, en donde los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (15).

1.3.2 Fase de iniciación

Durante la fase de iniciación o de inducción, las células reciben el estímulo de muerte. Las primeras señales son, en muchos casos, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación de citocromo C de la mitocondria (vía intrínseca), mientras que algunas de las señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca) (16) La naturaleza de los inductores puede ser fisiológica (hormonas, citosinas), biológica (bacterias, virus, parásitos), química (fármacos) o física (radiaciones), pudiendo un mismo estímulo generar efectos diferentes y hasta opuestos en distintos tipos celulares, e incluso en células del mismo tipo pero que se encuentren en diferente etapa de desarrollo (17).

En su inicio la *apoptosis* requiere de genes inductores (Cuadro I), esto ha sido comprobado con los estudios realizados en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) y en la mosca *Drosophila melanogaster* de los que se han aislado genes específicos, indispensables para la inducción de la muerte celular programada (18,19). En estas especies, se conocen tres genes que participan en este proceso de muerte celular: ced-3, ced-4 y ced-9.

Inhibidores	Promotores
bcl-2	ced-3
ced-9	ced-4
bcl-xL	caspasas
	fas-fas ligando
	factores de transcripción
	p53
	c-myc

Cuadro I. Algunos genes que participan en la regulación de la apoptosis (20, 11, 21).

1.3.3. Fase de ejecución

En los últimos años la mitocondria ha recibido una atención especial por su participación en la fase efectora de la apoptosis. El interés se ha centrado alrededor de la apertura de canales o poros de transición mitocondrial y la liberación de diversos factores pro-apoptóticos, entre ellos el citocromo C (10).

En la mayoría de los sistemas donde ocurre la apoptosis se observa, en la membrana mitocondrial, la formación de un canal de gran conductancia conocido como poro PT. Su estructura y composición no se conocen por completo, pero entre sus constituyentes se encuentran proteínas de la membrana interna como el traslocador de adenina nucleótido (ANT) y proteínas de la membrana externa como las porinas (canales aniónicos dependientes de voltaje o VDAC), que actúan en los sitios de contacto de la membrana interna y externa, creando un canal a través del cual pasan moléculas de aproximadamente 1.5 Kda. La apertura de este canal provoca la desregulación de la mitocondria y la pérdida del potencial de membrana, debido a un aumento de la osmolaridad de la matriz, haciendo que ésta se expanda y eventualmente se rompa y libere proteínas activadoras de caspasas, localizadas en el espacio intramembranal hacia el citosol y el desacoplamiento de la cadena respiratoria, que se reconoce como una falla temprana de muerte, donde participan diversos factores como la vía de señalización de la ceramida (10,22,23).

1.3.3.1. La Familia Bcl-2

Informes recientes sugieren que los cambios mitocondriales están bajo control de los productos génicos de la familia **Bcl-2** (*ced-9* en *C. elegans*).

Los miembros de la familia Bcl-2 promueven o inhiben la apoptosis en respuesta a diferentes estímulos como ausencia de factores de crecimiento, secuestro de Apaf-1, (factor activador de apoptosis) o bien al obstruir la salida de citocromo C desde la mitocondria (24,25).

Todos los integrantes de la familia Bcl-2 poseen uno de los cuatro residuos conservados conocidos como dominios de homología de Bcl-2 (BH1 a BH4), Bcl-2 y BC1-XL, que actúan como inhibidores de la apoptosis y los promotores de la apoptosis como Bax, Bak y Bad contienen BH1, BH2 y BH3 (26).

La proteína Bcl-2 es una molécula integral de membrana de 26 Kda que ha sido localizada en la membrana externa de las mitocondrias, en el retículo endoplásmico liso y en la envoltura perinuclear, donde se ha sugerido que reprime a la apoptosis al regular el flujo de calcio (27 -31).

Las proteínas pro-apoptóticas como Bax; que tienen como blanco la membrana mitocondrial, pueden inducir daño y las células mueren aún cuando las caspasas sean desactivadas acelerando la apertura de los canales VDCA (canales aniónicos dependientes de voltaje) y permiten la salida del citocromo C mientras que las proteínas antiapoptóticas cierran estos canales por unión directa con Bax. La explicación de esto es que, durante la interacción de VDCA con Bax ocurren cambios conformacionales, formando un megacanal que permite la salida del citocromo C (32), que al interactuar con Apaf-1 y procaspasa 9 forman el apoptosoma, activando a las caspasas y de esta manera inician la cascada proteolítica para comenzar la apoptosis (33,34).

1.3.3.2 Caspasas

A nivel bioquímico, cuando un inductor de apoptosis llega a su célula blanco, avanza a través de ella gracias a intermediarios que dirigen dicha señal hacia la maquinaria enzimática responsable de los cambios que presenta la célula durante la apoptosis (35). Esta maquinaria básica la constituyen principalmente las caspasas (*ced-3* en *C. elegans*) (11,36-38), tanto la apoptosis vía intrínseca como la vía extrínseca,

provoca la activación de estas enzimas. Las caspasas constituyen una familia de proteasas con una cisteína en su sitio activo (32,39), están presentes en el citoplasma de la mayoría de las células en forma inactiva como proenzimas; muestran entre sí similitud en la secuencia de aminoácidos, en estructura y en especificidad; sus sustratos deben contener una molécula de ácido aspártico y requieren del reconocimiento de al menos otros cuatro aminoácidos en el sitio de ruptura. Además de específica la ruptura es muy eficiente, de hecho algunas caspasas pueden ser sustrato de otras así como de sí mismas vía auto procesamiento. Las caspasas son sintetizadas como zimógenos, por lo que requieren de un procesamiento proteolítico para volverse activas (36, 38). Los precursores de las caspasas están constitutivamente expresadas en las células vivas y su actitud está regulada por una combinación de proteasas, cofactores, umbrales y mecanismos de retroalimentación (38). En su forma nativa las caspasas constan de tres dominios: un predominio N-terminal, un dominio que genera una subunidad grande (p20) y un dominio que da lugar a una subunidad enzimática pequeña (p10). La enzima madura es un heterodímero que contiene dos heterodímeros p20/p10, por lo que la forma activa cuenta con dos sitios activos independientes (34).

Existen por lo menos tres vías por las cuales las caspasas pueden ser activadas:

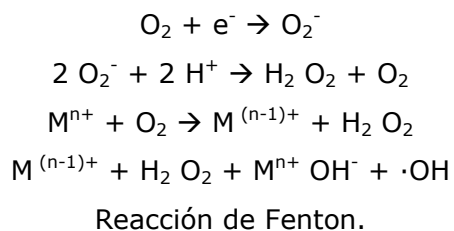
- 1.- A través de Apaf-1 que es el factor activador de proteasas apoptóticas. Apaf- 1 puede interactuar con el citocromo C e iniciar la cascada de activación de las caspasas, o bien unirse a algún miembro de la familia Bcl-2 y prevenir la apoptosis al evitar la activación de las caspasas.
- 2.- A través de receptores de muerte.
- 3.- A través de la traslocación del citocromo C, desde la mitocondria hasta el citoplasma (39).

Una vez activadas las caspasas rompen una gran cantidad de polipéptidos intracelulares que incluyen los elementos principales del núcleo y del citoplasma, fundamentales en mantener la estructura celular (β -actina, gelsolina y laminina A y B), proteínas involucradas en el metabolismo y reparación del ADN como la poli (ADPribosa) polimerasa (PARP), ADN-PK, ADN-topoisomerasa II, ARN polimerasa I y varias proteínas cinasas (24, 40).

1.3.4. Fase de eliminación

En esta etapa participan enzimas catabólicas como las endonucleasas y las caspasas, cuya actividad hidrolítica inicia una serie de alteraciones estructurales en la célula; los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (16).

Muchos de los eventos de la *apoptosis*, se acompañan de cambios de gran importancia en el balance redox como resultado de la oxidación, el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y la oxidación de algunos constituyentes celulares. Por otro lado los metales de transición como el Fe^{2+} y el Cu^{2+} mediante la reacción de Fenton generan al radical más activo, el radical hidroxilo (OH^\cdot), el cual se ha comprobado que es inductor de apoptosis (41).



1.3.5 Apoptosis y su asociación a enfermedades

Diversas enfermedades están asociadas con la inapropiada regulación de la apoptosis, estas enfermedades pueden dividirse en dos grandes grupos: el que presenta aumento de la supervivencia celular (asociado con la inhibición de la apoptosis) y otro en el que hay un exceso de muerte celular (sobre activación de la apoptosis), cuadro III (42).

Inhibición de la apoptosis	Incremento de la apoptosis
Cáncer Colorrectal Glioma Linfoma folicular Carcinomas con mutaciones de p53	Enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer Parkinson Esclerosis lateral amiotrófica Rinitis pigmentosa Epilepsia
Tumores dependientes de hormonas: Cáncer de mama Cáncer de próstata Cáncer de ovario	Sistema hematopoyético: Anemia aplásica Linfocitopenia T CD4+ Deficiencia 6PD (monolitos)
Enfermedades autoinmunes: Lupus eritematoso sistémico Miastenia gravis	Daño a órganos Diabetes mellitus tipo 1 Pancreatitis alcohólica Daño isquémico (miocardio, retina, cerebro , riñón)
Infecciones virales Herpesvirus Poxvirus Adenovirus	SIDA

Cuadro II. Enfermedades asociadas con la inducción e inhibición de la apoptosis (8).

1.4 Necrosis

Es la forma de muerte celular más conocida, fue descrita en 1858 por Virchow y puede ser definida como un fenómeno degenerativo producido por daño repentino y severo. Las células que mueren por necrosis presentan características morfológicas y bioquímicas distintivas: los cambios tempranos incluyen aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido celular al micro ambiente, lo que desencadena un proceso inflamatorio que daña a las células sanas adyacentes. La liberación de hidrolasas ácidas de los lisosomas acelera la desintegración celular en la fase tardía de la necrosis. La cromatina se condensa de

manera irregular en el núcleo y se degrada en sitios al azar. El mecanismo de la necrosis se dispara sin la intervención activa de las células (1). En el cuadro III se muestran las diferencias características de la muerte celular por apoptosis y necrosis.

Característica	Apoptosis	Necrosis
Estímulo	Físico/Patológico	Patológico
Ocurrencia	Células solas	Grupo de Células
Adhesión entre células	Pérdida (temprana)	Pérdida (tardía)
Hinchamiento citoplasmático	Estadío tardío	Temprano
Daños a organelos	Tardío	Temprano
Liberación de enzimas lisosomales	Ausente	Presente
Núcleo	Silueta nuclear intrincada	Desaparición del núcleo
Cromatina nuclear	Comparación uniforme de masas densas	Agrupada, indefinida
Ruptura del ADN	Internucleosomal	Al azar, manchas
Resultado	Formación de cuerpos apoptóticos	Hinchamiento y desintegración
Fagocitosis por otras	Presente	Ausente
Inflamación	Presente	Ausente
Formación de cicatriz	Ausente	Presente

Cuadro III. Principales diferencias de las dos formas de muerte celular.

1.5 Biotransformación de Fármacos

Un gran número de sustancias extrañas a nuestro organismo (xenobióticos) penetran por la piel, sangre o pulmones y pueden ocasionar trastornos inmediatos o a largo plazo, lo que se evita gracias a que poseemos sistemas enzimáticos que llevan a cabo su biotransformación (43). Algunos xenobióticos son inocuos, pero muchos pueden provocar reacciones biológicas de naturaleza farmacológica o tóxica. La intervención que puede tener el metabolismo en la inactivación de los fármacos puede ser notoria; sin embargo algunos productos de la biotransformación tienen un aumento

en la actividad o en las propiedades tóxicas, como mutagenicidad, teratogenicidad, y carcinogenicidad (44).

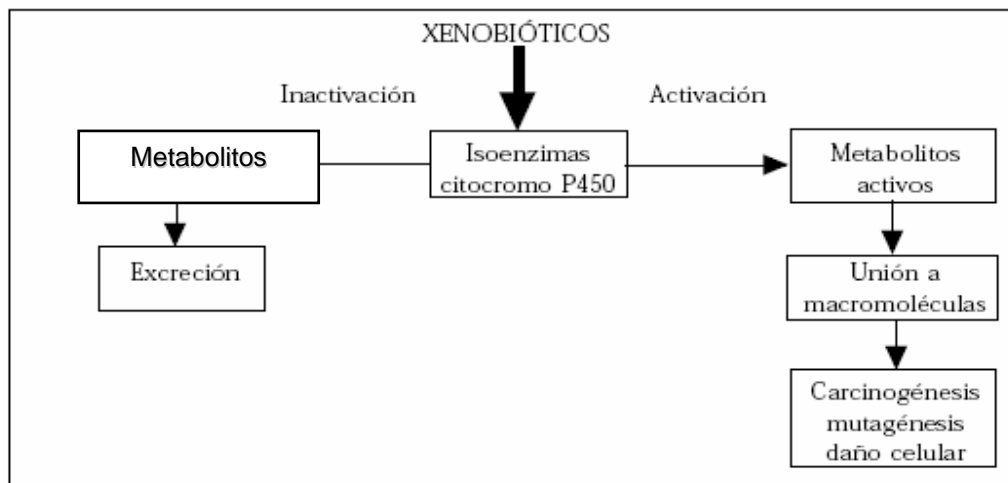


Figura 2. Reacciones de inactivación o activación mediadas por enzimas Citocromo P-450.

La biotransformación de xenobióticos se realiza básicamente en 2 fases:

Fase I, catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P-450. Fase II, en la que participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena como ácido glucorónico, sulfatos, acetato, el tripéptido glutatión o algunos aminoácidos. El objetivo final de ambas fases es aumentar la solubilidad en agua de los compuestos y así facilitar su excreción del organismo a través de la orina o la bilis.

Si bien la biotransformación de los fármacos *in vivo* puede ocurrir mediante reacciones químicas espontáneas y no catalizadas, la gran mayoría son catalizadas por enzimas celulares específicas. A nivel subcelular, estas enzimas pueden localizarse en el retículo endoplásmico, en las mitocondrias, en el citosol, en los lisosomas o incluso en la envoltura nuclear o la membrana plasmática (44)

1.5.1 Microsomas

Muchas enzimas que metabolizan fármacos se encuentran en las membranas lipofílicas del retículo endoplásmico de células hepáticas y en otros tejidos; cuando esas enzimas son aisladas mediante homogenización y fraccionamiento de la célula, son retransformadas en vesículas llamadas microsomas. Estos tienen la mayor parte de las características morfológicas y funcionales de las membranas íntegras, como la superficie del retículo endoplásmico rugoso (que contiene ribosomas) y del liso (que no contiene ribosomas). A pesar de que la principal función de los microsomas rugosos es la síntesis de proteínas, los microsomas lisos tienen una cantidad relativamente alta de enzimas que se encargan del metabolismo oxidativo de los fármacos; contienen la variedad de enzimas conocidas como oxidasas de función mixta (OFM) o monooxigenasas, la actividad de este sistema enzimático requiere la presencia de un agente reductor (NADPH) y de oxígeno molecular; en una reacción característica se consume una molécula de oxígeno (que es reducido) por cada molécula de sustrato, un átomo de oxígeno aparece en el producto y la otra en forma de agua.

En este proceso de oxidación y reducción intervienen dos enzimas microsómicas de manera fundamental (Fíg 3); la primera de ellas es una flavoproteína, NADPH-citocromo P-450 reductasa. Un mol de esta enzima contiene un mol de mononucleótido de flavoproteína (FMN) y uno de dinucleótido adenina flavina (FAD). A menudo esta enzima es llamada NADPH-citocromo c reductasa en virtud de que el citocromo c acepta electrones. La segunda enzima microsomal es una hemoproteína llamada citocromo P-450 y funciona como una oxidasa terminal. El nombre de citocromo P-450 se deriva de las propiedades del espectro de esta proteína en su forma reducida (ferrosa), se une al monóxido de carbono para formar un complejo que absorbe luz en forma máxima a 450 nm; la abundancia relativa del citocromo P-450 comparada con la reductasa en el hígado, contribuye a que la reducción en el hem fotocromo P-450 sea el paso de límite de velocidad de las oxidaciones de los fármacos en el hígado (44).

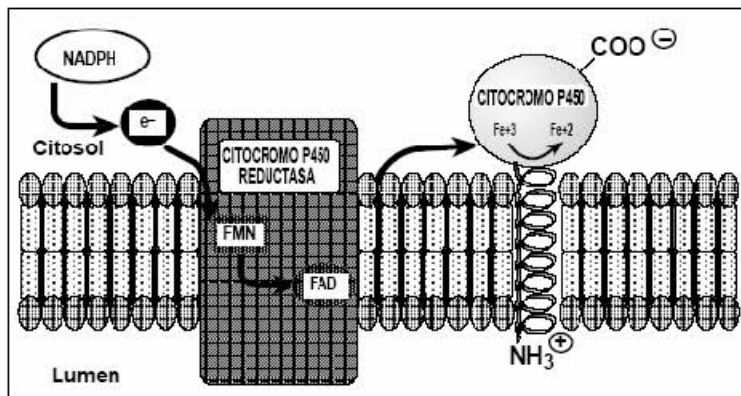


Figura 3. Traspaso de electrones desde el NADPH al citocromo P-450 catalizado por la enzima de membrana NADPH citocromo P-450 reductasa.

1.5.2 Mecanismo de acción del Citocromo P-450

El citocromo P-450 oxidado (Fe^{3+}) se combina con el sustrato de un fármaco para formar un complejo binario (1), el NADPH dona un electrón a la flavoproteína reductasa, la cual a su vez reduce el complejo citocromo oxidado P-450 fármaco (2), el NADPH dona un segundo electrón el cual se introduce por medio de la misma flavoproteína reductasa, y que sirve para reducir el oxígeno molecular (3) y para formar el complejo de "oxígeno activado" (4), este complejo a su vez transfiere el oxígeno activado hacia el fármaco (5, 6, 7), que sirve de sustrato para formar el producto oxidado (44).

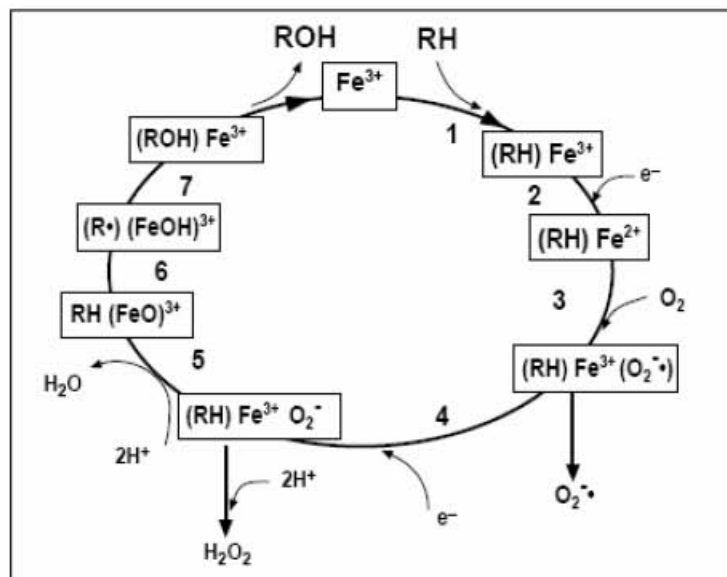


Figura 4. Mecanismo de acción del citocromo P450.

Este esquema (Fíg. 4) es una simplificación del mecanismo de acción del citocromo P450 propuesto por Coon. El Fe^{3+} representa al hierro del grupo heme del citocromo P-450 oxidado, $\text{RH}=\text{}$ al sustratos (fármaco original) y $\text{ROH}=\text{}$ y productos (metabolitos del fármaco) respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se liberan anión superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (45).

1.6 Técnicas Auxiliares Utilizadas en la Detección de Apoptosis

La detección de apoptosis ha adquirido gran importancia en el área del cáncer, ya que puede ser útil para conocer el mecanismo de acción de fármacos, mecanismos asociados a la naturaleza de la enfermedad, efectividad de tratamientos, etc. Dentro de los procesos comúnmente utilizados para la detección de apoptosis está la detección de degradación de DNA, cambios en la simetría de la membrana celular y activación de proteínas específicas.

1.6.1 Detección de apoptosis por la técnica de TUNEL

Debido a que la degradación del DNA es una de las características más importantes en la apoptosis se han desarrollado diferentes métodos que permiten analizar individualmente cada célula, en busca de esta degradación. Uno de los métodos más utilizados es el de marcaje de DNA de hebra sencilla por medio de una tranferasa terminal (46), que adiciona nucleótidos marcados al DNA en extremos 3' libres; dichos nucleótidos pueden estar marcados con fluoresceína o bien se pueden detectar por métodos de inmunohistoquímica, este método se conoce como TUNEL (tranferase-mediaded dUTP nik end labeling) y se puede utilizar tanto por medio de citometría como por microscopia. Esta técnica permite determinar la presencia de fragmentación de DNA en células individuales, por lo que es posible conocer la proporción de células que están muriendo por apoptosis en un determinado momento (47, 48).

1.6.2 Detección de la activación de caspasas

La activación de la caspasa 3 se utiliza como marcador temprano de la apoptosis (49). La determinación de la activación de la caspasa 3 presenta la gran ventaja de que es un evento que tiene una alta correlación con la inducción de apoptosis.

1.6.3 Inmunohistoquímica

Su importancia radica en la información que provee de las enfermedades neoplásicas tales como:

- 1. Nivel de receptores hormonales**
- 2. Expresión de oncogenes**
- 3. Proliferación celular**
- 4. Angiogénesis tumoral**
- 5. Productos hormonales de tumores.**

Es una técnica altamente sensible, permite resolver problemas en el diagnóstico así como en la clasificación de tumores, el origen de carcinomas, micrometástasis, información pronóstica y observación de microorganismos, por lo que es utilizada en la clínica cotidiana, así como en Proyectos de investigación.

La inmunohistoquímica es una herramienta muy útil ya que permite la detección de proteínas que participan en el proceso apoptótico al emplear anticuerpos dirigidos contra ellas. Por mencionar algunas: Fas (CD95), Fas L (CD95 L) miembros de la familia Bcl-2, Caspasa 3, p53, p21, etc. (50, 35).

Capítulo 2.

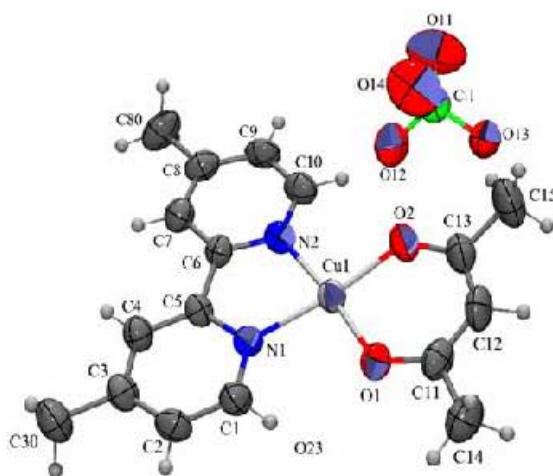
2.1 Casiopeínas

En México, la necesidad de importación de estos productos y su tan elevado costo, hace que el desarrollo de productos antineoplásicos adquiera prioridad. Así, en la búsqueda de alternativas, un grupo de investigadores de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, encabezado por la Dra. Lena Ruiz Azuara, se han enfocado al diseño, síntesis, caracterización y posterior evaluación, de una familia de compuestos de coordinación con Cobre como núcleo metálico, a los que se denominó Casiopeínas® (51-56).

Durante el desarrollo de estas moléculas se tomaron en cuenta tres factores fundamentales:

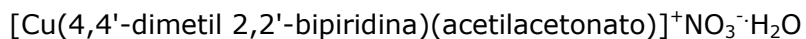
- La inclusión de un metal esencial biológicamente importante (lo que disminuye notablemente su toxicidad).
- La capacidad del metal para formar quelatos que favorecen la formación de estructuras químicas con configuración "cis".
- La asociación de moléculas con capacidad quelante que le confieren diferentes niveles de hidrofobicidad e hidrofiliidad.

Estos compuestos han mostrado actividad antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo la Casiopeína III-ia® una de las más activas y menos tóxica.



Estructura de la Casiopeína III-ia®

2.1.1 Casiopeína III-ia®



Propiedades fisicoquímicas:

- En condiciones de fuerza iónica, temperatura constante y en un intervalo de pH de 6 a 8, es una molécula estable tanto en estado sólido como en solución acuosa (84).
- En medios ácidos ($\text{pH} \leq 5$) se protona y disocian los ligantes, de allí que no pueda ser administrada por vía oral. Tiene un pKa de 8.25, esta característica química establece la relación del grado o fuerza de disociación de un ácido o una base (57).
- Es soluble en solución salina y estable por 5 días al igual que en solución de Hartmann, en tanto que en solución glucosada al 5% a bajas concentraciones (0.1 y 0.25 g/L) es estable únicamente por dos días; cuando las concentraciones de Casiopeína son de 0.5 y 1 g/l, la solución permanece estable hasta por 19 días (mantenidas en refrigeración durante el tiempo de evaluación) (57).
- Tiene un Coeficiente de partición de 0.358, este índice representa la distribución de una sustancia entre una fase lipídica y una fase acuosa. Mientras más alto sea este valor, más fácilmente puede difundirse a través de las membranas (57).

2.1.2 Actividad *In Vitro*

Se evaluó la actividad anticancerosa de los diferentes constituyentes de las Casiopeínas sobre dos líneas tumorales humanas y una murina, encontrándose que ninguno de sus constituyentes por separado tiene actividad medida en función de su capacidad para inhibir el crecimiento celular sobre ninguna de las líneas celulares estudiadas. Esto permite afirmar que se requiere de la integridad de la molécula para desarrollar su efecto.

Concentración inhibitoria media (CI50) en $\mu\text{g/mL}$

Compuesto	Fórmula Química	Líneas tumorales		
		Cáncer cervico-uterino humano		Murinas
		HeLa	SiHa	LL
III-ia	$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil}2,2\text{-bipiridina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$	1.6×10^{-5}	1.0×10^{-8}	198.8
	$[\text{Cu}(4,4\text{-dimetil}2,2\text{-bipiridina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$	26.0		48.72
	$[\text{Cu}(4,4\text{-dimetil}2,2'\text{-bipiridina})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$	190.2	197.6	32.91
	$[\text{Cu}(\text{acetilacetato})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{NO}_3$		679.1	∞
Cisplatino	$[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})_2]$	1.1×10^{-2}	1.9×10^{-4}	1.7×10^{-5}

HeLa: células de adenocarcinoma de cérvix queratinizantes, de morfología epitelial. Estadio IV A.

SiHa: carcinoma de células escamosas de cérvix, de morfología epitelial. Estadio III B

LL: carcinoma de pulmón de Lewis.

2.1.3 Mecanismo de acción y Modelaje

- Las Casiopeínas imitan la actividad de la SOD. Los valores obtenidos para la constante de velocidad (Kcat) se encuentran en el intervalo de 10^6 a 10^7 M⁻¹s⁻¹ que si bien es notablemente inferior al de la enzima natural (2×10^9), permite afirmar que las Casiopeínas tienen una reactividad similar en otros modelos de SOD.
- Inhibe la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hígado de rata, inhibe los estados 3 y 4 mitocondriales y la respiración desacoplada, y colapsa el potencial transmembranal. Este efecto depende del tiempo de exposición y de la concentración de Casiopeínas presente. Se propone que el citocromo b-c1 o la citocromo oxidasa sean el sitio específico de acción (58).
- Estudios realizados con *Drosophila* mostraron un efecto genotóxico, significativamente menor que el de otros anticancerígenos empleados actualmente en la terapéutica (59).

- Investigando su posible interacción con el DNA se estudió el grado de afinidad de la Casiopeína con las diferentes bases púricas y pirimídicas, encontrándose resultados positivos únicamente con la adenina, al parecer a través del establecimiento de uniones a través de enlaces π , que por su misma naturaleza tienden a romperse cuando cualquier compuesto con mayor afinidad se encuentra presente en el sistema. Sin embargo, se propone la intercalación de la Casiopeína con la molécula del DNA. A pH mayor a 8 se desprotona la adenina y ésta desplaza al acac en la molécula de Casiopeína III ia, dando lugar a un dímero de fórmula mínima $[\text{Cu}(4,4\text{-dm},2,2\text{-bipi})(\text{adenina})]_2 (\text{NO}_3)_2$ (60).
- El estudio de la interacción de Casiopeína III ia ® con metionina, mostró que este tioaminoácido es capaz de sustituir al acac (61).
- Estudios empleando plásmidos de DNA mostraron interacción dependiente de la dosis y el tiempo de incubación. Se encontró mayor efecto cuando se emplearon Casiopeínas ® en las que el donador (N-O) es un aminoácido, que cuando el donador (O-O) fue acac o salal (62).
- Se validó el modelo de determinación de la Casiopeína III ia por el método de HPLC y se realizaron estudios de farmacocinética en rata y perro (63).

2.1.4 Pruebas de Cernimiento, Primario y Secundario:

Pruebas In Vitro

- Mostró actividad anticancerígena sobre líneas tumorales humanas, en tanto que en las murinas no se encontró el mismo efecto:

Concentración inhibitoria media (CI50) en µg/ml

Casiopéina	Lineas tumorales							
	Carcinoma Cervico-uterino humano						Murinas	
	HeLa	SiHa	Ca Ski	C33	CaLo	InBi	Melanoma B16	Carcinoma de pulmón de Lewis
III-ia	16.8	0.01	—	—	—	2.64	10761.5	1988 x 105
Cis-Platino	11523	1.49	202.46	8.85	5.53	5.62	55.71	188.24

HeLa: células de adenocarcinoma de cérvix queratinizantes, de morfología epitelial. Estadio IV A, SiHa: carcinoma de células escamosas de cérvix, de morfología epitelial. Estadio III B, CaSki: células de carcinoma epidermoide de cérvix, de morfología epitelial. Estadio II B, C33: células de carcinoma epidermoide de cérvix, de morfología epitelial. Estadio I A, CaLo: células de carcinoma epidermoide no queratinizado, de morfología epitelial. Estadio II B.

Pruebas In Vivo

- Cuando se evaluó su potencial citotóxico mediante la determinación de su efecto sobre el índice mitótico en células de médula ósea de ratón, se encontró un valor de 1.8 para la Casiopéina, 3.7 para el cis-platino y de 9.9 para la Mitomicina C. Es de hacer notar que aún cuando las dosis empleadas son próximas para los dos primeros (14 y 17 mg/Kg) el potencial citotóxico del compuesto de prueba es 2 veces menor que para el Cisplatino (64).
- Cuando se probó su actividad antineoplásica en ratones con inóculo tumoral de células de Melanoma B16 (B16) en diferentes esquemas de tratamiento, la relación T/C (media de vida de animales tratados/media de vida de animales control x 100) fue mayor de 125% para el esquema en que se administró los días 1, 4, 7 y 10; considerando que un criterio de aceptación necesita de un T/C mayor o igual a 125%.

- Cuando el compuesto fue probado en líneas celulares murinas L1210, se obtuvo un valor de 97.6 % de sobrevivencia con un esquema de tratamiento de 1, 5 y 9 administrando una dosis de 6 mg/Kg.
- Se evaluó la actividad antineoplásica del compuesto en gatos con leucemia viral felina (LVF), enfermedad muy común en los gatos, es altamente infecciosa y ocasiona leucemia, inmunosupresión y anemia. Una vez adquirida no existe cura y se estima que el 85% muere en un lapso de tres años posteriores a su diagnóstico. Se administró una dosis semanal de 3 mg/Kg por infusión iv durante 6 semanas. Se encontró que la presencia de linfoma persistió, no obstante la cuenta leucocitaria mostró un descenso muy marcado (65,66).

2.1.5 Ensayos Farmacológicos

- Al implementar y validar la metodología de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para la cuantificación del compuesto de prueba en fluidos biológicos, se estudió su unión a proteínas plasmáticas humanas, en ratas a las que se administró 4 mg/Kg iv y se tomaron muestras a los 0, 15, 25, 35, 45 y 70 min. Se encontró que el tiempo de equilibrio se alcanzó a los 300 minutos y su unión a proteínas plasmáticas en una concentración de 25 µg/mL fue de un 34.77%.
- En estudio de unión de la Casiopeína III-ia[®] a proteínas plasmáticas por el método de ultrafiltración, empleando soluciones de albúmina y plasma humano: la primera a concentración de 45 mg/mL (equivalente a la presente en el organismo) se encontró un 5.67% de unión, para una concentración de Casiopeína de 10,25,50 y 100 µg/ml, para plasma humano el % de unión fue de 6.23 %, a concentraciones de Casiopeína de 25, 50, 100 y 125 µg/mL.
- Cuando se estudió su comportamiento farmacocinético en conejos (n = 10) a los que se administró una dosis de 10 mg/Kg por infusión iv por 15 min. Se tomaron muestras sanguíneas a los 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 210, 240, 270 y 300 min. Se ajustaron los resultados a un modelo de un compartimiento para diferentes niveles de Casiopeína, se usó CLAR (HPLC) (63).

2.1.6 Toxicología

- Dosis Letal50

Especie en estudio		Vía de administración	Dosis (mg/Kg)
Rata	Hembra	Intraperitoneal	19.93
		Intravenosa	5.96
	Macho	Intraperitoneal	14.36
		Intravenosa	5.51
Ratón	Hembra	Intraperitoneal	32.33
		Intravenosa	12.82
	Macho	Intraperitoneal	24.68
		Intravenosa	12.78

JUSTIFICACIÓN

Si bien los antecedentes aquí mostrados evidencian la actividad de la Casiopeína III-ia[®], poco se ha hecho acerca de la influencia que el metabolismo tiene en dicha actividad, de ahí que el presente trabajo pretende evaluar la influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa de la Casiopeína III-ia[®] así como la vía de inducción de muerte celular en tres líneas tumorales humanas HeLa, MCF7, SKLU-1, y en Linfocitos humanos aislados, comparando con Cisplatino[®] como fármaco de referencia, además de evaluar la influencia que el metabolismo tiene en la actividad de estos fármacos.

2.2 HIPÓTESIS

La capacidad antiproliferativa así como la expresión de proteínas apoptóticas y antiapoptóticas producidas por Casiopeína III-ia[®] se verá alterada por la influencia del metabolismo en las líneas tumorales SKLU-1, HeLa, MCF7 y Linfocitos Humanos aislados.

OBJETIVOS

- Evaluar la influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa de la Casiopeína III-ia[®] utilizando la técnica de Sulforrodamina B en las tres líneas tumorales SKLU-1, HeLa, MCF7 y Linfocitos Humanos aislados.
- Evaluar la influencia del metabolismo en la capacidad apoptótica de la Casiopeína III-ia[®] comparando por medio de dos técnicas, la de Inmunohistoquímica (proteínas Anti/pro-apoptóticas) y la de TUNEL (“TDT-mediated X-dUTP nick end labeling”) en tres líneas tumorales SKLU-1, HeLa, MCF7 y Linfocitos humanos aislados.
- Dilucidar la vía de inducción de apoptosis evaluando por inmunohistoquímica la proteína antiapoptótica Bcl2, la proteína proapoptótica Bax y la proteína ejecutora de la apoptosis Caspasa 3 en tres líneas tumorales SKLU-1, HeLa, MCF7 y Linfocitos Humanos aislados.
- Evaluar si la Casiopeína III-ia[®] produce efectos diferentes sobre la actividad antiproliferativa de líneas de células tumorales y células sanas (linfocitos).

METODOLOGÍA

3.1 Materiales, Equipo y Reactivos:

Adenocarcinoma de Pulmón SK-LU-1
Carcinoma mamario MCF-7
Carcinoma cérvico-uterino HeLa
Linfocitos humanos
Tanque de nitrógeno líquido
Ultracongelador Revco (- 70 °C)
Criotubos
Baño María
Termómetros de -20 a 100 °C
Campana de flujo laminar clase II
Pipeteadores
Pipeta automática de 2 a 10 µL
Pipeta automática de 10 a 100 µL
Pipeta automática de 100 a 1000 µL
Jeringas de 5 mL
Cajas de cultivo estériles de 25 mL
Placas de 96 pozos estériles
Pipetas serológicas estériles de 1, 5, 10 mL
Pipetas Pasteur estériles
Tubos de microfuga de 1.5 mL
Tubos cónicos estériles de polipropileno de 15 mL.
Puntas para micro pipeta de 100 y 1000 µL.
Filtros estériles de 0.22 µ
Portaobjetos estériles de 8 pozos
Cisplatino
Casiopéina III-ia
DMSO concentrado
Medio de Cultivo D-MEM.
Medio de Cultivo RPMI-1640
Suero Fetal Bovino
Fracción microsomal (lío-filizado de rata SD)
Incubadora de CO₂ Labline
Microscopio óptico Olympus

Microscopio invertido Iroscop
Centrífuga clínica de 1000 a 2500 rpm Solbal
Balanza analítica
Bomba de vacío
Quitazato Kimax
Matraz volumétrico de 100mL
Agua destilada

Soluciones:

Sulforrodamina B 10%
Ácido acético al 1 %
Ácido tricloroacético al 10 %
Etanol al 70 %
Antibiótico y antimicótico.- 10,000 unidades/mL de penicilina G-sódica, 10,000 µg/mL de sulfato de estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina b en solución salina al 0.85%.
Azul Tripano al 0.4%

Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS).

NaCl 0.8 g
KCl 0.04 g
Na₂HPO₄ 0.0048 g
KH₂PO₄ 0.006 g
NaHCO₃ 0.035 g
Glucosa 0.1 g
Rojo fenol 0.001g.
EDTA 0.7444g.

Todo se disuelve, se ajusta el pH a 7 ó 7.5, y se afora en un matraz volumétrico 100 mL con agua destilada y se almacena a 4 °C.

Cofactor para la fracción microsomal:

HEPES 20 mM, pH 7.2
MgCl₂ 0.4 M
KCl 1.65 M
Glucosa 6 fosfato (G-6-P) 1M
Dinucleótido Adenin fosfato (NADP) 1M
Ficoll Histopaque-1083.

Ficoll 400 6.41 g.

Diatrizoato de sodio 10.02 g.

Kit para inmunohistoquímica (DakoCytomation):

Recuperador de antígeno

Diluyente del anticuerpo

Bloqueador de peroxidasas biotinilado

Estreptavidina-HRP

Cromógeno + diaminobencidina

Anticuerpos monoclonales: Bcl-2, Bax, p53, Ki76, caspasa 3

Kit de TUNEL Roche.

3.2 Descongelamiento de líneas celulares

Las células se encuentran originalmente en criotubos que se sacan del tanque con nitrógeno líquido y se introducen en baño María a 37° C. En la campana de flujo laminar se prepara un tubo con 10 mL de medio D-MEM, en cuanto se observa el descongelamiento, se pasa la suspensión celular al tubo ya preparado y se centrifuga durante 5 min. a 1500 rpm, el sobrenadante se desecha y el paquete celular se resuspende en 1 mL de medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10%, aminoácidos, antibióticos, antifúngicos y se procede a la siembra en las botellas de cultivo.

3.2.1 Obtención del cultivo stock a confluencia

Las células después de haber sido lavadas se colocaron en botellas de cultivo de 25 cm², con 5 mL de medio de cultivo adicionado con 10% de suero fetal bovino, este cultivo se incubó a 37° C ± 2° C y 5% de CO₂. Se revisó diariamente el cultivo para estimar el porcentaje de confluencia, se cambió el medio de cultivo cada 48 hrs. Al tener el cultivo entre el 70 y 90% de confluencia se procedió a la tripsinización.

3.2.2 Tripsinización

Una vez que se obtuvo el cultivo Stock a confluencia se aspiró el medio de cultivo de la caja, se lavó con 5 mL de PBS estéril, se aspiró, se adicionaron 3 mL de PBS-EDTA y 2 mL de la solución de Tripsina, se agitó hasta que al microscopio se observaron las células desprendidas de la superficie y disgregadas. Se paró la reacción de la Tripsina adicionando 5 ml de PBS-Albúmina estéril, esta suspensión se colocó en

un tubo de polipropileno de 15 mL y se procedió a centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se desecho y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo.

3.2.3 Cuantificación de Células

Por separado en un tubo de microfuga de 1.5mL se colocaron 20 μ L de la suspensión de células y 80 μ L de solución de azul tripano, se mezcla perfectamente y se transfirieron cuidadosamente a las dos secciones de la cámara de Neubauer. Se colocó el hematocitómetro en el microscopio óptico utilizando el objetivo de 10X, y se procedió a contar el número de células, teñidas y no teñidas por mm^2 , para que el conteo sea más preciso se recomienda que la cuenta sea de entre 100 y 500 células por mm^2 , la cuenta se repitió en las otras secciones y después se hicieron 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

10^4 = Factor de conversión de la cámara

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = [(\text{Toc}-\text{Teñ})/\text{Toc}]*100$$

Donde:

Toc = Total de células contadas

Teñ = Células teñidas

3.2.4 Ensayo de Inhibición de la Proliferación

Una vez cuantificadas las células, se sembraron las células en las placas de 96 pozos de la siguiente manera: se preparó una dilución celular de 10^6 células/mL del cual se agregó un volumen de 20 μ l a cada pozo con 100 μ L de medio suplementado, para tener 20,000 células/pozo. Se incubó a 37°C y 5% de CO_2 por 24 horas para que se recuperaran de la tripsinización. Al término de las 24 horas se aspiró el medio y se adicionaron 90 μ L de medio con SFB y 10 μ L de cada una de las concentraciones de fármacos (casiopéina III-ia y cisplatino) a las concentraciones 0.01, 0.1, 1.0 y 10 μ g/mL; los fármacos se agregaron inmediatamente después de preparadas las disoluciones para evitar la degradación de los compuestos, y se dejó en incubación por

24 horas. Al término de la incubación se aspiró el medio y se fijaron las células con 100 μ L de ácido tricloroacético al 10% durante una hora a 4° C. Se lavaron 5 veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

3.2.5 Tinción con Sulforrodamina-B y Lectura

Se adicionaron 100 μ L de la solución de Sulforrodamina B al 0.4 % (preparada en ácido acético al 1%) a cada uno de los pozos con células, y se dejó en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron 4 veces con ácido acético al 1%, cuidando de aspirar completamente el ácido en cada lavado dejando secar completamente. El colorante celular se solubilizó con 100 μ L de Tris base 10 mM (pH 10.5) durante 5 minutos y con agitación mecánica suave. Finalmente el colorante celular se leyó en un lector de microplacas a 564 nm (94).

Se determinó en cada línea y compuesto la capacidad para inducir el 50% de inhibición de la capacidad proliferativa. Se consideró la proliferación celular máxima (100%) de los cultivos control, para este análisis se empleó el programa Probit (Log Probit Análisis by Maximum Likelihood).

3.3 Generalidades de las líneas celulares: HeLa, MCF7, y SK-LU-1

3.3.1 Línea Celular HeLa: Carcinoma epitelial de cervix

HeLa fue la primera línea celular epitelioide derivada de un tejido humano y mantenida continuamente por una serie de cultivos celulares. Fue aislada en 1951 de un carcinoma de cervix de una mujer negra de 31 años de edad por G.O. Gey, W.D. Coffman, and M.T Kubicek (Cancer Res. 12:264,1952). Una reexaminación de muestras originales efectuadas por Jones *et al.*, (Obstet Gynecol. 38:945-949, 1971) diagnosticó el tumor como adenocarcinoma. En mayo de 1952 se mandó una muestra de plasma sanguíneo a W.F Scherer para que mantuviera una serie de cultivos en monocapa en medio con 40 % de suero humano, 2% de extracto de embrión de pollo, 58% de solución balanceada de Hank's. en 1958 la línea fue congelada (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87: 480) y se comenzó a utilizar en 1959, con el tiempo fue recultivada y recongelada en 1960. Después de otra recultivación y recongelamiento fue reactivada en 1961 por la American Type Culture Collection. Esta línea fue sometida a aproximadamente de 76 a 88 pases.

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*10e5 células viables en 7 mL de medio de cultivo a 37°C, con atmósfera de 5% de bióxido de carbono y 95% de aire, se multiplica aproximadamente 15 veces en 7 días.
- Morfología: Tipo epitelial.
- Esterilidad: resultaron negativas a las pruebas para *Mycoplasma*, 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: DMEM suplementado con glutamina, HEPES, insulina, aminoácidos no esenciales, antibiótico-antimicótico y 10% de suero fetal bovino.

3.3.2 Línea Celular MCF7: adenocarcinoma mamario

Son células procedentes de efusión pleural, fueron sembradas en medio esencial Eagle's y con aminoácidos no esenciales, 20µg de insulina/mL y 20% de suero fetal bovino por derivación de esta línea (H.D. Soule, *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 51: 1409- 1416, 1973). Ha mantenido diversas características del epitelio mamario diferenciado incluyendo la capacidad para procesar estradiol vía receptores de estrógenos citoplasmáticos y la capacidad de formar domos.

Un cultivo en su pase 138 fue donado al ATCC por C.M. McGrath en abril de 1982.

- Datos Generales de las células MCF7
- Datos del paciente: edad 69 años, sexo femenino, raza caucásica; tipo sanguíneo O⁺.
- Tratamiento: Radiación y hormonoterapia.
- Características de crecimiento: monocapa, se multiplica en 1 a 2 semanas.

- Morfología: Tipo epitelial
- Isoenzimas PGM₃ 1; PGM₁ 1-2; ESD, 1-2; AK1, GLO-1, 1-2; G6PD, B.
- Número de subcultivos seriados: 143
- Condiciones de congelación: medio 95%, DMSO 5%, libre de antibiótico.
- Viabilidad: 83%.
- Medio de cultivo: medio de Eagle's mínimo esencial con aminoácidos no esenciales, y piruvato de sodio 90%, Suero fetal bovino 10%, libre de antibiótico.
- Esterilidad: pruebas para *Mycoplasma*, bacterias y hongos negativos.
- Especie: Confirmación en humano por análisis de isoenzimas.

3.3.2 Línea Celular SK-LU-1: adenocarcinoma de pulmón pobremente diferenciado, grado III, humano

Fue obtenido a partir de un células de un tumor primario, cultivadas en medio mínimo esencial Eagle's con 10 % de suero fetal bovino en 1969.

Características generales reportadas

- Datos del paciente: edad: 60 años, sexo femenino, raza caucásica, tipo sanguíneo O⁺.
- Crecimiento: monocapa, se multiplica de 1 a 4 semanas.
- Morfología: tipo epitelial.
- Citopatología *In Vitro* (p30) Adenocarcinoma.
- Tumorigenicidad: Forma tumores en ratas inmunocompetentes.
- Condiciones de congelación: 95 % de medio de cultivo, 5 % de DMSO, libre de antibiótico.
- Viabilidad: 80%
- Medio de cultivo: 90 %medio mínimo esencial Eagle's, con aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio en Earle's BSS, 10 % de suero fetal bovino, libre de antibiótico.
- Isoenzimas: Me-2,1; PGM₃,1; PGM₁ 2; Es D, 2,; AK1, 1; GLO-1, 2; G6PD, B.
- Esterilidad: negativo a micoplasma, bacterias y hogos.
- Especie: confirmado como humano por análisis de isoenzimas.

3.4 Preparación de la fracción microsomal

Para 5 mL de fracción microsomal

En condiciones estrictas de esterilidad, se pesaron 0.016mg de liofilizado de rata SD, se adicionó 1 mL de HEPES, 0.5 mL de $MgCl_2$, 0.5mL de KCl, 0.5 mL de NADP, 0.5 mL de Glucosa 6- P, y por último 2 mL de agua destilada (95). Todas las soluciones fueron filtradas con filtros de 0.22 μ m. Se adicionó 10 μ L de esta solución a los cultivos a estudiar al mismo tiempo que se adicionó el fármaco.

3.5 Aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica

- 1.- Por venopunción se obtienen de 5 a 7 mL de sangre de un voluntario adulto sano, en tubos de vacío con heparina.
- 2.- Se toman 5 mL de sangre y se mezclan con otro volumen igual, es decir, 5mL de Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS).
- 3.- Se adiciona el Ficoll a la mezcla realizada en el punto 2 ayudándose de una pipeta Pasteur.
- 5.- El tubo se centrifuga a 2500 rpm durante 15 min. a 25°C; al final de la centrifugación se obtuvieron dos fases: hasta el fondo del tubo, que constituye la fase inferior, hubo un color rojo intenso que eran eritrocitos y plaquetas; en la fase superior se observó un color rojo pálido; lo que nos interesó fue la fase intermedia entre estas dos, que es un anillo blanco que estaba exactamente en medio de las dos fases que es el que contenía los linfocitos.
- 6.-Este anillo se succionó con una pipeta Pasteur y se transfirió a otro tubo cónico de 15 mL al cual se le adicionó 5 mL de HBSS y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min.
- 7.- Se tiró el sobrenadante por succión, se resuspendió el botón de células en 5 mL de HBSS y se volvieron a centrifugar a 2500 rpm durante 10 min; nuevamente se tiró el sobrenadante, se resuspendió el botón de linfocitos en 1 mL de medio RPMI-1640 adicionado con 10% de suero fetal bovino, antibiótico y antifúngico y se contó en el hemocitómetro.

Una vez cuantificadas las células, se sembraron las células en las placas de 96 pozos para la determinación de la concentración inhibitoria 50 y en portaobjetos de 8 pozos para la determinación inmunohistoquímica.

3.6 Inmunohistoquímica

Para esta determinación se sembraron 20,000 células por pozo en portaobjetos estériles de 8 pozos, se dejó en incubación a 37° C y 5% de CO₂ por 24 horas. Al término de las 24 horas se aspiró el medio y se adicionó 90 µL de medio (adicionado con SFB al 10 %) y 10µL de cada una de las concentraciones de los fármacos (casiopeína III-ia y cisplatino) a las concentraciones 0.01, 0.1, 1.0 y 10 µg/mL, se incubando los cultivos por 24 horas. Al término de la incubación los cultivos fueron fijados en una mezcla de etanol- ácido acético- agua (90 mL-5 mL-5 mL), por 30 minutos, después fueron tratados por 10 minutos en horno de microondas con una solución recuperadora de antígenos pH 6.0, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se lavaron con tris-buffer con tween 20 pH 7.6, luego fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 3% por 5 minutos para el bloqueo de peroxidasas endógenas, seguido de la aplicación de los anticuerpos primarios Bcl-2, Bax, Ki-67 (marca DAKO), caspasa 3 (Santa Cruz) cuya dilución de trabajo fue de 1:50, incubados por 30 minutos a temperatura ambiente, después lavados por 5 minutos con tris-buffer con tween 20 pH 7.6, después fueron incubados por 15 minutos con un anticuerpo secundario biotinilado y 15 minutos con un anticuerpo terciario conjugado con peroxidasa (marca Dako), al término de este tiempo fueron lavados con tris-buffer con tween 20 pH 7.6 y reveladas la inmunoreacciones con diaminobencidina por 5 minutos formando un producto final permanente de color café, luego los cultivos fueron lavados y contrateñidos con hematoxilina de Mayers (marca Dako) por 3 minutos, finalmente fueron lavados con agua corriente, deshidratados y cubiertos con resina y observados al microscopio. Para la evaluación al microscopio se contaron de 1 a 25 %; de 26 a 50%, de 51 a 75 % y de 76 a 100 % en un campo de 400x. También fue evaluado el grado de tinción: 0 (negativo), 1+ (débil), 2+ (moderada), 3+ (fuerte)

3.7 TUNEL

Para esta determinación se sembraron 20,000 células por pozo en portaobjetos estériles de 8 pozos, se incubaron a 37° C y 5% de CO₂ por 24 horas. Al término de las 24 horas se aspiró el medio y se adicionó 90 µL de medio (adicionado con SFB al 10 %) y 10µL de cada una de las concentraciones de los fármacos (casiopeína III-ia y cisplatino) a las concentraciones 0.01, 0.1, 1.0 y 10 µg/mL, se incuban por 24 horas. Los cultivos fueron fijados en etanol-ácido acético-agua (90 mL-5 mL-5 mL) por 30 minutos, después fueron tratados por 10 minutos en horno de microondas con una

solución recuperadora de antígenos pH 6.0, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se lavaron con tris-amortiguador con tween 20 pH 7.6, seguido de la aplicación de la reacción mixta de TUNEL (marca Roche®), incubándose a 37° C por 1 Hr, al término de la incubación se lavó con amortiguador tris y se adicionó el convertidor POD por 30min a 37° C, nuevamente se lavó con tris buffer y se reveló la reacción de TUNEL con diamino bencidina por 5 minutos formando un producto final permanente de color café, luego los cultivos fueron lavados y contrateñidos con hematoxilina de Mayers (marca Dako) por 3 minutos, finalmente fueron lavados con agua corriente, deshidratados y cubiertos con resina y observados al microscopio La evaluación se hizo igual que en la determinación anterior.

Resultados y análisis de resultados

4.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media

A continuación se presentan los resultados de los ensayos colorimétricos con Sulforrodamina B obtenidos en las líneas celulares HeLa, MCF7, SK-LU-1 expuestas a Casiopeína III-ia[®] y Cisplatino[®] durante 24 hrs. y bajo las mismas condiciones.

4.1.1 Línea Celular HeLa

A continuación se presentan los porcentajes de viabilidad obtenidos en la línea celular HeLa en donde se observa que el Cisplatino[®] no alcanza el 50% de inhibición celular a ninguna de las concentraciones utilizadas, la adición de fracción microsomal disminuye ligeramente este porcentaje de células vivas. Sin embargo con la Casiopeína III-ia[®] se obtiene más del 50% de inhibición y también disminuye ligeramente el porcentaje de células vivas cuando se adiciona fracción microsomal en el medio obteniendo un porcentaje de inhibición de la proliferación menor a 50 %.

Concentración de Cisplatino [®] y Casiopeína III-ia [®] µg/mL	Tratamiento con Cisplatino [®] % Viabilidad	Tratamiento con Cisplatino [®] y fracción microsomal % Viabilidad	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®] % Viabilidad	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®] y fracción microsomal % Viabilidad
0	100	100	100	100
0.01	97	89	98	93
0.1	93	85	88	82
1.0	87	78	73	66
10	56	51	48	43

Tabla 4.1.A. Inhibición de la proliferación Celular en la Línea HeLa

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones mM equivalentes a los μg de fármaco que se utilizaron en todos los tratamientos.

Concentración de Cisplatino [®] y Casiopeína III-ia [®] $\mu\text{g}/\text{mL}$	Concentración de Cisplatino [®] mM	Concentración de Casiopeína III-ia [®] mM
0	0	0
0.01	3.33E-07	2.25E-07
0.1	3.33E-06	2.25E-06
1.0	3.33E-05	2.25E-05
10	3.33E-04	2.25E-04

Tabla 4.1.B. Concentraciones de Casiopeína III-ia[®] y Cisplatino[®].

4.1.A. Gráficos de viabilidad contra concentración en la línea HeLa

Se graficó el porcentaje de viabilidad obtenido del ensayo colorimétrico, contra la concentración en μg de Casiopeína III-ia[®], obteniéndose el gráfico 4.1.A, en donde observamos que la Casiopeína III-ia[®] mostró mayor inhibición y que la adición de fracción microsomal modifica la actividad de la Casiopeína III-ia[®] y del Cisplatino[®], ya que los hace un poco más activos en las concentraciones 1.0 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que se corroboró al determinar la concentración inhibitoria media para cada fármaco que se muestra en la tabla 4.1.B.

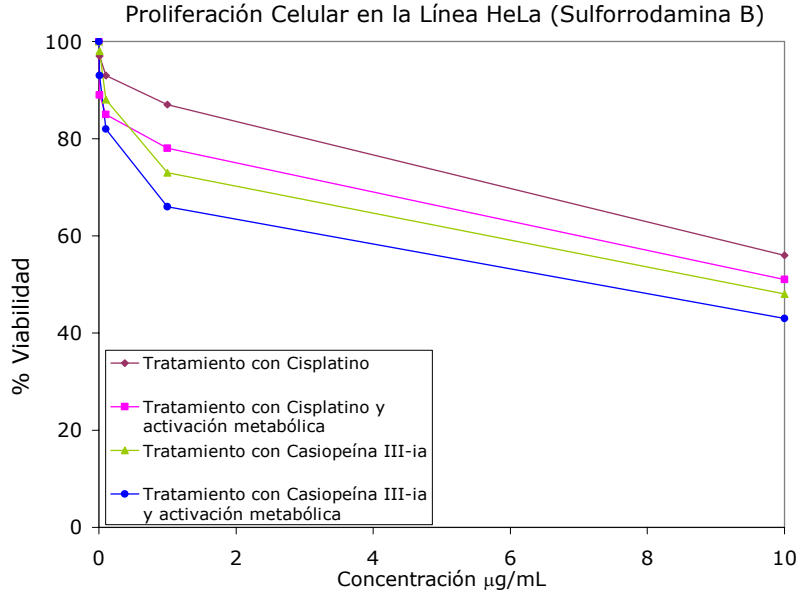


Gráfico 4.1.A. Ensayo de inhibición en la línea Celular HeLa en $\mu\text{g/mL}$

En el siguiente gráfico se puede observar que la concentración para inhibir la proliferación celular a menos del 50% se logra con una concentración de 2.25×10^{-4} mM de Casiopeína III-ia[®]; también se observa que la fracción microsomal influye en la actividad de los dos fármacos al mostrar una mayor actividad y esto se corroboró al determinar las concentraciones inhibitorias medias para cada tratamiento. Tabla 4.1.B.

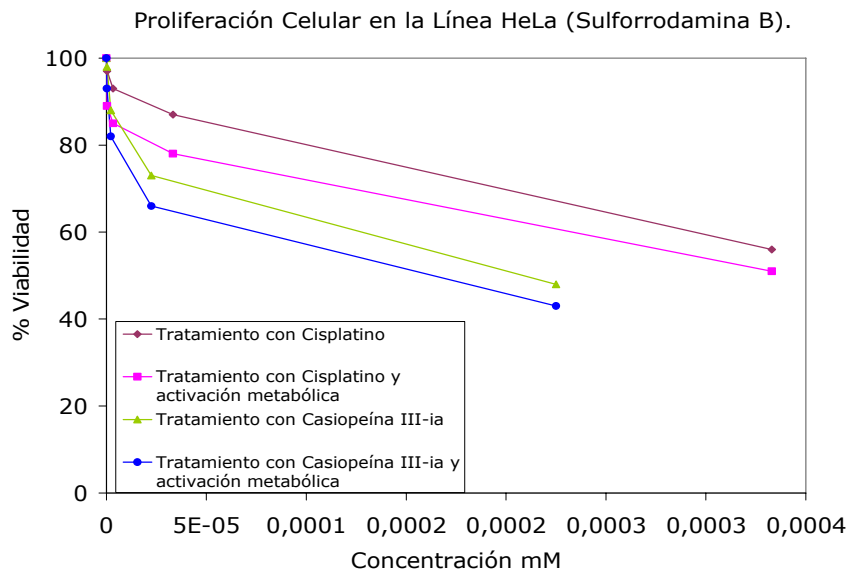


Gráfico 4.1.B Ensayo de inhibición en la línea Celular HeLa mM.

4.1.1.B. Concentración inhibitoria media en la línea celular HeLa.

Al obtener la concentración inhibitoria 50 de la línea celular HeLa con el programa Probit (Log Probit Analysis by maximum Likelihood) se obtuvieron los valores que se muestran en la tabla 4.1.B; en donde se observa que la CI_{50} es menor en el tratamiento con Cisplatino[®] y Casiopeína III-ia[®] con fracción microsomal en comparación con el tratamiento con Cisplatino[®] y Casiopeína III-ia[®] sin fracción microsomal.

Concentración Inhibitoria 50	Tratamiento con Cisplatino [®]	Tratamiento con Cisplatino [®] y fracción microsomal	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®]	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®] y fracción microsomal
CI_{50} μ g/mL	54	30.8	18.6	6.25
CI_{50} mM	0.18	0.10	0.04	0.01

Tabla 4.1.B. Concentración inhibitoria 50 en la línea celular HeLa.

4.1.2 Línea Celular MCF7

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos del ensayo colorimétrico con sulforrodamina B para la línea celular MCF7 en donde se observa que la actividad antiproliferativa del Cisplatino[®] es menor que de la Casiopeína III-ia[®], obteniéndose en ésta una viabilidad del 56%; también se observa que la fracción microsomal aumenta la actividad de los dos fármacos; mostrando más actividad la Casiopeína III-ia[®].

Concentración de Cisplatino [®] y Casiopeína III-ia [®] $\mu\text{g/mL}$	Tratamiento con Cisplatino [®] % Viabilidad	Tratamiento con Cisplatino [®] y fracción microsomal % Viabilidad	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®] % Viabilidad	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®] y fracción microsomal % Viabilidad
0	100	100	100	100
0.01	96	79	94	80
0.1	64	77	92	77
1.0	83	75	68	65
10	70	68	56	48

Tabla 4.1.2.A. Inhibición de la proliferación celular en la Línea MCF7.

4.1.2.A. Gráfico de viabilidad contra concentración en la línea celular MCF7.

En el gráfico se observa que la actividad antiproliferativa de la Casiopeína III-ia[®] es mayor que la actividad antiproliferativa del Cisplatino[®] ya que éste inhibe la proliferación en un 30% en la dosis más alta (10 $\mu\text{g/mL}$) no así la Casiopeína III-ia[®] que llega a inhibir la proliferación en un 44% también en la dosis más alta (10 $\mu\text{g/mL}$); también se observa que la fracción microsomal aumenta la actividad del Cisplatino[®]; sin embargo sólo llega a inhibir un 32% la proliferación celular, en cambio la Casiopeína III-ia[®] también es más activa al adicionar fracción microsomal ya que la inhibición de la proliferación celular llega al 52%.

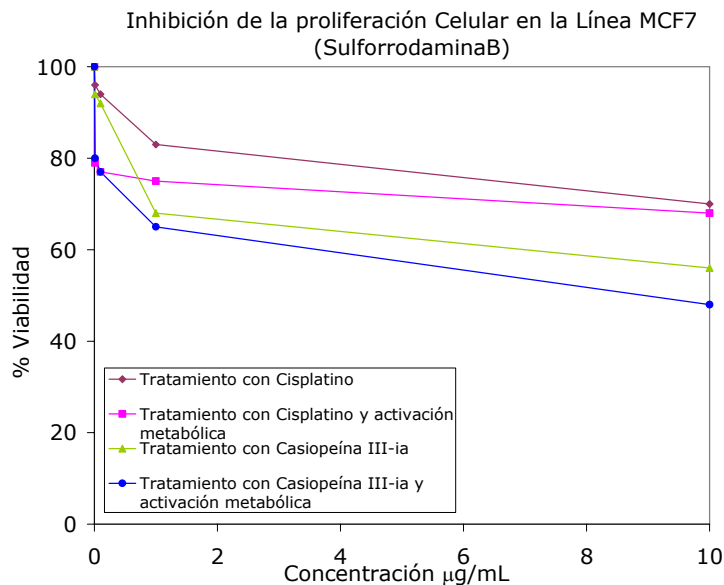


Gráfico 4.1.2.A. Ensayo de inhibición en la línea Celular MCF7 en µg/mL.

En el siguiente gráfico se puede observar mejor que la Casiopeína III-ia[®] muestra una mayor actividad antiproliferativa en comparación con el Cisplatino[®] ya que a una concentración de 2.25 E-4 mM se logra una inhibición del 48% en cambio con el Cisplatino[®] la concentración más alta sólo puede inducir una inhibición del 33%.

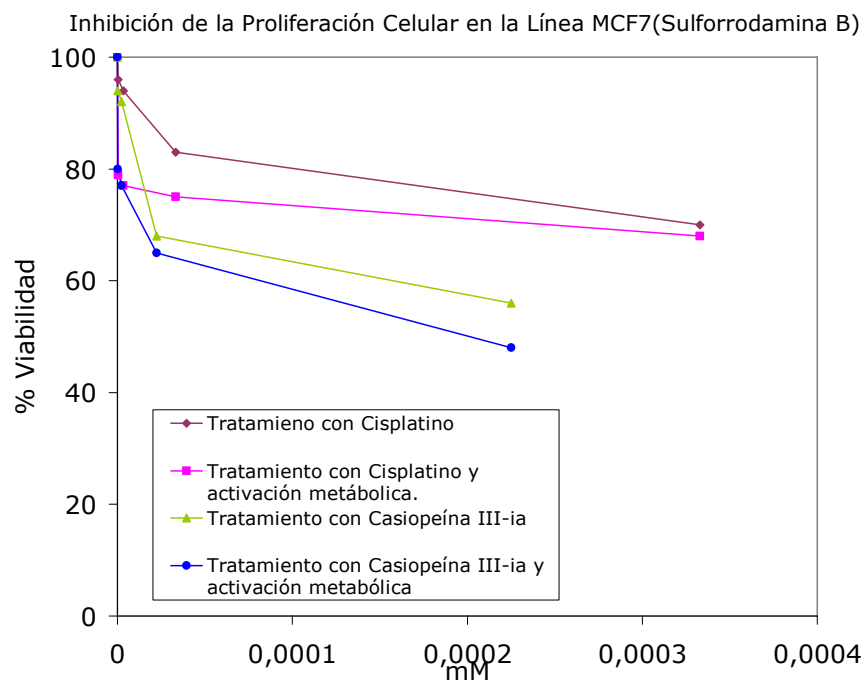


Gráfico 4.1.2.B. Ensayo de inhibición en la línea Celular MCF7 mM.

4.1.2.B. Concentración inhibitoria media en la línea celular MCF7.

A continuación se muestran las concentraciones inhibitorias medias obtenidas para la Casiopeína III-ia[®] con el programa Probit (Log Probit Analysis by maximum Likelihood). En el tratamiento con Cisplatino[®] el programa no pudo determinar la concentración inhibitoria media ya que sólo se logró una inhibición del 30%.

Concentración Inhibitoria	Tratamiento con Cisplatino [®]	Tratamiento con Cisplatino [®] y fracción microsomal	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®]	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®] y fracción microsomal
CI ₅₀ µg/mL	-	-	18.1	11.32
CI ₅₀ mM	-	-	0.04	0.02

Tabla 4.1.2.B. Concentración inhibitoria 50 en la línea celular MCF7.

4.1.3 Línea celular SK-LU-1

Los porcentajes de viabilidad obtenidos en la línea celular SK-LU-1 muestran que a mayor dosis hay una menor viabilidad celular, mostrando la Casiopeína III-ia[®] una mayor inhibición de la proliferación alcanzando un 48%, en comparación con el Cisplatino[®] que inhibe sólo el 34%, en el tratamiento con Casiopeína III-ia[®] con fracción microsomal se observa que la inhibición de la proliferación incrementa a un 53%.

Concentración de Cisplatino y Casiopeína III-ia [®] µg/mL	Tratamiento con Cisplatino [®] % Viabilidad	Tratamiento con Cisplatino [®] y fracción microsomal % Viabilidad	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®] % Viabilidad	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®] y fracción microsomal % Viabilidad
0	100	100	100	100
0.01	89	100	97	96
0.1	86	87	89	85
1.0	84	76	78	75
10	66	62	52	47

Tabla 4.1.3.A. Inhibición de la proliferación Celular en la Línea SK-LU-1.

4.1.3.A. Gráficos de viabilidad contra concentración en la línea celular SK-LU-1.

En el siguiente gráfico se observa que la Casiopeína[®] inhibe la proliferación celular de manera dependiente de la dosis hasta un 50% y el Cisplatino[®] sólo inhibe un 30% dicha proliferación, la adición de fracción microsomal afecta la actividad antiproliferativa en los dos tratamientos ya que se observa un porcentaje del 10% de viabilidad menos que en los tratamientos sin fracción microsomal, siendo nuevamente la Casiopeína III-ia[®] con fracción microsomal la más activa alcanzando una inhibición del 53 %.

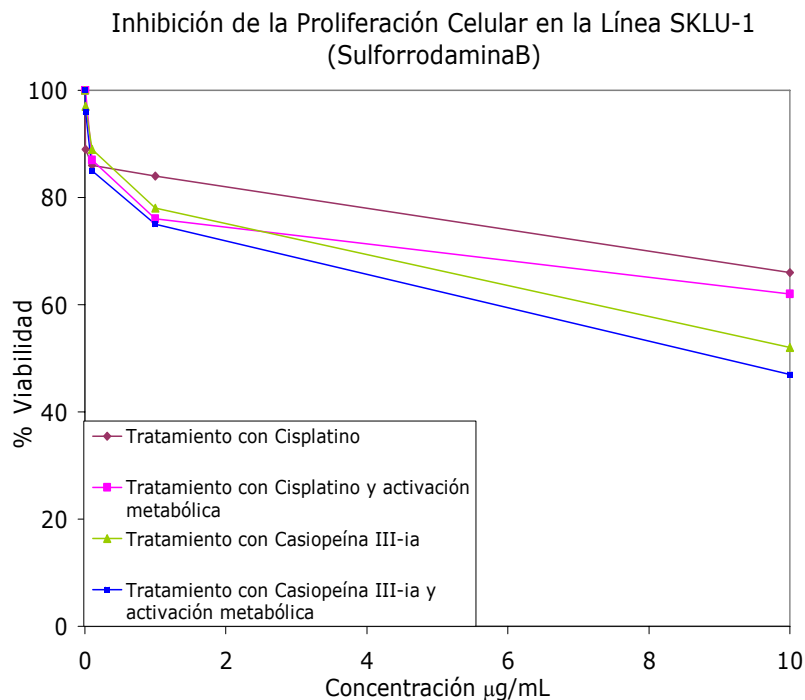


Gráfico 4.1.3.A. Ensayo de inhibición en la línea Celular SK-LU-1 en µg/mL.

En el siguiente gráfico se observa que la Casiopeína III-ia[®] muestra mayor actividad antiproliferativa ya que a una concentración de 2.25×10^{-4} inhibe la proliferación celular hasta un 48%; en cambio el Cisplatino[®] sólo inhibe el 22% a esa misma concentración. Al adicionar fracción microsomal a la Casiopeína III-ia[®] se observa que hay una inhibición de más del 50%.

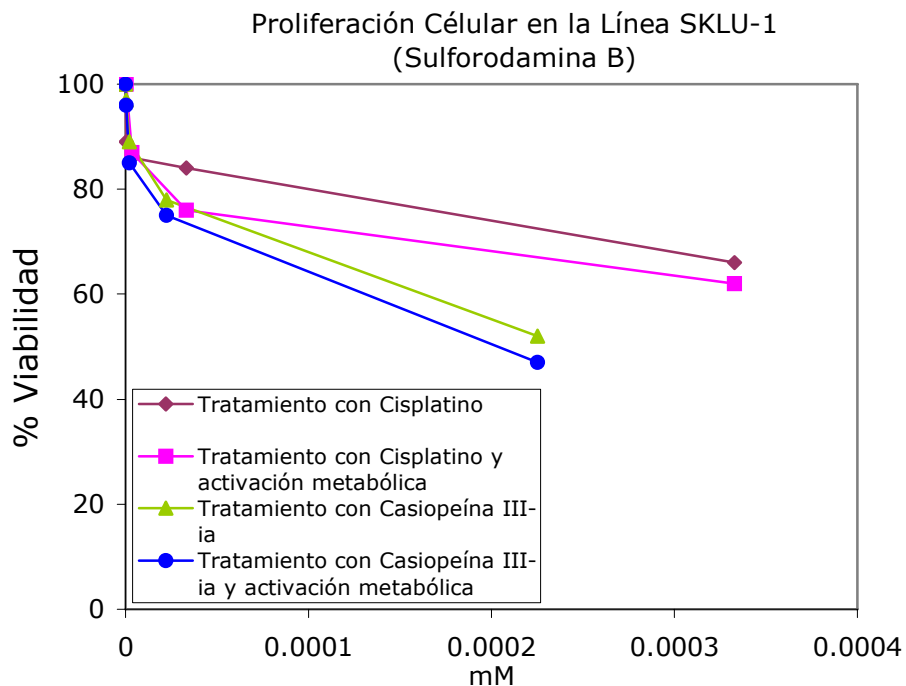


Gráfico 4.1.3.B. Ensayo de inhibición en la línea celular SK-LU-1 mM.

4.1.3.B Concentración inhibitoria media en la línea celular SK-LU-1.

Las concentraciones inhibitorias medias obtenidas para la Casiopeína III-ia[®] con el programa Probit (Log Probit Analisis by maximum Likelihood) se muestran en la tabla 4.1.3.B, no se obtuvo la concentración inhibitoria media para en tratamiento con Cisplatino ya que este tratamiento sólo inhibió la proliferación celular un 33% y el programa no pudo determinar la concentración inhibitoria media.

Concentración Inhibitoria	Tratamiento con Cisplatino [®]	Tratamiento con Cisplatino [®] y fracción microsomal	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®]	Tratamiento con Casiopeína III-ia [®] y fracción microsomal
CI ₅₀ µg/mL	-	-	13.9	9.64
CI ₅₀ mM	-	-	0.03	0.02

Tabla 4.1.3.B Concentración inhibitoria 50 en la línea celular SK-LU-1

4.1.4 Linfocitos humanos aislados

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos del ensayo colorimétrico con sulforrodamina B en linfocitos humanos aislados, donde se observa que en ninguno de los tratamientos hubo inhibición de la proliferación celular y que la viabilidad se mantiene en 90 %.

Concentración de Cisplatino® y Casiopeína III-ia® µg/mL	Tratamiento con Cisplatino® % Viabilidad	Tratamiento con Cisplatino® y fracción microsomal % Viabilidad	Tratamiento con Casiopeína III-ia® % Viabilidad	Tratamiento con Casiopeína III-ia® y fracción microsomal % Viabilidad
0	99	97	99	98
0.01	98	97	97	97
0.1	96	97	96	97
1.0	95	96	96	96
10	95	95	96	94

Tabla 4.1.4.A. Inhibición de la proliferación Celular en linfocitos humanos aislados.

4.2 Evaluación Inmunohistoquímica de los anticuerpos Bcl2, Bax, Caspasa 3 y Ki-67.

Esta evaluación se realizó en las líneas celulares HeLa, MCF7, SK-LU-1 y en linfocitos humanos aislados. Se expusieron al Cisplatino® y Casiopeína III-ia® por 24 hrs. en las mismas condiciones.

4.2.1 Línea Celular HeLa

A continuación se muestran los resultados obtenidos con el programa estadístico SPSS 12.0 utilizando la prueba de Kruskal Wallis y U de Mann-Witney empleando como variable de respuesta porcentajes promedio de células positivas.

Se observa que la proteína Bcl-2 sólo se expresa en la primera dosis en los tratamientos con Cisplatino® y Casiopeína III-ia® con fracción microsomal.

Capítulo 4. Resultados y Análisis de Resultados

La proteína Bax se expresa un 40% en el tratamiento con Cisplatino® en la dosis 0.1 µg/mL, en el tratamiento con Cisplatino® con fracción microsomal se expresa en la dosis 0.01µg/mL un 10%; en el tratamiento con Casiopeína III-ia® con y sin fracción microsomal se expresa en las dosis 0.1 y 1.0 µg/mL de menor a mayor porcentaje.

La proteína Caspasa 3 se expresa en el tratamiento con Cisplatino® a partir de la dosis de 1.0 µg/mL y aumenta el porcentaje de células positivas al aumentar la dosis; en el tratamiento con Casiopeína III-ia® se observa el mismo comportamiento, sin embargo el porcentaje de células positivas es mayor en el tratamiento con Cisplatino® que con Casiopeína III-ia®.

En la evaluación de la proteína Ki-67 en los cuatro tratamientos se observa que el porcentaje de células positivas disminuye de manera proporcional a la dosis, esto es, que a mayor dosis se observa un menor número de células positivas mostrando la Casiopeína III-ia®, un porcentaje de células positivas menor que en el tratamiento con Cisplatino®; la adición de fracción microsomal no afecta la actividad antiproliferativa de los dos fármacos.

Línea Celular HeLa % Promedio de Células positivas									
Anticuerpo	Cisplatino® µg/mL					Cisplatino® y fracción microsomal µg/mL			
	0	0.01	0.1	1.0	10	0.01	0.1	1.0	10
Bcl2	0	100	0	0	0	0	0	0	0
Bax	0	0	40	0	0	10	0	0	0
Caspasa	0	0	0	80	90	0	10	50	70
Ki-67	100	90	80	60	40	80	70	50	35

Tabla 4.2.1 A Porcentajes promedios de células positivas a los anticuerpos Bcl2, Bax, Caspasa 3 y Ki-67 en la línea celular HeLa.

Línea Celular HeLa % Promedio de Células positivas									
Anticuerpo	Casiopéina III-ia [®] µg/mL					Casiopéina III-ia [®] y fracción microsomal µg/mL			
	0	0.01	0.1	1.0	10	0.01	0.1	1.0	10
Bcl2	0	50	0	0	0	100	0	0	0
Bax	0	0	10	50	0	0	30	50	0
Caspasa	0	0	0	30	40	0	20	60	70
Ki-67	100	90	80	60	20	90	70	50	10

Tabla 4.2.1 B Porcentajes promedios de células positivas a los anticuerpos Bcl2, Bax, Caspasa 3 y Ki-67 en la línea celular HeLa.

4.2.1A Inmunohistoquímica en la línea celular HeLa.

En el gráfico se observa que el porcentaje promedio de células positivas a la proteína caspasa 3, aumenta al incrementar la dosis y que esta expresión es mayor a las dosis de 1.0 y 10 µg/mL siendo diferente del testigo en forma altamente significativa ($P \leq 0.01$); Bcl2 sólo se expresa en la concentración más baja (0.01 µg/mL) con diferencia altamente significativa ya que no se expresa en el testigo ni en las otras dosis. La proteína Bax sólo se expresa en las dosis 0.01 y 0.1 µg/mL de manera significativa ya que no se expresa en el testigo pero el porcentaje de células positivas no llega al 50%

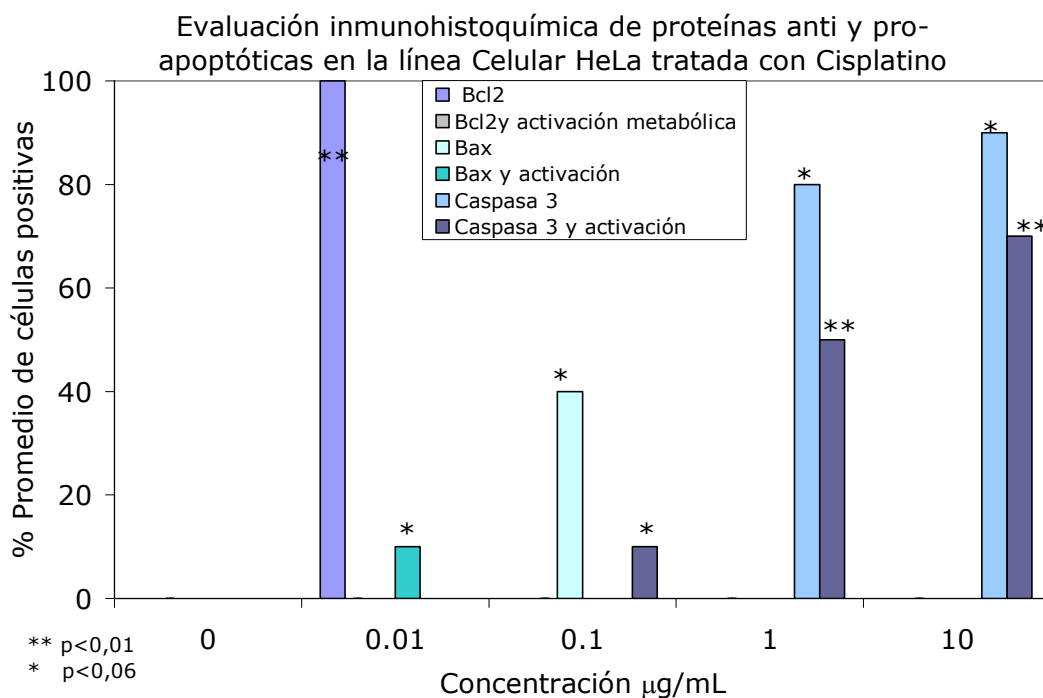


Gráfico 4.2.1.B. Porcentaje promedio de células positivas a proteínas anti y pro-apoptóticas en células HeLa tratadas con Cisplatino® con y sin fracción microsomal.

En el siguiente gráfico se muestran los porcentajes de células positivas para el tratamiento con Casiopéina III-ia® donde se observa que hay una expresión de Bcl2 en la dosis más baja (0.01µg/mL) y que este porcentaje de células positivas aumenta significativamente con fracción microsomal; la expresión de Bax se observa sólo en las dosis 0.01 y 1 µg/mL observándose un incremento significativo en el tratamiento con fracción microsomal; también se observa que la expresión de la proteína Caspasa 3 aumenta a partir de la dosis 0.01 µg/mL, observándose un incremento altamente significativo de células positivas en el tratamiento con fracción microsomal.

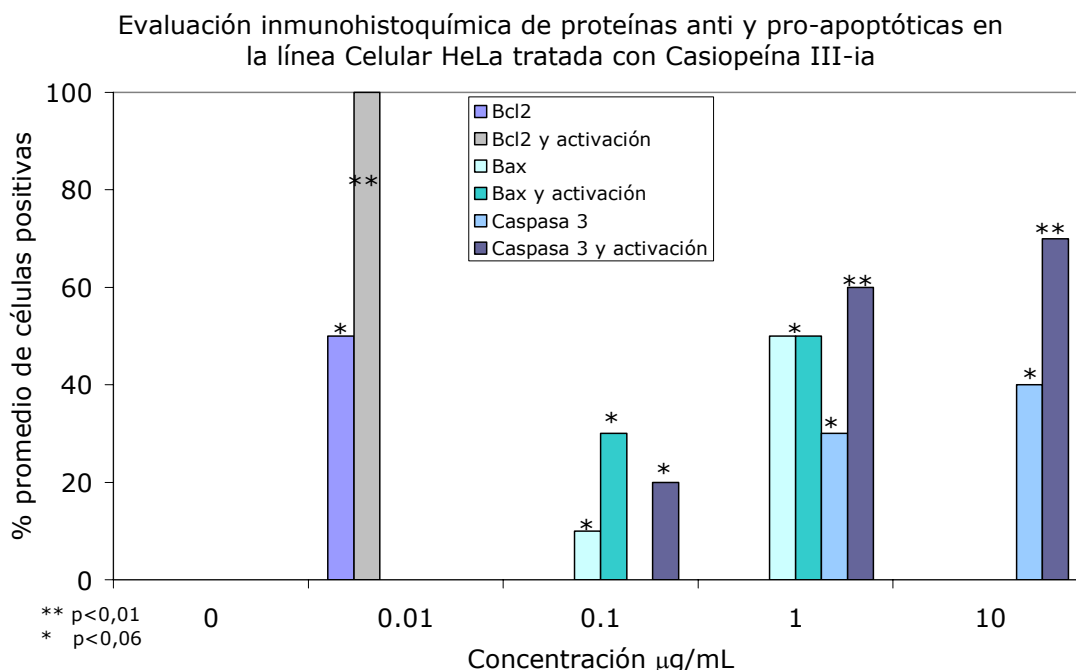


Gráfico 4.2.1B. Porcentaje promedio de células positivas a proteínas anti y pro-apoptóticas en células HeLa tratadas con Casiopeína III-ia[®] con y sin fracción microsomal.

Porcentaje de Células positivas al anticuerpo de proliferación celular Ki-67

En el siguiente gráfico se observa que el porcentaje de células positivas al anticuerpo de proliferación celular Ki-67 disminuye al incrementar la dosis de Cisplatino[®] y Casiopeína III-ia[®] observándose un porcentaje muy bajo (15 y 10 %) altamente significativo comparado con el testigo en las dosis de 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$ con la Casiopeína III-ia[®]. También se observa que la fracción microsomal no afecta la actividad citotóxica del Cisplatino[®] ni de la Casiopeína III-ia[®]. Al hacer la comparación entre los tratamientos con Cisplatino[®] y Casiopeína III-ia[®] se observa que en la dosis de 10 $\mu\text{g/mL}$ el porcentaje de células positivas es del 20%, siendo éste altamente significativo en comparación con el testigo y con el porcentaje de células positivas a esa misma dosis con Cisplatino[®] (42%).

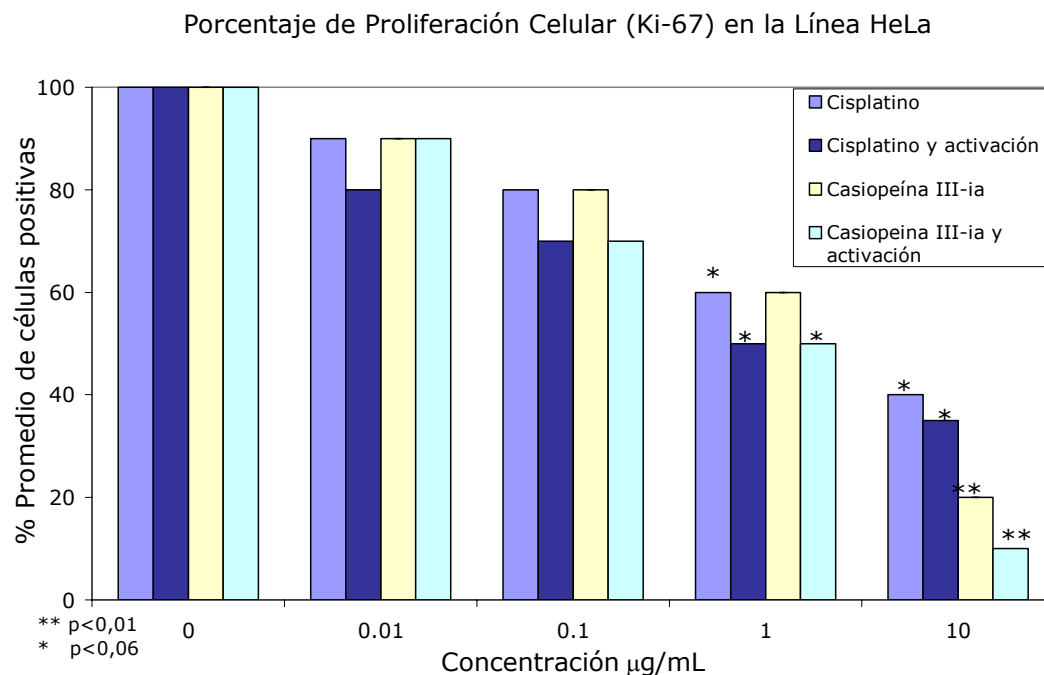


Gráfico 4.2.1C. Porcentaje de células positivas al anticuerpo de proliferación celular Ki-67 evaluado por inmunohistoquímica en la línea celular HeLa.

4.2.2 Línea Celular MCF7

A continuación se muestran los porcentajes promedios de proteínas anti/pro-apoptóticas y de la proteína ki-67 obtenidos con la prueba estadística ya mencionada.

En el tratamiento con Cisplatino® se observa que sólo hubo positividad para la proteína Ki-67 y que al haber un aumento en la dosis hay una disminución en la expresión de células positivas para esta proteína.

Línea Celular MCF7 % Promedio de Células positivas									
Anticuerpo	Cisplatino® µg/mL					Cisplatino® y fracción microsomal µg/mL			
	0	0.01	0.1	1.0	10	0.01	0.1	1.0	10
Bcl2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bax	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Caspasa 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ki-67	90	90	80	70	60	85	80	65	40

Tabla 4.2.2A Porcentajes promedios de células positivas a los anticuerpos Bcl2, Bax, Caspasa y Ki-67 en la línea celular MCF7.

Capítulo 4. Resultados y Análisis de Resultados

En la siguiente tabla se observa que en el tratamiento con Casiopeína III-ia[®] produce la expresión significativa de las proteínas Bcl2 y Bax en un mayor porcentaje, siendo Bcl2 altamente significativo ($P \leq 0.01$) y Bax significativo ($P \leq 0.06$) en el tratamiento con Casiopeína III-ia[®] y fracción microsomal.

Línea Celular MCF7 % Promedio de Células Positivas									
Anticuerpo	Casiopeína III-ia [®] $\mu\text{g/mL}$					Casiopeína III-ia [®] y fracción microsomal $\mu\text{g/mL}$			
	0	0.01	0.1	1.0	10	0.01	0.1	1.0	10
Bcl2	0	0	0	40	60	0	20	40	0
Bax	0	0	0	0	40	0	0	20	40
Caspasa3	0	0	0	10	20	0	0	10	20
Ki-67	90	90	80	60	40	80	60	30	20

Tabla 4.2.2B. Porcentajes promedios de células positivas a los anticuerpos Bcl2, Bax, Caspasa y Ki-67 en la línea celular MCF7.

La expresión de la proteína Ki-67 también disminuye a medida que aumenta la dosis, el porcentaje de células positivas es menor en comparación con el tratamiento con Cisplatino[®] y a su vez, se observa que el porcentaje de células positivas es menor en el tratamiento con Casiopeína III-ia[®] con fracción microsomal.

4.2.2A. Inmunohistoquímica de proteínas anti y pro-apoptóticas en la línea celular MCF7.

En el siguiente gráfico se observa que el porcentaje promedio de células positivas altamente significativo se da en la expresión de la proteína Bcl2 a la dosis de 10 $\mu\text{g/mL}$; la proteína Bax se expresa significativamente en las dosis 1.0 y 10 $\mu\text{g/mL}$; el porcentaje de expresión de la proteína Caspasa 3 es muy baja por lo que resultó no significativa.

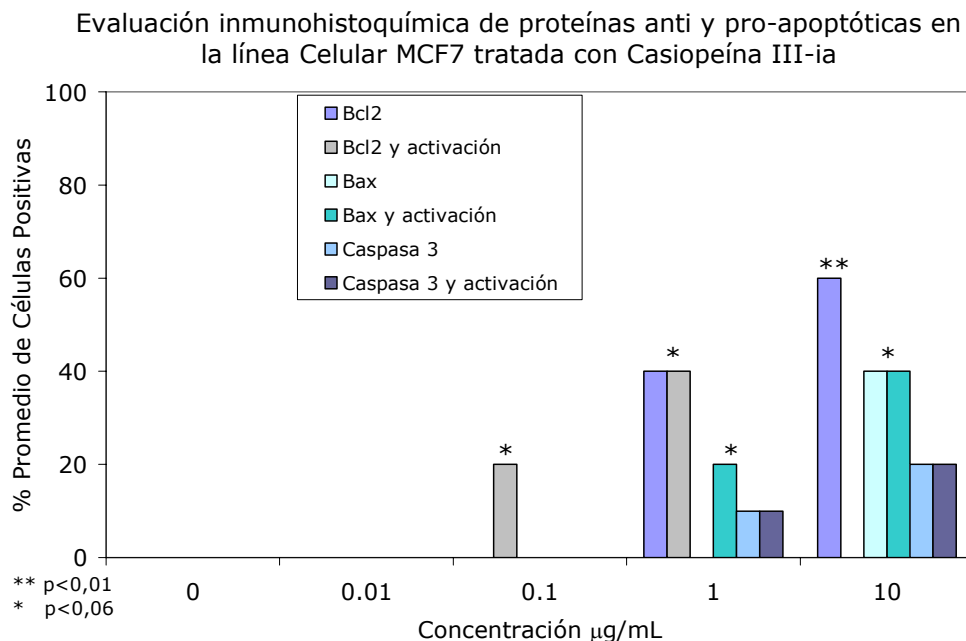


Gráfico 4.2.2B. Porcentaje promedio de células positivas a proteínas anti y pro-apoptóticas en la línea celular SK-LU-1 tratadas con Casiopeína III-ia[®] con y sin fracción microsomal.

Porcentaje de Células positivas al anticuerpo de proliferación celular Ki-67

En el siguiente gráfico se observa que el tratamiento que expresó la proteína ki-67 en forma altamente significativa ($P < 0.01$) fue la Casiopeína III-ia[®] y fracción microsomal a la concentración de 10 µg/mL; también se observa que esta proteína se expresa a esa misma concentración en forma significativa ($P < 0.06$), en los tratamientos con Cisplatino[®] y con Casiopeína III-ia[®] y a en la concentración de 1.0 µg/mL en el tratamiento con Casiopeína III-ia[®] y fracción microsomal.

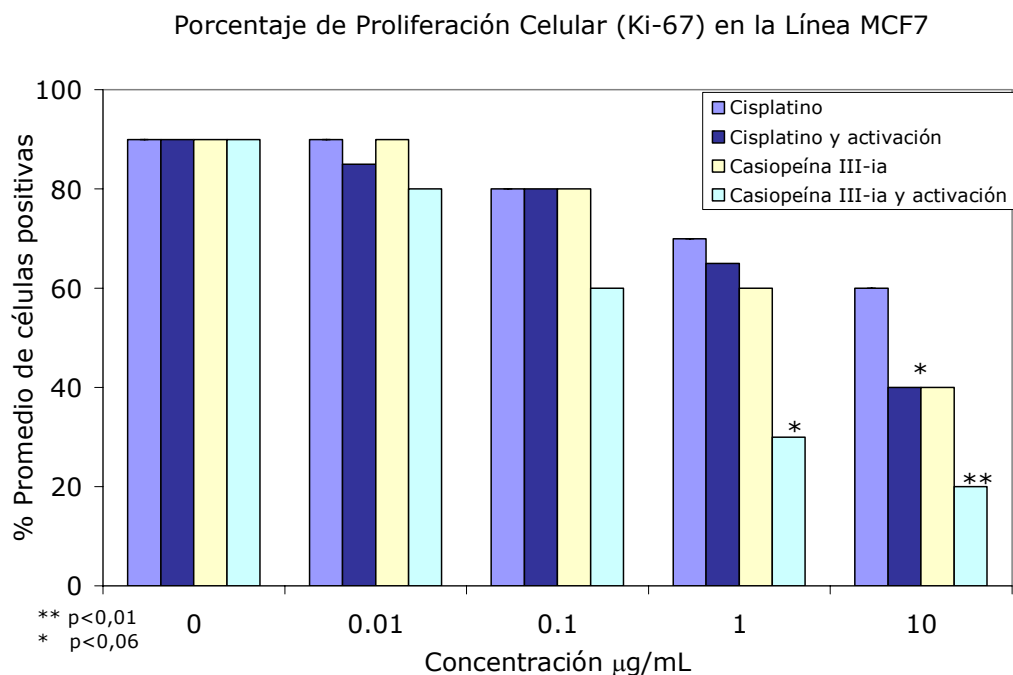


Gráfico 4.2.2C. Porcentaje de células positivas al anticuerpo de proliferación celular Ki-67 evaluado por inmunohistoquímica en la línea celular MCF7.

4.2.3 Línea Celular SK-LU-1

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes promedio de células positivas las proteínas anti/pro-apoptóticas y de proliferación celular (Ki-67), obtenidos con la prueba estadística mencionada en el punto 2.1.1 para la línea celular SK-LU-1.

Línea Celular SK-LU-1 % Promedio de Células positivas									
Anticuerpo	Cisplatino® µg/mL					Cisplatino® y fracción microsomal µg/mL			
	0	0.01	0.1	1.0	10	0.01	0.1	1.0	10
Bcl2	0	0	0	0	0	0	10	20	20
Bax	0	0	0	0	20	0	0	10	20
Caspasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ki-67	100	90	90	80	70	80	80	70	65

Tabla 4.2.3A Porcentajes promedios de células positivas a los anticuerpos Bcl2, Bax, Caspasa y Ki-67 en la línea celular SK-LU-1.

Línea Celular SK-LU-1 % Promedio de Células positivas									
Anticuerpo	Casiopéina III-ia [®] µg/mL					Casiopéina III-ia [®] y fracción microsomal µg/mL			
	0	0.01	0.1	1.0	10	0.01	0.1	1.0	10
Bcl2	0	20	0	0	0	0	0	0	0
Bax	0	0	30	60	70	0	10	40	60
Caspasa	0	0	0	20	60	0	20	40	60
Ki-67	100	90	70	40	25	90	60	40	15

Tabla 4.2.3B Porcentajes promedios de células positivas a los anticuerpos Bcl2, Bax, Caspasa y Ki-67 en la línea celular SK-LU-1.

En el tratamiento con Cisplatino[®] no se encontró evidencia estadística para afirmar que existen diferencias con el testigo en la expresión de las proteínas Bcl2, Bax y Caspasa 3, en el tratamiento con Casiopéina III-ia[®], se observa que en la concentración de 1µg/mL las proteínas Bax Y Caspasa 3 se expresan en forma significativa ($P \leq 0.06$) y en la concentración de 10 µg/mL, se expresan en forma altamente significativa ($P \leq 0.01$). La proteína Ki-67 se expresa en todas las dosis, con todos los tratamientos de forma directamente proporcional a estas dosis, no obstante la expresión de este marcador de proliferación disminuye de forma sustancial al agregar fracción microsomal, siendo la Casiopéina III-ia[®] mucho más eficaz para inhibir la proliferación que el Cisplatino[®] (Ver gráfico 4.2.3.C).

4.2.3A. Inmunohistoquímica de proteínas anti/pro-apoptóticas en la línea celular SK-LU-1 tratada con cisplatino con y sin fracción microsomal.

En el gráfico siguiente se observa que en este tratamiento sólo hubo expresión a los anticuerpos Bax y Bcl2; el porcentaje promedio de células positivas máximo es del 25% por lo que de acuerdo a la prueba estadística aplicada no se encontró evidencia estadísticamente significativa para decir que difiere del testigo.

Evaluación inmunohistoquímica de proteínas anti y pro-apoptóticas en la línea Celular SKLU-1 tratada con Cisplatino

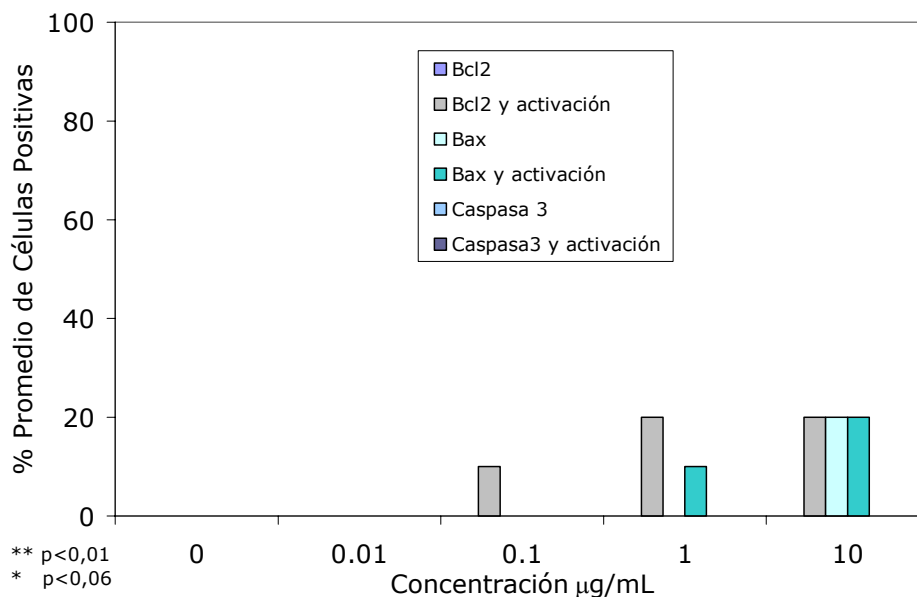


Gráfico 4.2.2.A. Porcentaje promedio de células positivas a proteínas anti y pro-apoptóticas en la línea celular SK-LU-1 tratadas con Cisplatino® con y sin fracción microsomal.

El siguiente gráfico de barras corresponde al tratamiento con Casiopeína III-ia® con y sin fracción microsomal; se observa que la proteína Bax se expresa en forma altamente significativa ($P \leq 0.01$) en las concentraciones 1.0 y 10 µg/mL en el tratamiento con Casiopeína III-ia® y fracción microsomal se expresa de forma significativa ($P \leq 0.06$) en la concentración de 1.0 µg/mL. La proteína Caspasa 3 se expresa en forma altamente significativa en la concentración 10 µg/mL, en el tratamiento con fracción microsomal, la proteína Caspasa 3 se expresa en las concentraciones 1.0 y 10 µg/mL en forma significativa ($P \leq 0.06$).

Evaluación inmunohistoquímica de proteínas anti y pro-apoptóticas en la línea Celular SKLU-1 tratada con Casiopeína III-ia

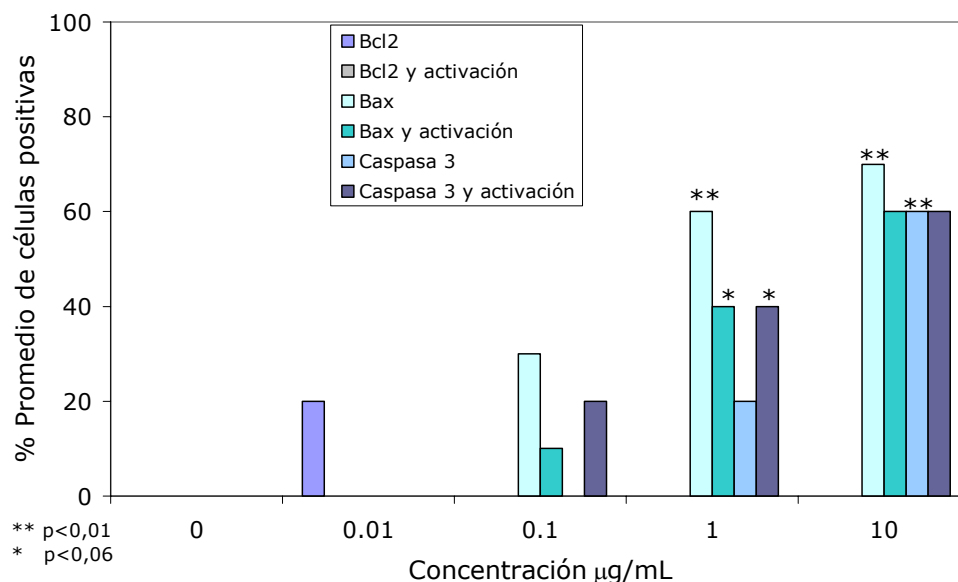


Gráfico 4.2.2.A. Porcentaje promedio de células positivas a proteínas anti y pro-apoptóticas en la línea celular SK-LU-1 tratadas con Casiopeína III-ia[®] con y sin fracción microsomal.

Porcentaje de Células positivas al anticuerpo de proliferación celular Ki-67

En el siguiente gráfico se observa que el porcentaje de células positivas en el tratamiento con Cisplatino[®] disminuye al aumentar la concentración, al igual que el tratamiento con fracción microsomal, no obstante, no se encontró evidencia estadística al comparar estos dos tratamientos con el testigo.

En el tratamiento con Casiopeína III-ia[®] con y sin fracción microsomal, se observa que el porcentaje de células positivas disminuye al aumentar la concentración, también se observa que hay una disminución en la expresión de la proteína Ki-67 en forma significativa ($P \leq 0.06$) en la concentración de 1.0 µg/mL y en forma altamente significativa ($P \leq 0.01$) en la concentración de 10µg/mL.

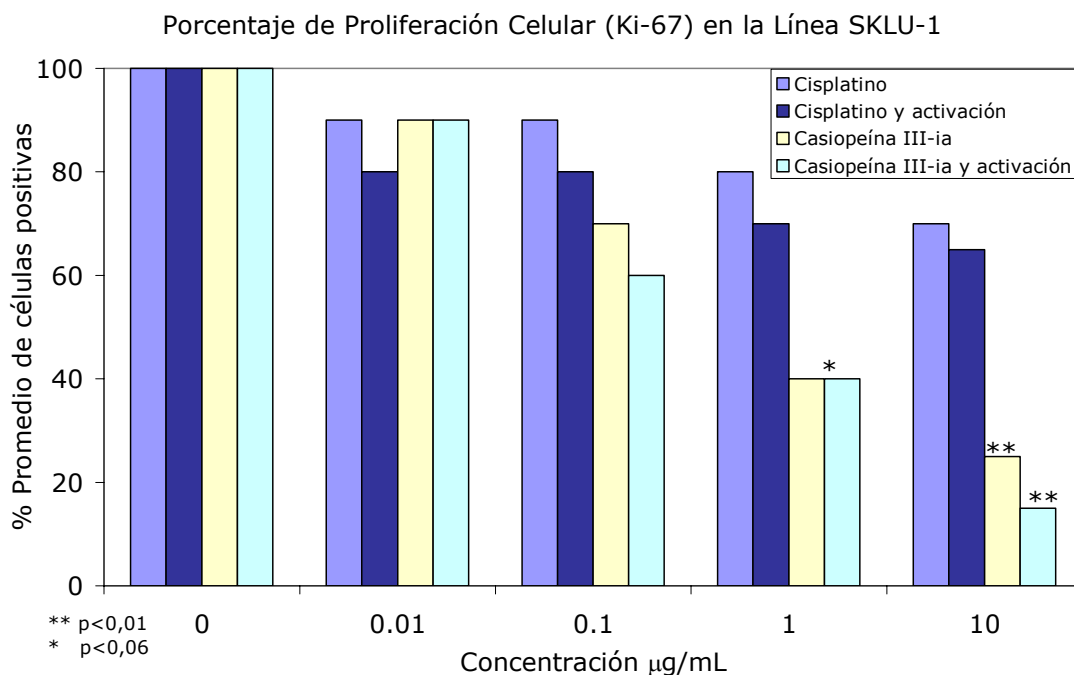


Gráfico 4.2.3C. Porcentaje de células positivas al anticuerpo de proliferación celular Ki-67 evaluado por inmunohistoquímica en la línea celular SK-LU-1.

4.2.4 Linfocitos Humanos Aislados

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes promedios de células positivas a los anticuerpos Bcl2, Bax, Caspasa 3 y Ki-67.

Se observa que no hay expresión de la proteína Bcl2 en ninguno de los tratamientos, la proteína Bax se expresa en un porcentaje muy bajo (5%) en todos los tratamientos; el porcentaje de células positivas a la proteína Caspasa 3 y Ki-67, se expresa en forma muy similar al testigo en todos los tratamientos. Por lo que no se encontró evidencia estadística para decir que hay diferencias.

Linfocitos Humanos Aislados (% Promedio de Células positivas)									
Anticuerpo	Cisplatino® µg/mL					Cisplatino® y fracción microsomal µg/mL			
	0	0.01	0.1	1.0	10	0.01	0.1	1.0	10
Bcl2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bax	0	0	5	5	0	0	5	5	2.5
Caspasa 3	20	0	0	0	0	0	0	0	0
Ki-67	60	60	60	60	60	60	60	60	60

Tabla 4.2.4A Porcentajes promedios de células positivas a los anticuerpos Bcl2, Bax, Caspasa y Ki-67 linfocitos humanos aislados.

Linfocitos Humanos Aislados (% Promedio de Células positivas)									
Anticuerpo	Casiopéina III-ia® µg/mL					Casiopéina III-ia® y fracción microsomal µg/mL			
	0	0.01	0.1	1.0	10	0.01	0.1	1.0	10
Bcl2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bax	0	0	5	5	10	0	0	0	0
Caspasa	20	0	10	10	30	0	0	0	30
Ki-67	60	60	60	60	60	60	60	60	50

Tabla 4.2.4B Porcentajes promedios de células positivas a los anticuerpos Bcl2, Bax, Caspasa y Ki-67 linfocitos humanos aislados.

4.2.4A. Inmunohistoquímica de proteínas anti/pro-apoptóticas en linfocitos humanos tratada con cisplatino con y sin fracción microsomal.

En el tratamiento con cisplatino con y sin fracción microsomal hubo una ligera expresión de Bax y Caspasa 3, no obstante no hay evidencia estadística para decir que hay diferencias con el testigo.

Evaluación inmunohistoquímica de proteínas anti y pro-apoptóticas en linfocitos humanos aislados tratados con Cisplatino

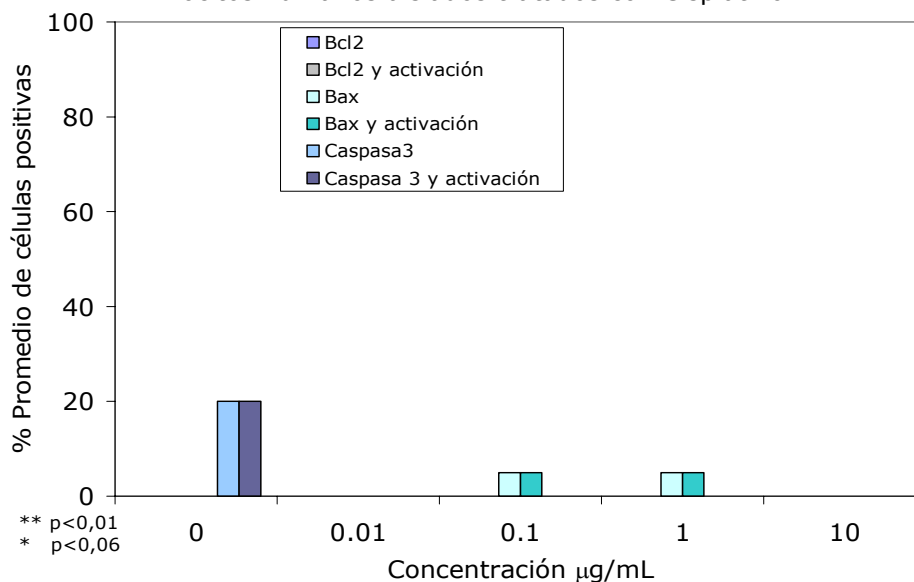


Gráfico 4.2.4A. Porcentaje promedio de células positivas a proteínas anti y pro-apoptóticas en linfocitos humanos aislados tratados con Cisplatino® con y sin fracción microsomal.

En el tratamiento con Casiopeína III-ia® se observa que no hay evidencia estadística para decir que hay diferencias en las proteínas evaluadas entre tratamientos.

Evaluación inmunohistoquímica de proteínas anti y pro-apoptóticas en linfocitos humanos aislados tratados con Casiopeína III-ia

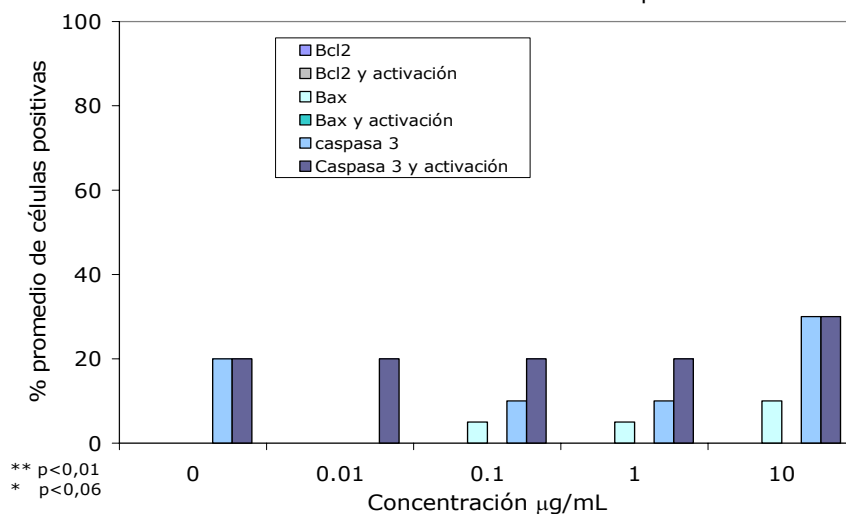


Gráfico 4.2.4B. Porcentaje promedio de células positivas a proteínas anti y pro-apoptóticas en linfocitos humanos aislados tratados con Casiopeína III-ia® con y sin fracción microsomal.

Porcentaje de Células positivas al anticuerpo de proliferación celular Ki-67

En el siguiente gráfico se observa que la proteína Ki-67 se expresó en todos los tratamientos de modo no significativo ya que el porcentaje de células positivas es el mismo en el testigo y en todas las concentraciones estudiadas, disminuyendo un 5% en la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en el tratamiento con Cisplatino[®] con y sin fracción microsomal y en el tratamiento con Casiopeína III-ia[®] con fracción microsomal también de modo no significativo.

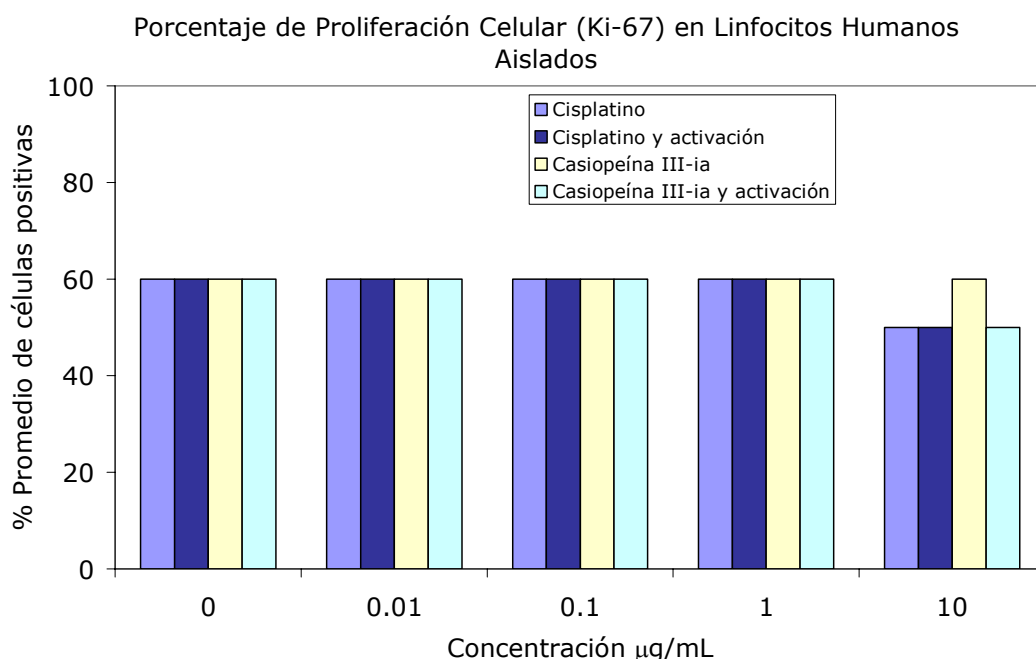


Gráfico 4.2.3.C. Porcentaje de células positivas al anticuerpo de proliferación celular Ki-67 evaluado por inmunohistoquímica en linfocitos humanos aislados.

4.3 Determinación de apoptosis por TUNEL

4.3.1. Línea Celular HeLa

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes promedios de células positivas a la evaluación de apoptosis por la técnica de TUNEL, en donde se observa que el Cisplatino[®] induce un 40% de apoptosis y aumenta un 10% más en presencia de fracción microsomal; en el tratamiento con Casiopeína III-ia[®] se observa que hay un

Capítulo 4. Resultados y Análisis de Resultados

porcentaje de células apoptóticas del 75 % y de 90% en presencia de fracción microsomal.

Línea Celular HeLa % Promedio de Células apoptóticas				
Testigo	Cisplatino [®] (CI ₅₀ 54µg/mL) (CI ₅₀ 0.18 mM)		Casiopéina III-ia [®] (CI ₅₀ 18.6µg/mL) (CI ₅₀ 0.1 mM)	
	Sin fracción microsomal	Con fracción microsomal	Sin fracción microsomal	Con fracción microsomal
0	40	50	75	90

Tabla 4.3.1 Porcentajes promedios de Células en apoptosis evaluada por la técnica de TUNEL en la línea celular HeLa.

En el siguiente gráfico se observa que el porcentaje de células en apoptosis para el tratamiento con Cisplatino[®] es significativamente mayor ($p \leq 0.06$) que en el testigo; en el tratamiento con Casiopéina III-ia[®], el porcentaje de células en apoptosis difiere de forma altamente significativa tanto del testigo como del tratamiento con Cisplatino[®].

Evaluación de Apoptosis por la Técnica de TUNEL en la Línea Celular HeLa

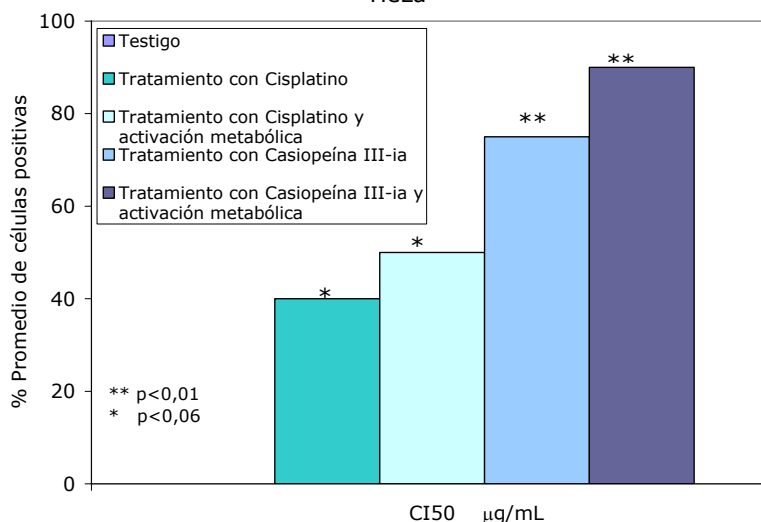


Gráfico 4.3.1 Evaluación de Células en apoptosis con la técnica de TUNEL en la línea celular HeLa.

4.3.2 Línea Celular MCF7

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes promedios de células en apoptosis obtenidos con la misma prueba estadística mencionada en el punto 4.2.1, en donde se observa que la Casiopeína III-ia[®] muestra mayor actividad apoptótica en comparación con el Cisplatino[®] ya que en este tratamiento no hubo expresión de células en apoptosis con la concentración inhibitoria media extrapolada de los resultados de inhibición mostrados en la tabla 4.1.2.A. También se observa que el porcentaje de células apoptóticas aumenta en el tratamiento con Casiopeína III-ia[®] y fracción microsomal hasta un 80%.

Línea Celular MCF7 % Promedio de Células apoptóticas				
Testigo	Cisplatino [®] (CI ₅₀ 3307µg/mL) (CI ₅₀ 33 mM)		Casiopeína III-ia [®] (CI ₅₀ 18.1µg/ml) (CI ₅₀ 0.01 mM)	
	Sin fracción microsomal	Con fracción microsomal	Sin fracción microsomal	Con fracción microsomal
0	0	0	50	80

Tabla 4.3.1 Porcentajes promedios de Células en apoptosis evaluada por la técnica de TUNEL en la línea celular MCF7.

En el siguiente gráfico se observa que el porcentaje promedio de células en apoptosis producido por la Casiopeína III-ia[®] tanto con activación como sin ella, es mayor y de forma altamente significativa en comparación con el testigo y con el tratamiento con Cisplatino[®]; el porcentaje de células apoptóticas se incrementa en el tratamiento con Casiopeína III-ia[®] y fracción microsomal un 20% más que en el tratamiento con Casiopeína III-ia[®] sola.

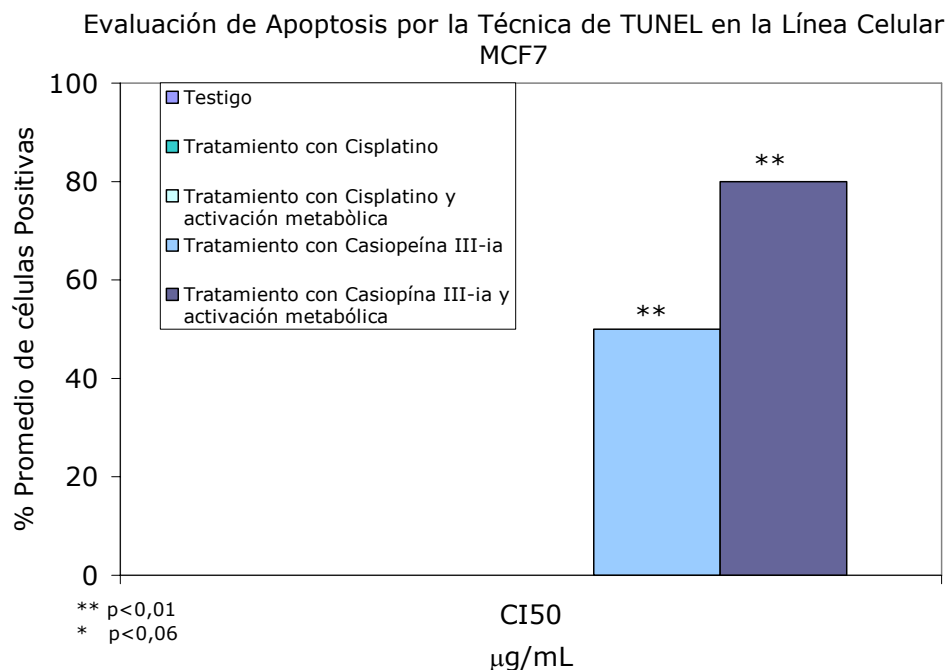


Gráfico 4.3.2 Evaluación de Células en apoptosis con la técnica de TUNEL en la línea celular MCF7.

4.3.3 Línea Celular SK-LU-1

En la siguiente tabla se observa que en el tratamiento con Cisplatino®, el porcentaje promedio de células en apoptosis es mayor con respecto al testigo ($p \leq 0.06$); en el tratamiento con Casiopeína III-ia® se observa que el porcentaje de células positivas alcanzan un porcentaje del 80 y 90% siendo más activa que el Cisplatino® y significativamente diferente del testigo ($p \leq 0.06$).

Línea Celular SK-LU-1 (% Promedio de Células apoptóticas)				
Testigo	Cisplatino® (CI ₅₀ 3307μg/mL) (CI ₅₀ 33 mM)		Casiopeína III-ia® (CI ₅₀ 13.9μg/ml) (CI ₅₀ 0.1 mM)	
	Sin fracción microsomal	Con fracción microsomal	Sin fracción microsomal	Con fracción microsomal
2	50	50	80	90

Tabla 4.3.3 Porcentajes promedios de Células en apoptosis evaluada por la técnica de TUNEL en la línea celular SK-LU-1.

En el siguiente gráfico se observa que La Casiopeína III-ia[®] muestra mayor actividad apoptótica, ya que el porcentaje promedio de células positivas es altamente significativo. En el tratamiento con Cisplatino[®] se observa que el porcentaje de células apoptóticas es del 50% siendo significativo en comparación con el testigo y con el tratamiento con Casiopeína III-ia[®].

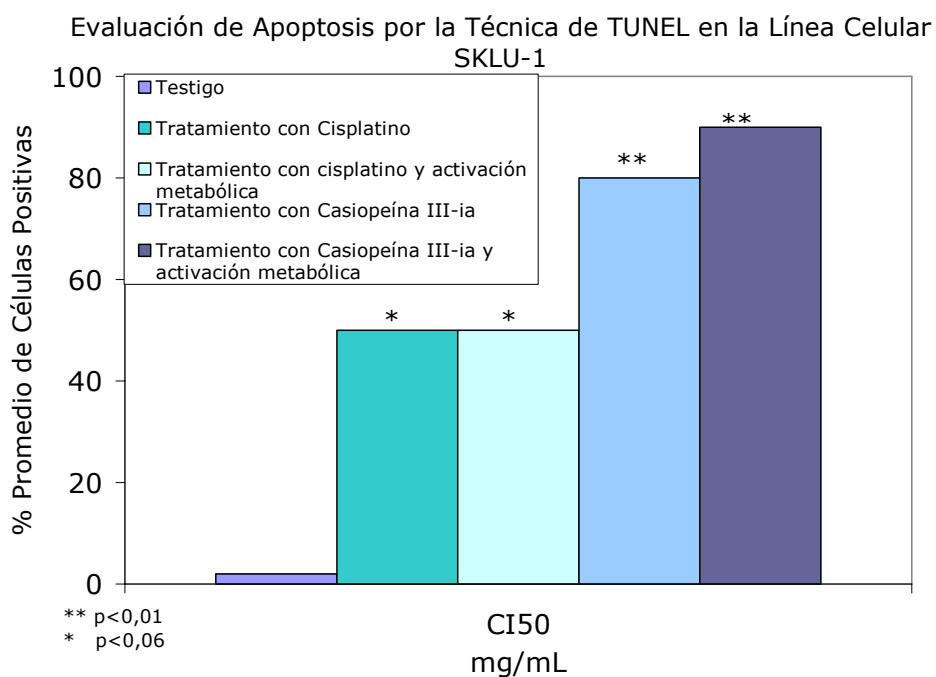


Gráfico 4.3.2 Evaluación de Células en apoptosis con la técnica de TUNEL en la línea celular SK-LU-1.

4.3.4 Linfocitos Humanos Aislados

En la siguiente tabla se observa que el porcentaje de células apoptóticas es similar en todos los tratamientos, no encontrándose evidencia estadística de diferencia entre tratamientos.

Capítulo 4. Resultados y Análisis de Resultados

Linfocitos (% Promedio de Células apoptóticas)				
Testigo	Cisplatino® (CI ₅₀ 10 µg/mL)		Casiopéina III-ia® (CI ₅₀ 10µg/ml)	
	Sin fracción microsomal	Con fracción microsomal	Sin fracción microsomal	Con fracción microsomal
40	40	30	45	52

Tabla 4.3.4 Porcentajes promedios de células en apoptosis evaluada por la técnica de TUNEL en linfocitos humanos aislados.

En el siguiente gráfico se observa que el porcentaje de células positivas se expresa de forma similar entre el testigo y los demás tratamientos y no hay evidencia estadística para afirmar que el porcentaje de células apoptóticas es diferente.

Evaluación de Apoptosis por la Técnica de TUNEL en Linfocitos Humanos Aislados

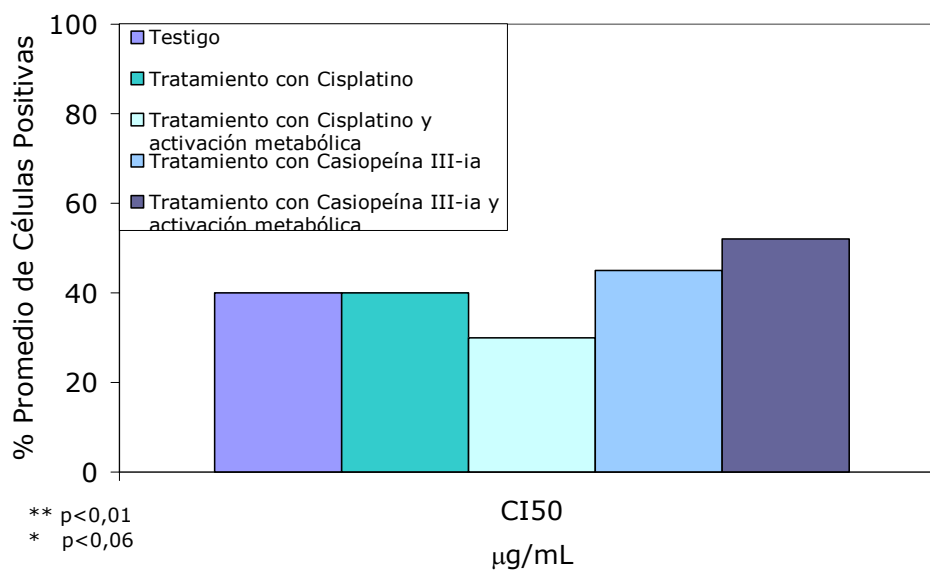


Gráfico 4.3.4 Evaluación de Células en apoptosis con la técnica de TUNEL en linfocitos humanos aislados.

5.1. Ensayo de inhibición de la Proliferación con Sulforrodamina B

Con los resultados obtenidos podemos concluir que los ensayos de viabilidad celular muestran que la Casiopeína III-ia[®] es más activa que el Cisplatino[®] en las tres líneas evaluadas y que la adición de la fracción microsomal la hace aún más activa; la línea celular que mostró mayor susceptibilidad es el carcinoma cérvico-uterino HeLa, seguida del adenocarcinoma de pulmón SK-LU-1 y por último el adenocarcinoma mamario MCF7. En concentraciones molares, la concentración inhibitoria media de la Casiopeína III-ia[®] siempre está en el mismo orden de magnitud en las tres líneas celulares, no así para el Cisplatino[®], con el que sólo se alcanza la concentración inhibitoria media en la línea HeLa (CaCU) al agregar activación metabólica a una dosis 4.5 veces mayor que la de Casiopeína III-ia[®]. Vale la pena señalar que el Cisplatino[®] no se usa en la clínica humana para tratar carcinomas mamarios, no obstante se usa en el tratamiento de carcinomas pulmonares y cérvico-uterinos.

5.2. Inmunohistoquímica

Con respecto a los resultados obtenidos en la evaluación inmunohistoquímica podemos observar que tanto la Casiopeína III-ia[®] como el Cisplatino[®], producen la expresión de Bcl2 y Bax sólo en las dosis más bajas (0.01 y 0.1 µg/mL) desapareciendo en las dosis mayores (1 y 10 µg/mL), lo cual probablemente implique una respuesta de defensa en las células desencadenando la vía apoptótica mitocondrial; la presencia de activación metabólica hace que esta expresión se produzca desde la dosis más baja en concordancia con el incremento de actividad antiproliferativa observado en los ensayos de viabilidad.

Otra explicación puede ser que las dosis altas producen apoptosis de forma más rápida por lo que no podemos observar la expresión de Bax y Bcl2. Aunado a la acción anti-apoptótica ejercida por Bcl-2, se ha descubierto un papel antioxidante, en donde frente a la presencia de estrés oxidativo, tiene la capacidad de acumularse en mitocondria con el fin de contrarrestar el efecto. Es importante recalcar que Bcl-2 y Bax funcionan antagónicamente y se regulan formando heterodímeros, razón por la cual las vemos expresadas juntas en las líneas celulares (69).

Bax es una proteína que se mantiene inactiva a través de interacción con factores citosólicos. Seguimiento de algunas señales citotóxicas, cambia la conformación de Bax y se ubica en la membrana mitocondrial, describiéndose dos mecanismos de acción: 1) formar poro que permite la salida de citocromo c y disparar así la vía

intrínseca de apoptosis y 2) cierre del canal aniónico dependiente de voltaje y la consecuente hiperpolarización de la membrana interna, con pérdida de potencial de membrana (70).

Aunado a lo anterior, la activación de Bax se describe como un procedimiento crítico para la manifestación de apoptosis inducida por variados estímulos en células epiteliales cancerosas, confiriendo quimiosensibilidad independientemente de los niveles relativos de expresión (71).

La activación de Caspasa 3 se produce a partir de las dosis de 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que sugiere la ejecución de la apoptosis ya que ésta es una caspasa ejecutora, vale la pena señalar que Caspasa 3 puede ser activada por diversas vías además de la formación del poro mitocondrial con la consecuente liberación del citocromo C, por lo que no se descartan la participación de vías alternas de apoptosis además de la mitocondrial. Se sugiere medir citocromo C y otros marcadores para dilucidar las vías involucradas.

Con respecto al marcador de proliferación celular Ki-67, podemos decir que los tratamientos de Casiopeína III-ia[®] comienzan a diferir del testigo de forma significativa desde la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la adición de activación metabólica disminuye aún más la expresión de este marcador. Estos resultados son totalmente coincidentes con los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación celular con sulforrodamina B, volviendo a observarse mayor actividad en la línea celular de carcinoma cérvico-uterino HeLa, seguida del adenocarcinoma de pulmón SK-LU-1 y por último el adenocarcinoma mamario MCF7. Se confirma que la Casiopeína III-ia[®] tiene mayores efectos antiproliferativos que el Cisplatino[®].

Los resultados en linfocitos muestran un comportamiento similar a los descritos en las líneas tumorales, pero con menor expresión de las proteínas involucradas en apoptosis y en proliferación, es decir, estas células son menos susceptibles de muerte que las transformadas.

5.3 TUNEL

Con respecto a la determinación de apoptosis por TUNEL, podemos señalar que esta forma de detección de muerte celular *In Situ* ha sido designada como una técnica rápida y simple con la ventaja de no involucrar materiales radioactivos, que nos permite detectar y cuantificar muerte celular a nivel de una sola célula tanto en cultivo celular como tisular. La aplicación de esta técnica para determinar la sensibilidad de células neoplásicas a la muerte inducida por fármacos, tiene una

aplicación implícita en la investigación de nuevas drogas anticancerosas y en la oncología clínica.

Sin embargo, las células necróticas también pueden ser TUNEL positivas, por lo que la degradación de ADN es un evento importante en muerte celular y su detección en células muertas no indica específicamente el mecanismo de apoptosis (99). Es por esta razón que siempre se deben utilizar al menos dos técnicas en análisis de apoptosis y en este caso, se usó la traslocación nuclear de caspasa 3, lo que en conjunto son un marcador inequívoco de apoptosis.

Con estas técnicas y usando la CI_{50} , se confirma de modo contundente la apoptosis inducida por la Casiopeína III-ia[®] y el Cisplatino[®] en menor medida, corroborándose la mayor actividad sobre HeLa seguida por SK-LU-1, MCF7 y en mucho menor medida en linfocitos. Esto concuerda con los resultados descritos por quienes demostraron que MCF-7 tiene niveles indetectables de pro caspasa 3(73).

Estudios previos han sugerido que las células cuya función de caspasa 3 está disminuida, alterada o ausente son parcialmente resistentes a la inducción de apoptosis por varios agentes, incluyendo el cisplatino (74) y doxorubicina. Sin embargo esta deficiencia no da resistencia a todos los agentes antineoplásicos, ya que estaurosporina (75) y paclitaxel (73) pueden inducir apoptosis en este tipo celular, lo que indica la activación de vías alternas.

La mayor actividad apoptótica se confirma una vez más en células HeLa cuando se agrega activación metabólica con una dosis milimolar 4.5 veces menor de Casiopeína III-ia[®] que de Cisplatino[®], produciendo un 90% de células apoptóticas *versus* 50%. Lo mismo sucede en SK-LU-1 con una concentración un orden de magnitud menor de Casiopeína III-ia[®] que de Cisplatino[®].

No se encontró evidencia de apoptosis con Cisplatino[®] en la línea MCF7, como se ha mencionado, este no es un fármaco de elección en carcinomas mamarios, no obstante la Casiopeína III-ia[®] induce un 80% de células en apoptosis cuando se agrega activación metabólica.

Los resultados aquí mostrados, concuerdan con los obtenidos mediante el empleo de citometría de flujo, en trabajos previos, donde se observó que la Casiopeína III-ia[®] posee actividad apoptótica *in vitro* en células HeLa(76), especialmente con la dosis de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en un porcentaje notablemente mayor al exhibido en las células basales y tratadas con Busulfán[®]. Por otra parte, Marín Hernández y col. (77) describen, la inhibición de la respiración celular mediante la inhibición de la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la liberación de citocromo C a

concentraciones de 25 nmoles/mg de Casiopeína III-ia[®], dosis que inhibe la síntesis de ATP, lo que puede comprometer los procesos dependientes de energía como la duplicación celular.

Podemos afirmar entonces, que hay muerte celular por apoptosis y que esta ocurre en forma significativamente diferente entre células tumorales y linfocitos de donadores sanos. Lo anterior se puede explicar debido a la diferencia entre el estatus metabólico entre una célula normal y una transformada. Se ha reconocido que las células neoplásicas tienen un mayor potencial de membrana, debido a generación activa de ATP producto de un mayor gradiente electroquímico de la membrana interna mitocondrial, lo cual se debe a su alta actividad replicativa (78). Con base en esto, se han descrito que las drogas catiónicas lipofílicas de un tamaño menor a 1.500 kDa (como es el caso de la Casiopeína III-ia[®]) tienen la capacidad de acumularse en la membrana interna mitocondrial, siendo el alto potencial de membrana la fuerza que orienta la acumulación del fármaco (79). Aunado a lo anterior, la presencia de un centro metálico (Cu^{+2}) favorece la generación de las especies reactivas de oxígeno, lo cual está ampliamente involucrado en la inducción de apoptosis (80). Existe una relación entre la activación de NADPH oxidasa y la activación de caspasa 3, en donde independiente de la droga aplicada, la generación de ROS parece ser una vía apoptótica común (81).

La meta terapéutica del cáncer es lograr activar la muerte celular selectiva a las células neoplásicas sin dañar las células sanas (82). La quimioterapia existente tiene como blanco células en proliferación, en lugar de atacar anomalías específicas asociadas a las células tumorales. Producto de lo anterior, la ventana terapéutica entre una célula normal y transformada es pequeña, lo que da lugar a efectos colaterales altamente debilitantes como toxicidad gastrointestinal y mielosupresión (83). La mayoría de las drogas parecen iniciar apoptosis a través de la vía mitocondrial directamente e incluso, puede no echar mano de las caspasas. Obviamente la apoptosis no se debe adjudicar solo a una vía, ya que dependerán de la respuesta del estímulo, el tipo celular, el medio extracelular y otros factores (84). Sin embargo, pocos tumores son sensibles a estas terapias, siendo la adquisición de resistencia un problema clínico importante. La falla en la activación del programa apoptótico representa una importante forma de resistencia a fármacos en células tumorales (85). Los resultados obtenidos nos hacen pensar que la Casiopeína III-ia[®] es un fármaco prometedor ya que es capaz de inducir apoptosis en células tumorales y no así en células sanas. Vale la pena señalar que alrededor del 46% de las moléculas en desarrollo para el combate del cáncer son

abortadas por falta de actividad y alrededor del 33% debido a la elevada toxicidad de estos fármacos, hasta ahora, los resultados señalan que tenemos un fármaco activo, afirmando esto no sólo por lo estudios de esta tesis, sino por los resultados en ensayos previos y paralelos con tumores iso- y hetero-transplantados donde la Casiopeína III-Ia[®] muestra ser activa en estos modelos, aunado a ello los ensayos de toxicidad aguda en roedores revelan baja toxicidad comparándola con Cisplatino[®].

Bibliografía

1. Biología Celular y Molecular Lodish, Berk, Zipursky, Matzudaira, Baltimore, Darnell Capitulo 13 Ed. *Médica Panamericana*, 2003.
2. Molecular Biology of Cancer 2004; pp 2-5.
3. Epidemiología del Cáncer. Secretaría de Salud Pública 2000.
4. Cancer. Principles & Practice of Oncology. Vincent T. de Vita, Jr. Samuel Hellman and Steven A. Rosemberg, Lippincott Company, E.U.A. 1982.
5. Lena Ruiz Azuara, Isabel Gracia Mora. Chapter 2: Research compounds with anticancer activity. Dpto de Química Inorgánica Nuclear. Programa Universitario de Salud. UNAM. (En prensa).
6. J. Michaler, T. Bücler, R Hájek. T Lymphocyte Therapy of Cancer. *Physiol. Res.* 53: 463-469. 2004.
7. Riungsa Kim, Recent Advances in Understanding the Cell Death Pathways Activated by Anticancer Therapy. *Cancer* April 15, 103 (8): 1551-15560.
8. Artículos de revisión La apoptosis y su importancia biomédica. Karla Ortega Camarillo; Margarita Días Flores, Alejandro Ávalos Rodríguez, Marcela Vergara – Onoforte, Ana María Rosales Torres. *Gac. Méd. Méx.* 2001; Vol. 137(6), 563-578.
9. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.
10. Richard C. Duke, David M Ojeius y Jhon Ding E Young. Suicidio celular en la salud y en la enfermedad. *Investigación y Ciencia* Febrero 1997. pp 44-52.
11. Kroemer G, Zamzami N, Susin S A. Mitochondrial control of apoptosis. *Inmunol Today* 1997; 18: 44-51.
12. Cohen JJ. Apoptosis. *Inmunol Today* 1993; 14 126-130.
13. Schwartzman AR, Cidlowski AJ. Apoptosis: the biochemistry and biology of programmed cell death. *Endocrine Rev* 1993; 14:133-151.
14. Penninger MJ, Kroemer G. Molecular and cellular mechanisms of T lymphocyte apoptosis. *Adv Immunol* 1998; 68: 51-144.
15. Hengartner MO. *Nature* 2000; 407:770-776.
16. Nagata S. *Ann Rev Genetic* 1999; 33:29-35.
17. Thompsom CB. *Science*, 1995; 267:1456-1462.
18. Ciara Twmey, J.V. McCarthy. Pathways of apoptosis and importance in development. *J. Cell. Med.* Vol.9, No.2, 2005 pp 345-359.
19. Raff MC. *Nature* 1992; 356:397-400.
20. Thatte U, Dahanukar S. *Drugs* 1997; 54:511- 532. 15.
21. Osborne AB, Schwartz ML. Trends. *Cell Biol* 1994;4:394-22
22. Adams MJ, Cory S. *Science* 1998;281:1322-1325
23. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lissa F. *Eur J Biochem* 1999; 264:687-701.
24. Hetts WS. *JAMA* 1998; 279:300-307.
25. Xiaolan Yi‡, Xiao-Ming Yin§, and Zheng Dong. *Biochemistry* Vol.178, No. 19, Issue of May 9, pp. 16992-16999, 2003.
26. Hong Zhang, Wolfgang Holzgreve and Christian De Geyter. Bcl2-L-10 a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Human Molecular Genetics*, 2001 Vol. 10 No. 21 pp 2329-2339.
27. Wyllie AH. *Br Med Bull* 1997; 53: 451-465.
28. Merino JJ, Cordero-Campaña MI. Bases moleculares del proceso de muerte celular programada: implicaciones de la proteína p53 y otras proteínas en el control del ciclo celular. Mecanismos de acción. *Revisión. Invest Clin* 1998; 39:323-358.
29. Green RD, Reed CJ. *Science* 1998; 281:1309-1312.
30. Jacobson MD, Burne JF, King MP, Migashita T, Reed ,JC, Raff MC. *Nature* 1993. p. 361-368.

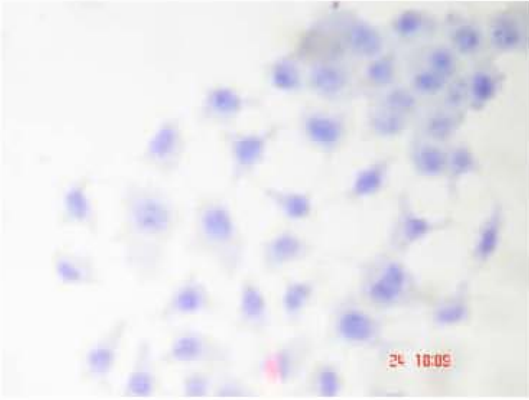
31. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124:1-6.
32. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein: *Cell* 1992; 69:119-128,399.
33. Cohen MG. *Biochem J* 1997; 326:1-16.
34. Thornberry AN, Lazebnik Y. *Science* 1998; 281:1312-1316).
35. Sánchez Torres Luvia E, Diosdado Vargas Fernando. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Tec Pecu Méx* 2003; 41(1):49-62).
36. Vaux DL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 293: 2239-2244.
37. Thornberry NA *Science* 1988; 281:1312-1316.
38. Mehmet *Nature* 2000; 403: 29-30.
39. Gorman MA. *Neuro Report* 1998; 9:R49-R55.
40. Earnshaw CW, Martins ML, Kaufmann HS. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:383-424.
41. Wolfe JT, Ross D, Cohen GM. *FEBS Letter* 1994; 352:58-62.
42. Arends JM, Wyllie AH. *Int Rev Exp Pathol* 1991; 32:223-254.
43. Myriam Orellana, Viviana Guajardo *Rev Méd Chile*. 2004; 132: 85-94.
44. Farmacología Básica y Clínica Bertram G.Katzang, MD, PhD. Pags 44-48. 1991.
45. Coon Mj, Ding X, Pernecky Sj, Vaz Adn. Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J* 1992; 6: 669-73.
46. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992 Nov;119(3):493-501.
47. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. Vol. 46; 4:275-280. 2000
48. Inserto kit para detección de apoptosis por TUNEL ROCHE.2004.
49. Benjamin CW, Hiebsch RR, Johns DA. Caspase activation in MCF7 cells responding to etoposide treatment. *Mol. Pharmacol*. 1998. 53(3); 446-50.
50. Cell Signaling Technology 2002 Catalog & Technical referente.
51. Lena Ruiz-Azuara. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo I. Patente de invención, SECOFI 18801. P. I. (1990).Patente, Enero 26, (1994) no. 172967.
52. Lena Ruiz-Azuara. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II. Patente de invención, SECOFI 18802. P. I. (1990).Patente, Dic.9 (1993) no. 172248.
53. Lena Ruiz-Azuara. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. U. S. Patent application serial No. 07/628,843., Ap 21 (1992) Number 5, 107, 005. U. S Patent Re35, 458, Feb. 18 (1997). U.E. Pub No. 0 434 444 A1, Ap. 903140739.
54. Lena Ruiz-Azuara. Process to obtain new mixed copper aminoacidate from methylate phenanthroline complexes to be used as anticancerigenic agents. U. S. Patent application serial No. 07/628,628., (1992), Pat. No. 5,576,326. Nov. 19 (1996). U.E. Pub No. 0 434 445 A2, Ap. 90314074.7-2110.
55. Título de Marca:Casiopeína. Reg. 407543 SECOFI (1992, 2002).
56. 3ª. Jornada De Casiopeínas Taxco Guerrero 2002.
57. Marín-Hernandez Alvaro, Gracia-Mora Isabel, Ruiz-Ramírez Lena, Moreno-Sánchez Rafael, Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas). *Biochemical Pharmacology*, 65 (2003) 1979-1989
58. Ruiz-Ramírez L., de la Rosa M:E ,Gracia I.,. Mendoza A., Pérez G., Ferrer-Sueta G., Breña M., Gutierrez P., E. Pimentel E.and Cruces M.and Natarajan A.T., Casiopeinas, Metal Based-Drugs a New Class of Antineoplastic and Genotoxic Compounds, *J.of Inorganic Biochemistry*,59 (2-3) (1995) 206.

59. A. Tovar-Tovar, L. Ruiz Ramírez, A. Campero, A. Ropmerosa, R. Moreno-Esparza, M.J. Rosalez-Hoz, Structural and reactivity studies on 4,4-dimethyl-2,2-bipyridine,acethylacetate copper (II) nitrate (Casiopeina III-I) with DNA constituents, by UV-vis and EPR Techniques., *J. of Inorganic Biochemistry*, 2004
60. Araceli Tovar, Lena Ruíz Ramírez , Antonio Campero Celis. Interacción entre Casiopeínas y Adenina. Primer Congreso en Casiopeínas, Taxco Guerrero 2002
61. Fuentes Noriega, L. Ruiz-Ramírez, A. Tovar-Tovar, H. Rico Morales, I. Gracia Mora. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína III-ia in rat plasma. *J. Of Chromatography B*. 772 (2002) 115-121.
62. Estudio De Los Efectos Genotóxicos, Citostáticos Y Citotóxicos De La Casiopeína III-ia En Médula Ósea Y Sangre Periférica De Ratón. Francisco Sánchez Bartéz, Isabel Gracia Mora, Elia Roldán Reyes, Lena Ruiz Azuara. Congreso de Química Médica 2004.
63. Isabel Gracia-Mora, Lena Ruiz-Ramírez, Celedonio Gómez-Ruiz, Mabel Tinoco, Adriana Márquez, Laura Romero, Álvaro Marín, Lucía Macías, Ma. Elena Bravo-Gómez. Knigth's Move In The Periodic Table, From Copper To Platinum, Novel Antitumor Mixed Chelate Copper Compounds, Casiopeinas, Evaluated By An *In Vitro* Human And Murine Cancer Cell Line Panel, *Metal Based Drugs*, 2001,8,1,19-28,
64. Ostrosky ,P., Montero, R., Hernández N., Ruiz-Ramirez L., Gasque L., Herrera L., Ruiz, M., Cortinas, C. and Rodríguez,Cytostatic Effect of some New Copper Complexes, R. *Mutagenesis* (1988) 11- 80.
65. Ruiz-Ramírez L., Gracia-Mora I., Moreno-Esparza R., Díaz D., Gasque L., Huerta L., Mayet L., Lomelí C., "The antitumor activity of several transition metal complexes", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 43, 2-3 (1991) 615.
66. Ruiz-Ramírez L., Gracia I., de la Rosa M:E., Sumano H., Gómez C., Arenas F.,Gómez E. Pimentel E.and Cruces M., "Cytostatic, Mutagenic, Antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeinas I, II and III.", *J.of Inorganic Biochemistry*,51 (1-2) (1993) 406.
67. Philip Skehan, Rits Storeng, Domic Scudiero, Anne Monk, James McMahon, David Vistica, Jonathan T. Warren, Heidi Bokesch, Susan Kenney, Michel R. Boyd;Nwe Colorimetric Citotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J. of Nat. Cancer*. Vol 82, No. 13, July 4 1990.
68. Dorothy M Maron and Bruce N Ames. Revised methods for the salmonella mutagenicity test *Elsevier Science*, 1983: 174-793.
69. Cory S, Huang DC, Adams JM. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607.
70. Lucken-Ardjomande S, Martinou JC. 2005. Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *C R Biologies* 328: 616-631.
71. Theodorakis P, Lomonosova E, Chinnadurai G. 2002. Critical requirement of BAX for manifestations of Apoptosis induced by multiple stimuli in human epithelial cancer cells. *Cancer Res* 62: 3373-3376.
72. Fink SL, Cookson BT. 2005. Apoptosis, Pyroptosis and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Inmunity* 73: 1907-1916.
73. Svingen PA, Loegering D, Rodriguez J, Meng XW, Mesner PW, Holbeck S, Monks A, Krajewski S, Scudiero DA, Sausville EA, Reed JC, Lazebnik YA, Kaufmann SH. 2004. Components of the cell death machine and drug sensitivity of the national cancer institute cell lines panel. *Clin Cancer Res* 10:6807-6820.
- 74.Faleiro L, Lazebnik Y. 2000. Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol* 151:951-959.

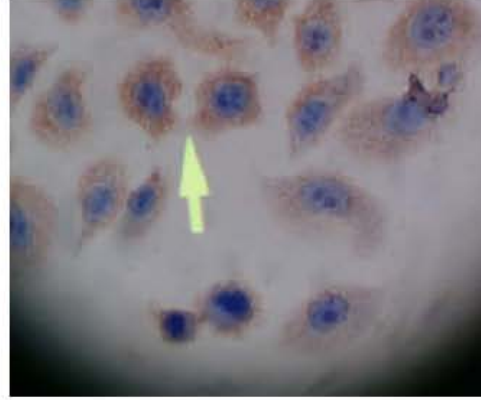
-
75. Janicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG. 1998. Caspase 3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other dead substrates in apoptosis. *J Biol Chem* 273:15540-15545.
76. Rodríguez-Aguilera E, Téllez M, Macías L, Cortés L, Ortíz R, Ruíz-Ramírez L, Gracia-Mora I. 2002. Estimación del porcentaje de muerte celular por apoptosis y necrosis en células HeLa, inducido por cinco Casiopeínas de la familia III. Primer Congreso en Casiopeínas. Taxco, Guerrero. Páginas 49-55. 2 y 3 de Diciembre 2002.
77. Marin-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. 2003. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology* 65: 1979-1989.
78. Bernal SD, Lampidis TJ, Summerhayes IC, Chen LB. 1982. Rhodamine-123 selectively reduces clonal growth of carcinoma cells in vitro. *Science* 218: 1117-1119.
79. Fantin VR, Berardi MJ, Scorrano L, Korsmeyer SJ, Leder P. 2002. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer Cell* 2:29-42.
80. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Biology & Medicine*. 29:1387-1404.
81. Shimizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M. 1998. Requirement of caspase-3(like) protease-mediated Hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem* 41:26900-26907.
82. Johnstone R.W, Ruefli A.A, Lowe S.W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108: 153-164.
83. McLaughlin F, Finn P, Thangue N. 2003. The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism-based therapeutics come of age. *DDT* 8: 793-801.
84. Newton., Strasser A Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy. *J Exp Med*. 2000 Jan 3;191(1):195-200.
85. Igney F, Krammer P.H. 2002. Death and anti death: Tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews in cancer* 2: 277-287.

Inmunohistoquímica

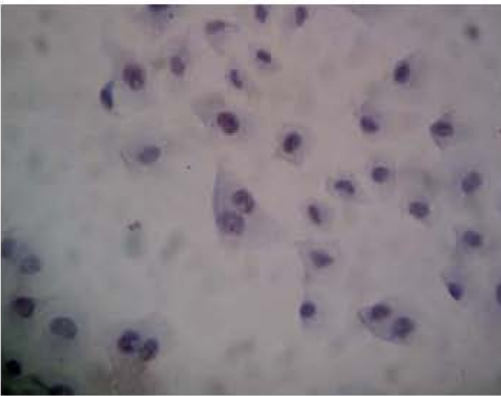
En este anexo se muestran las imágenes de las reacciones positivas a los anticuerpos estudiados para la detección de apoptosis: Bcl2, Bax, Caspasa 3, Ki-67 y TUNEL.



Reacción Negativa



Reacción Positiva Citosólica Bcl2.



Reacción Positiva Nuclear
Caspasa 3



Reacción Positiva Nuclear Ki-67



Reacción Positiva Nuclear
TUNEL