



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

---

---

“EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS Y APOPTÓTICOS DE LAS  
CASIOPEÍNAS® I Igli Y III-ia EN LÍNEAS TUMORALES HUMANAS”

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A

FRANCISCO RUBÉN CARVALLO CHAIGNEAU

ASESORES: FERNANDO CONSTANTINO CASAS  
LENA RUIZ AZUARA  
VICENTE MADRID MARINA

MÉXICO DF

AÑO 2007



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.

***A mi papá, con toda la admiración que te  
tendré por siempre...***

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que participaron de una forma u otra en el desarrollo de este trabajo de investigación. Durante esta tesis trabajé en los siguientes lugares, debiéndoles mi respeto y admiración a todos quienes ayudaron a mi formación.

Al Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM, lugar en donde aprendí de los maestros (Fernando, Enrique, José, Elizabeth, Laura, Nuri, Betty, Carlos, Gerardo, Gilberto, Jaime y Luis Ignacio), cuyos criterios he adoptado como actitud de vida y cuyas ganas de aprender marcan profundamente mi alma. Además, mis compañeros y estudiantes del Departamento (Christopher, Adrianita, Adriana, Lucía, Edna, Mario, Larisa, Luis Enrique, Cochinillo, Teresa, Jaime Eugenio, Miriam, Lucía, Adriana, César, Félix, Citlali, Xóchitl, etc...), a quienes debo una amistad que perdurará y se que traspasará las fronteras. Finalmente y no por eso menos importante, a mis amigos laboratoristas y administrativos (Teresa, Carmelita, Don Luis, Toño, Lalo, Lupita, Don Aureliano, Don Benito y Güerito) cuya alegría y ganas de vivir hicieron olvidar por ratos que me encontraba a más de 8,000 kilómetros de mi tierra.

A la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química de la UNAM, origen de todas mis incertidumbres y lugar de respuestas a las mayores interrogantes. Además, fuente de grandes amistades (Isabel, eres una tremenda persona)... Lucía, Celedonio, Marisol, Mabel, Francisco Sánchez, Nayeli, Sarahí, Ana, Héctor, Don Manuel, Sra. Lucía y Erika, a quienes nunca olvidaré. Por sus sabios consejos y acertados comentarios, todos mis respetos y admiración.

Al Departamento de Neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, en especial a Cristina Trejo, quien con paciencia y mucha dedicación guió mis torpes manos y afianzó mi debil andar en el área de la muerte celular.

Al Departamento de Salud de la UAM-I, en especial a Ernesto, de quien aprendí que la paciencia es la verdadera semilla del saber y que la planeación es lo más importante en un proyecto.

Al Laboratorio de Virus y Cáncer del CISEI- Cuernavaca, por enseñarme que en la vida la única forma de aprender es echando a perder y que quien diga que nunca algo le salió mal es quien nunca aprendió de sus pasos mal dados. Al Dr. Madrid, Víctor, Alfredo, Memo, Margarita, etc. Muchas gracias por su amistad y confianza depositada en mí.

A la unidad de Citogenética de la FES-Zaragoza, por todo su apoyo y amistad brindada con los años, en especial a Mario y a Elia por su diligencia y su puerta siempre abierta.

Al Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, en donde aprendí que la vida es muy corta y que el aprendizaje es hoy. Gracias Lena, María Elena,

Araceli, Juan Carlos, etc., por su amistad, confianza y por aportar los cimientos para construir este trabajo.

A mis tutores, Dr. Fernando Constantino, Dra. Lena Ruiz, Dr. Vicente Madrid y MC. Isabel Gracia, les agradezco por todos sus tirones de oreja y sus comentarios realizados a lo largo del desarrollo de este trabajo, el cual creo será un pequeño aporte al fascinante mundo de las Casiopeínas.

Por último y no por eso menos importante, a mi esposa Tamara por haberme soportado y apoyado todo el tiempo en México y por vivir conmigo la aventura de estudiar y vivir en tierras aztecas, lugar de inolvidables playas y paradisiacos paisajes, pero aun más importante, lugar de entrañables amigos y de una formación humana sin precedentes. Es para ti mi mayor reconocimiento y todo mi amor.

**Se agradece el apoyo económico otorgado por los proyectos sectoriales CONACYT-2002-C01-7677, CONACYT U-41997MA1, y las becas de Maestría y Doctorado otorgadas por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.**

## ÍNDICE

	Página
<b>CAPÍTULO 1. Introducción</b> .....	1
1.1 Cáncer .....	1
1.2 La célula cancerosa .....	3
1.2.1 Auto suficiencia en señales de crecimiento .....	3
1.2.2 Insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento .....	4
1.2.3 Potencial replicativo ilimitado .....	5
1.2.4 Angiogénesis .....	6
1.2.5 Invasión y metástasis .....	7
1.2.6 Resistencia tumoral a apoptosis .....	8
1.2.6.1. Mecanismo de apoptosis .....	9
1.2.6.2 Apoptosis y la mitocondria .....	12
1.2.6.3 Intercomunicación entre las vías intrínseca y extrínseca: la familia Bcl-2 .....	14
1.2.6.4 Ejecución de apoptosis dependiente de caspasas .....	15
1.2.6.5 Función de p53 en la regulación de apoptosis .....	20
1.3. Quimioterapia del cáncer .....	22
1.3.1 Fármacos anticancerígenos .....	23
1.3.2 El cobre en cáncer .....	27
1.3.3 Casiopeínas .....	28
1.4 El ratón desnudo en la evaluación de nuevos fármacos .....	31
1.5 Justificación.....	35
1.6 Hipótesis .....	35
1.7 Objetivo general .....	36
1.8 Objetivos particulares .....	36
<b>CAPÍTULO 2 Actividad y mecanismos de acción <i>in vitro</i> de las Casiopeínas® III-ia y IIgli en células de carcinoma de colon HCT-15</b> .....	37
2.1 Antecedentes .....	37
2.2 Material y métodos .....	39
2.2.1 Fármacos .....	39
2.2.1.1 Casiopeína III-ia® .....	39
2.2.1.2 Casiopeína IIgli® .....	40
2.2.2 Manejo de cultivo celular.....	41
2.2.3 Manejo de las células.....	42
2.2.3.1 Descongelamiento de las células .....	42
2.2.3.2 Obtención del cultivo <i>stock</i> a confluencia .....	42
2.2.3.3 Tripsinización .....	42
2.2.3.4 Cuantificación de las células .....	43
2.2.4 Tratamientos <i>in vitro</i> .....	44
2.2.4.1 Viabilidad celular .....	44
2.2.4.2 <i>Western Blot</i> .....	44
2.2.4.3 Ciclo celular .....	46
2.2.4.4 Alteraciones morfológicas .....	46
2.2.4.5 Apoptosis .....	50
2.2.5 Análisis estadístico .....	50

2.3 Resultados .....	52
2.3.1 Resultados para Casiopeína IIgli <i>in vitro</i> sobre HCT-15.....	52
2.3.1.1 Viabilidad .....	52
2.3.1.2 Cambios morfológicos .....	54
2.3.1.2.1 Cambios citológicos .....	54
2.3.1.2.2 Alteraciones ultraestructurales .....	56
2.3.1.3 Inducción de apoptosis .....	59
2.3.2 Resultados para Casiopeína III-ia <i>in vitro</i> .....	61
2.3.2.1 Viabilidad .....	61
2.3.2.2 Ciclo celular .....	63
2.3.2.3 Cambios morfológicos .....	65
2.3.2.3.1 Cambios citológicos .....	65
2.3.2.3.2 Alteraciones ultraestructurales .....	67
2.3.2.4 Apoptosis por citometría de flujo para Anexina V y yoduro de propidio .....	70
2.3.2.5 Mecanismo de apoptosis .....	74
2.4 Discusión y conclusiones .....	76
2.4.1 Actividad <i>in vitro</i> de Cas II-gli sobre carcinoma de colon HCT-15 ..	76
2.4.2 Actividad <i>in vitro</i> de Cas III-ia sobre carcinoma de colon HCT-15 ..	77
2.5 Bibliografía .....	83
<b>CAPÍTULO 3</b> Actividad, mecanismos de acción y efectos colaterales <i>in vivo</i> de las Casiopeínas® III-ia y IIgli en ratones xenotransplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon humano HCT-15	101
3.1 Antecedentes .....	101
3.2 Material y métodos .....	103
3.2.1 Fármacos .....	103
3.2.2 Células .....	103
3.2.3 Actividad antitumoral .....	103
3.2.4 Alteraciones colaterales a la aplicación de los fármacos .....	104
3.2.5 Necropsia e histopatología .....	105
3.2.6 Análisis estadístico .....	108
3.3 Resultados .....	109
3.3.1 Efectos antitumorales <i>in vivo</i> de Cas III-ia .....	109
3.3.2 Efectos antitumorales <i>in vivo</i> de Cas IIgli .....	120
3.4 Discusión y conclusiones.....	131
3.5 Bibliografía .....	136
<b>CAPÍTULO 4</b> Actividad y efectos colaterales <i>in vivo</i> de las Casiopeínas® III-ia, IIgli y III-La en células de carcinoma cérvico uterino HeLa y de próstata PC-3	139
4.1 Antecedentes .....	139
4.2 Material y métodos .....	142
4.2.1 Fármacos .....	142
4.2.2 Estudios <i>in vivo</i> con HeLa (carcinoma cérvico uterino) y PC-3 (carcinoma prostático) .....	143
4.2.3 Hemograma .....	146
4.2.4 Necropsia e histopatología .....	146
4.2.5 Análisis estadístico .....	147
4.3 Resultados .....	149

4.3.1 HeLa .....	149
4.3.2 PC-3 .....	157
4.4 Discusión y conclusiones .....	163
4.5 Bibliografía .....	167
<b>5. CONCLUSIONES FINALES</b> .....	171
<b>6. ANEXOS</b> .....	172
<b>7. ACEPTACIÓN PUBLICACIÓN:</b> Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effects in vivo. <i>Biometals</i> 2007, En Prensa.	179

## LISTA DE CUADROS

<i>N°</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
1.1	Fármacos antineoplásicos frecuentemente utilizados en la quimioterapia del cáncer.	26
2.3.1	Estadística de la viabilidad de HCT-15 con Cas Ilgli <i>in vitro</i> .	53
2.3.2	Frecuencia de alteraciones ultraestructurales observadas <i>in vitro</i> en alrededor de 50 células por tratamiento por 24 horas con Cas Ilgli.	58
2.3.3	Estadística de la viabilidad de HCT-15 tratadas con Cas III-ia <i>in vitro</i> .	62
2.3.4	Frecuencia de alteraciones ultraestructurales observadas en alrededor de 50 células por tratamiento <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	69
2.3.5	Estadística de viabilidad obtenida por citometría de flujo de HCT-15 tratadas <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	73
2.3.6	Estadística de apoptosis temprana obtenida por citometría de flujo de HCT-15 tratadas <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	73
3.3.1	Efectos antitumorales <i>in vivo</i> de Cas III-ia y CDDP.	112
3.3.2	Estadística de porcentaje de pérdida de peso al día 21 de animales tratados con Cas III-ia y CDDP.	114
3.3.3	Efectos antitumorales <i>in vivo</i> de Cas Ilgli.	121
3.3.4	Estadística de porcentaje de pérdida de peso al día 21 de animales tratados con Cas Ilgli y CDDP.	125
3.4.1	Resumen de efectos antitumorales y secundarios de Cas III-ia, Ilgli y CDDP en ratones transplantados con HCT-15.	135
4.3.1	Actividad antitumoral <i>in vivo</i> sobre HeLa de CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.	151
4.3.2	Hemograma de ratones transplantados con HeLa y tratados con CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.	154
4.3.3	Estadística de proteínas totales en el hemograma de animales tratados con CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.	154
4.3.4	Actividad antitumoral <i>in vivo</i> sobre HeLa de CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.	159

## LISTA DE FIGURAS

<i>N°</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
1.1	Mecanismos de apoptosis.	11
1.2	Electroforesis en gel de agarosa de ADN celular.	19
1.3	Protocolo <i>in vivo</i> definido para fase I preclínica.	34
2.2.1	Casiopeína III-ia.	39
2.2.2	Casiopeína IIgli.	40
2.3.1	Viabilidad <i>in vitro</i> de HCT-15 con Cas IIgli.	53
2.3.2	Células HCT-15 sin tratamiento.	55
2.3.3	Células HCT-15 tratadas con Cas IIgli.	55
2.3.4	Alteraciones ultraestructurales <i>in vitro</i> observadas en HCT-15 tras el tratamiento con Cas IIgli.	57
2.3.5	Muerte celular determinada <i>in vitro</i> por citometría de flujo de HCT-15 tratadas con Cas IIgli.	60
2.3.6	Electroforesis en gel de agarosa (2%) de ADN de HCT-15 expuesta <i>in vitro</i> a Cas IIgli.	60
2.3.7	Viabilidad de HCT-15 expuesta <i>in vitro</i> a Cas III-ia.	62
2.3.8	Detección de ciclo celular de HCT-15 expuesta <i>in vitro</i> a Cas III-ia.	64
2.3.9	Niveles de PCNA en células HCT-15 tratadas <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	64
2.3.10	Células HCT-15.	66
2.3.11	Células HCT-15 <i>in vitro</i> después de 24 horas con 5 µg/mL de Cas III-ia.	66
2.3.12	Hallazgos ultraestructurales de HCT-15 tratadas con Cas III-ia <i>in vitro</i> .	68
2.3.13	Muerte celular determinada por citometría de flujo de HCT-15 tratadas <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	71
2.3.14	Niveles de Bax en células HCT-15 tratadas <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	75
2.3.15	Electroforesis en gel de agarosa (2%) de ADN de HCT-15 expuesta <i>in vitro</i> a Cas III-ia.	75
2.4.1	Mecanismos propuestos de inducción de muerte <i>in vitro</i> para Cas III-ia y IIgli.	82
3.3.1	Volumen relativo tumoral de HCT-15 tratado con Cas III-ia y CDDP.	110
3.3.2	Días en doblar el tamaño de HCT-15 tratado con Cas III-ia y CDDP.	110
3.3.3	Índice mitótico y apoptótico de HCT-15 tratado con Cas III-ia y CDDP.	112
3.3.4	Porcentaje de pérdida de peso de los animales tratados con Cas III-ia y CDDP.	114
3.3.5	Hallazgos de necropsias en animales tratados con Cas III-ia y CDDP.	116
3.3.6	Hallazgos histológicos en animales tratados con Cas III-ia y CDDP.	117

3.3.7	Fotomicrografía de hígado proveniente de animal tratado con Cas III-ia.	118
3.3.8	Índice mitótico y apoptótico duodenal proveniente de animales tratados con Cas III-ia y CDDP.	119
3.3.9	Volumen relativo tumoral de HCT-15 tratado con Cas IIGli y CDDP.	121
3.3.10	Días en doblar el tamaño de HCT-15 tratado con Cas IIGli y CDDP.	121
3.3.11	Índice mitótico y apoptótico de HCT-15 tratado con Cas IIGli y CDDP.	124
3.3.12	Porcentaje de pérdida de peso de los animales tratados con Cas IIGli y CDDP.	124
3.3.13	Hallazgos de necropsias en animales tratados con Cas IIGli y CDDP.	127
3.3.14	Hallazgos histológicos en animales tratados con Cas IIGli y CDDP.	128
3.3.15	Índice mitótico y apoptótico duodenal proveniente de animales tratados con Cas IIGli y CDDP.	130
4.2.1	Casiopeína III-La.	142
4.3.1	Volumen relativo tumoral de HeLa tratado con CDDP, Cas IIGli, Cas III-ia y Cas III-La.	150
4.3.2	Días en doblar el tamaño de HeLa tratado con CDDP, Cas IIGli, Cas III-ia y Cas III-La.	150
4.3.3	Porcentaje de pérdida de peso de los animales transplantados con HeLa y tratados con CDDP, Cas IIGli, Cas III-ia y Cas III-La.	153
4.3.4	Hallazgos de necropsias en animales tratados con CDDP, Cas IIGli, Cas III-ia y Cas III-La.	156
4.3.5	Volumen relativo tumoral de PC-3 tratado con CDDP, Cas IIGli, Cas III-ia y Cas III-La.	158
4.3.6	Días en doblar el tamaño de PC-3 tratado con CDDP, Cas IIGli, Cas III-ia y Cas III-La.	158
4.3.7	Porcentaje de pérdida de peso de los animales transplantados con PC-3 y tratados con CDDP, Cas IIGli, Cas III-ia y Cas III-La.	160
4.3.8	Hallazgos de necropsias en animales tratados con CDDP, Cas IIGli, Cas III-ia y Cas III-La.	162

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Factor inductor de apoptosis
ANT	Adenin nucleótico traslocasa
Apaf 1	Factor activador de proteasas apoptóticas 1
APT	Aminofosfolípido traslocasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Mensajero de Ácido ribonucleico
ASPP	Proteína estimulante de la función apoptótica de p53
ATCC	American tissue culture collection
ATP	Adenina trifosfato
BH	Homología de Bcl-2
Bid	Dominio que interactúa con Bcl-2
CAD	DNasa activada por caspasas
CAMs	Moléculas de adhesión celular
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
Cas	Casiopeína
CDDP	<i>Cis</i> -diamino-dicloro platino (II)
CDK4	Cinasa dependiente de ciclinas 4
CED-3	Proteína 3 precursora de muerte celular
Cit c	Citocromo c
<i>c-myc</i>	Protooncogen relacionado a gen de mielocitomatosis
CRADD	Adaptador de caspasa a RIP con dominio de muerte
DFF	Factor de fragmentación de ADN
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECL	Quimioluminiscencia aumentada
EGF	Factor de crecimiento epitelial
FA	Función antitumoral
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FAK	Cinasa de adhesión focal
Fas	CD-95, Apo-1
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FLIP	Proteínas inhibitorias de FLICE
GSH	Glutación reducida
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF	Factor inducido por hipoxia
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
ICAD	Inhibidor de DNasas activadas por caspasas
ICE	Enzima convertidora de interleucina 1- $\beta$ / caspasa 1
IGF	Factor de crecimiento similar a insulina
InCan	Instituto Nacional de Cancerología
MDR1	Proteínas de resistencia múltiple a drogas 1
MEM	Medio esencial mínimo
MRP	Proteína asociada a MDR1
MTP	Transición de la permeabilidad mitocondrial
NAC	N-acetil cisteína

NAD	Dinucleótido de nicotinamida
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PS	Fosfatidilserina
Rb	Retinoblastoma
REC	Retraso específico del crecimiento
RIP	Proteína que interactúa con receptores
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
Smac/DIABLO	Activador de caspasas secundario a la mitocondria / Proteína de unión directa a IAP con bajo pl.
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
VDAC	Canales aniónicos dependientes de voltaje
VRT	Volumen relativo tumoral

## RESUMEN

### “EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS Y APOPTÓTICOS DE LAS CASIOPEÍNAS® IIgli Y III-ia EN LÍNEAS TUMORALES HUMANAS”

La quimioterapia del cáncer está dominada por una gran cantidad de agentes citotóxicos que se caracterizan por presentar paralelamente al tratamiento, múltiples efectos secundarios debilitantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* e *in vivo* los efectos antiproliferativos y apoptóticos en células tumorales humanas, así como los efectos colaterales de dos nuevos agentes quimioterapéuticos con base en cobre, las Casiopeínas® III-ia (Cas III-ia) y IIgli (Cas IIgli), con la finalidad de dilucidar sus mecanismos de acción. Ambos fármacos fueron evaluados *in vitro* (viabilidad, morfología, *western blot*, citometría de flujo y electroforesis en gel) e *in vivo* (xenotransplante en el ratón desnudo) sobre carcinoma de colon HCT-15, para tratar de establecer su actividad antiproliferativa y apoptótica sobre las células tumorales, además de la actividad tóxica en los ratones tras la aplicación intraperitoneal. Aunado a lo anterior, ambos fármacos más un tercero, la Casiopeína III-La, se estudiaron *in vivo* utilizando xenotransplante en el ratón desnudo, de carcinoma cérvico uterino HeLa y prostático PC-3. En los modelos utilizados, Cas III-ia disminuyó la viabilidad e indujo apoptosis sobre HCT-15 *in vitro* de manera dosis dependiente y ciclo celular independiente, a través de la activación de Bax y caspasas, presumiblemente por la vía intrínseca. Por su parte, Cas IIgli disminuyó la viabilidad e indujo apoptosis dependiente de caspasas, en parte a través de la producción de especies reactivas de oxígeno. Además, ambos fármacos demostraron actividad sobre HCT-15 transplantada en el ratón desnudo. No obstante, evidenciaron inducir peritonitis de manera dosis dependiente. Sumado a lo anterior, ambos fármacos mostraron modesta actividad sobre carcinoma cérvico uterino HeLa, sin embargo, la Casiopeína® III-La fue la que evidenció la mayor actividad, aunque fue ligeramente tóxica. Sin embargo, ninguna de las Casiopeínas® utilizadas fue activa sobre carcinoma de próstata PC-3. Se plantea más de un mecanismo de acción para las Casiopeínas® utilizadas, que tendrán su punto de convergencia en la mitocondria. Basado en los resultados obtenidos en este estudio, es posible concluir que en los modelos utilizados, las Cas III-ia y IIgli tienen actividad antitumoral a través distintos mecanismos de acción y que ambas drogas son buenos candidatos para su evaluación clínica en humanos.

**PALABRAS CLAVES:** casiopeína, quimioterapia, drogas citotóxicas, cáncer, cáncer colorectal, Bax.

## ABSTRACT

### ANTIPROLIFERATIVE AND APOPTOTIC EFFECTS OF CASIOPEINAS<sup>®</sup> II gli AND III-ia ON HUMAN TUMOR CELL LINES.

Chemotherapy in cancer is dominated in its highest form by cytotoxic and other antimetabolites agents that are accompanied by debilitating secondary effects. This work's objective was to evaluate *in vitro* and *in vivo*, the anti-proliferative and apoptotic effects on human cancer cells, as well as the secondary effects of two new copper based chemotherapeutic agents, Casiopeínas<sup>®</sup> III-ia (Cas III-ia) and Ilgli (Cas Ilgli)", with the finality of pin-pointing its action mechanisms. Both drugs were evaluated *in vitro* (viability, morphology, western blot, cytometry flow, and gel electrophoresis) and *in vivo* (nude mice model) on colon carcinoma HCT-15, to try to establish its anti-proliferative and apoptotic effects on the tumor cells, as well as their toxic activity after the intraperitoneal application on nude mice. In addition both drugs and a third, Casiopeína III-La", were studied *in vivo* using the nude mice model with HeLa cervical uterine carcinoma and PC-3 prostatic carcinoma. In the models used, Cas III-ia diminished the viability and induced apoptosis on HCT-15 *in vitro* in a dose dependent and cell cycle independent manner, through Bax and caspase activation, presumably by the intrinsic apoptosis pathway. In the other hand, Cas Ilgli diminished the viability and induced apoptosis in a caspase dependent manner, in part through reactive oxygen species production. Moreover, both drugs demonstrated activity over HCT-15 transplanted to the nude mice. However, evidence shows that they induced peritonitis in a dose dependent manner. Both drugs showed modest activity on HeLa cervical uterine carcinoma. However, Casiopeína<sup>®</sup> III-La showed a better activity, even though it was slightly toxic. Contrary to the data mentioned above, none of the Casiopeínas<sup>®</sup> showed activity on PC-3 prostate carcinoma. More than one mechanism of action is proposed for the used Casiopeínas<sup>®</sup>, and these mechanisms will have their point of convergence in mitochondria. Based on the results obtained in this study, it is possible to conclude that in these models, Cas III-ia and CasIlgli have anti-tumour activity through different action mechanisms, and that both drugs are good candidates for clinical evaluation in humans.

**KEY WORDS:** casiopeina, chemotherapy, cytotoxic drugs, cancer, colorectal cancer, Bax.

## **CAPÍTULO 1. Introducción**

### **1.1 Cáncer**

El cáncer es un grupo de enfermedades en el que las células afectadas adquieren capacidad de crecimiento descontrolado a través de un proceso de múltiples pasos, que envuelve el avance gradual de una célula normal a una neoplásica. Durante este proceso se generan mutaciones e inactivación de las vías relacionadas con diferenciación y apoptosis, así como la activación de las vías que promueven la proliferación y la diferenciación celular. Muchas mutaciones tienen lugar en protooncogenes y en genes supresores de tumores, lo que resulta en una desregulación del ciclo celular (Hanahan y Weinberg, 2000; Bissonette *et al.*, 1992; García-Carrancá, 2003). Como resultado de lo anterior, las células cancerosas siguen un esquema de proliferación propio, lo que les confiere la permanencia no sólo en el tejido donde se originan, sino también pueden alcanzar lugares distantes a este nuevo crecimiento (Weinberg, 1996).

Las estadísticas revelan que en los próximos años, el cáncer afectará a una de cada tres personas y que en occidente, es la causa de alrededor de 1 de cada 4 muertes. Tanto en México como en el mundo, el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiacas. La Organización Mundial de la Salud predijo que para el año 2020 habrán 20 millones de nuevos pacientes con cáncer por año. Entre los hombres, las 8 principales localizaciones mortales de cáncer son: colon-recto, pulmón, estómago, hígado, esófago, boca-faringe, próstata y ganglios linfáticos. Con respecto al cáncer de colon y recto, éste es uno de los tumores malignos más comunes en los países desarrollados, con aproximadamente 19,000 y 160,000 casos en Inglaterra y Estados Unidos de Norteamérica, respectivamente (Parkin *et al.*, 1985).

En las mujeres, los órganos más afectados por esta enfermedad son la glándula mamaria, el estómago, el colon-recto, cuello del útero, pulmón, ovario, esófago e hígado. El principal cáncer en las mujeres en países en desarrollo es el de mama, seguido por el de estómago. Por otra parte, en los países

desarrollados el cáncer de mama también se ubica en primer lugar seguido por cáncer colorrectal. (*World health organization report*, 1998).

En México, el cáncer de bronquios y pulmón se manifiesta como la primera causa de muerte en los hombres con 4,355 casos y una tasa de 9 por 100,000. Le siguen el cáncer de próstata y estómago con 3,766 y 2,645 casos respectivamente. Otras neoplasias malignas motivo frecuentes de defunción en el hombre son las de hígado y vías biliares intra-hepáticas, de páncreas y de colon (INCan México, 1999). En mujeres, en los últimos 10 años el cáncer cérvico uterino se ha ubicado en el primer lugar en orden de frecuencia a pesar del programa de control existente desde 1974 (Flores *et al.*, 2002). En el grupo etario de 30 a 44 años es la tercera causa de muerte y una de las primeras 10 causas en todos los grupos de edad hasta los 64 años (Escandón-Romero *et al.*, 1992).

## **1.2 La célula cancerosa**

Observaciones tanto de modelos tumorales humanos como animales, señalan que el desarrollo tumoral procede de una forma análoga a la evolución Darwiniana, en la cual una sucesión de cambios genéticos, cada uno de ellos brindándole ventajas en el tipo de crecimiento, da lugar a una transformación progresiva de células normales a células neoplásicas (Moncevičiūtė-Eringienė,

2005). Existen más de 100 tipos de cáncer, los cuales dan lugar a subtipos encontrados en distintos órganos y tejidos. Se enumeran seis alteraciones básicas que dictan un comportamiento maligno (Hanahan y Weinberg, 2000).

1. Auto suficiencia en señales de crecimiento.
2. Insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento.
3. Potencial replicativo ilimitado.
4. Angiogénesis.
5. Invasión y metástasis.
6. Resistencia tumoral a apoptosis.

### **1.2.1 Auto suficiencia en señales de crecimiento**

Las células tumorales muestran una dependencia reducida a factores de crecimiento exógeno. Se demostró que las células cancerosas son capaces de generar sus propias señales de crecimiento (acción autocrina), reduciendo por ende la dependencia con el microambiente externo, lo que afecta la homeostasis del comportamiento celular (Fedi *et al.*, 1997). Sin embargo, estudios recientes revelaron que los fibroblastos de la matriz extracelular tienen una participación importante en el desarrollo y progresión de carcinomas, dada la presencia de muchas familias de factores de crecimiento (*FGF*, *IGF*, *EGF*, *HGF*, *TGF- $\beta$* ) implicados de forma autocrina y paracrina en la interacción estroma – epitelio (Bhowmick *et al.*, 2004).

Los receptores celulares que traducen señales de crecimiento al interior de las células son blancos de desregulación durante la patogénesis tumoral. La mayoría de los receptores que tienen actividad de tirosin cinasas en sus dominios citoplasmáticos, están sobre expresados en muchos tipos de cáncer. Por ejemplo, el factor de crecimiento epidermal está sobre expresado en tumores de mama, cerebro y estómago, mientras que receptores a *HER2/neu* están presentes en carcinomas mamarios y de estómago (Slamon *et al.*, 1987; Yarden y Ullrich, 1988).

### **1.2.2 Insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento**

Existen múltiples señales en el medio extracelular (matriz) e inhibidores solubles del crecimiento que colaboran en la manutención de la homeostasis celular. Estas señales son recibidas a través de receptores transmembranales que conectan a circuitos intracelulares. Las células tumorales son capaces de evadir estas señales. Una de las vías es a través del desbaratamiento de la vía de pRb, dejando a las células insensibles a factores que detienen el crecimiento. Dentro de estas moléculas se encuentra TGF- $\beta$ , que mediante algunas formas (bloqueo de *c-myc*, síntesis de p15<sup>INK4B</sup> y proteína p21 que bloquean cinasas) previenen la fosforilación que inactiva pRB, por ende, bloquea el avance a través de G<sub>1</sub> (Datto *et al.*, 1997). Algunas células pierden la sensibilidad a TGF- $\beta$  a través de receptores mutantes o no funcionales (Markowitz *et al.*, 1995), mutación de Smad 4 (que traduce señal desde el ligando de TGF- $\beta$ ) y sustituciones aminoacídicas de CDK4 (blanco inmediato de la acción de TGF- $\beta$ ) (Zuo *et al.*, 1996).

Otras vías que se conocen, alteran la acción de pRB mediante la acción de algunas oncoproteínas, como lo es E7 del virus papiloma humano (Dyson *et al.*, 1989).

### **1.2.3 Potencial replicativo ilimitado**

La mayoría de las células tumorales que son propagadas en cultivo parecen ser inmortales, lo que sugiere que el fenotipo del potencial replicativo se adquiere *in vivo* durante la progresión tumoral y es esencial para el desarrollo del crecimiento maligno (Hayfflick, 1997). Los tumores acumulan alteraciones genéticas al progresar y al menos una pequeña porción de estas alteraciones, están directamente relacionadas con el desarrollo de tumores (Cheng y Loeb, 1993). Quienes demuestran lo anterior fueron Wright *et al.*, (1989), los que inactivaron p53 y Rb a fibroblastos senescentes, y estos comenzaron a replicar nuevamente, hasta entrar en un segundo estado de detención de división, nombrado crisis. Éste se caracteriza por muerte celular masiva, desarreglos cariotípicos asociados con fusiones término terminal de cromosomas y la

emergencia ocasional de una célula variante ( $1 \text{ en } 10^7$ ), la que ha adquirido la capacidad de multiplicar sin límites hacia la inmortalización.

Asimismo, la actividad de la telomerasa en la mantención de la longitud de los telómeros se ha correlacionado con el fenotipo maligno. Los telómeros constituyen estructuras especializadas que forman los extremos de los cromosomas eucariontes que participan en funciones celulares tan importantes como la mitosis, la estabilidad cromosómica y el tiempo de vida de las estirpes celulares (Hernández-Fernández, 1999). Está demostrada su relación con algunas enfermedades, especialmente con el cáncer, ya que se encontró mayor actividad de telomerasa en algunos tumores, como mama, próstata y colon (Nawaz *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2006).

#### **1.2.4 Angiogénesis**

La angiogénesis es un fenómeno fisiológico importante que ocurre durante el desarrollo embrionario y en la reparación de heridas. Sin embargo, la angiogénesis desregulada es un mecanismo clave en algunas condiciones patológicas, como en la génesis tumoral e inflamación crónica (Folkman, 1995).

El crecimiento de un tumor más allá de 2 cm de diámetro, requiere de llevar a cabo múltiples cambios en su ambiente molecular. Uno de ellos, es la formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización), que es un proceso que integra alteraciones genéticas de las células cancerosas y la respuesta del huésped, indispensable en la formación tumoral (Rak y Yu, 2004). La formación de nuevos vasos sanguíneos al sitio del tumor es un requisito indispensable para el crecimiento tumoral y metástasis. Esto se debe a que la sangre y los vasos sanguíneos son fuentes no sólo de oxígeno, factores de crecimiento, nutrientes y metabolitos, sino también de hormonas, factores de crecimiento circulantes y derivados del endotelio (paracrino), útiles para invasividad, actividad proteolítica y metástasis (Rak *et al.*, 1996).

Como ejemplo, VEGF es una citocina que tiene un importante papel en vasculogénesis y angiogénesis y su producción está regulada por la concentración local de oxígeno. La hipoxia estimula su producción, aumentando su transcripción (activando HIF) y la estabilidad del ARNm. Sin embargo, la concentración celular de oxígeno no es el único regulador de la síntesis de VEGF, ya que se demostró que algunas células neoplásicas pueden producirlo en normoxia (Mukhopadhyay y Datta, 2004).

### **1.2.5 Invasión y metástasis**

La adhesión de las células a la matriz extracelular y a otras células es esencial para la integridad tisular. La adhesión celular regula vías de señalización intracelular que regulan proliferación, apoptosis, diferenciación y otros procesos (Brakebusch *et al.*, 2002). Tarde o temprano, la mayoría de los tumores malignos generarán células con capacidad de abandonar el tumor primario produciendo metástasis, que hoy en día son la causa del 90% de las muertes asociadas a tumores (Sporn, 1996). Muchas clases de proteínas están envueltas en el contacto de la célula con su medio extracelular. Estas incluyen moléculas de adhesión celular (CAM's) que median interacciones intercelulares y las integrinas, que interacciona células con su medio extracelular. Se ha demostrado que las células cancerosas pueden encender receptores de integrinas que ellas mismas expresan, favoreciendo aquellos que transmiten señales a favor del crecimiento (Giancotti y Ruoslahti, 1999).

La caderina E (expresada principalmente en células epiteliales) es útil para la transmisión de señales inhibitorias del crecimiento a través de contactos citoplasmáticos con  $\beta$ -catenina a los circuitos intracelulares de señalización. La función de la caderina E está alterada en la mayoría de los tumores epiteliales por mecanismos que involucran inactivación mutacional de genes de caderina E y  $\beta$ -catenina, represión transcripcional o proteólisis del dominio extracelular

de caderina (Christofori y Semb, 1999). En un estudio realizado con fibroblastos transformados, las células que sobreexpresan integrina  $\beta 1$  formaron tumores primarios significativamente más grandes y tenían mayor número de metástasis en hígado y pulmón (Brakebusch *et al.*, 1999).

La cinasa de adhesión focal (*FAK* por sus siglas en inglés), regulada por p53, es un regulador clave de los sitios de adhesión a integrinas con el medio extracelular, señalización de factores de crecimiento, sobrevivencia celular y migración. *FAK* está frecuentemente sobre expresada en células tumorales, lo que se correlaciona con mal pronóstico (Owen *et al.*, 1995).

### **1.2.6 Resistencia tumoral a apoptosis**

El desarrollo de un mecanismo de muerte para controlar el número celular fue un evento esencial en la evolución de organismos multicelulares. Este mecanismo activo de control nombrado apoptosis, es requerido para la formación de órganos durante el desarrollo, para la homeostasis celular y para el buen funcionamiento del sistema inmune (Raff, 1992; Steller, 1995). Este tipo de muerte celular se caracteriza morfológicamente por condensación de cromatina en la periferia de la membrana nuclear, fragmentación nuclear, pérdida de contacto con las células vecinas, vacuolización de membrana (“*blebs*”) y formación de cuerpos apoptóticos, los que son fagocitados por otras células. Sin embargo, la membrana celular y las mitocondrias están bien preservadas (Wyllie *et al.*, 1980; Ziegler y Groscurth, 2004).

La mayoría de las células cancerosas tienen defectos en el control normal de apoptosis. El primer ejemplo que caracterizó lo anterior, fue la traslocación cromosomal 14:18 encontrada en pacientes con linfomas foliculares, la cual yuxtapone la porción reguladora de inmunoglobulinas con el gen antiapoptótico Bcl-2 (Tsujiyamoto *et al.*, 1984), cuyo efecto es dar resistencia a apoptosis mediada por la vía extrínseca, así como la supresión de proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bax y Bak (Wei *et al.*, 2001).

Los componentes de la cascada de señalización de apoptosis, entre otros reguladores, están entre los objetivos más promisorios para la modulación de la inflamación y de la muerte celular en el tratamiento del cáncer (Reed, 2002).

### **1.2.6.1. Mecanismo de apoptosis**

La apoptosis o muerte celular programada ocurre tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Durante la apoptosis se han identificado diferentes eventos celulares, los que ocurren a diferentes tiempos de éste proceso. Entre éstos está la degradación de proteínas, como las procaspasas, la cual no ocurre de forma caótica.

Las procaspasas son una familia de cisteín aspartato proteasas que se encuentran como moléculas inactivas, que al recibir la señal apoptogénica sufren un rompimiento proteolítico dando lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa o caspasa. (Duriez y Shah, 1997; Kidd 1998). Las caspasas fueron implicadas en el proceso de apoptosis con el descubrimiento de *CED-3* (producto de un gen requerido para muerte celular en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*). *CED-3* está relacionado a la enzima convertidora de interleucina 1- $\beta$  mamífera (*ICE* o caspasa 1), que a pesar de no participar en la apoptosis, dio pie al descubrimiento de una familia de proteasas con papeles diversos en inflamación y apoptosis (Yuan *et al.*, 1993). Las caspasas activadas por una señal apoptótica tienen como blanco varios sustratos celulares, como otras caspasas, actina, poli (ADP-ribosa) polimerasa, fodrina y laminas, los cuales son responsables de los cambios morfológicos observados en las células en apoptosis (Buendía *et al.*, 1999; Martin y Green, 1995).

Se han identificado dos vías de apoptosis, las cuales están intercomunicadas, la vía extrínseca y la vía intrínseca (Figura 1.1). La primera es mediada por receptores de muerte localizados en la superficie celular, como la familia de *Fas* y *TNF- $\alpha$*  (Nagata, 1997), que están ligados a proteínas adaptadoras específicas, como *FADD* o *CRADD* (Ahmad *et al.*, 1997). Estas moléculas adaptadoras interaccionan con las caspasas iniciadoras (2, 8 y 10) disparando

su autoactivación (Muzio *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998). Las caspasas iniciadoras activan a las caspasas efectoras (3, 6 y 7) (Muzio *et al.*, 1997).

La vía intrínseca está relacionada con la mitocondria e inicia con la liberación al citoplasma de varios factores ubicados en ella (como citocromo c, AIF, Omi/Htr2, Smac/DIABLO) y la posterior activación de vías dependientes e independientes de las caspasas. El *Citocromo c* (en adelante *Cit c*) liberado se une a *Apaf-1* y promueve su oligomerización (Liu *et al.*, 1996; Srinivasula, 1998). El reclutamiento de la pro-caspasa 9 al complejo *Cit c* – *Apaf-1* da lugar a la formación del apoptosoma. Este apoptosoma activo resulta en la activación de la caspasa 9 y en la posterior activación de caspasa 3 (Li *et al.*, 1997). En ambas vías, la activación de caspasas efectoras (3, 6 y 7) por caspasas iniciadoras (9, 2, 8 y 10) amplifica la señal apoptótica, para asegurar la muerte celular en una forma rápida, evitándose que el proceso de muerte se revierta.



mitocondria radica en la liberación de diferentes proteínas desde el espacio intermembranal, tales como el *Cit c*, quien es requerido como acarreador de electrones en la fosforilación oxidativa, proceso que genera la mayoría del ATP intracelular (Mathews, 1985). El mecanismo mediante el cual ocurre dicha liberación es aun desconocido, sin embargo, existen algunas hipótesis al respecto. La primera señala que al haber un estímulo pro apoptótico, hay una pérdida no específica de *Cit c* desde el espacio intermembranal debido a hinchamiento mitocondrial seguido de ruptura de la membrana externa (Kroemer *et al.*, 1995, 1997), lo que se postula se debe a la apertura del poro de transición de permeabilidad en la membrana interna (Marzo *et al.*, 1998) o por hiperpolarización de la membrana interna (Vander Heiden *et al.*, 1997). Sin embargo, la teoría más aceptada del hinchamiento mitocondrial en apoptosis es la transición de la permeabilidad mitocondrial (MTP), causada por la apertura de un megaporo en la membrana mitocondrial interna (Gunter y Pfeiffer, 1990), lo que causa aumento de volumen y ruptura de la membrana externa. Ambos mecanismos descritos están relacionados con una pérdida del potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ). El potencial de membrana es consecuencia de los protones que son expulsados desde la matriz, creando una carga negativa, el que es utilizado para la síntesis de ATP. Sin embargo, existe controversia ya que dependiendo de la célula y el estímulo, el  $\Delta\Psi_m$  muestra disminución antes o después de la salida de *Cit c*. Un tercer mecanismo involucra la salida de *Cit c* a través de sitios discretos que no alteran el tamaño o la función mitocondrial, constituidos por canales formados por Bax y/o Bak oligomerizados en interacción con los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC) (Martinou y Green, 2001). Con el tiempo se ha postulado que el aumento de permeabilidad de potasio por la membrana interna, provoca hinchazón, ruptura de membrana externa y liberación de *Cit c*. Lo anterior es seguido por abertura de MTP y permeabilización de la membrana interna mitocondrial, que pueden ser bloqueados o activados por bcl-2 y Bax con relación a adenin nucleótido traslocasa (ANT, que interacciona con VDAC), respectivamente (Eliseev *et al.*, 2002). Por otro lado, ya se demostró que cardiolipina, fosfolípido mitocondrial que se ubica en los puntos de contacto entre la membrana externa e interna mitocondrial, está unido a *Cit c* al ser liberado y su presencia es de vital importancia en la acción de Bid y Bax en liposomas sintéticos (Zamzani y

Kroemer, 2003). Sin embargo, los mecanismos moleculares envueltos en la permeabilización de la membrana mitocondrial y el papel de las proteínas de la familia de Bcl-2 en la regulación de estos mecanismos aún son materia de debate (Bettaieb *et al.*, 2003)

Sin embargo, Van Ahsen *et al.*, (2000) demostraron que si se induce la liberación de *Cit c* a través de bax pero se bloquean las caspasas, se libera todo el *Cit c* sin cursar la célula con apoptosis. Se postula que los cambios de la membrana interna mitocondrial, como pérdida de potencial de membrana e hinchamiento es dependiente de caspasas y que la célula utiliza vías glucolíticas para mantener los niveles de ATP.

No obstante la acción pro apoptótica del *Cit c* antes descrita, Oliver *et al.*, (2005) demostraron la presencia constitutiva de *Cit c* en el citosol de una línea celular de leucemia resistente a quimioterapia (K562/ADR), la cual no cursaba con cambios morfológicos asociados a apoptosis y no estaba acompañada de otras proteínas apoptogénicas. Esta presencia se asoció con preservación de integridad y función mitocondrial, así como con proliferación celular.

Otras proteínas mitocondriales que intervienen en este mecanismo de muerte celular, a través de regulación de caspasas, son Smac/DIABLO (Wang, 2001) y Omi/HtrA2 (Hegde *et al.*, 2001). Sus efectos apoptóticos los ejercen a través de la inhibición de una familia de proteínas inhibidoras de apoptosis, conocidas como XIAP (supresores endógenos de caspasas) (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Su salida desde la mitocondria se ha asociado a la salida de *Cit c*, los que compartirían un mecanismo similar, luego que no se registraran diferencias en los tiempos de expulsión al citosol (Zhuo *et al.*, 2005). Sin embargo, Chauhan *et al.*, (2001) demostraron que el tratamiento de células de mieloma múltiple con dexametasona disparó la liberación de Smac/DIABLO desde la mitocondria sin liberación de *Cit c*.

Además, existe otro mediador de apoptosis de origen mitocondrial, que es el factor inductor de apoptosis (AIF), cuya actividad es independiente a la activación de caspasas. AIF actúa directamente en el núcleo, produciendo

principalmente condensación de la cromatina nuclear y fragmentación de ADN en segmentos de alrededor de 50 kb (Daugas *et al.*, 2000). Su función principal en la mitocondria es similar a *Cit c* (aceptor/donador de electrones), pero una vez en el citoplasma, aparte de producir los cambios antes mencionados, es responsable de la salida de *Cit c* con pérdida de potencial de membrana. Por ende, AIF tiene efectos indirectos en la integridad de membrana mitocondrial (Susin *et al.*, 1999).

### **1.2.6.3 Intercomunicación entre las vías intrínseca y extrínseca: la familia Bcl-2**

Aunado a lo descrito, existe una intercomunicación entre ambos mecanismos de apoptosis. Las señales apoptóticas convergen en la mitocondria, a través de proteínas de la familia Bcl-2, la cual tiene tanto miembros pro apoptóticos (como Bax, Bid y bad) como anti apoptóticos (como Bcl-2, Bcl-XL) (Adams JW, 2003) y constituyen un punto crítico en el desarrollo de apoptosis. Los miembros de esta familia comparten homología en cuatro dominios, nombrados BH1, BH2, BH3 y BH4 (Adams y Cory, 1998). Las proteínas pro apoptóticas se pueden subdividir en subfamilias “multidominio” y “BH-3 only”. Las proteínas pro apoptóticas multidomios como Bax y Bak comparten homología entre los dominios BH 1 y 3, mientras que las proteínas BH-3 *only*, como Bid y Bim son similares a la familia de multidominio, pero la similitud de su secuencia se limita solo al dominio BH3. El radio de moléculas anti y pro apoptóticas determina la respuesta a la señal de muerte. La caspasa 8 puede activar la cascada de caspasas indirectamente por la vía mitocondrial mediante el rompimiento de *Bid* en dos fragmentos (p22 y p15). p15 se adhiere a la membrana externa mitocondrial y favorece la liberación de *Cit c* (Luo *et al.*, 1998). Los mecanismos propuestos son a través de un modelo ligando receptor, en el que la porción BH3 de p15 *Bid* se une a Bcl-2 o Bax de membrana, los que sirven como receptores (Wang *et al.*, 1996) y formadores de poros iónicos transmembranales (Minn *et al.*, 1997). p15 podría regular esos poros formando canales híbridos. Otro mecanismo propuesto es que p15 *Bid*, con o sin proteínas asociadas, constituyen un poro para el paso selectivo de *Cit c*. Este

mecanismo ha sido descrito para las toxinas A y B de difteria (Falnes *et al.*, 1992).

En condiciones fisiológicas, Bax existe como una proteína soluble en el citosol. Algunos estudios indican que se encuentra secuestrada a través de interacciones con proteínas inhibitorias, a pesar que el análisis de filtración en gel indica que es monomérica. Se proponen varias proteínas inactivantes de bax, como 14-3-3, Humanina, Ku70, regulador de apoptosis con CARD (ARC), Proteínas de choque calórico y hexoquinasas (Lucken-Ardjomande y Martinou, 2005). Sin embargo, aun falta demostrar que la inhibición del efecto de los inhibidores dispare apoptosis en forma espontánea.

#### **1.2.6.4 Ejecución de apoptosis dependiente de caspasas**

Al ser activadas las caspasas iniciadoras (2, 8, 9, 10), éstas inducen proteólisis de las caspasas efectoras (3, 6 y 7) las cuales tienen varios sustratos. Dentro de los blancos de las caspasas 3 y 7 está PARP [Poli(ADP-ribosa) polimerasa. PARP es una proteína de 116 kD que ha sido implicada en reparación del ADN y en la manutención de la integridad genómica (Virág y Szabó, 2002, Bouchard *et al.*, 2003). En forma resumida, PARP al percibir rompimiento en el ADN, se activa provocando el consumo de NAD<sup>+</sup>, inicialmente desde el citoplasma (Ying *et al.*, 2005). La célula intenta regenerar el NAD<sup>+</sup> desde nicotinamida a través de consumo de ATP, lo que en una célula dañada, va a llevar a reducción del NAD<sup>+</sup>, lo que afectará la glicólisis y la respiración celular. Esta descompensación energética va a llevar a la célula a una muerte irremediable a través de oncosis (Chiarugi, 2002). En apoptosis, PARP es degradada en fragmentos de 89 y 24 kD, lo que previene su sobreactivación (junto con su crisis energética) manteniendo la energía celular para ciertos pasos sensibles a ATP de apoptosis (Herceg y Wang, 1999), por lo que su degradación es considerada un marcador confiable de apoptosis (Virág y Szabó, 2002). No obstante, hoy en día se conoce la forma de bloquear a PARP durante la muerte oncótica, por lo que este tipo de muerte dejó de ser un proceso accidental y ambiental (Alison y Sarraf, 1994), transformándose en un tipo de muerte predecible y regulable (Jagtap y Szabó, 2005).

Asimismo, las caspasas ejecutoras tienen otros sustratos. Una vez activadas producen proteólisis de algunas proteínas tanto del citoesqueleto como de la membrana nuclear. La proteólisis sobre actina y fodrina da lugar a una pérdida de la forma y del tamaño celular. La degradación de lamina da como resultado el encogimiento nuclear (Mashima *et al.*, 1999; Hengartner, 2000).

Además, dentro de los efectos de la activación de caspasas, existen dos daños que son característicos y que diferencian estados iniciales y tardíos de apoptosis. Uno de ellos es la exposición de fosfatidilserina, como daño temprano y el otro, es el rompimiento del ADN en fragmentos oligonucleosomales.

La distribución asimétrica de fosfolípidos de membrana con la exposición de fosfatidilserina (PS) es una característica fundamental en aquellas células cuyos disturbios son incompatibles con la función fisiológica de membranas, viabilidad celular y apoptosis.

Se han descritos 3 mecanismos de asimetría (Bever *et al.*, 1999):

- a. Bomba transportadora dependiente de ATP específica de aminofosfolípidos o aminofosfolípido traslocasa (APT) o “flipasa”.
- b. Migración bidireccional de fosfolípidos a través de la bicapa independiente de los grupos polares, o modelo de “escramblasa” de fosfolípidos.
- c. A través de “flopasa”, que es una bomba que dirige hacia afuera algunos fosfolípidos polares. Su función es mantener la asimetría en células intactas.

Con respecto a estos mecanismos, la inhibición de la flopasa por sí sola, no es capaz de generar una redistribución espontánea de lípidos (de Jong *et al.*, 1997; Bratton *et al.*, 1997). Por otra parte, las condiciones de activación celular pueden estar caracterizadas por niveles elevados de  $Ca^{+2}$  intracelular, mismo que puede ser liberado desde el retículo endoplásmico por la acción de variadas drogas y por Bax (Nutt *et al.*, 2002). Lo anterior puede causar el

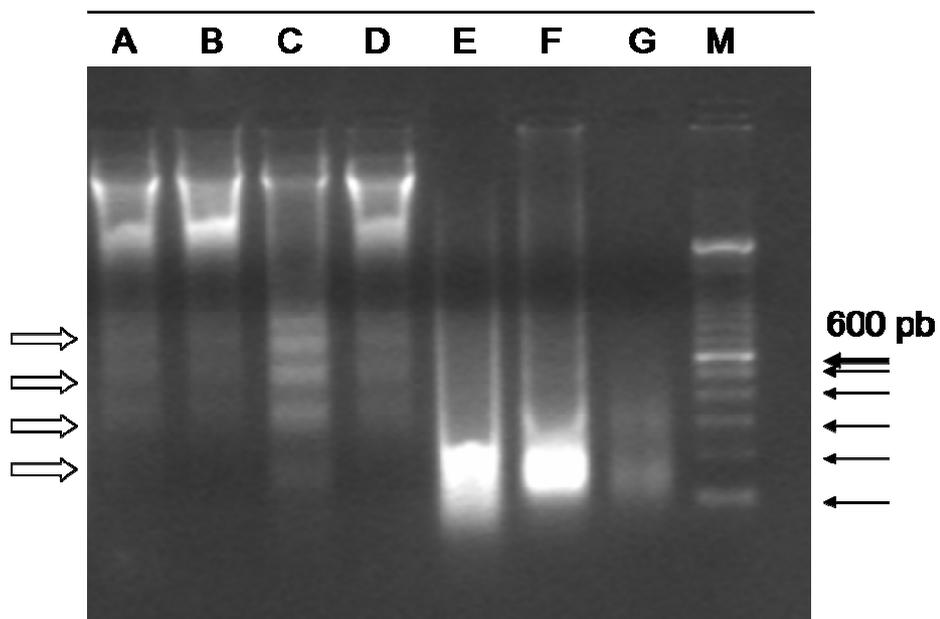
colapso de la asimetría de lípidos por activación de una escramblasa independiente de ATP y el subsiguiente movimiento bidireccional de toda clase de fosfolípidos (Bever *et al.*, 1998). Sin embargo, se demostró que la ATPasa de membrana plasmática es sustrato de caspasa 3, acto que libera el dominio de unión de calmodulina, lo que induce que esta bomba remueva rápidamente el calcio citosólico (Pászty *et al.*, 2002) dejando esta hipótesis en duda. Además, en el mismo año Schwab *et al.*, (2002) postulan que las capas disparan necrosis secundaria cuando rompen e inactivan sistemas transportadores de  $\text{Ca}^{+2}$  de membrana plasmática, causando sobrecarga de  $\text{Ca}^{+2}$  y lisis de membrana.

Por ende, el mecanismo de exposición de PS es compartido, generándose por inhibición de APT más la activación de escramblasas, exposición de PS para luego reconocimiento y fagocitosis. Con respecto a esto, los macrófagos activados secretan una glicoproteína que se une a PS, lo que es reconocido por  $\alpha_v\beta_3$  expresado en el fagocito (Hanayama *et al.*, 2002).

Hasta hace poco tiempo se asumió que la exposición de PS era un evento dependiente de caspasas (Martin *et al.*, 1996; Naito *et al.*, 1997), sin embargo, Ferraro-Peyret *et al.*, (2002) demostraron que en linfocitos T puede ocurrir una exposición de PS independiente de caspasas, proponiéndose a AIF como el responsable en la degradación de fodrina, proteína que se asocia con el mantenimiento de la asimetría de la membrana lipídica.

Sin embargo, el daño más severo a la célula en apoptosis es el rompimiento del ADN nuclear en fragmentos de 180 a 200 pares de bases, lo que es un evento tardío en este mecanismo de muerte y ocurre después de la formación de cuerpos apoptóticos o de la lisis final de la célula (Collins *et al.*, 1997). Una vez activa la caspasa 3, es capaz de inducir el rompimiento de DFF (Factor de fragmentación de ADN), el cual se compone de dos subunidades: DFF40 (40-kDa) y DFF45 (45kDa). DFF40 (también conocida como CAD) presenta actividad de endonucleasa intrínseca, mientras que DFF45 (o ICAD) sirve como chaperón e inhibidor de DFF40. La activación y formación de homo oligómeros de DFF40 y el rompimiento de DFF45, resulta en rompimientos de la doble

hebra de ADN en fragmentos internucleosomales (Zhang y Zu, 2001) (Figura 1.2).



**Figura 1.2 Electroforesis en gel de agarosa de ADN celular.** Columnas A, B, C, D: Rompimiento de ADN en fragmentos de 180 a 200 pares de base (flechas vacías). Columnas E, F, G: Degradación del ADN al azar. M: Marcador de 100 pares de base (flechas rellenas).

#### **1.2.6.5 Función de p53 en la regulación de apoptosis**

El gen p53 es uno de los genes más estudiados en la biología del cáncer humano. Este gen codifica para una proteína que es conocida como el “guardián del genoma”, basado en su habilidad de inducir arresto en G1 después de daño al ADN (Lane, 1992). Esta proteína se clasifica dentro de las proteínas supresoras de tumores, ya que es un factor de transcripción que responde a estrés citotóxico como daño al ADN, aumentando la transcripción de genes que regulan el avance en el ciclo celular y apoptosis (Ko y Prives, 1996). En un principio, la falla en una o varias de sus funciones pueden explicar la alta frecuencia de las mutaciones de p53 en tumores humanos (Hainaut *et al.*, 1998).

La mecánica de inducción de apoptosis a través de la vía de p53, favorece la expresión de proteínas envueltas en la vía intrínseca mitocondrial como *Bax*, *NOXA*, *PUMA* y *p53AIP*. Asimismo, en la vía extrínseca de receptores de membrana, p53 puede inducir la expresión de *Fas* y *TRAIL*. De tal forma, la presencia de p53 puede suprimir la expresión de genes antiapoptóticos, incluyendo *Bcl-2*, *Bcl-xL* o *survivina*. Sin embargo, p53 puede promover muerte celular a través de mecanismos independientes de transcripción y a la contribución de ambas vías dependerá de la célula, el contexto, la naturaleza y la intensidad de la señal (Slee *et al.*, 2004). Tiene paralelamente otras funciones, como interacción con proteínas, efectos directos en mitocondria y relocalización de receptores de muerte en la superficie celular (Igney y Krammer, 2002).

El estatus de p53 puede ser relevante en la sensibilidad a radio y/o quimioterapia en algunos tipos tumorales y puede ser un factor pronóstico para una gran variedad de tipos tumorales (O'Connor *et al.*, 1993). Las mutaciones del gen supresor p53 ocurren en alrededor del 50 al 70% de los tumores humanos, convirtiéndose en el blanco más frecuente de alteraciones en cáncer (Holstein *et al.*, 1994, Jia *et al.*, 1997). Estas mutaciones facilitan la carcinogénesis inactivando las actividades apoptóticas y de ciclo celular de la proteína silvestre (Oren, 1999). Por otro lado, en alrededor del 70% de los tumores de mama, se expresa p53 pero falla en suprimir el crecimiento celular (Samuels, 2001). Sin embargo, p53 puede inducir apoptosis en un tipo celular, pero no es requerido para activar la maquinaria de muerte celular programada en todos los tipos celulares. Por ejemplo, después de irradiar los timocitos, estos mueren de una forma dependiente de p53 (Lowe *et al.*, 1993). Contrariamente, al irradiar células endoteliales, la muerte fue independiente a p53 (Santana *et al.*, 1996).

La maquinaria apoptótica intrínseca es activa en la mayoría de los tumores y podría ser usada como blanco para eliminar selectivamente a las células cancerosas. Existen algunos informes que demuestran que las células tumorales (y no las normales) son preferencialmente sensibles a activar el apoptosoma o la mitocondria directamente (Nguyen y Wells, 2003). Con respecto a p53 y la actividad del apoptosoma, se encontró que las líneas celulares con p53 defectuoso mantienen intacta la actividad del apoptosoma y la inversa, si el apoptosoma es defectuoso, se mantiene intacta la actividad de p53, sugiriéndose un patrón complementario entre la mutación de p53 y la actividad del apoptosoma (Mashima *et al.*, 2005).

### 1.3. Quimioterapia del cáncer

Hoy en día, la quimioterapia del cáncer está dominada por tratamientos con agentes citotóxicos. Aunque se han hecho avances en el tratamiento del cáncer, el impacto en las tasas de mortalidad ha sido modesto. Por ejemplo, el cáncer de pulmón, tiene una esperanza de vida a los 5 años del 5%, tasa que ha cambiado muy poco en los últimos 30 años. No obstante han habido algunos avances, ya que hoy se pueden alcanzar curas en algunas leucemias juveniles, tumor de Wilm, teratocarcinomas, coriocarcinomas y en tumores testiculares (Workman y Kaye, 2002; Blagosklonny, 2004). No obstante, el logro más espectacular de la oncología en los últimos tiempos se alcanzó con Gleevec, el que inhibe Bcr-Abl (inhibidor de apoptosis) e induce apoptosis en células de leucemia que expresan esta proteína (Sawyers, 2002).

La meta terapéutica del cáncer es lograr activar la muerte celular selectiva a las células neoplásicas. En principio, existen al menos dos estrategias para alcanzar esta meta. La primera, es importante que el fármaco se acumule en el tejido tumoral para que favorezca su acumulación en las células transformadas. La segunda, se busca activar selectivamente la maquinaria de muerte celular en las células tumorales sin dañar las células no neoplásicas. (Johnstone *et al.*, 2002)

La mayoría de los fármacos quimioterapéuticos pueden inducir apoptosis a través de la vía intrínseca mitocondrial directamente e incluso, pueden no activar caspasas. Obviamente cada una de los fármacos tienen distintos mecanismos de inducción de muerte. La respuesta de una célula frente al tratamiento dependerá del estímulo, el tipo celular, el medio extracelular y otros factores (Newton y Strasser, 2000). Sin embargo y en términos generales, dado que generalmente la quimioterapia ejecuta su acción a través de apoptosis, la modulación de los elementos claves de apoptosis directamente influencia la muerte o supervivencia de la célula maligna (Ryungsa, 2005).

Estudios realizados en la última década indican que los agentes quimioterapéuticos inducen apoptosis *in vitro* e *in vivo* (Kaufmann y Earnshaw 2000). Sin embargo, la falla en activar la maquinaria apoptótica se ha correlacionado con resistencia a este tipo de agentes, dirigiéndose la vista hacia los factores que regulan el ciclo apoptótico, así como al mecanismo en sí (Kaufmann y Vaux, 2003.). En un estudio realizado por Svingen *et al.*, (2004), se demostró que prácticamente todas las líneas celulares (a excepción de MCF-7) que corresponden al panel celular del *National Cancer Institute*, tienen activos sus mecanismos de muerte, en mayor o menor grado. No obstante, pequeñas pero detectables cantidades de caspasas 3, 9 y Apaf1 son suficientes para disparar apoptosis. En otras palabras, los factores que regulan la maquinaria apoptótica juegan un papel más importante que la variación en la maquinaria por sí misma. Dentro de estos factores se ha correlacionado a p53, Bcl-2 y fármacos que inducen alteraciones al ADN.

### **1.3.1 Fármacos anticancerígenos**

La quimioterapia en el cáncer es la mejor opción de tratamiento en etapas intermedias y avanzadas. Las drogas antineoplásicas (Cuadro 1.1) se pueden clasificar según su mecanismo de acción en:

#### *1) Agentes que dañan el ADN*

Los agentes alquilantes forman fuertes enlaces con el ADN a través de la formación de intermediarios de iones de carbono. Asimismo, otras moléculas pueden ser blanco de la acción de estos fármacos, como grupos nucleofílicos de proteínas y ARN. Este tipo de agente daña la célula independientemente de su fase en el ciclo celular. Entre los agentes alquilantes más representativos están las mostazas nitrogenadas, busulfán y nitrosureas, así como cisplatino y sus derivados. Con respecto a este último, su acción es mediante la producción de aductos y enlaces intra e inter cadenas de ADN, generación de especies reactivas de oxígeno, activación de p53, síntesis de Bax y activación del sistema receptor ligando CD95.

## *II) Antimetabolitos*

Este tipo de agentes bloquean vías metabólicas envueltos en la síntesis de ADN. Se incluyen los antagonistas de ácido fólico, análogos de pirimidina y análogos de purina. Dentro de este grupo de drogas se encuentra 5-fluorouracilo, cuyo mecanismo de acción está basado en bloquear la timidilato sintetasa, esencial para la síntesis de ADN. Asimismo, el metotrexato es un análogo de ácido fólico que inhibe la dihidrofolato reductasa, interfiriendo así con la síntesis de timidilatos y por ende, de ADN (Smorenburg *et al.*, 2001)

## *III) Agentes que interactúan con microtúbulos*

Los microtúbulos son polímeros proteicos, compuestos principalmente por tubulina, responsables de varios aspectos de la forma y movimiento celular. Dentro de esta familia, están los alcaloides de Vinka, los que interfieren con la polimerización de tubulina, dando lugar a arresto en la fase de mitosis del ciclo celular. También están los taxanos, quienes estabilizan los microtúbulos en estado polimerizado. Su mecanismo de acción lo ejerce a través de la mitocondria (p-53 independiente) y activación de genes de respuesta a estrés (Broker *et al.*, 2004) e induce liberación de cathepsina B desde lisosomas (Sugimura *et al.*, 2004).

## *IV) Terapia endocrina*

Dentro de esta familia, se encuentra tamoxifen, la que se une a los receptores a estrógenos y se usa en el tratamiento de cáncer metastásico mamario. También están incluidos los antiandrógenos, ya sea de origen esteroidal o no esteroidal, los que son usados para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata.

## *V) Inhibidores de la topoisomerasa.*

En esta familia de drogas está etopósido, el que inhibe la síntesis de ADN a través de la inhibición de la topoisomerasa II. También está doxorubicina y camptotecinas.

**Cuadro 1.1 Fármacos antineoplásicos frecuentemente utilizados en la quimioterapia del cáncer.**

<b>Compuesto</b>	<b>Tipo</b>	<b>actividad</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
<b>Cisplatino</b>	Compuesto de coordinación	Alquilante	Daño de ADN nuclear, provocando producción de aductos y enlaces intra e intercadenas de ADN, generación de ERO's, con activación de p53 y síntesis de Bax y activación del sistema receptor/ligando CD95 (Zwelling y Kohn, 1979).
<b>Carboplatino</b>	Compuesto de coordinación	Alquilante	Aductos en ADN y unión a proteínas plasmáticas, con mecanismo similar a cisplatino.
<b>Oxaliplatino</b>	Compuesto de coordinación	Alquilante	Aductos en ADN y unión a proteínas plasmáticas, con mecanismo similar a cisplatino (Pill y Lippard, 1997).
<b>5-Fluoracilo</b>	Antimetabolito	Análogo de pirimidina	Bloquea Timidilato sintetasa, esencial para la formación de ADN.
<b>Metotrexato</b>	Antimetabolito	Análogo de ácido fólico	Inhibe la dihidrofolato reductasa interfiriendo con síntesis de timidilatos y por ende, del ADN (Smorenburg y col., 2001).
<b>Etoposido</b>	Inhibidor de Topoisomerasa	Inhibe función de cromatina	Daño al ADN, activación de p53 y caspasas.
<b>Ciclofosfamida</b>	Mostaza nitrogenada	Alquilante, por metabolitos hidroxilados	Citotóxico por daño al ADN.
<b>Busulfán</b>	Alquil sulfonato	Alquilante, Entrecruzamiento de ADN y ARN	Unión covalente al ADN (Erdal, 2005).
<b>Paclitaxel</b>	Taxano	Inhibidor mitótico, previene despolimerización microtubular	Vía de p-53 independiente de mitocondria y activación de genes de respuesta a stress (Brokar y col., 2004) e induce liberación de cathepsina B desde lisosomas (Sugimura y col., 2004;).
<b>Adriamicina (doxorubicina)</b>	Antibiótico (antraciclinas).	Intercala ADN, radicales libres	Inhibe síntesis de ADN y ARN (Erdal, 2005).

Los fármacos quimioterapéuticos alteran la cinética de proliferación celular e inducen apoptosis en las células transformadas a través de daño al ADN, a los componentes de las membranas lipídicas y a proteínas plasmáticas, lo que causa una pérdida de la homeostasis celular, llevando a la célula a activar apoptosis a través de diversas vías (Herr y Debatin, 2001). La apoptosis es llevada a cabo si el daño excede la capacidad de reparación de la célula bajo el estímulo de muerte. Sin embargo, la resistencia a fármacos es un problema

muy frecuente en el tratamiento de las neoplasias. El entendimiento de los mecanismos celulares que llevan a la muerte ha permitido visualizar racionalmente los usos de estas vías para poder exacerbar las terapias convencionales.

No obstante, la apoptosis no es el único mecanismo de muerte involucrado en la eliminación de células cancerosas o células normales. En una población celular pueden ocurrir muchos mecanismos de muerte distintos (por ejemplo, apoptosis, oncosis y autofagia) en forma simultánea (Kostin *et al.*, 2003), e incluso múltiples programas de muerte pueden ser activados en una sola célula (Hueffer y Galan, 2004), lo que sugiere la existencia de vías comunes para los distintos mecanismos de muerte.

### **1.3.2 El cobre en cáncer**

De los compuestos utilizados hoy en día en la terapia anticancerosa, sólo 3 de los 46 que existen en el mercado, tienen un elemento metálico (que es el platino) como parte de su formulación. Estos son cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Sin embargo, desde la aparición del cisplatino en el mercado, muchos grupos de investigación han comenzado a desarrollar compuestos similares, principalmente basados en oro, platino, paladio y cobre.

Existen en investigación numerosas drogas con cobre (II) en su núcleo, las que fueron concebidas como potenciales antineoplásicos, de las cuales se han descrito variados mecanismos de acción. Se ha demostrado que uno de los blancos más comunes de los quelatos de cobre es el ADN, dada su actividad nucleofílica (Aruoma *et al.*, 1991). Además, algunos investigadores evidenciaron que ciertos compuestos basados en cobre son capaces de inhibir la N-miristoiltransferasa e inducir apoptosis en células de cáncer de colon HT-29 (Shrivastav, 2006). Otro grupos de trabajo demostraron la actividad de otros complejos de cobre (II) en leucemia humana y murina (Gokhale *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2003).

Contrariamente, existen evidencias que el exceso de cobre puede favorecer la angiogénesis (Kent *et al.*, 2004). Con respecto a esto, el cobre (pero no otros metales de transición) es un cofactor esencial para el proceso de angiogénesis (Brewer, 2001), debido a que estimula la proliferación y migración de células endoteliales (Hu, 1998). Estos datos generan distintos puntos de vista en la actividad del cobre en el desarrollo del cáncer.

Modificaciones de algunos derivados de compuestos de cobre han servido de base para la síntesis de compuestos anticancerosos, siendo las Casiopeínas una de las familias más representativas de esta clase de compuestos.

### **1.3.3 Casiopeínas**

En 1980, la Dra. Lena Ruiz Azuara, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), diseñó una serie compuestos de coordinación con posible actividad antineoplásica. La estructura química de las Casiopeínas<sup>®</sup> está formada por cobre (II), como centro metálico, que en la esfera de coordinación presenta un ligante bidentado tipo diimina (N-N) y otro que puede ser aminoacidoato (N-O) o donador O-O (acetil acetato o salicilaldehidato) (Ruiz-Azuara 1993, 1994, 1996, 1997).

El cobre es un metal de transición que es esencial en los sistemas biológicos, ya que sus propiedades químicas le permiten participar en procesos fundamentales que involucran la transferencia de electrones asociada a enzimas oxidativas, por ejemplo: hemocianina, citocromo oxidasa y superóxido dismutasa. El cobre en su estado de oxidación (II) puede coordinar ligantes siguiendo una geometría cuadrada plana o pirámide de base cuadrada. Este centro metálico, puede participar en ciclos redox para liberar especies reactivas de oxígeno que pueden oxidar proteínas (atacando residuos azufrados y provocando entrecruzamiento proteico), lípidos, azúcares, ADN y ARN, que por consecuencia puede producir daño y muerte celular (Valencia y Morán, 2001).

Este grupo de compuestos fue diseñado pensando en que la planaridad en la geometría de la molécula y el ligante diimina (con carácter hidrofóbico), le conferían la posibilidad de actuar como intercalante a través de interacciones  $\pi$ - $\pi$  con las bases púricas y pirimídicas del ADN; y el ligante cargado, le confería la polaridad necesaria para el transporte de la molécula (Bravo *et al.*, 2002).

Dentro de esta familia de fármacos, la Casiopeína III-ia<sup>®</sup> es una de las más ampliamente estudiadas (Gracia-Mora *et al.*, 2001). Se describe dentro de su mecanismo de acción, la inhibición de la respiración celular mediante la inhibición de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y la liberación de *Cit c* inhibiendo la respiración celular y la síntesis de ATP, lo que puede comprometer los procesos dependientes de energía como la duplicación celular (Marín Hernández *et al.*, 2003). Asimismo, la presencia de  $\text{Cu}^{+2}$  en su centro, puede estar relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la reacción de Fenton (Shackelford *et al.*, 2000). No obstante, Tovar-Tovar *et al.*, (1995) demostraron unión de este fármaco a adenina en un modelo *in vitro*.

Para la Casiopeína II-gli y otros compuestos de esta familia, se demostró que exhiben una gran actividad antiproliferativa en carcinoma ovárico (CH1), leucemia murina (L1210) (de Vizcaya *et al.*, 2000) varios carcinomas cérvico uterinos (Gracia-Mora *et al.*, 2001) y en glioma de rata (C6) (Trejo-Solis *et al.*, 2005), así como en el panel *in vivo* sugerido por el *National Cancer Institute*, utilizando las líneas L1210, sarcoma S180 y melanoma B16, aumentando la supervivencia del 16 al 200%, dependiendo de la dosis y del compuesto usado (Ruiz-Ramírez *et al.*, 1991; Ruiz Ramírez *et al.*, 1993).

#### **1.4 El ratón desnudo en la evaluación de nuevos fármacos**

La selección de un modelo experimental apropiado es crítica para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos anticancerosos. El valor del modelo depende de su validación, selectividad, predictibilidad y reproducibilidad (Zubrud, 1972; De Vita y Schein, 1973). En el desarrollo de fármacos anticancerosos, el modelo de animal es seleccionado para demostrar el efecto de citotóxico del fármaco o agente biológico sobre el tumor transplantado en el sistema modelo.

El ratón desnudo es uno de los descubrimientos más grandes en la investigación del cáncer, ya que entre otros, permite que los tumores humanos sean estudiados en otros animales. La mutación *nu* fue descrita por primera vez en 1966 en el laboratorio de virología del hospital Ruchill en Glasgow, Escocia. Sin embargo, no fue hasta 1968 en que se descubrió que el ratón desnudo homocigoto era atímico. Estudios posteriores, revelaron que el timo se mantenía rudimentario después del día 14, aparte de que mostraban

leucopenia (815 a 3380 leucocitos/ $\mu$ L) y linfopenia mantenida en el tiempo, y la atrofia de las células linfoides dependientes del timo en la paracorteza de los linfonodos y en las regiones periarteriolares del bazo (Rygaard y Povlsen, 1974).

En 1978 se concluyó que la condición de atímico, se debía a un defecto en el desarrollo del ectodermo, la que ocurría durante la formación de la vesícula cervical el día 11 de la vida embrionaria (Holub *et al*, 1978), esta condición está ligada a un gen autosómico recesivo asociado a los genes *rex* y *trembler* en el grupo VII de ligazón, correspondiente al cromosoma 11.

La mutación genera una falta de pelo, lo que le da el nombre de “desnudo” .En estos ratones ocurre una aplasia del timo y baja fertilidad, dado el escaso desarrollo de ovarios y el bajo conteo de ovocitos en la hembra. En el macho se evidencia alta proporción de espermatozoides inmóviles (Flanagan, 1966).

La presencia de gamaglobulinas y la ausencia de linfocitos T indican que las células troncales para la linfopoyesis están presentes en el ratón desnudo, pero que los precursores de las células T son específicamente deprimidos (Wortis *et al.*, 1971).

Macroscópicamente el timo muestra una estructura nodular y fina, tanto en ratones normales como heterocigotos (*nu/+*), con proporciones normales de la médula y corteza. En el ratón desnudo hay grasa, tejido conectivo y estructuras quísticas, las que son interpretadas como epitelio tímico rudimentario. La morfología del sistema inmune en los ratones atímicos fue estudiado por primera vez por de Sousa *et al.*, en 1969. Ellos observaron que los linfonodos de los heterocigotos y normales fueron encontrados normales en estructura y función, lo que no ocurría en los homocigotos (*nu/nu*), en donde se observó atrofia total de las células linfoides en la región paracortical, con la ausencia de desarrollo secundario de folículos linfoides. Las placas de Peyer mostraron una severa atrofia, así como el bazo del ratón desnudo, que demostró una falta de células linfoides en las áreas periarteriolares (Christenbury, 1977).

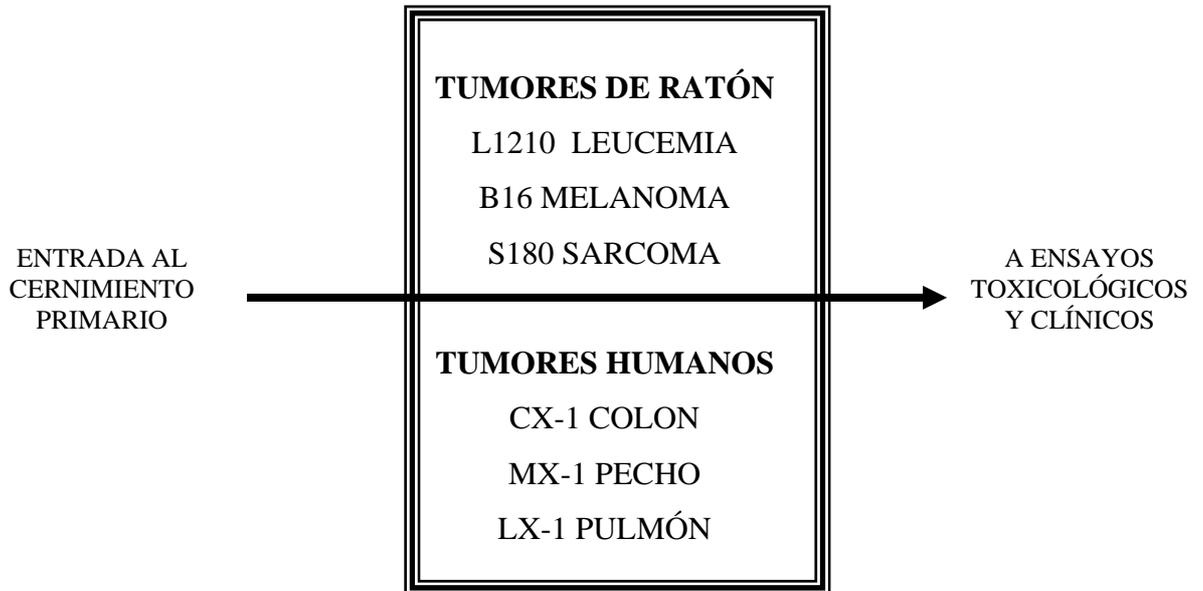
A pesar de la ausencia de células T, el ratón desnudo tiene un complemento normal de células B en médula ósea, así como niveles elevados de células NK (Taconic, 1996). En estudios de ratones normales y atímicos infectados con *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus*, se demostró que los macrófagos tenían una actividad incrementada y se concluyó que estas células se encontraban activadas antes de la infección. La ausencia de un sistema inmune completamente desarrollado parece ser compensado en parte por una mayor actividad macrofágica (Cheers y Waller, 1975).

El descubrimiento de que las neoplasias humanas pueden ser proliferadas en el ratón desnudo fue reconocido inmediatamente al instante como una herramienta en la investigación. En 1969 se publicó el primer informe preliminar, en el cual se detalla el éxito de proliferar un tumor humano maligno en un ratón desnudo (Rygaard y Povlsen, 1969). Desde entonces a la fecha, este modelo ha sido ampliamente utilizado para el estudio de los factores que influyen en el cáncer y en la metástasis. También es relevante su existencia en el estudio comparativo de la eficacia de distintos fármacos antineoplásicos, radioterapia, hormonoterapia e inmunoterapia en tumores humanos xenotransplantados, para poder llegar a tratamientos más certeros (Ferriols *et al.*, 1997; Vanhoefer *et al.*, 1997; Sabet *et al.*, 1999).

El trasplante puede llevarse a cabo tanto con trozos tumorales de 2 a 3 mm de diámetro, así como con células tumorales en suspensión. La mayoría de los investigadores transplantan los tumores subcutáneamente en el flanco, lo que permite su fácil observación y medición. También se pueden transplantar intraperitoneal, intramuscular, intravenosamente y bajo la cápsula del riñón (Bogden *et al.*, 1978).

El implante subcutáneo es el sitio predominante para la transplantación de tumores humanos en el ratón desnudo debido a su simplicidad y fácil acceso al tumor. De hecho, este provee el soporte principal para una prueba *in vivo* en el descubrimiento de fármacos y en programa de cernimiento del “*National Cancer Institute*” (NCI), E.U.A.

Los protocolos internacionales definidos por el “*Cancer Chemotherapy National Service Center*” pertenecientes al NCI describen un programa capaz de evaluar actividad antineoplásica de nuevos fármacos, como parte de las pruebas de cernimiento preclínicas de fase I. Esta fase describe el uso de ratones desnudos xenotransplantados con tumores de colon, de pecho y de pulmón (Figura 1.3).



**Figura 1.3** Protocolo *in vivo* definido para fase I preclínica. Tumores de ratón y humanos que deben ser evaluados como parte de las pruebas de cernimiento preclínicas de fase I, según el NCI.

## **Justificación**

Las Casiopeínas Illia<sup>®</sup> y Ilgli<sup>®</sup> han cubierto los requerimientos de actividad señalados por los protocolos internacionales mediante el empleo de líneas tumorales murinas y humanas *in vitro* así como en tumores murinos isotransplantados. Es por esta razón, que se decidió implementar la segunda fase de evaluación, que incluye líneas tumorales humanas xenotransplantadas al ratón desnudo, para así contribuir en el esclarecimiento de su actividad y mecanismos de acción.

## **Hipótesis**

Las Casiopeínas Ill-ia<sup>®</sup> y Ilgli<sup>®</sup> inducirán apoptosis *in vitro* en células neoplásicas de colon humano y así mismo, tendrán actividad antineoplásica en tumores de colon, cérvico uterino y de próstata humanos xenotransplantados al ratón nu/nu. No obstante, tendrán efectos colaterales indeseados en dosis terapéuticas.

## **Objetivo general**

Evaluar si las Casiopeínas Illia<sup>®</sup> y Ilgli<sup>®</sup> producen apoptosis *in vitro* en células de colon y a la vez, establecer su capacidad de alcanzar los requerimientos de actividad antitumoral (volumen tumoral, función antitumoral e inhibición del crecimiento) exigidos por los protocolos internacionales en tumores colon, cérvico uterino y próstata xenotransplantados al ratón desnudo y al mismo tiempo, evaluar su efecto histopatológico y hematológico.

## **Objetivos particulares**

1. Establecer la actividad y los mecanismos de acción *in vitro* de la Casiopeínas<sup>®</sup> Ill-ia y Ilgli sobre las células de carcinoma de colon HCT-15.

2. Establecer la actividad, los mecanismos de acción y efectos colaterales *in vivo* de las Casiopeínas<sup>®</sup> III-ia y IIgli en ratones xenotransplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon humano HCT-15.
  
3. Evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de las Casiopeínas<sup>®</sup> III-ia, IIgli y III-La contra las líneas tumorales humanas de próstata *PC-3* y cérvico uterino *HeLa* transplantadas al ratón desnudo.
  
4. Evaluar efectos colaterales a la aplicación de las Casiopeínas<sup>®</sup> III-ia, IIgli y III-La en los ratones xenotransplantados con *HeLa*, representados en pérdida de peso animal y en los valores de hemograma.

## **CAPÍTULO 2.** Actividad y mecanismos de acción *in vitro* de las Casiopeínas<sup>®</sup> III-ia y IIgli en células de carcinoma de colon HCT-15

### **2.1 Antecedentes.**

El cáncer colorectal es la causa más común de muerte por cáncer después de las neoplasias de pulmón y de mama. Ha habido pocos avances en la disminución de la tasa de muerte en los últimos 50 años, aunque se observan algunos avances en la sobrevivencia, los cuales han sido enmascarados por la mayor incidencia de la enfermedad. La sobrevivencia a 5 años rodea el 40% de los pacientes, esto debido a la detección tardía de la enfermedad. No obstante, en los pacientes con cáncer diseminado, la sobrevida es de 7 meses. En aquellos que son sometidos a cirugía aparentemente curativa del tumor primario, más de la mitad muere dentro de los siguientes 5 años y el 80% tendrá recurrencia dentro de 2 años. (McDonald *et al.*, 2004). La quimioterapia posoperativa aumenta el período de sobrevida en cáncer de colon en etapa III y se acepta como terapia estándar (Watanabe *et al.*, 2001).

La quimioterapia del cáncer tiene como objetivo principal activar la muerte selectiva de las células neoplásicas, sin dañar las células normales (Johnstone *et al.*, 2002). Dentro de los mecanismos envueltos en la muerte celular, apoptosis juega un papel central en la muerte inducida por drogas en las células tumorales (Kaufmann y Earnshaw, 2000; Kim *et al.*, 2003). Oxaliplatino y 5-fluorouracilo en combinación con otras drogas, han sido usados como tratamientos de elección para cáncer de colon avanzados, con tasas de respuesta en el 20 a 30% de los pacientes tratados (IMPACT investigators, 1995; Cvitkovic y Bekradda, 1999; Saunders y Iveson, 2006). En la búsqueda de nuevos agentes, el uso de drogas con un centro metálico como el cobre, fue concebido y propuesto por el grupo dirigido por la Dra. Lena Ruiz Azuara de la Facultad de Química de la UNAM, como compuestos antineoplásicos.

## **OBJETIVO**

Establecer la actividad y los mecanismos de acción *in vitro* de dos compuestos con centro de cobre(II), las Casiopeínas<sup>®</sup> III-ia y IIgli, sobre las células de carcinoma de colon HCT-15.

## 2.2 Material y métodos

### 2.2.1 Fármacos

#### 2.2.1.1 Casiopeína III-ia<sup>®</sup>

La Casiopeína<sup>®</sup> III-ia (Figura 2.2.1) fue disuelta en agua estéril a 1mg/mL<sup>-1</sup>, conservándose a 4° C y en la oscuridad durante 48 horas. Los demás reactivos fueron obtenidos de fuentes comerciales.

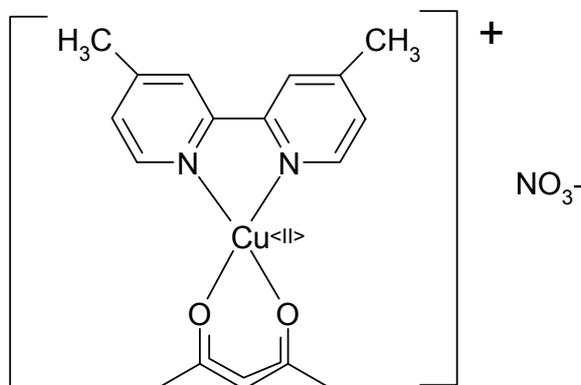


Figura 2.2.1 Casiopeína III-ia

- a) **Nombre común:** Casiopeína III-ia.
- b) **Clave:** Cas III-ia.
- c) **Fórmula:** [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub> · 2H<sub>2</sub>O
- d) **Fórmula condensada:** CuC<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>H<sub>19</sub> 2H<sub>2</sub>O
- e) **Peso molecular:** 444.93 g/mol (con dos moléculas de agua de cristalización).
- f) **Solubilidad:**
- Soluble en H<sub>2</sub>O, EtOH, MeOH.
  - No es estable por debajo de pH 6.
  - Estable en solución acuosa por 7 días.
  - Soluciones amortiguadoras recomendadas: MOPS y TRIS.
- g) **Análisis elemental:**
- |          |                         |
|----------|-------------------------|
| Teórico: | 9.4% N, 45.9% C, 5.2 %H |
|----------|-------------------------|

Experimental: 9.4 % N, 46.1 % C, 4.9 % H

### 2.2.1.2 Casiopeína Iigli®

La Casiopeína® Iigli (Figura 2.2.2) fue disuelta en agua estéril a  $1\text{mg/mL}^{-1}$ , conservándose a  $4^\circ\text{C}$  y en la oscuridad durante 48 horas.

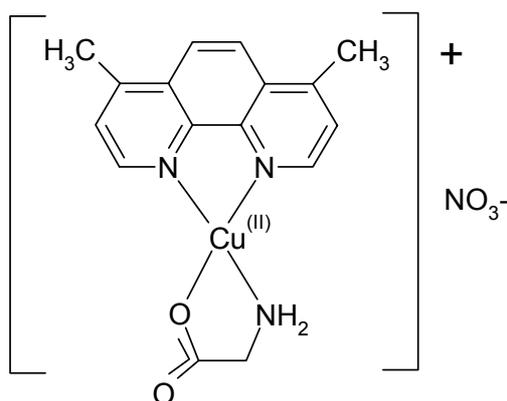


Figura 2.2.2 Casiopeína Iigli

**a) Nombre común:** Casiopeína Iigli.

**b) Clave:** Cas Iigli.

**c) Fórmula:**  $[\text{Cu}(\text{4,7-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$

**d) Fórmula condensada:**  $\text{CuC}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

**e) Peso Molecular:** 443.90 g/mol (con moléculas de agua de cristalización).

**f) Solubilidad:**

- Soluble en  $\text{H}_2\text{O}$ , EtOH, MeOH.
- No es estable por debajo de pH 6.
- Estable en solución acuosa por 7 días.
- Soluciones amortiguadoras recomendadas: MOPS y TRIS.

**g) Análisis elemental**

Teórico: 12.6 %N, 43.3 %C, 4.5%H

Experimental: 12.9 %N, 43.0 %C, 4.4 %H

## 2.2.2 Manejo de cultivo celular

La línea tumoral HCT-15 (adenocarcinoma colorectal) fue adquirida en *American Type Culture Collection* (ATCC) (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD). Las células se mantuvieron en el laboratorio de cultivos de tejidos de la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química de la UNAM.

Características de HCT-15 (ATCC):

- Organismo: *Homo sapiens* (humano)
- Género: macho
- Órgano de origen: colon
- Enfermedad: adenocarcinoma colorectal
- Clasificación: tipo C de Duke
- Morfología: epitelial
- Propiedades de crecimiento: adherente
- Propagación: RPMI 1640 con 0.2 mM de L-glutamina ajustado para contener 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 4.5 g/L de glucosa 10 mM de HEPES y 1 mM de piruvato de sodio; adicionado al 10% con suero fetal bovino.
- Temperatura: 37° C
- Atmósfera: 5% CO<sub>2</sub>
- Tumorigenicidad: 100% en ratón desnudo

## 2.2.3 Manejo de las células

### 2.2.3.1 Descongelamiento de las células

Originalmente habían alrededor de  $2 \times 10^6$  células congeladas en 1 mL de solución de DMSO : Suero fetal Bovino = 1 : 9. Las células se retiraron del tanque con nitrógeno líquido y se introdujeron al baño de 37° C. Mientras tanto, en la campana de flujo laminar se preparó un tubo con 8 mL de medio D-MEM

(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). En cuanto se observó el descongelamiento, se pasó la suspensión celular al tubo ya preparado y se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm. Luego, el sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo y se procede a la siembra en dos botellas de cultivo de 25 mL.

### **2.2.3.2 Obtención del cultivo *stock* a confluencia**

Las células se adicionaron con 5 mL de medio de cultivo *Eagle's modified medium* (Sigma Chemical Co.) suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (Sigma Chemical Co.) y una mezcla 1 X de penicilina y amfotericina, incubándose a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se revisaron diariamente para estimar el porcentaje de confluencia, cambiándose el medio de cultivo cada 48 h.

### **2.2.3.3 Tripsinización**

Una vez que se obtuvo el cultivo a confluencia se aspiró el medio de cultivo de la caja, se lavaron con PBS 1 X y se aplicó 1 mL de solución de Tripsina – EDTA 1 X (Gibco® Invitrogen, Carlsbad), incubándose a 37° C (5 – 10 minutos) hasta que al microscopio se observaron las células desprendidas de la superficie y disgregadas. Se detuvo la reacción adicionando 8 mL de medio D-MEM, se traspasaron a un tubo Falcon de 15 mL y se procedió a centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspende en 1 mL de medio de cultivo.

### **2.2.3.4 Cuantificación de las células**

En un tubo eppendorf se colocaron 20 µL de la suspensión de células y 80 µL de solución de azul tripano (Gibco® Invitrogen, Carlsbad), se mezcló perfectamente y se transfiere cuidadosamente a las dos secciones de un hemocitómetro. Utilizando el objetivo de 10 X, se procedió a contar el número de células teñidas y no teñidas por mm<sup>2</sup>. La cuenta se repitió en las otras 3

secciones y después se hicieron los cálculos correspondientes a la viabilidad y al número de células por mL de suspensión.

$$C = \bar{N} \times 5 \times 10^4$$

Donde:

C = Células por mililitro

$\bar{N}$  = Promedio de células contadas

$10^4$  = Factor de conversión de la cámara

5 = Dilución celular

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

Donde:

$Toc$  = Total de células contadas

$Teñ$  = Células teñidas

Una vez hecho lo anterior, se sembraron 400,000 células en cajas de 25 mL, 50,000 células en placas de 6 pozos o 20,000 células en cajas de 96 pozos (según correspondiera) y se procedió a la proliferación celular para los distintos experimentos.

## **2.2.4 Tratamientos *in vitro***

Cada vez que se obtuvieron las cajas o los pozos con 80 a 90% de confluencia, se procedió a aplicar los tratamientos, los cuales duraron 24 horas. Los tratamientos se realizaron en duplicado con concentraciones en incremento de las Casiopeínas. Las dosis utilizadas fueron 0, 2.5, 5.0, 10, 15, 20  $\mu\text{g/mL}$  para la Casiopeína III-ia y 0, 1.25, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$  para la Casiopeína IIgli.

### **2.2.4.1 Viabilidad celular**

Las células HCT-15 fueron sembradas en placas de 96 pozos, fueron tratadas con las concentraciones mencionadas durante 24 horas y procesadas

como fue descrito por Skehan *et al.*, (1990). Los cultivos se fijaron con ácido tricloroacético y fueron teñidos con Sulforrodamina B (Sigma Chemical Co) al 0.4 % (peso/volumen) disuelta en ácido acético al 1%. Las células no fijadas fueron removidas por 4 lavados con ácido acético al 1%. Luego, la proteína adherida y teñida se solubilizó con 10 mM de Tris base [tris (hidroximetil) aminometano]. Una vez solubilizada, se determinó la densidad óptica en un lector de placa (Labsystem Multiskan MS, Finlandia) con una longitud de onda de 564 nm.

#### **2.2.4.2 Western blot** (sólo Cas III-ia)

Las células tratadas en las concentraciones en incremento de Cas III-ia fueron cosechadas y lavadas en PBS frío una vez. Luego se centrifugaron a 2000 rpm y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de *Cell Lysis-M buffer* frío (Sigma Chemical Co.) más inhibidores de proteasas (10 mg/mL Leupeptin, 1.0  $\mu$ g/mL aprotinina y 0.1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma Chemical Co.) y luego fueron puestas en agitador clínico en cuarto refrigerado durante 30 minutos. Luego, se removió el sobrenadante y se obtuvieron 5  $\mu$ L de cada tubo (para cuantificación de proteínas) y se congeló hasta su uso. La cuantificación de proteínas se realizó con *BCA Protein assay kit* (Pierce Rockford, IL). Para esto, se depositaron los 5  $\mu$ L obtenidos de cada tubo y se diluyeron 1:4 con agua estéril en placa de 96 pozos. Luego, se agregaron 200  $\mu$ L de la solución de trabajo y se incubó la placa a 37 °C durante 30 minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia con longitudes de onda de 564 nm en lector de placas (Multiskan MS, Finlandia).

Las muestras conteniendo similar cantidad de proteínas (40  $\mu$ g) se mezclaron con volumen similar de solución amortiguadora de muestra (Tris-HCL 125 mM, pH 6.8, glicerol al 20%, SDS 4%, 0.02% de azul bromofenol y 2-mercaptoetanol al 10%) y se calentaron a 67 °C por 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 4 °C 5000 rpm durante 1 minuto y se expusieron a gel de electroforesis de poliacrilamida – SDS al 10%. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa por una hora a 100 V con TRIS – HCl 25 mM, pH 8.0, glicina 125 mM y metanol al 10%. Las membranas se bloquearon con leche *light* al 5% en

solución amortiguadora de fosfatos 1X, para luego aplicar el anticuerpo anti PCNA (DAKO), el cual se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Seguido de tres lavados consecutivos con PBS, se incubó con anticuerpo de oveja anti ratón (Santa Cruz Biotechnologies) durante 1 hora a temperatura ambiente, continuando con tres lavados con PBS. La quimioluminiscencia fue observada con el sistema de quimioluminiscencia aumentada (ECL) (Santa Cruz Biotechnologies). Posteriormente se expuso a película Kodak XAR-5-ray (Sigma Chemical Co.) durante aproximadamente 1 minuto, y después fue revelado. Se aplicó un procedimiento similar con BAX, y  $\beta$ -Actina (Santa Cruz Biotechnologies). Las intensidades de las bandas resultantes fueron evaluadas con el software *ImageQuant* versión 3.2.2.

#### **2.2.4.3 Ciclo celular (Sólo Cas III-ia).**

Seguido el tratamiento de las células con las dosis mencionadas, durante 24 horas, éstas fueron cosechadas y centrifugadas dos veces (1200 rpm / 5 min) en PBS frío y resuspendidas en los reactivos de CycleTest Plus DNA (Becton y Dickinson, San Jose, CA), siguiendo la metodología del kit. Se añadieron 250  $\mu$ L del reactivo A (solución amortiguadora de tripsina) a cada tubo, se homogeneizaron suavemente y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, sin eliminar el reactivo A, se añadieron 200  $\mu$ L del reactivo B (Inhibidor de tripsina y RNAasa en solución amortiguadora) y se homogeneizaron e incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 200  $\mu$ L del reactivo C (solución de tinción de Yoduro de Propidio) y se incubaron en refrigeración durante 10 minutos. Las muestras fueron analizadas inmediatamente en un FACSCalibur flow cytometer (Beckton Dickinson, San José, CA) y analizadas en el software CellFit.

#### **2.2.4.4 Alteraciones morfológicas**

Para este fin, las células tratadas con los distintos esquemas fueron desprendidas de forma mecánica, lavadas dos veces en PBS y separadas en dos grupos. Con uno de ellos, se hizo extendido en portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente, para luego ser teñidas con Diff Quick (Hycel de

México, México DF). Para ésto, los portaobjetos desecados fueron sumergidos en el reactivo A (fijador) por un minuto, luego en reactivo B (hemocolorante 1) por 20 pases por inmersión y finalmente en el reactivo C (hemocolorante 2) por 20 pases por inmersión. Se sumergieron en agua para eliminar sobrantes de los colorantes, para luego ser montadas y observadas con microscopía de luz. Se observaron 100 células por tratamiento, describiéndose las alteraciones morfológicas más frecuentes.

El otro grupo de células fue fijado en glutaraldehído 2.5% amortiguado en cacodilato de sodio 0.2 M (pH= 7.4) por toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las células fueron sometidas a 5 lavados en solución amortiguadora de cacodilatos y centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos en cada ciclo. Luego, las células fueron pos fijadas en tetraóxido de osmio 1% por 1 hora y sometidas a 5 lavados en solución amortiguadora de cacodiltados a 1500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, las muestras se deshidrataron con distintas diluciones de alcohol etílico (50, 70, 80, 90, 96, 100, 100, 100%) durante 7 minutos en cada una y centrifugadas a 1500 rpm por 2 minutos entre un alcohol y el siguiente. A continuación, las células se infiltraron con óxido de propileno y resina en una proporción 2:1 durante 72 horas. Trascorrido el tiempo, se hicieron 2 cambios de resina de 1 hora a 60 °C cada una, para finalmente incluirse en cápsulas de agar embebidas en resina por 24 horas. Para las etapas de preinclusión e inclusión se emplearon resinas epóxicas (Epon 812). De esta inclusión, se obtuvieron secciones semifinas de 0.2 µm, las que se tiñeron con azul de toluidina y se observaron bajo microscopio óptico. Subsecuentemente, cortes ultra finos de 70-80 µm fueron montados en rejillas de cobre y teñidas con acetato de uranilo y contrateñidas con citrato de plomo antes de examinarlas bajo un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900 (Stuttgart, Alemania) a un voltaje de 50 kv. Se observaron más de 50 células por tratamiento, describiéndose y clasificándose las células en distintos niveles de alteración, que se describen a continuación.

- 1 Sin alteraciones.** La célula HCT-15 es de origen epitelial de colon humano. Ultraestructuralmente se caracteriza por presentar algunos remanentes de aparato ciliar, lo que se refleja en pequeñas

prolongaciones polares, las cuales no son observables en todas las células. Los organelos más evidente son las mitocondrias, las cuales tienen un tamaño de alrededor de 2  $\mu\text{m}$ , son alargadas, fusiformes y se distingue claramente la membrana externa, interna y las crestas mitocondriales. El aparato de golgi es poco evidente, así como el retículo endoplásmico. Los núcleos presentan variadas formas, siendo frecuente observarles escotados. La cromatina es laxa y frecuentemente se observan 2 nucléolos muy evidentes.

- 2 Alteraciones ligeras.** En este nivel, las células exhiben mitocondrias tumefactas sin pérdida de crestas, ni de su estructura mitocondrial.
- 3 Apoptosis temprana:** Lo observado en alteraciones ligeras más la formación de pequeñas vesículas (“*blebs*”) de membrana, así como la presencia de cromatina compacta adherida en la membrana nuclear formando un patrón de “crescent” o medialuna. Aunado a lo anterior, son evidentes ligeros agregados electrodensos rosetoides en el citoplasma.
- 4 Apoptosis tardía:** En apoptosis tardía, se observan agregados electrodensos redondos que corresponden a cromatina compacta, los cuales están o no cubiertos por una doble membrana, aunado a ligera aparición de espacios electrodensos, compatibles con degeneración hidrópica. Sin embargo, la membrana citoplásmica se mantiene íntegra y los cambios en organelos son mínimos.
- 5 Degeneración hidrópica.** Lo observado en **2** junto con que la célula muestra algunos espacios electrolúcidos (degeneración hidrópica) con la aparición de algunos acúmulos electrodensos rosetoides (ribosomas) entre medio de los organelos, la presencia de vacuolas moderadamente electrodensas y rodeadas por una membrana unilaminar, las que corresponden a lípidos. Pueden observarse en la superficie celular pequeñas vesículas (“*blebs*”)

- 6 Daño mitocondrial.** Lo observado en degeneración hidrópica más daño mitocondrial severo, se traduce en moderada a marcada tumefacción mitocondrial con pérdida de crestas mitocondriales y ligeros depósitos de material granular electrodense en el interior de los mismos, así como en el núcleo. Cabe destacar que la tumefacción celular es moderada, observándose algunas células redondeadas y la mantención de la membrana plasmática.
- 7 Oncosis.** Alteración previa a la muerte acompañada con aumento de volumen celular y/o de organelos. En este nivel, se clasifican las células que presentan las alteraciones observadas en 6 más un marcado aumento de volumen y presencia de material electrodense granular tanto en mitocondrias como en núcleos, aunado a nucléolo sin alteraciones y mantención de membrana plasmática.
- 8 Necrosis.** Se define necrosis como las características morfológicas de las células que están muertas y que han alcanzado equilibrio con el ambiente. Caerán dentro de esta clasificación las células que exhiban pérdida de continuidad de membrana plasmática, mitocondrias tumefactas y pérdida de crestas mitocondriales, marcada degeneración hidrópica, cromatina dispersa, nucléolo degenerado con lisis nucleolar y pérdida de matriz fibrilar mas un depósito puntiforme electrodense en mitocondrias y núcleo.

#### **2.2.4.5 Apoptosis**

Se determinó apoptosis con anexina V por citometría de flujo como fue previamente descrito (Vermes *et al.*, 1995). El método se basa en la unión de anexina V a fosfatidilserina que se transloca tempranamente desde membrana interna a la externa en células que cursan con apoptosis. Seguido el

tratamiento de las células con las dosis ya mencionadas durante 24 horas, éstas fueron cosechadas y centrifugadas dos veces (200 g/5 min) en PBS frío y resuspendidas en 100  $\mu$ L de solución amortiguadora de incubación (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, NaCl 140 mM, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Tras este último lavado, las suspensiones celulares (100  $\mu$ L) fueron pasadas a nuevos tubos con 5  $\mu$ L de annexin-V-Fluos y 10  $\mu$ L de solución stock de yoduro de propidio (50  $\mu$ g/mL). Después de 20 minutos de incubación se agregó 400  $\mu$ L de solución amortiguadora HEPES y las muestras fueron analizadas inmediatamente en un citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson, San Jose, CA) usando excitación de 488 nm, filtro *Bandpass* 515 nm para detección de fluoresceína y un filtro de > 560 nm para detección del yoduro de propidio.

La apoptosis se comprobó mediante un segundo método, en el cual se aisló DNA fragmentado y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% (peso/volumen) y teñido con bromuro de etidio, como fue descrito en el método de extracción de ADN *Quantum PrepR AquaPure Genomic DNA kit* (Bio-Rad).

### 2.2.5 Análisis estadístico

Todos los estudios *in vitro* fueron realizados en triplicado. Los datos obtenidos desde los experimentos *in vitro* fueron analizados con la prueba de Kruskal Wallis para análisis de rangos con el programa *Analyst®* de SAS® 8.0 *for Windows*. La significancia utilizada en todos los estudios fue de 0.05.

Para los datos balanceados y analizados con Kruskal Wallis, una vez demostrada una diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ), se procedió al cálculo del intervalo de confianza. Para esto, se utilizó el cálculo de  $\hat{\phi}$  utilizando un contraste ortogonal (-1 1), el cual se realizó de la siguiente manera:

$$\hat{\phi} = \bar{R}_1 - \bar{R}_2$$

en donde:

$\bar{R}_1$  = media de rangos del grupo 1 a comparar.

$\bar{R}_2$  = media de rangos del grupo 2 a comparar

La varianza de  $\hat{\phi}$  se calculó de la siguiente manera:

$$Var(\hat{\phi}) = \frac{N(N+1)}{12} \sum_{k=1}^K \frac{a_k^2}{n}$$

En donde  $a$  = contraste correspondiente (-1 o 1) y  $N$  = tamaño de la población en estudio.

Con estos datos, ya es posible el cálculo del intervalo confianza, como sigue:

$$\hat{\phi} \pm \sqrt{\chi_{K-1}^2, 0,95} \sqrt{Var\hat{\phi}}$$

Para asegurar que dos grupos son estadísticamente diferentes entre sí, el intervalo de confianza no debe involucrar el cero (0). Si lo involucra, quiere decir que no hay diferencia significativa entre los grupos ( $P > 0,05$ ).

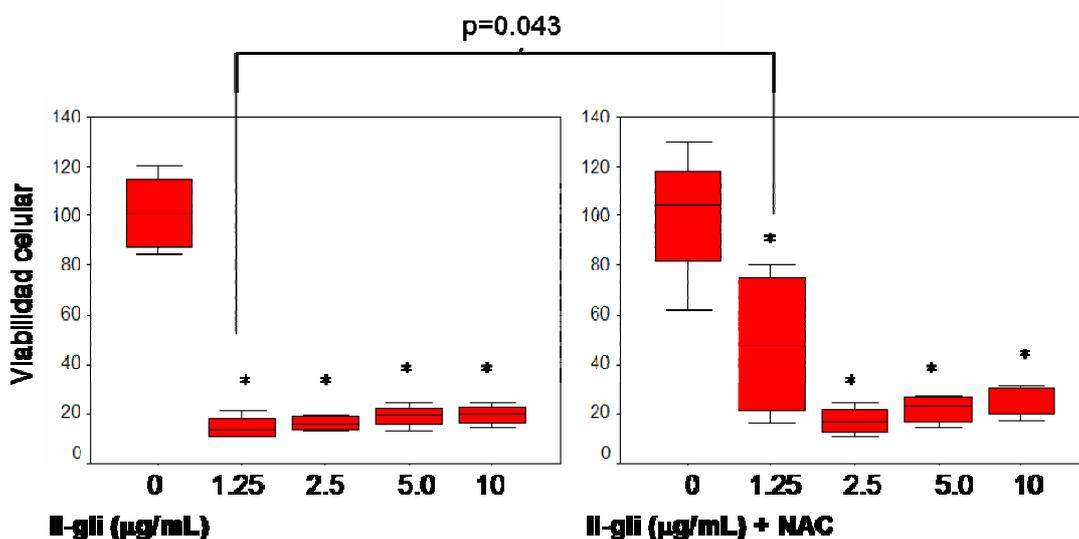
## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Resultados para Casiopeína Igli *in vitro* sobre HCT-15

#### 2.3.1.1 Viabilidad

Con las dosis utilizadas, la Cas Igli demostró alterar estadísticamente la viabilidad a partir de la primera dosis ( $p=0.008$ ), comportamiento que se repitió con todas las otras dosis con respecto al testigo (Figura 2.3.1). Aunado a lo anterior, al aumentar la concentración de Cas Igli, no se observan diferencias entre los tratamientos ( $p>0.05$ ) con el cálculo de intervalos de confianza (Anexo 1). Estos datos se resumen en el cuadro 2.3.1.

No obstante, al incubar las células dos horas antes de la aplicación del fármaco con 10 mM de N-acetil cisteína (NAC), éste demostró proteger a las células de la muerte hasta en un 50% en la dosis de 1.25 µg/mL. Sin embargo, no ejerció efecto alguno sobre las otras concentraciones (Figura 5; Anexo 2). Aunado a lo anterior, existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.043$ ) entre la dosis de 1.25 µg/mL sin y con NAC (Figura 5). Con estos datos se puede concluir que en dosis bajas, Cas Ilgli induce parcialmente muerte a través de la generación de especies reactivas de oxígeno.



**Figura 2.3.1 Viabilidad *in vitro* de HCT-15 con Cas Ilgli.** Caja de valores extremos que representa la viabilidad de HCT-15 con y sin tratamiento previo con N-Acetil cisteína después de 24 horas de exposición a Cas Ilgli en las distintas dosis. (\* $p<0.05$ )

**Cuadro 2.3.1 Estadística de la viabilidad de HCT-15 con Cas Ilgli *in vitro*.** Literales provenientes del cálculo de intervalo de confianza (95%) de las células HCT-15 tratadas *in vitro* en concentraciones ascendentes de la Cas Ilgli.

Cas Ilgli (µg/mL)	literal
0	a
1.25	b
2.5	b
5	b
10	b

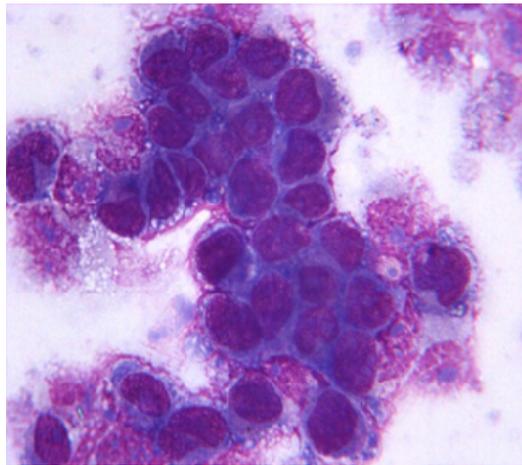
### 2.3.1.2 Cambios morfológicos

#### 2.3.1.2.1 Cambios citológicos

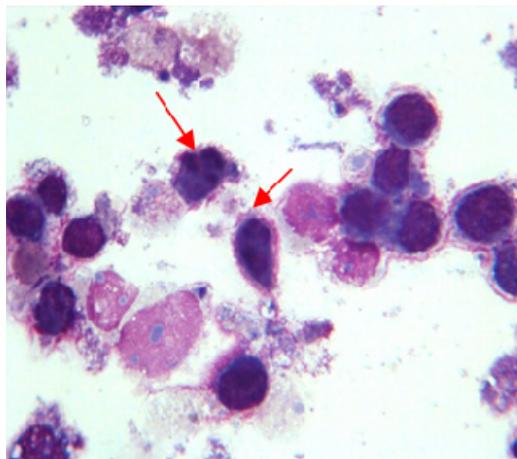
Una de las características de los fármacos antineoplásicos es la inducción de apoptosis. Este tipo de muerte se caracteriza por agregados cromatínicos en la membrana nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos, mientras que la observación de organelos hinchados y ruptura de membrana celular es característico de necrosis (Ziegler and Groscurth, 2004). Al realizarse los estudios citológicos en células HCT-15 tratadas con Sas Ilgli, se describieron las alteraciones morfológicas más frecuentemente observadas, las que se resumen de la siguiente forma:

- A) Sin alteraciones:** Las células eran redondas a ovals con bordes distintos. Los núcleos eran redondos a ovals y de tamaño no uniforme, muchos con una pequeña escotadura y 1 a 3 nucléolos evidentes, de afinidad basofílica. El citoplasma era basofílico en moderada a escasa cantidad (Figura 2.3.2).
  
- B) Compatible con apoptosis:** Las células se observan contraídas, redondeadas, ligeramente basofílicas y la cromatina forma pequeños acúmulos basofílicos (Figura 2.3.3), no distinguiéndose entre núcleo y citoplasma.

- C) Compatible con necrosis:** Las células se apreciaron hinchadas con citoplasma ligeramente eosinofílico y en algunas ocasiones, es posible observar ruptura de la membrana citoplasmática. Los núcleos se observaron distendidos, eosinofílicos con algunos gránulos ligeramente basofílicos.



**Figura 2.3.2 Células HCT-15 sin tratamiento.** Tinción de Diff Quick (100 X).

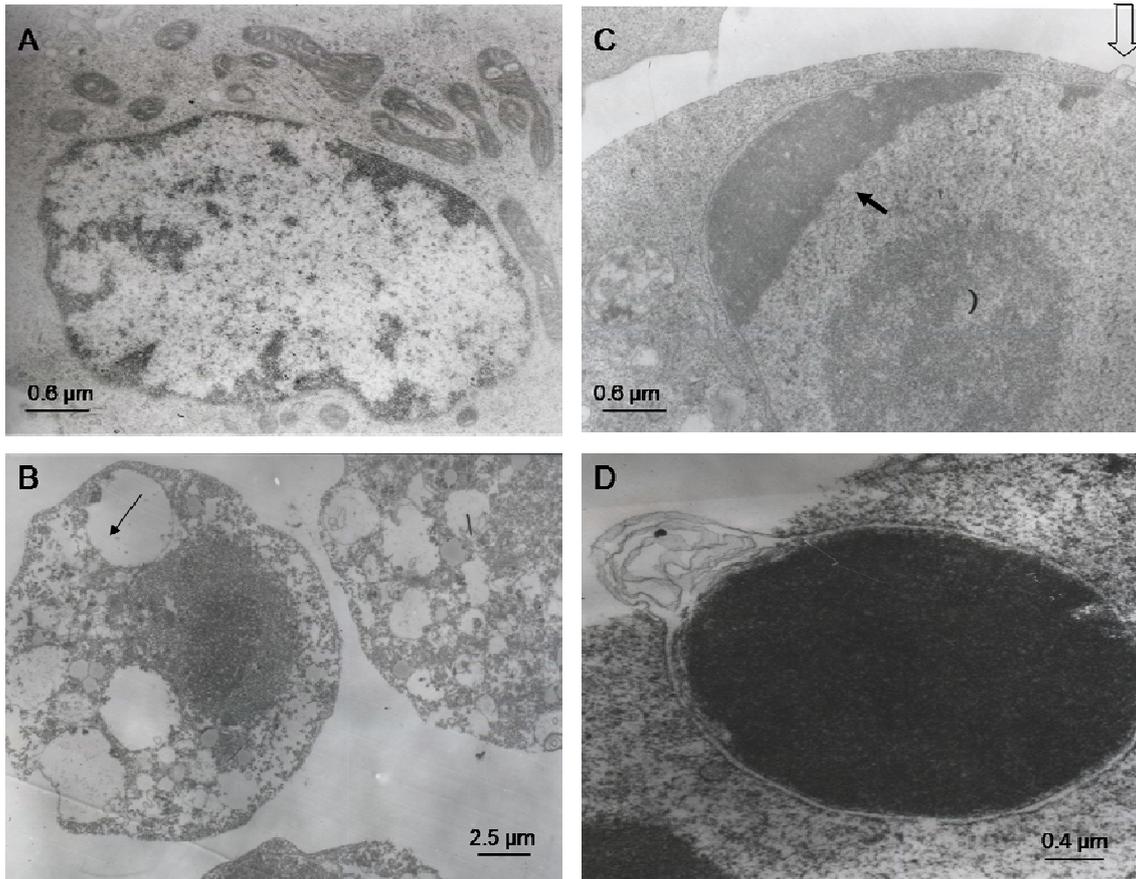


**Figura 2.3.3 Células HCT-15 tratadas con Cas IIgli.** Células HCT-15 después de 24 horas con 5 µg/mL de Cas IIgli. Tinción de Diff Quick (100 X). Las flechas rojas muestran células compatibles con apoptosis.



### 2.3.1.2.2 Alteraciones ultraestructurales

Una de las características de los fármacos antineoplásicos es la inducción de apoptosis. Este tipo de muerte se caracteriza por agregados cromatínicos en la membrana nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos, mientras que la observación de organelos hinchados y ruptura de membrana celular es característico de necrosis (Ziegler and Groscurth, 2004). Para investigar si la disminución en la viabilidad celular era debida a apoptosis, oncosis o ambos mecanismos, se realizó análisis ultraestructural en búsqueda de alteraciones asociadas a estos tipos de muerte. Las células no tratadas eran redondas, con citoplasma moderado y el núcleo mostraba anisocariosis y cromatina laxa. (Figura 2.3.4A). A partir de la primera dosis utilizada, se aprecian algunas células tumefactas con citoplasma vacuolado y mitocondrias tumefactas con pérdida de estructura de las crestas mitocondriales, más pérdida de la morfología celular y de la membrana plasmática, lo que es compatible con oncosis (Figura 2.3.4B). En otras células, se observaron “*blebs*” en la membrana citoplasmática y algunos núcleos muestran cromatina adosada a la membrana nuclear interna formando una alteración conocida como media luna nuclear (Figura 2.3.4C). Además se observaron cuerpos electrodensos (compatibles con ADN) rodeados por una doble membrana (Figura 2.3.4D), cambios característicos de apoptosis. Las alteraciones mencionadas se hacen más frecuentes a medida que aumenta la dosis de tratamiento (Cuadro 2.3.2). Con estos datos se encuentra que tanto apoptosis como oncosis son mecanismos involucrados en la muerte inducida por Cas IIgli.



**Figura 2.3.4 Alteraciones ultraestructurales *in vitro* observadas en HCT-15 tras el tratamiento con Cas IglI.** A) Células HCT-15 sin tratamiento. B) Células con alteraciones compatibles con oncosis. La flecha muestra vacuola electrolúcida en citoplasma. C) Células con alteraciones compatibles con apoptosis. La flecha rellena muestra condensación de la cromatina con “forma de media luna” en la cara interna de la membrana nuclear. La flecha abierta exhibe *bleb* de membrana. D) Cuerpo electrodenso, compatible con cuerpo apoptótico, rodeado por una doble membrana.

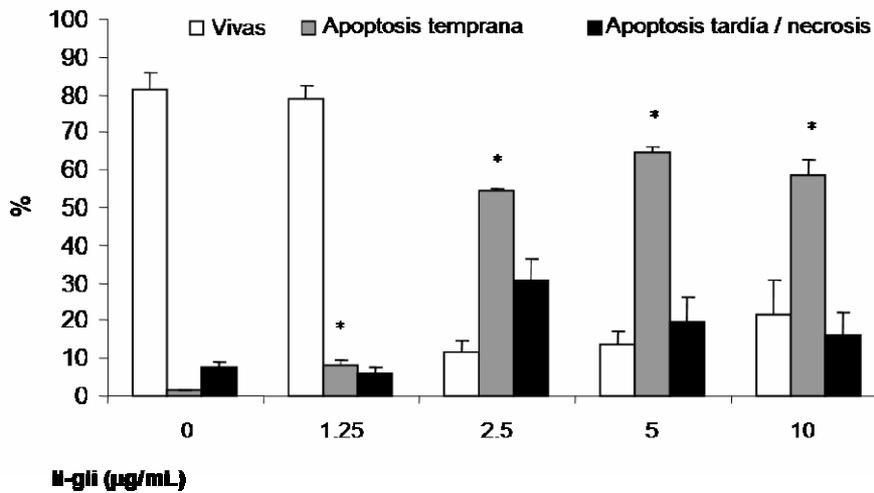
**Cuadro 2.3.2 Frecuencia de alteraciones ultraestructurales observadas *in vitro* en alrededor de 50 células por tratamiento por 24 horas con Cas IIgli.**

<b>Grado de alteración</b>	<b>Tratamiento</b>				
	<b>0 µg/mL</b>	<b>1.25 µg/mL</b>	<b>2.5 µg/mL</b>	<b>5 µg/mL</b>	<b>10 µg/mL</b>
<b>Sin alteraciones</b>	39	17	12	1	0
<b>Alteraciones ligeras</b>	10	18	12	2	1
<b>Apoptosis temprana</b>	0	6	6	2	0
<b>Apoptosis tardía</b>	0	1	1	3	2
<b>Degeneración hidrópica</b>	0	3	5	1	2
<b>Oncosis</b>	3	1	10	8	12
<b>Necrosis</b>	2	5	9	39	33
<b>Total</b>	<b>54</b>	<b>51</b>	<b>55</b>	<b>56</b>	<b>50</b>

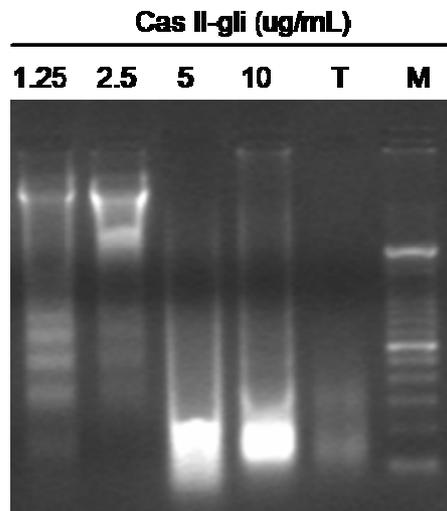
### **2.3.1.3 Inducción de apoptosis**

Una de las características del mecanismo de apoptosis es la exposición en la superficie celular de fosfatidilserina, fosfolípido que sólo puede ser encontrado en la cara interna de la membrana celular intacta y que es expuesta en la cara externa donde puede ser detectado por la unión selectiva de anexina V. El tratamiento con Cas IIgIi resultó en inducción de apoptosis a partir de la primera dosis utilizada (8,3%) de una forma estadísticamente significativa con respecto al testigo (1.4%), alteración que se hizo más evidente con el aumento de la dosis (Figura 2.3.5).

Además, fue posible observar un patrón en escalera de fraccionamiento de ADN, el que indirectamente evidencia la actividad de caspasas, con las dosis de 1.25 y 2.5 µg/mL (Figura 2.3.6). Con las dosis de 5 y 10 µg/mL se observó un barrido de ADN, hallazgo compatible con degradación de ADN. Con estos se encuentra que Cas IIgIi induce apoptosis a partir de la dosis de 1.25 µg/mL y que la inducción de apoptosis con 1.25 y 2.5 µg/mL de Cas IIgIi está relacionada a la activación de caspasas.



**Figura 2.3.5 Muerte celular determinada *in vitro* por citometría de flujo de HCT-15 tratadas con Cas IIgli.** El gráfico muestra células HCT-15 vivas, en apoptosis temprana o en apoptosis tardía/necrosis después de 24 horas de tratamiento con Cas IIgli, medidas por citometría de flujo. Los datos están representados como porcentaje, graficándose la media  $\pm$  error estándar de 10,000 células por tratamiento. (\* $p < 0.05$ )

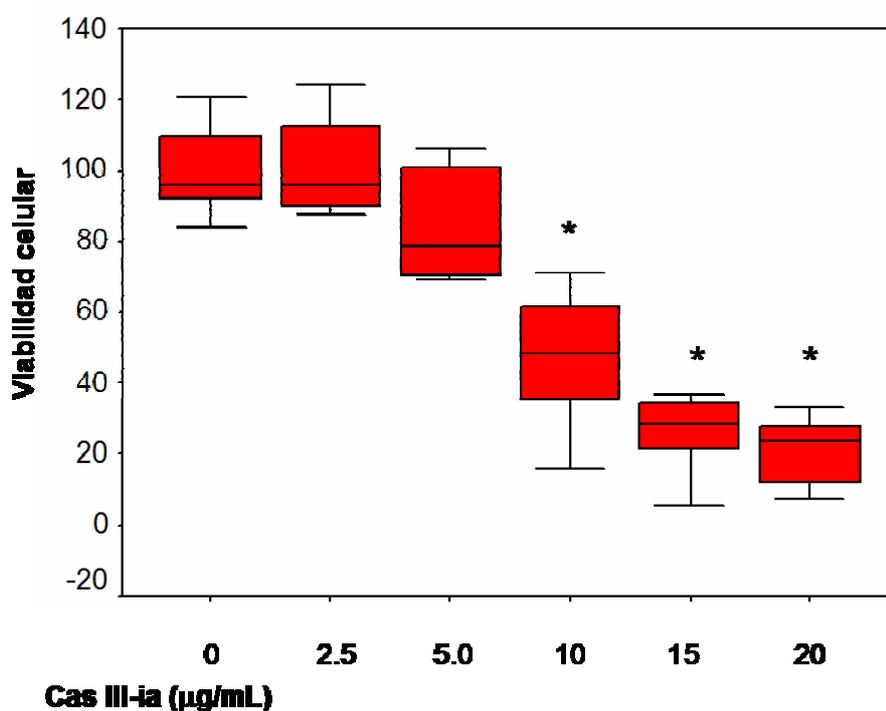


**Figura 2.3.6 Electroforesis en gel de agarosa (2%) de ADN de HCT-15 expuesta *in vitro* a Cas IIgli.** Corrimiento de ADN obtenido desde células expuestas con distintas concentraciones de Cas IIgli durante 24 horas.

### 2.3.2 Resultados para Casiopeína III-ia *in vitro*

#### 2.3.2.1 Viabilidad

Para caracterizar los efectos de este fármaco en la viabilidad, las células fueron tratadas con concentraciones de 0, 2.5, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por un período de 24 horas. Cas III-ia disminuyó la viabilidad de manera proporcional a la dosis, siendo esta disminución estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ). Al realizar la determinación de los intervalos de confianza (Anexo 3), Cas III-ia no mostró diferencias entre los grupos tratados con 0, 2.5 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, a partir de la dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la viabilidad se hace estadísticamente menor, con respecto a los grupos antes mencionados. Asimismo, la viabilidad con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  es diferente a aquella con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pero no con la dosis de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 2.3.7; cuadro 2.3.4). Aunado a lo anterior, la aplicación de 10 mM de N-acetil cisteína (atrapador de especies reactivas de oxígeno) 2 horas previas al tratamiento con las distintas concentraciones de Cas III-ia no demostró alterar la viabilidad, descartándose así que en este modelo, la muerte sea inducida a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (datos no presentados).



**Figura 2.3.7 Viabilidad de HCT-15 expuesta *in vitro* a Cas III-ia.** Cajas de valores extremos que representan la viabilidad de HCT-15 después de 24 horas de exposición a Cas III-ia en las distintas dosis. (\* $p < 0.05$ )

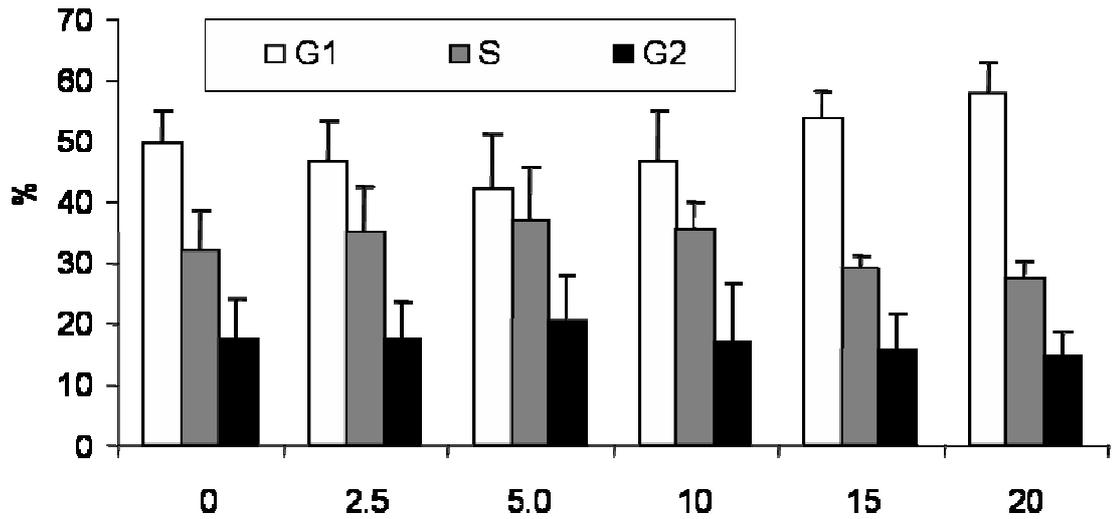
**Cuadro 2.3.3 Estadística de la viabilidad de HCT-15 tratadas con Cas III-ia *in vitro*.** Literales provenientes del cálculo de intervalo de confianza (95%) de la viabilidad determinada por sulforrodamina de las células HCT-15 tratadas *in vitro* en concentraciones ascendentes de la Cas III-ia.

<b>Cas III-ia (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>literal</b>
0	a
2.5	a
5	a
10	b
15	bc
20	c

### **2.3.2.2 Ciclo celular**

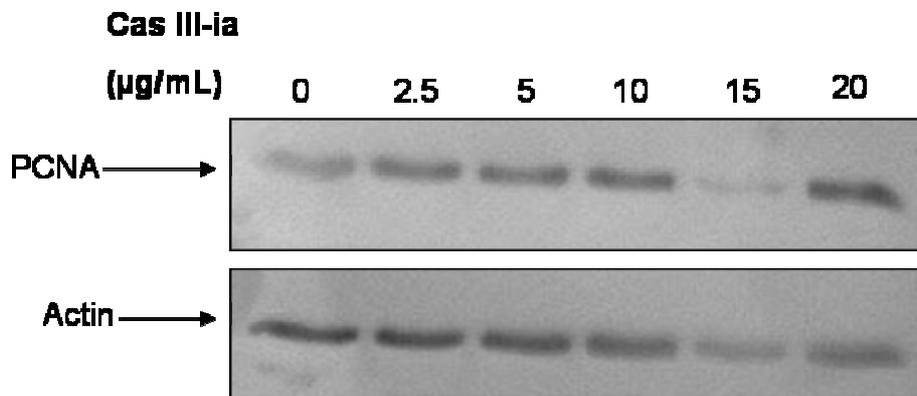
La aplicación de Cas III-ia demostró no alterar las distintas etapas del ciclo celular en las dosis administradas (Figura 2.3.8). Con respecto a G1, con las dosis de 2.5 y 5.0  $\mu\text{g/mL}$ , esta fase tendió a descender. Sin embargo, con las dosis 15 y 20, se alcanzó alrededor de 60% de las células en esta fase. La fase de síntesis se mantiene casi invariable, demostrando sólo una pequeña alza con las dosis de 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ . La fase de G2 – M se mantuvo sin alteraciones.

Además, se extrajo proteína total desde las células HCT-15 con 24 horas de los distintos tratamientos. Al medir los niveles de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), éste no demostró alterar su expresión con las dosis utilizadas (Figura 2.3.9).



**Cas III-ia (µg/mL)**

**Figura 2.3.8 Detección de ciclo celular de HCT-15 expuesta *in vitro* a Cas III-ia.** Fase del ciclo celular en células HCT-15 medidas por citometría de flujo (yoduro de propidio) después de 24 horas de tratamiento con las dosis de 0, 2.5, 5, 10, 15 y 20 µg/mL. Los datos están representados como media ± error estándar de 20,000 células por tratamiento.



**Figura 2.3.9 Niveles de PCNA en células HCT-15 tratadas *in vitro* con Cas III-ia.** Las proteínas totales fueron obtenidas desde los distintos tratamientos con Cas III-ia durante 24 horas y analizadas por western blot.

### 2.3.2.3 Cambios morfológicos

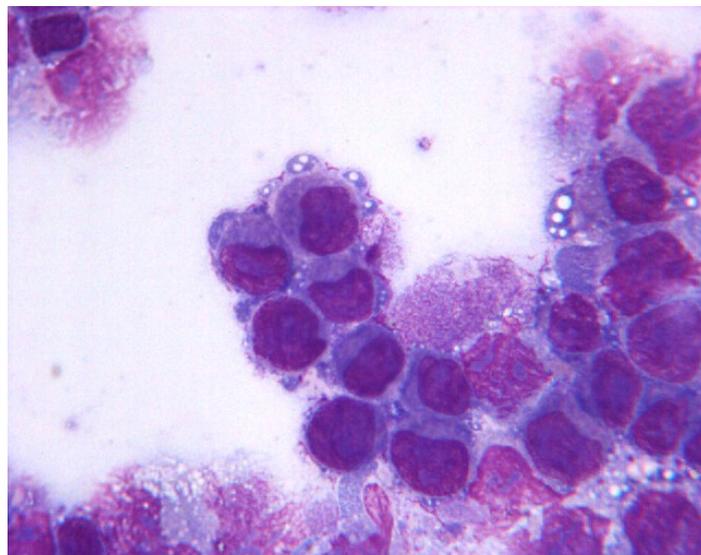
#### 2.3.2.3.1 Cambios citológicos

Al realizarse las evaluaciones citológicas, se describieron las alteraciones morfológicas, las que se resumen a continuación:

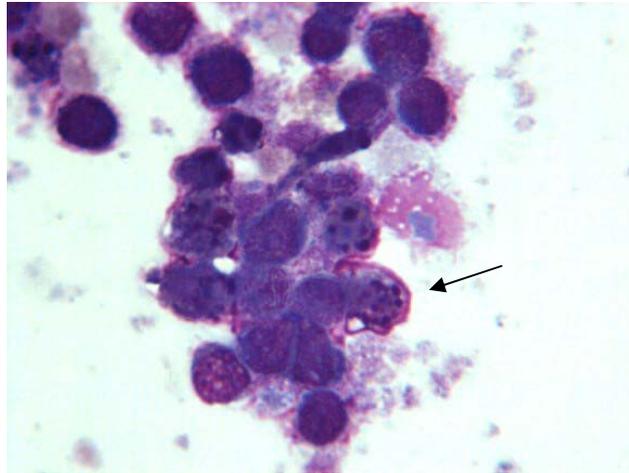
**A) Sin alteraciones:** Las células eran redondas a ovales con bordes distintos. Los núcleos eran redondos a ovales y de tamaño no uniforme, muchos con una pequeña escotadura y 1 a 3 nucléolos evidentes, de afinidad basofílica. El citoplasma era basofílico en escasa a moderada cantidad (Figura 2.3.10).

**B) Compatible con apoptosis:** Las células se observan contraídas, redondeadas, ligeramente basofílicas y la cromatina forma pequeños acúmulos basofílicos, no distinguiéndose entre núcleo y citoplasma (Figura 2.3.11).

**C) Compatible con necrosis:** Las células se apreciaron tumefactas con citoplasma ligeramente eosinofílico y en algunas ocasiones, es posible observar ruptura de la membrana citoplasmática. Los núcleos se observaron distendidos, eosinofílicos con algunos gránulos ligeramente basofílicos.



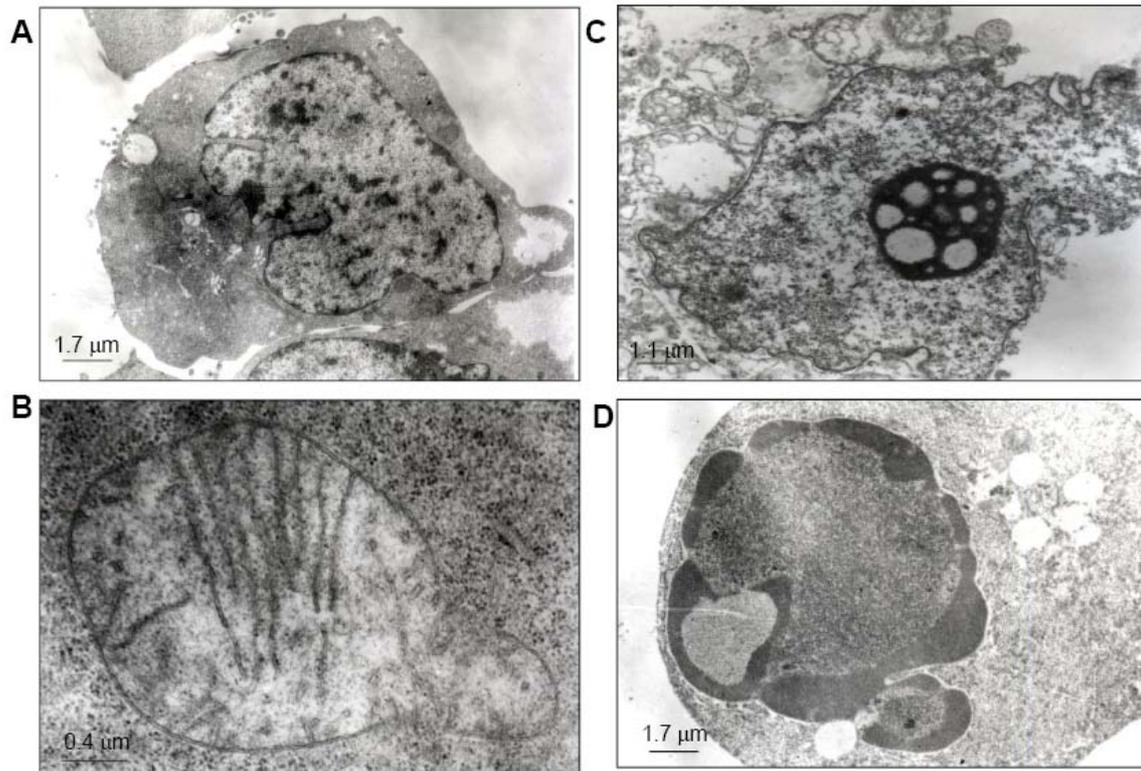
**Figura 2.3.10 Células HCT-15. Tinción de Diff Quick (100 X).**



**Figura 2.3.11 Células HCT-15 *in vitro* después de 24 horas con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Cas III-ia. Tinción de Diff Quick (100 X). La flecha indica acúmulos cromatínicos, alteración compatible con apoptosis.**

### **2.3.2.3.2 Alteraciones ultraestructurales**

Para investigar si la inducción de muerte por la Cas III-ia era resultado de apoptosis, se llevó a cabo un estudio ultraestructural con microcopía electrónica de transmisión. Las células HCT-15 no tratadas eran redondas, con citoplasma moderado y el núcleo mostraba anisocariosis y cromatina laxa. (Figura 2.3.12A). Con las dosis menores (2.5 y 5.0  $\mu\text{g/mL}$ ), las células HCT-15 revelaban tumefacción mitocondrial, incluso con pérdida de estructura de las crestas mitocondriales (Figura 2.3.12B) y citoplasma vacuolado. A partir de la dosis de 5.0  $\mu\text{g/mL}$ , es posible identificar mecanismos compatibles con dos tipos de muerte. Algunas células mostraban degeneración hidrópica severa con organelos tumefactos y ruptura de la membrana plasmática, alteraciones compatibles con oncosis (Figura 2.3.12C). En otras células, el núcleo exhibió la cromatina adherida a la cara interna de la membrana nuclear formando media lunas, sin cambios citoplasmáticos graves, alteraciones compatibles con apoptosis (Figura 2.3.12D). Estas alteraciones eran más evidentes a medida que aumentaba la concentración de Cas III-ia (Cuadro 2.3.4). Es importante recalcar que las alteraciones mitocondriales observadas en la dosis más bajas (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) cursaban con membrana celular y citoplasma intacto, sin evidenciar condensación de la cromatina. Estos datos sugieren que apoptosis y oncosis son mecanismos relacionados con la inducción de muerte por Cas III-ia, estando estos mecanismos relacionados con la mitocondria.



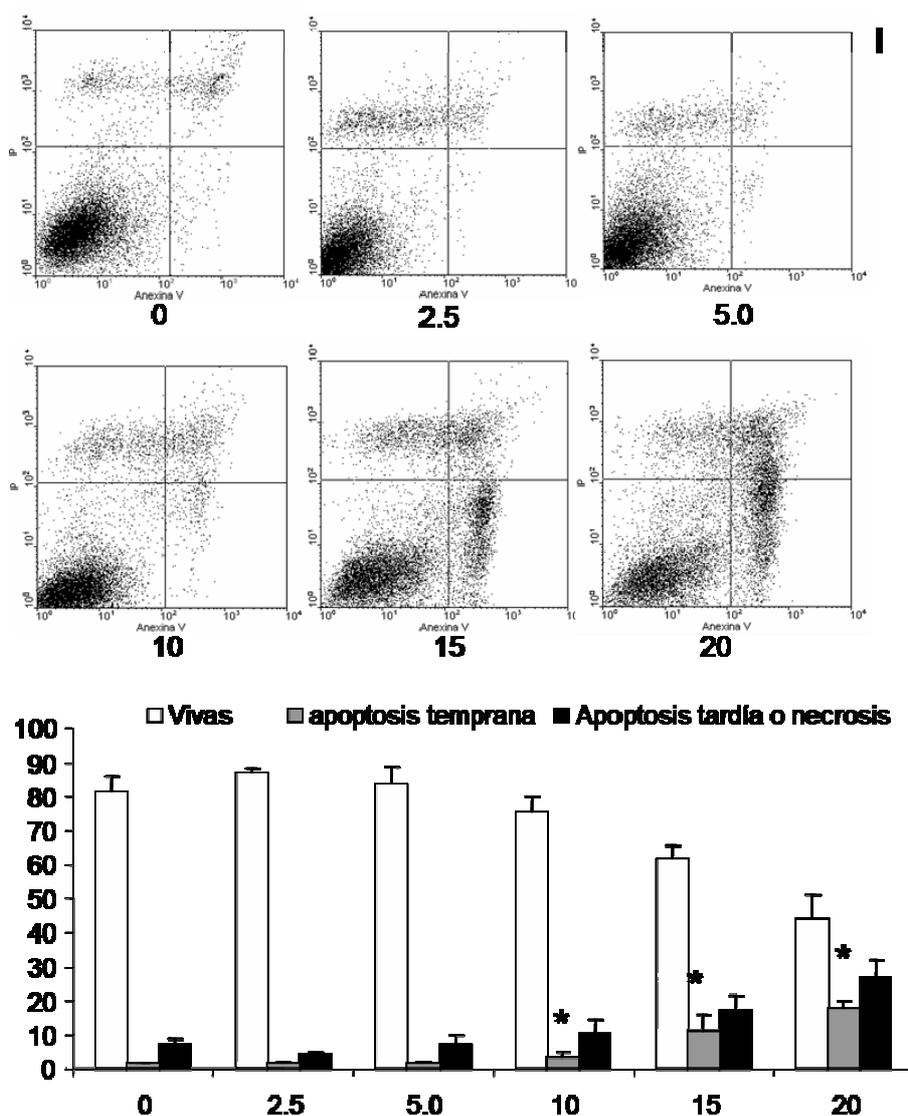
**Figura 2.3.12 Hallazgos ultraestructurales de HCT-15 tratadas con Cas III-ia *in vitro*.** A) Célula HCT-15 sin tratamiento. B) Mitocondria tumefacta de célula tratada con 2.5 μg/mL de Cas III-ia, con moderada pérdida de arquitectura de las crestas. C) Célula tumefacta con pérdida de estructura de organelos, característico de una célula necrótica. D) Condensación de la cromatina en la membrana nuclear, con ligeros cambios en el citoplasma, característico de apoptosis.

**Cuadro 2.3.4 Frecuencia de alteraciones ultraestructurales observadas en alrededor de 50 células por tratamiento *in vitro* con Cas III-ia.**

Grado de alteración	Tratamiento					
	0	2.5 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	15 µg/mL	20 µg/mL
Sin alteraciones	39	18	18	8	2	0
Alteraciones ligeras	10	11	10	1	0	0
Apoptosis temprana	0	4	3	2	0	1
Apoptosis tardía	0	1	4	10	20	26
Degeneración hidrópica	0	10	10	5	1	1
Oncosis	3	1	3	5	1	1
Necrosis	2	6	4	22	29	23
<b>Total</b>	<b>54</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>53</b>	<b>53</b>	<b>52</b>

### 2.3.2.4 Apoptosis por citometría de flujo para anexina V y yoduro de propidio

Una de las características más relevantes del mecanismo de apoptosis es la exposición del fosfolípido fosfatidilserina en la superficie celular, lugar en donde puede ser detectado a través de la unión con anexina V. Para caracterizar los efectos de este fármaco en la inducción de apoptosis, las células fueron tratadas con concentraciones de 0, 2.5, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g/mL}$  por un período de 24 horas. Cas III-ia disminuyó la viabilidad e indujo apoptosis temprana de manera dosis dependiente, siendo estas disminuciones estadísticamente significativas ( $p=0.021$  y  $p=0.020$ , respectivamente). Los resultados anteriores se grafican en la figura 2.3.13.



**Figura 2.3.13 Muerte celular determinada por citometría de flujo de HCT-15 tratadas *in vitro* con Cas III-ia.** Células vivas, en apoptosis temprana o en apoptosis tardía/necrosis después de 24 horas de tratamiento con Cas III-ia, medidas por citometría de flujo. El diagrama de puntos refleja la positividad para anexina V (eje de X) y para yoduro de propidio (eje de Y). El gráfico de barras muestra los datos obtenidos desde el diagrama de puntos, representados como porcentaje, graficándose la media  $\pm$  error estándar de 10,000 células. (\*p <0.05)

Con respecto a las células vivas, al realizar el análisis estadístico mediante la determinación de los intervalos de confianza (Anexo 4), Cas III-ia no mostró diferencias entre los grupos tratados con 0, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, a partir de la dosis de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la viabilidad se hace estadísticamente menor con respecto a los grupos mencionados, a excepción de la dosis de 10 comparada con la de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , las que son estadísticamente iguales. Asimismo, la viabilidad con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  es diferente a aquella con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pero no con la dosis de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Cuadro 2.3.5).

Con respecto a las células en apoptosis temprana, el cálculo del intervalo de confianza (Anexo 5) no arrojó diferencias entre las células sin tratamientos y las tratadas con 2.5 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, las dosis de 10, 15 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  indujeron apoptosis temprana, comparados con los otros grupos, siendo los grupos de 15 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  los que indujeron la mayor cantidad de células en apoptosis temprana, no encontrándose diferencias entre ellos. No hubo diferencias entre las células en apoptosis tardía/necrosis ( $p=0.06$ ). Estos datos se esquematizan en el cuadro 2.3.6.

**Cuadro 2.3.5 Estadística de viabilidad obtenida por citometría de flujo de HCT-15 tratadas *in vitro* con Cas III-ia.** Literales provenientes del cálculo de intervalo de confianza (95%) para la viabilidad determinada por citometría de flujo de las células HCT-15 tratadas *in vitro* en concentraciones ascendentes de la Cas III-ia.

Cas III-ia ( $\mu\text{g/mL}$ )	literal
0	a
2.5	a
5	a
10	ab
15	bc
20	c

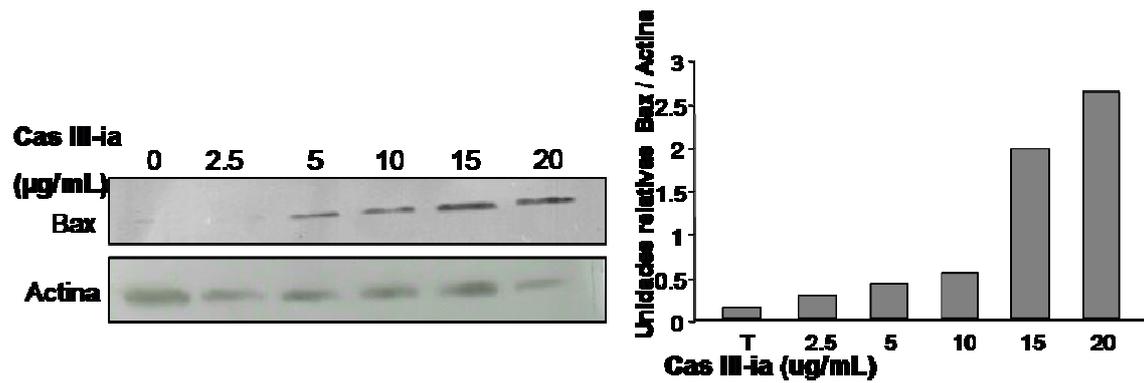
**Cuadro 2.3.6 Estadística de apoptosis temprana obtenida por citometría de flujo de HCT-15 tratadas *in vitro* con Cas III-ia.** Literales provenientes del cálculo de intervalo de confianza (95%) para apoptosis temprana determinada por citometría de flujo de las células HCT-15 tratadas *in vitro* en concentraciones ascendentes de la Cas III-ia.

Cas III-ia ( $\mu\text{g/mL}$ )	literal
0	a
2.5	a
5	ab
10	b
15	c
20	c

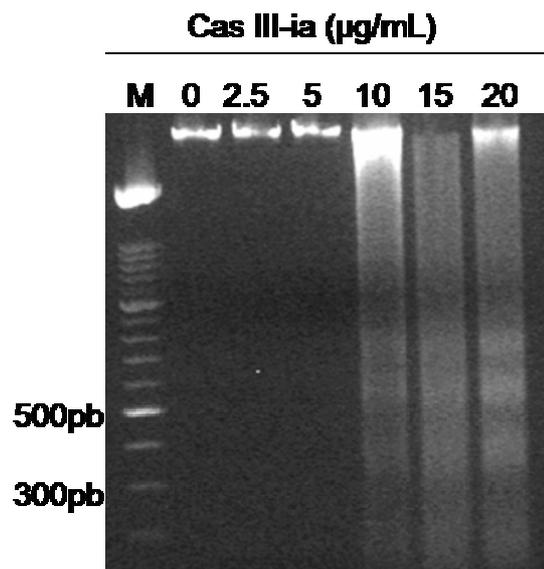
### **2.3.2.5 Mecanismo de apoptosis**

Para determinar el mecanismo de apoptosis, se evaluaron los niveles de Bax, miembro pro apoptótico de Bcl-2 en las células con los distintos tratamientos por *western blot* de extractos celulares totales. Bax evidenció un incremento dosis dependiente de los niveles de la proteína (Figura 2.3.14), lo que correlaciona con la inducción de apoptosis temprana en la citometría de flujo.

Asimismo, la activación de caspasa 3 fue indirectamente analizada por fragmentación de ADN en gel de agarosa (2%). Se observó el clásico patrón en escalera de ADN a partir de la dosis de 10 hasta la dosis de 20  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 2.3.15), datos que también concuerdan con la citometría de flujo. Estos resultados en conjunto indican que la inducción de apoptosis está relacionada con aumentos en los niveles de la proteína Bax y que la fase de ejecución ocurre a través de mecanismos dependientes de caspasas.



**Figura 2.3.14 Niveles de Bax en células HCT-15 tratadas *in vitro* con Cas III-ia.** Expresión de Bax por western blot en lisado celular total de HCT-15 obtenidos desde los distintos tratamientos con Cas III-ia durante 24 horas: El gráfico de barras muestra las unidades relativas de Bax normalizadas con actina.



**Figura 2.3.15 Electroforesis en gel de agarosa (2%) de ADN de HCT-15 expuesta *in vitro* a Cas III-ia.** Corrimiento de ADN obtenido de células expuestas con distintas concentraciones de Cas III-ia durante 24 horas.

## 2.4 Discusión y conclusiones

### 2.4.1 Actividad *in vitro* de Cas II-gli sobre carcinoma de colon HCT-15

La Cas IIgli indujo disminución de la viabilidad e inducción de apoptosis a partir de la primera dosis utilizada. Además, indujo cambios ultraestructurales compatibles con oncosis y apoptosis, éste último mecanismo de una manera dependiente de caspasas tras la formación de fragmentos oligonucleosomales. Sin embargo, la inducción de la muerte fue bloqueada parcialmente por un inhibidor de especies reactivas de oxígeno (N-acetil cisteína o NAC).

La Cas IIgli demostró inducir apoptosis de forma marcada desde la primera dosis utilizada, hecho que fue parcialmente inhibido por la incubación previa de las células HCT-15 con N-acetil cisteína. Con respecto a esto, uno de los mayores blancos de la droga a base de quelatos mixtos de cobre (II) es el ADN, dada su demostrada actividad tipo nucleasa (Sigman *et al.*, 1979). El ión de cobre (II) en presencia de peróxido de hidrógeno es capaz de romper el ADN, incluso de una forma más agresiva que el daño causado por  $\text{Fe}^{+3}$  (Aruoma *et al.*, 1991). Aunado a lo anterior, el cobre unido a 1,10-fenantrolina tiene una actividad nucleasa comprobada, la que está basada en su habilidad de romper el ADN a través de un mecanismo oxidativo (Kuwabara *et al.*, 1986; Kuwabara y Sigman, 1987). Otros investigadores demostraron que el complejo 1,10-fenantrolina-cobre con peróxido de hidrógeno como coreactante, es una nucleasa artificial que rompe el ADN por un mecanismo oxidativo en condiciones fisiológicas (Sigman *et al.*, 1979; Zelenko, 1998), en el que el sitio inicial del ataque es el átomo C1' de la desoxiribosa (Chen *et al.*, 2001).

Sin embargo, la inhibición de la muerte ejercida por NAC es sólo parcial y en la dosis más baja, lo que indica mecanismos alternos de inducción de muerte, distintos a las especies reactivas de oxígeno. Estos datos concuerdan con un estudio previo realizado *in vitro* con la Cas IIgli, utilizando células de glioma de rata. En éste se demostró que la actividad de la Cas IIgli era producto de la formación de especies reactivas de oxígeno, vía que podía ser bloqueada por la aplicación de NAC y que además, se activaban vías de apoptosis dependientes e independientes de caspasas (Trejo-Solís *et al.*, 2005). Estos datos apuntaron al centro metálico de cobre (II) y a su ligante (1,10-fenantrolina) como los responsables de inducción de apoptosis. Por otra parte,

se postula que el cobre unido a la 1,10 fenantrolina es una molécula muy permeable, lo que aunado a su lipofilidad favorece el transporte de cobre a través de membranas biológicas. Lo anterior cursa con una excesiva acumulación de cobre en el interior de la célula (Cai *et al.*, 2007), misma que puede ser la responsable de los eventos tempranos de la inducción de apoptosis (Jabs *et al.*, 1999).

Con estos datos, se puede concluir que Cas IIgli induce apoptosis y oncosis a HCT-15 en las dosis utilizadas, y que parte de su mecanismo de inducción de apoptosis es la generación de especies reactivas de oxígeno.

#### **2.4.2 Actividad *in vitro* de Cas III-ia sobre carcinoma de colon HCT-15**

Con respecto a la Cas III-ia, ésta indujo una disminución de la viabilidad de manera dosis dependiente, sin afectar los niveles de PCNA o alterar las etapas del ciclo celular. Además, mostró inducir cambios ultraestructurales compatibles con dos mecanismos de muerte, oncosis y apoptosis. Con respecto a apoptosis, éste fármaco indujo apoptosis de manera dosis dependiente y que además está relacionada a aumento de los niveles de Bax y a fragmentación internucleosomal de ADN, esto último, relacionado con mecanismos dependiente de caspasas. Aunado a lo anterior, Cas III-ia demostró actividad sobre HCT-15 xenotransplantado al ratón desnudo. Sin embargo, la ruta de aplicación elegida (intraperitoneal) en varias aplicaciones produjo irritación crónica, lo que se evidenció a través de adherencias peritoneales.

Se sabe que la inducción de apoptosis por agentes quimioterapéuticos es una vía establecida de inducción de muerte celular en células transformadas. Una gran cantidad de drogas inducen apoptosis por la vía intrínseca, lo que comprende la liberación de citocromo c desde la mitocondria y su unión a Apaf-1 (factor activante de caspasas apoptóticas, por sus siglas en inglés) y la activación de caspasa 9 (Budihardjo *et al.*, 1999). Además, el gen supresor de tumores p53 tienen un papel esencial en la señalización de apoptosis por daño al ADN, porque puede mediar la expresión de múltiples proteínas relacionadas

a la inducción de apoptosis como puma, noxa, p53AIP1 y Bax (Fridman y Lowe, 2003). Se sabe que Bax (miembro pro apoptótico de la familia Bcl-2) juega un papel fundamental en otorgar a las células neoplásicas epiteliales sensibilidad hacia agentes quimioterapéuticos, siendo su integridad esencial para el mantenimiento de la capacidad apoptótica a través de diferentes estímulos (Theodorakis *et al.*, 2002). Sin embargo, el estatus de p53 en HCT-15 está alterado (p53 -/-) (Mashima *et al.*, 2005), lo que nos indica que el aumento de los niveles de Bax pudo haber sido mediado por otro factor transcripcional, como p73 (Irwin *et al.*, 2003; Ramadan *et al.*, 2005). Con respecto a esto, está demostrado que el daño al ADN inducido por algunos agentes quimioterapéuticos activan y potencian la función apoptótica de p73, aumentando su habilidad de activar selectivamente la trascrición de los genes blanco pro apoptóticos de p53 (Costanzo *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que Cu (II) es capaz de inducir apoptosis a través de la activación de Bax y a su vez, inactivar de la vía de NFκβ que promueve la sobrevivencia celular frente a ciertos estímulos (Zhai, 2000; Jimenez del Río, 2004).

En el presente estudio, la inducción de Bax y la activación de caspasa 3 (observada indirectamente con la formación de fragmentos nucleosomales de ADN) fueron observadas en conjunto, lo que indica que la activación de caspasa 3 podría haber sido mediada por la liberación de citocromo c y la formación del apoptosoma. Más aun, está descrito que la activación de caspasas es esencial para apoptosis inducida por Bax (Xiang *et al.*, 1996; Kitanaka *et al.*, 1997, Pastorino *et al.*, 1998). Sin embargo, Kobayashi *et al.*, (2002) demostraron que es suficiente que Bax esté presente por arriba de los niveles basales, para disparar la cascada apoptótica y que la iniciación de la misma, requiere la activación simultánea de caspasas probablemente no mediada por la liberación de citocromo c ni relacionadas con cambios en el potencial de membrana. Lo anterior se puede deber probablemente a que Bax active dos vías independientes de apoptosis, uno que es mediada a través de la activación de caspasas a través de la liberación de citocromo c y otra que da lugar a muerte dependiente de permeabilidad de la membrana mitocondrial y que no cursa con activación de caspasas (Kitanaka *et al.*, 1996), lo que puede

ser mediado por la formación de un poro en la membrana externa mitocondrial formado sólo por Bax (Liu *et al.*, 1997).

Aunado a lo anterior, se demostró que compuestos derivados de otros metales de transición (como rutenio) son capaces de activar p53 y p73, lo que está relacionado a aumentos en la expresión de p21 y Bax (Gaiddon *et al.*, 2005), los que están involucrados en la detención en la fase G1 del ciclo celular y la inducción de apoptosis, respectivamente. Sin embargo, las células que presentan mutaciones en p53 fallan en la activación de p21 y por ende, tienen reducida habilidad de inducir arresto celular en G1, lo que explica los niveles inalterados de PCNA y la manutención de la duración de las fases del ciclo celular (Fan *et al.*, 1995; Wahl *et al.*, 1996).

En un estudio paralelo al presente, utilizando glioma C6 y Cas III-ia en las mismas concentraciones, se demostró la expresión de Bid y Bax y actividad de caspasa 3, aparte de mecanismos de apoptosis independientes de caspasas, a través de AIF y endonucleasa G (Trejo-Solís *et al.*, en prensa). Con respecto a esto, Bid se une a Bax a través de su dominio BH3, lo que le produce a Bax un cambio conformacional y la liberación de citocromo c (Kuwana *et al.*, 2002). Bid también debe ser considerado al momento de tratar de establecer el mecanismo de acción de la Cas III-ia, ya que transmite las señales a Bax, quien es el responsable de la liberación de citocromo c e inducción de apoptosis dependiente de caspasas.

Por otra parte, está demostrado que el mayor potencial de membrana mostrado por las células neoplásicas, facilita la acumulación de solutos catiónicos lipofílicos más pequeños que 1500 D en la membrana mitocondrial interna (Fantin *et al.*, 2002). Lo anterior dispara la liberación de citocromo c y la ejecución de la vía intrínseca de apoptosis. Lo anterior coincide con los hallazgos ultraestructurales en los que se observa tumefacción mitocondrial sin alteración de la viabilidad con la dosis de 2.5 µg/mL. El mecanismo del enunciado anterior se puede explicar de la siguiente manera: la membrana interna mitocondrial se muestra como una estructura condensada al ser examinada por microscopía electrónica de transmisión. Sin embargo, esto

desaparece al inducirse la transición de permeabilidad mitocondrial, lo que refleja un cambio en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial (Terauchi *et al.*, 2005). El aumento de la permeabilidad es el resultado de la formación de poros proteínáceos, más conocidos como poros de transición de permeabilidad, los que son canales formados por la oposición de proteínas en los sitios de contacto de la membrana interna con la membrana externa mitocondrial (Walter *et al.*, 2002). Se cree presumiblemente, que este poro se forma por la asociación entre el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC o porina mitocondrial), los que permiten la permeación no específica de solutos o iones de un tamaño molecular de hasta 1500 D (Bernardi, 1999). Como resultado, hay pérdida del potencial de membrana, desacoplo de la fosforilación oxidativa y del equilibrio químico entre el citoplasma y la matriz mitocondrial (Bossy-Wetzel y Green, 1999). Lo anterior, cursa con hinchamiento de la matriz mitocondrial y ruptura de la membrana externa, lo que permite que el citocromo c salga a citosol, activando así la vía intrínseca de apoptosis.

Adicionalmente, estudios previos sugieren que las Casiopeínas son capaces de unirse a ADN a través de la interacción con adenina (Tovar-Tovar *et al.*, 1995) y bloquear la fosforilación oxidativa (Marín-Hernández *et al.*, 2003). En conjunto estos datos postulan más de un mecanismo de acción para la Cas III-ia.

Se postula que las células cancerosas con p53 inactivo son resistentes a las drogas que inducen apoptosis a través de la vía intrínseca (Bunz *et al.*, 1999), por lo que la búsqueda de nuevas drogas con actividad antineoplásica es una meta razonable. Nuestros hallazgos postulan a la Cas III-ia como un buen candidato para la terapia de cáncer con fenotipos resistentes. Como se observó, Cas III-ia 1) Induce apoptosis en células con p53 alterado y 2) Aumenta los niveles de Bax y activa la muerte a través de caspasas.

Con los datos obtenidos con las Cas IIgli y Cas III-ia *in vitro*, en la figura 2.4.1 se grafica el mecanismo parcial de acción propuesto para estos fármacos. No obstante, deben realizarse estudios más certeros, como análisis exhaustivo de

proteínas de la familia Bcl-2 (como Bid) que participan en la inducción de muerte y la medición de especies reactivas de oxígeno con DL50 y tiempos más cortos, para establecer la vía exacta de inducción de muerte.

Con base en el análisis de los resultados de este estudio, se concluye lo siguiente:

- La Casiopeína IIgli disminuye la viabilidad de HCT-15 parcialmente a través de la generación de especies reactivas de oxígeno. Además, induce apoptosis, la que está relacionada con la activación de caspasas.
- La Casiopeína III-ia disminuye la viabilidad e induce apoptosis de HCT-15 de manera dosis dependiente, lo que se relaciona al aumento de los niveles de Bax y la activación de caspasas. No obstante, no influye en la duración de las distintas etapas del ciclo celular.

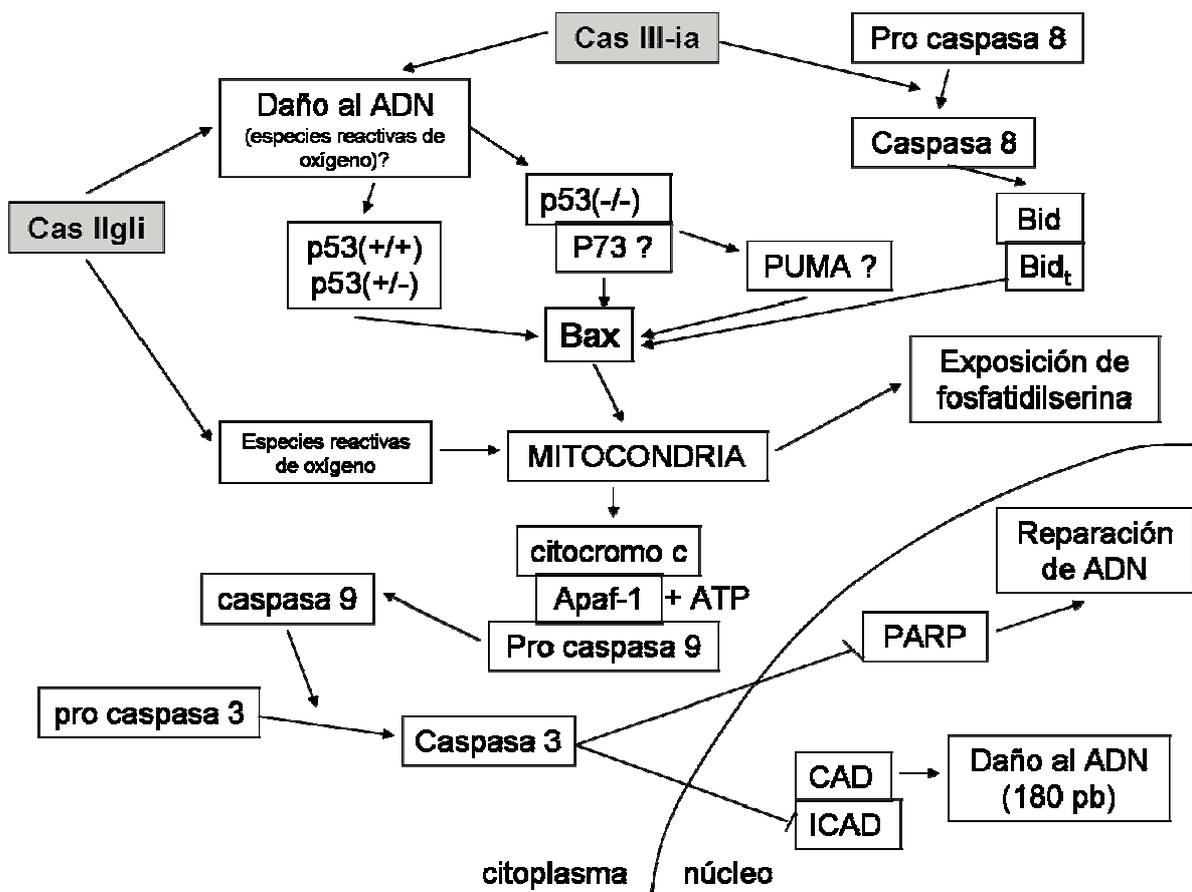


Figura 2.4.1 Mecanismos propuestos de inducción de muerte *in vitro* para Cas III-ia y IIgli.

**CAPÍTULO 3.** Actividad, mecanismos de acción y efectos colaterales *in vivo* de las Casiopeínas<sup>®</sup> III-ia y IIgli en ratones xenotransplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon humano HCT-15

### **3.1 Antecedentes**

Mientras que el tratamiento con quimioterapia de algunas malignidades ha sido exitoso, la efectividad ha sido frecuentemente limitada por la resistencia a fármacos o por efectos colaterales en tejidos y células no alteradas. De hecho, muchos tumores son intrínsecamente resistentes a los agentes citotóxicos más potentes usados en quimioterapia. Otros tumores son inicialmente sensibles, recurren y se hacen resistentes no sólo a los agentes quimioterapéuticos iniciales, sino que también a otras drogas no usadas en el tratamiento (Tsuruo *et al.*, 2003; Blagosklonny, 2004).

La acción de las drogas quimioterapéuticas no es específica para el tumor, dañando las células normales que proliferan rápidamente como las células de médula ósea y en la criptas intestinales, alteraciones que complican el tratamiento de pacientes con enfermedades neoplásicas (Van Huyen *et al.*, 1998; Wadler *et al.*, 1998). La quimioterapia sistémica ejerce su acción tóxica a través de múltiples mecanismos, que dan lugar a bloqueo del ciclo celular y/o a apoptosis (Damia y Broggin, 2004), produciendo cambios en la mucosa intestinal que se asocian al aumento de permeabilidad del intestino (Siber *et al.*, 1980). No obstante, a pesar de existir una gran cantidad de blancos intracelulares para los distintos fármacos, muchos de estos agentes inducen apoptosis a través de la activación de unas pocas vías comunes (Trejo Solís *et al.*, 2005).

Es por esta razón que se continúa con la búsqueda de drogas con potencial anticancerígeno pero que presenten una baja toxicidad para evitar efectos secundarios graves, así como de menor costo y que no presenten resistencia cruzada (Pratt y Ruddon, 1979).

### **OBJETIVO**

Establecer la actividad, los mecanismos de acción y efectos colaterales *in vivo* de las Casiopeínas<sup>®</sup> III-ia y IIgli en ratones xenotransplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon humano HCT-15.

## 3.2 Material y métodos

### 3.2.1 Fármacos

Las Casiopeínas<sup>®</sup> III-ia y IIgli fueron disueltas en agua estéril a 1mg/mL<sup>-1</sup>, conservándose a 4° C y en la oscuridad durante 48 horas. *Cis*-diamino-dicloro platino (II) (CDDP) (*Alfa Aesar*, Ward Hill, MA) fue disuelto en agua estéril y usado inmediatamente después de preparado. Los demás reactivos fueron obtenidos de fuentes comerciales.

### 3.2.2 Células

La línea tumoral HCT-15 (adenocarcinoma colorectal) fue adquirida en *American Type Culture Collection* (ATCC) (*American Tissue Culture Collection*, Rockville, MD). Las células se mantuvieron y proliferaron en el laboratorio de cultivos de tejidos de la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química de la UNAM, como fue descrito en el “Material y métodos” del capítulo 2.

### 3.2.3 Actividad antitumoral

Se inocularon 1 x 10<sup>6</sup> células de carcinoma de colon HCT-15 subcutáneamente en el área del flanco izquierdo inferior de 30 ratones desnudos nu/nu (Harlan México, S.A. de C.V.). Se consideró día de inicio de tratamientos (día 0) aquel en el que el tumor midiera 3 mm de diámetro. Los animales fueron distribuidos al azar en los distintos grupos: testigo (n=10); Cas III-ia 3.0 mg/kg (n=5) cada 4 días por 6 dosis; Cas III-ia 6 mg/kg (n=5) cada 4 días por 6 dosis; CDDP 4 mg/kg (n=5) cada 7 días por 4 dosis. Los animales fueron pesados y los tumores medidos a lo largo y ancho, usando calibradores Vernier diariamente. Usando una fórmula establecida, las medidas fueron convertidas en tamaño tumoral (cm<sup>3</sup>).

$$\text{Tamaño tumoral} = \frac{[\text{longitud}(\text{cm}) \times \text{ancho}^2(\text{cm}) \times \pi]}{6}$$

Usando las medias de los volúmenes relativos tumorales (VRT) (Vol. día X / Vol. día 0) x 100 para cada grupo, se calculó la función del fármaco como posible antitumoral como sigue:

$$\text{Función antitumoral} = (VRT_{\text{tratado}} / VRT_{\text{testigo}}) \times 100$$

Este índice debe ser menor a 42 para considerar el fármaco con actividad antineoplásica.

Asimismo, se calculó el retraso del crecimiento específico considerando la media de los días que demora el tumor en doblar su tamaño (D), en los distintos grupos como sigue:

$$\text{Retraso de crecimiento específico} = (D_{\text{tratado}} - D_{\text{testigo}}) / D_{\text{testigo}}$$

Para considerar que el fármaco posee potencial antineoplásico, este índice debe ser menor o igual a 2.

### **3.2.4 Alteraciones colaterales a la aplicación de los fármacos**

El porcentaje de la pérdida de peso del animal, como indicador de toxicidad, fue calculado para cada individuo como sigue:

$$\% \text{ pérdida de peso} = [(Peso \text{ al día } 21 / Peso \text{ al día } 0) - 1] \times 100$$

El experimento terminó 24 horas después de la última aplicación del fármaco en cada grupo, día en que los ratones fueron eutanasiados en una cámara de CO<sub>2</sub>.

### **3.2.5 Necropsia e histopatología**

Una vez hecha la eutanasia de los animales en una cámara de CO<sub>2</sub>, los animales fueron colocados en decúbito dorsal sobre una charola de disección y

se sostuvieron de los cuatro miembros con alfileres. Se humedeció la región ventral con alcohol etílico y se incidió las cavidades abdominal, torácica y craneal para observar y describir las lesiones macroscópicas.

Los grados de las lesiones macroscópicas fueron asignados de acuerdo a su gravedad y fueron clasificados de la siguiente forma:

- a. Adherencias: Se asignó 1 al haber menos de 5 adherencias entre las asas intestinales; 2 al haber más de 5 adherencias e involucrar estómago y bazo; 3 al haber lo descrito en 2 y encontrarse adherencias con la pared peritoneal.
  
- b. Ascitis: 1 al haber ligera cantidad de líquido transparente; 2 al encontrarse moderado a abundante líquido transparente; 3 al ser el líquido color rojo (sanguinolento).
  
- c. Alteraciones hepáticas: Se asignó 1 al tener bordes redondeados y palidez ligera; 2 al tener bordes moderadamente redondeados y tonalidad violácea; 3 al tener bordes gravemente redondeados y color rojo oscuro. Además, se asignó 4 al encontrarse el órgano de menor tamaño y peso, alteración compatible con atrofia.

A continuación, se obtuvieron muestras de hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón, intestino delgado, cerebro y la mitad del tumor, los que fueron inmediatamente inmersos en una solución de formalina amortiguada al 10% por un tiempo mínimo de 24 horas. Las muestras analizadas se obtuvieron desde los animales tratados con los distintos esquemas de Casiopeína<sup>®</sup> III-ia (n=4), Casiopeína IIgli (n=4) con CDDP (n=4) y del grupo testigo negativo (n=4) para realizar un análisis comparativo.

Las muestras ya fijadas se procesaron mediante las técnicas histológicas de rutina. Finalmente se procedió a teñir con hematoxilina-eosina (H-E) lo cual se realizó en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Una vez obtenidas las secciones, se procedió a realizar una primera revisión. Inicialmente, se observaron las secciones provenientes de los animales sin tratamiento y posteriormente, se procedió a la evaluación de los grupos tratados. De dicha observación se obtuvo el cuadro de evaluación microscópica, mismo que fue utilizada para la evaluación final. En ésta se asignó a cada sección histológica un número al azar y las lesiones fueron clasificadas según su gravedad como sigue:

a) Peritoneo

- 0 Sin alteraciones
- 1 El hígado exhibe sobre su serosa de 1 a 4 capas de células mononucleares (macrófagos y linfocitos) inmersas en una fina trama de fibrina.
- 2 Lo observado en 1, más la presencia de neutrófilos, eritrocitos y moderada fibrina sobre el hígado, las cual se extiende focalmente hacia la grasa mesentérica.
- 3 Lo observado en 2, más abundante fibrina sobre el hígado y en la grasa mesentérica, haciéndose extensiva esta lesión a la superficie de otros órganos de la cavidad abdominal como páncreas, intestino y riñones.
- 4 Lo observado en 3, más abundantes vasos sanguíneos de neoformación en el mesenterio y adherencias graves con otros tejidos. Asimismo, se observa celulitis mesentérica crónica, la que se evidencia por abundantes neutrófilos, macrófagos, linfocitos y fibroblastos. Además se aprecia colágena entremezclada con la reacción inflamatoria.

b) Hígado

- 0 Sin alteraciones.
- 1 Vacuolización de gota fina en hepatocitos y/o múltiples focos ligeros de infiltrado linfoplasmocítico.
- 2 Lo observado en 1, más congestión grave de sinusoides.
- 3 Lo observado en 2, más vacuolización de gota gruesa en hepatocitos y disociación de cordones hepáticos.
- 4 Necrosis multifocal moderada a grave.

c) Riñón

- 0 Sin alteraciones.
- 1 Nefritis intersticial ligera multifocal.
- 2 Necrosis tubular aguda.

d) Corazón

- 0 Sin alteraciones.
- 1 En el miocardio auricular o ventricular se aprecia foco de necrosis, el cual se encuentra rodeado por moderados linfocitos y macrófagos.
- 2 El miocardio exhibe 2 o más focos de necrosis, rodeado por reacción inflamatoria compuesta por linfocitos y macrófagos.

Asimismo, se obtuvo el índice mitótico en el tumor y en las criptas del duodeno. Este índice se determinó promediando el número de mitosis en 10 campos de gran aumento (40X), utilizando los criterios descritos por Jannink *et al.*, 1995. Se incluyeron aquellas células en que la membrana nuclear que esté ausente, para asegurar que las células ya atravesaron la profase. La cromatina debió estar condensada (metafase temprana), en un plano (metafase/anafase) o en agregados cromosómicos separados (telofase). Además, el citoplasma de estas células debió estar aumentado y basofílico durante la mitosis. También se obtuvo el índice de células picnóticas (apoptosis) en las criptas duodenales y en los tumores en 10 campos de gran aumento (40X), en los que en intestino, se hizo un análisis crítico para excluir linfocitos intra epiteliales o mitosis. El

criterio de inclusión fue condensación de la cromatina, separación de las células picnóticas de las células adyacentes y la formación de vesículas cromatínicas agrupadas, cambios compatibles con cuerpos apoptóticos (Hall *et al.*, 1994; Thunissen *et al.*, 2001). Todas las evaluaciones histológicas fueron hechas por doble ciego, para evitar sesgos.

### **3.2.6 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos desde los experimentos *in vivo* fueron analizados con la prueba de Kruskal Wallis para análisis de rangos con el programa *Analyst*® de SAS® 8.0 for Windows, a excepción del porcentaje de pérdida de peso animal que fue analizado por análisis de varianza seguida de Tukey. La significancia utilizada en todos los estudios fue de 0.05.

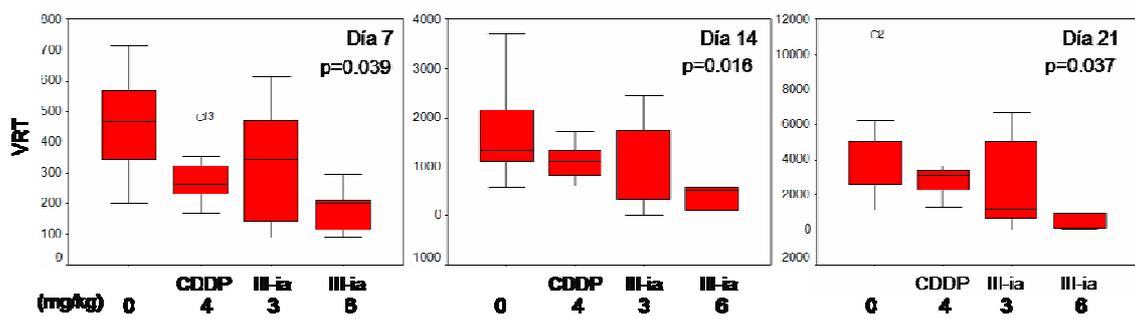
### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Efectos antitumorales *in vivo* de Cas III-ia

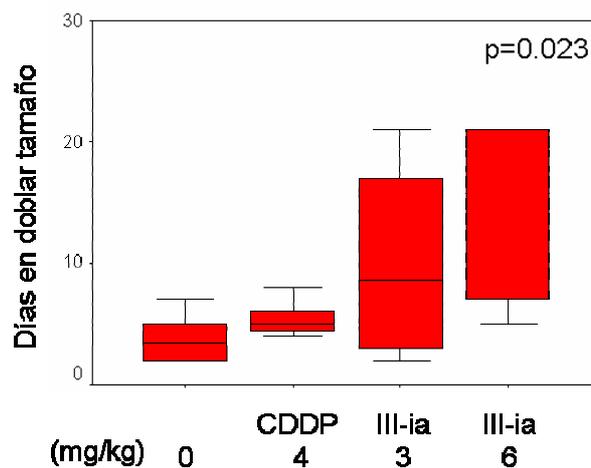
Para determinar si la Cas III-ia aplicada intraperitonealmente ejercía una actividad antitumoral, se calculó el volumen relativo tumoral (VRT), la función antitumoral, los días en doblar el tamaño, el retraso específico del crecimiento y el índice mitótico de los tumores y apoptótico de los tumores.

Con respecto al VRT, este índice demostró ser menor de una manera estadísticamente significativa en los animales tratados con Cas III-ia 6 mg/kg con relación al testigo, a partir del día 7 de tratamiento ( $p=0.039$ ), manteniéndose esta diferencia constante al día 14 ( $p=0.016$ ) y 21 ( $p=0.037$ ) de tratamiento. No hubo diferencias entre los otros grupos de tratamiento y el grupo testigo (Figura 3.3.1).

Sumado a lo anterior, al analizar los días que demora el tumor en doblar su tamaño con respecto al testigo en los distintos grupos, el tratamiento con Cas III-ia 6.0 mg/kg aumentó estadísticamente este índice ( $p=0.023$ ). Por otra parte, ni CDDP ni Cas III-ia 3.0 mg/kg mostraron retardar estadísticamente el crecimiento tumoral (Figura 3.3.2).



**Figura 3.3.1 Volumen relativo tumoral de HCT-15 tratado con Cas III-ia y CDDP.** Cajas de valores extremos que representan el volumen relativo tumoral (VRT) de los tumores originados del transplante de HCT-15 en los días 7, 14 y 21 de experimentación y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas III-ia 3 (n=5) y Cas III-ia 6 mg/kg (n=5). <sup>o</sup> Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.



**Figura 3.3.2 Días en doblar el tamaño de HCT-15 tratado con Cas III-ia y CDDP.** Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del transplante de HCT-15 y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas III-ia 3 (n=5) y Cas III-ia 6 mg/kg (n=5).

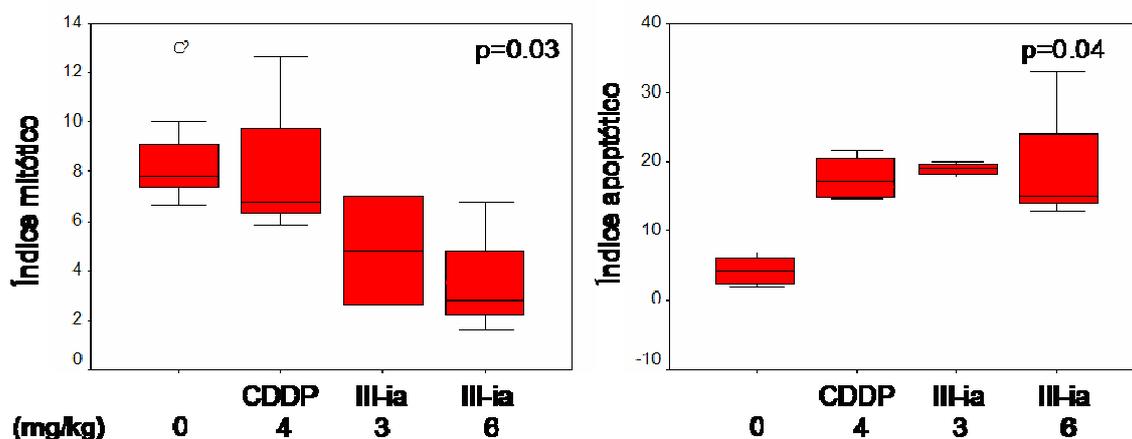
Con respecto a la función antitumoral, que debe ser menor a 42%, el único tratamiento que alcanza el requerimiento para este índice es Cas III-ia 6 mg/kg, cuyo valor fue de 20.3%. No obstante lo anterior, ni uno de los grupos tratados

alcanzó los requerimientos de retraso específico de crecimiento, que debía ser mayor o igual a 2 (Cuadro 3.3.1).

Con referencia al índice mitótico (Figura 3.3.3), sólo el tratamiento de Cas III-ia 6 mg/kg demostró disminuir este índice de una forma estadísticamente significativa ( $p=0.03$ ). Aunado a lo anterior, los tratamientos con CDDP y Cas III-ia demostraron inducir núcleos picnóticos (apoptosis) de manera estadísticamente significativa con respecto al testigo ( $p=0.04$ ). Estos datos indican que Cas III-ia en la dosis de 6.0 mg/kg tiene actividad antitumoral *in vivo* a través de la inhibición de la proliferación y además tiene la capacidad de inducir apoptosis. No obstante, Cas III-ia 3 mg/kg y CDDP inducen apoptosis, pero no disminuyen de manera significativa el índice mitótico.

**Cuadro 3.3.1 Efectos antitumorales *in vivo* de Cas III-ia y CDDP.** Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 21 de experimentación.

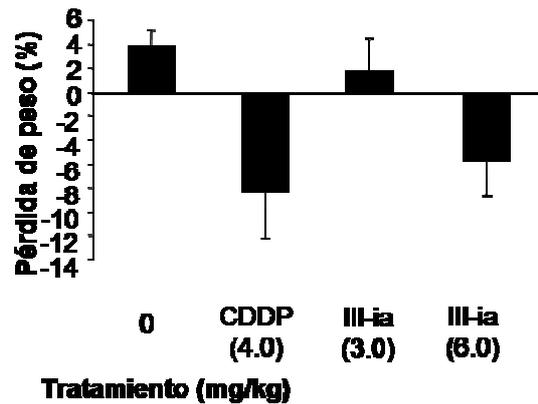
<b>Tratamientos</b>	<b>n</b>	<b>FA</b>	<b>REC</b>
<b>Testigo</b> <b>(Agua destilada)</b>	<b>10</b>	<b>—</b>	<b>—</b>
<b>CDDP</b> <b>4.0 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>84.3</b>	<b>0.1</b>
<b>Casiopeína III-ia</b> <b>3 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>82.9</b>	<b>0.89</b>
<b>Casiopeína III-ia</b> <b>6 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>20.3</b>	<b>1.45</b>



**Figura 3.3.3 Índice mitótico y apoptótico de HCT-15 tratado con Cas III-ia y CDDP.** Cajas de valores extremos que representan los índices mitótico y apoptóticos de los tumores originados del trasplante de HCT-15 y tratados bajo los distintos esquemas durante 21 días experimentación y tratados con 0 mg/kg (n=4), CDDP (n=4), Cas III-ia 3 (n=4) y Cas III-ia 6 mg/kg (n=4). <sup>o</sup> Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.

Con respecto a la toxicidad *in vivo* producida por la Cas III-ia, se calculó el porcentaje de pérdida de peso de los animales (Figura 3.3.4). Al ser comparado este indicador de los animales tratados con el grupo testigo, se observaron reducciones de  $8.2 \pm 3.9\%$  y de  $5.7 \pm 3.5\%$  en los animales tratados con CDDP

y con la dosis de 6 mg/kg de la Cas III-ia, respectivamente. Los animales tratados con CDDP demostraron una diferencia de peso estadísticamente significativa sólo con el grupo testigo ( $p=0.0058$ ) (Cuadro 3.3.2). Para el grupo testigo y aquel tratado con 3 mg/kg de Cas III-ia, se observaron ganancias de peso del  $3.8 \pm 1.2\%$  y  $1.7 \pm 2.7\%$  respectivamente.



**Figura 3.3.4 Porcentaje de pérdida de peso de los animales tratados con Cas III-ia y CDDP.** Porcentaje de pérdida de peso de los ratones desnudos transplantados con HCT-15, bajo los distintos esquemas y tratamientos con CDDP y Cas III-ia. Los datos representan la media y error estándar de los distintos esquemas de tratamiento; 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas III-ia 3 (n=5) y Cas III-ia 6 mg/kg (n=5).

**Cuadro 3.3.2 Estadística de porcentaje de pérdida de peso al día 21 de animales tratados con Cas III-ia y CDDP.** Literales provenientes del cálculo del análisis de varianza seguida de Tukey para porcentaje de pérdida de peso al día 21 de los animales transplantados con HCT-15 y tratados bajo los distintos esquemas, 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas III-ia 3 (n=5) y Cas III-ia 6 mg/kg (n=5).

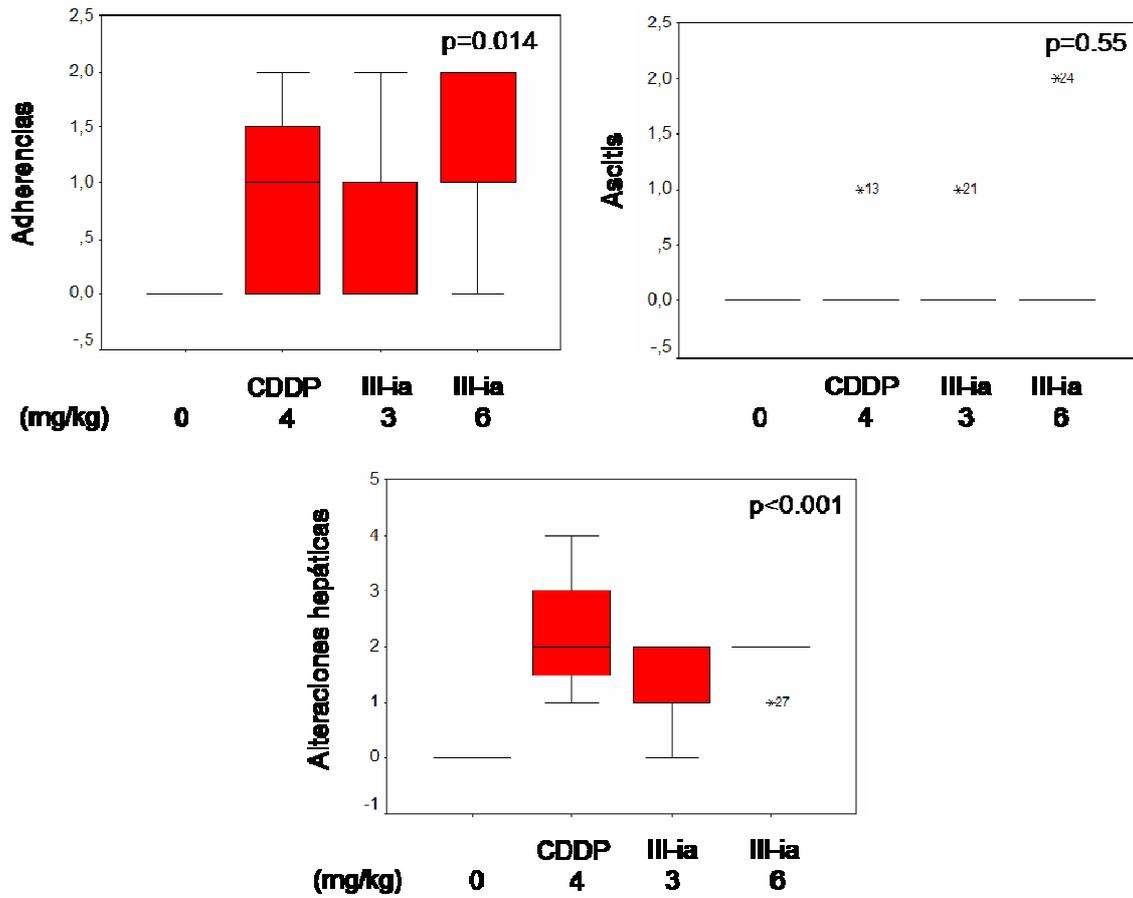
Tratamiento (mg/kg)	literal
0	a
III-ia 3 mg/kg	ab
III-ia 6 mg/kg	ab
CDDP	b

En la necropsia de los ratones, se observaron múltiples adherencias y alteraciones hepáticas en los tres grupos de tratamientos (CDDP y Cas III-ia en sus dos dosis), los que fueron estadísticamente significativos al ser comparados con el grupo testigo ( $p=0.014$  y  $p<0.001$ , respectivamente). Las

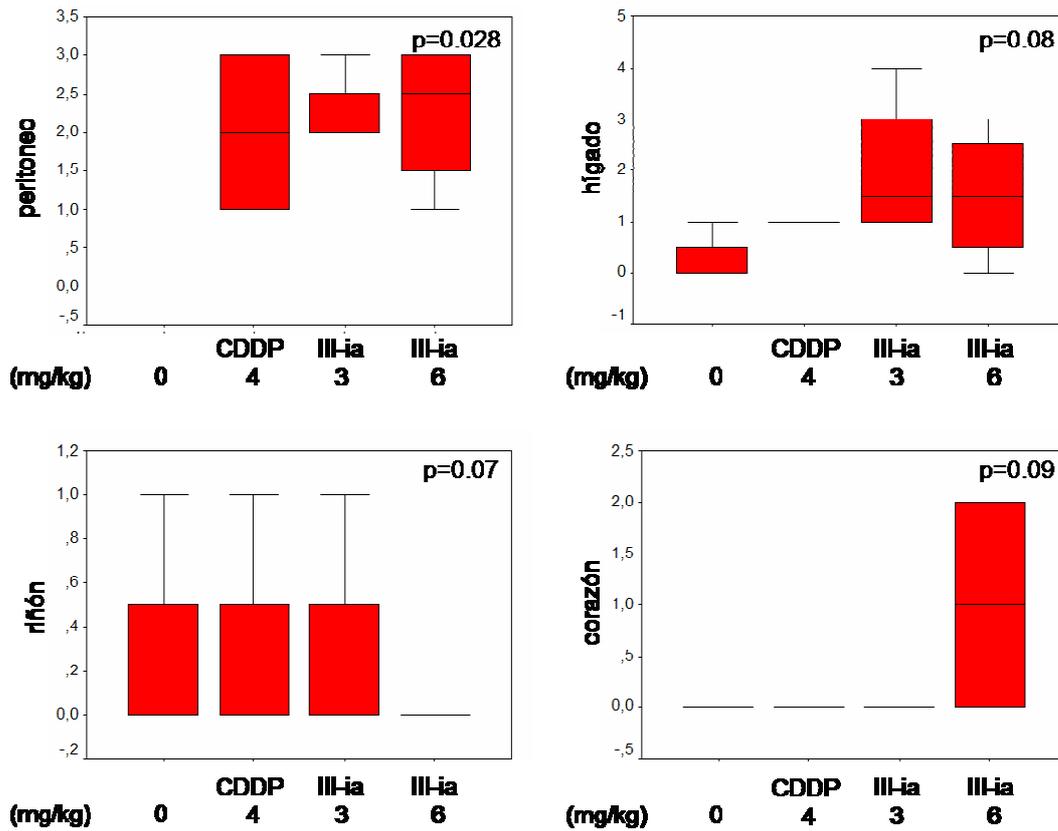
adherencias fueron más frecuentes entre la serosa intestinal y el hígado en los animales tratados con 6 mg/kg de Cas III-ia, siendo la gravedad de estas lesiones proporcional a la dosis. Además, a pesar de observarse ascitis en algunos animales, no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo en ninguno de los grupos tratados ( $p=0.55$ ) (Figura 3.3.5).

En el análisis histológico de las distintas secciones del animal, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas de las muestras provenientes del peritoneo, en donde predominó esteatitis mesentérica y abundantes neutrófilos, macrófagos, linfocitos y fibroblastos en la superficie del hígado, riñón y del peritoneo. Además se observó abundante colágena entremezclada con la reacción inflamatoria, alteraciones que se mostraron en los ratones tratados con CDDP y Cas III-ia ( $p=0.028$ ). Hígado, riñón y corazón no demostraron alteraciones estadísticamente significativas con respecto al testigo (Figuras 3.3.6 y 3.3.7).

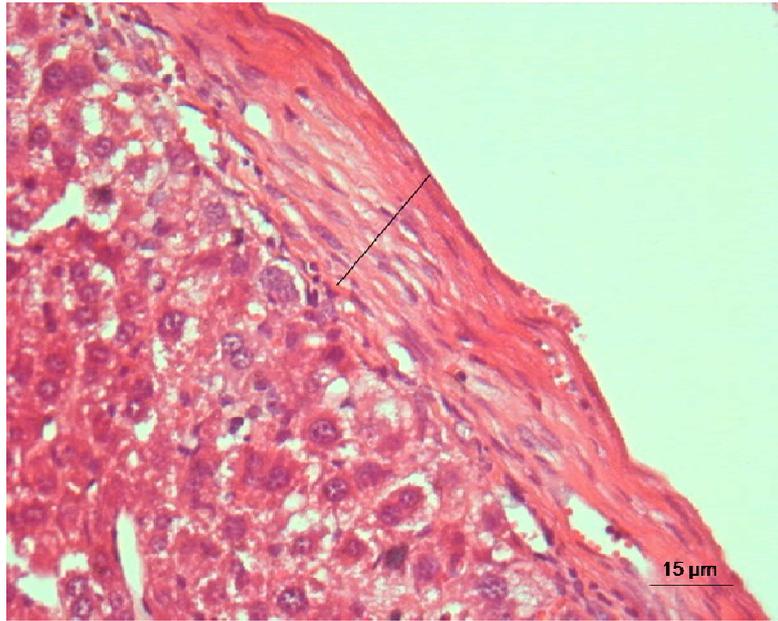
Además, se realizó el estudio de los índices mitóticos y apoptóticos del intestino delgado (duodeno), en donde no se observaron variaciones estadísticamente significativas con respecto al índice mitótico intestinal ( $p=0.11$ ) en los distintos tratamientos. No obstante, CDDP mostró inducir apoptosis en las células de las criptas ( $p=0.01$ ), alteración que no se hizo evidente en los tratamientos con Cas III-ia, en ambas dosis utilizadas (Figura 3.3.8).



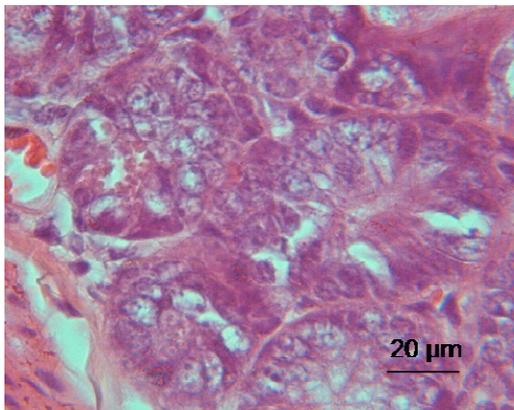
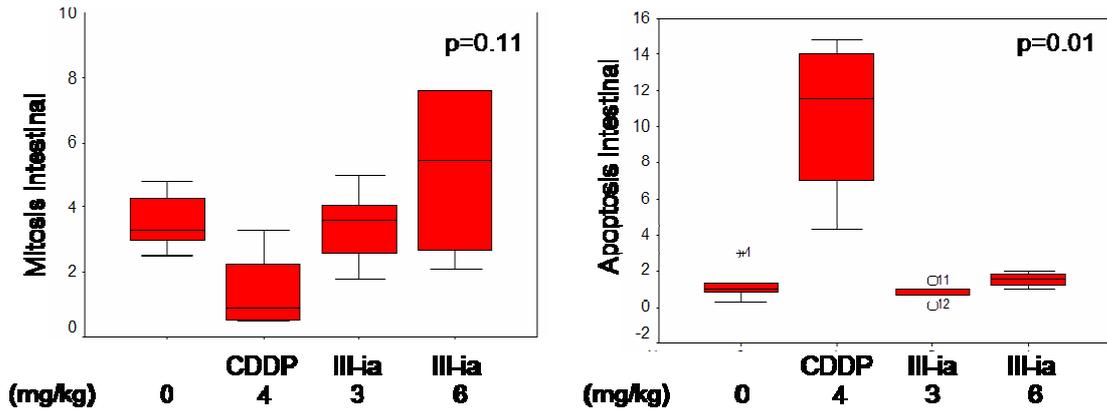
**Figura 3.3.5 Hallazgos de necropsias en animales tratados con Cas III-ia y CDDP.** Cajas de valores extremos que representan adherencias, ascitis y alteraciones hepáticas de los animales tratados bajo los distintos esquemas durante 21 días experimentación; n=4 para todos los grupos. \* Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media.



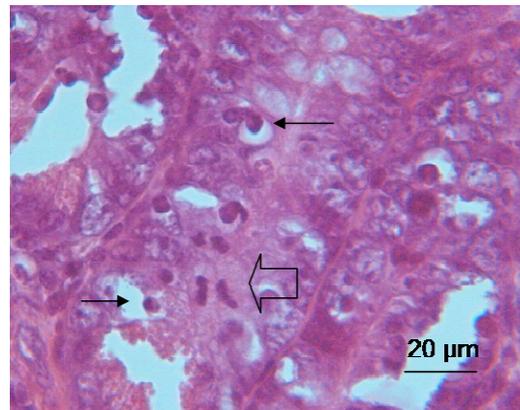
**Figura 3.3.6 Hallazgos histológicos en animales tratados con Cas III-ia y CDDP.** Cajas de valores extremos que representan alteraciones histológicas de peritoneo, hígado, riñón y corazón de los animales tratados bajo los distintos esquemas durante 21 días experimentación; n=4 para todos los grupos.



**Figura 3.3.7 Fotomicrografía de hígado proveniente de animal tratado con Cas III-ia.** Serosa engrosada (representada por la barra), producto del depósito de fibrina y colágena, entremezclada con algunas células inflamatorias mononucleares. HE.



**Testigo**



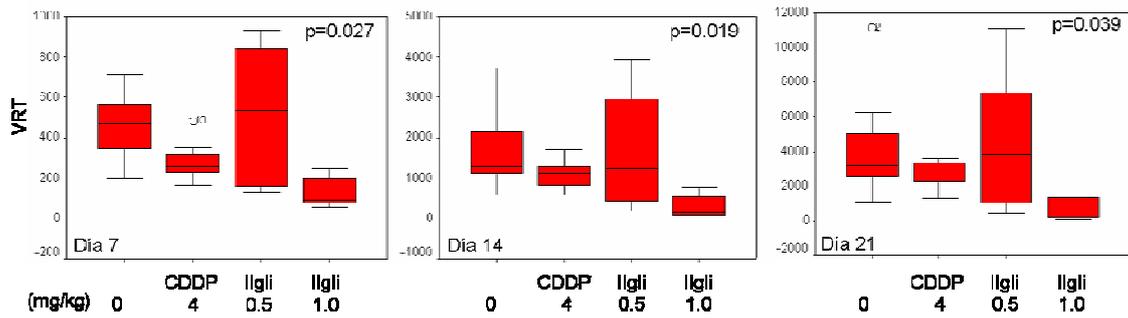
**CDDP**

**Figura 3.3.8 Índice mitótico y apoptótico duodenal proveniente de animales tratados con Cas III-ia y CDDP.** Arriba: Cajas de valores extremos que representan mitosis y apoptosis intestinal de los animales tratados bajo los distintos esquemas durante 21 días experimentación; n=4 para todos los grupos. \* Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media. <sup>o</sup> Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media. Abajo: Fotomicrografías de secciones de intestino (criptas) en las que se observan múltiples células con morfología de apoptosis (flechas cerradas) y una mitosis (flecha abierta) proveniente de ratón tratado con CDDP, comparado con imagen histológica de criptas de un ratón del grupo testigo. HE.

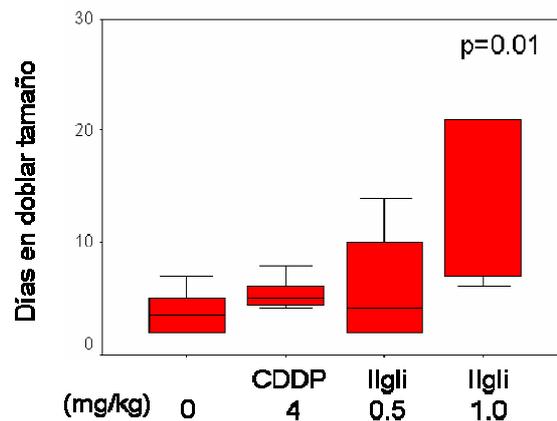
### **3.3.2 Efectos antitumorales *in vivo* de Cas Ilgli**

Para determinar si la Cas Ilgli ejercía acción antitumoral, se procedió a analizar los volúmenes relativos tumorales (VRT) en los días 7, 14 y 21, además de los días en doblar el tamaño (D) de HCT-15 transplantado en 25 ratones desnudos y tratados intraperitonealmente con los esquemas y dosis mencionadas en material y métodos. Sólo la dosis de 1 mg/kg mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al VRT en los días 7 ( $p=0.027$ ), 14 ( $p=0.019$ ) y 21 ( $p=0.039$ ) al ser comparado con el testigo (Figura 3.3.9), alcanzando al final de la experimentación, un tamaño promedio correspondiente al 10.58% del tamaño observado en el grupo testigo.

Además, fue este mismo esquema de tratamiento (1 mg/kg) el que demostró retardar significativamente ( $p=0.01$ ) los días en doblar el tamaño tumoral. Dicho efecto fue proporcional a la dosis (Figura 3.3.10). Finalmente, al analizar los índices de función antitumoral y retraso del crecimiento, se apreció que sólo la dosis de 1 mg/kg alcanzó ambos requerimientos, comprobándose así su acción antitumoral (Cuadro 3.3.3).



**Figura 3.3.9 Volumen relativo tumoral de HCT-15 tratado con Cas Irli y CDDP.** Cajas de valores extremos que representan el volumen relativo tumoral (VRT) de los tumores originados del trasplante de HCT-15 en los días 7, 14 y 21 de experimentación y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas Irli 0.5 mg/kg (n=5) y Cas Irli 1 mg/kg (n=5). <sup>o</sup> Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.



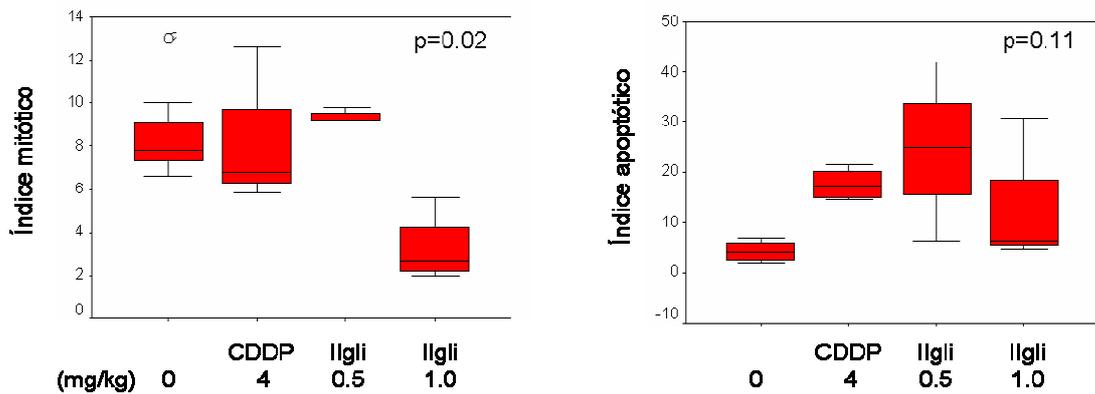
**Figura 3.3.10 Días en doblar el tamaño de HCT-15 tratado con Cas Irli y CDDP.** Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del trasplante de HCT-15 y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas Irli 0.5 mg/kg (n=5) y Cas Irli 1 mg/kg (n=5).

**Cuadro 3.3.3 Efectos antitumorales *in vivo* de Cas IIgli.** Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 21 de experimentación.

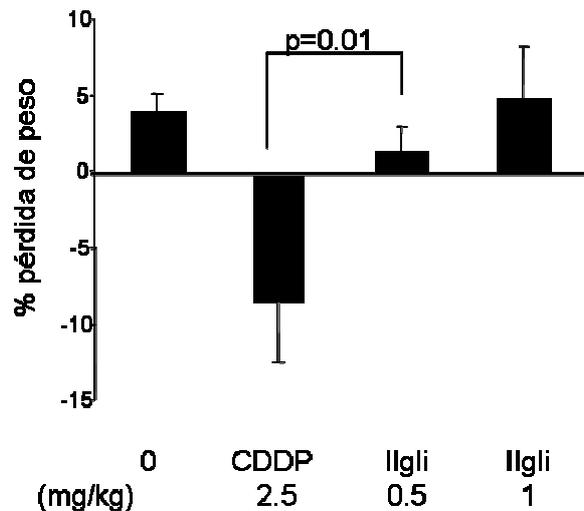
<b>Tratamientos</b>	<b>n</b>	<b>FA</b>	<b>REC</b>
<b>Testigo (Agua destilada)</b>	<b>10</b>	<b>–</b>	<b>–</b>
<b>CDDP 4 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>84.3</b>	<b>0.1</b>
<b>Casiopeína II-gli 0.5 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>145.9</b>	<b>0.3</b>
<b>Casiopeína II-gli 1 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>26.5</b>	<b>2</b>

Al tratar de dilucidar el mecanismo de acción antitumoral, se observó que con 1 mg/kg de Cas Iigli, el índice mitótico tumoral disminuyó alrededor del 50% con relación al grupo testigo ( $p=0.02$ ). No obstante, ni uno de los tratamientos demostró inducir cambios morfológicos de apoptosis en el tumor de una manera estadísticamente significativa (Figura 3.3.11).

Con respecto al porcentaje de pérdida de peso, como indicador de toxicidad, se encontraron diferencias ( $p=0.01$ ) entre los tratamientos con CDDP y Cas Iigli 0.5 mg/kg. El grupo testigo evidenció ganancias de  $3.8 \pm 1.2\%$  y los tratados con Cas Iigli en las dosis de 0.5 y 1 mg/kg, evidenciaron ganancias de  $1.3 \pm 1.6\%$  y  $4.7 \pm 3.4\%$ , respectivamente. Sin embargo, los animales tratados con CDDP evidenciaron pérdidas de peso del  $8.3 \pm 3.9\%$  (Figura 3.3.12, Cuadro 3.3.4). No obstante, no se observaron muertes asociadas a la aplicación del fármaco durante el período de tratamiento.



**Figura 3.3.11 Índice mitótico y apoptótico de HCT-15 tratado con Cas Ilgli y CDDP.** Cajas de valores extremos que representan los índices mitótico y apoptóticos de los tumores originados del trasplante de HCT-15 y tratados bajo los distintos esquemas durante 21 días experimentación y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas Ilgli 0.5 mg/kg (n=5) y Cas Ilgli 1 mg/kg (n=5).  
 ○ Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.



**Figura 3.3.12 Porcentaje de pérdida de peso de los animales tratados con Cas Ilgli y CDDP.** Porcentaje de pérdida de peso de los ratones desnudos transplantados con HCT-15, bajo los distintos esquemas y tratamientos con CDDP y Cas Ilgli. Los datos representan la media y error estándar de los distintos esquemas de tratamiento; 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas Ilgli 0.5 mg/kg (n=5) y Cas Ilgli 1 mg/kg (n=5).

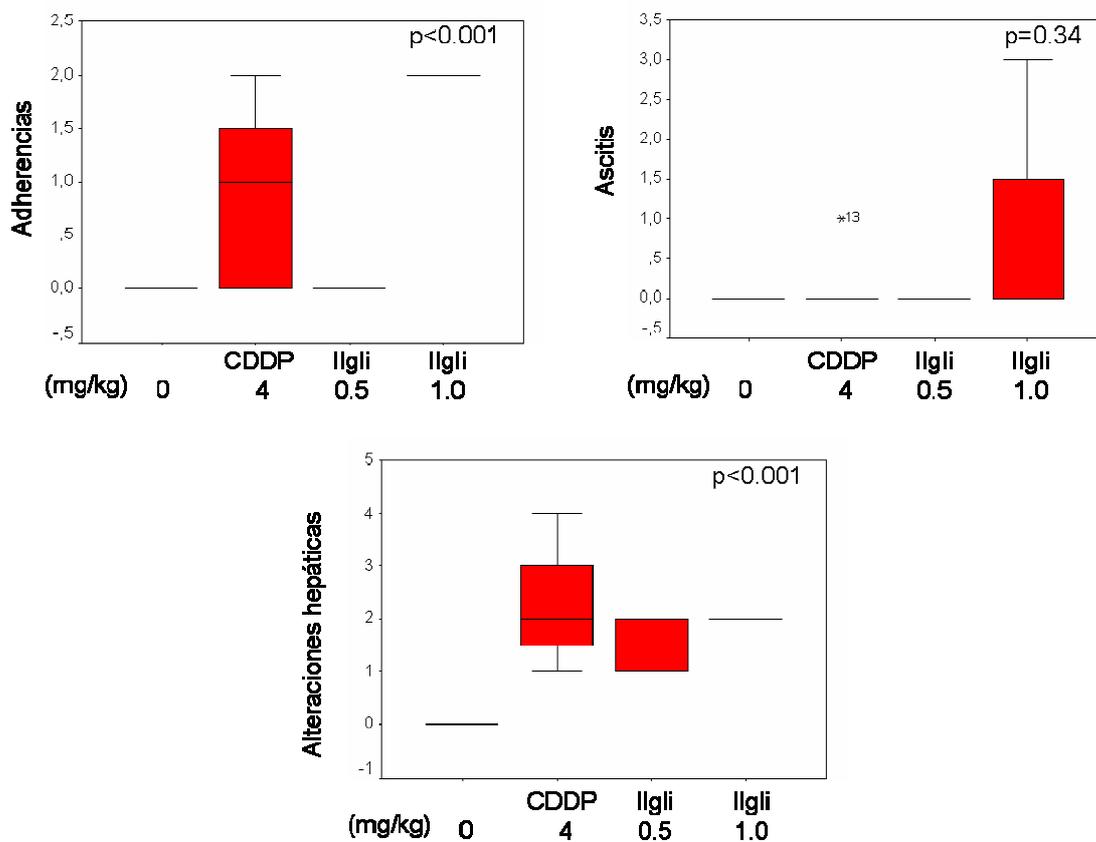
**Cuadro 3.3.4 Estadística de porcentaje de pérdida de peso al día 21 de animales tratados con Cas Ilgli y CDDP.** Literales provenientes del cálculo del Análisis de Varianza seguida de Tukey para porcentaje de pérdida de peso al día 21 de los animales transplantados con HCT-15 y tratados bajo los

distintos esquemas, 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas Iigli 0.5 mg/kg (n=5) y Cas Iigli 1 mg/kg (n=5).

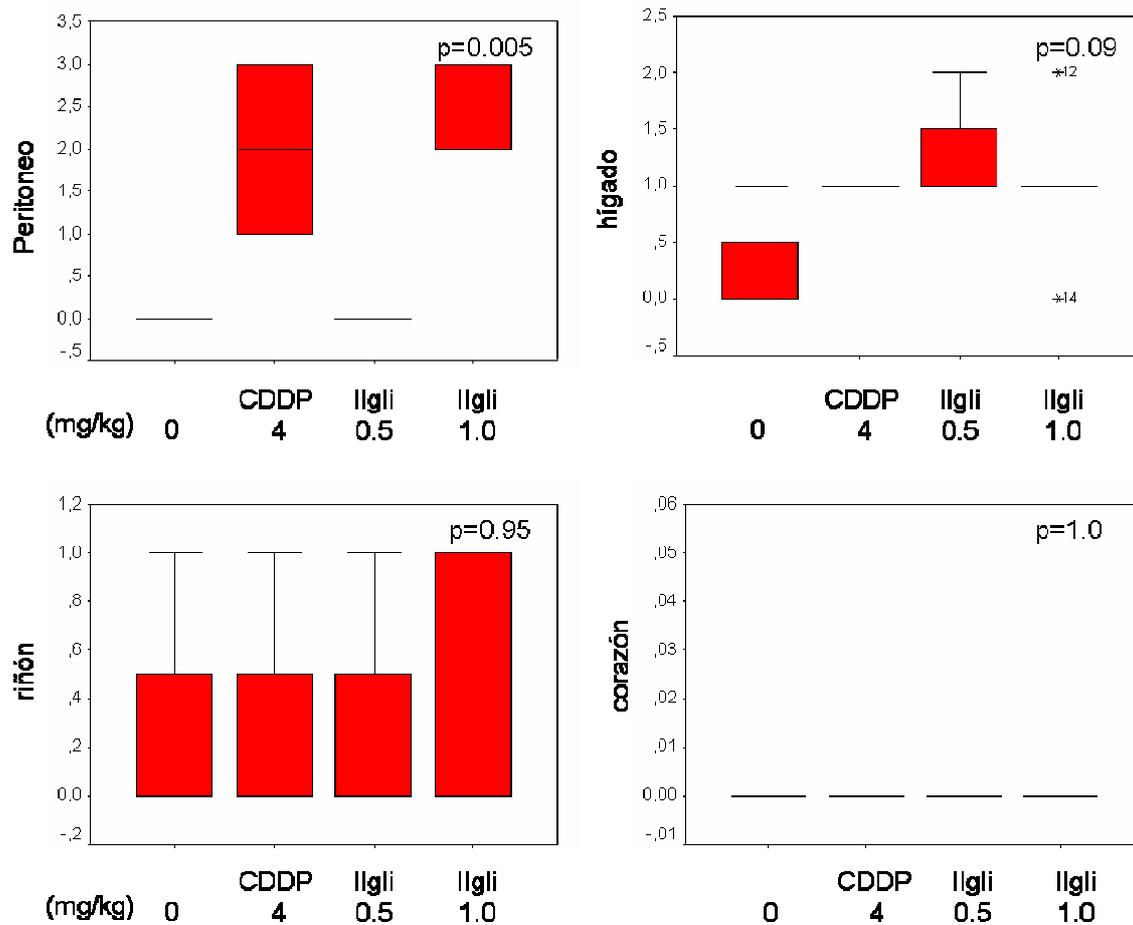
<b>Tratamiento (mg/kg)</b>	<b>literal</b>
Iigli 0.5	a
0	ab
Iigli 1	ab
CDDP	b

A la necropsia de los ratones, se observaron diferencias en lo que respecta a adherencias en los ratones tratados con CDDP y Irgli 1 mg/kg y alteraciones hepáticas en los tres grupos de tratamientos (CDDP y Cas Irgli en sus dos dosis), los que fueron estadísticamente significativos al ser comparados con el grupo testigo ( $p < 0.001$  y  $p < 0.001$ , respectivamente). Las adherencias fueron más frecuentes en la serosa intestinal, además del estómago y bazo en los animales tratados con 1 mg/kg de Cas Irgli. Las alteraciones hepáticas se observaron en todos los tratamientos, en donde las alteraciones más frecuente fueron los bordes redondeados y la tonalidad violácea. Además, con lo que respecta a la ascitis y a pesar de observarse en algunos animales, no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo en ninguno de los grupos tratados ( $p = 0.34$ ) (Figura 3.3.13).

En el análisis histológico de las distintas secciones del animal, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.005$ ) desde las muestras provenientes del peritoneo, en donde predominó engrosamiento de la serosa hepática, infiltrado por linfocitos, neutrófilos y macrófagos, además de moderada fibrina que se extendía sobre el hígado y la serosa intestinal en los ratones tratados con CDDP y Cas Irgli 1 mg/kg. Hígado, riñón y corazón no demostraron alteraciones estadísticamente significativas con respecto al testigo (Figura 3.3.14).

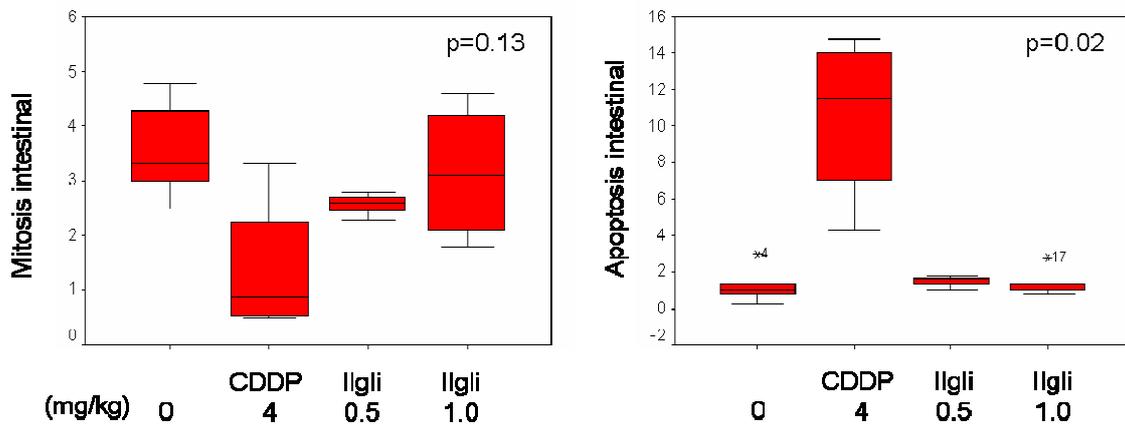


**Figura 3.3.13 Hallazgos de necropsias en animales tratados con Cas Igli y CDDP.** Cajas de valores extremos que representan adherencias, ascitis y alteraciones hepáticas de los animales tratados bajo los distintos esquemas durante 21 días experimentación; n=4 para todos los grupos. \* Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media.



**Figura 3.3.14 Hallazgos histológicos en animales tratados con Cas Igli y CDDP.** Cajas de valores extremos que representan alteraciones histológicas de peritoneo, hígado, riñón y corazón de los animales tratados bajo los distintos esquemas durante 21 días experimentación; n = 4 para todos los grupos. \* Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media.

Además, se realizó el estudio de los índices mitóticos y apoptóticos del intestino delgado (criptas duodenales), en donde no se observaron variaciones estadísticamente significativas con respecto al índice mitótico intestinal ( $p=0.13$ ) en los distintos tratamientos. No obstante, CDDP mostró inducir apoptosis en las células de las criptas ( $p=0.02$ ), alteraciones que no se hicieron evidentes en los tratamientos con Cas I/gli, en ambas dosis utilizadas (Figura 3.3.15).



**Figura 3.3.15 Índices mitótico y apoptótico duodenal proveniente de animales tratados con Cas Igli y CDDP.** Cajas de valores extremos que representan mitosis y apoptosis intestinal de los animales tratados bajo los distintos esquemas durante 21 días de experimentación; n=4 para todos los grupos. \* Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media. <sup>o</sup> Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.

### 3.4 Discusión y conclusiones

En el presente estudio, el tratamiento con la Casiopeína III-ia mostró: 1) Disminuir el volumen relativo tumoral de HCT-15 a través de inhibición de la proliferación e inducción de cambios morfológicos sugerentes de apoptosis; 2) Alcanzar el requerimiento sólo para función antitumoral y 3) producto de la vía de aplicación, inducir adherencias (producto de peritonitis) y alteraciones hepáticas, todo lo anterior de una forma proporcional a la dosis. Por su parte, la Casiopeína IIgli demostró: 1) Disminuir el volumen relativo tumoral de HCT-15 a través de la inhibición de la proliferación, sin evidencias de apoptosis como su mecanismo de muerte; 2) Alcanzar requerimientos de función antitumoral y retraso específico del crecimiento e 3) Inducir adherencias y alteraciones hepáticas de manera proporcional a la dosis. Por otro lado, CDDP (en la dosis utilizada) demostró 1) inducir apoptosis tumoral, sin embargo, 2) No alcanza actividad antitumoral ni muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto al volumen tumoral. 3) En la dosis utilizada, disminuyó el porcentaje de pérdida de peso de manera significativa, indujo adherencias (por peritonitis), alteraciones hepáticas e indujo muerte de células de las criptas duodenales. Todos estos hallazgos se pueden resumir en el cuadro 3.4.1.

Con respecto a la determinación de células en mitosis, ésta sólo refleja el número de células ciclando, sin considerar el tiempo requerido por una célula para ciclar (Brown y Gatter, 1997). Además, un tercio de tumores colorrectales con alto índice proliferativo tiene baja expresión de ARN mensajero (Jansson y Sun, 1997), por lo que la síntesis de proteínas de marcadores de ciclo tampoco son buenos marcadores. Sin embargo, al correlacionar el índice mitótico con los días en doblar el tamaño, estos son en conjunto un marcador más directo de la actividad proliferativa de un tumor, ya que considera el número de células ciclando y de forma indirecta y semicuantitativa, la velocidad de replicación. Si además agregamos variables como volumen relativo tumoral e inducción de apoptosis, nos da una relación interesante. En este estudio, la Cas III-ia y IIgli cumplieron con 4 de 5 las variables analizadas en lo que la actividad antitumoral refiere, datos que se correlacionan con una mayor actividad al ser comparado con CDDP, que sólo cumplió una de ellas. Es bien sabido que la

actividad citotóxica de CDDP se debe a la inducción de apoptosis en células tumorales (Taketo *et al.*, 1998; Kerr *et al.*, 1994), principalmente a través de la activación de caspasa 3 (Mizutani *et al.*, 2004). Sin embargo, en los estudios *in vivo* esta actividad es poco relevante por sí sola como factor pronóstico de respuesta a tratamientos (Garrity *et al.*, 2004; Elkablawy *et al.*, 2001), debiéndose de considerar otros factores en adición, más que la sola inducción de apoptosis.

Estos datos postulan a la inhibición de la proliferación como mecanismo de acción común para las Cas III-ia y IIgli. Además, sugieren a la apoptosis como mecanismo de acción *in vivo* para la Cas III-ia, datos que concuerdan con lo descrito por Trejo-Solís *et al.* (datos no publicados), quienes encontraron que el tratamiento *in vivo* con la Cas III-ia disminuyó la proliferación de Glioma C6, lo que estaba asociado a aumento de los niveles de p21 y disminución de ciclina D, aunado a inducción de apoptosis. Sin embargo, con respecto a la apoptosis y la Cas IIgli, estos datos no concuerdan con lo descrito por Trejo-Solís *et al.* (2005), quienes describen a apoptosis como su mecanismo de acción *in vivo* en glioma C6 transplantado en ratas. Además, fue Cas IIgli la droga que alcanzó los requerimientos de actividad de función antitumoral y retraso del crecimiento de manera simultánea, lo que sugiere que la descripción únicamente morfológica de apoptosis es insuficiente para describir este tipo de muerte celular, datos que concuerdan con lo descrito por Jerome *et al.* (2000), quienes describen una subestimación de la tasa de apoptosis de dos a tres veces con la sola observación histológica. Además, fue la Cas IIgli la que mostró una mayor actividad con la menor concentración molar, dato que en comparación con la Cas III-ia, la hace casi medio orden de magnitud más activa pero a la vez, medio orden de magnitud más tóxica, dato que se comprueba con el análisis histológico, en el que con las concentraciones utilizadas para cada una de las drogas ( $14$  y  $2.4 \times 10^6$   $\mu\text{M}$  para Cas III-ia y Cas IIgli, respectivamente), hubo hallazgos histológicos similares.

Los estudios macroscópicos e histológicos de los ratones tratados con todas las drogas mostraron inflamación de la serosa peritoneal y visceral. Lo anterior es producto del efecto irritativo crónico ejercido por el fármaco, lo que ocasionó

isquemia e inflamación sobre la superficie peritoneal, hechos que interfieren con la fibrinólisis y dan lugar a organización mas que resolución de la matriz fibrinocelular (di Zerega, 1994; Monk *et al.*, 1994). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias estadísticas en la pérdida de peso (como indicador de toxicidad) entre los grupos tratados con Cas III-ia o Cas IIgli con el grupo testigo negativo. La toxicidad de complejos metálicos puede ser secundaria a la acumulación en tejidos. En humanos, la sobrecarga de cobre (hasta 15 veces el consumo base) puede ser tolerado por largos períodos sin evidenciar síntomas de toxicidad. Esta tolerancia está asociada a la rápida movilización y excreción de cobre y con la inducción de mecanismos desintoxicantes, como metalotioneína, el que se une e inactiva los excesos de cobre en los tejidos (Daniel *et al.*, 2005). Además, las Casiopeínas poseen actividad similar a superóxido dismutasa (Ferrer-Sueta *et al.*, 1997) y baja inducción de inestabilidad genómica por recombinación intracromosomal (Arnaudeau *et al.*, 2000), lo que afirma que estas drogas tienen pocos efectos indeseados.

Por otra parte, los animales tratados con CDDP redujeron de peso de manera significativa y además, demostraron presentar un elevado número de células muertas (apoptosis) en las criptas intestinales al ser comparado con el grupo testigo, corroborando así su efecto tóxico en células de las criptas duodenales, las que proliferan aceleradamente. Estos resultados concuerdan con los descritos por otros autores (Monte *et al.*, 2005; Vijayalakshmi *et al.*, 2006), quienes encontraron que CDDP indujo apoptosis en las criptas intestinales de 2.3 a 4 veces, describiendo la formación de aductos, estrés oxidativo y lipoperoxidación como parte del mecanismo de daño intestinal.

No obstante, en el análisis histológico no se observó el descrito efecto nefrotóxico de CDDP (Arany, 2003; Kuhlmann *et al.*, 1997). Esto se explicaría con que Kuhlmann *et al.* (1997), usaron 6 mg/kg en dosis agudas y que además, la pureza del CDDP utilizado en esta investigación es mínimo 67%, agregando error y subdosificación al estudio.

Con base en los resultados antes descritos, se propone a las Casiopeínas III-ia y IIgli para estudios en otros tipos de tumores epiteliales de origen colorectal,

para ser establecido en una segunda fase de evaluación, esta vez en ensayos clínicos.

Se tienen las siguientes conclusiones del análisis de los resultados de este estudio:

- Cas III-ia inhibe la proliferación y dispara apoptosis en células HCT-15 transplantadas al ratón desnudo. No obstante, demostró inducir peritonitis de manera dosis dependiente en la serosa parietal y visceral.
- Cas IIgli inhibe la proliferación y alcanza todos los requerimientos de actividad antitumoral evaluados, sin embargo, y al igual que Cas III-ia, es irritante en la administración intraperitoneal.

Tratamiento			Actividad antitumoral					Efectos secundarios a aplicación de fármaco		
Fármaco	Dosis	Esquema	↓VRT	Apoptosis	Inhibición de proliferación	FA	REC	Adherencias peritoneales	Alteraciones hepáticas	Muerte de células de criptas
Cas III-ia	3 mg/kg; 7 μmol/kg	Qd 4x6	–	--	–	–	–	--	--	--
Cas III-ia	6 mg/kg; 14 μmol/kg	Qd 4x6	SI	SI	SI	SI	–	SI	SI	--
Cas IIgli	0.5 mg/kg; 1.2 μmol/kg	Qd 21	–	--	–	–	–	--	--	--
Cas IIgli	1 mg/kg; 2.4 μmol/kg	Qd 4x6	SI	--	SI	SI	SI	SI	SI	--
CDDP	4 mg/kg; 13 μmol/kg	Qd 7x4	–	SI	–	–	–	SI	SI	SI

**Cuadro 3.4.1 Resumen de efectos antitumorales y secundarios de Cas III-ia, IIgli y CDDP en ratones transplantados con HCT-15.** Comparación de los tratamientos, efectos antitumorales y efectos secundarios a la aplicación de los fármacos utilizados en el tratamiento de los ratones transplantados con HCT-15.

## **CAPÍTULO 4.** Actividad y efectos colaterales *in vivo* de las Casiopeínas® III-ia, IIgi y III-La en células de carcinoma cérvico uterino HeLa y de próstata PC-3

### **4.1 Antecedentes**

El cáncer cérvico uterino es la segunda causa más frecuente de mortalidad femenina en el mundo. Este trastorno proliferativo se desarrolla hasta carcinoma en una manera ordenada de eventos desde una lesión displásica precursora, la cuál está iniciada por una infección persistente de papiloma virus humano, HPV (zur Hausen, 2000). La terapia estándar es la cirugía radical en pacientes con enfermedad localizada y radioterapia más quimioterapia en pacientes con enfermedad más avanzada o metastásica. La radiación en conjunto con quimioterapia con Cisplatino han aumentado la sobrevida y disminuido las recurrencias y metástasis (Rose, 2003). A pesar de los grandes avances aún se necesitan mejores protocolos de tratamiento, en especial para el cáncer cervical metastático, donde el tratamiento ha sido hasta ahora paliativo. El mecanismo de acción de diferentes fármacos quimioterapéuticos, solos o en combinación con radiación, son todavía pobremente entendidos. Se han descrito más de 20 agentes con modesta actividad en este tipo de tumores, mismos que producen tasas de respuesta del 8 a 25% (Savarese y Cognetti, 2003).

Se considera que el estatus de p53 es un determinante importante en la sensibilidad de un tumor a la terapia. En condiciones normales p53 se transcribe en bajas cantidad y se degrada por Mdm-2 (Walboomers *et al.*, 1999). En pacientes con cáncer cérvico uterino, se puede encontrar el genoma de HPV en el 99.7% de los casos (zur Hausen, 2000). Los HPV de alto riesgo son los tipos 16, 18, 33, 35 y 45, los que acarrean dos oncogenes, E6 y E7, los que se unen a p53 y Rb respectivamente, para su posterior degradación por ubiquitinación. HeLa posee un estatus inalterado de p53, sin embargo, tiene altamente expresada secuencias de HPV-18, cuyo producto (E6) inactiva p53. Si la expresión de E6 es abolida, p53 se restaura como una proteína funcional,

misma que retomará sus actividades en el ciclo celular y apoptosis (Butz *et al.*, 2000).

Por otra parte, Cisplatino (CDDP) se ha transformado en un fármaco fundamental en el tratamiento de este tipo de tumores, la que en combinación con radioterapia, reducen el riesgo de muerte entre un 30 a un 50% (Rose, 2002).

Con respecto al cáncer de próstata, ésta es la forma más común de cáncer no cutáneo en hombres, con una incidencia de 179,300 casos nuevos por año, después de cáncer de pulmón en los Estados Unidos de Norteamérica (Landis *et al.*, 1998). Su incidencia ha aumentado marcadamente en las últimas dos décadas, sin embargo, la mortalidad se ha mantenido estable. Un aumento aparente en la incidencia se puede deber a mejores métodos de diagnóstico relacionados al uso del antígeno prostático específico (Ruijter *et al.*, 1999; Jarup *et al.*, 2002). Esta enfermedad tiene además, una historia natural extremadamente variable, oscilando entre desde una forma no invasiva hasta a una enfermedad metastásica y la muerte al poco tiempo de realizado el diagnóstico. Con respecto a la susceptibilidad, la población afroamericana tienen mayor incidencia del cáncer de próstata que cualquier otro grupo étnico de Estados Unidos de Norteamérica (McDonald *et al.*, 2002).

Dada la importancia de los efectos colaterales de CDDP al ser usado en dosis terapéuticas en estos tipos de neoplasias, es que se origina la búsqueda de otros metales para la síntesis de moléculas activas. Entre estos, el Cu(II) es especialmente atractivo dada su participación como parte integral del sitio activo de diferentes tipos de metalo-proteínas. A pesar de que la acción antiproliferativa de los compuestos de coordinación de Cu(II) ha sido contradictoria, resultados recientes de moléculas pequeñas con base en este metal son alentadores (Humphreys KJ *et al.*, 2001; Humphreys KJ *et al.*, 2002; Bolos *et al.*, 1998; Bolos *et al.*, 2002). Se sabe que los complejos de cobre interaccionan con el ADN, lo que da lugar al rompimiento de la molécula de la doble hebra y por ende, la actividad antitumoral (Quin *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2003; Chaviara *et al.*, 2004). Por otra parte, dada la presencia de Cu(II) en su

centro metálico, tendría la capacidad de participar en ciclos REDOX y liberar especies reactivas de oxígeno (Kuwabara *et al.*, 1986; Kuwabara y Sigman, 1987).

Con base en lo anterior y producto de la importancia mundial del cáncer cérvico uterino y cáncer de próstata en la población humana, se decide realizar este estudio con la finalidad de evaluar el efecto antitumoral de las Casiopeínas III-ia, IIgli y III-La en estos tumores transplantados al ratón desnudo, además de estudiar sus efectos colaterales con las dosis terapéuticas obtenidas del estudio con cáncer de colon.

## **OBJETIVOS**

Evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de las Casiopeínas<sup>®</sup> IIIia, IIgli y III-La contra las líneas tumorales humanas de próstata *PC-3* y cérvico uterinas *HeLa* transplantadas a ratones desnudos.

Evaluar efectos colaterales a la aplicación de las Casiopeínas<sup>®</sup> IIIia, IIgli y III-La en los ratones xenotransplantados con *HeLa* y *PC-3*, con base en hallazgos macroscópicos y pérdida de peso animal. Además, evaluar los valores de hemograma en los animales transplantados con *HeLa*.

## 4.2 Material y métodos

**4.2.1 Fármacos:** Para este estudio, se utilizaron las Casiopeínas (Cas) III-ia, IIgli y III-La. Las Cas III-ia y IIgli fueron descritas en el capítulo número 2. A continuación se describe la Cas III-La.

### Casiopeína III-La

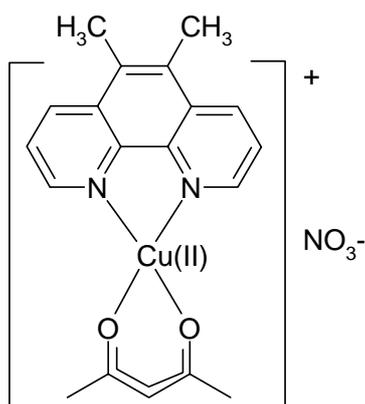


Figura 4.2.1 Casiopeína III-La

a) **Nombre común:** Casiopeína III-La

b) **Clave:** Cas III-La

c) **Fórmula:**  $[\text{Cu}(\text{5,6-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetionato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

d) **Fórmula condensada:**  $\text{CuC}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{19} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

e) **Peso molecular:** 468.95 g/mol (con moléculas de agua de cristalización).

f) **Análisis elemental:**

Teórico: 8.9% N, 48.7% C, 4.9%H

Experimental: 8.8 % N, 48.4 % C, 4.9 % H

g) **Solubilidad:**

Soluble en  $\text{H}_2\text{O}$ , EtOH, MeOH

No es estable por debajo de pH 6

Amortiguadores recomendados: MOPS y TRIS

**4.2.2 Estudios *in vivo* con HeLa (carcinoma cérvico uterino) y PC-3 (carcinoma prostático)**

Las células HeLa y PC-3 fueron descongeladas y proliferadas al igual que HCT-15.

Características de las células HeLa (ATCC):

- Organismo: *Homo sapiens* (humano)
- Género: hembra
- Raza: negra
- Edad: 31 años
- Órgano: cérvix uterino
- Enfermedad: adenocarcinoma de cérvix
- Morfología: epitelial
- Propiedades de crecimiento: adherente
- Propagación: medio mínimo esencial con 0.2 mM de L-glutamina ajustado para contener 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 4.5 g/L de glucosa 10 mM de HEPES y 1 mM de piruvato de sodio; adicionar al 10% con suero fetal bovino.
- Temperatura: 37° C
- Atmósfera: 5% CO<sub>2</sub>

### Características de las células PC-3 (ATCC):

- Organismo: *Homo sapiens* (humano)
- Edad: 62 años
- Género: macho
- Órgano: próstata (derivado de metástasis en hueso)
- Enfermedad: adenocarcinoma prostático
- Clasificación: grado IV
- Morfología: epitelial
- Propiedades de crecimiento: adherente
- Propagación: RPMI 1640 con 0.2 mM de L-glutamina ajustado para contener 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 4.5 g/L de glucosa 10 mM de HEPES y 1 mM de piruvato de sodio; Adicionar al 10% con suero fetal bovino.
- Temperatura: 37° C
- Atmósfera: 5% CO<sub>2</sub>

Los procedimientos siguientes fueron realizados independientemente, tanto para los animales transplantados con HeLa como para aquellos transplantados con PC-3. Se inocularon  $1 \times 10^6$  células subcutáneamente en el área del flanco izquierdo inferior de 25 ratones machos desnudos nu/nu (Harlan México, S.A. de C.V.). Se consideró día de inicio de tratamientos (día 0) aquel en el que el tumor midiera 3 mm de diámetro. Los animales fueron distribuidos al azar en los distintos grupos: testigo, agua destilada estéril (n=5); Cas III-ia 6.0 mg/kg (n=5) cada 4 días por 7 dosis; Cas IIgli 1 mg/kg (n=5) cada 4 días por 7 dosis; Cisplatino 2.5 mg/kg (n=5) cada 4 días por 7 dosis. Además, se utilizó la Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5) cada 4 días por 7 dosis, debido a alentadores resultados obtenidos en un estudio QSAR paralelo al presente. Los animales fueron pesados y los tumores medidos a lo largo y ancho usando calibradores Vernier diariamente. Usando una fórmula establecida, las medidas fueron convertidas en tamaño tumoral (cm<sup>3</sup>).

$$\text{Tamaño tumoral} = \frac{[\text{longitud}(\text{cm}) \times \text{ancho}^2(\text{cm}) \times \pi]}{6}$$

Usando las medias de los volúmenes relativos tumorales (VRT) (Vol. día X / Vol. día 0) x 100 para cada grupo, se calculó la función del fármaco como posible antitumoral como sigue:

$$\text{Función antitumoral} = (VRT_{\text{tratado}} / VRT_{\text{testigo}}) \times 100$$

Este índice debe ser menor a 42 para considerar al fármaco con actividad antineoplásica.

Asimismo, se calculó el retraso del crecimiento específico considerando la media de los días que demora el tumor en doblar su tamaño (D), en los distintos grupos como sigue:

$$\text{Retraso específico de crecimiento} = (D_{\text{tratado}} - D_{\text{testigo}}) / D_{\text{testigo}}$$

Para considerar que el fármaco posee potencial antineoplásico, este índice debe ser menor o igual a 2.

El porcentaje de la pérdida de peso del animal, como indicador de toxicidad, fue calculado para cada individuo como sigue:

$$\% \text{ pérdida de peso} = [(Peso \text{ al día } 24 / Peso \text{ al día } 0) - 1] \times 100$$

Para aquellos animales transplantados con PC-3, el experimento terminó 48 horas después de la última aplicación del fármaco y posteriormente se les realizó la eutanasia en cámara de CO<sub>2</sub>.

#### **4.2.3 Hemograma**

Desde los animales transplantados con HeLa y tratados con los distintos fármacos, se obtuvo alrededor de 1 mL de sangre de cada uno de los ratones a través de sangrado yugular 48 horas después del último tratamiento. La sangre

se depositó y agitó en tubos con heparina como anticoagulante, para su posterior procesamiento.

La sangre fue procesada en la Sección de Patología Clínica del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, siguiendo los estándares del departamento.

Se analizó: hematocrito, eritrocitos, volumen globular medio (VGM), plaquetas, proteínas totales, fibrinógeno, leucocitos, neutrófilos y linfocitos. Se consideraron como valores de referencia aquellos obtenidos en el grupo testigo.

#### **4.2.4 Necropsia e histopatología**

Para todos los grupos, una vez hecha la eutanasia de los animales en una cámara de CO<sub>2</sub>, los animales fueron colocados en decúbito dorsal sobre una charola de disección y se sostuvieron de los cuatro miembros con alfileres. Se humedeció la región ventral con alcohol etílico y se incidieron las cavidades abdominal, torácica y craneal para identificar y describir las lesiones macroscópicas.

Los grados de las lesiones macroscópicas fueron asignados de acuerdo a su gravedad y fueron clasificados de la siguiente forma:

- a. Adherencias: Se asignó 1 al haber menos de 5 adherencias entre las asas intestinales; 2 al haber más de 5 adherencias e involucrar estómago y bazo; 3 al haber lo descrito en 2 y encontrarse adherencias con la pared peritoneal.
- b. Ascitis: 1 al haber ligera cantidad de líquido transparente; 2 al encontrarse moderado a abundante líquido transparente; 3 al ser el líquido rojo (sanguinolento).

- c. Alteraciones hepáticas: Se asignó 1 al tener bordes redondeados y palidez ligera; 2 al tener bordes moderadamente redondeados y tonalidad violácea; 3 al tener bordes gravemente redondeados y color rojo oscuro. Además, se asignó 4 al encontrarse el órgano de menor tamaño y peso, alteración compatible con atrofia.

#### 4.2.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos desde los experimentos *in vivo* fueron analizados con la prueba de Kruskal Wallis para análisis de rangos con el programa *Analyst*<sup>®</sup> de SAS<sup>®</sup> 8.0 for Windows, a excepción del porcentaje de pérdida de peso animal y hemograma, los que fueron revisados por análisis de varianza seguida de Tukey. La significancia utilizada en todos los estudios fue de 0.05.

Para los datos de VRT analizados con Kruskal Wallis, una vez demostrada una diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ), se procedió al cálculo del intervalo de confianza. Para esto, se utilizó el cálculo de  $\hat{\phi}$  utilizando un contraste ortogonal (-1 1), el cual se realizó de la siguiente manera:

$$\hat{\phi} = \bar{R}_1 - \bar{R}_2$$

en donde:

$\bar{R}_1$  = media de rangos del grupo 1 a comparar

$\bar{R}_2$  = media de rangos del grupo 2 a comparar

La varianza de  $\hat{\phi}$  se calculó de la siguiente manera:

$$Var(\hat{\phi}) = \frac{N(N+1)}{12} \sum_{k=1}^K \frac{a_k^2}{n}$$

En donde  $a$  = contraste correspondiente (-1 o 1) y  $N$  = tamaño de la población en estudio.

Con estos datos, ya es posible el cálculo del intervalo confianza, como sigue:

$$\hat{\phi} \pm \sqrt{\chi_{k-1}^2, 0,95} \sqrt{Var\hat{\phi}}$$

Para asegurar que dos grupos son estadísticamente diferentes entre sí, el intervalo de confianza no debe involucrar el cero (0). Si lo involucra, quiere decir que no hay diferencia significativa entre los grupos ( $P > 0,05$ ).

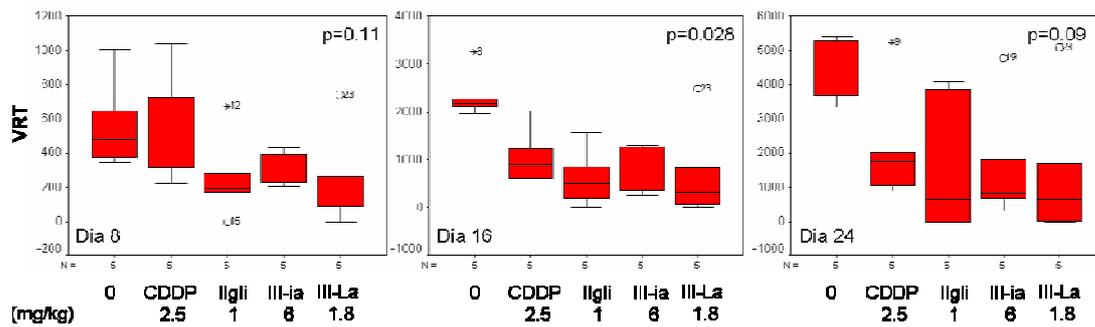
## 4.3 Resultados

### 4.3.1 HeLa

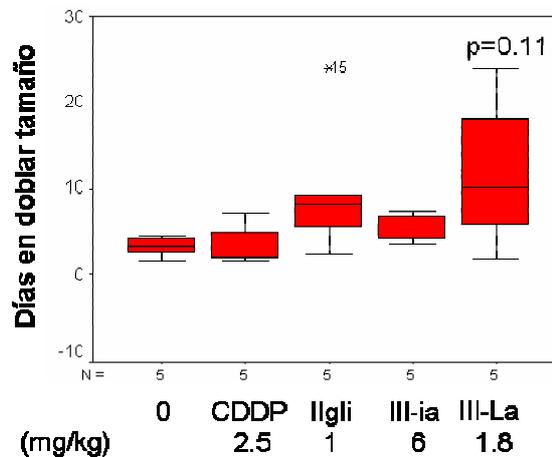
Para determinar si las Casiopeínas III-ia, Ilgli y III-La aplicadas intraperitonealmente ejercían una actividad antitumoral sobre HeLa transplantada al ratón desnudo, se calculó el volumen relativo tumoral (VRT), la función antitumoral, los días en doblar el tamaño y el retraso específico del crecimiento.

Con respecto al VRT en los días 8, 16 y 24 (Figura 4.3.1), sólo se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en el día 16 ( $p=0.028$ ). Además, al realizar el cálculo de intervalo de confianza, se observó que esta diferencia sólo se manifestaba entre los distintos grupos de tratamiento con el testigo, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre CDDP, Ilgli, III-ia y III-La (Anexo 6).

Sumado a lo anterior, al analizar los días que demora el tumor en doblar su tamaño en los distintos grupos (Figura 4.3.2), ningún tratamiento demostró aumentar este indicador de manera significativa ( $p=0.11$ ).



**Figura 4.3.1 Volumen relativo tumoral de HeLa tratado con CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.** Cajas de valores extremos que representan el volumen relativo tumoral (VRT) de los tumores originados del trasplante de HeLa en los días 8, 16 y 24 de experimentación y tratados cada cuatro días con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgli 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). \* Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media. O Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.



**Figura 4.3.2 Días en doblar el tamaño de HeLa tratado con CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.** Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del trasplante de HeLa y tratados cada cuatro días con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgli 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). \* Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media.

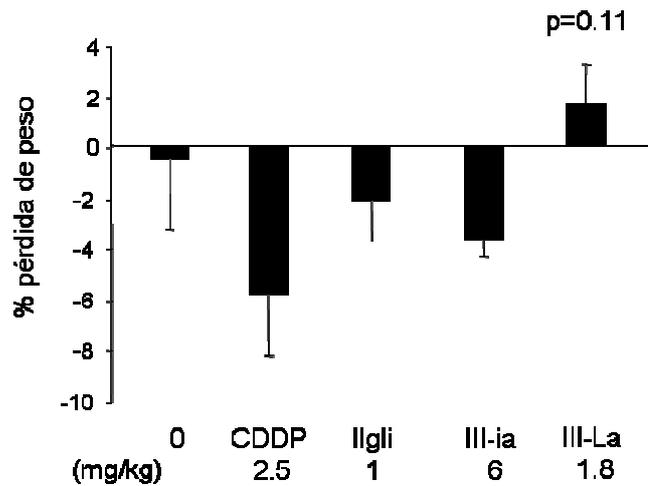
Sin embargo, a pesar de los resultados estadísticos obtenidos con el volumen relativo tumoral y los días en doblar el tamaño, al calcular los índices de función antitumoral y retraso específico de crecimiento, se observó actividad antitumoral. El requerimiento de función antitumoral, que debe ser menor a 42%, fue cubierto por las Cas III-ia y la Cas III-La. Por otra parte, el requerimiento de retraso específico de crecimiento, que debe ser mayor o igual a 2, fue alcanzado por las Cas IIgli y la Cas III-La (Cuadro 4.3.1). Estos datos postulan a la Cas III-La como la más activa sobre HeLa, en este modelo y esquema de tratamiento.

Con respecto a la toxicidad ejercida por los distintos tratamientos, la que se manifestó a través del porcentaje de pérdida de peso (Figura 4.3.3), no se observaron diferencias entre los distintos grupos de tratamiento ( $p=0.11$ ).

Además, el análisis de hemograma de los ratones bajo los distintos esquemas sólo arrojó diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.046$ ) entre el promedio observado para proteínas totales en el tratamiento con Cas III-La y CDDP. Estos datos se representan en el cuadro 4.3.2 y se comparan en el cuadro 4.3.3.

**Cuadro 4.3.1 Actividad antitumoral *in vivo* sobre HeLa de CDDP, Cas II-gli, Cas III-ia y Cas III-La.** Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 24 de experimentación.

<b>Tratamientos</b>	<b>n</b>	<b>FA</b>	<b>REC</b>
<b>Testigo (Agua destilada)</b>	<b>5</b>	<b>—</b>	<b>—</b>
<b>CDDP 2.5 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>50.1</b>	<b>0.28</b>
<b>Casiopéina II-gli 1 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>48.9</b>	<b>2.03</b>
<b>Casiopéina III-ia 6 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>38.8</b>	<b>0.77</b>
<b>Casiopéina III-La 1.8 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>33.8</b>	<b>2.7</b>



**Figura 4.3.3** Porcentaje de pérdida de peso de los animales transplantados con HeLa y tratados con CDDP, Cas Iigli, Cas III-ia y Cas III-La. Porcentaje de pérdida de peso al día 24 de investigación de los ratones desnudos transplantados con HeLa y tratados cada cuatro días con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Iigli 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). Los datos representan la media y error estándar de los distintos esquemas de tratamiento.

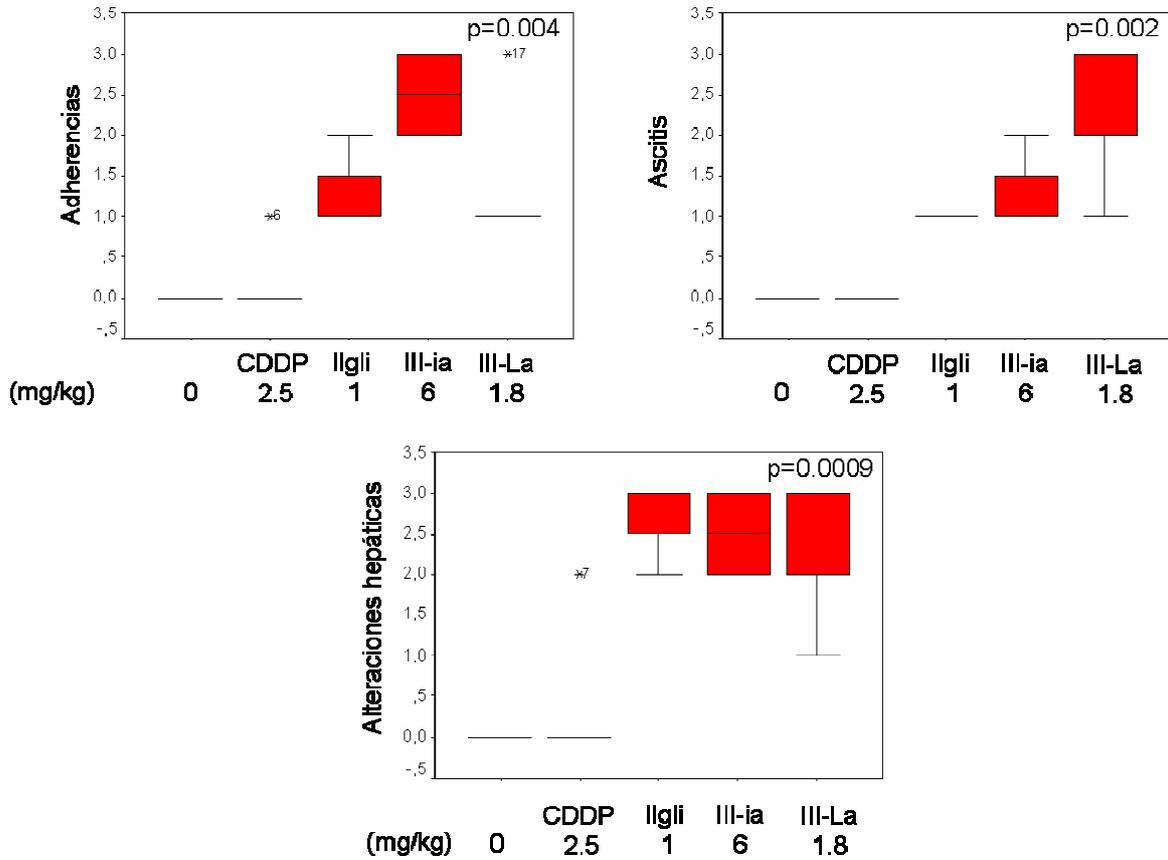
**Cuadro 4.3.2 Hemograma de ratones transplantados con HeLa y tratados con CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.** Valores de hemograma de los ratones desnudos transplantados con HeLa y tratados cada cuatro días con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgli 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). Los datos representan la media y error estándar de los distintos esquemas de tratamiento. \*p<0.05.

Variable	Tratamientos					unidades
	testigo	CDDP 2.5	Ilgli 1.0	IIIia 6.0	III-La 1.8	
Hematócrito	0.44 ± 0.03	0.39 ± 0.04	0.45 ± 0.04	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.01	L/L
Eritrocitos	9 ± 0.97	8.1 ± 1.34	8 ± 1.19	8.23 ± 0.78	8.31 ± 0.67	x10 <sup>12</sup> /L
VGM	49 ± 5.20	46.75 ± 7.05	53.5 ± 7.12	51.57 ± 5.38	52.60 ± 3.57	ft
Plaquetas	828 ± 365.65	838.88 ± 201.89	846.75 ± 185.17	836.86 ± 260.80	740.66 ± 338.30	x10 <sup>9</sup> /L
Prot. totales	66.43 ± 4.79	69.33 ± 7.83	63 ± 2.97	63.43 ± 5.09	60.16 ± 5.71 *	g/L
Fibrinógeno	4.29 ± 3.30	3.11 ± 1.17	4.17 ± 2.99	4 ± 0.82	3.16 ± 1.47	g/L
Leucocitos	5.24 ± 2.37	3.64 ± 2.43	5.88 ± 1.67	4.61 ± 2.85	6.16 ± 3.70	x10 <sup>9</sup> /L
Neutrófilos	2.67 ± 1.44	1.93 ± 1.20	3.17 ± 2.26	3.14 ± 2.10	4.70 ± 3.90	x10 <sup>9</sup> /L
Linfocitos	2.00 ± 1.28	1.25 ± 1.71	2.00 ± 1.37	1.29 ± 1.56	1.16 ± 0.94	x10 <sup>9</sup> /L

**Cuadro 4.3.3 Estadística de proteínas totales en el hemograma de animales tratados con CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.** Literales provenientes del cálculo del análisis de varianza seguida de Tukey para proteínas totales al día 24 de los animales transplantados con HeLa y tratados cada cuatro días con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgli 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5).

Tratamiento (mg/kg)	literal
III-La 1.8 mg/kg	a
Ilgli 1 mg/kg	ab
III-ia 6 mg/kg	ab
Testigo	ab
CDDP 2.5 mg/kg	b

En la necropsia de los ratones, se observaron múltiples adherencias y alteraciones hepáticas en los tres grupos de tratamientos con Casiopeínas, los que fueron estadísticamente significativos al ser comparados con el grupo testigo ( $p=0.004$  y  $p=0.0009$  respectivamente). Además, se observó ascitis con moderado a abundante líquido transparente de manera estadísticamente significativa ( $p=0.002$ ) en los grupos tratados, siendo observada esta alteración con mayor gravedad en los animales tratados con Cas III-La (Figura 4.3.4).



**Figura 4.3.4 Hallazgos de necropsias en animales tratados con CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.** Cajas de valores extremos que representan adherencias, ascitis y alteraciones hepáticas de los animales transplantados con HeLa y tratados bajo los distintos esquemas durante 24 días experimentación; n=4 para todos los grupos. \* Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media.

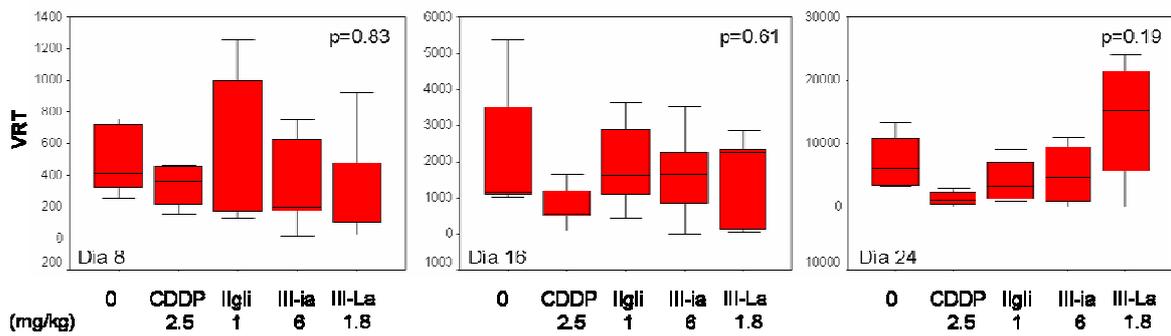
### 4.3.2 PC-3

Para determinar si las Cas III-ia, Ilgli y III-La aplicadas intraperitonealmente ejercían una actividad antitumoral sobre PC-3 transplantada al ratón desnudo, se calculó el volumen relativo tumoral (VRT), la función antitumoral, los días en doblar el tamaño y el retraso específico del crecimiento.

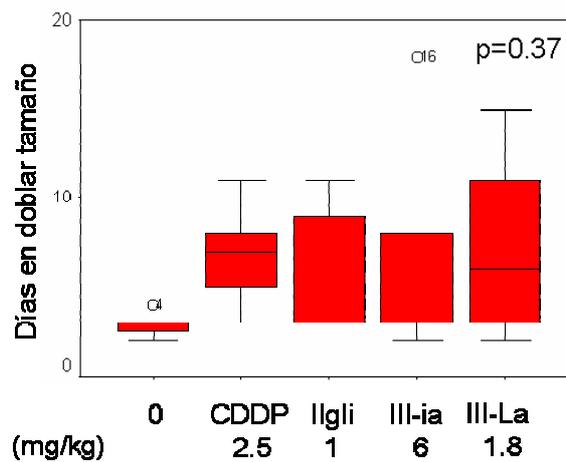
Con respecto al VRT en los días 8, 16 y 24 (Figura 4.3.5), y a los días en doblar el tamaño (Figura 4.3.6) no hay diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos ( $p > 0.05$ ).

Sin embargo, a pesar de los resultados estadísticos obtenidos con el volumen relativo tumoral y los días en doblar el tamaño, al calcular el índice de función antitumoral se observó que CDDP tenía actividad antitumoral. El requerimiento de función antitumoral, que debe ser menor a 42%, fue cubierto por la CDDP. Sin embargo, el requerimiento de retraso específico de crecimiento, que debe ser mayor o igual a 2, no fue alcanzado por ninguno de los tratamientos (cuadro 4.3.4).

Con respecto a la toxicidad ejercida por los distintos tratamientos, la que se manifestó a través del porcentaje de pérdida de peso (Figura 4.3.7), no se observaron diferencias entre los distintos grupos de tratamiento ( $p = 0.062$ ).



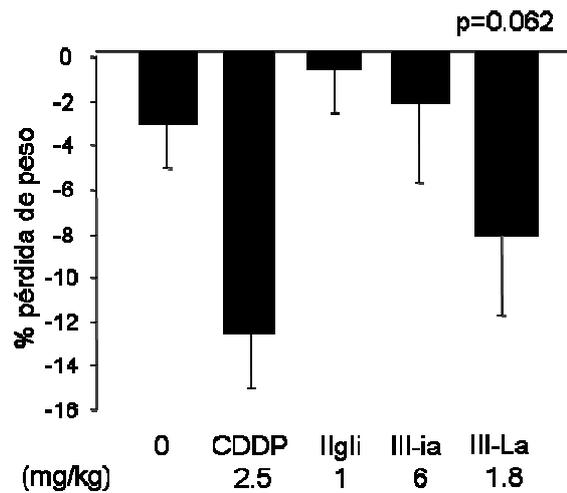
**Figura 4.3.5 Volumen relativo tumoral de PC-3 tratado con CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.** Cajas de valores extremos que representan el volumen relativo tumoral (VRT) de los tumores originados del transplante de PC-3 en los días 8, 16 y 24 de experimentación y tratados cada cuatro días con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgli 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5).



**Figura 4.3.6 Días en doblar el tamaño de PC-3 tratado con CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.** Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del transplante de PC-3 y tratados cada cuatro días con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgli 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). ○ Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.

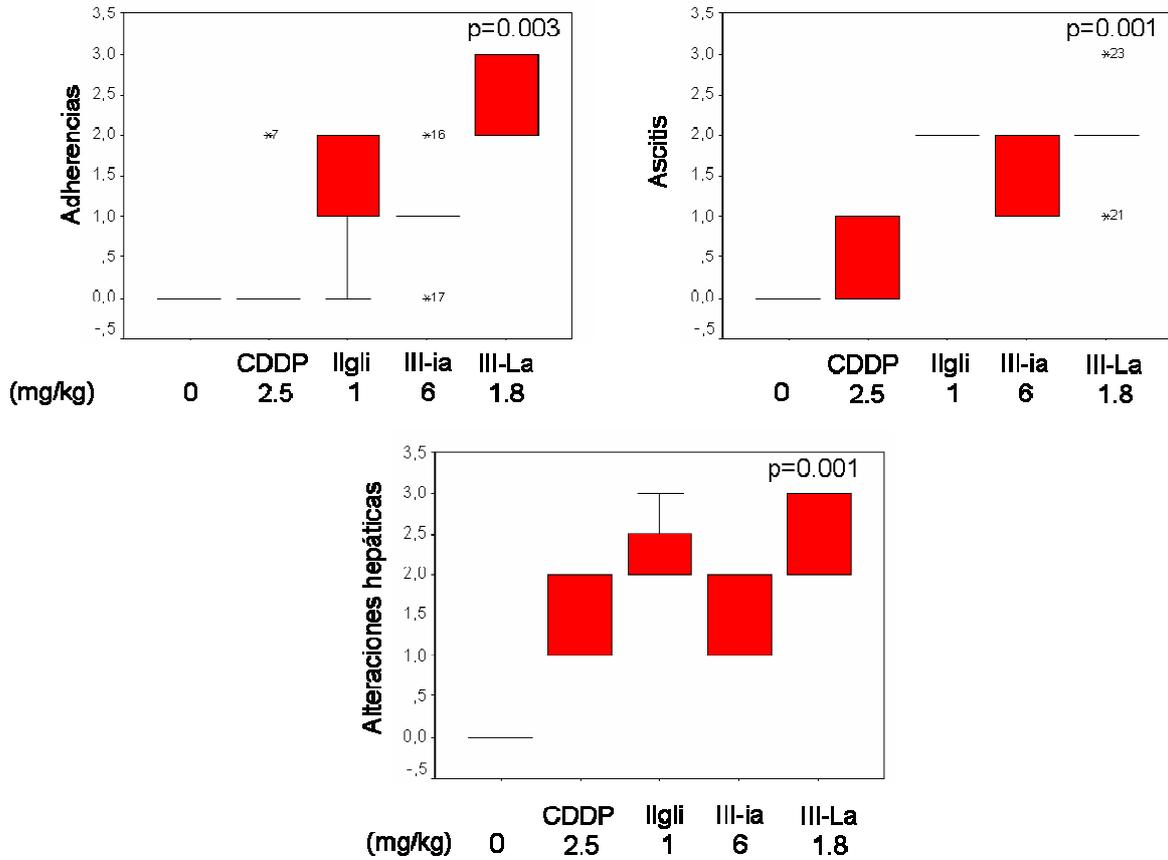
**Cuadro 4.3.4 Actividad antitumoral *in vivo* sobre HeLa de CDDP, Cas IIgli, Cas III-ia y Cas III-La.** Efectos antitumorales *in vivo* de cisplatino (CDDP), Casiopeínas III-ia, IIgli y III-La. Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 24 de experimentación.

<b>Tratamientos</b>	<b>n</b>	<b>FA</b>	<b>REC</b>
<b>Testigo (Agua destilada)</b>	<b>5</b>	<b>—</b>	<b>—</b>
<b>CDDP 2.5 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>17.9</b>	<b>1.1</b>
<b>Casiopeína II-gli 1 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>58.1</b>	<b>0.6</b>
<b>Casiopeína III-ia 6 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>71.7</b>	<b>1.4</b>
<b>Casiopeína III-La 1.8 mg/kg</b>	<b>5</b>	<b>190.7</b>	<b>1.2</b>



**Figura 4.3.7 Porcentaje de pérdida de peso de los animales transplantados con PC-3 y tratados con CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.** Porcentaje de pérdida de peso al día 24 de investigación de los ratones desnudos transplantados con PC-3 y tratados cada cuatro días con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgli 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). Los datos representan la media y error estándar de los distintos esquemas de tratamiento.

En la necropsia de los ratones, de manera similar que con lo observado en los ratones transplantados con HeLa, se encontraron múltiples adherencias, ascitis y alteraciones hepáticas en los tres grupos de tratamientos con Casiopeínas, los que fueron estadísticamente significativos al ser comparados con el grupo testigo ( $p=0.003$ ,  $p=0.001$  y  $p=0.001$  respectivamente). Con respecto a las adherencias, la Cas III-La fue la droga que indujo esta alteración de manera más grave, observándose compromiso entre la serosa intestinal, hígado y cavidad peritoneal (Figura 4.3.8).



**Figura 4.3.8 Hallazgos de necropsias en animales tratados con CDDP, Cas Ilgli, Cas III-ia y Cas III-La.** Cajas de valores extremos que representan adherencias, ascitis y alteraciones hepáticas de los animales transplantados con PC-3 y tratados bajo los distintos esquemas durante 24 días experimentación; n=4 para todos los grupos.

#### 4.4 Discusión y conclusiones

Con los datos obtenidos en este estudio, podemos concluir que las Casiopeínas IIgli y III-ia son activas sobre HeLa transplantada en el ratón desnudo, sin embargo, la Cas III-La cumple con los requerimientos de actividad antitumoral. No obstante esta actividad, ésta droga produce leve disminución estadística en las proteínas totales en el hemograma. Contrariamente, las Casiopeínas no mostraron actividad sobre PC-3. Sin embargo, CDDP fue parcialmente activo sobre PC-3 transplantado al ratón desnudo, al cubrir el requerimiento de función antitumoral. Además, al igual que lo observado en el capítulo 2 del presente estudio, la aplicación de Casiopeínas de manera intraperitoneal induce inflamación crónica peritoneal. Lo anterior debe de ser evaluado más cuidadosamente en otros estudios, con la finalidad de determinar alternativas en las vías de administración de las Casiopeínas y evitar efectos secundarios inflamatorios en el sitio de administración del fármaco.

Con respecto a los datos obtenidos desde los ratones desnudos transplantados con HeLa, la Cas III-La demostró cubrir los requerimientos de función antitumoral y retraso específico del crecimiento, además de exhibir diferencias estadísticamente significativas en el VRT al día 16. Lo anterior concuerda con un estudio *in vivo* realizado en nuestro grupo con ratones desnudos transplantados con glioblastoma U-373, en donde Cas III-La (y no Cas IIgli) cumple los requerimientos antitumorales de actividad con la mitad de la dosis utilizada en el presente experimento, pero aplicándose diariamente por 21 días (Rico-Morales *et al.*, 2006). No existen en el grupo de trabajo hasta la fecha, otros estudios *in vivo* realizados con células HeLa.

Adicionalmente, en estudios *in vitro* realizados con diferentes Casiopeínas, se postula a la Cas III-La como la más activa frente a HeLa, al ser comparada con las Cas III-ia, Cas IIgli y otros componentes de esta familia (García-Pérez, 2006). Con respecto a esto, un estudio QSAR realizado con varias Casiopeínas, perfila a la Cas III-La como una de las más activas sobre células HeLa (Bravo-Gómez ME, comunicación personal).

Se conoce que las células HeLa tienen metabolismo de tipo oxidativo, lo que implica que la mitocondria participa esencialmente en el proceso proliferativo (Rodríguez-Enríquez, 2006). Por otra parte, se demostró que las Casiopeínas III-ia y IIgli son capaces de bloquear la fosforilación oxidativa (Marín-Hernández *et al.*, 2003), razón por la que evidenciaría la actividad antitumoral observada en el presente estudio. Por ende, tal como se discutió en cáncer de colon, el uso de drogas catiónicas lipofílicas, como las Casiopeínas, estaría recomendado. El hecho de ser catiónico y lipofílico permite que este tipo de drogas se acumulen y permanezcan por períodos largos preferentemente en células tumorales, promoviendo así la inhibición de la función mitocondrial (Davis *et al.*, 1985; Fantin *et al.*, 2002). No obstante, debe aun ser demostrado el o los sitios exactos de acción de las Casiopeínas y sus derivados, ya que está descrito que algunas drogas con base en Cu(II) tienen su actividad a través del rompimiento del ADN.

En los últimos años, la radiación y la quimioterapia han sido de gran ayuda para el tratamiento del cáncer cérvico uterino avanzado, comparado con la tradicional terapia de radiación (Rose, 2002). Dentro de la quimioterapia utilizada, CDDP se ha vuelto parte fundamental del tratamiento (Koivusalo *et al.*, 2002, 2004, 2005). En este trabajo se demuestra la actividad de la Cas III-La sobre HeLa *in vivo*, que supera a la actividad exhibida por CDDP, por lo que se propone para ser analizado en el tratamiento del cáncer cérvico uterino.

En relación con el cáncer de próstata, sólo CDDP fue activo en la dosis y esquemas utilizados, lo que concuerda con lo descrito en otro estudio (Hanigan *et al.*, 1999), en el que se evidenció actividad antitumoral parcial en tumores PC-3 transplantados en el ratón desnudo, con la misma dosis de CDDP pero aplicada una vez a la semana, sin evidencias de toxicidad.

Contrariamente, las Casiopeínas utilizadas no mostraron actividad antitumoral sobre las células de carcinoma prostático PC-3. Se postula que este efecto es debido a que las células malignas de cáncer prostático, en particular la línea PC-3 (andrógeno independiente), mantienen una alta capacidad antioxidante, incluso en presencia de agentes estresantes (Lim *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

Lo anterior es producto de la sobre expresión de sistemas antioxidantes (particularmente GSH), lo que da lugar a la pérdida de sensibilidad por estrés oxidativo. Se demostró en estudios anteriores, que parte de la actividad antitumoral de algunas Casiopeínas se debían a la generación de especies reactivas de oxígeno (de Vizcaya *et al.*, 2000; Trejo-Solís, 2005), hecho que explicaría parcialmente la nula actividad observada en esta línea celular. No obstante, se necesitarían mayores estudios para clarificar este postulado.

Por otra parte, los ratones transplantados con HeLa y PC-3 exhibieron alteraciones a la necropsia compatibles con toxicidad con las tres Casiopeínas utilizadas. Lo anterior es producto del efecto irritativo crónico ejercido por los fármacos, lo que ocasiona inflamación crónica sobre la superficie peritoneal, hecho que interfiere con la fibrinólisis y da lugar a organización de la matriz fibrinocelular, lo que se evidencia a través de generación de adherencias (di Zerega, 1994; Monk *et al.*, 1994). Adicionalmente, el tratamiento con la Cas III-La (la más activa de las Casiopeínas utilizadas en este estudio), demostró afectar otro indicador de toxicidad, al disminuir el valor de proteínas totales en el hemograma. Las causas se pueden relacionar a mala nutrición, enfermedad hepática o enteropatía con pérdida de proteínas (Arnold *et al.*, 2001). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias estadísticas en la pérdida de peso (como indicador de toxicidad) entre los grupos tratados con Cas III-ia o Cas IIgli con el grupo testigo negativo. Son necesarios estudios complementarios para establecer la causa de la hipoproteinemia observada.

Con base en este estudio se tienen las siguientes conclusiones:

- Las Cas IIgli, III-ia y III-La tienen actividad antitumoral sobre HeLa transplantado al ratón desnudo en las dosis utilizadas, siendo la Cas III-La la droga que demuestra la mayor actividad, pero muestra una ligera toxicidad, al inducir disminución de las proteínas totales en el hemograma.

- Las Casiopeínas utilizadas no son activas sobre PC-3 transplantedo al ratón desnudo.

## CONCLUSIONES FINALES

- La Casiopeína III-ia disminuye la viabilidad e induce apoptosis *in vitro* de HCT-15 de manera dosis dependiente, lo que se relaciona con el aumento de los niveles de Bax y la activación de caspasas. No obstante, no influye en la duración de las distintas etapas del ciclo celular. Adicionalmente, Cas III-ia inhibe la proliferación y dispara apoptosis en células HCT-15 transplantadas en el ratón desnudo. No obstante, demostró inducir peritonitis de manera dosis dependiente en la serosa parietal y visceral.
- La Casiopeína IIgli disminuye parcialmente la viabilidad de HCT-15 *in vitro* a través de la generación de especies reactivas de oxígeno. Además, induce apoptosis, la que está relacionada con la activación de caspasas. Por otra parte, Cas IIgli inhibe la proliferación y alcanza todos los requerimientos de actividad antitumoral evaluados *in vivo*, sin embargo y al igual que Cas III-ia, es irritante cuando se administra por vía intraperitoneal.
- Las Cas IIgli, III-ia y III-La tienen actividad antitumoral parcial sobre HeLa transplantada en el ratón desnudo en las dosis utilizadas, siendo la Cas III-La la droga que demuestra la mayor actividad, hecho que se ve opacado por una ligera toxicidad, al inducir disminución de las proteínas totales en el hemograma. No obstante, este dato requiere de estudios posteriores para evaluar su mecanismo.
- Las Casiopeínas utilizadas no son activas sobre PC-3 transplantado en el ratón desnudo.

## 6. ANEXOS

**Anexo 1.** Cálculo del intervalo de confianza, basado en los rangos obtenidos por la prueba de Kruskal Wallis, para la viabilidad sin NAC obtenida por sulforrodamina 24h post-tratamiento con Casiopeína IIgli

Contraste	Estimado ( $\phi$ )	Límite inferior	Límite superior
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{1.25}$	16.25 *	10.48	22.01
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{2.5}$	15.75 *	9.98	21.51
$\bar{R}_0 - \bar{R}_5$	11.63 *	5.86	17.39
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{10}$	10.63 *	4.86	16.39
$\bar{R}_{1.25} - \bar{R}_{2.5}$	-0.5	-6.26	5.26
$\bar{R}_{1.25} - \bar{R}_5$	-4.62	-10.38	1.14
$\bar{R}_{1.25} - \bar{R}_{10}$	-5.62	-11.38	0.14
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_5$	-4.12	-9.88	1.64
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_{10}$	-5.12	-10.88	0.64
$\bar{R}_5 - \bar{R}_{10}$	-1	-6.76	4.76

\* Diferencia estadísticamente significativa.

**Anexo 2.** Cálculo del intervalo de confianza, basado en los rangos obtenidos por la prueba de Kruskal Wallis, para la viabilidad con NAC obtenida por sulforrodamina 24h post-tratamiento con Casiopeína Ilgli

Contraste	Estimado ( <i>phi</i> )	Límite inferior	Límite superior
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{1.25}$	8.75 *	2.98	14.51
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{2.5}$	17.25 *	11.48	23.01
$\bar{R}_0 - \bar{R}_5$	13 *	7.23	18.76
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{10}$	11 *	5.23	16.76
$\bar{R}_{1.25} - \bar{R}_{2.5}$	8.5 *	2.73	14.26
$\bar{R}_{1.25} - \bar{R}_5$	4.25	-1.51	10.01
$\bar{R}_{1.25} - \bar{R}_{10}$	2.25	-3.51	8.01
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_5$	-4.25	-10.01	1.51
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_{10}$	-6.25 *	-12.01	-0.48
$\bar{R}_5 - \bar{R}_{10}$	-2	-7.76	3.76

\* Diferencia estadísticamente significativa.

**Anexo 3.** Cálculo del intervalo de confianza, basado en los rangos obtenidos por la prueba de Kruskal Wallis, para viabilidad obtenida por sulforrodamina 24h post tratamiento con Casiopeína III-ia

Contraste	Estimado ( $\phi$ )	Límite inferior	Límite superior
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{2.5}$	1.34	-5.58	8.26
$\bar{R}_0 - \bar{R}_5$	5	-1.92	11.92
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{10}$	15.34 *	8.41	22.26
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{15}$	21 *	14.07	27.92
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{20}$	23.34 *	16.41	30.26
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_5$	3.66	-3.26	10.58
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_{10}$	14 *	7.07	20.92
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_{15}$	19.66 *	12.73	26.58
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_{20}$	22 *	15.07	28.92
$\bar{R}_5 - \bar{R}_{10}$	10.34 *	3.41	17.26
$\bar{R}_5 - \bar{R}_{15}$	16 *	9.07	22.92
$\bar{R}_5 - \bar{R}_{20}$	18.34 *	11.41	25.26
$\bar{R}_{10} - \bar{R}_{15}$	5.66	-1.26	12.58
$\bar{R}_{10} - \bar{R}_{20}$	8 *	1.07	14.92
$\bar{R}_{15} - \bar{R}_{20}$	2.34	-4.58	9.26

\* Diferencia estadísticamente significativa.

**Anexo 4.** Cálculo del intervalo de confianza, basado en los rangos obtenidos por la prueba de Kruskal Wallis, para las células vivas obtenidas por citometría de flujo 24h post tratamiento con Casiopeína III-ia

Contraste	Estimado ( <i>phi</i> )	Límite inferior	Límite superior
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{2.5}$	-2.33	-7.41	2.75
$\bar{R}_0 - \bar{R}_5$	-1	-6.08	4.08
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{10}$	2.67	-2.41	7.75
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{15}$	7.33 *	2.24	12.41
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{20}$	10.33 *	5.24	15.41
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_5$	1.33	-3.75	6.41
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_{10}$	5	-0.08	10.08
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_{15}$	9.66 *	4.57	14.74
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_{20}$	12.66 *	7.57	17.74
$\bar{R}_5 - \bar{R}_{10}$	3.67	-1.41	8.75
$\bar{R}_5 - \bar{R}_{15}$	8.33 *	3.24	14.41
$\bar{R}_5 - \bar{R}_{20}$	11.33 *	6.24	16.41
$\bar{R}_{10} - \bar{R}_{15}$	4.66	-0.42	9.74
$\bar{R}_{10} - \bar{R}_{20}$	7.66 *	2.57	12.74
$\bar{R}_{15} - \bar{R}_{20}$	3	-2.08	8.08

\* Diferencia estadísticamente significativa.

**Anexo 5.** Cálculo del intervalo de confianza, basado en los rangos obtenidos por la prueba de Kruskal Wallis, para apoptosis temprana obtenida por citometría de flujo 24h post tratamiento con Casiopeína III-ia

Contraste	Estimado (phi)	Límite inferior	Límite superior
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{2.5}$	-2.66	-7.74	2.42
$\bar{R}_0 - \bar{R}_5$	-1.33	-6.41	3.75
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{10}$	-6.33 *	-11.41	-1.24
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{15}$	-10.33 *	-15.41	-5.24
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{20}$	-12.33 *	-17.41	-7.24
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_5$	1.33	-3.75	6.41
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_{10}$	-3.67	-8.71	1.41
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_{15}$	-7.67 *	-12.75	-2.58
$\bar{R}_{2.5} - \bar{R}_{20}$	-9.67 *	-14.75	-4.58
$\bar{R}_5 - \bar{R}_{10}$	-5	-10.08	0.08
$\bar{R}_5 - \bar{R}_{15}$	-9 *	-14.08	-3.91
$\bar{R}_5 - \bar{R}_{20}$	-11 *	-16.08	-5.91
$\bar{R}_{10} - \bar{R}_{15}$	-4	-9.08	1.08
$\bar{R}_{10} - \bar{R}_{20}$	-6 *	-11.08	-0.91
$\bar{R}_{15} - \bar{R}_{20}$	-2	-7.08	3.08

\* Diferencia estadísticamente significativa.

**Anexo 6.** Cálculo del intervalo de confianza, basado en los rangos obtenidos por la prueba de Kruskal Wallis, para volumen relativo tumoral al día 16 de tratamiento con los distintos fármacos

Contraste	Estimado ( $\phi$ )	Límite inferior	Límite superior
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{CDDP}$	8 *	1.62	14.37
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{Igli}$	13.1 *	6.72	19.47
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{III-ia}$	11.2 *	4.82	19.07
$\bar{R}_0 - \bar{R}_{III-La}$	12.7 *	6.32	19.07
$\bar{R}_{CDDP} - \bar{R}_{Igli}$	5.1	-1.27	11.47
$\bar{R}_{CDDP} - \bar{R}_{III-ia}$	3.2	-3.17	9.57
$\bar{R}_{CDDP} - \bar{R}_{III-La}$	4.7	-1.67	11.07
$\bar{R}_{Igli} - \bar{R}_{III-ia}$	-1.9	-8.27	4.47
$\bar{R}_{Igli} - \bar{R}_{III-La}$	-0.4	-6.77	5.97
$\bar{R}_{III-ia} - \bar{R}_{III-La}$	1.5	-4.87	7.87

\* Diferencia estadísticamente significativa.

**Anexo 7.** Significancias en el análisis de varianza (ANDEVA) de las variables obtenidas en el hemograma de los animales transplantados con HeLa y tratados bajo los distintos esquemas

Variable	Significancia (ANDEVA)
Hematocrito	0.064
Eritrocitos	0.427
VGM	0.229
Plaquetas	0.963
Proteína Total	0.046 *
Fibrinógeno	0.732
Leucocitos	0.411
Linfocitos	0.625
Neutrófilos	0.249

\* Diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

## LISTA DE CUADROS

<i>N°</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
1.1	Fármacos antineoplásicos frecuentemente utilizados en la quimioterapia del cáncer.	26
2.3.1	Estadística de la viabilidad de HCT-15 con Cas IIgli <i>in vitro</i> .	53
2.3.2	Frecuencia de alteraciones ultraestructurales observadas <i>in vitro</i> en alrededor de 50 células por tratamiento por 24 horas con Cas IIgli.	58
2.3.3	Estadística de la viabilidad de HCT-15 tratadas con Cas III-ia <i>in vitro</i> .	62
2.3.4	Frecuencia de alteraciones ultraestructurales observadas en alrededor de 50 células por tratamiento <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	69
2.3.5	Estadística de viabilidad obtenida por citometría de flujo de HCT-15 tratadas <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	73
2.3.6	Estadística de apoptosis temprana obtenida por citometría de flujo de HCT-15 tratadas <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	73
3.3.1	Efectos antitumorales <i>in vivo</i> de Cas III-ia y CDDP.	112
3.3.2	Estadística de porcentaje de pérdida de peso al día 21 de animales tratados con Cas III-ia y CDDP.	114
3.3.3	Efectos antitumorales <i>in vivo</i> de Cas IIgli.	121
3.3.4	Estadística de porcentaje de pérdida de peso al día 21 de animales tratados con Cas IIgli y CDDP.	125
3.4.1	Resumen de efectos antitumorales y secundarios de Cas III-ia, IIgli y CDDP en ratones transplantados con HCT-15.	135
4.3.1	Actividad antitumoral <i>in vivo</i> sobre HeLa de CDDP, Cas IIgli, Cas III-ia y Cas III-La.	151
4.3.2	Hemograma de ratones transplantados con HeLa y tratados con CDDP, Cas IIgli, Cas III-ia y Cas III-La.	154
4.3.3	Estadística de proteínas totales en el hemograma de animales tratados con CDDP, Cas IIgli, Cas III-ia y Cas III-La.	154
4.3.4	Actividad antitumoral <i>in vivo</i> sobre HeLa de CDDP, Cas IIgli, Cas III-ia y Cas III-La.	159

## LISTA DE FIGURAS

N°	Descripción	Página
1.1	Mecanismos de apoptosis.	11
1.2	Electroforesis en gel de agarosa de ADN celular.	19
1.3	Protocolo <i>in vivo</i> definido para fase I preclínica.	34
2.2.1	Casiopeína III-ia.	39
2.2.2	Casiopeína IIgli.	40
2.3.1	Viabilidad <i>in vitro</i> de HCT-15 con Cas IIgli.	53
2.3.2	Células HCT-15 sin tratamiento.	55
2.3.3	Células HCT-15 tratadas con Cas IIgli.	55
2.3.4	Alteraciones ultraestructurales <i>in vitro</i> observadas en HCT-15 tras el tratamiento con Cas IIgli.	57
2.3.5	Muerte celular determinada <i>in vitro</i> por citometría de flujo de HCT-15 tratadas con Cas IIgli.	60
2.3.6	Electroforesis en gel de agarosa (2%) de ADN de HCT-15 expuesta <i>in vitro</i> a Cas IIgli.	60
2.3.7	Viabilidad de HCT-15 expuesta <i>in vitro</i> a Cas III-ia.	62
2.3.8	Detección de ciclo celular de HCT-15 expuesta <i>in vitro</i> a Cas III-ia.	64
2.3.9	Niveles de PCNA en células HCT-15 tratadas <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	64
2.3.10	Células HCT-15.	66
2.3.11	Células HCT-15 <i>in vitro</i> después de 24 horas con 5 µg/mL de Cas III-ia.	66
2.3.12	Hallazgos ultraestructurales de HCT-15 tratadas con Cas III-ia <i>in vitro</i> .	68
2.3.13	Muerte celular determinada por citometría de flujo de HCT-15 tratadas <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	71
2.3.14	Niveles de Bax en células HCT-15 tratadas <i>in vitro</i> con Cas III-ia.	75
2.3.15	Electroforesis en gel de agarosa (2%) de ADN de HCT-15 expuesta <i>in vitro</i> a Cas III-ia.	75
2.4.1	Mecanismos propuestos de inducción de muerte <i>in vitro</i> para Cas III-ia y IIgli.	82
3.3.1	Volumen relativo tumoral de HCT-15 tratado con Cas III-ia y CDDP.	110
3.3.2	Días en doblar el tamaño de HCT-15 tratado con Cas III-ia y CDDP.	110
3.3.3	Índice mitótico y apoptótico de HCT-15 tratado con Cas III-ia y CDDP.	112
3.3.4	Porcentaje de pérdida de peso de los animales tratados con Cas III-ia y CDDP.	114
3.3.5	Hallazgos de necropsias en animales tratados con Cas III-ia y CDDP.	116
3.3.6	Hallazgos histológicos en animales tratados con Cas III-ia y CDDP.	117
3.3.7	Fotomicrografía de hígado proveniente de animal	118

	tratado con Cas III-ia.	
3.3.8	Índice mitótico y apoptótico duodenal proveniente de animales tratados con Cas III-ia y CDDP.	119
3.3.9	Volumen relativo tumoral de HCT-15 tratado con Cas Iigli y CDDP.	121
3.3.10	Días en doblar el tamaño de HCT-15 tratado con Cas Iigli y CDDP.	121
3.3.11	Índice mitótico y apoptótico de HCT-15 tratado con Cas Iigli y CDDP.	124
3.3.12	Porcentaje de pérdida de peso de los animales tratados con Cas Iigli y CDDP.	124
3.3.13	Hallazgos de necropsias en animales tratados con Cas Iigli y CDDP.	127
3.3.14	Hallazgos histológicos en animales tratados con Cas Iigli y CDDP.	128
3.3.15	Índice mitótico y apoptótico duodenal proveniente de animales tratados con Cas Iigli y CDDP.	130
4.2.1	Casiopéina III-La.	142
4.3.1	Volumen relativo tumoral de HeLa tratado con CDDP, Cas Iigli, Cas III-ia y Cas III-La.	150
4.3.2	Días en doblar el tamaño de HeLa tratado con CDDP, Cas Iigli, Cas III-ia y Cas III-La.	150
4.3.3	Porcentaje de pérdida de peso de los animales transplantados con HeLa y tratados con CDDP, Cas Iigli, Cas III-ia y Cas III-La.	153
4.3.4	Hallazgos de necropsias en animales tratados con CDDP, Cas Iigli, Cas III-ia y Cas III-La.	156
4.3.5	Volumen relativo tumoral de PC-3 tratado con CDDP, Cas Iigli, Cas III-ia y Cas III-La.	158
4.3.6	Días en doblar el tamaño de PC-3 tratado con CDDP, Cas Iigli, Cas III-ia y Cas III-La.	158
4.3.7	Porcentaje de pérdida de peso de los animales transplantados con PC-3 y tratados con CDDP, Cas Iigli, Cas III-ia y Cas III-La.	160
4.3.8	Hallazgos de necropsias en animales tratados con CDDP, Cas Iigli, Cas III-ia y Cas III-La.	162

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Factor inductor de apoptosis
ANT	Adenin nucleótico traslocasa
Apaf 1	Factor activador de proteasas apoptóticas 1
APT	Aminofosfolípido traslocasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Mensajero de Ácido ribonucleico
ASPP	Proteína estimulante de la función apoptótica de p53
ATCC	American tissue culture collection
ATP	Adenina trifosfato
BH	Homología de Bcl-2
Bid	Dominio que interactúa con Bcl-2
CAD	DNasa activada por caspasas
CAMs	Moléculas de adhesión celular
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
Cas	Casiopeína
CDDP	<i>Cis</i> -diamino-dicloro platino (II)
CDK4	Cinasa dependiente de ciclinas 4
CED-3	Proteína 3 precursora de muerte celular
Cit c	Citocromo c
<i>c-myc</i>	Protooncogen relacionado a gen de mielocitomatosis
CRADD	Adaptador de caspasa a RIP con dominio de muerte
DFF	Factor de fragmentación de ADN
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECL	Quimioluminiscencia aumentada
EGF	Factor de crecimiento epitelial
FA	Función antitumoral
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FAK	Cinasa de adhesión focal
Fas	CD-95, Apo-1
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FLIP	Proteínas inhibitorias de FLICE
GSH	Glutación reducida
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF	Factor inducido por hipoxia
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
ICAD	Inhibidor de DNasas activadas por caspasas
ICE	Enzima convertidora de interleucina 1- $\beta$ / caspasa 1
IGF	Factor de crecimiento similar a insulina
InCan	Instituto Nacional de Cancerología
MDR1	Proteínas de resistencia múltiple a drogas 1
MEM	Medio esencial mínimo
MRP	Proteína asociada a MDR1
MTP	Transición de la permeabilidad mitocondrial
NAC	N-acetil cisteína
NAD	Dinucleótido de nicotinamida
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa

PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PS	Fosfatidilserina
Rb	Retinoblastoma
REC	Retraso específico del crecimiento
RIP	Proteína que interactúa con receptores
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
Smac/DIABLO	Activador de caspasas secundario a la mitocondria / Proteína de unión directa a IAP con bajo pl.
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
VDAC	Canales aniónicos dependientes de voltaje
VRT	Volumen relativo tumoral

**Date:** 08 Feb 2007  
**To:** "Francisco Ruben Carvalho-Chaigneau"  
francisco.carvalho@gmail.com, fcarvalho@santotomas.cl  
**From:** "Biometals" Paulo.Montes@springer.com  
**Subject:** Your Submission BIOM397R1

Dear Francisco Ruben Carvalho-Chaigneau,

We are pleased to inform you that your manuscript, "Casiopaina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo.", has been accepted for publication in BioMetals.

You will be contacted about proofs and offprints in due course by our Manufacturing Department. Any queries concerning your manuscript should now be addressed to the Editorial Department at: [editdept@springer-sbm.com](mailto:editdept@springer-sbm.com)

Please remember to quote the manuscript number, BIOM397R1, whenever inquiring about your manuscript.

If you would like to have your accepted article published with open access in our Open Choice program, please access the following URL: <http://www.springer.com/openchoice>

With best regards,  
Journals Editorial Office  
Springer

## Bibliografía Capítulo 1 y 2

Adams JW. Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 2003; 17:2481–2497.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 1998; 281:1322–1326.

Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* 1997; 57:615-619.

Alison MR, Sarraf CE. Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut* 1994; 35: 577–581.

Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski, Dizdaroglu M. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1991; 273:601-604.

Bernardi O. Mitochondrial transport cations: channel, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999; 79:1127-1155.

Bettaieb A, Bubreux-Daloz L, Launay S, Plenchette S, Rebe C, Cathelin S, Solary E. Bcl-2 proteins: targets and tools for chemosensitisation of tumor cells. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents* 2003; 3:307-318.

Bevens EM, Comfurius P, Dekker DW, Harmsma M, Zwaal RF. Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling. *Lupus* 1999; 7:S126-S131

Bevens EM, Comfurius EM, Dekkers DWC, Zwaal RFA. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1439:317-330.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblast in cancer initiation and progression. *Nature* 2004; 432: 332-337.

Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; 359: 552-554.

Blagosklonny MV. Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells. *Oncogene* 2004; 23:2967-2975.

Bogden A, Kelton D, Cobb W, Esber J. A rapid screening for testing chemotherapeutic agents against human tumor xenografts. In "The Use of

Athimic (Nude) Mice in Cancer Research". D. Houchens and A. Ovejera, p. 231. Stuttgart, 1978.

Bossy-Wetzel E, Green DR. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res* 1999; 434:243-251.

Bouchard VJ, Roleau M, Poirier GG. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol* 2003; 31:446–454.

Brakebusch C, Wennerberg K, Krell HW, Weidle UH, Sallmyr A, Johansson S, Fässler R.  $\beta$ 1 integrin promotes but is not essential for metastasis of ras-myc transformed fibroblasts. *Oncogene* 1999; 18:3852–3861.

Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fässler R. Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* 2002; 109:999-1006.

Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 1997; 272:26159-26165.

Bravo ME, Tovar A, Ruiz M, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Esparza R. Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas<sup>®</sup>. Memorias del primer Congreso en Casiopeínas; 2002 diciembre 2-3; Taxco (Guerrero) México. Páginas 1-9.

Brewer GJ. Copper control as an antiangiogenic anticancer therapy: lessons from treating Wilson's disease. *Exp Biol Med* 2001; 226:665-73.

Broker LE, Huisman C, Span SW, Rodríguez JA, Kruyt FA, Giaccone G. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubules stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64:27-30.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15:269-290.

Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 1999; 112:1743-1753.

Bunz F, Hwang PM, Torraine C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. Disruption of p53 in human cancer cells alters the response to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999; 104:263-269.

Cai X, Pan N, Zou G. Copper 1-10 phenantroline-induced apoptosis in liver carcinoma Bel-7402 cells associates with copper overload, reactive oxygen

species production, glutathione depletion and oxidative DNA damage. *Biometals* 2007; 20:1-11.

Chauhan D, Hideshima T, Rosen S, Reed JC, Kharbanda S, Anderson KC. Apaf1/cytochrome c independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* 2001; 276:24453-24556.

Chen CB, Milne L, Landgraf R, Perrin DM, Sigman DS. Artificial nucleases. *ChemBiochem* 2001; 2:735-740.

Cheng K, Loeb L. Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. *Adv Cancer Res* 1993; 60:121-156.

Cheers C, Waller R. Activated macrophages in congenitally athymic "nude mice" and in lethally irradiate mice. *J Immunol* 1975; 115:844-7.

Chiarugi A. Poly (ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The "suicide hypothesis" revisited. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23:122-129.

Chrystenbury, J. Absence of quantitative effects of heterozygosity of the "nude" gene on lymphocyte populations in the mouse. *Proc Okla Acad Sci* 1977; 57:12-15.

Christofori G, Semb H. The role of the cell adhesion molecule E-cadherin as tumor suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999; 24:73-76.

Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:923-934.

Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole PA, Fontemaggi G, Fanciulli M, Schiltz L, Blandino G, Balsano C, Levero M. DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell* 2002; 9:175-186.

Cvitkovic E, Bekradda M. Oxaliplatin: a new therapeutic option in colorectal cancer. *Semin Oncol* 1999; 26:647-662.

Datto, MB, Hu PP, Kowalik PF, Yingling J, Wang XF. The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor  $\beta$  mediated induction of p21/WAF/Cip 1 and P15/INK4B. *Mol Cell Biol* 1997; 17:2030-2037.

Daugas E, Susin S, Zamzami M, Ferri K, Ironopoulou T, Larochette N, Prévost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* 2000;14:729-739.

De Jong K, Geldwerth D, Kuypers FA. Oxidative damage does not alter membrane phospholipid asymmetry in human erythrocytes. *Biochemistry* 1997; 36:6768-6776.

De Sousa, M, Parrot D, Pantelouris E. The lymphoid tissues in mice with congenital aplasia of the thymus. *Clin Exp Immunol* 1969; 4:637-644.

De Vizcaya-Ruiz A, Rivero-Muller L, Ruiz-Ramirez L, Kass GEN, Kelland LR, Orr RM, Dobrota M. Induction of apoptosis by a novel Copper-based anticancer compound, Casiopeina II, in L1210 murine Leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol in vitro* 2000; 14:1-5.

De Vita VT, Schein PS. The use of drugs in combination for the treatment of cancer: rationale and results. *N Engl J Med* 1973; 288:998-1006.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102:33-42.

Duriez PJ, Shah GM. Cleavage of Poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol* 1997; 75:337-349.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243:934-937.

Eliseev RA, Gunter KK, Gunter TE. Bcl-2 sensitive mitochondrial potassium accumulation and swelling in apoptosis. *Mitochondrion* 2002; 1:361-370.

Escandón-Romero C, Benítez-Martínez M, Navarrete-Espinoza J, Vásquez-Martínez J, Martínez-Montañez O, Escobedo-de la Peña J. Epidemiología del cáncer cérvico uterino en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Publ Mex* 1992; 34:607-614.

Falnes PO, Madshus H, Sandvig K, Olsnes S. Replacement of negative by positive charges in the presumed membrane- inserted part of diphtheria toxin B fragment. Effect on membrane translocation and on formation of cation channels. *J Biol Chem* 1992; 267:12284-12290.

Fan S, Smith ML, Rivet DJ, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, Fornace AJ Jr, O'Connor PM. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res* 1995; 55:1649-1654.

Fantin VR, Berardi MJ, Scorrano L, Kormeyer SJ, Leder P. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer Cell* 2002; 2:29-42.

Fedi P, Tronick SR, Aaronson SA. Growth factors in cancer medicine. In: Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW, Weichselbaum RR,

editors. *Cancer Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkinson Press. 1997:41-64.

Ferraro-Peyret C, Quemeneur L, Flacher M, Revillard JP, Genestier L. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T Lymphocytes. *J Immunol* 2002; 169:4805-4810.

Ferriols F, Ferriols R, Colomina J. Inmunoterapia tumoral. Vacunas y terapia génica. *Farm Hosp* 1997; 21:166-170.

Flanagan, S. Nude, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 1966; 8:295-309.

Flores Y, Keerti S, Lazcano-Ponce E, Hernández M, Bishai D, Ferris DG, Lörinicz A, Hernández P, Salmerón J. Design and methods of the evaluation of an HPV-based cervical cancer screening strategy in Mexico: The Morelos HPV Study. *Salud Publ Mex* 2002; 44:335-44.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1:27-31.

Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; 22:9030-9040.

Gaiddon C, Jeannequin P, Bischoff P, Pfeffer M, Sirlin C, Loeffler JP. Ruthenium (II)-derived organometallic compounds induces cytostatic and cytotoxic effects on mammalian cancer cell lines through p53-dependent and p53-independent mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315:1403-1411.

García-Carrancá A. La célula cancerosa. En: Jiménez LF, Merchant H, editores. *Biología Celular y Molecular*. México DF: Pearson Educación, 2003:663-678.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285:1028-1032.

Gockhale N, Padhye S, Rathbone D. The crystal structure of first copper(II) complex of a pyridine-2-carboxamidrazone – a potential antitumor agent. *Inorg Chem Commun* 2001; 4:26-29.

Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Tinoco-Méndez M, Márquez-Quiñones A, Romero-De Lira M, Marín-Hernández A, Macías-Rosales M, Bravo-Gomez ME. Knight'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; 8:19-28.

Gunter T, Pfeiffer DR. Mechanism by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 1990; 258:C755-C786.

Hainaut P, Hernández T, Robinson A, Rodríguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC, Montesano R. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualization tools. *Nucleic Acid Res* 1998; 26:205-213.

Hanahan D, Weinberg A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.

Hanayama R, Tanaka m, Miwa A, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002; 417:182-187.

Hayfflick L. Mortality and immortality at cellular level. A review. *Biochemistry* 1997; 62:1180-1190.

Hengartner MO. The Biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-776.

Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukkatash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts IAP-caspase interaction. *J Biol Chem* 2001; 277:432-438.

Herceg Z, Wang ZQ. Failure of poly (ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999; 19:5124-5133.

Hernández-Fernández RA. Telómeros y telomerasas. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999; 18:121-129.

Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001; 98:2603-2614.

Holstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acid Res* 1994; 22:3551-3555.

Holub M, Rossmann P, Mandi B. The dysgenetic thymic complex of the nude mouse. *Folia Biol (Praha)* 1978; 24:416-418.

Hu GF. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *J Cell Biochem* 1998; 69:326-35.

Hueffer K, Galan JE. Salmonella-induced macrophage death: multiple mechanisms, different outcomes. *Cell Microbiol* 2004; 6:1019-1025.

Igney F, Krammer PH. Death and anti death: Tumor resistance to apoptosis. *Nature Rev Cancer* 2002; 2:277-287.

INCan. Registro histopatológico: Mortalidad por tumores malignos 1999. <http://www.incan.edu.mx/html/registroh.htm>

International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. *Lancet* 1995; 345:939-944.

Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC. Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* 2003; 3:403-410.

Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol* 1999; 57:231-245.

Jagtap P, Szabó C. Poly (ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature Rev Drug Discov* 2005; 4:421-440.

Jia LQ, Osada M, Ishioka C, Makio G, Ikawa S, Suzuki T, Shimodaira H, Niitani T, Kudo T, Akiyama M, Kimura N, Matsuo M, Mizusawa H, Tanaka N, Koyama H, Namba M, Kanamaru R, Kuroki T. Screening the p53 status of human cell lines using a yeast functional assay. *Mol Carcinog* 1997; 19:243-253.

Jiménez del Rio M, Vélez Pardo C. Transition metal induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase 3 activation: An in vitro model for neurodegeneration. *Arch Med Res* 2004; 35:185-193.

Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108:153-164.

Kaufmann SH. Components of the cell death machine and drug sensitivity of the national cancer institute cell line panel. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6807-6820.

Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256:42-49.

Kaufman SH, Vaux DL. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene* 2003; 22:7414-7430.

Kent MS, Madewell BR, Dank G, Dick R, Merajver SD, Brewer GJ. An anticopper antiangiogenic approach for advanced cancer in spontaneously occurring tumors using Tetrathiomolibdate: A pilot study in a canine animal model. *J Trace Elem Exp Med* 2004;17:9-29.

Kidd VJ. Proteolytic activities mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:533-573.

Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T. Current status of the molecular mechanism of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis of chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 50:343-352.

Kitanaka C, Namiki T, Noguchi K, Mochizuki T, Kagaya S, Chi S, Hayashi A, Asai A, Tsujimoto Y, Kuchino Y. Caspase-dependent apoptosis of COS-7 cells induced by bax Overexpression: differential effects of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> on Bax-induced caspase activation and apoptosis. *Oncogene* 1997; 15:1763-1792.

Ko LJ, Privies C. p53: Puzzle and paradigm. *Genes & Dev* 1996; 10:1054-1072.

Kobayashi T, Sawa H, Morikawa J, Ueno S, Katayama N, Zhang W, Shiku H. Bax-induction alone is sufficient to activate apoptosis cascade in wild-type Bax-bearing K562 cells, and the initiation of apoptosis requires simultaneous caspase activation. *Int J Oncol* 2002; 20:723-728.

Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Kovlekorn WE, Schaper J. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 2003; 92:715-724.

Kroemer G, Petit P, Zamzani M, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J* 1995; 9:1277-1287.

Kroemer G, Zamzani M, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18:44-51.

Kuwabara M, Yoon C, Goyne T, Thederahn T, Sigman SD. Nuclease activity of 1,10-Phenanthroline copper ion: Reaction with CGCGAATTTCGCG and its complexes with Neotripsin and *EcoRI*. *Biochemistry* 1986; 25:7401-7408.

Kuwabara M, Sigman DS. Footprinting DNA-protein complexes *in situ* following gel retardation assays using 1,10 phenanthroline-copper ion: *Escherichia Coli* RNA polymerase-*lac* promoter complexes. *Biochemistry* 26:7234-7238, 1987.

Kuwana, T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, Green DR, Newmeyer DD. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002; 111:331-342.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-16.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula S, Ahmad M, Alnemri E, Wang X. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* 1997; 91:479-489.

Lin Y, Uemura H, Fujinami K, Hosaka M, Harada M, Kubota Y. Telomerase activity in primary prostate cancer. *J Urol* 1997;157:1161-1165.

Liu JL, Ge LY, Zhang GN. Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase expression in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 21:465-467.

Liu X, Naekyung C, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* 1996; 86:147-157.

Liu X, Zou H, Wang X. DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation during Apoptosis. *Cell* 1997; 89:175-184.

Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p 53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362:847-849.

Lucken-Ardjomande S, Martinou JC. Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *CR Biologies* 2005; 328:616-631.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94:481-490.

Marin-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas<sup>®</sup>) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol* 2003; 65:1979-1989.

Markowitz S, Wang J, Meyeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fran R, Zborowska E, Kinzler K, Vogelstein B. Inactivation of the type II TGF- $\beta$  receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268:1336-1338.

Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo M. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACH $\alpha$ 1) death signal. *J Biol Chem* 1998; 273:4345-4349.

Martin S, Green D. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts. *Cell* 1995; 82:349-352.

Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 1996; 271:28753-28756.

Martinou J, Green D. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 67-71.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin HL, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemwe G. Bax and adenine

nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998; 281:2027-2031.

Mashima T, Naito M, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene* 1999 ; 18:2423-2430.

Mashima T, Oh-hara T, Sato S, Mochizuki M, Sugimoto Y, Yamazaki K, Hamada J, Tada M, Moriuchi T, Ishikawa Y, Kato Y, Tomoda H, Yamori T, Tsuruo T. p-53 defective tumors with a functional apoptosome-mediated pathway: A new therapeutic target. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:765-777.

Mathews FS. The structure, function and evolution of cytochromes. *Prog Biophys Mol Biol* 1985; 45:1-56.

McDonald F, Ford CHJ, Casson AG, editors. Molecular biology of cancer. Colorectal cancer. 2<sup>nd</sup> ed. Trowbridge; Cronwell Press. 2004:111-120.

Minn AJ, Velez P, Schendel S, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson SB. Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997; 385:253-257.

Moncevičiūtė-Eringienė E. Neoplastic growth: The consequence of evolutionary malignant resistance to chronic damage for survival of cells (review of a new theory of the origin of cancer. *Med hypoth* 2005; 65:595-604.

Mukhopadhyay D, Datta K. Multiple regulatory pathways of vascular permeability factors/vascular endothelial growth factor (VEGF/VEGF) expression in tumors. *Semin Cancer Biol* 2004; 14:123-130.

Muzio M, Salvesen G, Dixit V. FLICE Induced Apoptosis in a Cell-free System. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem* 1997; 272:2952-2956.

Muzio M, Stockwell B, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit V. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998; 273:2926-2930.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 81:505-512.

Naito M, Nagashima K, Mashima T, Tsuruo T. Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1 beta-converting enzyme family protease activation during apoptosis. *Blood* 1997; 89:2060-2066.

Nawaz S, Hashizumi TL, Markkhan NE, Shroyer AL, Shroyer KR. Telomerase expression in human breast cancer with and without lymph node metastases. *Am J Clin Pathol* 1997; 107:542-547.

Newton K, Strasser A. Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy. *J Exp Med* 2000; 191:195-200.

Nguyen JT, Wells JA. Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells- *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:7533-7538.

Nutt LK, Chandra J, Pataer A, Fang B, Roth JA, Swisher SG, O'Neil RG, McConkey DJ. Bax-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. *J Biol Biochem* 2002; 277:20301-20308.

O'Connor PM, Jackman J, Jondle D, Bhatia K, Magrath I, Kohn KW. Role of p53 tumor suppressor gene in cell cycle arrest and radiosensitivity of Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Res* 1993; 53:4776-4780.

Oliver L, Le Cabellec MT, Pradal G, Meflah K, Kroemer G, Vallette FM. Constitutive presence of cytochrome c in the cytosol of a chemoresistant leukemic cell line. *Apoptosis* 2005; 10:277-287.

Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 1999; 274:36031-36034.

Owen LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, Liu ET, Cance WG. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125<sup>FAK</sup>) in invasive human tumors. *Cancer Res* 1995; 55:2752-2755.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1985; 54:594-606.

Pastorino JG, Cheng ST, Tafani M, Snyder JW, Farber JL. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 1998; 273:7770-7775.

Pászty K, Verma AK, Padányi R, Filoteo AG, Penniston JT, Enyedi A. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform 4b is cleaved and activated by caspase-3 during the early phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277:6822-6829.

Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356:397-400.

Rak J, Filmus J, Kerbel RS. Reciprocal paracrine interactions between tumor cells and endothelial cells. The "angiogenesis progression" hypothesis. *Eur J Cancer* 1996; 32A:2438-2450.

Rak J, Yu J. Oncogenes and tumor angiogenesis: The question of vascular "supply" and vascular "demand". *Semin Cancer Biol* 2004; 14:93-104.

Ramadan S, Terrinoni A, Catani MV, Sayan E, Knight RA, Mueller M, Krammer PH, Melino G, Candi E. p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331:713-717.

Reed, J.C. Apoptosis based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1:111-121.

Ruiz-Azuara L. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II. Patente de invención, SECOFI no. 172248. Dic. 9 1993.

Ruiz-Azuara L. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo I. Patente de invención, SECOFI no. 172967. Enero 26 1994.

Ruiz-Azuara L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complex from phenylphenantroline to be used as anticancerigenic agents. U.S. patent, Ap21 (1992) Number 5,107,005. U.S. patent Re 35,458, Feb 18 1997.

Ruiz-Azuara L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate from methylate phenantroline complex to be used as anticancerigenic agents. U.S. Patent, Patent No. 5,576,326. Nov 19 1996.

Ruíz-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. *J Inorg Biochem* 1991; 43:615.

Ruíz Ramírez L, Gracia-Mora I, de la Rosa ME, Sumano H, Gómez L, Arenas F, Gomez E, Pimentel E, Cruces M. Cytostatic, mutagenic, antineoplastic, activities and preliminary toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeínas I, II and III. *J Inorg Biochem* 1993; 51:406.

Rygaard J, Povlsen C. Heterotransplantation of a human malignant tumor to the mouse mutant nude. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1969; 77:758.

Ryungsa K. Recents advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* 2005; 103:1551-1560.

Sabet S, Darjatmoko S, Lindstrom M, Albert D. Antineoplastic Effect and Toxicity of 1,25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D<sub>3</sub> in Athymic Mice With Y-79 Human Retinoblastoma Tumors. *Arch Ophthalmol* 1999; 117:365-370.

Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M, Cordon-Cardo C, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblast and mice are defective in radiation induced apoptosis. *Cell* 1996; 86:189-199.

Samuels-Lev Y. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p-53. *Mol Cell* 2001; 8:781-794.

Saunders M, Iveson T. Management of advanced colorectal cancer: State of the art. *Br J Cancer* 2006; 95:131-138.

Sawyers CL. Finding the next Gleevec: FLT3 targeted kinase inhibitor therapy for acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 1:413-415.

Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1387-1404.

Schwab BL, Guerini D, Didszun C, Bano D, Ferrando-May E, Fava E, Tam J, Xu D, Xanthoudakis S, Nicholson DW, Carafoli E, Nicotera P. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* 2002; 9:818-831.

Shrivastav A, Singh NK, Tripathi B, George T, Dimmock JR, Sharma RK. Copper (II) and manganese (III) complexes of N`-(2-hydroxy phenyl) carbonothioyl] pyridine 2-carbohydrazide: novel therapeutic agents for cancer. *Biochemie* 2006; 88:1209-1216.

Sigman DS, Graham DR, D`Aurora V, Stern AM. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10 penantroline cuprous complex. Inhibition of *Eschericia coli* DNA polimerase I. *J Biol Chem* 1979; 254:12269-12272.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the *HER2/neu* oncogene. *Science* 1997; 235:177-182.

Slee EA, O`Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide?. *Oncogene* 2004; 23:2809-2818.

Smorenburg CH, Sparreboom A, Bontenbal M, Verweij J. Combination chemotherapy of the taxanes and antimetabolites: it use and limitations. *Eur J Cancer* 2001; 37:2310-2323.

Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 1996; 347:1377-1381.

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998; 1:949-957.

Steller H. Mechanisms and genes of cell suicide. *Science* 1995; 267:1445-1449.

Sugimura M, Sagae S, Ishioka S, Nishioka Y, Tsukada K, Kudo R. Paclitaxel: Mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis in an ovarian cancer cell line and Its paclitaxel-resistant clone. *Oncology* 2004; 66:53-61

Susin S, Lorenzo HK, Zamzami M, Marzo I, Snow B, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett D, Aebersold

R, Siderovski D, Penninger J, Kroemer G. Molecular characterization of apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397:441-446.

Svingen PA, Loegering D, Rodriguez J, Meng XW, Mesner PW Jr, Holbeck S, Monks A, Krajewski S, Scudiero DA, Sausville EA, Reed JC, Lazebnik YA, Kaufmann SH. Components of the cell death machine and drug sensitivity of the National Cancer Institute Cell Line Panel. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6807-6820.

Taconic Farms. Immunodeficient rodents opening new doors to investigators. *Res Animal Rev* 1996; 1:1-6.

Terauchi S, Yamamoto T, Yamashita K, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y. Molecular basis of morphological changes in mitochondrial membrane accompanying induction of permeability transition, as revealed by immunoelectron microscopy. *Mitochondrion* 2005; 5:248-254.

Theodorakis P, Lomonosova E, Chinnadurai G. Critical requirement of Bax for manifestation of apoptosis induced by multiple stimuli in human epithelial cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62:3373-3376.

Tovar-Tovar A, Ruíz-Ramírez L, Moreno-Esparza R, Briansó JL. Interaction of Casiopeína III with methionine, adenosinemonophosphate, puric and pyrimidic bases. *J Inorg Biochem* 1995; 59:206.

Trejo-Solís C, Palencia-Hernández G, Gracia-Mora I, Zúñiga-Sánchez S, Rodríguez-Ropón A, Osorio-Rico L, Márquez-Rosado L, Sánchez García A, Moreno-Cornejo M, Cruz-salgado A, Bravo-Gómez ME, Ruiz-Ramírez L, Sotelo-Morales J. *In vitro* and *in vivo* apoptosis induction through caspase dependent and independent mechanism with Casiopeína II-gly on the C6 rat glioma cell line. *Neoplasia* 2005; 6:563-574.

Trejo-Solís C, Marquez-Rosado L, Cruz A, Zúñiga S, Rodríguez S, Carvallo-Chaigneau F, Mendoza-Alcántara L, Sánchez A, Tena-Suck M, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L, Sotelo J. Casiopeína III-ia induces autophagy and apoptotic cell death in glioma C6 in vitro and in vivo through caspase independent mechanism. Datos no publicados.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14:18) chromosome traslocation. *Science* 1984; 226:1097-1099.

Valencia A, Morán J. Participación de las especies reactivas de oxígeno en la muerte apoptótica neuronal en el desarrollo de algunas patologías. *BEB* 2001; 20:222-233.

Vander Heiden MG, Chandel MS, Williamson EK, Schumaker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of the mitochondria. *Cell* 1997; 91:627-637.

Van Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD. Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 2000; 150:1027-1036.

Vanhoefler U, Cao S, Harstrick A, Seeber S, Rustum Y. Comparative antitumor efficacy of docetaxel and paclitaxel in nude mice bearing human tumor xenografts that overexpress the multidrug resistance protein. *Ann Oncol* 1997; 8:1221-1228.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184:39-51.

Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54:375-429.

Wahl AF, Donaldson KL, Fairchild C, Lee FY, Foster SA, Demers GW, Galloway DA. Loss of normal p53 functions confers sensitization to Taxol by increasing G<sub>2</sub>/M arrest and apoptosis. *Nat Med* 1996; 2:72-79.

Walter L, Miyoshi H, Leverage X, Bernard P, Fontaine E. Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by ubiquinone analogs. A progress report. *Free Radic Res* 2002; 36:405-412.

Wang K, Yin X, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 1996; 10:2859-2869.

Wang K, Yin X, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 1996; 10:2859-2869.

Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller D, Benson AB, Hamilton SR. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344:1196-1206.

Verhagen AM, Eckert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LN, Reid GE, Moritz RL, Simpson LJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102:43-53.

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292:727-730.

Weinberg, R. How cancer arises. *Sci Am* 1996; 275:62-70.

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytology* 1980; 68:251-306.

Workman P, Kaye L. A trends guide to cancer therapeutics. *Trends Mol Med* 2002; 9(Suppl):S1-S9.

World Health Organization. The world health report. Life in the 21<sup>st</sup> century. A vision for all. World Health Organization (Geneva), Switzerland 1998:1-8.

Wortis, H, Nehlsen S, Owen J. Abnormal development of the thymus in "nude" mice. *J Exp Med* 1971; 134:681-697.

Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989; 9:3088-3092.

Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14559-14563.

Yarden Y, Ullrich A. EGF and erbB2 receptor overexpression in human tumors. Growth factor receptors tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:443-478.

Ying W, Alano CC, Garnier P, Swanson RA. NAD(+) as a metabolic link between DNA damage and cell death. *J Neurosci Res* 2005; 79:216-223.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *Cell* 1993; 75:641-652.

Zamzami N, Kroemer G. Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization - the (w) hole story? *Curr Biol* 2003; 13:R71-R73.

Zelenko O, Gallagher J, Xu Y, Sigman DS. Chemical nuclease activity of 1,10 phenantroline-copper. Isotopic probes of mechanism. *Inorg Chem* 1998; 37:2198-2204.

Zhai Q, Ji H, Zheng Z, Yu X, Sun L, Liu X. Copper induces apoptosis in BA/F3 $\beta$  cells: Bax, reactive oxygen species, and NF $\kappa$ B are involved. *J Cell Physiol* 2000; 184:161-170.

Zhang J, Ke X, Tu C, Lin J, Ding J, Lin L, Fun HK, You X, Guo Z. Novel Cu(II)-quinoline carboxamide complexes: Structural characterization, cytotoxicity and reactivity towards 5-GMP. *Biometals* 2003;16:485-496.

Zhang J, Xu M. Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. *Trends in Cell Biology* 2001; 12:84-89.

Zhuo LL, Zhuo LY, Luo KQ, Chang DC. Smac/DIABLO and cytochrome C are released from mitochondria through a similar mechanism during UV-inducing apoptosis. *Apoptosis* 2005; 10:289-299.

Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 2004; 19:124-128.

Zubrud CG. The national program for cancer chemotherapy. *JAMA* 1972; 222:1161-1162.

Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. Germline mutations in the p15<sup>INK4B</sup> binding domain in familial melanoma. *Nat Genet* 1996; 12:97-99.

### **Bibliografía Capítulo 3**

Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003; 23:460-464.

Arnaudeau C, Tenorio Miranda E, Jenssen D, Helleday T. Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mut Res* 2000; 461:221-228.

Blagosklonny MV. Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells. *Oncogene* 2004; 23:2967-2975.

Brown DC, Datter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17:489-503.

Damia G, Broggin M. Improving the selectivity of cancer treatments by interfering with cell response pathways. *Eur J Cancer* 2004; 40:2550-2559.

Daniel KG, Chen D, Orlu S, Cui QC, Miller FR, Dou QP. Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005; 7:R897-R908.

diZerega GS. Contemporary adhesion prevention. *Fertil Steril* 1994; 61:219-235.

Elkablawy MA, Maxwell P, Williamson K, Anderson M, Hamilton PW. Apoptosis and cell-cycle regulatory proteins in colorectal carcinoma: relationship to tumor stage and patient survival. *J Pathol* 2001; 194:436-443.

Ferrer-Sueta G, Ruíz-Ramírez L, Radi R. Ternary copper complexes and Manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin catalyze peroxynitrite-dependent nitration of aromatics. *Chem Res Toxicol* 1997; 10:1338-1344.

Garrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR, Windschitl HE, Salim M, Wiesenfeld M, Krook JE, Michalak JC, Goldberg RM, O'Connell MJ, Furth AF, Murphy LM, Riehle DL, Meyers CH, Witzig TE. Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair and p53 overexpression in

patients with resected Duke's B2 or C colon cancer: a north central cancer treatment group study. *J Clin Oncol* 2004; 22:1572-1582.

Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107:3569-3577.

Jannink I, van Diest PJ, Baak JPA. Comparison of the prognostic value of four methods to assess mitotic activity in 186 invasive breast cancer patients. *Hum Pathol* 1995; 26:1086-1092.

Jansson A, Sun XF. Ki-67 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinomas. *APMIS* 1997; 105:730-734.

Jerome KR, Vallan C, Jaggi R. The TUNEL assay in the diagnosis of graft-versus-host disease. Caveats for interpretation. *Pathology* 2000; 32:186-190.

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73:2013-2026.

Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H. Insights into potential cellular mechanism of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:2478-2480.

Mizutani Y, Nakanishi H, Nan Li Y, Sato N, Kawauchi A, Miki T. Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to cisplatin mediated cytotoxicity and apoptosis in vitro and in vivo by the selective cyclooxygenase-2 inhibitor JTE-522. *J Urol* 2004; 72:1474-1479.

Monk BJ, Berman NL, Montz FJ. Adhesions after extensive gynecologic surgery: Clinical significance, etiology, and prevention. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:1396-1403.

Monte MJ, Ballesterro MR, Briz O, Perez MJ, Marin JJG. Proapoptotic effect on normal and tumor intestinal cells of cytostatic drugs with enterohepatic organotropism. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315:24-35.

Pratt WB, Ruddon RW. The anticancer drugs. New York: Oxford University Press, 1979.

Siber GR, Mayer RJ, Levin MJ. Increased gastrointestinal absorption of large molecules in patients after 5-fluorouracil therapy for metastatic colon carcinoma. *Cancer Res* 1980; 40:3430-343.

Taketo M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part II). *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1609-1620.

Thunnissen FBJM, Ambergen AW, Koss M, Travis WD, O'Leary TJ, Ellis IO. Mitotic counting in surgical pathology: sampling bias, heterogeneity and statistical uncertainty. *Histopathology* 2001; 39:1-8.

Trejo-Solís C, Palencia-Hernández G, Zúñiga-Sánchez S, Rodríguez-Ropón A, Osorio-Rico L, Sánchez-Torres L, Gracia-Mora I, Márquez-Rosado L, Sánchez García A, Moreno-García M, Cruz-Salgado A, Bravo-Gómez ME, Ruiz-Ramírez L, Rodríguez-Enríquez S, Sotelo-Morales J. Cas Ilgli induces apoptosis in glioma C6 *in vitro* and *in vivo* through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia* 2005; 7:563-574.

Trejo-Solís C, Marquez-Rosado L, Cruz A, Zúñiga S, Rodríguez S, Carvallo-Chaigneau F, Mendoza-Alcántara L, Sánchez A, Tena-Suck M, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L, Sotelo J. Casiopeína III-ia induces autophagy and apoptotic cell death in glioma C6 *in vitro* and *in vivo* through caspase independent mechanism. Datos próximamente a ser publicados.

Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Haga N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci* 2003; 94:15-21.

Van Huyen JP, Bloch F, Attar A, Levoir D, Kreft C, Molina T, Bruneval P. Diffuse mucosal damage in the large intestine associated with Irinotecan (CPT-11). *Dig Dis Sci* 1998; 43:2649-2651.

Vijayalakshmi B, Sesikeran B, Udaykumar P, Kalyanasundaram S, Raghunath M. Chronic low vitamin intake potentiates cisplatin-induced intestinal epithelial cell apoptosis in WNIN rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12:1078-1085.

Wadler S, Benson AB, Engelking C, Catalano R, Field M, Kornblau SM, Mitchell E, Rubin J, Trotta P, Vokes E, Recommended guidelines for the treatment of chemotherapy-induced diarrhea. *J Clin Oncol* 1998; 16:3169-3178.

#### **Bibliografía Capítulo 4**

Arnold SM, Patchell M, Lowy AM, Foon KE. Paraneoplastic syndromes. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and practice of oncology*. 6<sup>th</sup> ed. New Haven: Lippincot, Williams and Wilkins Publishers, 2001.

Bolos CA, Papazisis KT, Kortsaris AH, Voyatzi S, Zambouli D, Kyriakidis DA. Antiproliferative activity of mixed-ligand dien-Cu(II) complexes with thiazole, thiazoline and imidazole derivatives. *J Inorg Biochem* 2002; 88:25-36.

Bolos CA, St. Nikolov G, Ekateriniadou L, Kortsaris A, Kyriakidis DA. Distribution of copper in rats submitted to treatment with copper aspirinate 333. *Metal-Based Drugs* 1998;5:323-332.

Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. Induction of apoptosis in human papillomavirus positive cancer cells by peptides aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:1218-1223.

Chaviara AT, Cox PJ, Repana KH, Papi RN, Papazisis KT, Zambouli D, Kortsaris AH, Kyriakidis DA, Bolos CA. Copper (II) Schiff base coordination compound of dien with heterocycles aldehydes and 2-amino-5-methyl-thiazole: synthesis, characterization, antiproliferative and antibacterial studies. Crystal structure of CudienOOC12. *J Inorg Biochem* 2004; 98:1271-1283.

Davis S, Weiss MJ, Wong JR, Lampidis TJ, Chen LB. Mitochondrial and plasma membrane potential cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J Biol Chem* 1985; 260:13844-13850.

De Vizcaya-Ruiz A, Rivero-Muller L, Ruiz-Ramirez L, Kass GEN, Kelland LR, Orr RM, Dobrota M. Induction of apoptosis by a novel Copper-based anticancer compound, Casiopeina II, in L1210 murine Leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol in vitro* 2000; 14:1-5.

diZerega GS. Contemporary adhesion prevention. *Fertil Steril* 61, 219-235, 1994.

Fan J, Bertino JR. 1999. Modulation of cisplatin cytotoxicity by p53: effect of p-53 mediated apoptosis and DNA repair. *Mol Pharmacol* 1999; 56:966-972.

Fantin VR, Berardi MJ, Scorrano L, Kormeyer SJ, Leder P. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer Cell* 2002; 2:29-42.

García-Pérez AE, Gómez Ruiz C, Ruiz-Azuara L, Gracia-Mora I. Evaluación antineoplásica *in vitro* de la Cas III-La y su posible sinergia con otros fármacos comerciales en líneas tumorales humanas de estirpe diferentes. Memorias del II Congreso de Nacional de Química Médica dedicado a la investigación en cáncer y diabetes; 2006 septiembre 4-8; Querétaro (Querétaro) México. Versión electrónica.

Hanigan MH, Gallagher BC, Townsend DM, Gabarra V.  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increase resistance of tumors to cisplatin *in vivo*. *Carcinogenesis* 1999; 20:553-559.

Humphreys KJ, Karlin KD, Rokita SE. Recognition and strand scission at junctions between single- and double-stranded DNA by a trinuclear copper complex. *J Am Chem Soc* 2001;123:5588-5589.

Humphreys KJ, Karlin KD, Rokita SE. Targeted strand scission of DNA substrates by a tricopper(II) coordination complex. *J Am Chem Soc* 2002; 124:8055-8066.

Jarup L, Best N, Toledano MB, Wakefield J, Elliott P. Geographical epidemiology of prostate cancer in Great Britain. *Int J Cancer* 2002; 97:695-699.

Koivusalo R, Hietanen S. The cytotoxicity of chemotherapy drugs varies in cervical cancer cells depending on the p53 status. *Cancer Biol Ther* 2004; 3:1177-1183.

Koivusalo R, Krausz E, Ruotsalainen P, Helenius H, Hietanen S. Chemoradiation of cervical cancer cells: Targeting human papillomavirus E6 and p53 leads to either augmented or attenuated apoptosis depending on the platinum carrier ligand. *Cancer Res* 2002; 62:7364-7371.

Koivusalo R, Krausz E, Helenius H, Hietanen S. Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering RNA- Mediated degradation of human papillomavirus 18 E6 mRNA: Opposite effect of siRNA in combination with different drugs. *Mol Pharmacol* 2005; 68:372-382.

Kuwabara M, Yoon C, Goyne T, Thederahn T, Sigman SD. Nuclease activity of 1,10-Phenanthroline copper ion: Reaction with CGCGAATTCGCG and its complexes with Neotripsin and *EcoRI*. *Biochemistry* 1986; 25:7401-7408.

Kuwabara M, Sigman DS. Footprinting DNA-protein complexes *in situ* following gel retardation assays using 1,10 phenanthroline-copper ion: *Escherichia coli* RNA polymerase-*lac* promoter complexes. *Biochemistry* 1987; 26:7234-7238.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1998; 48:6-29.

Li H, Kantoff PW, Giovannucci E, Leitzmann MF, Gaziano JM, Stampfer MJ, Ma J. Manganese superoxide dismutase polymorphism, prediagnostic antioxidant status, and risk of clinical significant prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65:2498-2504.

Liang F, Wu C, Lin H, Li T, Gao D, Li Z, Wei J, Zheng C, Sun M. Copper complex of hydroxyl-substituted triazamacrocyclic ligand and its antitumor activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:2469-2472.

Lim HW, Hong S, Jin W, Lim S, Kim SJ, Kang HJ, Park EH, Ahn K, Lim CJ. Up-regulation of defense enzymes is responsible for low reactive oxygen species in malignant prostate cancer cells. *Exp Mol Med* 2005; 37:497-506.

Marin-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas<sup>®</sup>) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol* 2003; 65:1979-1989.

McDonald F, Ford CHJ, Casson AG. Genitourinary cancer. In: Molecular biology of cancer. 2nd ed. Trowbridge: Cronwell Press, 2004.

Monk BJ, Berman NL, Montz FJ. Adhesions after extensive gynecologic surgery: Clinical significance, etiology, and prevention. *Am J Obstet Gynecol* 170, 1396-1403, 1994.

Qin C, Dua Y, Xiao L, Li Z, Gao X. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int J Biol Macromol* 2002; 31:111-117.

Rico-Morales HA, Macías-Rosales L, Rivera-Huerta M, Tinoco-Méndez M, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L. Evaluación de Casiopeínas en Glioblastoma U-373 empleando el modelo de xenotransplatación en ratón desnudo. Memorias del II Congreso de Nacional de Química Médica dedicado a la investigación en cáncer y diabetes; 2006 septiembre 4-8; Querétaro (Querétaro) México. Versión electrónica.

Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Marín-Hernández A, Ruiz-Azuara L, Moreno-Sánchez R. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast growing tumor cells. *Toxicol Applied Pharmacol* 2006; 215:208-217.

Rose PG. Chemoradiotherapy for cervical cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38:270-278.

Rose PG. Combined-modality therapy of locally advanced cervical cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:211-217.

Ruijter E, Kaa CVD, Miller G, Ruiters D, Debruyne F, Schalken J. Molecular genetics and epidemiology of prostate cancer. *Endocr Rev* 1999; 20:22-45.

Savarese A, Cognetti F. New drugs in the treatment of recurrent or metastatic cervical cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 48:323-327.

Trejo-Solís C, Palencia-Hernández G, Gracia-Mora I, Zúñiga-Sánchez S, Rodríguez-Ropón A, Osorio-Rico L, Márquez-Rosado L, Sánchez García A, Moreno-Cornejo M, Cruz-Salgado A, Bravo-Gómez ME, Ruiz-Ramírez L, Sotelo-Morales J. *In vitro* and *in vivo* apoptosis induction through caspase dependent and independent mechanism with Casiopeína II-gly on the C6 rat glioma cell line. *Neoplasia* 2005; 6:563-574.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of cervical invasive cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-19.

Zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:690-698.