



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Cinética de inhibición y recuperación de la
proliferación celular de líneas tumorales y
linfocitos humanos tratados con Casiopeínas[®]

Ilgly y III-ia

TESIS

QUE PARA OBTENER
EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A

FABIOLA MARGARITA PELÁEZ SÁNCHEZ



MÉXICO DF

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

- PRESIDENTE: Profesor: Rafael Ri3n Arriola
- VOCAL: Profesora: Mar3a Isabel Gracia Mora
- SECRETARIO: Profesora: Raquel Ortega Mu3oz
- 1er SUPLENTE: Profesora: Mar3a Eva Gonz3lez Trujano
- 2do SUPLENTE: Profesora: Mar3a Elena Bravo G3mez

SITIO DONDE SE DESARROLL3 EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUT3NOMA DE M3XICO, FACULTAD DE QU3MICA, DEPARTAMENTO DE QU3MICA INORG3NICA Y NUCLEAR, LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS, UNIDAD DE EXPERIMENTACI3N ANIMAL (UNEXA), EDIFICIO "E", FACULTAD DE QU3MICA. 56225347

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Isabel Gracia Mora.

SUPERVISOR T3CNICO:

Q.F.B Mar3a Elena Bravo G3mez.

SUSTENTANTE:

Fabiola Margarita Pel3ez S3nchez.

DEDICATORIAS

A Dios, por ayudarme todos los días de mi vida, darme la fortaleza para superar los obstáculos y alcanzar ésta meta tan importante.

A mis padres, por todo el amor que me han dado desde pequeña, por haberme reprendido en el momento que lo necesité, por las desveladas, esfuerzos y angustias que han pasado por mi, por la educación y principios que me inculcaron y gracias a los cuales estoy alcanzando una de mis metas, por la confianza que me han otorgado y finalmente por toda la alegría y apoyo que he tenido siempre en nuestro hogar.

A mi angelito de la guarda, sé que desde el cielo me ha cuidado siempre, me dejó en muy buenas manos y desde el cielo está conmigo celebrando éste momento tan especial.

A mi hermano, de quien me siento profundamente orgullosa, que ha sido mi compañero de juegos, confidente y protector desde pequeño, gracias por preocuparte siempre por mi, por saber aconsejarme y con tu poca o mucha experiencia tratar de que sea feliz y que nadie me lastime, recuerda que siempre contarás conmigo en las buenas y en las malas.

A mi hermana, aunque podamos tener puntos de vista y formas de ser diferentes, hay un cariño que nos une y que hará que siempre estemos juntas, échale ganas a todo lo que hagas y que ya solamente faltas tú, y recuerda que siempre puedes venir a comer conmigo, ya que no te gusta cocinar, te quiero.

A mis abuelitos, unos todavía en ésta tierra y otros en el cielo, por que sin ellos no habría logrado ésta meta.

A mi tío Juan Carlos, con quien conviví desde pequeña, por haber sido un ejemplo a seguir desde mi infancia, por saber escucharme, aconsejarme y por ser un amigo.

A mis tíos y tías, primos y primas, con quienes he contado siempre, y quienes han estado en las buenas y en las malas. En especial a mi prima y comaye Nancy, con quien compartí mi infancia, nunca olvidaré nuestros juegos y los momentos felices que hemos pasado, como tu último viaje de soltera y el aguacero en Bellas Artes.

A mi ahijado Diego y a mi ahijada Natalia, aunque no los veo mucho últimamente, siempre me acuerdo de ustedes, y espero que su futuro este lleno

de felicidad y éxito, saben que cuentan conmigo en todo, y aquí estará siempre su madrina para darles besos ya abrazos y también reprenderlos cuando sea necesario.

A mis amigos, por orden de antigüedad para no ofender: Victor Hugo, Denisse, Maricruz Esteban, Natalia, Joel, Dani, Vero, Sara, todos los miembros de la columna de la Prepa 2, Graciela, Aurora, Eric, Irys, Fernando, Laurita, Sofi, Caro, Mitsi, a los compañeros de carrera.

A Victor Hugo, a quien conozco desde segundo de secundaria, quien siempre me ha motivado a seguir adelante y ha confiado en mi, en mis capacidades y ha sabido escucharme en momentos difíciles, ayudándome a resolver muchas dudas existenciales.

A Denisse, con quien compartí toda mi estancia en UPIICSA, y llegamos a ser grandes amigas, y aunque actualmente no nos veamos tan frecuentemente, sabes que siempre estas en mi corazón, gracias por apoyarme y escucharme siempre.

A Maricruz, mi amiga del alma, no sé por donde empezar... han sido ya tantos años de amistad, gracias por estar siempre conmigo, por apoyarme, ayudarme e impulsarme a seguir con mis metas, gracias por creer en mí. Todavía tengo la flor del árbol de tu abuela, las bugambilias de dos colores, afortunadamente el término de la prepa no nos separó, y al entrar a la universidad, seguimos forjando recuerdos, de los cuales reiremos cuando estemos arrugaditas como pasitas. Te quiero muchísimo, sabes que cuentas conmigo para lo que sea.

A Antonio, gracias por el apoyo que me diste durante la carrera, y por darme buenos consejos para que le sacara el mayor provecho posible a la escuela, por el apoyo personal que yo sentí durante el tiempo que compartimos, estoy orgullosa de ti y sabes que tienes mi amistad incondicional.

A Irys, Grace, Fer, Laurita y Hugo con quienes pasamos muchas cosas durante de la carrera, como los laboratorios de Micro I y II, la clase de Bacter (verdad Lau?) y las convivencias en copilco, inolvidables, gracias por hacer inolvidables mis años en la universidad.

A Miguel, gracias por apoyarme y creer siempre en mí, por tu cariño y amistad incondicional, por haberme introducido al grupo de trabajo y por haberme demostrado que si puedo lograr muchas cosas, por prestarme tu

hombro para llorar, por secar mis lágrimas y por saber como sacarme una gran sonrisa siempre, por nunca hacerme llorar. Juntos hemos pasado muchas cosas inolvidables y espero que aún haya más. Te quiero mucho y a tu familia también, en especial al pequeño Said, mami, Roy y Emanuel!

AGRADECIMIENTOS.

A Isabel Gracia Mora, gracias por aceptarme en el proyecto, apoyarme en la realización de ésta tesis, por todas tus aportaciones, y por transmitirme un poco de tu conocimiento y experiencia, pero sobre todo por haberme hecho sentir parte del grupo y contar siempre con tu comprensión, calidez humana y amistad.

A Maria Elena Bravo Gómez, gracias por toda tu ayuda en la realización de mi tesis, por tus correcciones y aportaciones, por los jalones de oreja, por los sushis compartidos, y por ser complice en muchas cosas, gracias por tu amistad.

A la Doctora Lena Ruiz Azuara, gracias por dejarme pertenecer al grupo de trabajo, por haberme aceptado desde el congreso en Querétaro, por haberme apoyado, por haberme regalado a mi gran compañero Flekoz, y por su amistad y por ser un ejemplo a seguir en el aspecto personal y profesional.

A todo el grupo del Bioterio, Lidia por su apoyo en la parte experimental de mi tesis y por la amistad que me has brindado, Luci, Celedonio Paquito, Marisol, Mabel, Héctor, Leo, la señora Lucia, Erika, Lilia, el señor Manuel, Rebe, Auro, gracias por todo el apoyo, y por hacer mi estancia en el Bioterio tan agradable, por hacerme sentir apreciada, gracias por los consejos profesionales y personales, y finalmente por las pláticas tan agradables en la oficina.

A todo el grupo del laboratorio 210, gracias por los seminarios compartidos, por nuestra afición por el sushi, Juan Carlos gracias por sentarte a ayudarme a darle un enfoque diferente y claro a mi tesis, aunque me dabas miedo por el tamaño, pero eres un dulce! , Silvia gracias por la amistad que construimos en este tiempo, por ser confidente y complice muchas veces y por las largas caminatas a copilco por café, Ana Laura, gracias por la amistad que tenemos, por las divertidas platicas y reuniones, y por que siempre es extremadamente divertido cuando tu cabra sigue a la de Honey.

Gracias a la Facultad de Química en donde realicé mis estudios universitarios, y a la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha formado desde iniciación universitaria, gracias por todo el conocimiento y

experiencias adquiridas en sus aulas y en espacios culturales, espero ser digna representante de mi alma mater.

Al proyecto DESARROLLO DE ANTINEOPLASICOS SINTÉTICOS DE NOVO Y SU EVALUACION PRECLINICA CONACYT-SALUD C01-7677, Y AL PROYECTO PAPIIT IN209907.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1 RESUMEN.....	1
1. Resumen.....	2
CAPÍTULO 2 INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 El cáncer.....	5
2.2 Breve historia del cáncer.....	5
2.3. Epidemiología.....	7
2.4 Características de las células cancerosas.....	11
2.4.1 Propiedades microscópicas.....	11
2.4.2 Propiedades cinéticas.....	12
2.5 Carcinogénesis.....	14
2.5.1 Metástasis.....	15
2.6. Clasificación del cáncer.....	15
2.6.1. Líneas celulares tumorales empleadas.....	16
2.6.1.1 HeLa.....	16
2.6.1.2 HCT-15.....	17
2.6.1.3 SkLu-1.....	18
2.6.2 Linfocitos humanos.....	18
2.7 Tratamientos contra el cáncer.....	19
2.7.1 Cirugía.....	19
2.7.2 Radioterapia.....	20
2.7.3 Inmunoterapia.....	20
2.7.4 Radioinmunoterapia.....	20
2.7.5 Terapia Génica.....	20
2.7.6 Quimioterapia.....	21
2.7.6.1 Historia de la Quimioterapia.....	21
2.7.6.2 Clasificación de los Quimioterapéuticos.....	22
2.7.6.2.1 Compuestos de platino.....	23
2.7.6.3 Principios biológicos de la Quimioterapia.....	24
2.7.6.4 Principios farmacológicos de la Quimioterapia.....	24
2.7.6.5 El quimioterapéutico ideal.....	25
2.7.6.5.1 Hipótesis de muerte celular.....	25
2.7.6.5.1.1 Cinética de primer orden.....	26

2.7.6.5.1.2 Toxicidad en el paciente.....	27
2.7.6.5.1.3 Selectividad.....	28
2.7.6.6 Desventajas de la Quimioterapia.....	29
2.7.6.6.1 Resistencia.....	30
2.7.6.6.2 Mecanismos de resistencia de los agentes antitumorales.....	30
2.7.6.7 Importancia del desarrollo de nuevos quimioterapéuticos.....	31
2.7.6.8 Metales con actividad antineoplásica.....	31
CAPÍTULO 3 ANTECEDENTES.....	33
3 Antecedentes.....	34
3.1 Casiopeínas®.....	34
3.2 Casiopeína® Ilgly y Casiopeína® III-ia.....	34
3.3 Avances en Casiopeína® Ilgly y Casiopeína® III-ia.....	37
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	39
4 Hipótesis y Objetivos.....	40
4.1 Hipótesis.....	40
4.2 Objetivos Generales.....	40
4.3 Objetivos particulares.....	40
CAPÍTULO 5 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	41
5 Desarrollo experimental.....	42
5.1 Líneas celulares.....	42
5.2 Materiales, equipos y reactivos.....	42
5.3 Soluciones.....	43
5.4 Descongelamiento de las líneas celulares.....	43
5.4.1 Cuantificación de células.....	44
5.4.2 Proliferación de líneas celulares tumorales.....	44
5.4.3 Tripsinización de líneas celulares tumorales.....	45
5.4.4 Resiembra del cultivo celular.....	45
5.5 Determinación de la CI ₅₀ por medio del ensayo de inhibición de la proliferación celular.....	45
5.5.1 Siembra de células en placas de 96 pozos.....	45
5.5.2 Preparación de las soluciones de compuestos evaluados.....	46
5.5.3 Adición de compuesto.....	47
5.5.4 Fijación de células.....	47

5.5.5 Tinción con sulforrodamina B.....	47
5.5.6 Lectura de absorbancia.....	47
5.6 Ensayo de cinética de inhibición y recuperación celular en líneas celulares tumorales.....	48
5.6.1 Siembra de células en placas de 96 pozos.....	48
5.6.2 Adición de compuestos en placas.....	48
5.7 Determinación de CI_{50} en linfocitos humanos aislados.....	49
5.7.1 Aislamiento de linfocitos humanos.....	49
5.7.2 Preparación y adición de soluciones de compuestos evaluados.....	50
5.7.3 Fijación de linfocitos humanos.....	51
5.7.4 Tinción de sulforrodamina B.....	51
5.7.5 Lectura de absorbancia.....	51
CAPÍTULO 6 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	52
6 Resultados y análisis de resultados.....	53
6.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}).....	53
6.1.1 Línea celular HeLa.....	53
6.1.1.1 Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) en la línea celular HeLa.....	54
6.1.2 Línea celular SkLu-1.....	55
6.1.2.1 Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) en la línea celular SkLu-1.....	56
6.1.3 Línea celular HCT-15.....	57
6.1.3.1 Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) en la línea celular HCT-15.....	58
6.1.4 Ensayo en Linfocitos Humanos no activados.....	59
6.1.5 Ensayo en Linfocitos Humanos activados con FitoheMATOGlutinina.....	60
6.2 Ensayos de cinéticas en líneas celulares tumorales.....	61
6.2.1 Serie 1. Cinética de inhibición de la proliferación celular.....	62
6.2.2 Serie 2. Evaluación de la recuperación de la proliferación celular.....	64
6.2.3 Serie 3. Cinética de recuperación de la proliferación celular.....	67
CAPÍTULO 7 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	70
7 Discusión y conclusiones.....	71
7.1 Ensayo de inhibición de la proliferación celular en líneas tumorales.....	71

7.2 Ensayo de inhibición de la proliferación celular en linfocitos humanos activados y no activados con un mitógeno.....	71
7.3 Ensayo de cinética de Inhibición de la Proliferación celular.....	72
7.4 Evaluación de la recuperación de la población de células tumorales.....	72
7.5 Ensayo de Cinética de recuperación de la proliferación celular.....	73
APENDICE 1. SERIES 1. Cinética de inhibición de la proliferación celular.....	74
APENDICE 2. SERIES 2. Evaluación de la recuperación de la proliferación celular.....	79
APENDICE 3. SERIES 3. Cinética de recuperación de la proliferación celular.....	84
Glosario.....	89
Bibliografía.....	91

CAPÍTULO 1

RESUMEN

Resumen

El cáncer es un conjunto de enfermedades de alta incidencia entre la población mundial y nacional, debido a esto se han buscado diferentes terapias para combatirlo, una de ellas es la quimioterapia. El objetivo de la quimioterapia es la eliminación de todas las células tumorales, sin embargo presenta algunas desventajas entre las que se encuentran los altos costos, la baja selectividad, la resistencia y la reaparición del cáncer después de haber seguido una terapia aparentemente exitosa debido a que no se eliminaron todas las células tumorales o debido a las propiedades carcinogénicas de la misma terapia. Es por lo anterior que resulta importante saber si la población de células tumorales y sanas tratadas con un quimioterapéutico son capaces de recuperarse del daño causado, o por el contrario, continua la disminución en la población celular después del tratamiento.

Debido a que el cáncer es un problema de salud pública, un grupo de investigadores encabezados por la Doctora Lena Ruiz Azuara ha desarrollado y diseñado un nuevo grupo de agentes quimioterapéuticos patentados bajo el nombre de Casiopeínas[®], buscando disminuir la toxicidad de la quimioterapia sobre las células sanas del paciente y reducir los costos. Éste grupo de nuevos agentes quimioterapéuticos ha mostrado tener actividad citotóxica, citostática y antineoplásica, lo que ha motivado a continuar su estudio con el objetivo de emplearlos en la clínica.

Entre la familia de compuestos Casiopeínas[®], se encuentran la Casiopeína[®] IIgly y la Casiopeína[®] III-ia, que ya han sido evaluadas tanto *in vivo* como *in vitro*; en la presente tesis, se evaluó la actividad citotóxica de dichas Casiopeínas en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos; además de evaluar la cinética de inhibición y recuperación de la proliferación celular

Se concluyó que la potencia de las Casiopeínas[®] y el Cisplatino[®] es similar, además las Casiopeínas no son capaces de inhibir la proliferación celular en linfocitos humanos activados o no con un mitógeno. Por otro lado en las condiciones experimentales empleadas no fue posible determinar la cinética

de inhibición o de recuperación de la proliferación celular causada por las Casiopeínas o el Cisplatino. Los resultados demostraron que la población de células tumorales tratadas con Casiopeínas o Cisplatino en el rango de tiempo estudiado no son capaces de recuperarse del daño ocasionado.

CAPITULO 2

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El Cáncer

Se considera al cáncer como un conjunto de enfermedades cuyo origen es común, ya que en todos los tipos de cáncer, una de las numerosas células de las cuales está compuesto el organismo se encuentra alterada de tal forma que se multiplica de forma incontrolada produciendo millones de células hijas igualmente alteradas, algunas de las cuales pueden diseminarse a otras partes del cuerpo(metástasis)[1, 2]. Por otra parte se le considera como un conjunto de enfermedades debido a que existen grandes diferencias entre los cánceres de distintos órganos, además de existir variabilidad significativa entre los tumores que tienen origen en el mismo órgano, e incluso presentan una importante heterogeneidad fenotípica entre las células de un mismo tumor[2, 3], lo que implica que su comportamiento y respuesta a un tratamiento puede variar significativamente[4].

La pérdida de control en la proliferación celular es el resultado de una serie de cambios genéticos en las células tumorales y se origina en un largo proceso de selección- variación similar al que se produce en la propia evolución. La variación es el resultado de la tendencia de las células tumorales a desarrollar procesos de cambios epigenéticos, por otra parte la selección proviene de las variadas condiciones micro ambientales a las que las células se ven sometidas y que van permitiendo la proliferación de algunas clonas[3].

2.2 Breve historia del cáncer[5]

Debido a su creciente incidencia, el cáncer ha sido calificado por algunos autores como la enfermedad de la civilización, aunque se ha encontrado evidencia de un caso de cáncer óseo en un esqueleto de un antropoide que tiene una antigüedad mayor al millón de años descubierto en la Isla de Java.

En los papiros de Edwin Smith, escritos entre los años 3000 y 2500 a.C., se describen ocho casos de “tumores o úlceras de mama” y en los papiros de Ebers, que datan de alrededor del año 1152 a.C. se reporta un caso de tumor

maligno de una extremidad, además se han encontrado evidencia de tumores en momias egipcias.

Por su parte, Hipócrates (460-370 a.C.) describe, basándose en la observación del enfermo, tumores de piel, mama, estómago, cervico-uterino y recto con lo cual contribuyó al conocimiento inicial acerca del cáncer y su clasificación. Es Hipócrates quien crea el término metástasis y fue el primero en describir el cáncer de matriz. Galeno (130-200 d.C.), el padre de la farmacia, contribuye también mediante su descripción del cáncer gástrico y el de esófago.

La contribución del mundo árabe al saber médico del cáncer está representado por Avicena (980-1037), quien describió cómo un tumor canceroso aumenta de tamaño progresivamente, invade y destruye los tejidos contiguos eliminando la sensibilidad de la parte afectada.

Con el desarrollo de la Anatomía, la Fisiología y la Patología, en los siguientes siglos aumentan las descripciones de diferentes tipos de cáncer, así como incrementa el número de colecciones de historias clínicas de casos de cáncer y observaciones epidemiológicas; como la realizada por Ramazzini (1713) acerca de la incidencia del cáncer de mama el cual es mucho más frecuente en las monjas que en el resto de las mujeres.

En la actualidad el nacimiento de una serie de organismos internacionales especializados en asuntos sanitarios ha conseguido sumar los esfuerzos de todos los países del mundo para luchar contra esta enfermedad. La fundación de la OMS (Organización Mundial de la Salud fundada el 7 de abril de 1948) ha logrado unificar una serie importante de criterios en la práctica médica y ha establecido la clasificación anatomoclínica de los tumores, basada en los órganos de origen. La aparición de la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer), con sede en Ginebra, facilitó la unificación de una clasificación internacional, la clasificación TNM, que sirve para clasificar la mayoría de los tumores sólidos de acuerdo con el tamaño de la neoplasia primaria (T), la presencia de ganglios metastásicos (N) y la existencia de metástasis a distancia (M). En función de la localización de la enfermedad, la extensión del tumor primario puede variar de T1 a T4, los ganglios de N0 a N3 y las metástasis de M0 a M1[3].

Por último, la fundación IARC (International Agency of Research in Cancer) de Lyon está dando gran impulso al estudio epidemiológico de los productos químicos que son carcinógenos para el hombre y sentando las bases para una prevención primaria del cáncer[5].

2.3 Epidemiología

En la actualidad el control del cáncer implica la prevención, la detección temprana de lesiones preneoplásicas[6], y la identificación de individuos con altas probabilidades de padecer cáncer debido a mutaciones genéticas recesivas o dominantes[7]. Dentro de la prevención, se incluye también la identificación de una gran cantidad de agentes carcinogénicos de origen químico, físico ó biológico[8], sin embargo, las cifras indican que no se ha conseguido el éxito total en ésta labor, ya que en el 2005 el cáncer fue la tercera causa de muerte en todo el mundo (figura 1); de los 58 millones de muertes que se registraron en el mundo, 7.6 millones (13%) se debieron al cáncer. Los tipos de cáncer de mayor incidencia fueron:

Tipos de cáncer de mayor incidencia

Pulmón	1.3 millones de muertes anuales
Estómago	Casi 1 millón de muertes anuales
Hígado	662 000 muertes anuales
Colón	655 000 muertes anuales
Mama	502 000 muertes anuales

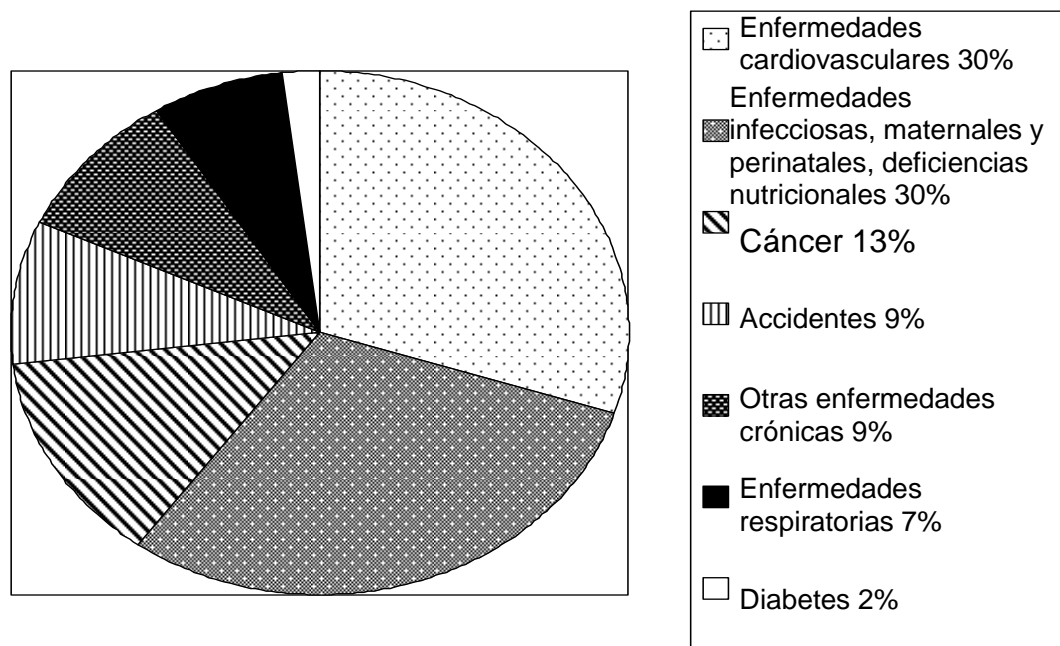


Figura 1. Principales causas de muerte, a nivel mundial en el año 2005[9]

Cabe resaltar que más del 70% de las muertes por cáncer registradas en 2005 se produjeron en países de ingresos bajos y medianos, así mismo, se prevé que la mortalidad anual a nivel mundial a causa de cáncer siga aumentando hasta alcanzar los 9 millones en 2015 y 11.4 millones en 2030[6, 10-13] . En los países desarrollados las principales causas de cáncer son el tabaco, la exposición a carcinógenos ambientales, la dieta y los hábitos poco saludables de vida[14]. La tasa de mortalidad varía en función del sexo siendo mayor en hombres que en mujeres fundamentalmente por dos razones; por un lado hay más casos de cáncer entre los hombres, y por otro lado los cánceres más frecuentes entre las mujeres tienen mejor pronóstico: mama y cérvix[12].

En el caso particular de México datos de la OMS muestran que en el año 2005 el cáncer fue la tercera causa de muerte (figura 2), murieron 64,000 personas, de las cuales el 57% era menor de 70 años[15].

Principales causas de muerte en México 2005

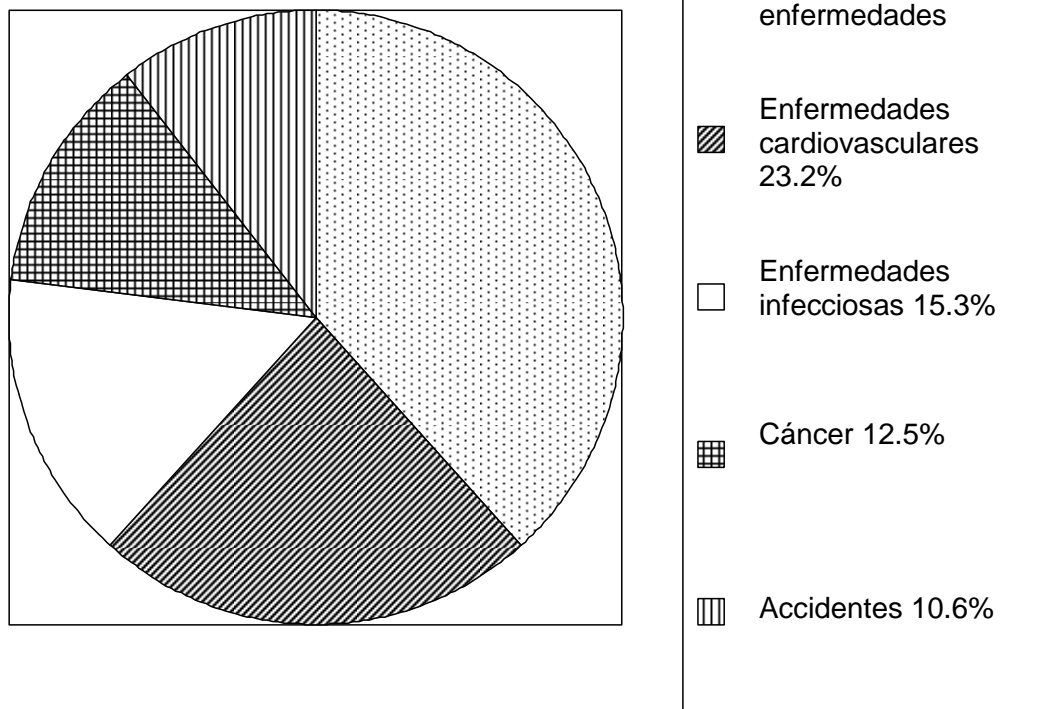


Figura 2. Principales causas de muerte en México, año 2005, fuente: OMS[15]

Datos del 8 de febrero del 2008 por parte del INEGI muestran que en el 2006 los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte a nivel nacional, por otra parte se observó que las defunciones por tumores malignos presentan también diferencias entre los sexos ya que en los hombres representó el 11.3% y en las mujeres el 14.9%, además de observarse un aumento en el número de muertes por tumores malignos en el periodo de 1997 a 2006(figura 3)[16]

Porcentaje de defunciones generales y por sexo causadas por tumores malignos, 1997-2006

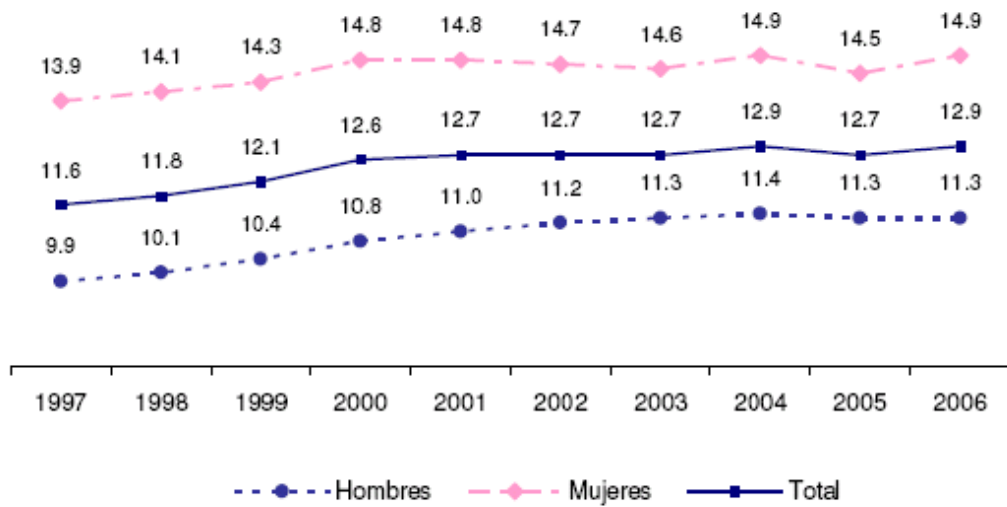


Figura 3. Gráfica de porcentaje de defunciones causadas por tumores malignos en el periodo 1997-2006, total y por sexo. Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales 1997-2006[16]

En los hombres los tres tipos de tumores malignos causantes del mayor porcentaje de defunciones por cáncer en el 2006 corresponden a: tráquea, bronquios y pulmón (16.6%), próstata (17.1%) y estómago (10.4%). En el caso de las mujeres, 13.9% de las defunciones por tumores malignos corresponden al cervico-uterino, 15% al de mama; y de estómago, y el de hígado y vías biliares intrahepáticas ocasionaron cada uno, 8% de las muertes como se observa en la figura 4. Si bien se observan diferencias en los órganos afectados por el cáncer en hombres y mujeres, los que inciden en órganos reproductivos son los que más defunciones causan en las mujeres[17].

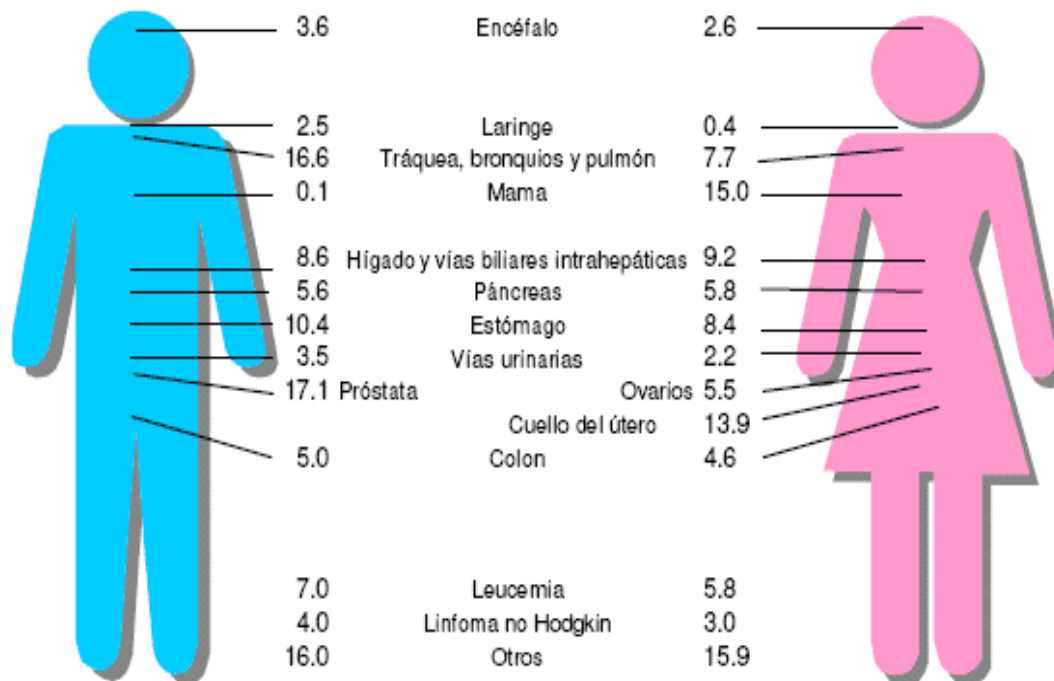


Figura 4. Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos según sexo, 2006. Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales.

Defunciones 2006. Base de datos[16].

2.4 Características de las células cancerosas

2.4.1 Propiedades microscópicas

En las células cancerosas se pueden observar varias características microscópicas que pueden permitir diferenciarlas de las células normales. Una de ellas es el pleomorfismo el cual se refiere a la diferencia en tamaño y forma que las células cancerosas muestran, algunas de ellas muestran tamaños extraordinariamente grandes y otras son tan pequeñas que no se pueden observar al microscopio; en muchas ocasiones se pueden observar varios núcleos en la misma célula. Las células cancerosas presentan otro fenómeno, llamado hiper cromatismo, que significa que la cromatina de la célula se encuentra más condensada de lo normal, lo cual hace que en una tinción se pueda observar de forma más pronunciada. Con respecto al núcleo, éste puede observarse más grande y en formas variadas (polimorfismo), además de presentar cantidades anormales de cromosomas (aneuploidia), y

macrolesiones cromosómicas como traslocaciones, (intercambio de material entre cromosomas), deleciones (perdida de secciones cromosómicas) y adiciones (cromosomas adicionales)[18].

2.4.2 Propiedades cinéticas

Las células cancerosas pierden el control de la proliferación celular, a diferencia de las células normales, para las cuales, la necesidad de renovación o reemplazo celular es el estímulo para que las células se multipliquen, y de esta forma mantienen un equilibrio entre la producción y la pérdida celular. Por el contrario en el caso de las células tumorales, una vez iniciada la proliferación, las células cancerosas proliferan de manera continua y sin control, ya que los mecanismos normales de control no detienen la proliferación celular[18].

Todas las células que se reproducen pasan por una serie de fases que se repiten periódicamente y reciben el nombre de ciclo celular; son cuatro, Fase G_1 (Intervalo comprendido entre la terminación de la mitosis y el comienzo de la síntesis de ADN), Fase S (en la que tiene lugar la síntesis de ADN), Fase G_2 (en la que tiene lugar la síntesis de RNA y proteínas), Fase M (periodo de mitosis, subdividida en profase, metafase, anafase y telofase, se separan los cromosomas y se reparten entre las dos células hijas), las células en reposo quedan en Fase G_0 , el tiempo que dura el ciclo completo se denomina tiempo de generación. El crecimiento tumoral y el de los tejidos normales, se desarrolla según la curva de Gompertz, que consiste en una disminución exponencial de una función exponencial. El crecimiento inicial es exponencial y durante esta fase logarítmica la velocidad de crecimiento es elevada y por tanto el tiempo de duplicación es breve. Al crecer la masa tumoral, la velocidad de crecimiento disminuye y la curva de crecimiento puede incluso alcanzar la fase de meseta. Esta fase estacionaria en el modelo de crecimiento, se caracteriza por su baja frecuencia de crecimiento y por un largo tiempo de duplicación[19]

La diferenciación es el proceso mediante el cual las células se diversifican y adquieren características estructurales y funcionales específicas. En el cáncer, la diferenciación se refiere al grado en que las células cancerosas

se asemejan a las células normales. Las que se parecen bastante a la célula normal pero que originan tumores de crecimiento lento, por lo general encapsulados, se denominan *bien diferenciadas* y tienen funciones y estructuras especializadas. Las que crecen de forma rápida y no poseen las características morfológicas ni las funciones celulares especializadas se llaman *indiferenciadas*; ésta pérdida de las características con respecto a las células normales se llama *desdiferenciación (anaplasia)*. Una célula maligna es más virulenta cuanto más indiferenciada sea.

Es posible que ciertas propiedades bioquímicas no se conserven debido al estado de anaplasia de las células malignas; o bien que adquieran nuevas propiedades como resultado de cambios en los patrones enzimáticos o de alteraciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Algunos ejemplos incluyen: producción de antígenos tumorales que marcan a la célula cancerosa como “ajena”, reproducción continua a pesar de la disminución de las concentraciones de hormona del crecimiento; incremento en la velocidad de la glucólisis anaeróbica lo que hace que las células dependan menos del O₂, y producción anormal de hormonas o de sustancias con características similares a las hormonas[18].

En la mayoría de las células tumorales existen cambios en el número normal de cromosomas (46) y su estructura. Estas alteraciones incluyen la pérdida o ganancia de cromosomas completos o secciones de cromosomas o traslocaciones en los cromosomas. Algunos de estos cambios pueden ser eventos primarios que ocurren en una etapa temprana durante el desarrollo del tumor y muy probablemente sean un evento importante en el desarrollo del mismo. Otros son eventos secundarios y pueden tener un papel importante en el comportamiento subsecuente del tumor. La pérdida de material cromosómico puede resultar en la delección de un gen supresor de tumor, por otro lado la duplicación de una región puede provocar una sobreexpresión de un oncogen[20].

Las células tumorales tienen la capacidad para generar metástasis, proceso por medio del cual las células tumorales se propagan desde el sitio de origen (tumor primario) hasta otros sitios distantes (tumores secundarios)[18].

2.5 Carcinogénesis

Las neoplasias se producen mediante un proceso llamado Carcinogénesis. El primer paso en este proceso es la Iniciación, el cual implica un cambio en el ADN o mutación que puede ser producido por una variedad de agentes químicos, virales o físicos. La susceptibilidad individual a la transformación maligna o durante las siguientes etapas de promoción y progresión es influenciada por factores genéticos relacionados con mecanismos anormales de reparación del ADN, pérdida de genes supresores de tumor, o a la variable expresión de oncogenes[21]. La Promoción es el proceso por medio del cual la célula inicializada se clona y expande hasta formar un tumor visible, normalmente una lesión benigna o foco preneoplásico como un papiloma; estas células deben sufrir uno o más cambios heredables durante la tercera etapa, Progresión, en donde progresan a una neoplasia maligna[22]

Los tumores malignos se distinguen de los benignos por sus características histopatológicas de morfología celular, invasividad, metástasis, proliferación, y diferenciación

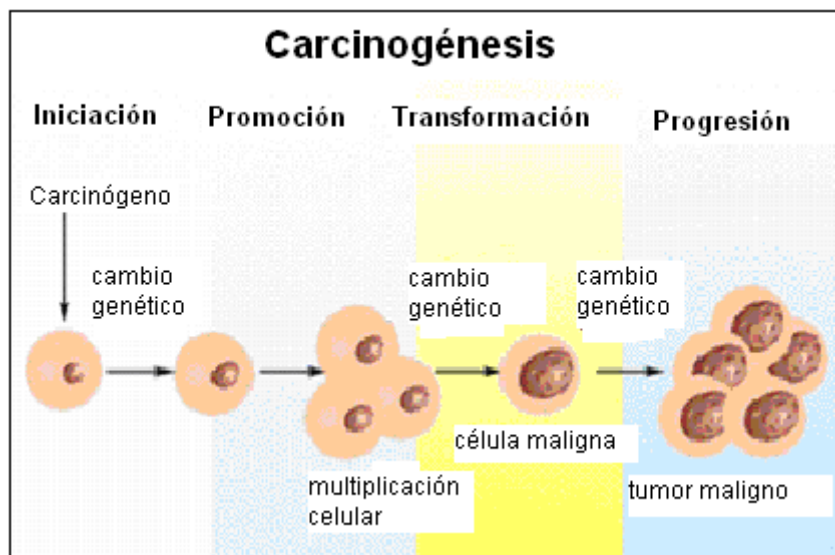


Figura 5. Esquema de las etapas de la carcinogénesis,

2.5.1 Metástasis

La Metástasis es un proceso por el cual el tumor primario es capaz de originar nuevos tumores en lugares lejanos dentro del organismo. En éste proceso ciertas células malignas del tumor primario (células metastásicas) penetran la barrera extracelular alrededor del tumor y viajan a través del tejido hasta el vaso sanguíneo ó linfático más cercano. Después, por medio de la secreción de enzimas proteasas (serina proteasas, metaloproteasas, cisteína proteasas y aspartilo proteasas) capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular[23], estas células entran al sistema linfático o al sistema circulatorio. A éste proceso se le conoce como intravasación; después, viajando en forma aislada, o en cúmulos, estas células tienen el potencial de acceder a casi cualquier parte del cuerpo. Las células metastásicas que sobreviven el rigor del viaje, se extravasan en el nuevo tejido u órgano blanco y comienzan un nuevo tumor secundario[24].

El dilema clínico es que para cuando el tumor primario es detectado y quirúrgicamente removido, la mayoría de las veces el proceso metastático ya ha comenzado. De hecho, en muchas ocasiones la expansión de colonias metastásicas ya está muy avanzada antes de que los síntomas clínicos sean evidentes, y en algunos casos, aún antes de que se manifieste el tumor primario[24]

.2.6 Clasificación de tumores

Los tumores pueden clasificarse como benignos o malignos. Un tumor benigno permanece confinado a su localización original; un tumor maligno es capaz de invadir tejidos normales cercanos y diseminarse a través del cuerpo. Solo a los tumores malignos se les denomina como cáncer[4].

Tanto los tumores malignos como los benignos son clasificados de acuerdo al tipo de célula del que provienen. La mayoría de los tumores se encuentran en uno de los tres grupos principales:

- Carcinomas: provenientes de células del endodermo o ectodermo[2, 4]

- Sarcomas: provenientes del mesodermo, son tumores sólidos de tejidos conectivos, como músculo, hueso, cartílago y tejido fibroso[2, 4],
- Leucemia y Linfoma: son tumores cuyas células cancerosas no forman tumores sólidos, sino que están esparcidas por todo el sistema linfático o circulatorio e interfieren con su funcionamiento normal. Las leucemias son un tipo de sarcoma[2, 25] que tiene origen en células hematopoyéticas, por su parte, los Linfomas tienen origen en células del sistema inmune[4]

2.6.1. Líneas celulares tumorales empleadas

2.6.1.1.HeLa

Carcinoma epitelial de Cérvix humano estadio IV A. Fue la primera línea celular aneuploide epitelial derivada de tejido humano y mantenida continuamente por cultivo celular. Fue aislada por G.O. Gey, W.D. Coffman y M.T. Kubicek en Febrero de 1951 de un adenocarcinoma del Cérvix de una mujer de raza negra de 31 años de edad. Desde su origen ha sido una de las líneas celulares más estudiadas, posee crecimiento en cultivo de tipo adherente (figura 6).

Un inóculo de $0.5-1.0 \times 10^5$ células viables en medio de cultivo a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 se multiplica 15 veces en 7 días, su tiempo de duplicación es de 11.2 horas[26].

Número ATCC: CCL-2
Designación: HeLa

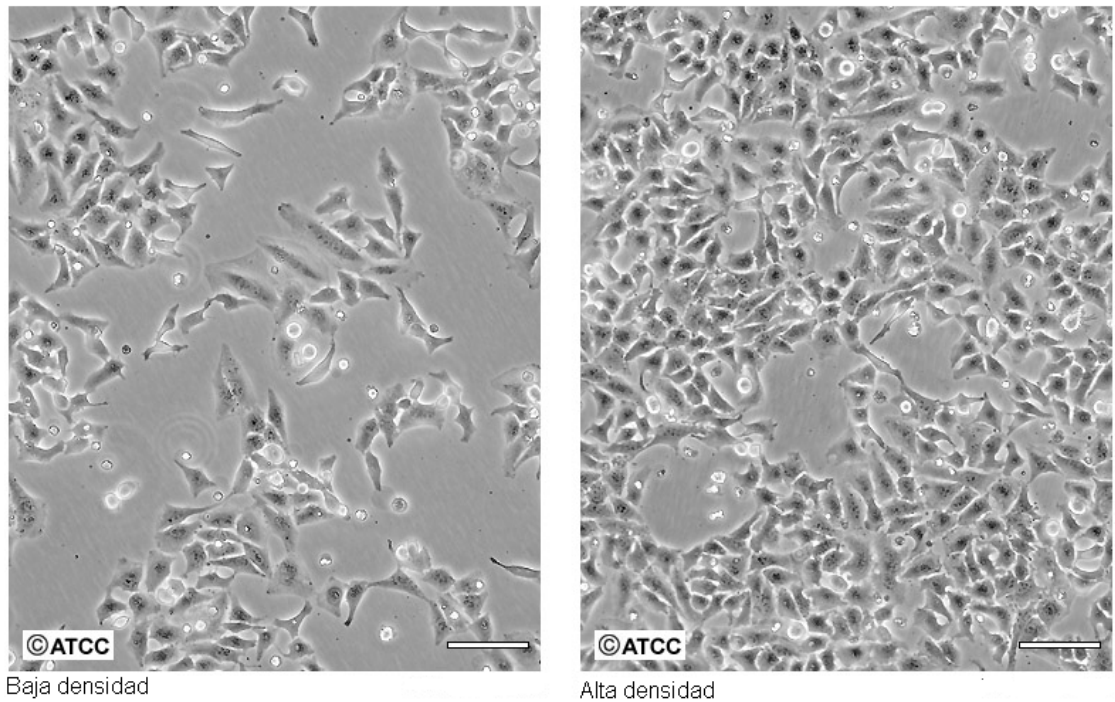


Figura 6. Imagen de células de la línea tumoral HeLa, tomado del catálogo de ATCC.

[27]

2.6.1.2 HCT-15

Adenocarcinoma colorectal humano, fue aislado de un paciente de sexo masculino[28] , es una de las dos líneas celulares de adenocarcinoma colorectal, que fueron aisladas por Dexter y asociados durante el periodo de 1977- 1979. Ésta línea tiene una morfología de tipo epitelial (figura 7) y es tumorigénica en ratón desnudo.

Un inóculo de 10^5 células en medio de cultivo se multiplica aproximadamente 8 veces en 7 días, su tiempo de duplicación es de 20.6 horas[26].

Número ATCC: CCL-225
Designación: HCT-15

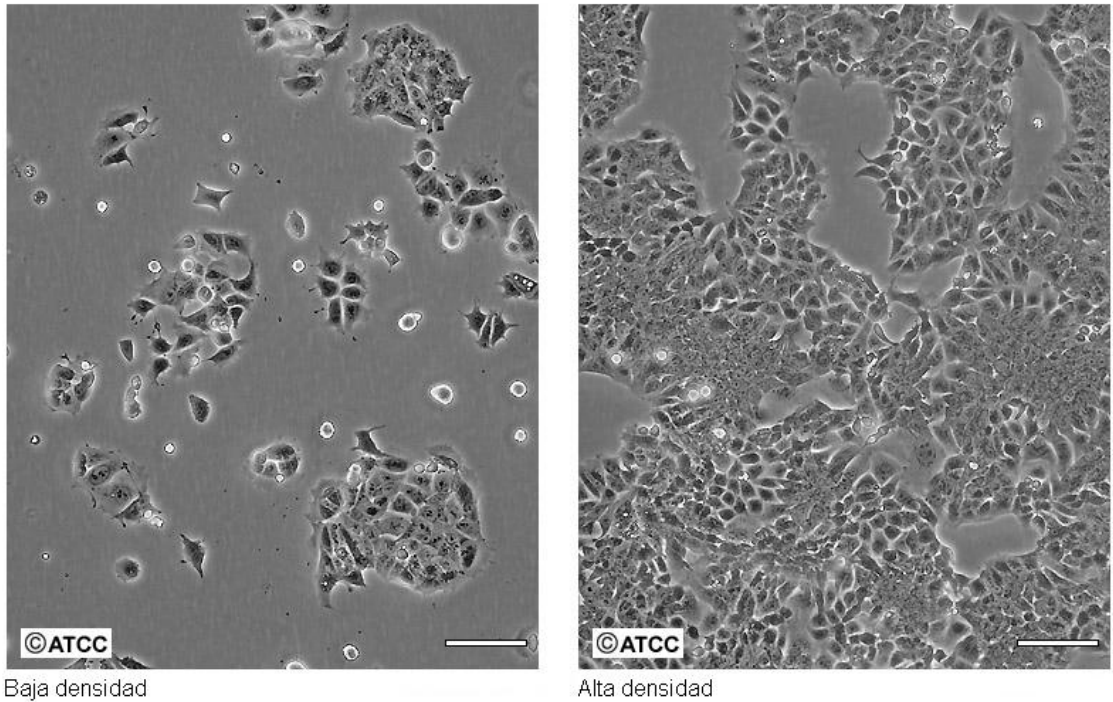


Figura 7. Imagen de células de la línea tumoral HCT-15, tomado del catálogo de ATCC[29]

2.6.1.3 SkLu-1

Adenocarcinoma de pulmón humano pobremente diferenciado estadio III. C. Southam aisló la línea SkLu-1 en 1969 de un tumor primario de adenocarcinoma de una mujer de 60 años de raza caucásica y tipo sanguíneo O⁺; crece en monocapa y tiene una morfología epitelial[26]

6.6.2 Linfocitos humanos

La línea celular escogida para comparar el efecto de los fármacos en células normales fueron los linfocitos de sangre periférica, y se escogieron porque como sistema celular de ensayo presentan una serie de características que los hacen especialmente apropiados para su utilización:

- a. Disponibilidad fácil y en gran número (1 ml de sangre contiene de 1 a 3 millones de linfocitos).
- b. Crecimiento en cultivo fácil tras ser estimulados con un mitógeno (normalmente fitohemaglutinina)[30].
- c. Poseen una amplia distribución en el organismo, y los linfocitos circulantes en individuos sanos, normalmente se encuentran en fase de no división (G_0), pero al cultivarlos en presencia del mitógeno se estimula la división mitótica en 24 horas[30]
- d. Los linfocitos tienen una vida media de aproximadamente cuatro años, aunque se pueden encontrar linfocitos capaces de sobrevivir durante varias décadas[31, 32].

Ya que en los pacientes, la mayoría de los linfocitos de sangre periférica se encuentran en fase de no división (G_0)[33], se decidió primero evaluar el efecto de los fármacos sobre los linfocitos aislados, sin activarlos con el mitógeno fitohematoglutinina; y después evaluar el efecto de los mismos compuestos cuando los linfocitos han sido activados por 24 horas con el mitógeno.

2.7 Tratamientos contra el cáncer

2.7.1 Cirugía

Es la forma más antigua de tratamiento del cáncer[34].La extirpación quirúrgica completa es el tratamiento más eficaz para la mayoría de los tumores sólidos, sin embargo, la práctica actual de la cirugía oncológica demanda conocimientos de la biología tumoral y un tratamiento multidisciplinario que excede los conceptos técnicos que participan en la denominada extirpación radical de los órganos[3].

2.7.2 Radioterapia

Es el empleo de radiación X o gamma para obtener la destrucción total del tumor sin producir alteraciones graves o irreversibles en los tejidos sanos. La radioterapia tiene una acción selectiva, lenta y gradual, que poco a poco, produce en las células tumorales daños incompatibles con su supervivencia, dejando a los tejidos normales la posibilidad de reparar los efectos de la irradiación[35, 36].

2.7.3 Inmunoterapia

El objetivo primario de la inmunoterapia consiste en desarrollar las capacidades normales de defensa del organismo humano frente al tumor mediante el reclutamiento de los mecanismos de defensa naturales del huésped, el sistema inmune, y de esta forma combatir el proceso maligno invasor. Éste tipo de terapia presupone que las células tumorales poseen antígenos de superficie inmunológicamente reactivos no existentes en las células normales[36, 37].

2.7.4 Radioinmunoterapia

La Radioinmunoterapia (RIT) es una modalidad terapéutica en onco-hematología que utiliza conjugados de radioisótopos y anticuerpos monoclonales dirigidos contra células tumorales, de forma que los efectos de la radiación ionizante utilizada en la radioterapia esten dirigidos a las células tumorales. La RIT es bien tolerada, siendo su efecto tóxico más destacable la mielosupresión transitoria.[38]

2.7.5 Terapia Génica

La Terapia Génica involucra transferir genes a las células para restaurar o conferirles nuevas funciones[39, 40]. En el caso del cáncer, la terapia génica tiene por objetivo inactivar un oncogén o reemplazar un gen supresor de tumor mutado o introducirlo en caso de estar ausente[40]. En los últimos años se han

visto los primeros intentos para utilizar la terapia génica, aunque continua en fase experimental[39].

2.7.6 Quimioterapia

Paul Ehrlich acuñó la palabra quimioterapia para el uso de un compuesto químico de composición conocida contra parásitos, pero en el caso de la quimioterapia del cáncer, se refiere a la habilidad de curar el cáncer por medio del uso de compuestos químicos que eliminan a las células tumorales[41]. Así, la Quimioterapia contra el Cáncer actualmente se define como un tratamiento general y sistémico capaz de alcanzar todas las células tumorales, salvo el caso particular de las localizaciones inaccesibles, como el sistema nervioso central[42].

2.7.6.1 Historia de la Quimioterapia antineoplásica

La historia de la quimioterapia contra el cáncer es relativamente reciente. La quimioterapia moderna comenzó después de la segunda guerra mundial, cuando se observó que una variedad de compuestos podían eliminar las células transformadas o inhibir significativamente su proliferación[43]. Los primeros estudios clínicos sobre la mostaza nitrogenada o azoiperita, la cual es un agente alquilante capaz de adicionar un grupo alquilo en un nitrógeno de la cadena de ADN fueron realizados por Gilman, Goodman, Lindskog y Dougherty en 1942[41, 44, 45]. Otro hito importante fue la demostración en 1948, por Farber y cols.[46] del efecto beneficioso de un análogo del ácido fólico en la leucemia linfoblástica infantil. Más adelante, diversas sustancias químicas demostraron actividad antitumoral en modelos experimentales con animales, y muchas de ellas acabaron siendo evaluadas en ensayos clínicos en humanos. El efecto antitumoral del antagonista de las purinas 6-mercaptopurina fue descrito por Elion y Hitchings en 1952[47]; este compuesto es empleado en el tratamiento de leucemias, es un análogo de las purinas hipoxantina y guanina en donde el grupo ceto del C₆ del anillo de purina se remplazó por un átomo de azufre. La 6-mercaptopurina sirve como sustrato de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil tranferasa para producir ácido tioinosínico, el cual

interfiere con la síntesis de adenina y guanina[48] . A comienzos de los años 50, Heidelberg sintetizó el 5-fluorouracilo después de llegar a la conclusión correcta de que un antimetabolito similar al uracilo debía bloquear la formación de nucleótidos de timina y prevenir así la síntesis de ADN. Este antimetabolito es una pirimidina halogenada que resulta del cambio de un átomo de Hidrógeno del carbono 5 del uracilo por un átomo de Fluor.

En los años 60's Skipper y colegas[49-51] crearon los principios rectores de la Quimioterapia usando un modelo de leucemia murina L1210, pero la adecuada aplicación de éstos principios requirió el entendimiento de las diferencias entre las características de crecimiento de la leucemia murina y los diferentes tipos de cáncer humanos. Otras fuentes de error de este modelo fueron la simple presunción de poder tratar al cáncer como una infección bacteriana y tratar de extrapolar los datos obtenidos en modelos murinos al modelo humano[41].

Durante las décadas de 1960 y 1970 se utilizaron en clínica muchos fármacos antineoplásicos nuevos, y en los años siguientes, el énfasis se centró en el desarrollo de fármacos nuevos, nuevas combinaciones de los fármacos disponibles, la optimización de la posología, esquema de tratamiento y la modulación de sus efectos tóxicos[3].

2.7.6.2 Clasificación de los quimioterapéuticos

Los quimioterapéuticos citotóxicos matan células tumorales dañando el ADN, interfiriendo con su replicación o inhibiendo la división celular. Los quimioterapéuticos han sido clasificados por su naturaleza (orgánica o inorgánica), por su efecto en el ciclo celular o por su mecanismo de acción[40]:

- Por su efecto en el ciclo celular: Los fármacos que afectan a la célula durante una fase específica del ciclo celular, son llamados "fase –específicos"; en contraste los fármacos que afectan a la célula durante cualquier fase del ciclo celular son llamados "fase-noespecíficos"[40]
- Por su mecanismo de acción. Se clasifican en agentes alquilantes, antimetabolitos (análogos estructurales), fijadores de

la tubulina, inhibidores de la topoisomerasa, complejos de platino, antibióticos, agentes hormonales[48, 52].

2.7.6.2.1 Compuestos de platino

Entre los compuestos de platino destacan el cisplatino, carboplatino y oxaliplatino (figura 8). El carboplatino es menos reactivo que el cisplatino, el cual se coordina al ADN en zonas nucleofílicas como el nitrógeno en la posición 7 o el oxígeno en la posición 6 de la guanina, alterando de esta forma la estructura y funciones del ADN. Se utiliza en el tratamiento de carcinomas de ovario, testículo, vejiga y teratomas. La vía de administración es intravenosa a la dosis de 80mg/m² de superficie corporal durante tres semanas, se une en un 90% a las proteínas plasmáticas, no atraviesa la barrera hematoencefálica, se elimina por el riñón y entre sus efectos secundarios destacan: náuseas, vómitos, mielod depresión, ototoxicidad, nefrotoxicidad, neuropatías[19].

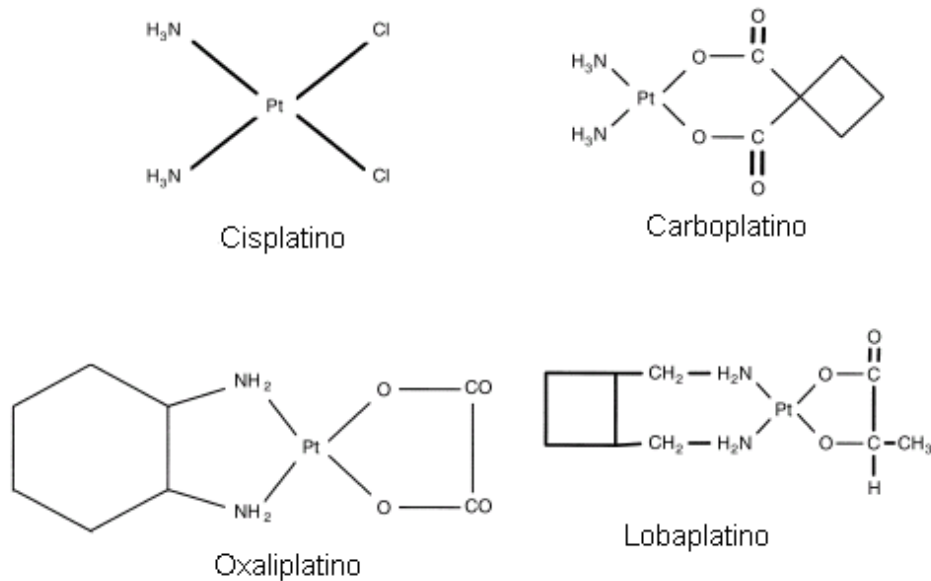


Figura 8. Estructura del Cisplatino y algunos de sus análogos, Carboplatino, Oxaliplatino y Lobaplatino

2.7.6.3. Principios Biológicos de la Quimioterapia

La mayoría de los fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer dañan al ADN o inhiben su replicación, consecuentemente éstos fármacos son tóxicos no solamente para las células tumorales si no también para las células normales, especialmente para éstas células normales que son reemplazadas continuamente.

La acción de los quimioterapéuticos contra las células normales contribuye mayoritariamente a su toxicidad y limita su efectividad[4].

2.7.6.4 Principios Farmacológicos de la Quimioterapia

La interrelación de la farmacocinética del quimioterapéutico y la cinética de proliferación de la célula tumoral es la parte más importante en la quimioterapia del cáncer, ya que regula la destrucción celular después de la quimioterapia[36, 41]. Los conceptos y los datos de citocinética influyen notablemente sobre el esquema de tratamiento, este representa uno de los puntos clave del éxito del tratamiento con quimioterapéuticos. Las consideraciones citocinéticas son:

- Conocimiento de efecto terapéutico de un determinado agente sobre el ciclo celular
- Conocimiento del efecto de un determinado agente sobre las células en replicación.
- Conocimiento del efecto citocinético de un determinado agente sobre los tejidos normales.
- Conocimiento de la citocinética de un determinado tipo de neoplasia durante el tratamiento[36]

Casi todos los quimioterapéuticos comparten dos características comunes: trabajan afectando la síntesis o función del ADN, y generalmente no matan células que no se encuentran proliferando, a menos que estas células estén destinadas a dividirse después de la exposición al quimioterapéutico[41]. El tratamiento de los tumores está actualmente basado en las diferencias que existen en cuanto a respuesta a los fármacos entre las células normales y las células tumorales. En parte tal diferencia puede explicarse considerando las

distintas características proliferativas; sin embargo, la destrucción del tejido neoplásico se encuentra también en relación con mecanismos biológicos, bioquímicos y farmacocinéticos[36]. El efecto terapéutico y tóxico se relaciona con el tiempo y frecuencia de exposición a una dosis efectiva. El mismo grado de citotoxicidad se puede alcanzar en diferentes dosificaciones de una misma concentración de compuesto multiplicado por el tiempo de exposición (CxT)[41].

2.7.6.5. El quimioterapéutico ideal

El quimioterapéutico ideal debería erradicar las células tumorales sin dañar a los tejidos normales. Desafortunadamente hasta el momento ningún quimioterapéutico cumple éste criterio[52]. Las características deseadas en un quimioterapéutico son[53]:

- Cinética de primer orden
- Toxicidad
- Selectividad

2.7.6.5.1. Hipótesis de muerte celular[36]

Los aspectos cuantitativos de la capacidad de los fármacos antiproliferativos de destruir las células neoplásicas, son descritos en la Hipótesis de muerte celular (Cell Kill Hypotesis) que establece los siguientes puntos:

- La supervivencia de los animales es inversamente proporcional al número de células tumorales inoculadas o que sobreviven tras tratamiento.
- Una única célula neoplásica es capaz de multiplicarse hasta matar al huésped.
- Para la mayor parte de los fármacos antiproliferativos existe una clara relación entre dosis y capacidad de eliminar enteramente las células neoplásicas dentro de los límites de toxicidad tolerable por el huésped.

- La destrucción celular por los fármacos sigue la ley de cinética de primer orden (mientras la dosis es constante y eficaz).

2.7.6.5.1.1 Cinética de Primer orden

Como se observa en la gráfica de la figura 9 al administrar una dosis determinada del fármaco /unidad de tiempo se elimina una fracción constante de células, no un número fijo[36] Esto significa que la misma dosis que disminuye la población de células tumorales de 10^6 a 10^3 será necesaria para disminuirla de 10^3 a 10^0 .

Como un ejemplo, si un tumor tiene una población de 10^6 células, al administrar un tratamiento que es 99.9% efectivo, sobrevivirán 10 células intactas, por lo tanto el tratamiento eliminará los síntomas clínicos, pero el tumor puede reaparecer[53].

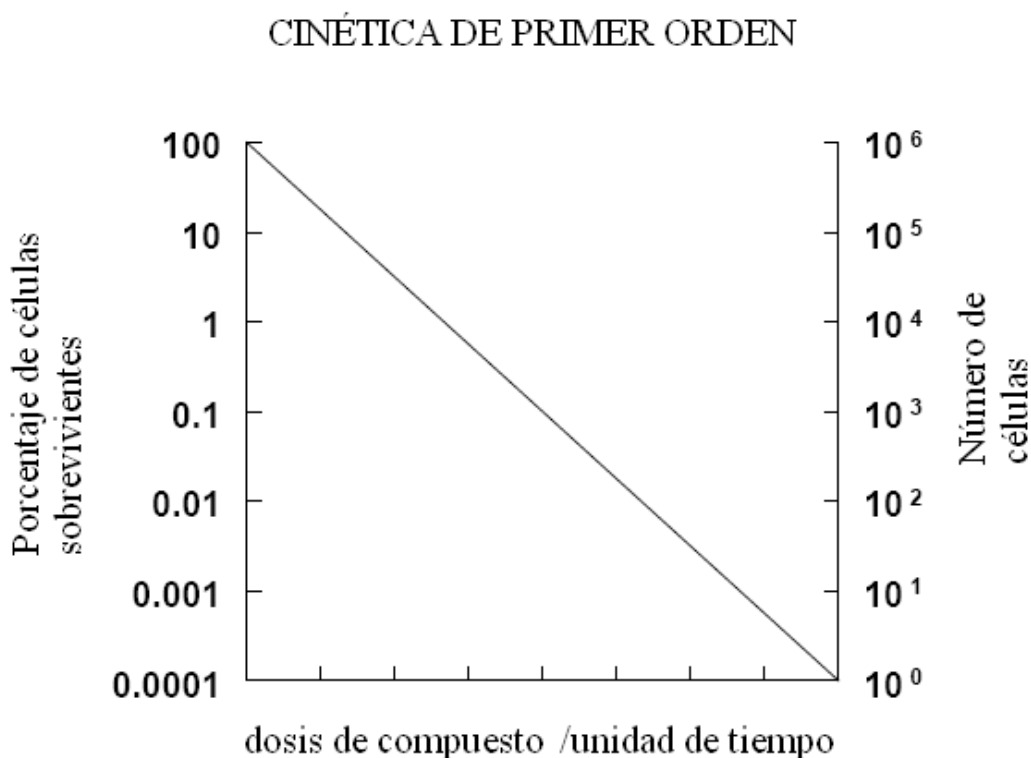


Figura 9. Cinética de primer orden deseada en un quimioterapéutico, tomado de Bast Fr, Cancer Medicine [53]

Por tanto, la destrucción celular por los fármacos sigue un modelo exponencial, modelo que se conoce como log-kill, ya que se utiliza una escala logarítmica. Algunos tratamientos pueden ser clasificados en base a su potencial de log-kill; por ejemplo, un log kill de 2 reduce una determinada población celular de 10^9 a 10^7 células; y aunque representa la eliminación del 99% queda claro que el tratamiento debe ser repetido varias veces para obtener un control de la población celular tumoral[36].

2.7.6.5.2. Toxicidad en el paciente

Los efectos terapéuticos sobre el tumor y la toxicidad se relacionan con la dosis del quimioterapéutico y el esquema de tratamiento. Ambas curvas mostradas en la figura 10, son ascendentes, una representa la respuesta en el tumor y la otra representa la toxicidad en el paciente; el grado del desplazamiento de la curva de toxicidad hacia la derecha refleja el índice terapéutico (dosis tóxica media/ dosis efectiva media), que usualmente tiene un valor pequeño para los agentes quimioterapéuticos[53].

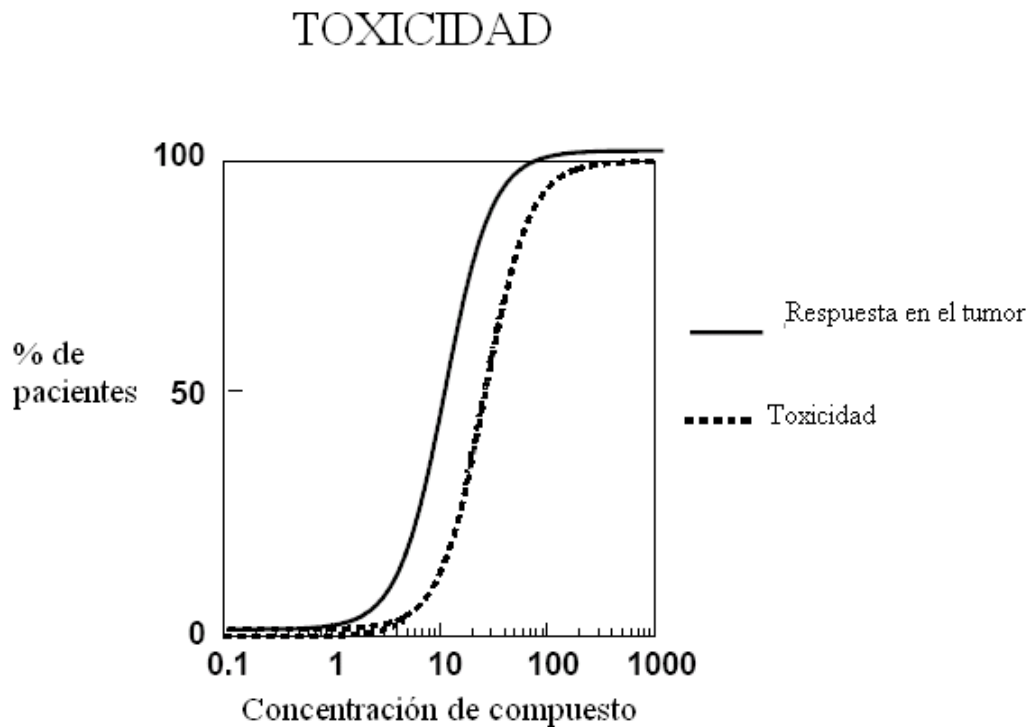


Figura 10. Comparación de la respuesta del tumor y la toxicidad que se induce en un paciente, tomado de Bast Fr. Cancer Medicine[53].

2.7.6.5.3 Selectividad

La selectividad de un quimioterápico se evalúa mediante la comparación de la recuperación y muerte de la población de células normales provenientes de la médula ósea con respecto a la muerte y recuperación de la población de células tumorales. La administración de un quimioterápico causa una destrucción similar de células tumorales y normales, pero se espera que la velocidad de recuperación de la población de células normales sea mayor que la de la población de células tumorales; sin embargo, el número de células progenitoras de médula ósea eventualmente decrece durante la terapia continua[53].

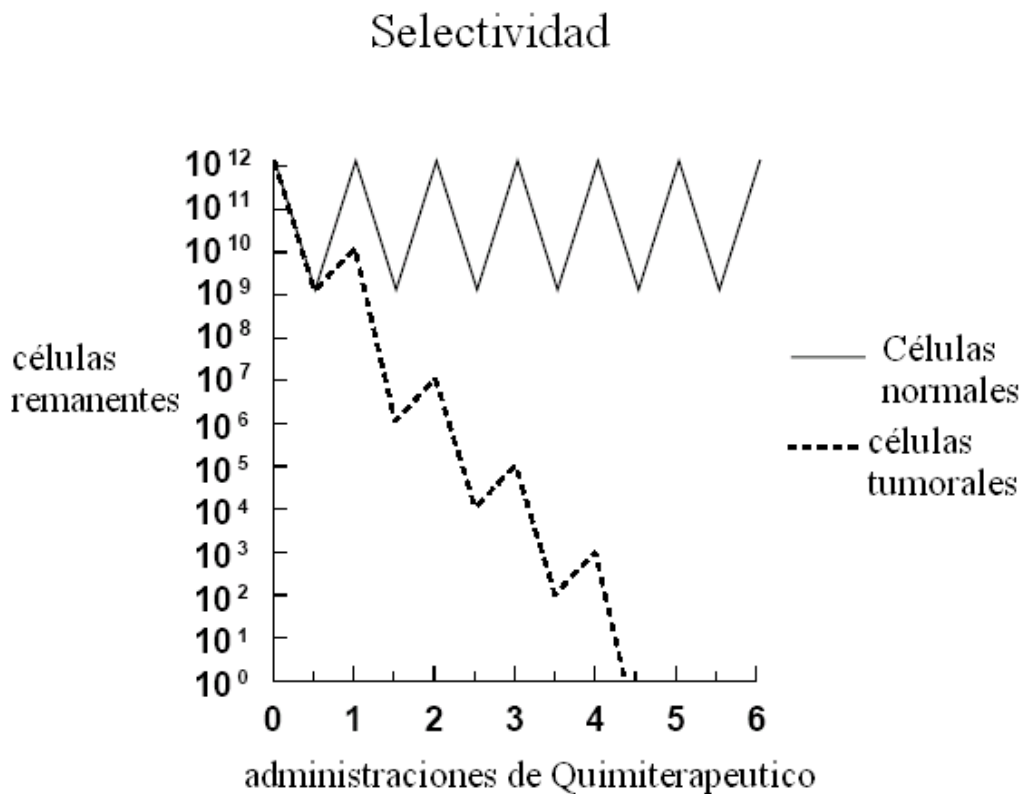


Figura 11. Selectividad, tomado de Bast Fr, Cancer Medicine[53]

2.7.6.6. Desventajas de la Quimioterapia

Al comparar la quimioterapia contra el cáncer y la quimioterapia contra enfermedades infecciosas es posible marcar algunas desventajas de la quimioterapia del cáncer. El concepto de toxicidad selectiva usado en la quimioterapia contra enfermedades infecciosas usualmente no es operativo en la quimioterapia contra el cáncer, ya que las diferencias bioquímicas que existen entre las células cancerosas y normales del mismo tejido no son aprovechadas por los quimioterapéuticos usados en la clínica actualmente. Por lo general la gran mayoría de los agentes anticancerosos, interfieren de una forma no selectiva en los procesos celulares y de crecimiento celular. Muchos de estos compuestos citotóxicos muestran un efecto similar en células normales y en el tejido neoplásico, por tanto, no es sorprendente que estos compuestos produzcan efectos secundarios serios y debilitantes. Las dosis frecuentemente utilizadas de estos compuestos citotóxicos son altas para detener el crecimiento tumoral o para obtener una remisión temporal de los síntomas. Por otra parte también deprimen las funciones de la médula ósea, reduciendo drásticamente el número de plaquetas, leucocitos y linfocitos, lo cual produce a su vez mayor susceptibilidad a infecciones y hemorragias internas[24].

Otra ventaja en el tratamiento de enfermedades infecciosas, pero no en la quimioterapia del cáncer, involucra la respuesta inmunológica del paciente hacia sustancias ajenas. En las enfermedades infecciosas los compuestos utilizados son comúnmente bacteriostáticos, los mecanismos de defensa del cuerpo, como la producción de anticuerpos y la fagocitosis, eliminan a los invasores. Con pocas excepciones, esto no ocurre con los tumores. De hecho muchos quimioterapéuticos también son inmunosupresores ya que pueden eliminar la producción de anticuerpos, e inhibir la habilidad del paciente para combatir simultáneamente las infecciones lo que puede entonces convertirse en la causa de muerte[24].

En el caso del cáncer, el concepto de cura no es tan claro como lo es en otras enfermedades; una definición adecuada para la cura del cáncer es la no-recurrencia de los síntomas por 5 años desde la fecha del diagnóstico inicial. Una de las principales hipótesis en el uso de la quimioterapia es que todas las células neoplásicas se deben erradicar si se alcanza la curación. Ya sea que se utilice la cirugía, la radioterapia, quimioterapia, o más comúnmente, una

combinación de todas ellas; el objetivo del tratamiento es la eliminación total de las células neoplásicas[24].

2.7.6.6.1 Resistencia

Otra importante desventaja de la Quimioterapia es la generación de resistencia a los agentes quimioterapéuticos utilizados en la clínica y, por lo tanto, la aparición de tumores refractarios, lo que impulsa la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos con nuevos o diferentes mecanismos de acción[41].

Se debe enfatizar que el presentar resistencia a un agente quimioterapéutico de una clase determinada no necesariamente implica resistencia a todos los agentes de la misma clase.

La resistencia es de dos tipos:

Intrínseca; ocurre cuando el tumor no es susceptible o es ligeramente susceptible al tratamiento, ésta resistencia se puede deber a obstáculos farmacológicos o debido a propiedades heredadas de la línea celular[54].

Adquirida; se observa en pacientes en los que el cáncer remite después de haber seguido una terapia aparentemente exitosa. En éste caso, el nuevo tumor se genera a partir de un pequeño número de células resistentes que sobrevivieron a la terapia inicial[54]; por lo tanto, es muy importante tratar siempre de eliminar todas las células tumorales durante la quimioterapia.

2.7.6.6.2 Mecanismos de resistencia a los agentes antitumorales[19]

Los principales mecanismos de resistencia a los agentes antineoplásicos son los siguientes:

- Inactivación del fármaco.
- Insuficiente activación *in vivo* del fármaco por pérdida de la acción de la enzima correspondiente.

- Cambios en las vías metabólicas, con la utilización de otra vía bioquímica, o por disminución de las necesidades de un substrato metabólico.
- Disminución de la afinidad del fármaco por sus receptores o aumento del número de estos.
- Disminución de la captación del fármaco activo por la célula cancerosa.
- Presencia de enzimas reparadoras del daño celular.

2.7.6.7 Importancia del desarrollo de nuevos quimioterapéuticos

En las últimas 3 décadas se ha realizado un mayor esfuerzo en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos a través del cernimiento empírico y el diseño racional.

El desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos sigue siendo necesario, ya que aunque se estén logrando grandes avances en la cirugía y radioterapia, los alcances de éstas terapias son limitados debido a la propensión de varios tumores sólidos a diseminarse (metástasis) a lugares inaccesibles del cuerpo, muchas veces éste proceso ocurre antes del diagnóstico del paciente e inclusive antes de la aparición de síntomas del tumor primario[55].

La quimioterapia falla actualmente debido a dos razones: la primera es que varios tipos de cáncer humano de alta incidencia responden pobremente a los agentes que se usan en la actualidad, y muchos otros que responden inicialmente al tratamiento no son curados y eventualmente desarrollan resistencia al fármaco utilizado[55].

2.7.6.8 Metales con actividad antineoplásica

Se ha demostrado que algunos metales como el Platino (Pt), y Rodio (Rh) poseen actividad antineoplásica en forma de complejos[56, 57]. La actividad biológica de los iones metálicos se debe a que estos iones son deficientes de electrones, mientras que la mayoría de las moléculas biológicas (proteínas, ADN) y pequeñas moléculas (O₂) importantes para la vida son ricas

en electrones, por tanto, los iones metálicos tienden generalmente a unirse o interactuar con muchas de las moléculas biológicas importantes[58]. Los metales de transición pueden catalizar la generación de especies reactivas de Oxígeno (ROS), las cuales juegan un papel importante, pero poco comprendido, sobre la citotoxicidad mediante la oxidación de diferentes componentes celulares y la modificación del balance redox de la célula[58]. Actualmente se sabe que el complejo metálico en conjunto, es decir el metal y los ligantes son importantes[56], además la coordinación de metales es una de las estrategias más usadas en el diseño de reservorios de fármacos de acción prolongada o de lenta liberación[58].

Históricamente, el potencial antitumoral de fármacos que contienen metales, ha sido ampliamente evaluado. El caso específico de los compuestos metálicos de platino, como el cisplatino y sus análogos[59] ha generado gran interés en diseñar otros compuestos alternativos que contengan platino[58].

Además de controlar la selectividad de éstos complejos metálicos, deben de tener buenas propiedades fisicoquímicas; ya que muchos de ellos, no pueden ser evaluados en las fases clínicas debido a algunas de sus propiedades físico-químicas como baja solubilidad en agua, inestabilidad en medios acuosos y su tendencia a degradarse al exponerse a la humedad, luz o aire[58]. Éstos problemas han contribuido al escaso desarrollo de fármacos que contienen metales; y como consecuencia, a pesar de su buena actividad citotóxica *in vitro*, muchas veces no se evalúan en fases clínicas[58].

CAPITULO 3

ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES

3.1 Casiopeínas[®]

Debido a la alta incidencia de tumores malignos entre la población, a los altos costos y la baja selectividad de los quimioterapéuticos empleados actualmente en la clínica[24], a principio de los años 80's un grupo de investigadores de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, encabezados por la Dra. Lena Ruiz Azuara diseñó un grupo de compuestos de coordinación con potencial actividad antineoplásica[60-63] llamados Casiopeínas[®][64, 65]. Estos compuestos se definen como un grupo de compuestos de coordinación de cobre (II) con dos ligantes bidentados; el primer ligante es del tipo diimina (N-N) como la 1-10-fenantrolina o la 2,2'-bipiridina sustituidas; y el segundo ligante cargado es de tipo N-O (α -aminoacido) o donador O-O (acetilacetato o salicilaldehido)[64, 65]

En las hipótesis de posibles mecanismos de acción debido al diseño de los compuestos se propone al cobre, que es un metal esencial, como participante en una reacción de Fenton para la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's), al ligante diimina como un intercalante del ADN[58, 66], y según el diseño de los compuestos se espera finalmente que el segundo ligante les confiera selectividad antitumoral. Estos compuestos han demostrado actividad citotóxica[67, 68], citostática[69, 70] y antineoplásica[71] con buenos resultados para su empleo como antitumorales en la clínica por lo que es necesario estudiarlas detalladamente.

3.2 Casiopeína[®] IIgly y Casiopeína[®] III-ia

Dentro de la familia de las Casiopeínas, la Casiopeína[®] IIgly y Casiopeína[®] III-ia han sido ampliamente estudiadas tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*[67, 68, 70-73], se han realizado estudios de estabilidad de algunos miembros de esta familia de compuestos[74] algunas de sus características son:

La Casiopeína Igly[®]: $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, cuya estructura se muestra en la figura 12 tiene un peso molecular de 443.90 g/mol[75, 76], ha sido caracterizada por varios métodos analíticos y se ha resuelto su estructura por técnica de difracción de rayos X[77]

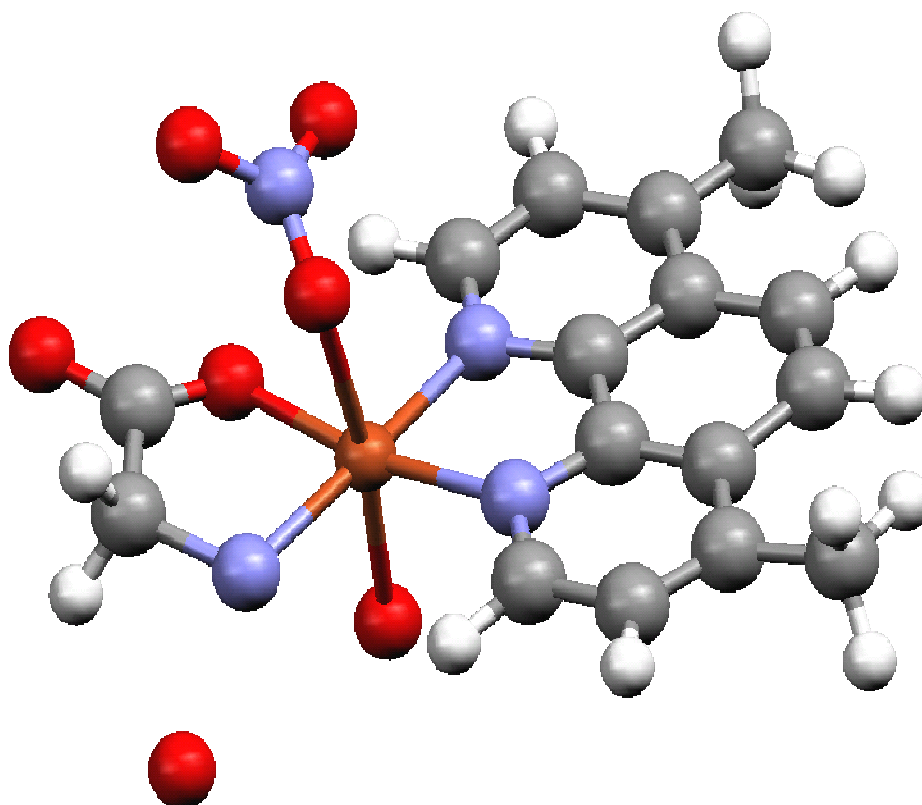


Figura 12. Estructura de la Casiopeína[®] Igly, tomado de Solans X, Acta Crystallographica.[77]

Para la Casiopeína[®] III-ia, la fórmula correspondiente es: $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{acetilacetonato})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [73], y su estructura se muestra en la figura 13.

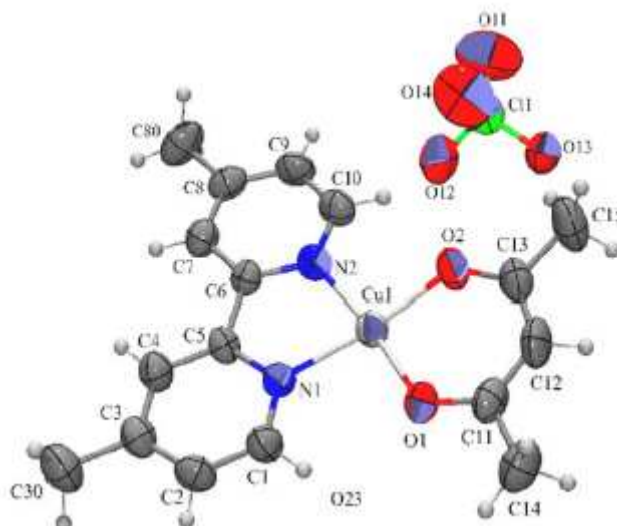


Figura 13. Estructura de la Casiopeína® III-ia, teniendo como contra-ión a una molécula de ClO_4^- , tomado de Tovar-Tovar Caracterización cristalográfica y EPR de complejos mixtos de Cu(II) (Casiopeínas) e interacciones con algunas biomoléculas.[73]

La Casiopeína III-ia con el contra-ión NO_3^- tiene un peso molecular de 444.93 g/mol[78], un valor de pKa de 8.25 y un Coeficiente de partición de 0.3580[79], y ha sido caracterizada por varios métodos analíticos y se ha resuelto su estructura por la técnica de difracción de rayos X[73]

Ambas casiopeínas han sido evaluadas en diferentes líneas tumorales por diferentes operadores, algunos de los valores de Cl_{50} determinados para ambas Casiopeínas en las líneas tumorales utilizadas en este trabajo se muestran en la tabla 1, se puede observar que hay diferencias entre las diferentes determinaciones, ya que el operador es un factor importante, por lo que se decidió determinar el valor de Cl_{50} para todas las líneas utilizadas.

Línea tumoral	Casiopeína Ilgly [μM]	Cl_{50}	Casiopeína III-ia Cl_{50} [μM]	
HeLa	5.5	1.0	41.3	18.7
SkLu-1	4.9		31.4	
HCT-15	2.5	3.7	40.5	54.5

Tabla 1. Valores de Cl_{50} para las Casiopeína Ilgly y Casiopeína III-ia[63, 75, 76, 80]

3.3. Avances en Casiopeína IIgly[®] y Casiopeína III-ia[®]

Se han realizado hasta el momento varios estudios para tratar de elucidar el mecanismo de acción de las Casiopeínas, encontrándose algunas evidencias interesantes.

Ambas Casiopeínas han sido evaluadas en varias líneas celulares tumorales, mostrando una buena actividad citotóxica y antitumoral dosis-dependiente[71, 72, 81]; por otra parte, al adicionar Casiopeína III-ia en células tumorales de la línea HCT-15, se encontró evidencia de inducción de apoptosis con aumento de expresión del gen Bax, y la observación de fragmentos de ADN nuclear lo que indica un mecanismo dependiente de caspasas, en especial de la caspasa 3, además se observó que la duración de las fases del ciclo celular no son afectadas[81], también se encontró evidencia de que ésta misma Casiopeína y la Casiopeína IIgly inhiben la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa, y promueven la liberación del citocromo C de la membrana mitocondrial[82], lo cual compromete los procesos dependientes de Energía como la proliferación celular. En cuanto a los estudios con modelos *in vivo*, la Casiopeína III-ia ha sido evaluada en el modelo de ratón desnudo (nu/nu), y también modelos de xenotransplatación, mostrando actividad citotóxica, citostática y propiedades antitumorales por inhibición de la proliferación celular[81].

En cuanto a la Casiopeína IIgly, además de interferir con la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa en la mitocondria[82], promueve la fragmentación del ADN[83], la apoptosis y necrosis dosis dependiente[84]; también se ha sugerido que la citotoxicidad causada por las Casiopeínas pueda deberse a la producción de especies reactivas de oxígeno debido a la presencia de un átomo de cobre (II) dentro de la estructura de las Casiopeínas, causando daño al material genético, o en otro compartimento celular como la mitocondria[85] pero sin producir lipoperoxidación de la membrana celular[68], ni daño oxidativo en el citosol[85]; se ha postulado que una de las especies reactivas de oxígeno producida sea el radical hidroxilo, ya que al adicionar DMSO (secuestrador de radical hidroxilo) en bajas concentraciones, el efecto citotóxico de las Casiopeínas disminuye[85].

Al comparar los efectos tóxicos de las Casiopeínas con otros quimioterapéuticos como la adriamicina o cisplano, se observan menos efectos cardiotóxicos[86] , hematotóxicos[87], toxicidad cardiovascular y respiratoria[88].

Además se desarrollaron y validaron métodos cromatográficos para cuantificar ambas Casiopeínas en plasma de rata pudiendo determinar sus tiempos de vida media y realizar estudios de farmacocinética preclínica, encontrando que las Casiopeínas se unen a proteínas plasmáticas[89, 90].

Todos los resultados obtenidos muestran hasta el momento que las Casiopeínas tienen actividad antitumoral, por lo que se sigue investigando acerca de sus propiedades ya que se espera pronto pasen a las pruebas en fases clínicas.

CAPITULO 4

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

No existirá recuperación de las células tumorales tratadas con Casiopeína[®] Ilgly y Casiopeína[®] III-ia en el tiempo evaluado, y existirá una diferencia significativa en la cinéticas de inhibición y recuperación de la proliferación celular con respecto al cisplatino; por otra parte el efecto citotóxico de estos compuestos en linfocitos humanos será inapreciable comparado con el observado en células tumorales

4.2 Objetivos Generales

Evaluar el efecto antiproliferativo de las Casiopeínas[®] Ilgly y Casiopeína[®] III-ia en las líneas celulares tumorales HeLa, SKLU-1, HCT-15; al igual que en linfocitos humanos.

Determinar la cinética de inhibición y de recuperación que siguen las células tratadas con las Casiopeínas[®] III-ia y Ilgly

4.3 Objetivos particulares

Comparar el efecto citotóxico en células tumorales contra células normales producido por el mismo fármaco

Analizar la capacidad de recuperación de las células tumorales posterior a la exposición a diferentes tiempos.

CAPITULO 5

DESARROLLO EXPERIMENTAL

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. Líneas celulares

Almacenadas en la Unidad de Experimentación Animal:

- HeLa
- HCT-15
- SkLu-1

Aisladas de sangre de donadores sanos de sexo masculino:

- Linfocitos humanos

5.2 Materiales, equipos y reactivos

0.25% Tripsina-EDTA 1X

Suero Fetal Bovino

Medio de Cultivo RPMI

Agua destilada

Azul de Tripano

Campana de Flujo laminar clase II marca TELSTAR Mini –V/PCR

Centrifuga Equipar J-600

Incubadora de CO₂ Lab-Line

Ultracongelador Revco (70°C)

Microscópio óptico Olympus CH-2

Microscópio invertido Iroscope Mod SI-PH

Lector de placas marca Labsystems Multiskan MS

Balanza analítica marca OHAUS analytical plus modelo AP25000

Bomba de vacío marca Cole parmer Mod. L-79200-00

Quitasato Kimax

Matraz volumétrico de 10mL

Matraz volumétrico de 100mL

Tubos cónicos estériles de propileno de 15 mL

Tubos de microfuga de 1.5 mL

Criotubos de 1mL

Pipetas serológicas estériles de 10 mL

Pipetas serológicas estériles de 5 mL
Pipetor automático marca Costar
Pipetas Pasteur estériles
Pipeta automática de 2 a 10 μ L
Pipeta automática de 10 a 100 μ L
Pipeta automática de 100 a 1000 μ L
Puntas para pipetas automáticas de 100 y 1000 μ L.
Cajas de cultivo estériles de 25 mL
Placas de 96 pozos estériles
Tinas estériles
Filtros estériles de 0.2 μ m
Cisplatino (Cis-diamino-dicloro-platino II)
Casiopeína[®] Ilgly [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO₃
Casiopeína[®] III-ia [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)acetilacetonato)]NO₃, ambas sintetizadas y caracterizadas por la Q.F.B. María Elena Bravo Gómez

5.3 Soluciones

- Sulforrodamina B al 0.4%(p/v) en ácido acético al 1%
- Ácido acético al 1%
- Ácido Tricloroacético al 10%
- Buffer Tris base 10mM (pH 10.5) (Tris(hidroximetil)aminometano)

5.4 Descongelamiento de las líneas celulares[26, 90]

Las líneas celulares que se encontraban almacenadas en criotubos a -70°C (ultracongelador Revco) fueron descongeladas en un baño María a 37°C. Posteriormente bajo condiciones estériles, en la campana de flujo laminar se vertió el contenido de cada criotubo en un tubo estéril de propileno de forma cónica con capacidad para 15mL preparado previamente con 10 mL de medio de cultivo DMEM y se centrifugaron por cinco minutos a 1500 rpm. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 1mL de

medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, aminoácidos esenciales, antibióticos y antifúngicos al 1%.

5.4.1 Cuantificación de células[90]

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se colocaron 80µL de azul tripano, y se adicionaron 20µL de la suspensión celular se mezcló perfectamente y se transfirió una alícuota de 20µL a una de las secciones de la Cámara de Neubauer, después se colocó la cámara sobre la platina del Microscopio óptico (Olympus) y se observaron las células con el objetivo de 10x. Se contaron las células que había en cada uno de los cuatro cuadrantes grandes de la cámara de Neubauer y se calculó el promedio por cuadrante, la cantidad de células por mililitro de suspensión celular se calculó empleando la siguiente relación:

$$\text{Cantidad de células} = X * 5 * 10,000 = \text{células/mL} \dots \dots \dots \text{Ecuación 1}$$

Donde, X es el promedio de células en los cuatro cuadrantes, 5 es el factor de dilución y 10,000 es el volumen de la cámara en µL.

5.4.2 Proliferación de líneas celulares tumorales[90]

Bajo condiciones estériles se adicionaron 15 mL de medio de cultivo RPMI suplementado en una caja de cultivo estéril de 25 mL; posteriormente se adicionó una alícuota de la suspensión de células que contenía 500 000 células. La caja se incubó a 37°C, y una atmósfera de 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 48 horas hasta que el cultivo celular alcanzó el 80% de confluencia, momento en que el cultivo expresa sus aspectos más característicos y es en este momento cuando el parecido morfológico y fisiológico es mayor al modelo celular de origen. En éste momento se debe detener el crecimiento y se hace necesario dividir, replaquear o propagar las células[90] por medio de la tripsinización de los cultivos celulares de cada caja de cultivo.

5.4.3 Tripsinización de las líneas celulares tumorales[90]

Una vez que los cultivos celulares alcanzaron el 80% de confluencia, bajo condiciones estériles, se aspiró el medio de cultivo y se adicionaron 3mL de la solución de tripsina EDTA. Posteriormente se incubó la caja por 5 minutos en las condiciones antes descritas para que la tripsina destruyera la matriz extracelular. Transcurridos los 5 minutos se agitó suavemente la caja de cultivo para facilitar el desprendimiento de las células y se adicionaron 9 mL de mezcla nutritiva F-12 (HAM) con el objetivo de detener la actividad de la tripsina. La suspensión de células se transfirió a un tubo cónico estéril de 15 mL y se centrifugó por 5 minutos a 15000 r.p.m. Después se aspiró el sobrenadante y se adicionó 1 mL de medio RPMI suplementado para resuspender las células.

5.4.4 Resiembra de cultivo celular

Con el objetivo de asegurar que las células utilizadas se recuperaran del periodo de congelación y se encontraran en óptimas condiciones se resembró una alícuota de la suspensión celular que contenía 500 000 células en 15mL de medio RPMI suplementado en una caja de cultivo la cual se incubó a 37°C y 5% de CO₂ con recambios de medio de cultivo cada 48 horas. Una vez que el cultivo alcanzó el 80% de confluencia, se tripsinizó y se cuantificó la cantidad de células para posteriormente realizar el ensayo de inhibición de la proliferación celular o de determinación de las cinéticas.

5.5. Determinación de la CI₅₀ por medio del ensayo de inhibición de la proliferación celular[91, 92].

5.5.1 Siembra de células en placas de 96 pozos

A partir de la suspensión se preparó una dilución que contiene 200 000 células /mL en medio RPMI suplementado. De la cual se sembraron 100 µL/pozo en placas de 96 pozos (Corning Incorporated Costar®). Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% CO₂ con el objetivo de permitir la

recuperación de las células del proceso de la tripsinización y se adhieran al fondo de la placa.

5.5.2 Preparación de las soluciones de compuestos evaluados

Se preparó una solución stock de 300 μ g/mL en agua destilada de cada uno de los compuestos a evaluar (Casiopéina[®] III-ia, Casiopéina[®] IIgly y Cisplatino como control positivo) posteriormente ésta solución se filtró utilizando un filtro estéril de 0.2 μ m de diámetro de poro (Corning Incorporated Costar[®]) y bajo condiciones estériles se realizaron las diluciones pertinentes en agua destilada filtrada previamente como se ha descrito para obtener concentraciones de 100, 30, 10 y 3 μ g/mL (figura 14).

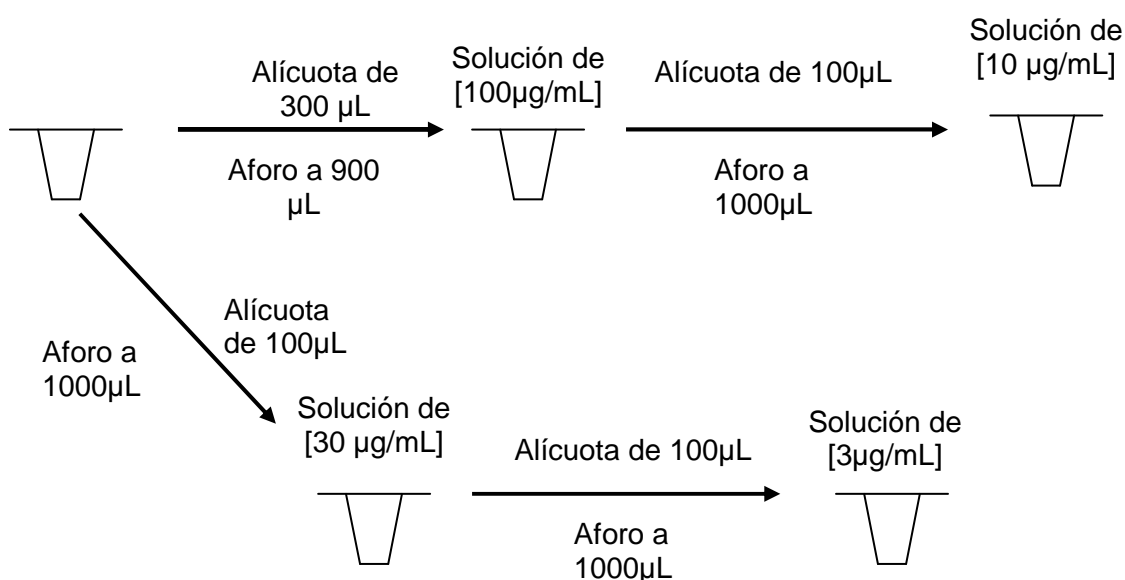


Figura 14: Esquema para hacer diluciones de los compuestos II-gly, III-ia y Cisplatino.

Es importante mencionar que no deben transcurrir más de 20 minutos entre la preparación de la solución Stock de Cisplatino y su adición en la placa ya que isomeriza con rapidez a la forma *trans* disminuyendo su actividad citotóxica[93, 94].

Después de la adición de los compuestos, la placa se incubó a 37 $^{\circ}$ C y una atmósfera de 5% de CO₂ por 24 horas al término de las cuales se aspiró el medio

5.5.3 Adición de compuesto

Transcurridas las 24 horas de incubación, se aspiró el medio de cultivo y se adicionaron 100µL de medio RPMI suplementado a los pozos que sirvieron como blancos y 90µL a los pozos de prueba. Posteriormente se agregaron por triplicado 10 µL/pozo de cada una de las soluciones de prueba de los tres compuestos a evaluar: Casiopeína® Ilgly, Casiopeína® III-ia y Cisplatino®, para obtener concentraciones finales en pozo de 10, 3, 1 y 0.3 µg/mL.

5.5.4 Fijación de células

Después de haber aspirado el medio de cultivo se adicionaron 100µL de Ácido Tricloroacético al 10% a 5°C, y se incubaron por 1 hora a la misma temperatura. Transcurrido este tiempo se aspiró el ácido tricloroacético, se lavó la placa con agua destilada cuidando de no desprender las células y se dejó secar por 24 hrs.

5.5.5 Tinción con sulforrodamina B[91]

Se adicionaron 50µL de una solución de sulforrodamina B al 0.4% (p/v) en ácido acético al 1%, dejando actuar por 30 minutos a temperatura ambiente después de los cuales se decantó el exceso de colorante, se lavaron los pozos 4 veces con una solución de ácido acético al 1% y se dejaron secar por 24 hrs.

5.5.6 Lectura de absorbancia

Se adicionaron 100µL/pozo de una solución de Buffer Tris base 10mM (pH 10.5); se agitó suavemente hasta que se disolvió todo el colorante celular de forma homogénea, y después se leyó la densidad óptica de cada uno de los pozos (lector de placas Labsystems Multiskan MS) a 564nm.

Se calculó el porcentaje de sobrevivencia de cada uno de los pozos con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ sobrevivencia} = \frac{(\text{absorbancia.pozo.tratado})(100)}{\text{absorbancia.del.pozo.no.tratado}} \dots\dots\dots(2)$$

Usando los datos de tres experimentos independientes para cada línea celular se calculó la CI_{50} (concentración inhibitoria media) por medio de un análisis estadístico probit, usando el programa Statplus 2005[95]

5.6 Ensayo de cinética de inhibición y recuperación celular en líneas celulares tumorales

5.6.1 Siembra de células en placas de 96 pozos

Se emplearon 9 placas de 96 pozos estériles agrupadas en 3 series de placas cada una con 3 placas

En cada una de las placas se sembraron 100 μ L de la suspensión de células que contiene 200,000 células por mililitro en 12 pozos dispuestos en 4 columnas y 3 hileras. Cada una de las columnas fue etiquetada como: blanco, Cisplatino, Casiopeína[®] IIgly y Casiopeína[®] III-ia. Después de haber sembrado las células, se incubaron las placas por 24 horas a 37°C y 5%CO₂, para que se recuperaran las células de la tripsinización. Al término de las 24 horas, se aspiró el medio de cultivo, y se adicionaron 90 μ L de medio de cultivo nuevo.

5.6.2 Adición de compuestos en placas

Se adicionaron 10 μ L de una solución 10 veces más concentrada que la CI_{50} obtenida del compuesto correspondiente a cada uno de los pozos para obtener una concentración en pozo equivalente a la CI_{50} , y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ el tiempo correspondiente de acuerdo a la Tabla 2. Transcurrido el tiempo de incubación a las placas de la serie 1 se les aspiró el medio, se fijaron, se tiñeron y se leyó su absorbancia de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito. Para las placas de la serie 2 y 3 se aspiró el medio de cultivo con el que se habían incubado, y se les adicionó medio de cultivo sin compuesto para incubarlas a 37°C y 5%CO₂ a diferentes tiempos (postratamiento) de acuerdo a la Tabla 2.

Serie 1	Tiempo de incubación (h)/tiempo de recuperación(h)	Serie 2	Tiempo de incubación (h)/tiempo de recuperación postratamiento	Serie 3	Tiempo de incubación (h)/tiempo de recuperación postratamiento
Placa 1	4/0	Placa1	4/24	Placa 1	24/4
Placa 2	8/0	Placa 2	8/24	Placa 2	24/8
Placa 3	24/0	Placa 3	24/24	Placa 3	24/24

Tabla 2. Tiempos de incubación en presencia del compuesto de prueba a una dosis equivalente a la CI_{50} / tiempos de recuperación en medio de cultivo fresco para las 3 series de placas usadas en las cinéticas de inhibición y recuperación de la proliferación celular.

Después del tiempo de postratamiento, se aspiró el medio de cultivo a las placas de la serie 2 y 3 con una pipeta Pasteur, se fijaron, se tiñeron y se leyó su absorbancia de acuerdo al procedimiento antes descrito.

Se realizaron 3 experimentos independientes, con tres réplicas para cada una de las líneas celulares y cada uno de los compuestos.

5.7 Determinación de CI_{50} en linfocitos humanos aislados

5.7.1 Aislamiento de linfocitos humanos

Los linfocitos humanos se aislaron de sangre de sujetos sanos, no fumadores, de sexo masculino. La muestra de sangre se obtuvo por venopunción, posteriormente bajo condiciones estériles en un tubo cónico de 15mL se vertieron 5 mL de sangre y 5mL de solución de Hanks, se homogenizó la mezcla y se introdujo una pipeta pasteur hasta el fondo del tubo por medio de la cual se adicionaron cuidadosamente 5mL de Histopaque 1077 para formar un gradiente y observar las dos fases de diferentes densidades que se ven en la figura 15, después se centrifugó por 30 minutos a 2500 rpm[90]. Transcurridos los 30 minutos se observaron varias fases, (figura 15), la fase más densa es roja y contiene a los eritrocitos, la que se encuentra inmediatamente sobre ésta corresponde al Histopaque 1077, y la fase sobre el

Histopaque 1077 presenta un aspecto de anillo blanquecino y corresponde a los linfocitos, finalmente la última fase corresponde al plasma[96].

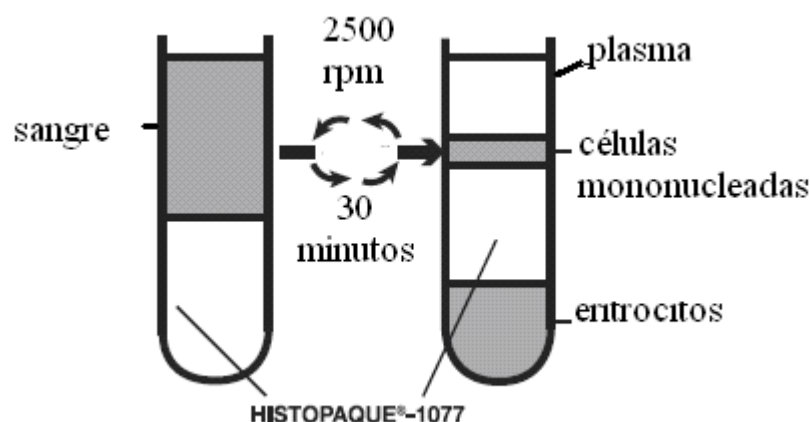


Figura 15. Aislamiento de linfocitos humanos con Histopaque 1077, tomado de catálogo de Sigma-Aldrich[96]

Para lavar los linfocitos aislados, en otro tubo cónico se vertieron 5mL de medio RPMI suplementado y se le adicionó el contenido del anillo blanquecino correspondiente a los linfocitos evitando romper el gradiente de densidad formado. Se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos, después de lo cual se aspiró el sobrenadante, y se resuspendió el botón celular en 2 mL de medio RPMI suplementado para el ensayo de linfocitos humanos no activados; y para el ensayo de linfocitos humanos activados, se le adicionó Fitohepatoglutinina al 0.5%[90, 97]. Se cuantificaron los linfocitos de ésta suspensión celular tal y como fue descrito para las células tumorales, y se adicionaron 90 μ L de una suspensión celular que contenía 222,222 células/mL a cada pozo de una placa de 96 pozos, y se dejaron incubar por 24 horas para llevar a cabo la activación de los linfocitos humanos.

5.7.2 Preparación y adición de soluciones de compuestos evaluados

Se preparó una solución stock de [3000 μ g/mL] de los tres compuestos a evaluar, (Casiopéina Igly[®], Casiopéina[®] III-ia y Cisplatino[®] como control positivo), posteriormente se hicieron diluciones para obtener soluciones con las

concentraciones de 1000, 800, 600, 400 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; de dichas soluciones se adicionaron 10 μL /pozo para obtener una concentración final en pozo de 100, 80, 60, 40 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se incubaron las placas por 24 horas

5.7.3 Fijación de Linfocitos humanos

El procedimiento es similar al descrito para las células tumorales, pero en éste caso se usaron 100 μL de una solución de Alcohol etílico al 70% y se dejaron reposar 30 minutos a temperatura ambiente.

5.7.4 Tinción con Sulforrodamina B

La metodología es igual a la empleada para la tinción de células tumorales (ver sección 5.5.5).

5.7.5 Lectura de absorbancia

La lectura de la absorbancia del colorante celular se realizó como se describió en el apartado de las líneas celulares tumorales, y posteriormente se calculó el porcentaje de sobrevivencia de cada uno de los pozos de la misma forma que se hizo con las líneas tumorales (sección 5.5.6).

CAPITULO 6

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media

A continuación se presentan los resultados de los ensayos de inhibición de la proliferación celular por medio de la tinción con Sulforrodamina B obtenidos en las líneas celulares tumorales HeLa, HCT-15, SKLu-1 y linfocitos humanos, expuestos a Casiopeína® Ilgly, Casiopeína® III-ia y Cisplatino® por 24 horas a 37°C y una atmósfera de 5 % de CO₂.

6.1.1 Línea Celular HeLa

En la tabla 3 se reportan los promedios de los porcentajes de sobrevivencia obtenidos en 3 experimentos independientes en la línea tumoral HeLa. Todos los compuestos fueron capaces de inhibir la proliferación celular en más del 50%.

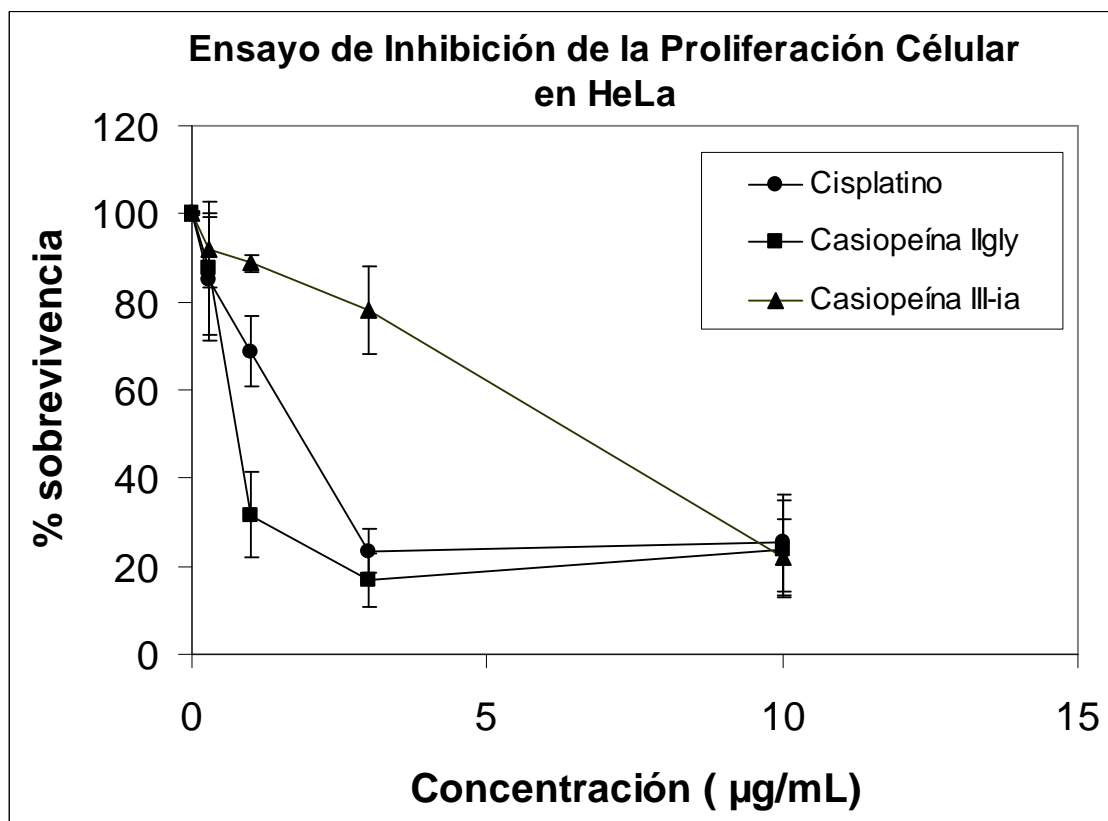
Promedios de porcentaje de sobrevivencia

Concentración evaluada (µg/mL)	% de Sobrevivencia Tratamiento con Cisplatino [®]	Desviación estándar	% de Sobrevivencia Tratamiento con Casiopeína [®] Ilgly	Desviación estándar	% de Sobrevivencia Tratamiento con Casiopeína [®] III-ia	Desviación estándar
0	100	0	100	0.3	100	0.3
0.3	85	14.0	87	14.9	91	8.5
1	68	7.9	31	9.6	88	1.9
3	23	4.8	16	6.0	78	9.9
10	25	11.0	23	11.1	22	8.6

Tabla 3. Promedios y desviaciones estándar de los valores de % de sobrevivencia obtenidos de 3 ensayos independientes de Inhibición de la proliferación celular en HeLa.

A continuación se graficaron los datos de la tabla 3 obteniéndose la gráfica 1, donde se observa que el comportamiento y la potencia de la Casiopeína Ilgly y el Cisplatino son bastante similares y que la pendiente de la

curva de la Casiopeína III-ia es la más suave y es el compuesto menos potente.



Gráfica 1. Ensayo de Inhibición de la proliferación celular en la línea tumoral HeLa, % de supervivencia vs concentración de compuesto evaluado[$\mu\text{g/mL}$]

6.1.1.1 Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) en la Línea Celular HeLa

Se obtuvieron los valores que se muestran en la tabla 4 como valores de CI_{50} . Donde se puede observar que los tres compuestos tienen valores de CI_{50} similares, debido a las desviaciones estándar obtenidas no hay diferencia estadística significativa

Valores de CI₅₀

Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀)	Cisplatino [®]	Casiopéina [®] II gly	Casiopéina [®] III-ia
[$\mu\text{g/mL}$] (Intervalo de confianza) _{95%}	1.27 (0.26-6.13)	0.78 (0.10-5.89)	5.39 (1.65-27.65)
[μM] (Desviación estándar)	4.26 (8.62)	1.82 (5.74)	12.1 (25.8)

Tabla 4. Valores de Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) para los tres compuestos evaluados en la línea celular HeLa.

6.1.2 Línea celular SkLu-1

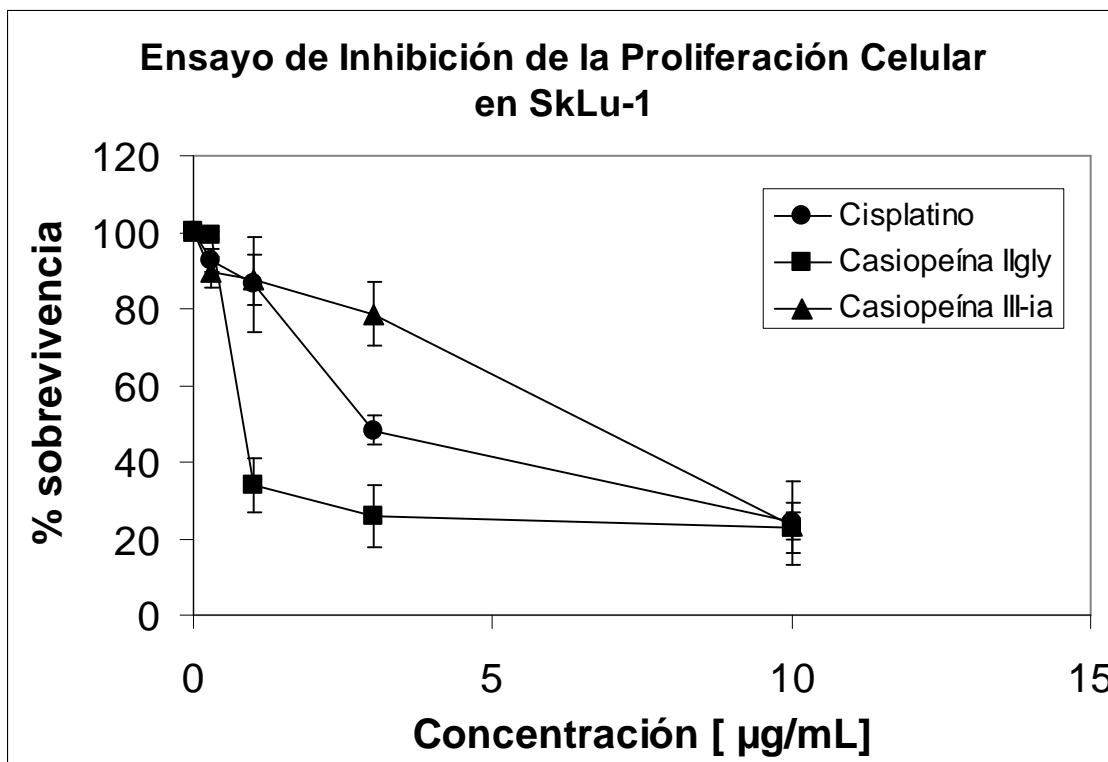
En la tabla 5 se presentan los promedios de los porcentajes de sobrevivencia obtenidos de 3 experimentos independientes en la línea celular tumoral SkLu-1.

Promedios de porcentaje de sobrevivencia

Concentración evaluada [$\mu\text{g/mL}$]	% de Sobrevivencia Tratamiento con Cisplatino [®]	Desviación estándar	% de Sobrevivencia Tratamiento con Casiopéina [®] II gly	Desviación estándar	% de Sobrevivencia Tratamiento con Casiopéina [®] III-ia	Desviación estándar
0	100	0.13	100	0.11	100	0.16
0.3	93	3.02	99	1.15	90	4.08
1	86	12.33	34	7.04	88	6.53
3	48	3.85	26	8.24	79	8.37
10	24	10.89	23	6.67	23	3.65

Tabla 5. Promedios de los porcentajes de sobrevivencia obtenidos al evaluar los tres compuestos en la línea celular tumoral SkLu-1

A continuación se elaboró la gráfica 2, con los porcentajes de sobrevivencia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular contra las concentraciones en [$\mu\text{g/mL}$] de cada uno de los compuestos evaluados en la línea celular SkLu-1, se observa que la Casiopéina II gly es el compuesto más potente, seguido del Cisplatino y finalmente por la Casiopéina III-ia, que es el compuesto que tiene la curva con la menor pendiente, también se observa que los tres compuestos evaluados inhiben la proliferación celular de forma dependiente de la concentración evaluada.



Gráfica 2 Ensayo de Inhibición de la proliferación celular en la línea tumoral SkLu-1, % de supervivencia vs concentración de compuesto evaluado [µg/ml]

6.1.2.1 Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) en la Línea Celular SkLu-1

Se determinó la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) obteniéndose los valores que se muestran en la tabla 6. Se puede observar que de acuerdo a los valores de CI₅₀ obtenidos y sus correspondientes valores de desviación estándar, el compuesto más activo es la Casiopeína IIgly, mientras que el Cisplatino y la Casiopeína III-ia mostraron una actividad similar.

Valores de CI_{50}

Concentración Inhibitoria Media (CI_{50})	Cisplatino ^U	Casiopéina ^U II gly	Casiopéina ^U III-ia
[$\mu\text{g/mL}$] (Intervalo de confianza) _{95%}	3.51 (1.32-5.24)	1.55 (0.20-3.76)	6.11 (4.19-8.24)
[μM] (Desviación estándar)	11.7 (5.78)	3.5 (3.53)	13.7 (4.00)

Tabla 6. Valores de Concentración Inhibitoria Media CI_{50} obtenidos para los tres compuestos evaluados en la Línea celular SkLu-1.

6.1.3 Línea celular HCT-15

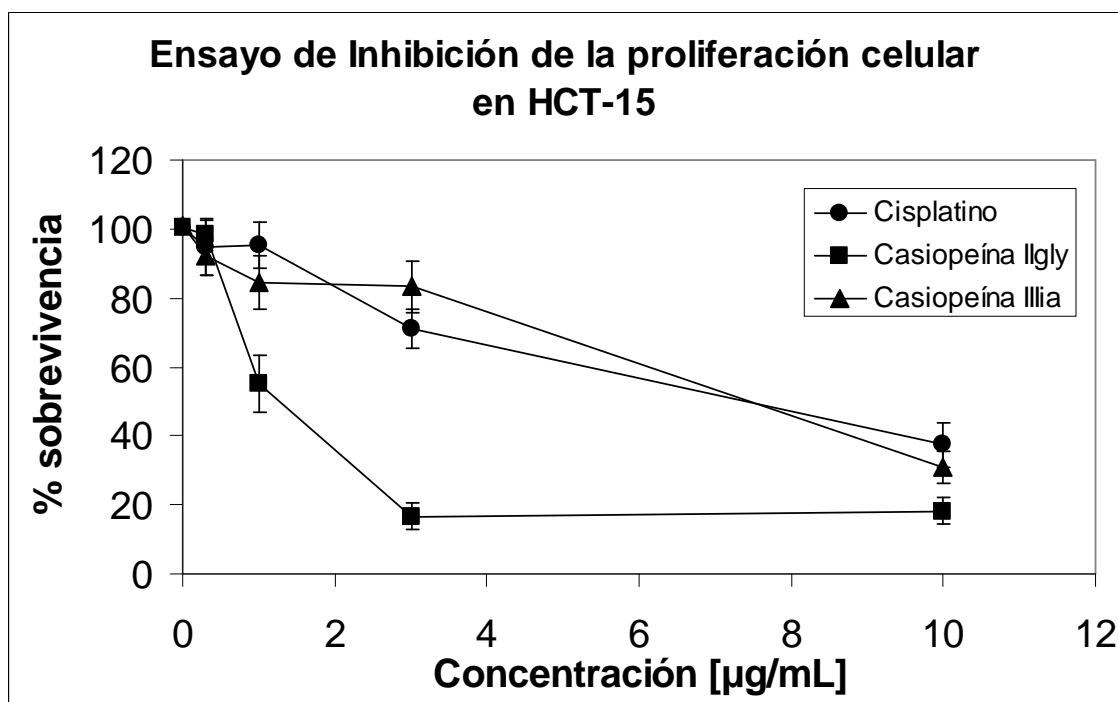
A continuación, se presenta en la tabla 7 los promedios de los porcentajes de sobrevivencia obtenidos de 3 experimentos independientes en la línea celular tumoral HCT-15.

Promedios de porcentaje de sobrevivencia

Concentración evaluada [$\mu\text{g/mL}$]	% de Sobrevivencia Tratamiento con Cisplatino ^U	Desviación estándar	% de Sobrevivencia Tratamiento con Casiopéina ^U II gly	Desviación estándar	% de Sobrevivencia Tratamiento con Casiopéina ^U III-ia	Desviación estándar
0	100	0.26	100	0.15	100	0.34
0.3	94	8.01	98	4.47	92	5.36
1	95	6.80	55	8.42	84	7.79
3	71	5.68	17	3.79	83	7.49
10	37	6.44	18	3.93	31	4.71

Tabla 7. Promedios de los porcentajes de sobrevivencia obtenidos al evaluar los tres compuestos en la línea tumoral HCT-15

Posteriormente se graficaron los porcentajes de sobrevivencia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular contra las concentraciones en [$\mu\text{g/mL}$] de cada uno de los compuestos evaluados en la línea celular SkLu-1, obteniéndose así la gráfica 3, en ésta gráfica es posible observar que en ésta línea celular la Casiopéina II gly es el compuesto de mayor potencia y que la Casiopéina III-ia y el Cisplatino tienen un comportamiento similar, además de una potencia semejante, pero menor con respecto a la Casiopéina II gly.



Gráfica 3 Ensayo de Inhibición de la proliferación celular en la línea celular tumoral HCT-15, % de supervivencia vs concentración de compuesto evaluado [µg/ml]

6.1.3.1 Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) en la Línea Celular HCT-15

Se determinó el valor de CI₅₀ y se obtuvieron los datos mostrados en la tabla 8, correspondientes a los tres compuestos evaluados en unidades [µM] y [µg/mL], y en éste caso se puede observar que la Casiopeína IIgly es más activa que la Casiopeína III-ia, y finalmente se encuentra el Cisplatino.

Valores de CI₅₀

Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀)	Cisplatino®	Casiopeína® IIgly	Casiopeína® III-ia
[µg/mL]	9.12	1.12	3.29
(Intervalo de confianza) $\alpha=0.95$	(5.23-12.93)	(1.02-1.23)	(2.73-3.95)
[µM]	30.4	2.52	7.39
(Desviación estándar)	(11.3)	(2.07)	(1.19)

Tabla 8. Valores de Concentración Inhibitoria Media CI₅₀ obtenidos para los tres compuestos evaluados en la Línea HCT-15.

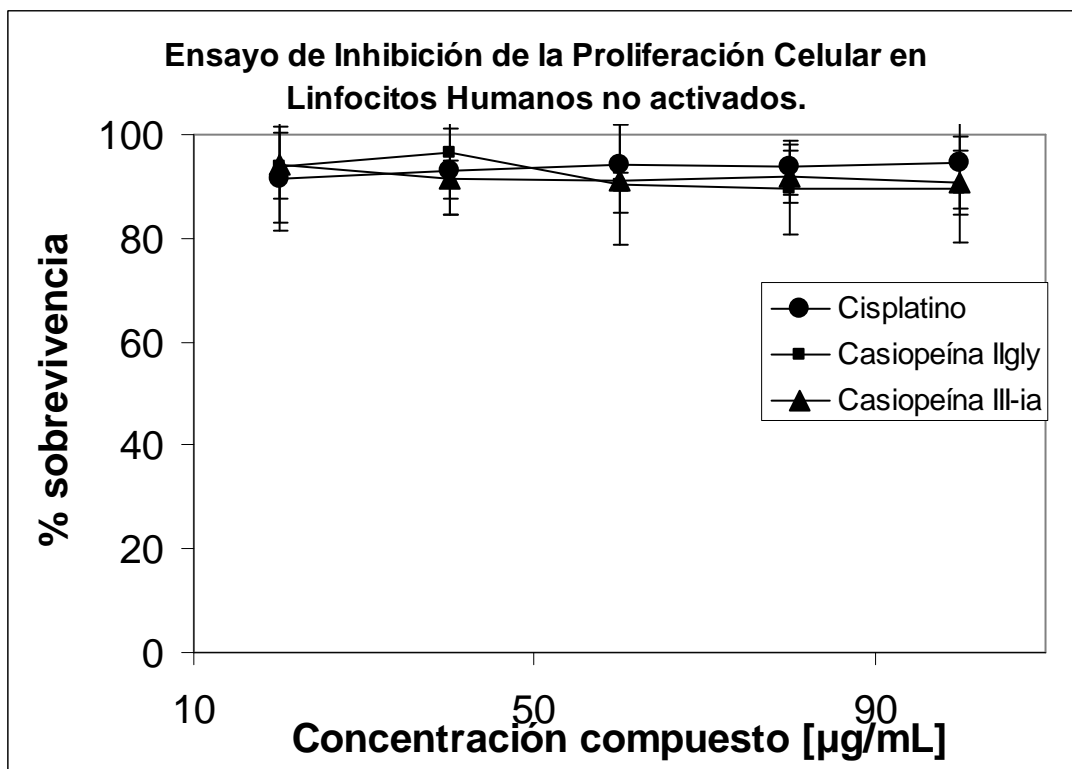
6.1.4. Ensayo en Linfocitos humanos no activados

En la tabla 9 se presentan los promedios de sobrevivencia obtenidos de tres experimentos independientes del ensayo de Inhibición de la Proliferación celular en linfocitos humanos no activados, y es posible observar que los compuestos no fueron capaces de inhibir la proliferación celular en más del 10%.

Concentración [µg/mL]	% de Sobrevivencia Tratamiento con Cisplatino®	Desviación estándar	% de Sobrevivencia Tratamiento con Casiopeína® Ilgly	Desviación estándar	% de Sobrevivencia Tratamiento con Casiopeína® III-ia	Desviación Estándar
20	91	10.08	94	11.06	94	6.38
40	93	8.32	97	11.98	91	3.62
60	94	9.53	90	11.61	91	1.82
80	94	5.22	89	8.70	92	5.07
100	94	8.88	89	10.19	91	6.24

Tabla 9. Promedios de los porcentajes de sobrevivencia obtenidos al evaluar los tres compuestos en linfocitos humanos no activados.

Se graficaron los promedios de sobrevivencia contra las concentración de compuesto, obteniendo la gráfica 4, y se puede observar que ninguno de los tres compuestos es capaz de inhibir la proliferación celular de Linfocitos Humanos no activados en más del 10% dentro del rango de concentraciones evaluadas, lo que indica que ninguno de los compuestos es capaz de inhibir la proliferación celular de células que se encuentran en G₀.



Gráfica 4 Ensayo de Inhibición de la proliferación celular en Linfocitos Humanos no activados, % de supervivencia vs concentración de compuesto evaluado [μg/ml]

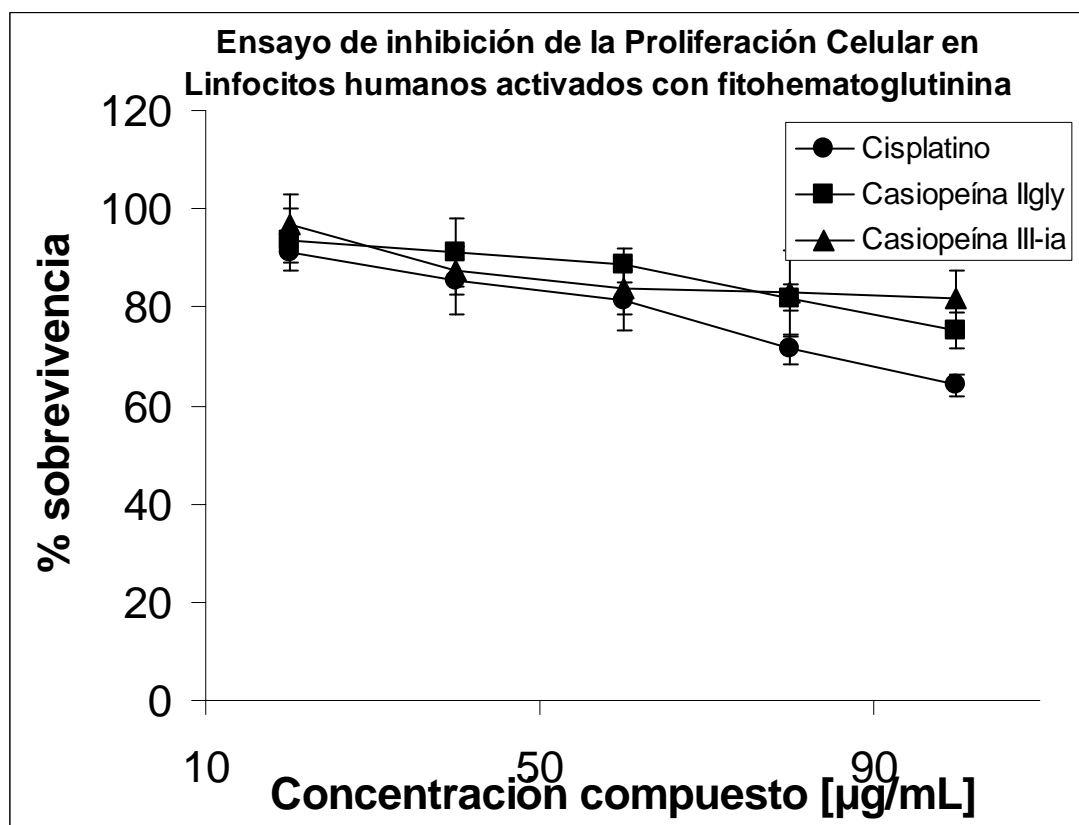
6.1.5. Ensayo en Linfocitos Humanos activados con Fitohematoglutina

Se realizaron tres experimentos independientes del Ensayo de Inhibición de la Proliferación celular en Linfocitos humanos activados con Fitohematoglutina, y los promedios de supervivencia de estos experimentos se presentan en la tabla 10. Es posible observar en estos datos que ninguno de los tres compuestos inhibió la proliferación celular más del 64%. en el rango de concentraciones evaluado, sin embargo el incremento de la concentración no fue posible debido a la solubilidad de los compuestos. Debido a esto no fue posible realizar los ensayos para determinar la cinética con linfocitos humanos, ya que era necesario contar con un valor de CI_{50} como en los ensayos de las líneas celulares tumorales.

Concentración [µg/mL]	% de supervivencia Tratamiento con Cisplatino [®]	Desviación estándar	% de Supervivencia Tratamiento con Casiopeína [®] Ilgly	Desviación Estándar	% de Supervivencia Tratamiento con Casiopeína [®] III-ia	Desviación estándar
100	64	2.12	75	3.51	82	5.81
80	71	3.01	82	2.72	83	8.71
60	81	5.96	88	3.53	84	5.53
40	85	6.97	91	7.09	87	4.82
20	91	2.10	94	6.38	97	6.03

Tabla 10. Promedios de los porcentajes de supervivencia obtenidos al evaluar los tres compuestos en linfocitos humanos activados con Fitohematoglutina.

A continuación se graficaron los promedios de porcentajes de supervivencia contra la concentración de compuesto, obteniéndose la gráfica 5.



Gráfica 5. Ensayo de Inhibición de la proliferación celular en Linfocitos Humanos activados con fitohematoglutina, % de supervivencia vs concentración de compuesto evaluado [µg/ml]

En la gráfica 5 es posible observar que la proliferación de los linfocitos humanos activados se tampoco se ve inhibida por los tres compuestos.

Vale la pena destacar que la concentración máxima evaluada en linfocitos humanos activados y no activados fue 10 veces mayor que la concentración máxima evaluada en las líneas tumorales y en todos los casos los compuestos evaluados fueron capaces de inhibir al menos el 56% de la proliferación celular. Este hecho nos indica que las Casiopeínas causan una mayor inhibición de la proliferación celular en las células tumorales que en linfocitos humanos.

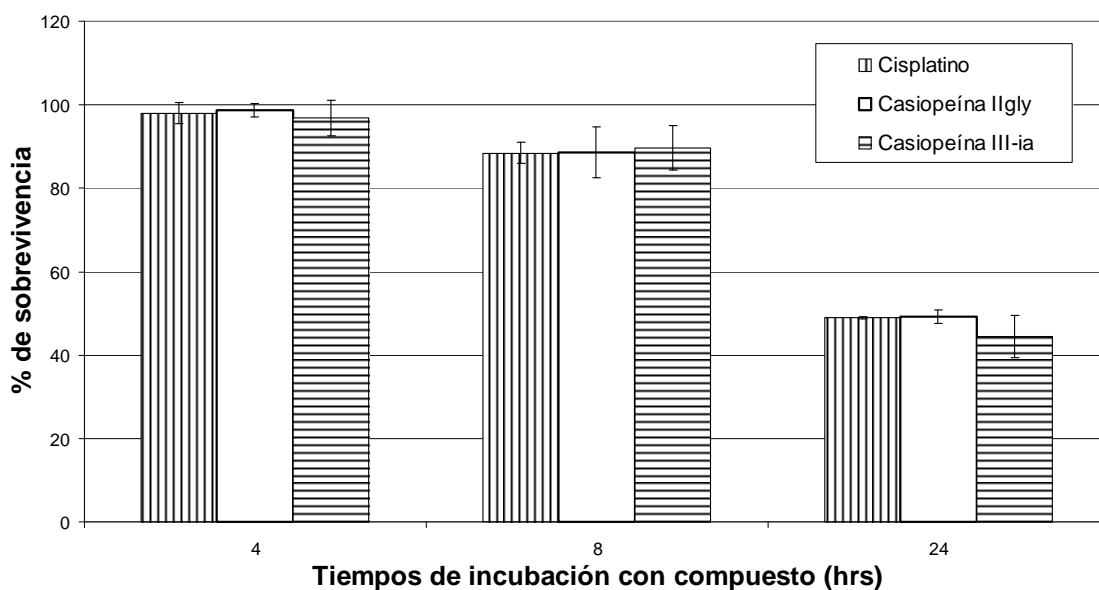
6.2 Ensayos de Cinéticas en líneas celulares tumorales

A continuación se presentan las gráficas que muestran los resultados obtenidos de las cinéticas de inhibición y recuperación de la proliferación celular, realizadas en las líneas celulares HeLa, SkLu-1 y HCT-15.

6.2.1 Serie 1. Cinética de inhibición de la proliferación celular

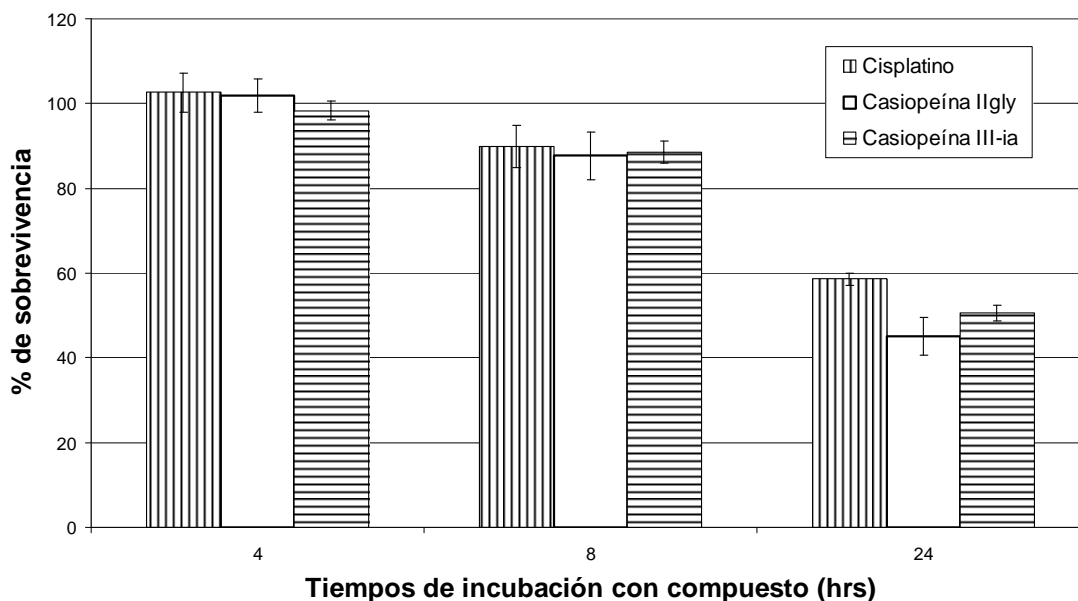
En las gráficas 6, 7 y 8, es posible observar que la inhibición de la proliferación celular es dependiente del tiempo de incubación y se observa que cuando el tiempo de incubación es mayor también lo es el porcentaje de inhibición de la proliferación celular. A las 24 horas de incubación la proliferación celular es inhibida 50% aproximadamente tal y como se esperaba debido a que se empleo la CI_{50} . Con éstos datos se realizaron las regresiones lineales de cada uno de los tratamientos para tratar de elucidar el orden de la cinética de inhibición que siguen los tres compuestos evaluados, encontrándose que con los datos obtenidos (apéndice 1), no fue posible determinar el orden de la cinética de inhibición para ninguno de los tres compuestos ya que los valores de coeficiente de correlación lineal (r) son muy similares en los tres modelos (Orden 0,1 y 2).

HeLa serie 1, cinética de inhibición de la proliferación celular

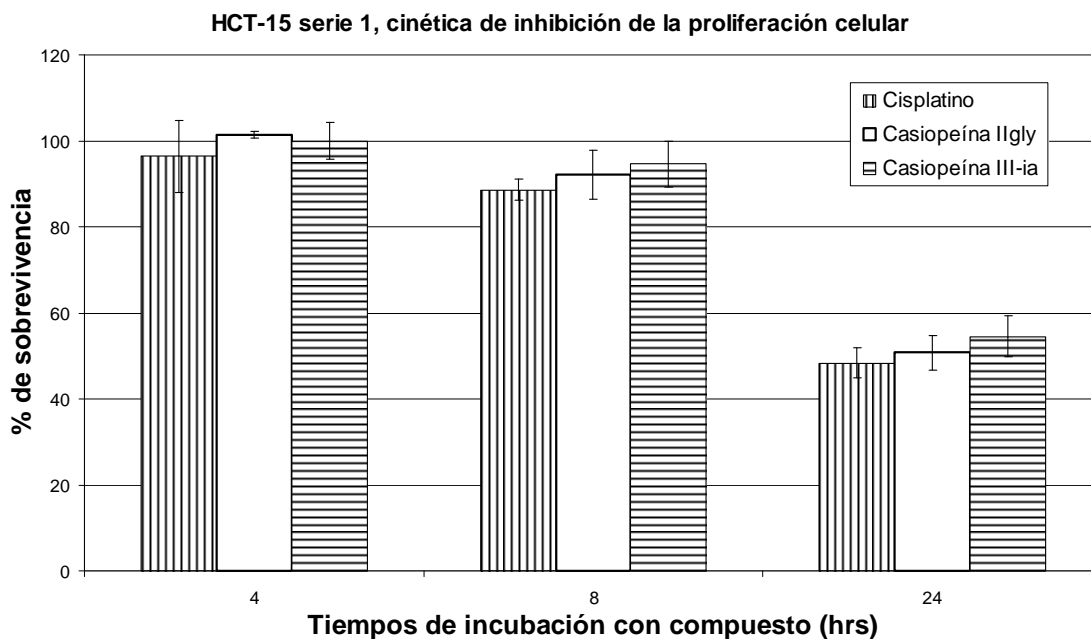


Gráfica 6. Porcentajes de supervivencia obtenidos en la serie 1, diferentes tiempos de incubación con tratamiento en la línea celular tumoral HeLa.

SkLu-1 Serie 1, cinética de inhibición de la proliferación celular



Gráfica 7. Porcentajes de supervivencia obtenidos en la serie 1; diferentes tiempo de incubación con tratamiento en la línea celular tumoral SkLu-1



Gráfica 8. Porcentajes de supervivencia obtenidos en la serie 1; diferentes tiempos de incubación con tratamiento en la línea celular tumoral HCT-15.

6.2.2 Serie 2. Evaluación de la recuperación de la proliferación celular

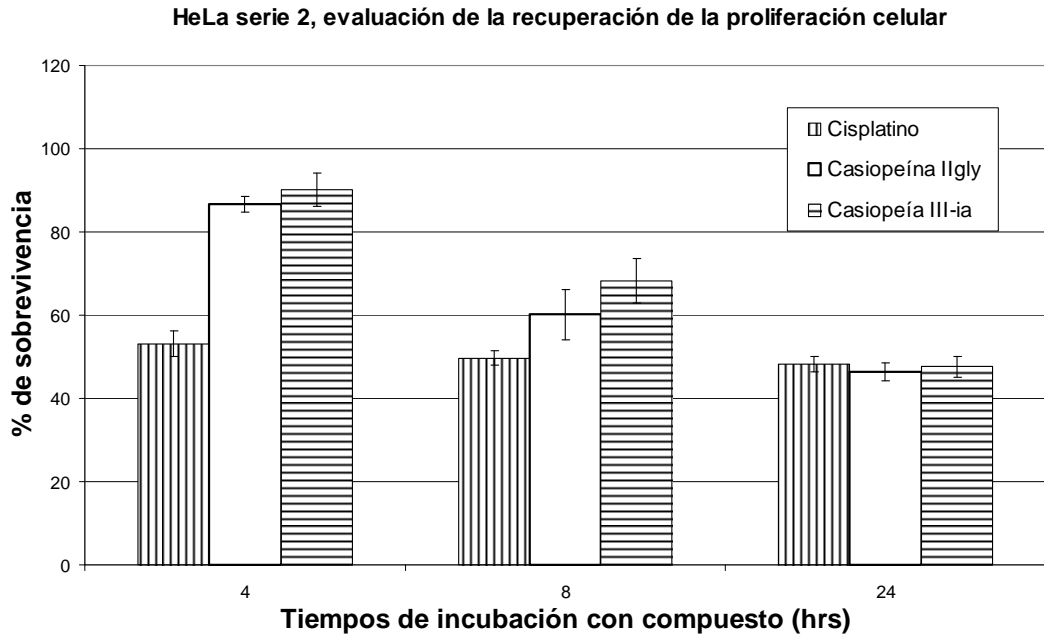
En las gráficas 9, 10 y 11 se muestran los porcentajes de supervivencia obtenidos en las series 2, el objetivo de dichas series fue observar si las células que fueron incubadas con los fármacos a diferentes tiempos eran capaces o no de recuperarse del daño causado al adicionarles medio de cultivo fresco por 24 horas continuas.

Es posible observar que el comportamiento de cada uno de los compuestos en las tres líneas es similar. En el caso del Cisplatino, se observa que la inhibición de la proliferación celular no cambia con respecto al tiempo, el daño producido por éste fármaco a las 4 horas es el mismo que el que se logra con 24 horas de exposición y la población celular no es capaz de recuperarse de éste daño y tampoco continua la disminución de la población. Al igual en la serie 1 se realizaron las regresiones lineales correspondientes para modelar la cinética de recuperación del cisplatino pero no fue posible asignar el orden de la cinética debido a que en los tiempos evaluados la inhibición de la proliferación permanece constante. En comparación, en el caso de las

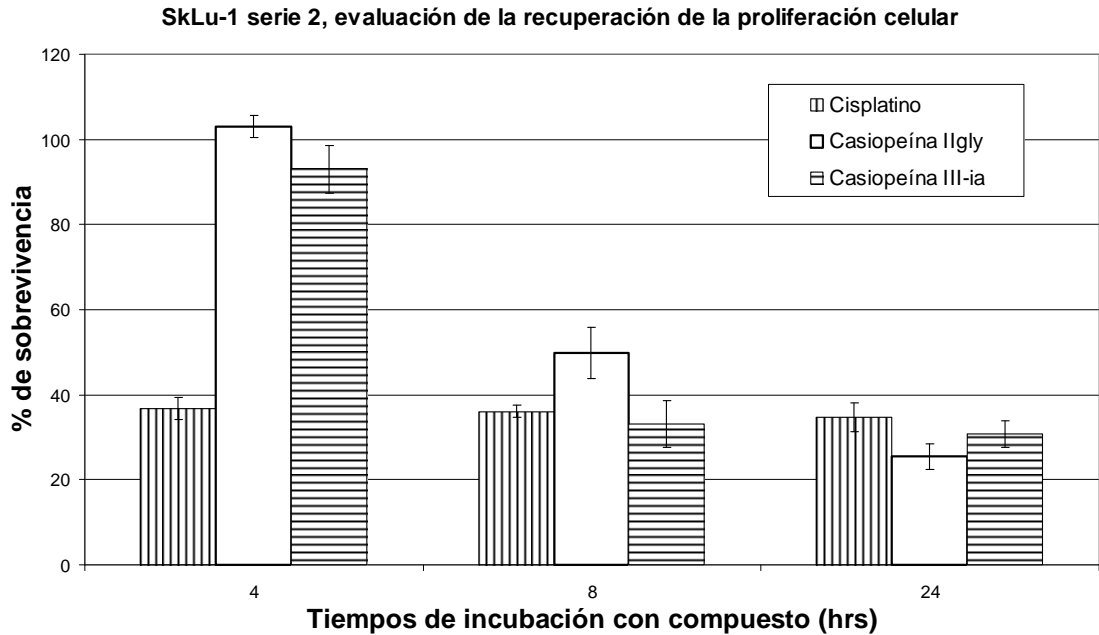
Casiopeínas, la inhibición de la proliferación celular si varía con respecto al tiempo, la población celular disminuye cuando el tiempo de incubación con compuesto aumenta aunque el tiempo de postratamiento haya sido el mismo; también se observa que comienza a disminuir la proliferación celular después de las 8 horas de incubación con compuesto. Al comparar las columnas correspondientes a las 24 horas en la serie 1 y la serie 2, se observa que en el caso de los cultivos de las series 2, el % de sobrevivencia es menor, aunque ambas series son expuestas a los mismos compuestos en las mismas concentraciones y las mismas 24 horas incubación, la única diferencia entre ambas series fueron las 24 horas de postratamiento que se les da a la serie 2, lo que indica que en esas 24 horas de postratamiento, los cultivos celulares continuaron disminuyendo, y no se recuperaron del daño causado por los compuestos en las 24 horas de incubación.

Con los datos obtenidos para cada uno de los compuestos evaluados se hicieron las regresiones lineales para tratar de asignar un orden a la cinética realizada para evaluar la recuperación de la inhibición de la proliferación celular (apéndice 2), debido a la similitud en los valores de coeficiente de correlación lineal (r), no fue posible una vez más determinar el orden de la cinética.

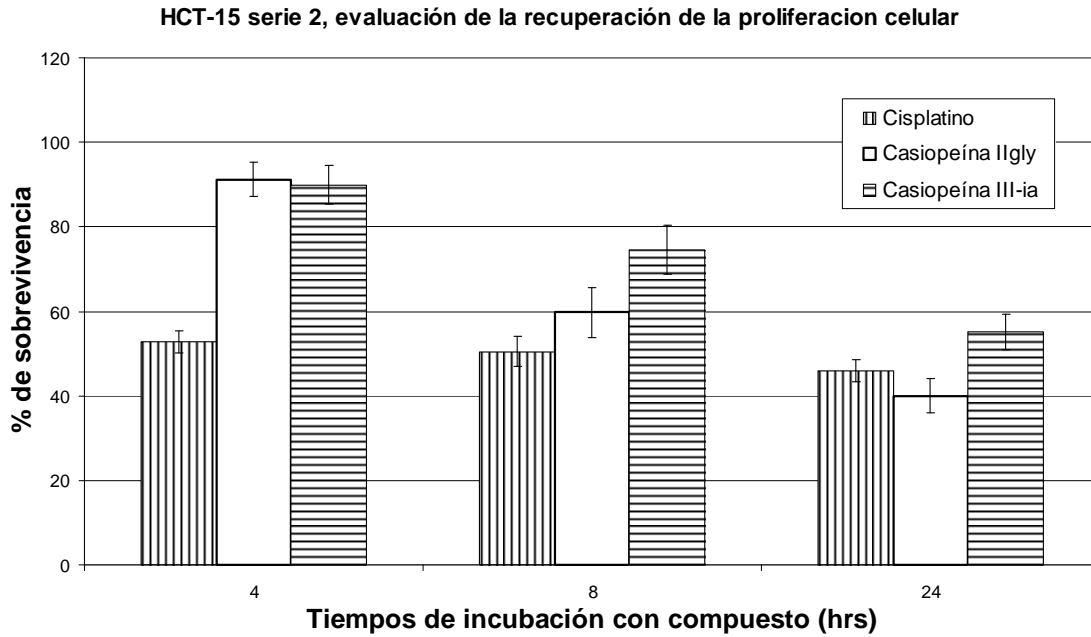
Las dos Casiopeínas muestran un comportamiento similar entre ellas en las tres líneas celulares, pero diferente con respecto al cisplatino, por lo que hace claro que tienen un mecanismo de acción diferente. Es sabido que el cisplatino forma aductos con el ADN y por otro lado, se ha propuesto que el mecanismo de acción de las Casiopeínas sea mediante la formación de Especies Reactivas de Oxígeno[68, 85], inducción de apoptosis debido al aumento de la proteína pro apoptótica Bax[81] o mediante la activación de caspasas[84], daño a la mitocondria, daño a la mitocondria desacoplando respiración mitocondrial, inhibiendo la síntesis de ATP y provocando la liberación del Citocromo C[82], o daño al ADN y ARN mediante su unión y degradación[83]. El encontrar diferencias en las cinéticas de inhibición de la proliferación celular, nos da motivos para pensar y apoyar que las Casiopeínas tengan un mecanismo de acción diferente al del Cisplatino.



Gráfica 9. Porcentajes de supervivencia obtenidos en la serie 2, diferentes tiempos de incubación con tratamiento y 24 horas continuas de postratamiento en la línea celular tumoral HeLa.



Gráfica 10. Porcentajes de supervivencia obtenidos en la serie 2, diferentes tiempos de incubación con tratamiento y 24 horas continuas de postratamiento en la línea celular tumoral SkLu-1.

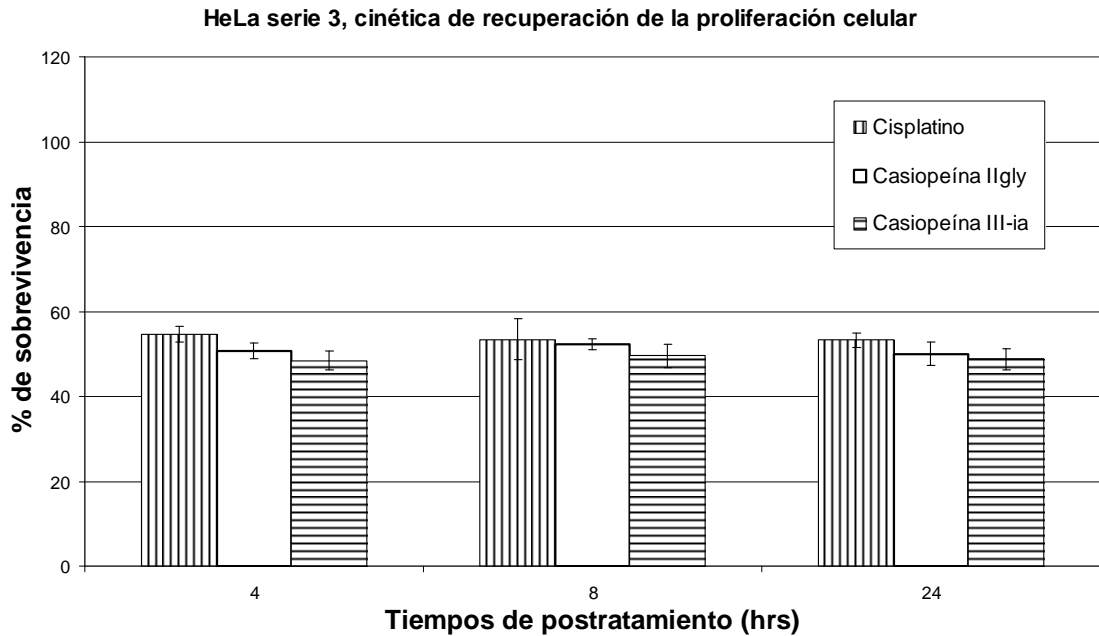


Gráfica 11. Porcentajes de sobrevivencia obtenidos en la serie 2, diferentes tiempos de incubación con tratamiento y 24 horas continuas de postratamiento en la línea celular tumoral HCT-15

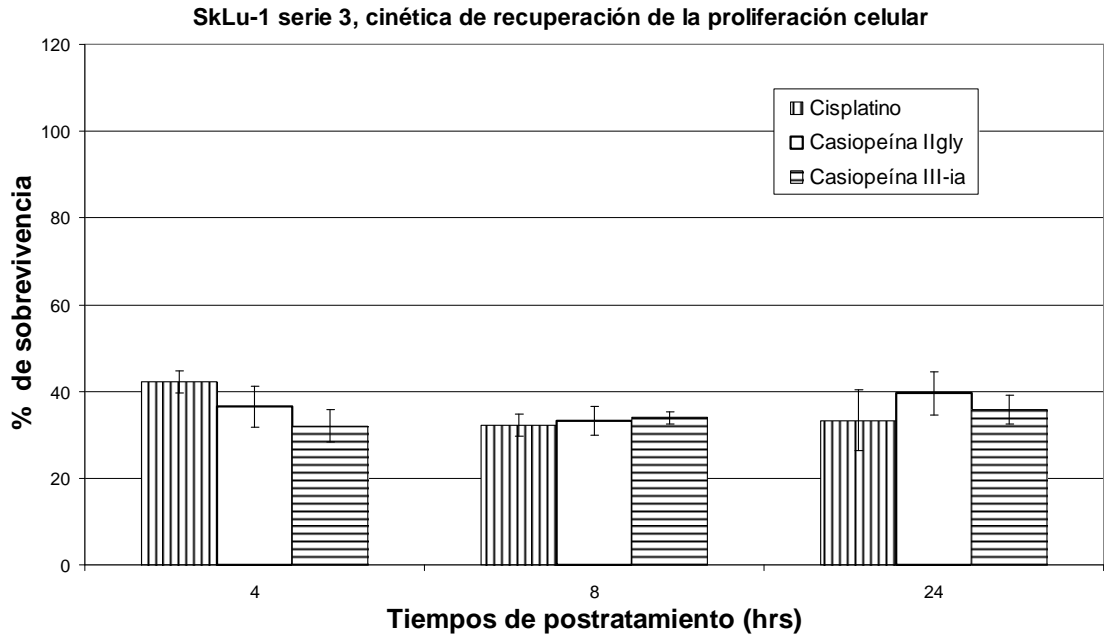
6.2.3 Serie 3. Cinética de recuperación de la proliferación celular

En las gráficas 12, 13 y 14 se muestran los porcentajes de sobrevivencia que se obtuvieron al evaluar la cinética de recuperación después de haber tratado los cultivos de células tumorales con los tres compuestos mediante la serie de placas 3. En todas las gráficas se observa que después de la incubación de los cultivos celulares con los diferentes fármacos por 24 horas continuas no hay recuperación de la población celular ya que, no hay un cambio en el porcentaje de sobrevivencia de las poblaciones; es decir que las poblaciones celulares no son capaces de reparar el daño y de proliferar nuevamente en el tiempo observado; sin embargo, tampoco se observa una disminución significativa en la población celular, lo que nos indica que las células sobrevivientes tampoco continúan muriendo; más bien parece que quedan en arresto, tendría que continuarse la cinética por un mayor tiempo para determinar que es lo que pasa con esas células que sobreviven al tratamiento después de un mayor tiempo de recuperación.

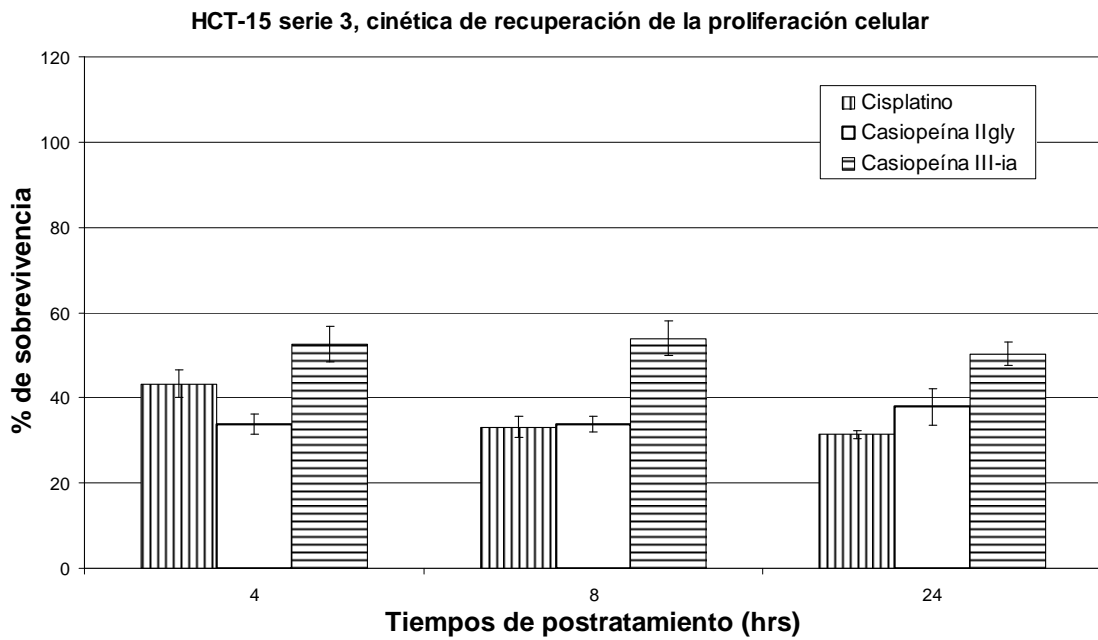
Se hicieron las regresiones lineales (apéndice 3), para tratar de determinar el orden de la cinética de recuperación, pero debido a que el porcentaje de sobrevivencia de las poblaciones celulares no varia en función del tiempo de postratamiento evaluado, no fue posible determinar el orden de la cinética de recuperación



Gráfica 12. Porcentajes de sobrevivencia obtenidos en la serie 3 después de 24 horas continuas de incubación con tratamiento y diferentes tiempos de postratamiento en la línea celular tumoral HeLa



Gráfica 13. Porcentajes de sobrevivencia obtenidos en la serie 3 después de 24 horas continuas de incubación con tratamiento y diferentes tiempos de postratamiento en la línea celular tumoral SkLu-1



Gráfica 14. Porcentajes de sobrevivencia obtenidos en la serie 3 después de 24 horas continuas de incubación con tratamiento y diferentes tiempos de postratamiento en la línea celular tumoral HCT-15

CAPITULO 7

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

7 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

7.1 Ensayo de inhibición de la proliferación celular en líneas tumorales

Mediante el Ensayo de Inhibición de la Proliferación celular se pudo evaluar el efecto antiproliferativo de la Casiopeínas[®] Ilgly, Casiopeína[®] III-ia y el Cisplatino[®] en líneas tumorales humanas, encontrándose el siguiente comportamiento: en el caso de la línea tumoral HeLa, la potencia de la Casiopeína Ilgly y el Cisplatino son bastante similares, y la Casiopeína III-ia es el compuesto menos potente; en la línea tumoral SkLu-1 la Casiopeína Ilgly fue el compuesto más potente, seguido del Cisplatino y finalmente por la Casiopeína III-ia; en la línea tumoral HCT-15 la Casiopeína Ilgly es el compuesto de mayor potencia, seguido por la Casiopeína III-ia y el Cisplatino que tuvieron un comportamiento y potencia similar.

En trabajos anteriores, se ha determinado un parámetro importante dentro de la clínica de los antineoplásico; el margen terapéutico en pequeñas especies[88], encontrándose que el valor de margen terapéutico para las Casiopeínas es muy amplio, comparado con el del Cisplatino; éste es un dato importante que se debe considerar, ya que el margen terapéutico nos indica que tan selectivo es un compuesto para producir el efecto deseado[98], y que tan estrecha es la diferencia entre obtener el efecto deseado y un efecto tóxico.

7.2 Ensayo de inhibición de la proliferación celular en linfocitos humanos activados y no activados con un mitógeno

En el ensayo realizado con Linfocitos humanos no activados con el mitógeno, los compuestos no inhibieron la proliferación más de 10%, y cuando los linfocitos fueron activados con el mitógeno, la inhibición de la proliferación celular fue un poco mayor, pero en ambos casos las concentraciones de los compuestos evaluados fueron 10 veces mayores a las CI_{50} determinadas en las líneas tumorales; éste es un dato relevante porque nos indica que éstos compuestos fueron más tóxicos para células tumorales que para los linfocitos humanos que fueron las células humanas sanas con las que se comparó la toxicidad; resultando relevante ya que entre los efectos secundarios de la

quimioterapia se encuentra la inmunosupresión, que muchas veces provoca que el paciente sea más susceptible a infecciones durante la quimioterapia.

No fue posible evaluar concentraciones aún mayores a las que se emplearon debido a la solubilidad de los compuestos, además de tratarse de concentraciones muchísimo mayores a los valores de CI_{50} determinadas para células tumorales.

La mayor parte de la población de linfocitos en un paciente sano se encuentra en la fase $G_{0[33]}$, y se sabe que el Cisplatino es un compuesto no-fase específico[99], por lo que es capaz de actuar en cualquier fase del ciclo celular, y hasta el momento se desconoce si las Casiopeínas son antineoplásicos fase específicos o no; sin embargo los tres compuestos mostraron un comportamiento similar en la Inhibición de la Proliferación de linfocitos humanos.

7.3 Ensayo de Cinética de Inhibición de la Proliferación celular

Mediante éste ensayo se evaluó la cinética de inhibición de la proliferación celular, y se concluyó que los tres compuestos inhiben la proliferación celular de forma dependiente del tiempo de incubación con compuesto administrado en su CI_{50} . Se concluyó que no hay diferencia entre en el comportamiento de los tres compuestos evaluados

7.4 Evaluación de la recuperación de la población de células tumorales

Con los resultados del ensayo para evaluar la recuperación de las poblaciones de células tumorales, es posible concluir que las poblaciones tumorales no fueron capaces de recuperarse del daño causado con los compuestos evaluados durante los tiempos estudiados.

Con éste ensayo se observó que el daño causado por el Cisplatino se puede observar a partir de las 4 horas de incubación, un grupo de investigadores ha reportado platinación del ADN a partir de una hora de incubación con Cisplatino[100], por lo que sería recomendable que en un futuro se evalúen tiempos más cortos de incubación con compuesto. En el caso de las Casiopeínas se concluye que el daño causado con estos compuestos se

puede observar a partir de las 8 horas de incubación y continúa después de haber sido retirado el compuesto del medio de cultivo. El comportamiento es similar en todas las líneas celulares y para los tres compuestos evaluados.

7.5 Ensayo de Cinética de recuperación de la proliferación celular

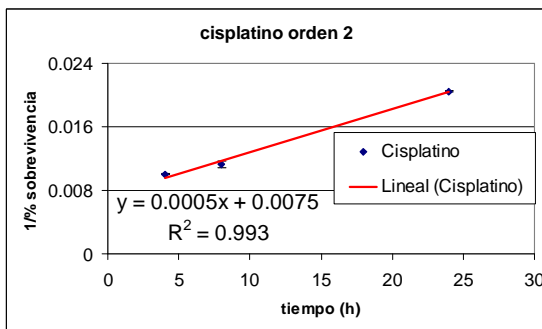
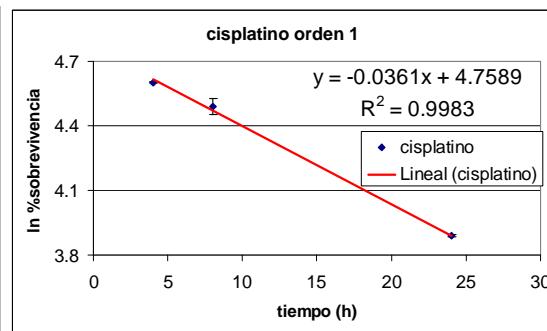
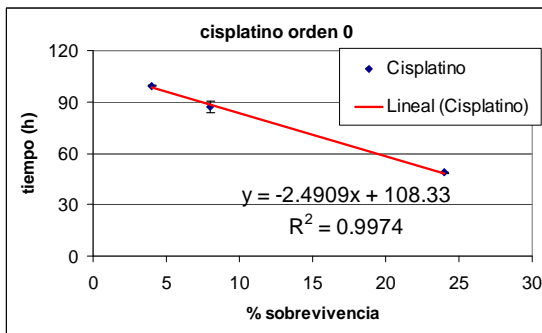
Con el ensayo de cinética de recuperación de la proliferación celular se determinó que la proliferación celular de las poblaciones de células tumorales que son tratadas por 24 horas continuas con los tres compuestos evaluados en su CI_{50} , no se modificó en función del tiempo de postratamiento que se evaluó. Sería recomendable evaluar tiempos mayores, para determinar después de cuanto tiempo es posible observar el aumento de la población celular.

APENDICE 1

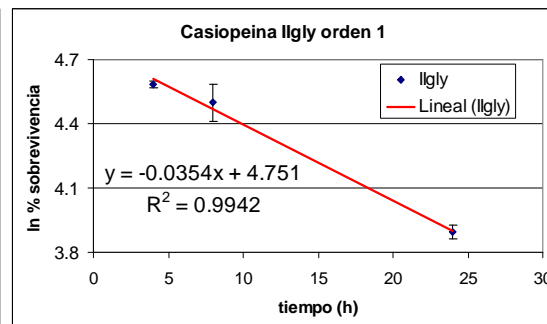
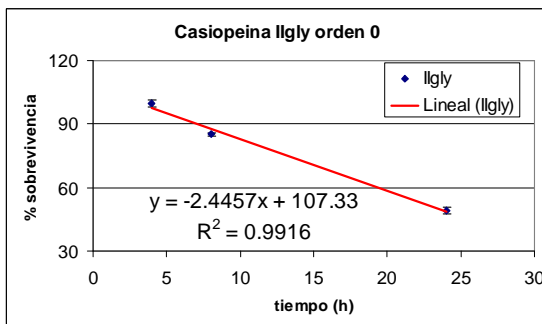
SERIES 1. CINÉTICA DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

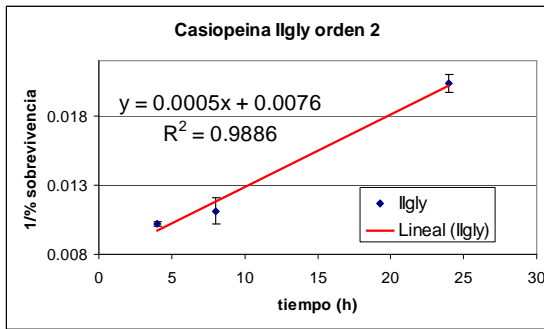
HELA SERIE 1. GRÁFICAS PARA DETERMINAR EL ORDEN DE LA CINÉTICA DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

CISPLATINO

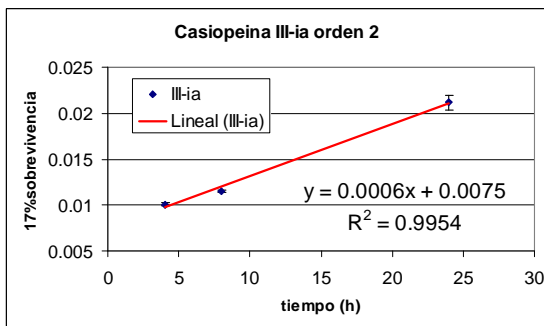
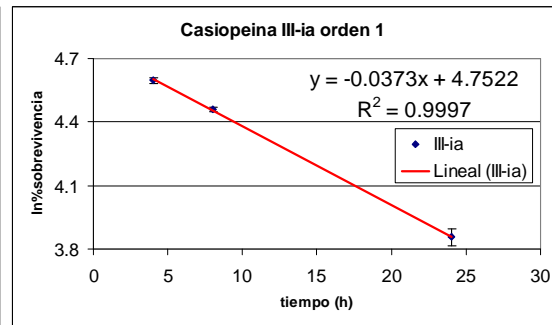
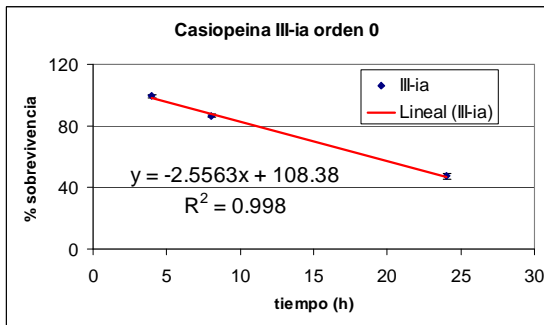


CASIOPEÍNA Ilgly



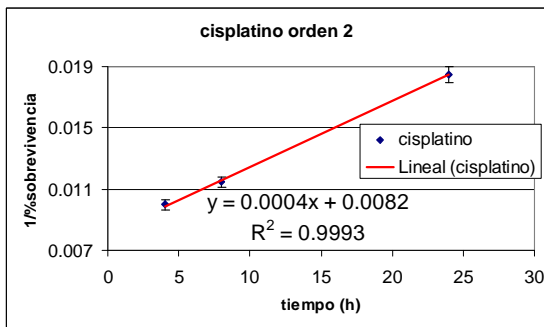
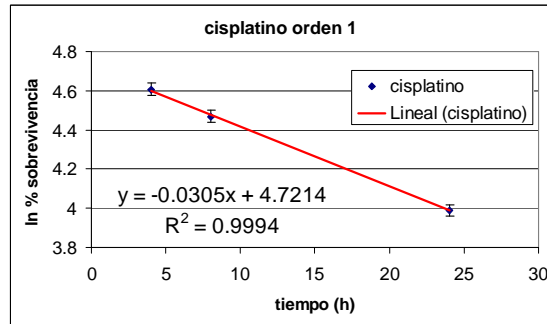
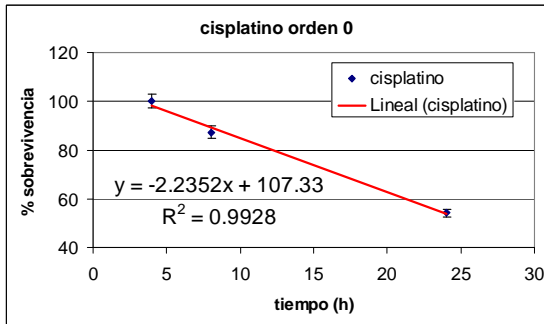


CASIOPEÍNA III-ia

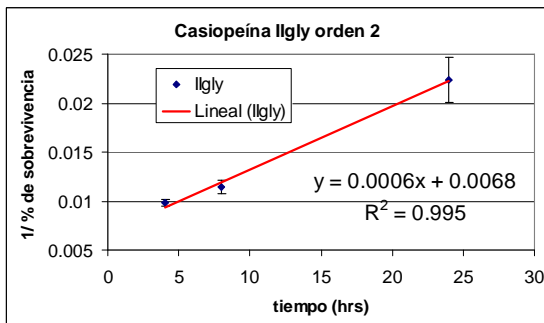
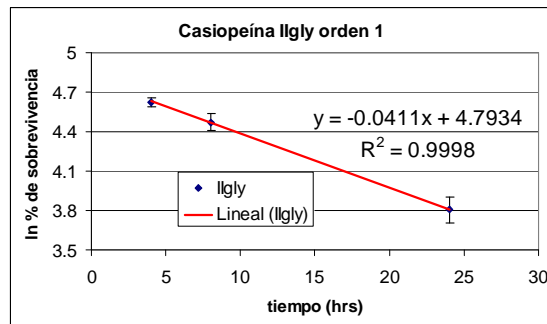
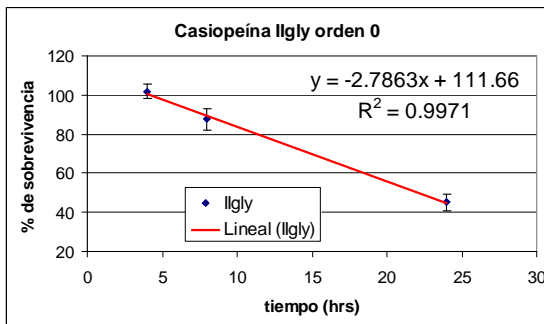


SkLu-1 SERIE 1. GRÁFICAS PARA DETERMINAR EL ORDEN DE LA CINÉTICA DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

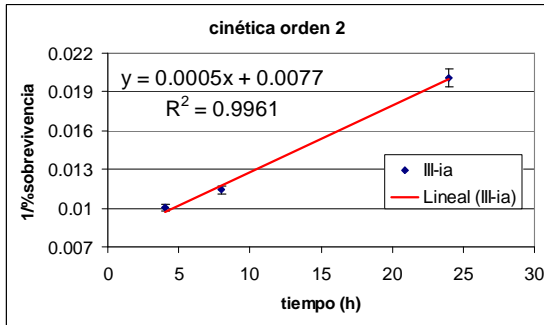
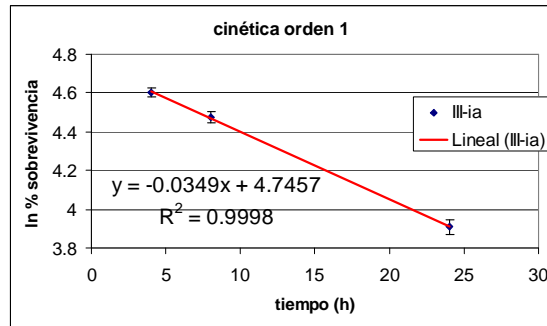
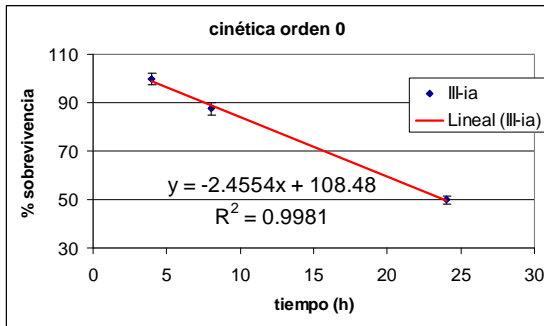
CISPLATINO



CASIOPEÍNA Igly

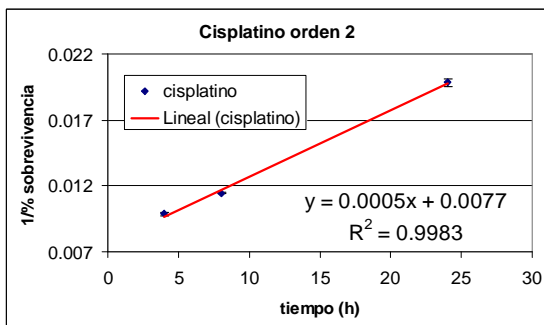
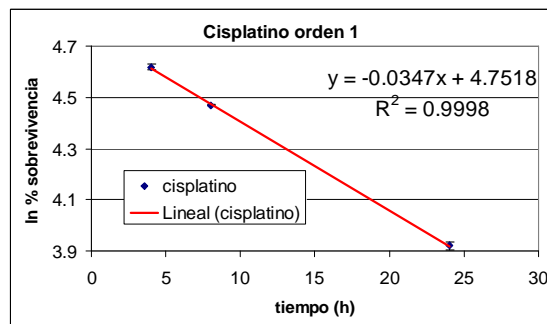
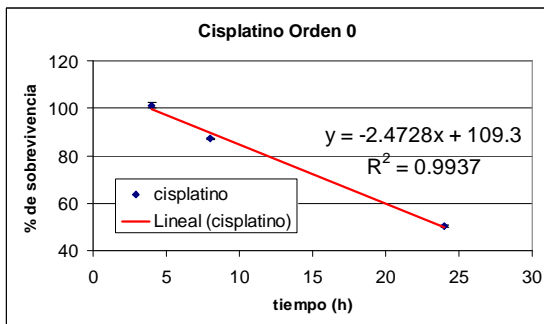


CASIOPEÍNA III-ia

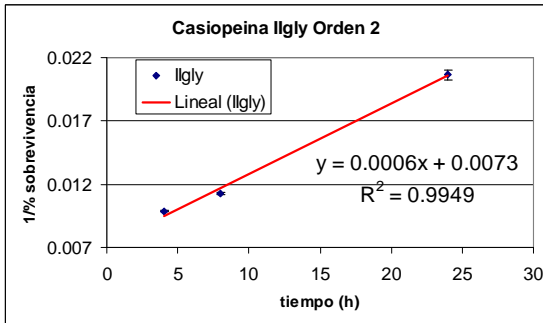
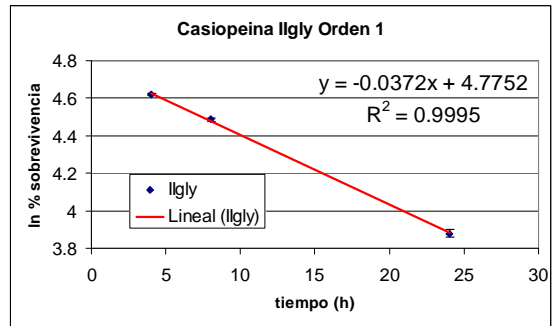
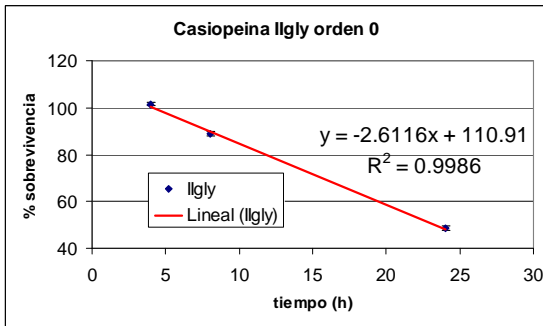


HCT-15 SERIE 1. GRÁFICAS PARA DETERMINAR EL ORDEN DE LA CINÉTICA DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

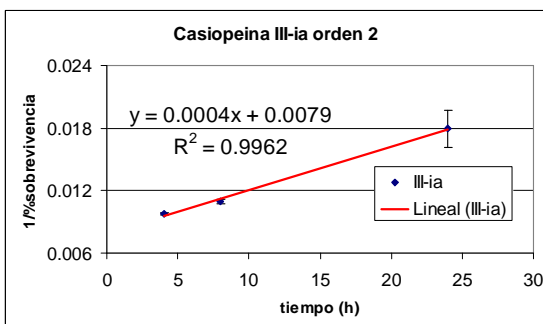
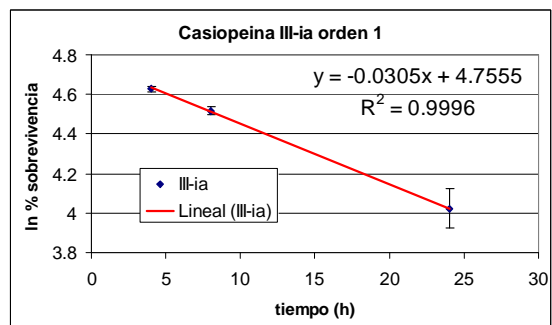
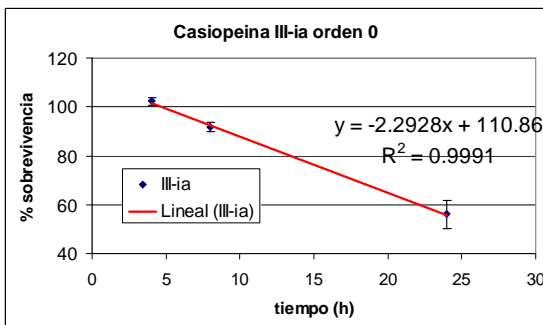
CISPLATINO



CASIOPEÍNA Igly



CASIOPEÍNA III-ia

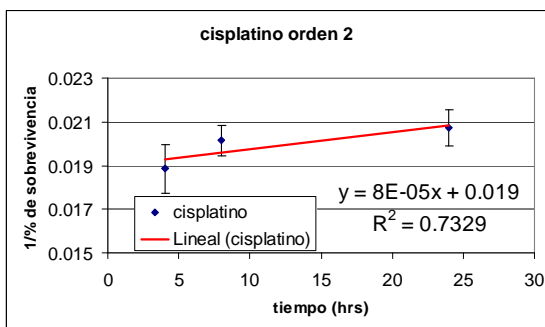
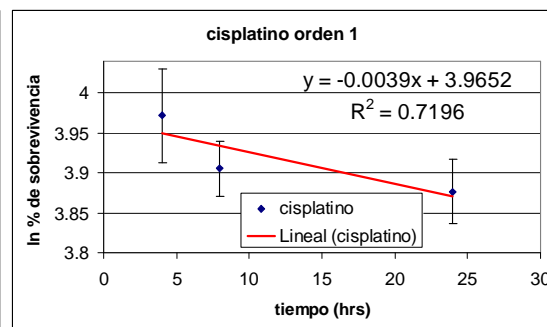
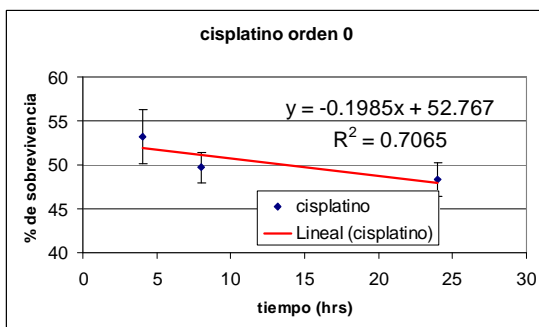


APÉNDICE 2

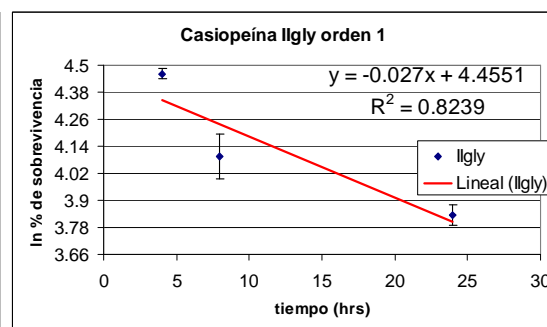
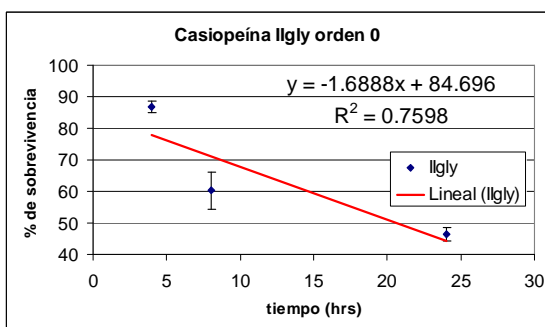
SERIES 2. EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

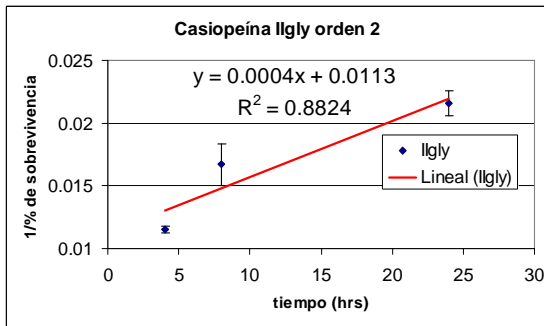
HELA SERIE 2. GRÁFICAS PARA DETERMINAR EL ORDEN DE LA EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

CISPLATINO

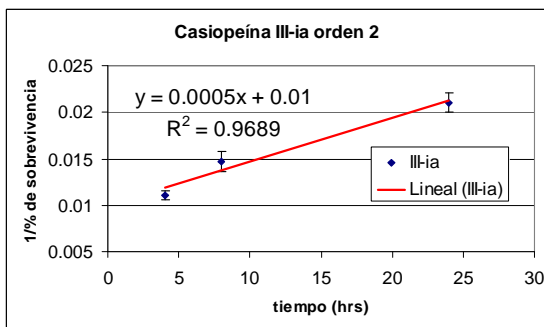
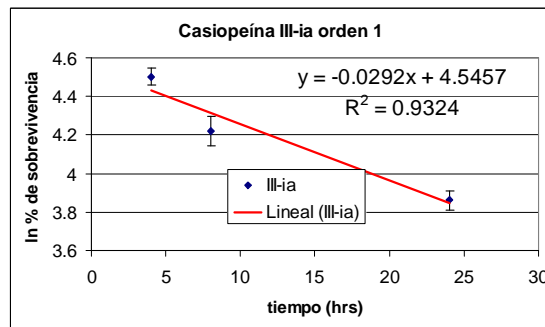
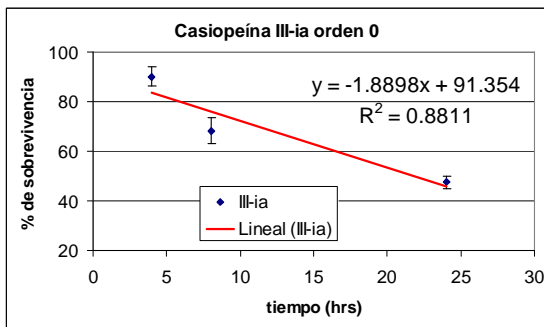


CASIOPEÍNA Ilgly



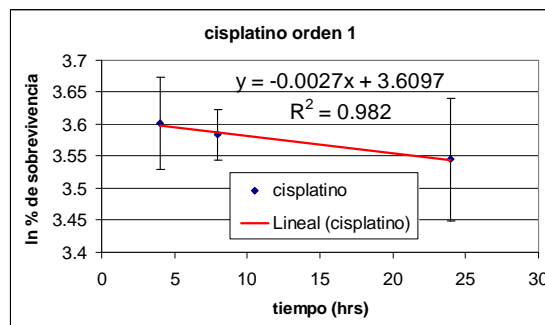
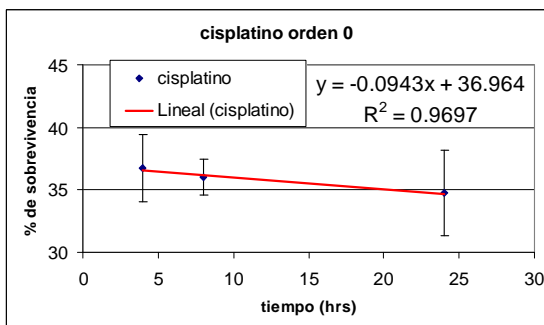


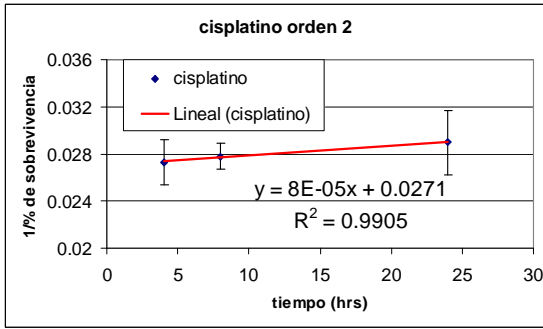
CASIOPEÍNA III-ia



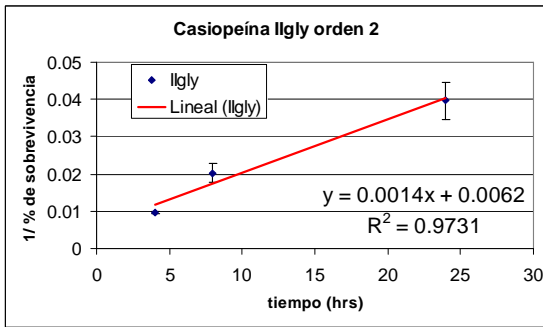
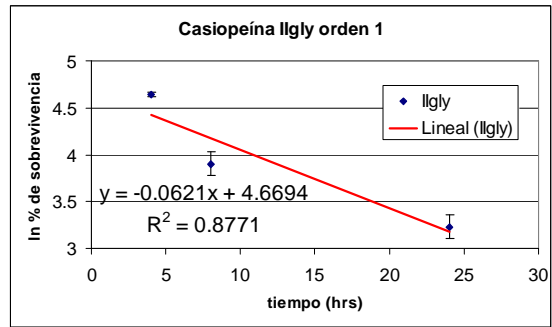
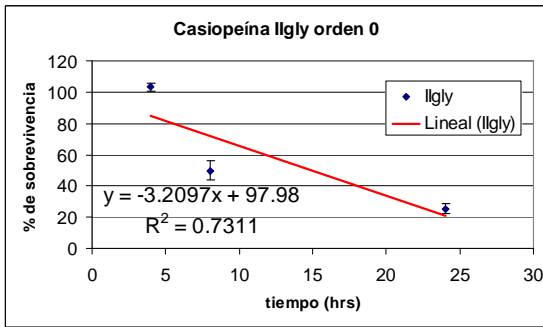
SKLu-1 SERIE 2. GRÁFICAS PARA DETERMINAR EL ORDEN DE LA EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

CISPLATINO

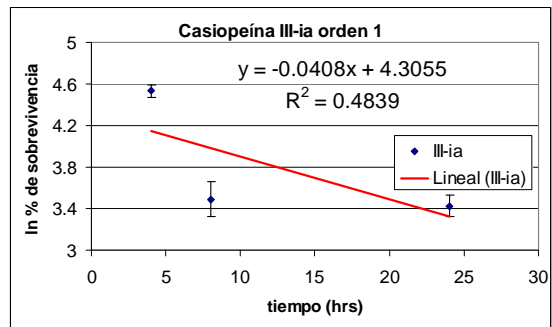
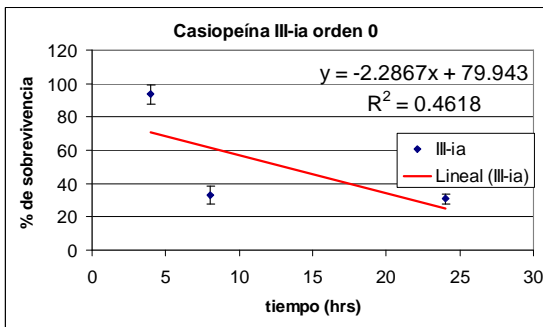


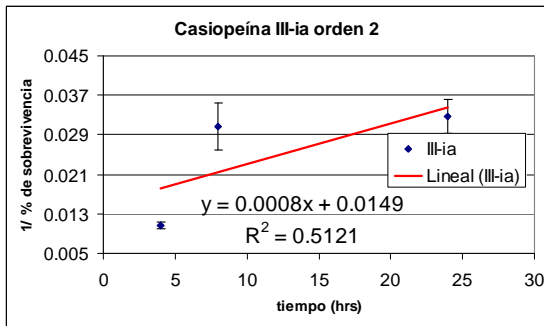


CASIOPEÍNA Igly



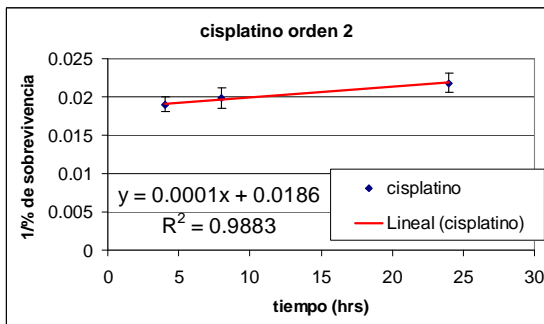
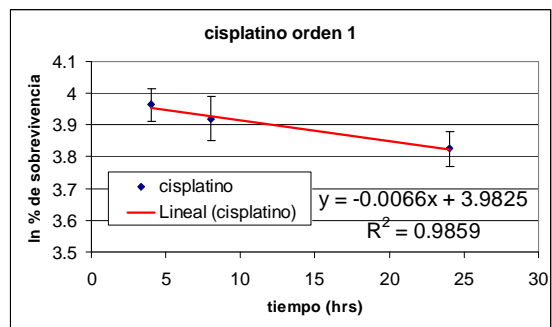
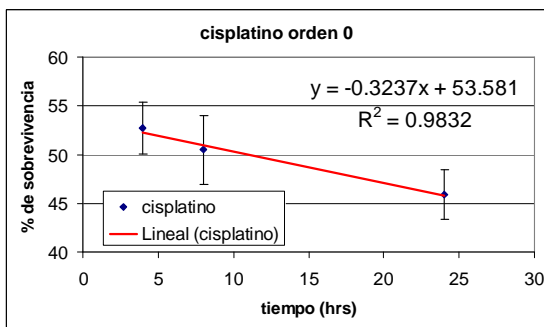
CASIOPEÍNA III-ia



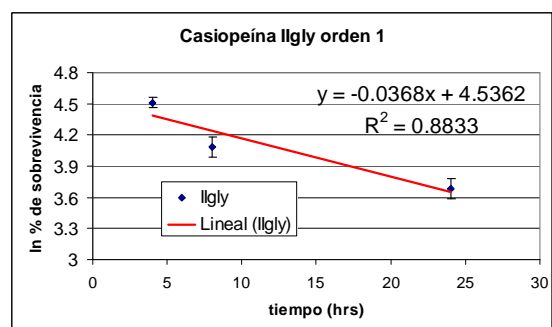
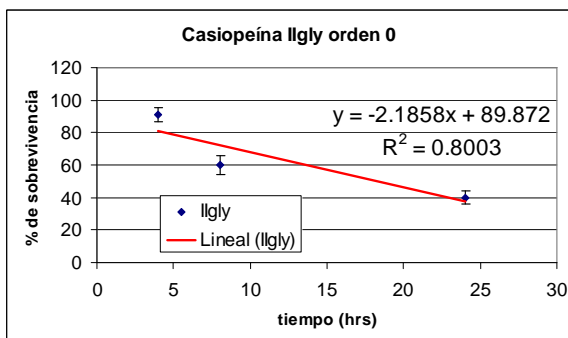


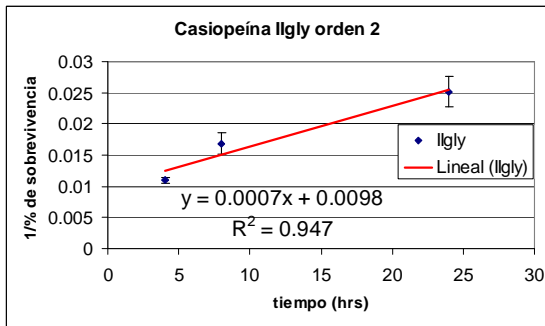
HCT-15 SERIE 2. GRÁFICAS PARA DETERMINAR EL ORDEN DE LA EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

CISPLATINO

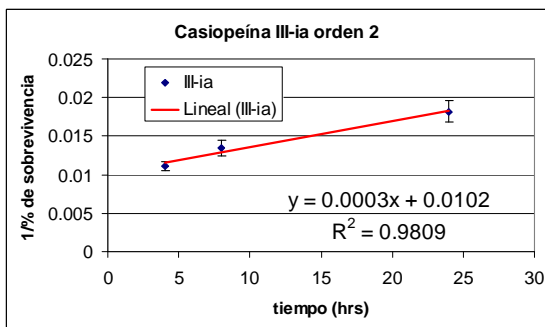
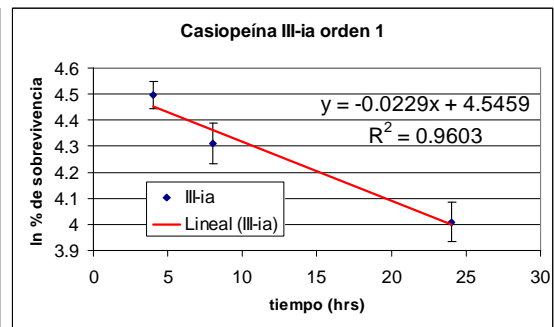
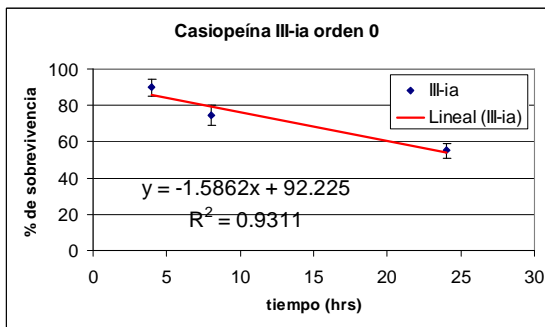


CASIOPEÍNA IIgly





CASIOPEÍNA III-ia

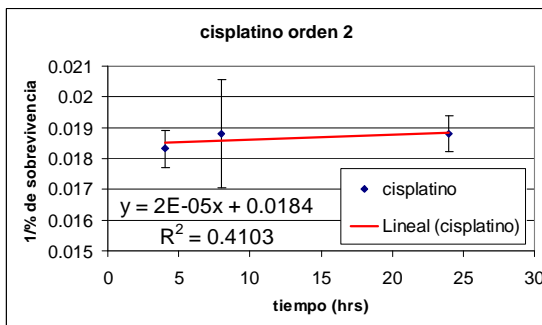
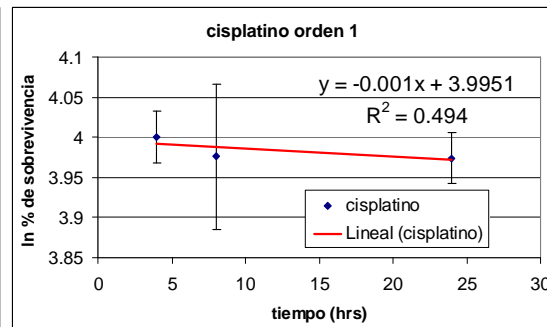
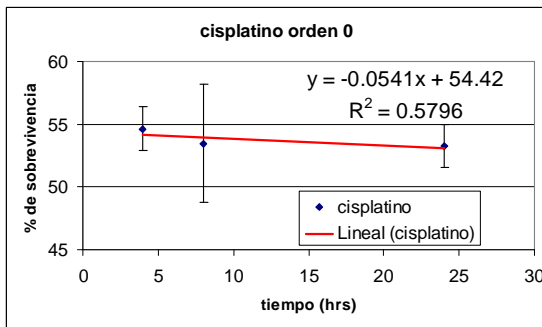


APÉNDICE 3

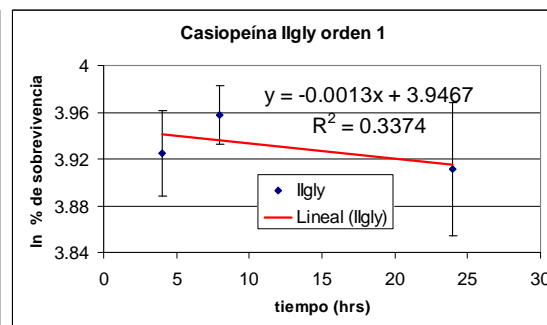
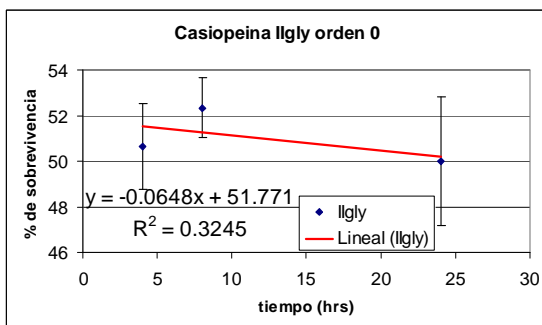
SERIES 3. CINÉTICA DE RECUPERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

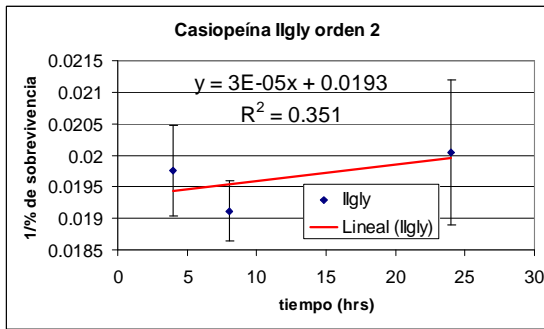
HELA SERIE 3. GRÁFICAS PARA DETERMINAR EL ORDEN DE LA CINÉTICA DE RECUPERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

CISPLATINO

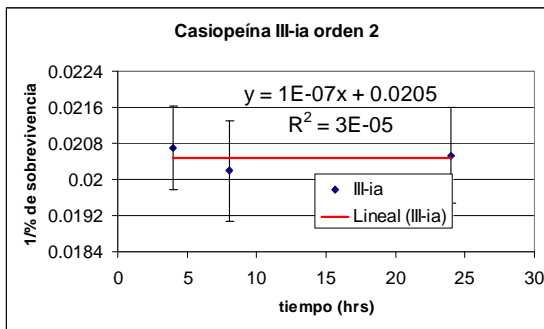
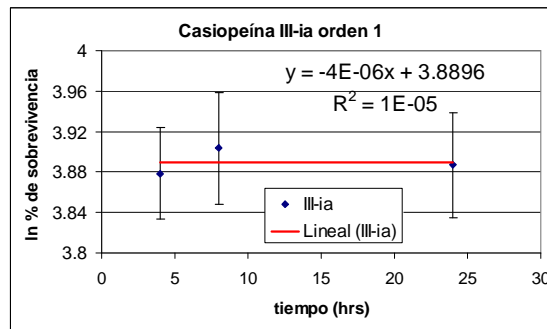
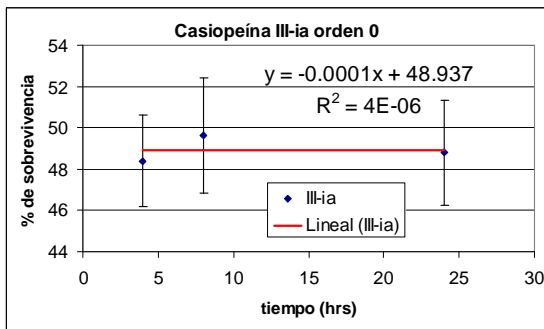


CASIOPEÍNA Igly



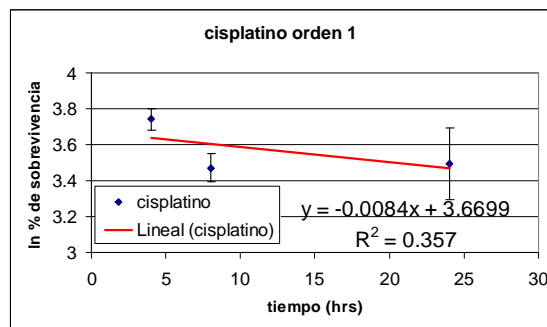
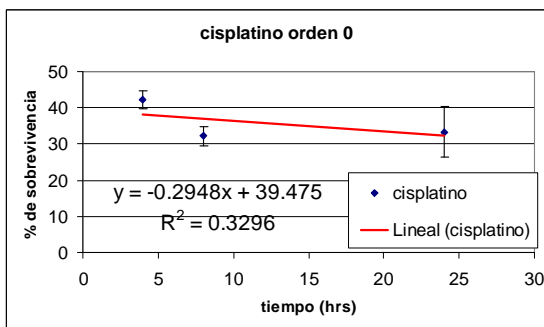


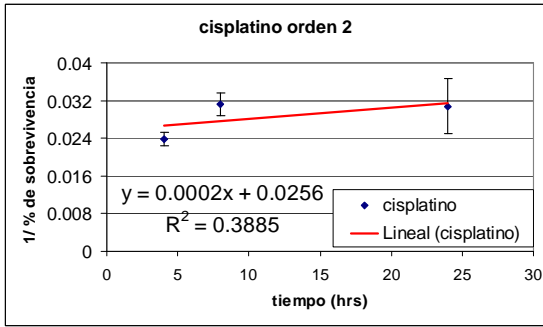
CASIOPEÍNA III-ia



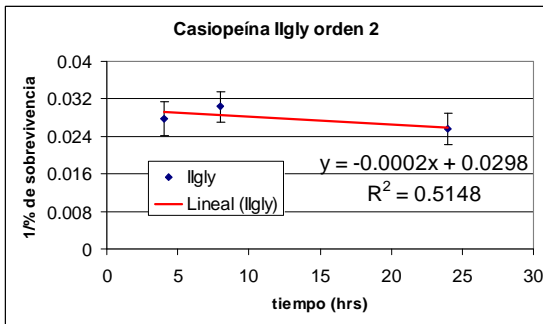
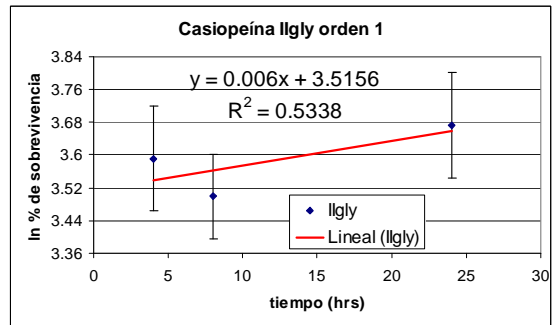
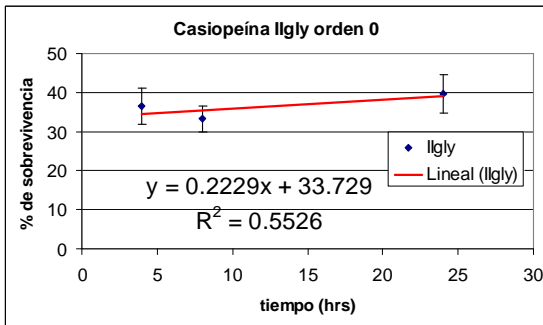
SkLu-1 SERIE 3. GRÁFICAS PARA DETERMINAR EL ORDEN DE LA CINÉTICA DE RECUPERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

CISPLATINO

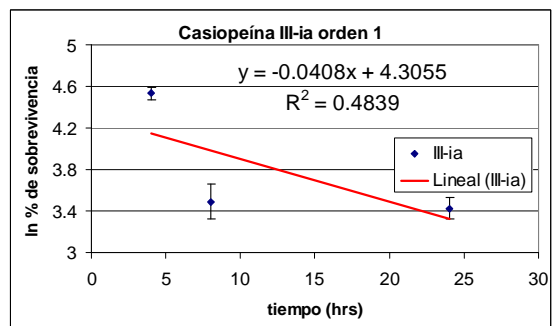
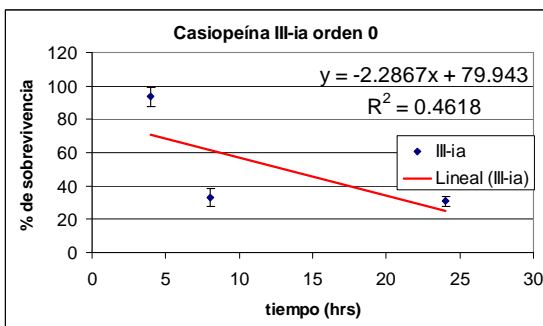


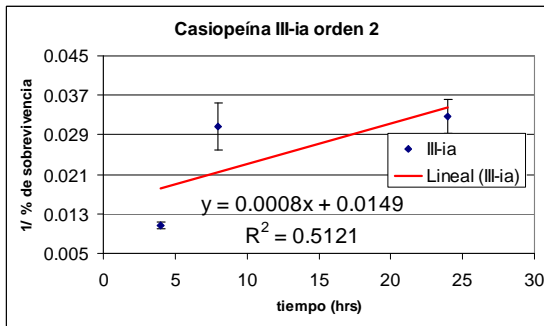


CASIOPEÍNA Igly



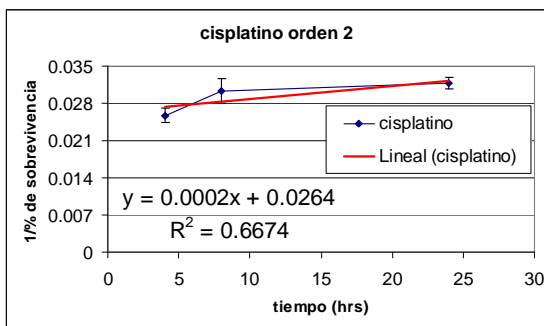
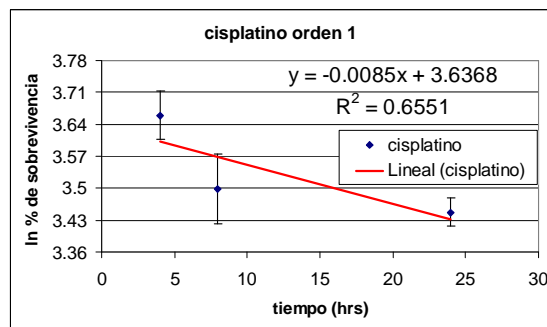
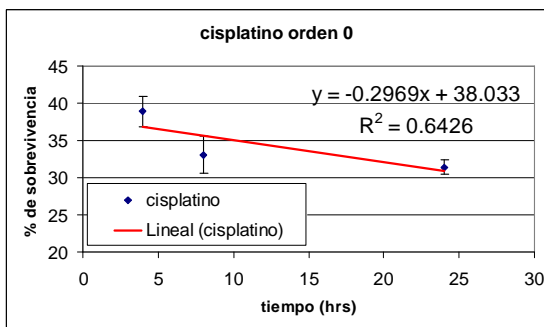
CASIOPEÍNA III-ia



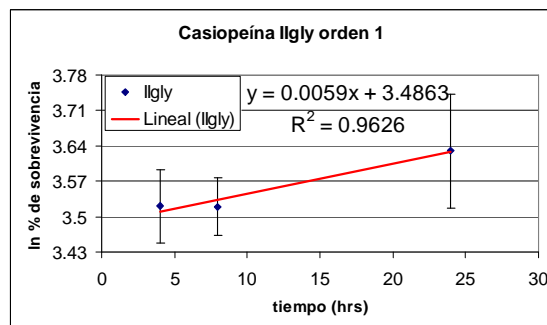
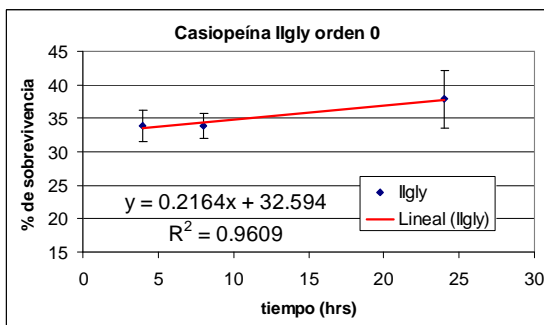


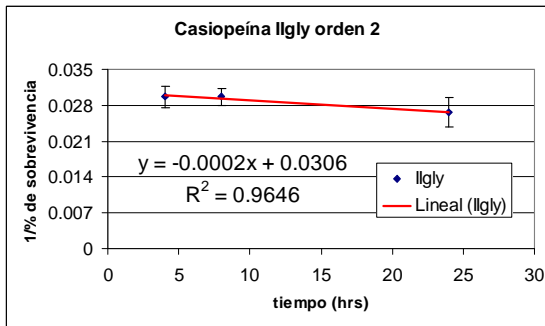
HCT-15 SERIE 3. GRÁFICAS PARA DETERMINAR EL ORDEN DE LA CINÉTICA DE RECUPERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

CISPLATINO

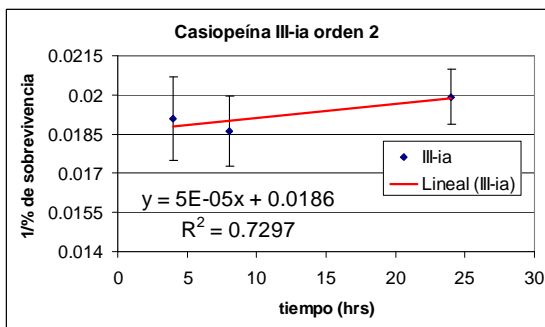
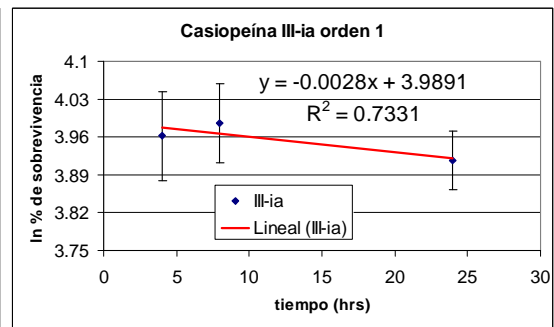
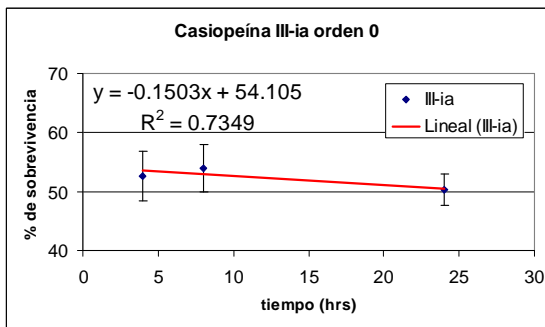


CASIOPEÍNA IIgly





CASIOPEÍNA III-ia



GLOSARIO

Aneuploide- condición por la cual un organismo gana o pierde uno o más cromosoma[101]

Apoptosis-Muerte celular programada, en la cuál la célula produce proteínas necesarias para la autodestrucción, evitándose la liberación de constituyentes celulares potencialmente tóxicos[102].

Carcinógeno- Agente inductor de cáncer[102].

Célula hematopoyética- célula progenitora de células mieloides y linfoides[102].

Cromosoma-arreglos de moléculas de ADN lineales íntimamente asociadas con proteínas[101].

Ectodermo- La capa germinal más externa, da origen a tejidos que incluyen la piel, y el sistema nervioso[102].

Endodermo- La capa germinal más profunda, da origen a órganos internos[102].

Fenotipo. Características de un organismo[101].

Glucólisis- mecanismo mediante el cual la energía almacenada en moléculas orgánicas, puede ser convertida en ATP, que puede después ser usada como fuente de energía para llevar a cabo otras reacciones metabólicas[102].

IARC- Internacional Agency of Research in Cáncer[5].

In vitro- Denota una reacción o proceso que se lleva a cabo en un extracto celular aislado, aveces utilizado para distinguir las células que crecen en un cultivo, de aquéllas de un organismo[103].

In vivo- En un organismo o célula intacta[103].

Mesodermo-La capa germinal intermedia. Da origen a tejidos conectivos y al sistema hematopoiético[102].

Mitógeno- Cualquier molécula extracelular, como por ejemplo un factor de crecimiento, que promueve la proliferación celular[103].

Mitosis- proceso de división celular por el cual se producen dos células, cada una de las cuales tiene el mismo número de cromosomas que la célula madre[101].

OMS-Organización Mundial de la Salud.

Oncogen- gen resultante de la mutación de un proto-oncogen, inducen o mantienen la proliferación celular incontrolada asociada con el cáncer[101].

UICC-Unión Internacional Contra el Cáncer

Bibliografía

1. Laporte Joan R, Brosa Xalma F., *capítulo 1. Introducción*, en *Las causas del Cáncer*. 1989, Salvat: Barcelona, España. p. 1-9.
2. Lodish H., Berk.A., Matsudaira P., Kaiser C.A, *chapter 23: Cancer*, en *Molecular Cell Biology*. 2004, W.H. Freeman and Company: U.S.A. p. 935-969.
3. Rubin P., Williams J., *Capítulo 2: Biología del Cáncer*, en *Oncología Clínica*. 2002, Elsevier Science Imprint: Madrid, España. p. 32-44
4. Cooper G.M., Hausman R.E., *chapter 18: Cancer*, en *The cell: A molecular approach*. 2007, A.S.M Press: Washington, U.S.A. p. 719-763.
5. O.M.S., *Cáncer*. febrero 2006, <http://www.who.int/features/2006/cancer/es/index.html>.
6. Hussain S. Pervez, Harris C.C., *Molecular Epidemiology of Human Cancer*. *Toxicology Letters*, 1998(102-103): p. 219-225.
7. Clavel J., *Progress in the epidemiological understanding of gene-environment interactions in major diseases: cancer*. *Comptes Rendus Biologies*, 2007. **330**: p. 306-317.
8. WHO, *world health statistics 2006*. <http://www.who.int/whosis/whostat2006/en/index.html>, 2006.
9. *Cáncer, Congreso mundial de la UICC sobre el cáncer, Declaración mundial sobre el cáncer 2006*.
10. AECC, *Incidencia*. <http://www.todocancer.com/NR/rdonlyres/644E25A4-CE02-41EC-9EAC-3B2184DC1CDD/0/Incidencia.pdf>, 2006.
11. AECC, *Mortalidad*. <http://www.todocancer.com/NR/rdonlyres/3BF40B87-AEA0-4256-9ED2-07C13B654ADB/0/mortalidad.pdf>, 2006.
12. AECC, *Supervivencia*. <http://www.todocancer.com/NR/rdonlyres/7599E6FB-DA18-4FF5-BE15-B2FF994EFA39/0/supervivencia.pdf>, 2006.
13. AECC, *El cáncer en el mundo*. <http://www.todocancer.com/NR/rdonlyres/D5E77B09-EDC6-43E5-A8CC-500199E3A4AB/0/MUNDO.pdf>, 2006.

14. OMS, *The impact of cancer in your country- Graphs*.
<http://www.who.int/infobase/report.aspx?rid=119&iso=MEX&generateReport=Generate+Report>, 2005.
15. INEGI, *Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer, Datos nacionales*.
<http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2008/cancer08.pdf>, 4 febrero 2008.
16. INEGI, *Estadísticas a propósito del día Internacional de la Mujer, Datos nacionales*.
<http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/mujer07.pdf>, 8 marzo 2007.
17. Otto S.E., *capítulo 1 Fisiopatología*, en *Enfermería Oncológica*. 1999, Ediciones Hancourt: Madrid , España. p. 3-19.
18. Velasco Martin A, Fernández L.P., Serrano Molina J.S., Andrés-Trelles F., *Fármacos antineoplásicos*, en *Velazquez. Farmacología*. 1996, McGraw Hill Interamericana de España: Madrid España. p. 1089-1121.
19. Macdonald F., Ford C., Casson A.G., *Molecular Biology of Cancer*. 2004, Garland Science/BIOS Scientific Publisher: New York, U.S.A. p. 12-30.
20. Haskell C.M., *chapter 1: Principles of Cancer treatment*, en *Cancer treatment*. 1998, W.B. Saunders Company: Pennsylvania, U.S.A. p. 10-13
21. Barret C, Wiseman R.W., *Cellular and Molecular Mechanisms of Multistep Carcinogenesis: Relevance to Carcinogen Risk Assessment*,. *Environmental Health Perspectives* 1987. **76**: p. 65-70.
22. González Sastre Francesc, Guinovart J.J., *Patología molecular*. 2003, Elsevier España. p. 61-64.
23. Gringauz A., *chapter 4: Anticancer drugs and their mechanism of action*, en *Introduction to Medicinal Chemistry*. 1997, Wiley- VCH Inc.: New York, U.S.A. p. 93-137.
24. Linda Lane Lilley, Aucker R.S., Richard E. Lake, Roberto Gómez del Campo, *capítulo 44 Antineoplásicos*, en *Farmacología en Enfermería*. 1999, Elsevier: España. p. 643-664.
25. ATCC, *Catalogue of cell lines & hybridomas*. 7 ed. 1992: American Type Culture Collection.

26. ATCC, http://www.atcc.org/common/images/Cells/CCL-2_mg1.jpg.
27. ATCC,
<http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CCL-225>.
28. ATCC, http://www.atcc.org/common/images/Cells/CCL-225_mg1.jpg.
29. Bender M.A., Moore R.C., *Dose relationships for different effects of aphidicolin in human peripheral blood leukocytes*. Mutation Research, 1988(198): p. 227-231.
30. Evans H.J., *Population cytogenetics and environmental factors*. Pfizer Medical Monographs. Vol. 5. 1970: Edinburgh University Press.
31. Buckton K.E., Evans H.J., *Methods for Analysis of human Chromosome Aberrations*. World Health Organization, Geneva, 1973.
32. Aoki Y, Moore G.E., *Comparative study of mitotic stages of cells derived from human peripheral blood*. Experimental Cell Research, 1970. **59**: p. 259-266.
33. Cameron R.B., *capítulo 1: Principios generales de Oncología, sección 2. Principios de cirugía oncológica*, en *Oncología Práctica*. 1995, Editorial Médica Panamericana: Madrid, España. p. 5-9.
34. Cameron R.B., *Capítulo 1: Principios generales de Oncología, sección 4: Principios de Oncología radiante*, en *Oncología Práctica*. 1995, Editorial Médica- Panamericana: Madrid, España. p. 18-24.
35. Bonadonna Gianni, Robustelli G., *Manual de Oncología médica*. 1 ed. 1983, Barcelona, España: Masson.
36. Cameron R.B., *capítulo 1: principios generales de oncología, sección 5: Principios de Inmunoterapia*, en *Oncología Práctica*. 1995, Editorial Médica Panamericana: Madrid, España. p. 25-29.
37. Porta V.G., *capítulo 4: Avances en radioterapia: Tecnología y Biofarmacología aplicada*, en *Avances en Oncología*. 2002, Ediciones Arán: Madrid, España. p. 79-119.
38. Pinedo H.M., Longo D.L., Charbner B.A, *Chapter 14 Strategies for cancer gene therapy*, en *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*. 1997, Elsevier Science B.V.: Netherlands. p. 328-340.

39. Koda K.M.A., Young L.Y., Kradjan W.A., Guglielmo B.J., *chapter 19: Neoplastic disorders*, en *Applied Therapeutics: The clinical use of Drugs*. 2005, Lippincott Williams & Wilkins: Pennsylvania U.S.A. p. 881- 921.
40. De Vita Vincent T., Hellman J.S., Rosenberg S.A., *Chapter 13: Principles of Chemotherapy*, en *Cancer Principles & Practice*. 1982, Lippincott: U.S.A. p. 257-271.
41. Amiel J.L., Rouëssé J., Machover D, *Manual de Oncología*. 1978, Toray-Masson: España: p 102-110
42. Luchello P.E., Begamini N., Bachini V, *Rationality of drug development*. 1976, Elsevier Publishing Company Inc.: Florence, Italy.
43. Goodman L, Gilman, Lindskog, *Nitrogen mustard therapy*. The journal of the american medical association, 1964. **132**(3): p. 126.
44. Curtis J., *From the field of battle, an early strike to cancer*. Yale medicine, 2005. **summer 2005**: p. 16-18.
45. Farber S., Diamond L.K., Mercer R.D., *Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin)*. The New England Journal of Medicine, 1948. **238**: p. 787-793.
46. Hitchings George H., Elion G.B., *THE CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF PURINE ANALOGS*. Annals of the New York Academy of Sciences 1954. **60**(2): p. 195-199.
47. Calabresi Paul , Chabner B.A., *section X. Chemotherapy of Neoplastic Diseases*, en *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Editor: Hardman J.G. 1996, The Mc Graw Hill Companies: U.S.A. p. 1225-1280.
48. Skipper H.E., *Reasons for success and failure in treatment of murine leukemias with the drugs now employed in treating human leukemias*. Cancer Chemotherapy, 1978. **1**: p. 1-16.
49. Skipper H.E., Schabel F.M., Mellet L.B., *Implications of biochemical, cytokinetic, pharmacologic, and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules*. Cancer Chemotherapy, 1950(54): p. 431-450.
50. Skipper H.E., Schabel F.M., Wilcox W.S., *Experimental evaluation of potential anticancer agents. On the criteria and kinetics associated with*

- "curability" of experimental leukemia. *Cancer Chemotherapy* 1964. **35**: p. 1-111.
51. Katzung B.G., *chapter 55: Chemotherapy of cancer*, en *Basic & Clinical Pharmacology*. 2001, Mc Graw Hill: U.S.A. p. 1011-1047.
 52. Bast Fr. RC, Kufe D.W., Pollack RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei III E., en *Cancer medicine*. 2000, B.C. Decker Inc.
 53. Mendelsohn J., Howley P.M., Israle M.A., Liotta L.A., *section 4, chapter 18: Chemotherapy, suceptibility and resistance*, en *The Molecular Basis of Cancer*. 1995, W.B. Saunders Company: Philadelphia, U.S.A. p. 387-397.
 54. Cory J.G., Szentivanyi A., *Chapter 1, Section 2: The biological bases for the design of Anticancer Agents*, en *Cancer Biology and Therapeutics*. 1987, Plenum Press: Florida, U.S.A. p. 20-34.
 55. Thompson K. H, Orvig C., *Boon and Bane of Metal Ions in Medicine*. science, 2003. **300**: p. 936-939.
 56. Yung C.Y., *A synopsis on Metals in Medicine and Psychiatry*. *Pharmacology Biochemistry & Behaviour*, 1984. **21**(suppl 1): p. 41-47.
 57. Huang R, Wallquist A., Covell D.G. , *Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action*. *Biochemical Pharmacology* 2005. **69**: p. 1009-1039.
 58. Cohen S.M., Lippard S.J., *Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2001(67): p. 93-130.
 59. Gracia-Mora I , Ruiz-Ramírez L. *Antineoplastic Effect of Several Transition Metal Complexes*. en *Fourth Chemical Confress of North America (memories)*. 1991. New York , U.S.A.: Academic Press,.
 60. Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L. *trabajo 26: Antineoplastic Effect of Several Transition metal Complexes*. in *Fourth Chemical Congress of North America, 25-30, August, N.Y.* 1991.
 61. Gracia- Mora I, Ruiz-Ramírez L., *The Antitumor Activity of Several Transition Metal Complexes*. . *Journal of Inorganic Biochemistry; an Interdisciplinary Journal.*, 1991. **43**: p. 2-3.
 62. Bravo-Gómez M.E., *Tesis de licenciatura Evaluación Antineoplásica de Compuestos de Coordinación de Cobre (Casiopeínas) en Modelo*

- tumoral murino , en *Departamento de Química Inorgánica*. 1998, Universidad Nacional Autónoma de México: D.F.
63. Ruíz-Azuara L., *US Patent Ap. 21 (1992) Number 5, 107, 005. US Patent Re 35, 458, February 18 (1997). US Patent November 19(1996) Number 5, 576, 326. 407543 SECOFI; 1993.*
64. *Titulo de Marca : Casiopeína . Reg 407543 SECOFI (1992-2002).*
65. Tamotsu Sugimori, Masuda H., Nayumi Ohata, Kouji Koiwai, Akira Odani, Osuma Yamauchi, *Structural Dependence of Aromatic ring stacking and related weak interactions in ternary amino acid- copper (II) complexes and its biological implication*. *Inorganic Chemistry*, 1997(36): p. 576-583.
66. Aguilera E.R., Martínez E.M.T.; Mácias, R.L.; Cortés, M.L.; Ortiz, M.R.; Ruiz-Ramírez.L. & Gracia-Mora I. . *Estimación del porcentaje de Muerte celular por Apoptosis y Necrosis en Células HeLa, Inducido por cinco Casiopeínas de la Familia III. . en Memorias de 5ª Jornada de Trabajos en Casiopeínas. Primer Congreso en Casiopeínas. Taxco, Guerrero, 2 a 3 de Diciembre de 2002. 2002.*
67. Alemón-Medina R., Breña-Valle Matilde; Muñoz-Sánchez José Luis; Gracia-Mora Isabel, Ruiz-Azuara Lena., *Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®)*. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 007. **60**(2): p. 219-28.
68. Ruíz-Ramírez L., Gracia-Mora I., de la Rosa M.E., Sumano H., Gómez C., Arenas F., Gómez E., Pimentel E., Cruces M.P., *Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeínas I, II and III*. *Journal of Inorganic Biochemistry; an Interdisciplinary Journal.*, 1993. **51**(1-2): p. 250.
69. Sánchez-Bartez F., *Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las Casiopeínas I, II y III en linfocitos de médula ósea de ratón y linfocitos humanos en cultivo.*, en *Programa de maestría y doctorado en ciencias químicas*. 2006, Universidad Nacional Autónoma de México: Ciudad de México.
70. Trejo-Solís C., Palencia Guadalupe; Zúñiga Sergio; Rodríguez-Ropon Andrea; Osorio-Rico Laura, Torres-Sánchez Luvia; Gracia-Mora Isabel;

- Marquez-Rosado Lucrecia; Sánchez Aurora; Moreno-García Miguel E.; Cruz Arturo; Bravo-Gómez María Elena; Ruiz-Ramírez Lena; Rodríguez-Enriquez Sara y Sotelo Julio. *Cas Ilgly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms*. *Neoplasia*, 2005. **7**(6): p. 563-574.
71. Gracia-Mora I., Ruiz-Ramírez L.; Gómez C.; Tinoco M.; Márquez A.; Romero L., Marín A.; Macías L.; Bravo M.E, *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**(1): p. 19-28.
72. Tovar-Tovar A., *Caracterización cristalográfica y EPR de complejos mixtos de Cu(II) (Casiopeínas) e interacciones con algunas biomoléculas*. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 2005.
73. Gasque L, Ruiz-Ramírez L., Moreno-Esparza R. , *Stabilities of ternary copper and nickel complexes with 1,10phenanthroline*. *Journal of Inorganic Biochemistry; an Interdisciplinary Journal.*, 1992. **2**(48): p. 121.
74. Ramos-García J.C., *Tesis de licenciatura Estudio QSR de compuestos de Coordinación de cobre de tipo [Cu(N-N)(glicinato)]NO₃*, en *Química Inorgánica y Nuclear*. 2007, Universidad Nacional Autónoma de México: Ciudad de México.
75. Flood-Garibay J.A., *Tesis de licenciatura Síntesis y evaluación biológica in vitro de compuestos de coordinación [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO₃ (Casiopeína) en diferentes líneas tumorales*, en *Escuela de Ingeniería y Ciencias, Departamento de Ciencias Químico-Biológicas*. 2006, Universidad de las Américas, Puebla: Puebla.
76. Solans X., Ruiz-Ramírez L., Martínez A., Gasque L. y Moreno-Esparza R., *Mixed chelate complexes. II. Structures of L-alaninato(aqua)(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)copper(II) nitrite monohydrate and aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(nitrate)copper(II) monohydrate*. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, 1993. **49**(5): p. 890-893.

77. Bravo-Gómez M. E., García-Ramos J.C., Gracia-Mora I., Ruiz-Azuara L., QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonate)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinate)]NO₃ complexes, (Casiopeínas ®) employing their antiproliferative activity on different human tumor cell lines as biological response. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008. **enviado**.
78. Alpizar Viveros Alfred, Fuentes I., *Determinación del pKa y el coeficiente de partición de la Casiopeína III-ia*. 3a Jornada de trabajo en Casiopeinas, 1998: p. 64-68.
79. Barrón-Sosa L.R., *Tesis de licenciatura. Influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa y apóptica del quelato mixto de cobre Casiopeína III-ia en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos*, en *Química Inorgánica y nuclear*. 2006, Universidad Nacional Autónoma de México: Distrito Federal.
80. Carvallo- Chaigneau Francisco; Constantino-Casas Fernando, Trejo-Solís C., Gómez-Ruiz C., Rodríguez-Aguilera E., Macías-Rosales L., Cortés-Barberena E., Cedillo-Peláez C., Gracia-Mora I., Ruiz-Azuara L., Madrid M., *Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo*. *Biometals: an international journal on the role of metals ions in biology*. 2008. **21**(1): p. 17-28.
81. Marín-Hernández A., Gracia-Mora I.; Ruiz-Ramírez L.; Moreno-Sánchez R., *Toxic effects of copper-based drugs (Casiopeinas) on mitochondrial functions*. *Biochemical Pharmacology*, 2003. **65**(12): p. 1979-1989.
82. Rivero-Mueller A., De Vizcaya-Ruiz A.; Plant N.; Ruiz-Ramírez L.; Dobrota M., *Mixed chelate cooper complex Casiopeina II gly binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity*. *Chemico-Biological Interactions*, 2007. **165**(3): p. 189-199.
83. De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Muller A; Ruiz –Ramírez L.; Kass G.E.N.; Kelland L.R.; Orr R.M.; Dobrota M., *Induction of apoptosis by a novel-based anticancer compound, Casiopeína II, en L1210 murine leukemia and CH1 human ovarian carcinoma cells*. *Toxicology in Vitro*, 2000. **14**(1): p. 1-5.

84. Alemón-Medina R., Muñoz-Sánchez J.L., Ruiz-Azuara L., Gracia-Mora I., *Casiopaina Ilgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide*. *Toxicology in Vitro*, 2008. **22**: p. 710-715.
85. Hernández-Esquivel L., Marin-Hernández A.; Pavon N.; Carvajal K.; Moreno-Sánchez R., *Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopainas is related to inhibition of energy metabolism*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006. **212**(1): p. 79-88.
86. De-Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Muller A; Ruiz-Ramírez L.; Howarth J.A. ; Dobrota M. *Hematotoxicity in rats by the novel cooper-based anticancer agent: Casiopéina Ilgly*. *Toxicology* 2003. **194**(1-2): p. 103-113.
87. Leal-García M., Sumano H.; Luna-Delvillar J. ;Gracia-Mora I. ; Ruíz-Azuara L.; García-Ortuño, Luis *Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of casiopainas in anaesthetized dogs*. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 2007. **101**(3): p. 151-8.
88. Fuentes-Noriega I.; Ruíz-Ramírez L.; Tovar-Tovar A.; Rico-Morales H.; Gracia-Mora I., *Development and validation of liquid chromatographic method for Casiopenia III-ia in rat Plasma*. *Journal of chromatography, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2002. **772**(1): p. 115-121.
89. Freshney R.I., *chapter 26 Specialized techniques*, en *Culture of animal cells*. 2000, Wiley Liss Inc.: U.S.A. p. 350-379.
90. Shekan P, Storeng R., Scudeiro D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R., *New colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1990. **82**(13): p. 1107-1112.
91. NCI, *DTP Human Tumor Cell Line Screen*. <http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>, 2008.
92. Yachnin J.R., Wallin I., Lewensohn R., Sirzén F., Ehrsson H., *The kinetics and cytotoxicity of cisplatin and its monohydrated complex*. *Cancer Letters*, 1998. **132**: p. 175-180.
93. Pujol M., Girona V., Prat J., Muñoz M., De Bolós J., *Degradation pathway of carboplatin in aqueous solution*. *International journal of pharmaceuticals*, 1996. **146**: p. 263-269.

94. AnalystSoft-Robust-Business-solutions, *StatPlus 2005*. 2005.
95. Sigma-Aldrich, *Histopaque-1077 procedure No.1077*
<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general%20information/1077.pdf>,
 2008.
96. Alves-dosSantos R.; Takahazhi-Satie C., *Anticlastogenic and antigenotoxic effects of selenomethionine on doxorubicin-induced damage in vitro in human lymphocytes*. Food and chemical Toxicology, 2008. **46**: p. 671-677.
97. Nies A., Spilberg S., *chapter 3 Principles of therapeutics*, in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Editor Hardman J.G., Limbird L.L. 1996, McGraw Hill: USA p. 43-59.
98. Lan F. Qin; Irene O.L.N., *Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells*. Cancer Letters, 2002. **175**: p. 27-38.
99. Katano K., Akira K., Roohangiz S., Holzer A., Goli S., Misako M., Yien-Ming K., Rochdi M., Howell S., *Acquisition of Resistance to Cisplatin is accompanied by changes in the cellular Phaymacology of Copper*. Cancer Research, 2002. **62**: p. 6559-6565.
100. Sklug William, Cummings Michael.R., *Concepts of Genetics*. 6 ed. 2000, Prentice Hall Inc.: New Jersey U.S.A. p 251-252
101. Cooper G.M , Haussman R.E., *The cell, A molecular approach*. 4 ed. 2007, Washington U.S.A.: A.S.M. Press.p 7,18,704-705, 781, 784, 788
102. Senra, A.V., *Capitulo 1: Introducción: Historia del Cáncer*, en *El Cáncer*. 2002, Ediciones Hancourt: Madrid, España. p. 3-20.
103. Lodish H., Berk.A., Matsudaira P., Kaiser C.A, *Molecular cell Biology*. 2004, W.H. Freeman and Company: U.S.A. p. g-11,g-13.

