



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR  
DE COBRE EN CÉLULAS TUMORALES HeLa TRATADAS CON  
COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DEL TIPO [Cu(4,7-  
DIMETIL-1,10-FENANTROLINA)( $\alpha$ -AMINOACIDATO)]NO<sub>3</sub>  
(CASIOPEÍNAS®)”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**SILVIA GRACIELA DÁVILA MANZANILLA**



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE	Lena Ruiz Azuara
VOCAL	Homero Hernández Montes
SECRETARIO	Enrique Moreno Sáenz
PRIMER SUPLENTE	Armando Marín Becerra
SEGUNDO SUPLENTE	María Elena Bravo Gómez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 210  
Departamento de Química Inorgánica y Nuclear

Laboratorio de cultivo de tejidos  
Unidad de experimentación animal (UNEXA)

Facultad de Química, UNAM

**Dra. Lena Ruiz Azuara**  
ASESOR DE LA TESIS

**Dra. María Elena Bravo Gómez**  
SUPERVISOR TÉCNICO

**Silvia Graciela Dávila Manzanilla**  
SUSTENTANTE

Este trabajo contó con el apoyo de CONACYT (Proyecto 60085) y al fideicomiso “Medicamentos Antineoplásicos” otorgado a Silvia Graciela Dávila Manzanilla (No. 634-3)

## Agradecimientos

A la Dra. Lena Ruiz Azuara por permitirme participar en su grupo de trabajo.

A la reciente Dra. María Elena Bravo por ayudarme en los ensayos experimentales y para escribir la tesis.

Al próximo Dr. Francisco "Pakito" Sánchez Bartz, por cultivar los millones de millones de células que necesité para los ensayos biológicos.

A la M. en C. Aracely Tovar Tovar por realizar los análisis de absorción atómica, sin los cuales este trabajo no sería lo que es.

# Dedicatorias

*A mis padres, Víctor y Silvia.*

*A mis hermanos, Víctor y Pablo.*

*A mis tíos: Aída, Mimí, Teté, Enrique y Angélica, Marco y Laura. Y primos: Gaby, Checo, Tere, Martita, Quique, Gaby, Toño, Calola Dunny y Goretti.*

*En memoria de mis abuelos, Marcos, Tere, Humberto y Lilia; y de mis tíos que los acompañan, especialmente Marco Aurelio y Sergio.*

*A mis compañeros de la Facultad.*

*A mis compañeros del 210.*

*A la UNAM.*

*Last but not least... a Dios.*

# Contenido

Índice de tablas, figuras y gráficas

Abreviaturas

I.	Resumen.....	1
II.	Antecedentes.....	4
	a. <b>El cobre</b> .....	7
	b. <b>Casiopeínas</b> .....	10
III.	Justificación.....	15
IV.	Hipótesis.....	16
V.	Objetivos.....	17
VI.	Material y Método.....	19
	<b>Diseño Experimental</b> .....	19
	a. Evaluación de la inhibición de la proliferación celular.....	21
	b. Cuantificación de cobre intracelular.....	23
	1) Determinación de la concentración de proteína.....	23
	2) Determinación del volumen de solución amortiguadora de lisis para disolver la proteína.....	25
	3) Determinación del tiempo óptimo de exposición de los compuestos.....	25
VII.	Resultados y Análisis de resultados.....	27
	a. Ensayo de inhibición de la proliferación celular.....	27
	b. Condiciones experimentales de cobre intracelular en la línea tumoral HeLa.....	29
	1) Determinación del número de células por pozo y volumen de buffer de lisis.....	29
	2) Determinación del tiempo de exposición de los complejos de cobre en $2 \times 10^6$ células.....	32
	3) Cuantificación de cobre en la línea tumoral HeLa.....	35

VIII. Discusión de Resultados.....	40
IX. Conclusiones.....	45
Bibliografía.....	46

# ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

## Tablas:

*Tabla 1: Vías de generación de especies oxidantes a través de la reacción de Fenton y el ciclo de Haber-Weiss. ¡Error! Marcador no definido.*

*Tabla 2: Clasificación de las Casiopeínas<sup>®</sup> ..... ¡Error! Marcador no definido.*

*Tabla 3:  $CI_{50}$  del  $Cu(NO_3)_2$ ,  $Cu-(phen)^{2+}$  y  $Cu-(phen)_2^{2+}$  ..... ¡Error! Marcador no definido.*

*Tabla 4:  $CI_{50}$  de las Casiopeínas<sup>®</sup> incluidas en este estudio y log P de los aminoácidos presentes en los compuestos ternarios. ¡Error! Marcador no definido.*

## Figuras:

*Figura 1: Principales causas de mortalidad en México. OMS, 2005. .... ¡Error! Marcador no definido.*

*Figura 2. Homeostasis del cobre.. .... ¡Error! Marcador no definido.*

*Figura 3. Ejemplos de Casiopeínas variando los ligantes primarios y secundarios. .... ¡Error! Marcador no definido.*

*Figura 4: Compuestos ternarios evaluados en este trabajo... .... ¡Error! Marcador no definido.*

## Gráficas:

*Gráfica 1: Curva estándar de la determinación de proteínas.. ..... ¡Error! Marcador no definido.*

*Gráfica 2: Curva estándar de proteína..... ¡Error! Marcador no definido.*

*Gráfica 3. Porcentaje de cobre con respecto al control negativo a los diferentes tiempos de exposición, CasII gly... ¡Error! Marcador no definido.*

*Gráfica 4: ppb de cobre intracelular por mg de proteína. ¡Error! Marcador no definido.*

*Gráfica 5: %Cu vs  $CI_{50}$  de los controles estructurales. ¡Error! Marcador no definido.*

*Gráfica 6: Cobre intracelular a diferentes tiempos de exposición de los complejos ternarios 20  $\mu$ M, Casiopeínas<sup>®</sup> y sus controles estructurales  $Cu(NO_3)_2$ ,  $Cu(phen)^{2+}$  y  $Cu(phen)_2^{2+}$  ..... ¡Error! Marcador no definido.*

*Gráfica 7: Comparación del %Cu, con el log P del aminoácido correspondiente, después de a) 10 min, b) 15 min y c) 20 min de exposición a cada Casiopeína<sup>®</sup> ..... ¡Error! Marcador no definido.*

*Gráfica 8: Actividad antiproliferativa de las Casiopeínas<sup>®</sup>. ..... ¡Error! Marcador no definido.*

# ABREVIATURAS

acac	Acetilacetato
ATCC	Centro de Recursos Biológicos
ATP7A	ATPasa Tipo P. Transportador de $\text{Cu}^{2+}$ , polipéptido alfa
ATP7B	ATPasa Tipo P. Transportador de $\text{Cu}^{2+}$ , polipéptido beta
Bis phen	Nitrato de Bis acuo, bisfenantrolina cobre (II)- hidratado
CasII-AB	$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{aminobutirato})]\text{NO}_3$
CasII-ala	$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{alaninato})]\text{NO}_3$
CasII-gly	$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$
CasII-norleu	$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{norleucinato})]\text{NO}_3$
CasII-norval	$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{norvalinato})]\text{NO}_3$
CCS1	Proteína chaperona de cobre para superóxido dismutasa 1.
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria a las 24 horas de la proliferación del 50% de la población
COX17	Proteína chaperona de cobre para citocromo oxidasa
%Cu	Porcentaje de cobre con resto al control del día
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E <sub>1/2</sub>	Potencial de media onda
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
hCtr1	Transportador humano de $\text{Cu}^+$
HeLa	Línea tumoral de cáncer cervico-uterino
Mono-phen	Monoquelato de cobre-fenantrolina hidratado
PMSF	Fluoruro de metilfenilsulfonilo
PSB	Amortiguador salino de fosfatos
QSAR	Estudios Cuantitativos de Relación Estructura-Actividad
ROS	Especies reactivas de oxígeno

salal	Salilaldehidato
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Superóxido dismutasa
Tris base	Tris(hidroximetil)aminometano

# I. RESUMEN

Las Casiopeínas<sup>®</sup>, son compuestos de coordinación cuya fórmula general es  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$ , donde N-N es una diimina aromática, ya sean fenantrolinas o bipyridinas sustituidas; O-O es un donador por oxígeno y N-O es un  $\alpha$ -aminoacidoato[1,2]. Estos compuestos han presentado actividad genotóxica[3,4], citotóxica *in vitro*[4,5] e *in vivo*[5], citostática *in vitro*[5] y antitumoral en animales de laboratorio[5-7]

En estudios Cuantitativos de Relación Estructura-Actividad (QSAR) realizados previamente en el grupo de trabajo con complejos  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$ , se encontró una significativa correlación entre la inhibición de la proliferación celular evaluada *in vitro* y el carácter redox de la molécula, expresado como el potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) de la pareja Cu(II)/Cu(I), el cual está influido principalmente por el ligante diimina. En este mismo estudio se propuso que existe una aparente influencia de las propiedades hidrofóbicas, determinadas por el coeficiente de partición de los compuestos, en la actividad biológica, sin embargo, los resultados no permiten establecer claramente el grado de ésta sobre la actividad biológica y la participación de cada uno de los ligantes en esta propiedad fisicoquímica[8].

En este trabajo se comparó la actividad antiproliferativa con la concentración total intracelular de cobre en la línea tumoral HeLa después del tratamiento con diferentes Casiopeínas<sup>®</sup> que conservan

constante la fenantrolina, mientras, el aminoacidato presenta variaciones en el número de carbonos de la cadena alifática lineal y, por lo tanto, en las propiedades hidrofóbicas del compuesto. Los compuestos evaluados tienen como ligante diimina 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, debido a que los complejos de cobre que contienen esta fenantrolina como ligante primario demostraron, en estudios previos, tener una de las mejores actividades antiproliferativas[8].

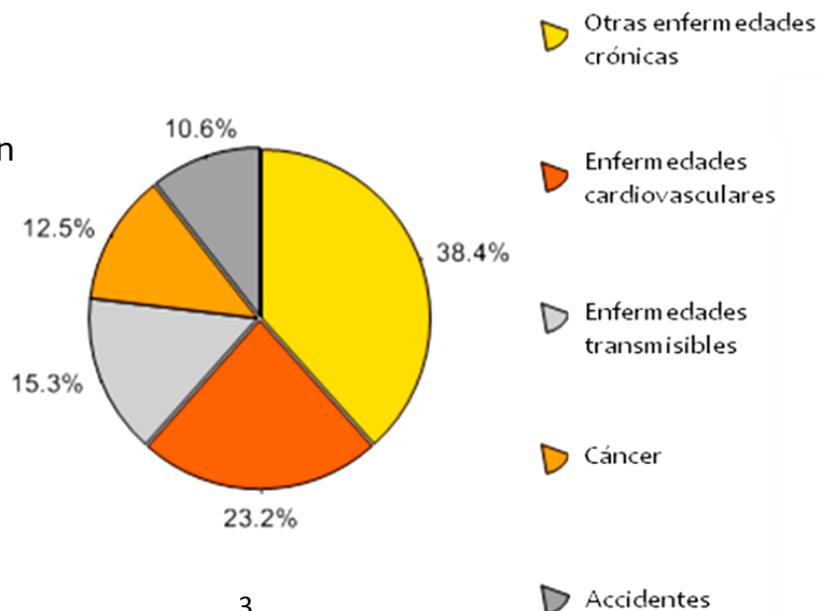
En este trabajo se encontró que la concentración de cobre intracelular es directamente proporcional al incremento de la cadena lateral del ligante aminoacidato, aunque no se encontró relación directa con la inhibición de la proliferación. Esto sugiere que los compuestos ternarios, Casiopeínas<sup>®</sup>, ingresan a la célula por difusión simple, sin embargo, se requieren estudios en presencia y ausencia de los transportadores responsables del ingreso de cobre a la célula para confirmar esta idea. La relación indirecta de la concentración de cobre y la inhibición de proliferación indica que el mecanismo de acción de estos compuestos podría ser independiente de las propiedades hidrofóbicas del complejo.

## II. ANTECEDENTES

El término cáncer se refiere a un grupo de padecimientos, producto de la proliferación anormal de una célula y cuyas células hijas han adquirido la habilidad de multiplicarse e invadir los tejidos circundantes debido a la reducción del control de su crecimiento y la alteración de las funciones celulares[15].

De acuerdo a datos de la OMS, a nivel mundial, el cáncer es una de las diez primeras causas de mortalidad. Se estima que en el 2004, 7.4 millones de personas murieron a causa de cáncer, de las cuales, el 14% padecían cáncer de mama y 11%, cáncer cérvico-uterino. En México, el cáncer representó en el 2005, la cuarta causa de mortalidad. Actualmente, el cáncer cérvico-uterino y el cáncer de mama representan el primer y segundo lugar de incidencia en mujeres, respectivamente; mientras que en hombres, el primer lugar lo ocupa el cáncer de próstata y el segundo, los cánceres de tráquea, bronquios y pulmones.[16]

**Figura 1:** Principales causas de mortalidad en México. OMS, 2005.



Existen diversos tratamientos para el cáncer, entre los cuales los principales son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, así como combinaciones de éstos. La quimioterapia incluye compuestos de origen orgánico como el Taxol y la Colchicina; y de origen inorgánico, siendo los compuestos de platino los más representativos. En este grupo se encuentran el Cisplatino (*cis*-diamino-dicloro-platino (II), *cis*-DDP), Carboplatino, Oxaliplatino y Nadoplatino. Los primeros dos están aprobados a nivel mundial, el tercero en algunos países y el cuarto, únicamente en Japón[17]. Este grupo de compuestos se han utilizado exitosamente en el tratamiento de algunos tumores como el cáncer de testículos[9]; sin embargo, también han presentado efectos adversos como disfunción renal, alergias, cambios degenerativos y necrosis.[18]

A partir del uso del cisplatino como agente anticancerígeno en 1971, se investigaron otros metales con propiedades antitumorales, y siendo los derivados de éste los más comunes. El mecanismo de acción de la actividad citotóxica de los metales se puede clasificar en cuatro grupos de acuerdo a [26]:

1. la preferencia de unirse a grupos sulfhidrilos,
2. características quelatantes,
3. comportamiento como cationes hidrofóbicos y,
4. la generación de especies reactivas.

El primer grupo se refiere ácidos blandos los cuales reaccionarán con bases blandas, S y Se. Son metales pesados de los periodos 5º y 6º de la Tabla Periódica. El segundo grupo comprende metales coordinados a ligantes con capacidad quelatante, cuya actividad antitumoral está dada, ya sea por la formación de aductos con biomoléculas (*cis*-DDP), intercambio del metal de la metaloenzima o abstracción total de éste. En el tercer grupo se encuentran complejos cargados positivamente cuyos ligantes son muy grandes e hidrofóbicos, obligando a la molécula a permanecer secuestrada en las membranas celulares, principalmente la mitocondrial, confiriéndole de esta forma cierta toxicidad selectiva. Finalmente, el último grupo consiste en complejos con metales que tienen la capacidad de participar en reacciones de óxido-reducción, como el Cu, Mn, V y Fe, entre otros, y por tanto, pueden generar el incremento de las especies intracelulares oxidantes como resultado de reacciones tipo Fenton, en las cuales se genera en presencia de Fe(II) radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) y ión hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . [19]

Desafortunadamente, la selectividad hacia células tumorales no es una característica intrínseca de este tipo de compuestos, por lo que la búsqueda de nuevas moléculas que presenten menor toxicidad hacia las células normales ha llevado a utilizar metales esenciales como el cobre, los cuales, si bien no carecen por completo de toxicidad, tienen la ventaja de que el organismo cuenta con sistemas de regulación que los mantienen dentro de niveles de concentración alrededor de  $10^{-15}\text{M}$ . [23]

## **El Cobre**

El cobre se encuentra en la superficie terrestre con una abundancia relativa de 68 ppm. Pertenece al grupo XI de la Tabla Periódica, con una configuración electrónica de  $[\text{Ar}]4s^23d^9$ . Los estados de oxidación del cobre pueden ser 0, I, II, III y IV. Los más abundantes en medios biológicos son el cobre(I) y el cobre(II), éste último es el más estable[20,21]. Los números de coordinación predominantes del cobre son 4, 5 y 6, con los que se forman estructuras que pueden ser de geometría cuadrada plana, pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada, como consecuencia del efecto Jahn-Teller, y bipirámide trigonal [22].

Desde el punto de vista bioinorgánico, el cobre es un metal esencial que se encuentra distribuido naturalmente en el cuerpo humano principalmente en el cerebro, riñón, corazón e hígado. Aunque su concentración dentro de las células no excede  $1 \times 10^{-15} \text{M}$ [23], el cobre es un metal muy importante para la función metabólica y fisiológica de las células. La primera con respecto a enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de energía (citocromo C oxidasa), respiración (hemocianina) y de óxido reducción (superóxido dismutasa)[24]. Con respecto al papel fisiológico, como secuestrante de radicales libres (*scavenger*), en el entrecruzamiento de elastina y colágeno y es promotor de la vascularización o angiogénesis.[23,25]

Como ya se ha mencionado, el uso del cobre como agente antitumoral se debe a que éste, al igual que el hierro, es capaz de

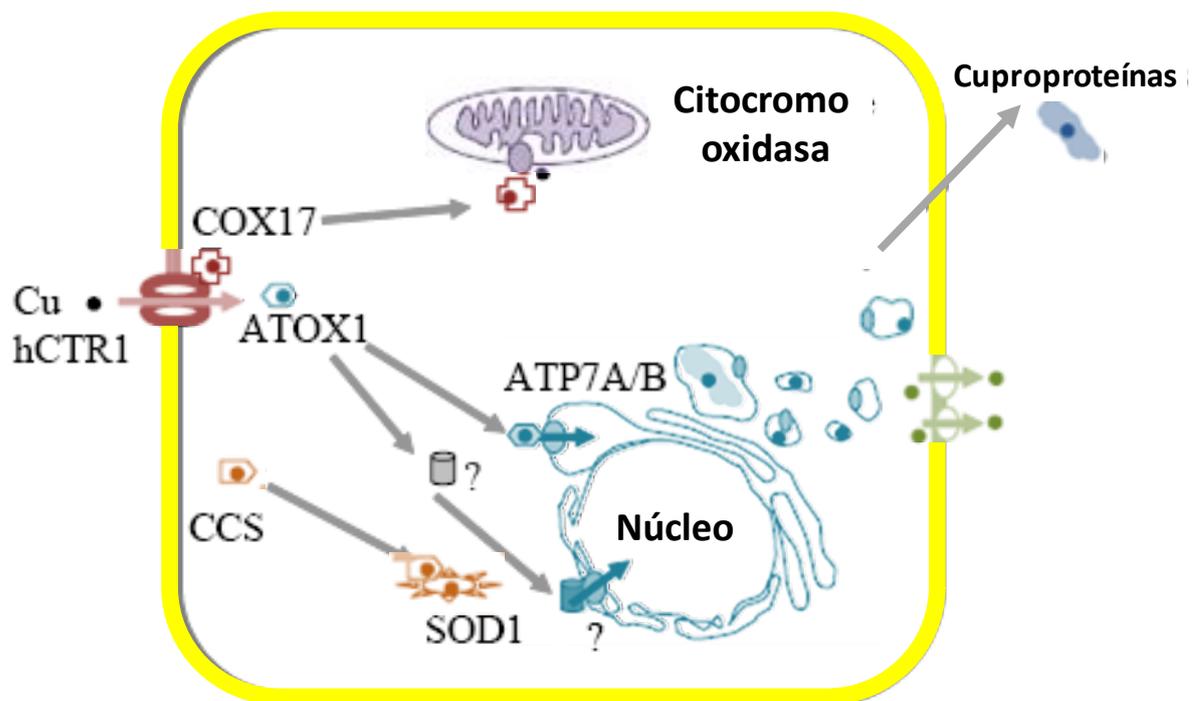
incrementar el estrés oxidativo de la célula[26,27], es decir, incrementar la concentración de especies oxidantes (especies reactivas de oxígeno, ROS) en la célula, por medio de una reacción tipo Fenton, catalizando el ciclo de Haber-Weiss (Tabla 1). Las especies oxidantes que resultan de estas reacciones, pueden reaccionar con lípidos, ADN y proteínas. El daño en estas moléculas representa el primer paso en mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento.[28]

**Tabla 1:** Vías de generación de especies oxidantes a través de la reacción de Fenton y el ciclo de Haber-Weiss.[29]

<i>Ciclo de Haber-Weiss</i>
$\text{H}_2\text{O}_2 + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^- + \text{H}^+$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$
<i>Reacción de Fenton</i>
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{3+}$
<i>Catálisis del Ciclo de Haber-Weiss</i>
$\text{H}_2\text{O}_2 + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^- + \text{H}^+$ $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{3+}$ <hr/> $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}^-$

La generación de ROS en células tumorales es considerada un buen mecanismo de acción en contra de este grupo de enfermedades debido a que este tipo de células presentan mayor sensibilidad al estrés oxidante [30,31], relacionado con una concentración de enzimas antioxidantes disminuida.[32]

Finalmente, cabe mencionar la homeostasis del cobre, la cual es regulada por los transportadores hCtr1 encargado de la captación de cobre (I), y las ATP-asas tipo P: ATP7A Y ATP7B, para su excreción. Una vez que ha ingresado a las células, es trasladado por medio de proteínas chaperonas hacia tres destinos: a la mitocondria por el transportador COX17[33]; para la formación de Superóxido dismutasa por CCS1 [34] y; al sistema *trans*-Golgi para su excreción por los sistemas ATP7A y ATP7B[35], (Figura 2). También, se ha encontrado que el cobre unido a aminoácidos, puede entrar por los transportadores específicos para estos últimos, distribuidos en las membranas. [36-38]

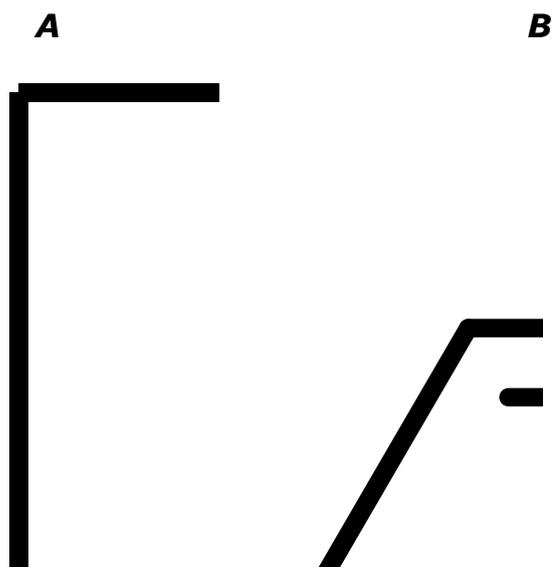


**Figura 2.** Homeostasis del cobre. El cobre es ingresado como cobre (I) por el transportador hCTR1. Posteriormente es llevado por proteínas chaperonas, COX17 y CCS1 para formar parte de enzimas como la SOD y la citocromo oxidasa, respectivamente. Finalmente será excretado por ATP7A y ATP7B. Adaptado y traducido de Safaei, R. (2006) [36].

Por otro lado, se tiene que considerar que existen mutaciones en los genes que codifican para ATP7A Y ATP7B, siendo éstas las responsables de las enfermedades de Wilson y Menkes, respectivamente. Estas mutaciones producen un desequilibrio en la exportación de cobre, seguido de una acumulación de cobre en hígado, cerebro y riñón, en caso de la enfermedad de Wilson, y en cerebro, para el caso de la enfermedad de Menkes.[39-41]

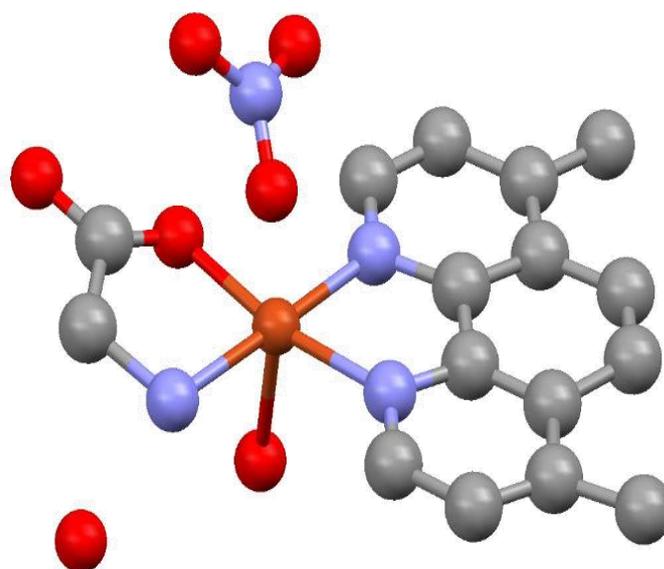
### ***Casiopeínas<sup>®</sup>***

Alrededor de los años setenta, se inició el proyecto "Casiopeínas<sup>®</sup>", en la Facultad de Química, encabezados por la Dra. Lena Ruiz Azuara y su equipo, quienes han sintetizado, caracterizado y patentado una serie de agentes antineoplásicos basados en quelatos mixtos de cobre (II) llamados Casiopeínas<sup>®</sup> [1,2], con fórmulas generales  $[Cu(N-N)(\alpha\text{-aminoacidato})]NO_3$  y  $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$ , donde el donador *N-N* es una diimina aromática sustituida (1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina) y el donador por oxígeno (*O-O*) es acetilacetato (*acac*) o salicilaldehidato (*salal*) (Figura 3). Los objetivos de este proyecto incluyen disminuir el costo en terapias para el cáncer, la toxicidad que se presentan con otros compuestos y principalmente, generar quimioterapia nacional.



**Figura 3.** Ejemplos de Casiopeínas variando los ligantes primarios y secundarios. En A  $[\text{Cu}(4,4\text{-bipiridina})(\text{acetilacetionato})]^+$ ; en B,  $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{glicinato})]^+$

En Rayos X de monocristal, se observa que este tipo de compuestos tiene geometría de pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada con una molécula de agua en la posición apical, como se observa en la Figura 4 [42,43].



**Figura 4:** Casiopeína II-gly [42]  
 $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$

Actualmente, se han sintetizado más de 100 Casiopeínas, las cuales se dividen en diferentes grupos, de acuerdo a los ligantes que presenten en su estructura, como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2:** Clasificación de las Casiopeínas®

<b>Familia</b>	<b>Fórmula General</b>
<b>Casiopeína I</b>	$[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-}1,10\text{-fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
<b>Casiopeína II</b>	$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-}1,10\text{-fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
<b>Casiopeína III-a</b>	$[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$
<b>Casiopeína III-s</b>	$[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{salal})]\text{NO}_3$
<b>Casiopeína IV</b>	$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-}2,2'\text{-bipiridina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
<b>Casiopeína V</b>	$[\text{Cu}(5\text{-NO}_2\text{-}1,10\text{-fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
<b>Casiopeína VI</b>	$[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-}1,10\text{-fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
<b>Casiopeína VII</b>	$[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
<b>Casiopeína VIII</b>	$[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-}1,10\text{-fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
<b>Casiopeína IX</b>	$[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$

El diseño de las Casiopeínas® toma en consideración ligantes que le brinden al cobre la posibilidad de producir citotoxicidad por medio de diferentes mecanismos de acción, de manera que están consituidos por: una diimina sustituida y un ligante donador de electrones por N-O u O-O. En el caso del cobre, se sabe que éste es un metal que participa en diversos procesos biológicos[21,23,24], sin embargo, esto no lo exime de presentar efectos tóxicos, entre los que destaca la generación de ROS[27,44], las cuales pueden causar daño a través de la oxidación de los componentes celulares, alterar el balance redox en la célula o interferir con los mecanismos de señalización celular relacionados con el estado redox [26,27]. Por otra parte, los ligantes modifican las propiedades de transporte del cobre catiónico, las propiedades electrónicas del metal central y el reconocimiento molecular. Las 1,10-fenantrolinas (*phen*) y 2,2'-

bipiridinas (*bpy*) sustituidas son ligantes bidentados donadores por nitrógeno con gran afinidad por el cobre [45-47] y que, gracias al sistema de anillos aromáticos en su estructura pueden, en su forma libre o bien como complejos metálicos, unirse al ADN mediante interacciones intercalantes y no intercalantes [26,48]. Por otra parte, los  $\alpha$ -aminoácidos fueron seleccionados como ligantes secundarios debido a su baja toxicidad y a su elevada afinidad por complejos Cu(II)-*bpy* o Cu(II)-*phen* [49,50]. Finalmente los ligantes *salal* y *acac* tienen también buena afinidad por complejos (N-N) cobre (II)[50], así como modular las propiedades redox del centro metálico. Estas propiedades conferidas por los ligantes que los conforman, les permitirán a los complejos generar una respuesta citotóxica y posiblemente, una actividad antitumoral. Todo esto a través de varios posibles mecanismos entre los cuales se incluyen la generación de ROS, resultado de la reducción del átomo de cobre por moléculas intracelulares como glutatión y ácido ascórbico, entre otras; la interacción directa con el ADN a través de la intercalación de la fenantrolina, formación de aductos por sustitución del ligante secundario, e incluso toxicidad mitocondrial debido a su comportamiento como iones lipofílicos.

Aunque aún no está completamente claro el mecanismo de acción de estos complejos, existe evidencia que sugiere que los principales sitios de acción son el núcleo y/o la mitocondria. Sin embargo, la presencia de citotoxicidad por exposición de estos compuestos en eritrocitos[51], células que carecen de ambos organelos, genera la interrogante de la existencia de otros blancos celulares.

Entre las evidencias que se tienen para intentar establecer el mecanismo de acción, se incluyen:

- 1) Disminución de las especies antioxidantes como glutatión oxidado debido al incremento en las ROS en células de la línea tumoral HeLa[52], las cuales aumentan en presencia de un agente reductor como ácido ascórbico. También se encontró que este incremento de ROS es concomitante con apoptosis.
- 2) Interferencia en la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa en mitocondria.[53] Se ha encontrado que las CasII-gly y CasIII-ia [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acac)]NO<sub>3</sub> desacoplan la cadena respiratoria, inhiben la producción de ATP, modifican el potencial de la membrana mitocondrial y facilitan la liberación de citocromo c, produciendo eventualmente apoptosis, la cual se ha encontrado ya sea por mecanismos tanto dependientes como independientes de caspasas.[6]
- 3) Fragmentación de ADN y apoptosis. Al exponer al ADN a CasII gly, los resultados muestran degradación de ésta, la cual se ve incrementada cuando se agrega ácido ascórbico como agente reductor. Este daño no se ve disminuido en presencia de SOD, sin embargo sí en presencia de catalasa, lo que sugiere que sí hay producción de OH<sup>·</sup>[54]; mientras, la presencia de un potente secuestrante de ROS, N-acetil-L-cisteína, disminuyó la apoptosis de células de glioma C6 y las detuvo en la fase del ciclo celular G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. [6,54]

4) Interacción con el ADN. Rivero Muller y colaboradores. (2007)[54] sugieren la formación de los complejos ADN-Casiopéina<sup>®</sup>, sin embargo, aún no se ha establecido si esta interacción es debido a una intercalación directa, intercalación no clásica en los surcos del ADN, o la formación de aductos.

En conclusión, la actividad biológica de estos compuestos podría ser consecuencia de uno o varios de los mecanismos de acción descritos anteriormente. En estudios QSAR realizados previamente en el grupo de trabajo con compuestos  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$ , se encontró una correlación significativa entre la inhibición de la proliferación celular evaluada *in vitro* y el carácter redox de la molécula, expresado como el  $E_{1/2}$  de la pareja  $\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{I})$ , el cual está influido principalmente por el ligante diimina. Este hallazgo apoya la hipótesis acerca de la generación de ROS como parte del mecanismo de acción. En este mismo estudio se propuso que las propiedades hidrofóbicas podrían influir en menor proporción en la actividad antiproliferativa, sin embargo, los resultados no permitieron establecer claramente el grado de ésta sobre la actividad biológica y la participación de cada uno de los ligantes en esta propiedad fisicoquímica[8]. Considerando que el cobre puede ser reconocido y transportado por hCtr1 sólo cuando se encuentra libre y como  $\text{Cu}(\text{I})$ , se espera que estos compuestos se transporten a través de la membrana por otro sistema. Es por eso, que en el presente trabajo se busca determinar la relación entre las modificaciones estructurales de las Casiopéinas<sup>®</sup> y su capacidad de ingresar a la célula.

### III. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales tratamientos contra el cáncer es la quimioterapia, la cual está dividida en compuestos de origen orgánico e inorgánico. Dentro de éstos últimos, el tratamiento más empleado es el cisplatino, el cual ha demostrado su eficacia en el cáncer de los ovarios y los testículos.[9,10]. Sin embargo, la resistencia de algunos tumores al cisplatino[11,12] y a sus derivados, sumado a su elevada toxicidad en funciones biológicas, entre las cuales se encuentra la función renal[13,14] ha llevado a la búsqueda de nuevas moléculas que representen mejores opciones terapéuticas para combatir esta enfermedad. Tal es el caso de las Casiopeínas<sup>®</sup>, las cuales son compuestos de coordinación a base de cobre coordinado a una fenantrolina o a una bipyridina y a un donador de electrones por oxígeno y nitrógeno (acetilacetato, salicilaldehidato) o por oxígeno y nitrógeno (aminoácidos).  $[Cu(N-N)(\alpha-N-O)]NO_3$  y  $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$

Los estudios previos de Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR) revelaron que dentro de este grupo de compuestos, poseen mejor actividad cuando: presentan el anillo central de la fenantrolina, su potencial de media onda es más reductor y su carácter hidrofóbico es mayor[8]. Por lo tanto, en este trabajo se seleccionó como variante estructural el incremento de la cadena lineal alifática del aminoácido, la cual incrementará la hidrofobicidad de la molécula, facilitando en principio, la entrada del complejo al interior de la célula, por transporte no regulado.

## **IV. HIPÓTESIS**

El transporte de las moléculas a través de la membrana está influenciado por sus características fisicoquímicas como el tamaño, la carga y propiedades hidrofóbicas de la molécula. Si el complejo ingresa a la célula a través de difusión simple, el incremento de la hidrofobicidad del ligante secundario, como consecuencia la elongación de la cadena lateral del aminoácido, facilitará su transporte al interior de la célula del compuesto y, por tanto, se observará un incremento de la concentración intracelular de cobre.

## V. OBJETIVOS

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la influencia de la hidrofobicidad del ligante aminoacidato de la familia II de las Casiopeínas<sup>®</sup> en su transporte a través de la membrana de células de la línea tumoral HeLa, y analizar si existe relación con la actividad antiproliferativa en la misma línea celular.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la concentración inhibitoria del 50% de la población a las 24 horas (CI<sub>50</sub>) de los siguientes compuestos puros en cultivos celulares de la línea tumoral HeLa.
  1. Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
  2. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
  3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
  4. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α-glicinato)] NO<sub>3</sub>
  5. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α-alaninato)] NO<sub>3</sub>
  6. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α-aminobutarato)] NO<sub>3</sub>
  7. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α-nornorvalinato)] NO<sub>3</sub>
  8. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α-norleucinato)] NO<sub>3</sub>

- Estandarizar la metodología necesaria para cuantificar la concentración de cobre intracelular por absorción atómica.
- Cuantificar la concentración intracelular de cobre por absorción atómica en cultivos de células HeLa expuestos a cinco Casiopeínas<sup>®</sup>, así como a  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cu}(\text{phen})^{2+}$ ,  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$
- Analizar la relación entre la concentración de Cu intracelular y la actividad antiproliferativa en células HeLa.

## VI. MATERIAL Y MÉTODO

### *Diseño Experimental*

Como ya se ha mencionado, la familia de compuestos Casiopeínas<sup>®</sup> ha sido estudiada en diversos modelos *in vivo* e *in vitro*[5-7][54-59]. Las variaciones estructurales presentes en este tipo de compuestos y la existencia de descriptores fisicoquímicos permitió desarrollar un estudio QSAR[8], a partir del cual se pudo seleccionar una molécula con posibilidades de alcanzar las etapas clínicas en el desarrollo de fármacos, así como apoyar la hipótesis sobre los mecanismos de acción y otras actividades. Del trabajo de Bravo y colaboradores (2009)[8], surge la hipótesis del papel que desempeña el ligante secundario en esta familia de compuestos como contribuyente en el ingreso de la molécula a la célula, y/o en su distribución, una vez que ésta ha sido absorbida. Para establecer la influencia del ligante secundario de la familia de compuestos "Casiopeínas<sup>®</sup>" en la actividad antiproliferativa se seleccionaron seis compuestos con las siguientes características: a) 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina como ligante diimina, ya que de acuerdo al estudio QSAR antes mencionado, los compuestos con este ligante presentaron las mejores actividades en la línea tumoral HeLa; b) que el ligante secundario fuera un aminoácido alifático con cadena lateral lineal, de manera que el incremento en ésta, influyera únicamente en la hidrofobidad de la molécula (Figura 4).

<b>Donde R:</b>	<b>Residuo del aminoácido:</b>	<b>Clave de la Casiopeína®</b>
-H	Glicina	CasII-gly
-CH <sub>3</sub>	Alanina	CasII-ala
-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Ácido aminobutírico	CasII-ab
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Norvalina	CasII-norval
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Norleucina	CasII-norleu

**Figura 1:** Compuestos ternarios evaluados en este trabajo.  
Fórmula general: [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)(H<sub>2</sub>O)<sub>x</sub>]NO<sub>3</sub>.

Estos compuestos fueron evaluados por medio del método de inhibición de la proliferación celular y tinción con sulforhodamina B descrito por Skehan[60] para determinar la CI<sub>50</sub> a las 24 h. Posteriormente se llevó a cabo el montaje de la técnica para la determinación de cobre intracelular por absorción atómica y así establecer número de células/pozo óptimos, selección de la técnica adecuada para determinación de proteínas, tiempo ideal de exposición de células a los compuestos y finalmente, volumen de buffer de lisis y volumen de HNO<sub>3</sub> adecuados.

Para relacionar que los cambios en la actividad antiproliferativa y en la entrada de cobre le sean atribuidos únicamente a la presencia del ligante aminoacidato, se determinó la concentración intracelular de cobre en ausencia y presencia del ligante diimina:  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cu}(\text{phen})^{2+}$  y  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ .

El análisis se llevó a cabo a partir de dos experimentos independientes: a) Evaluación de la inhibición de la proliferación celular y b) Cuantificación de la concentración intracelular de cobre. A partir de los resultados obtenidos, se compararon la concentración de cobre en las células después de 15 minutos de exposición a los compuestos, con la  $\text{CI}_{50}$  y con el log P de los aminoácidos. También se analizó la concentración de cobre con respecto al tiempo entre 0 y 20 minutos de exposición y la variación de la concentración intracelular en función de los ligantes coordinados al cobre.

#### *a. Evaluación de la inhibición de la proliferación celular*

Consiste en determinar la  $\text{CI}_{50}$  de los compuestos, la cual es la concentración a la que se inhibe la proliferación celular en un 50% con respecto al control negativo. El procedimiento es el siguiente:

Se sembraron  $2 \times 10^4$  células HeLa (ATCC) por pozo en una microplaca de 96 pozos (Costar<sup>®</sup>) en presencia de medio D-MEM (Gibco) adicionado con 10% de SFB (Gibco), y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, el medio de cultivo se aspiró y se agregaron 90  $\mu\text{L}$  de medio D-MEM y 10  $\mu\text{L}$  de la solución de prueba por pozo (concentraciones finales: 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Las soluciones de prueba para cada compuesto se prepararon 10 veces más concentradas en agua destilada y se filtraron para retirar impurezas antes de la administración en filtros millipore de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. La adición de los compuestos se realizó por triplicado y los resultados se reportan como el promedio de tres repeticiones independientes. Las placas se incubaron durante 24 horas a las mismas condiciones de temperatura y atmósfera. Pasado el tiempo de incubación se aspiró nuevamente el medio de cultivo y se adicionaron 200 $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 10% (Baker) en cada pozo. Las placas se incubaron a 4°C durante una hora para fijar las células. Los residuos de ácido tricloroacético fueron lavados 3 veces con agua.

La proliferación celular se determinó realizando una tinción con 100  $\mu\text{L}$  de sulforhodamina B (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos, después de los cuales se retiró el colorante y se lavó cuatro veces con 100  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial, para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de tris base (Sigma-Aldrich) 20mM, pH=10.5. La cantidad de colorante incorporado se determinó mediante la absorbancia de cada pozo a 564 nm (Microplate reader BIORAD 550). El porcentaje de crecimiento celular para cada concentración se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \textit{proliferación} = 100 - \left[ 100 * \left( \frac{T}{C} \right) \right]$$

Donde T es la absorbancia de los pozos tratados y C es la absorbancia de los pozos no tratados. El análisis estadístico para realizar el cálculo de la  $\text{CI}_{50}$  se realizó empleando la prueba estadística de análisis de sobrevivencia PROBIT [61], el cual es un

método paramétrico para estimar la relación dosis-respuesta de un compuesto o sustancia.

### *b. Cuantificación de cobre intracelular*

Se realizaron ensayos para implementar y optimizar el método para la determinación de cobre intracelular total, como parámetro de referencia de la entrada de los complejos a la célula. Entre las evaluaciones que se consideran se tienen: 1) la determinación de concentración de proteína, 2) el volumen de solución amortiguadora de lisis para la recuperación de la proteína y 3) el tiempo de exposición de las células a los compuestos, de manera que se tuvieran resultados que pudieran justificar la citotoxicidad de los compuestos.

#### 1) Determinación de la concentración de proteína.

La determinación de proteína se llevó a cabo con el *kit* DC de BioRad, el cual es un método colorimétrico compatible con detergentes. La reacción está basada en el ensayo de Lowry[62], en el cual, tartrato de cobre reacciona con las proteínas. Posteriormente se agrega el reactivo de *Folin-Ciocalteu* (ácido fosfomolibdotúngstico), siendo éste el responsable del color al reaccionar principalmente con residuos fenólicos de los aminoácidos tirosina y triptófano. A diferencia del ensayo de Lowry, éste *kit* contiene un tensoactivo no especificado por el fabricante (reactivo S) para solubilizar los detergentes presentes en la matriz de las

muestras. Este tensoactivo se mezcla con el tartrato de cobre en una relación de 20  $\mu\text{L}$  en 1mL. Esta mezcla se hace únicamente cuando los detergentes pueden interferir en la determinación, como fue el caso de la solución amortiguadora, la cual contenía SDS y Tritón X-100 al 0.1 y 1%, respectivamente.

Para llevar a cabo la reacción, a 100  $\mu\text{L}$  de la muestra, se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla tartrato de cobre/reactivo S y 4mL del reactivo de *Folin-Cicalteu*. La mezcla se agitó y se dejó reposar 15 minutos, tras los cuales se midieron por espectrofotometría UV-visible a 750 nm. Los valores de las muestras se compararon con una curva patrón sugerida por el fabricante, que comprendía concentraciones de albúmina bovina (Research Organics, libre de ARN-asas, ADN-asas y proteasas, grado biología molecular) entre 0.3 y 1.5 mg/mL.

Entonces se realizaron ensayos para determinar la cantidad de células necesaria en los pozos que fuese cuantificable con respecto a la curva patrón del *kit* para la determinación de proteína: en una placa de 12 pozos se probaron las siguientes concentraciones: 0.2, 1, 5 y  $8 \times 10^5$ , 1 y  $1.5 \times 10^6$  células por pozo, recuperadas en 2 mL de solución amortiguadora de lisis (NaCl 150 mM, EDTA 1mM, SDS 0.1%, Triton X-100 1%, Tris HCl 50 mM pH 7.4, PMSF 1mM). Se realizó una segunda prueba con  $1.5 \times 10^6$  y se incluyeron pozos con  $2 \times 10^6$  células, pero esta vez se recuperaron en un 1 mL. Del volumen recuperado se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se cuantificó la proteína con el método antes descrito.

## 2) Determinación del volumen de solución amortiguadora de lisis para disolver la proteína.

Se realizó un ensayo para establecer el volumen óptimo de solución amortiguadora de lisis, en el cual disolver la proteína para su cuantificación, por lo que en una placa de 12 pozos se proliferaron  $1.5 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  células por pozo durante 48 horas, tras las cuales se disolvieron en 0.5 y 1 mL de solución amortiguadora de lisis. De cada pozo se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se cuantificó la proteína con el método antes descrito.

## 3) Determinación del tiempo óptimo de exposición de los compuestos.

En una placa de 12 pozos, se cultivaron durante 48 horas células de la línea tumoral HeLa, hasta una concentración aproximada de  $2 \times 10^6$  células por pozo en medio D-MEM, tras los cuales se les retiró el medio y se agregaron 2.7 mL de medio nuevo y 0.3 mL del compuesto a evaluar durante 0, 5, 10, 15 y 20 min. Al finalizar los diferentes tiempos de exposición, se retiró el medio y los pozos se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos 20  $\mu\text{M}$  y pH de 7.4 en frío. Las células fueron re-suspendidas en la solución amortiguadora de lisis, con ayuda de *cell lifters* (Corning Incorporated Costar<sup>®</sup>). Finalmente las células se dividieron en dos fracciones: 1) 100  $\mu\text{L}$  que se usaron en la determinación de proteínas y 2) 300  $\mu\text{L}$  que se usaron para la cuantificación de cobre por absorción atómica (Varian Spectr AA 220 acoplado a horno de grafito GTA 110). La cuantificación de cobre se llevó a cabo previa digestión con  $\text{HNO}_3$

suprapuro concentrado (Merck), y dos horas de calentamiento en horno de microondas (CEM, modelo MDS 2000). Se realizó una curva de calibración para la cuantificación de cobre, con un estándar preparado de cobre de 100  $\mu\text{g/mL}$  High Quality Standards, en  $\text{HNO}_3$  suprapuro al 2%.

Los resultados se muestran en %Cu, el cual es la relación entre la concentración de Cu en partes por billón (ppb) con respecto a la concentración de cobre obtenida en el control por cien.

$$\%Cu = \frac{T}{C} \times 100$$

Donde T es la concentración de cobre por miligramo de proteína de las muestras tratadas y C es la concentración de cobre por miligramo de proteína de las muestras no tratadas.

## VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### a. Ensayo de la inhibición de la proliferación celular

Se determinó la  $CI_{50}$  a las 24 horas de exposición para todos los compuestos en la línea tumoral Hela de acuerdo al método descrito por Skehan[60]. Los resultados se muestran en la Tablas 3 para los controles estructurales y en la Tabla 4, para las Casiopeínas<sup>®</sup>.

**Tabla 1:**  $CI_{50}$  del  $Cu(NO_3)_2$ ,  $Cu-(phen)^{2+}$  y  $Cu-(phen)_2^{2+}$ .

#	Compuesto Nombre	$CI_{50}$ , $\mu M$ ( $\sigma$ )
1	$Cu(NO_3)_2$	11.73* (0.72)
2	$Cu(phen)^{2+}$	1.91* (0.019)
3	$Cu(phen)_2^{2+}$	0.90* (0.043)

\*  $p= 0.05$  (denota diferencia significativa de acuerdo a la distribución  $\chi^2$ )

En la Tabla 3, se observa que los compuestos  $Cu-(phen)^{2+}$  y  $Cu-(phen)_2^{2+}$  son, respectivamente, entre seis y trece veces más activos que el  $Cu(NO_3)_2$ , siendo el  $Cu(phen)_2^{2+}$  el más tóxico y lipofílico de los tres compuestos. Este incremento en la actividad de  $Cu(phen)_2^{2+}$  podría deberse a un incremento en la disponibilidad del compuesto en la célula como consecuencia de su ingreso más eficiente a través del transporte no regulado favorecido por el incremento de lipofilidad que le proporciona la diimina.

**Tabla 2:**  $CI_{50}$  de las Casiopeínas<sup>®</sup> incluidas en este estudio y log P de los aminoácidos presentes en los compuestos ternarios. Se consideró únicamente el log P del aminoacidato como una forma de estimar la lipofilidad de la molécula porque el resto de la molécula se mantiene constante.

#	Compuesto Nombre	$CI_{50}$ , $\mu M$ ( $\sigma$ )	Log P aa
4	CasII gly	1.33* (0.044)	-1.03
5	CasII ala	1.90 (0.079)	-0.68
6	CasII ab	1.72* (0.075)	-0.15
7	CasII norval	1.74 (0.078)	0.38
8	CasII norleu	1.33* (0.051)	0.91

\*  $p = 0.05$  (denota diferencia significativa de acuerdo a la distribución  $\chi^2$ )

Como se observa en la Tabla 4, no existe una relación directa entre la inhibición de la proliferación y el incremento de la cadena lateral del ligante aminoacidato y/o la lipofilidad de los compuestos ternarios "Casiopeínas<sup>®</sup>".

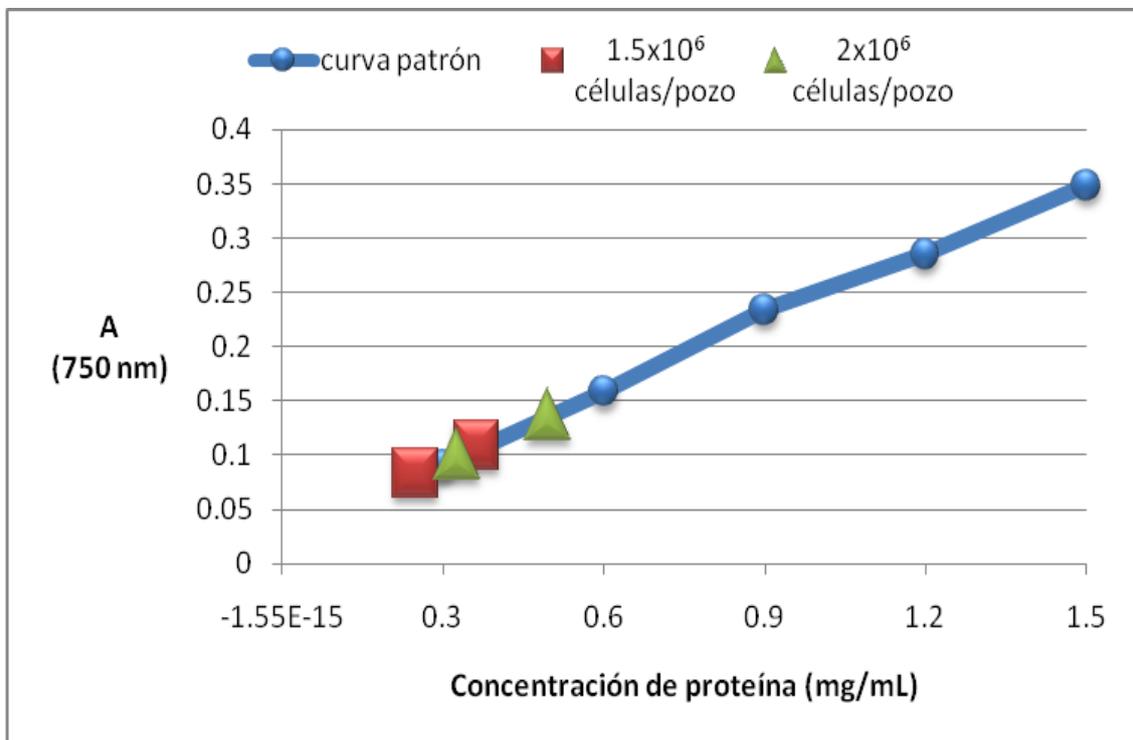
## **b. Condiciones experimentales para la Cuantificación de cobre intracelular en la línea tumoral HeLa.**

Para lograr que la cuantificación de cobre por absorción atómica se llevara a cabo en un intervalo de concentración de cobre superior al límite de detección de la técnica, se realizaron ensayos para determinar las condiciones óptimas de cada una de las variables. De esta forma se consideraron las siguientes variables críticas para el ensayo: 1). el número de células requeridas por pozo en la placa, 2) la concentración a administrar de los compuestos, 3) el tiempo de exposición y 4) el volumen de solución amortiguadora de lisis adecuados para la determinación de proteínas y la cuantificación de cobre.

- 1) Determinación del número de células por pozo y volumen de buffer de lisis.

La elección del número de células en cada pozo de la placa, se estableció a partir de los límites de detección del *kit* DC de BioRad para cuantificar la concentración de proteína presente. Se estableció que la suspensión celular produjera una absorbancia a 750 nm entre 0.2 y 0.3, correspondiente a 7.5 y 1.2 mg/mL de proteína, respectivamente de acuerdo a la curva patrón propuesta por el fabricante.

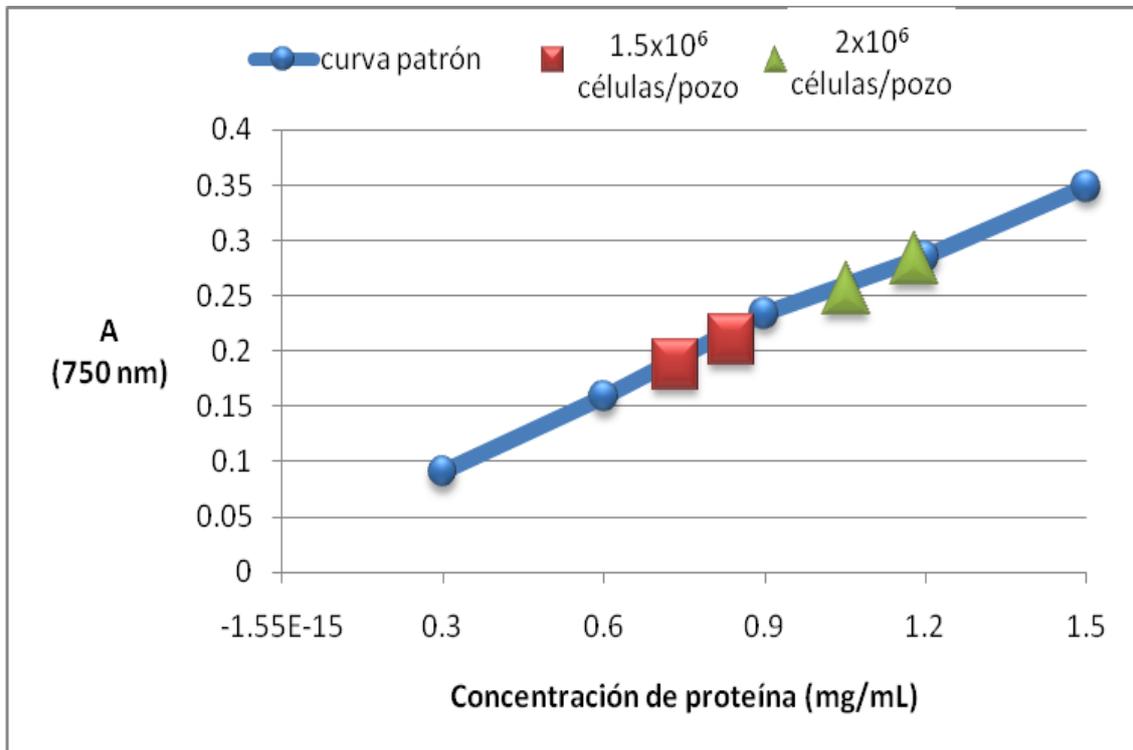
En un primer ensayo, se evaluó la concentración de proteína cuando se siembran  $1.5$  y  $2 \times 10^6$  células por pozo y se recolectan en 1mL de buffer. Los resultados se muestran en la Gráfica 1.



**Gráfica 1:** Curva estándar de la determinación de proteínas. Los triángulos representan a los pozos con  $2 \times 10^6$  células por pozo, mientras que los cuadrados representan los pozos con  $1.5 \times 10^6$  células, ambas concentraciones celulares recolectadas en 1 mL de solución amortiguadora de lisis.

Como se puede observar en la Gráfica 1, ambas concentraciones de proteína se pueden interpolar en la curva patrón; sin embargo, la respuesta es muy baja y por debajo de los límites que previamente establecimos como aceptables (0.2-0.3). Este tipo de respuesta tan baja en el espectrofotómetro disminuye la sensibilidad del método, por lo que se prefirió incrementar la concentración de proteína al disminuir a la mitad el volumen de

solución amortiguadora de lisis. Los resultados se muestran en la Gráfica 2.



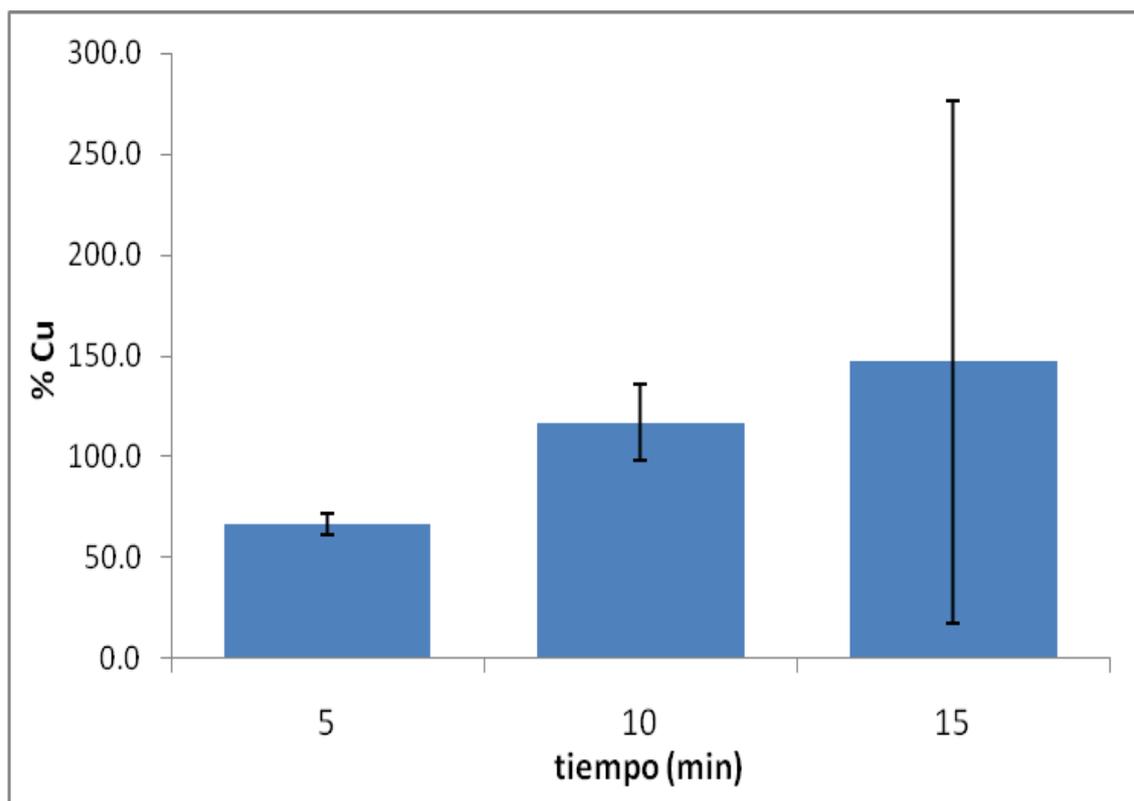
**Gráfica 2:** Curva estándar de proteína. Los triángulos representan a los pozos con  $2 \times 10^6$  células, mientras que los cuadrados representan los pozos con  $1.5 \times 10^6$  células, en ambos casos la proteína se recuperó del pozo en 0.5 mL de solución amortiguadora de lisis.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió utilizar una concentración de  $2 \times 10^6$  células por pozo y recolectar las células en 0.5 mL de buffer de lisis, ya que se encontró que estas condiciones permiten obtener respuestas en el espectro que varían entre 0.25 y 0.30.

2) Determinación del tiempo de exposición de los compuestos de cobre en  $2 \times 10^6$  células.

Posteriormente, se realizaron pruebas para elegir la concentración de los compuestos a administrar en los pozos que permitiría cuantificar cobre por encima del límite de detección del equipo (Varian Spectr AA 220 acoplado a horno de grafito GTA 110). En este punto debe mencionarse que debido a que estos compuestos son citotóxicos, la concentración a administrar del compuesto no puede ser muy elevada ya que provocaría la muerte del cultivo celular, y nuestro interés se centra en cuantificar el cobre presente intracelularmente como consecuencia de la administración de estos compuestos.

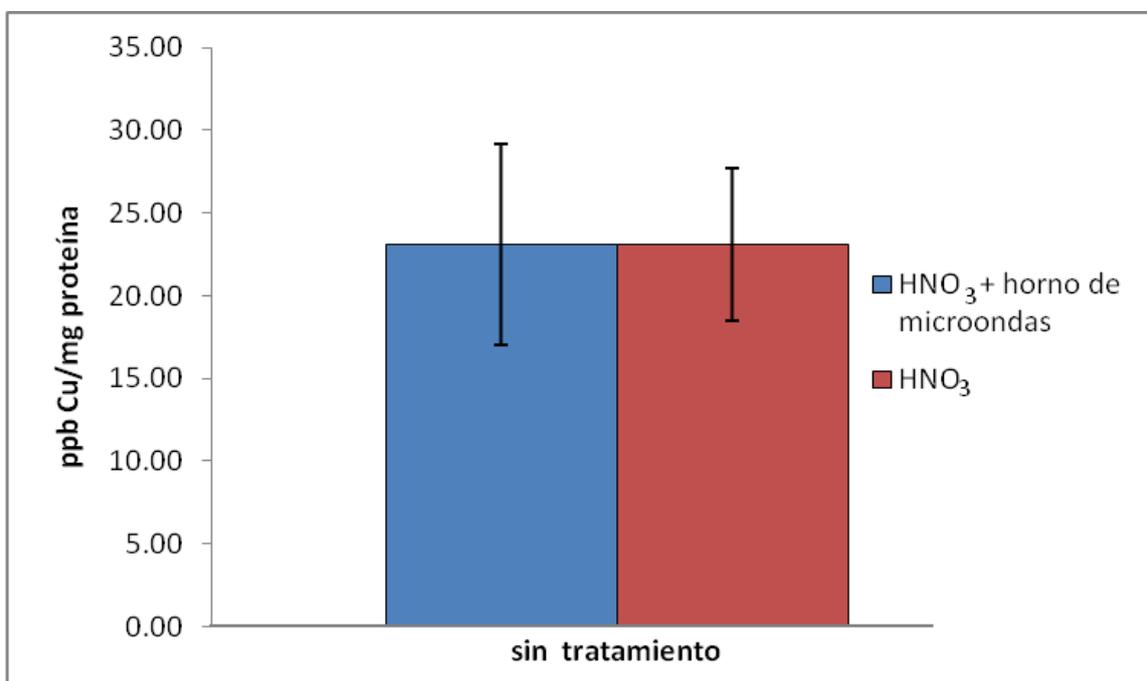
En base a lo anterior, se realizó un primer ensayo empleando CasII gly  $20 \mu\text{M}$  con un tiempo de exposición de 5, 10 y 15 min, cada prueba con su respectivo control de células sin tratamiento. La digestión se realizó con  $\text{HNO}_3$  ultrapuro concentrado (Gráfica 3).



**Gráfica 3.** Porcentaje de cobre con respecto al control negativo a los diferentes tiempos de exposición, CasII gly. El ensayo se realizó por triplicado empleando aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/pozo.

En la Gráfica 3, se observa que existe una relación directamente proporcional entre el tiempo de exposición a CasII gly, y el %Cu con respecto al control negativo sin embargo, a los 5 min la muestra presentó un %Cu menor al del control, por lo que se decidió en los ensayos posteriores incrementar el tiempo a 20 min de exposición. A su vez, la variación encontrada entre las muestras a los 15 minutos es muy grande y no permite establecer si la diferencia con respecto a los otros dos tiempos es significativa. Este fenómeno se presentó en varios experimentos posteriores lo que nos llevó a suponer que la digestión celular podría no ser completa empleando solamente  $\text{HNO}_3$  concentrado.

Para establecer si la digestión por microondas en presencia de  $\text{HNO}_3$  es necesaria se cuantificó la concentración de cobre en células HeLa sin tratamiento, las cuales se dividieron en dos fracciones: en la primera, la digestión se realizó en horno de microondas en presencia de  $\text{HNO}_3$ , mientras que la segunda fracción se digirió únicamente con el  $\text{HNO}_3$  durante el tiempo entre su recolección y su cuantificación. Los resultados se muestran en la Gráfica 4.

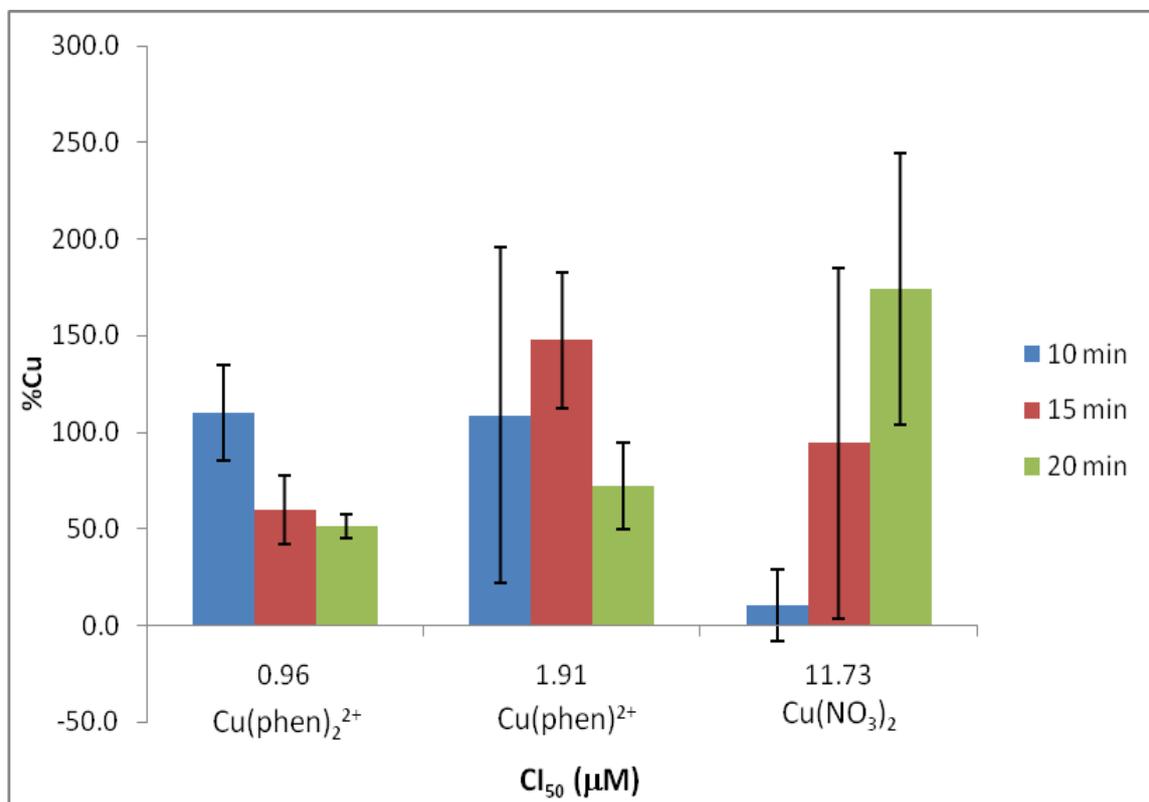


**Gráfica 4:** ppb de cobre intracelular por mg de proteína. En azul la fracción digerida con microondas en presencia de  $\text{HNO}_3$ ; y en rojo la fracción digerida en presencia de  $\text{HNO}_3$  solamente.

Como se puede observar en la Gráfica 4, las muestras sin tratamiento presentaron concentraciones de cobre iguales, y aunque la variación no mejoró mucho con o sin digestión, se eligió digerir las muestras en el horno de microondas para asegurar que todas las muestras recibieran un tratamiento más homogéneo.

### 3) Cuantificación de cobre intracelular en la línea tumoral HeLa.

Una vez establecidas las condiciones experimentales se procedió a cuantificar el cobre intracelular en los cultivos expuestos a los diferentes compuestos en una concentración en pozo de  $20\mu\text{M}$  empleando 3 tiempos de exposición (10, 15 y 20 minutos).

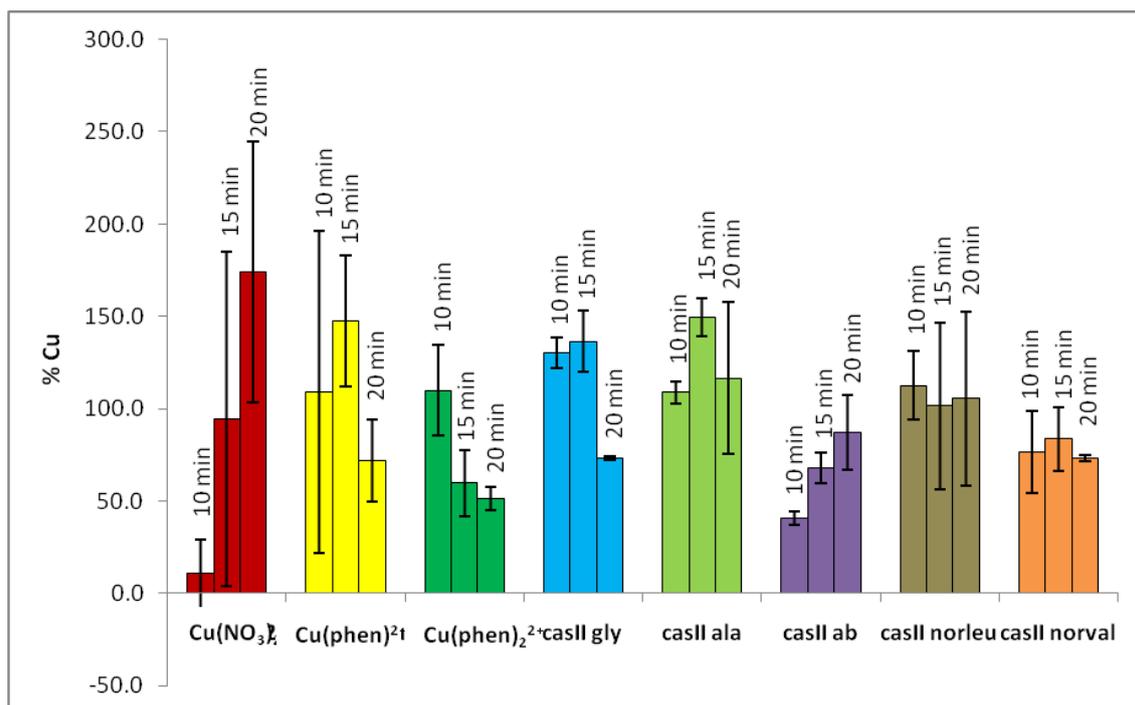


**Gráfica 5:** %Cu vs CI<sub>50</sub> de los controles estructurales.

En la gráfica 5 se muestran los resultados para los controles estructurales, estos resultados revelaron que existe variación en el patrón de ingreso de cobre con respecto al tiempo. En esta gráfica se pueden observar en el eje de las abscisas las CI<sub>50</sub> de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

$\text{Cu}(\text{phen})^{2+}$  y  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ ; a medida que el compuesto es más tóxico, el máximo de concentración se alcanza en menor tiempo. Para el  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ , el máximo se encuentra a los 10 min, para el  $\text{Cu}(\text{phen})^{2+}$  a los 15 y finalmente para el  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , a los 20 minutos. Esta tendencia puede explicarse a partir de la hidrofobicidad del compuesto, mientras más hidrofóbico es, más rápido ingresa a la célula, y por tanto, el pico máximo de concentración cobre intracelular se alcanza en menor tiempo.

Se considera que la hidrofobicidad de los complejos  $\text{Cu}(\text{phen})(\text{a.a.})^+$  se encuentra entre los valores de  $\text{Cu}(\text{phen})^{2+}$  y  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ . Debido a que en la gráfica 5 se observa que el pico máximo de concentración se alcanza entre los 10 y 15 minutos, para ambos complejos, y posteriormente comienza el regreso de esas concentraciones de cobre intracelular hacia valores similares al control, se decidió realizar una cinética de absorción de cobre con tiempos entre 10 y 20 minutos de exposición para todos los compuestos (Gráfica 6).



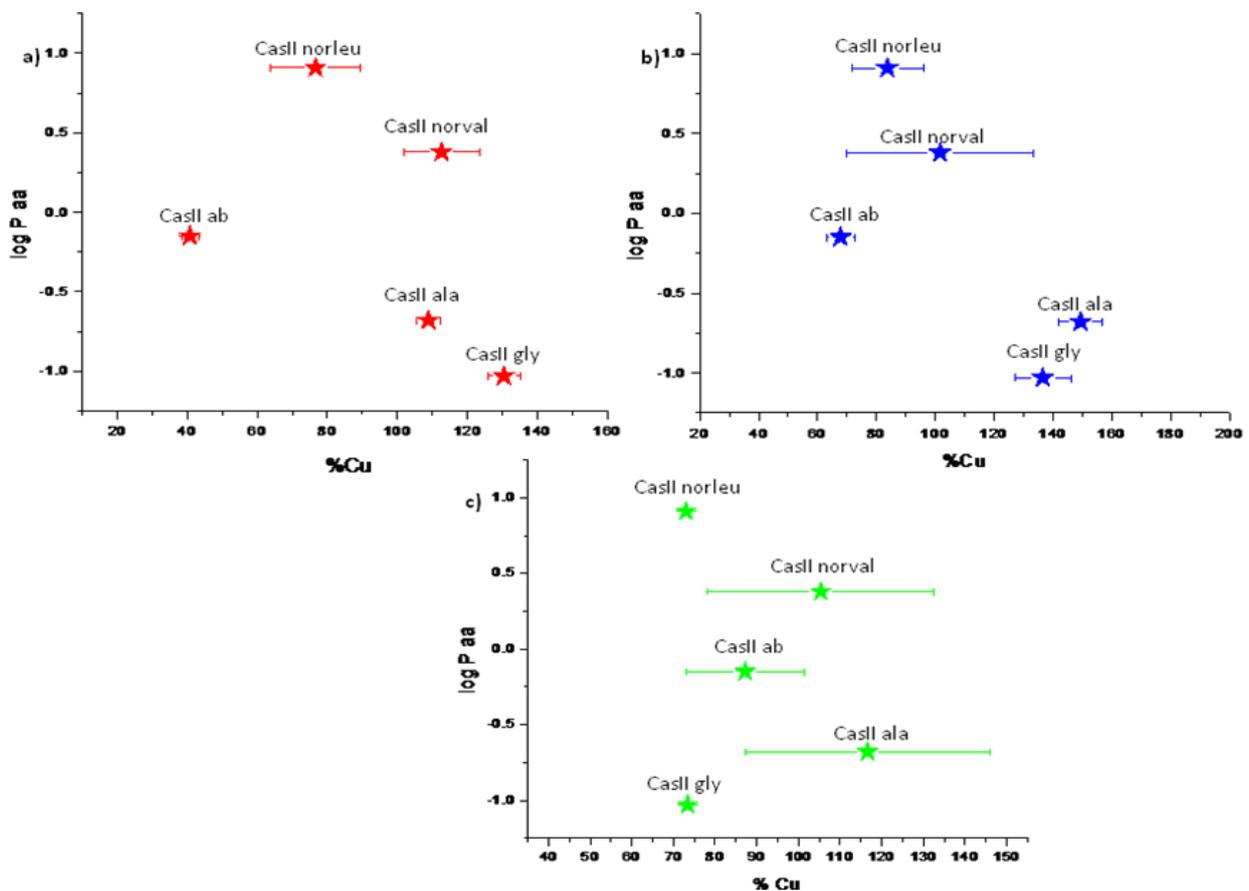
**Gráfica 6:** Cobre intracelular a diferentes tiempos de exposición de los complejos ternarios 20  $\mu\text{M}$ , Casiopeínas<sup>®</sup> y sus controles estructurales  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$  y  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ .

Como se puede observar en la Gráfica 6, el  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  es el compuesto que tarda más en presentar el máximo de concentración de cobre, lo que podría explicar en parte la diferencia de citotoxicidad con respecto a todos los compuestos coordinados.

En relación a las Casiopeínas, se encontró que los patrones de ingreso de CasII gly, CasII ala y CasII norval son muy similares al patrón de ingreso del  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ ; el pico máximo de concentración de cobre intracelular se presenta a los 15 minutos en todos los casos mencionados. En el caso de la CasII ab, el máximo pudiera llevarse a cabo después de los 20 minutos, presentando un patrón similar al del  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . Finalmente, los compuestos con norleucina los resultados

no permiten establecer si el máximo se encuentra antes o después de los tiempos evaluados.

Para determinar si existe relación entre el coeficiente de partición y la concentración de cobre intracelular, se graficó el log P de los aminoácidos contra el %Cu a los diferentes tiempos de exposición.



**Gráfica 7:** Comparación del %Cu, con el log P del aminoácido correspondiente, después de a) 10 min, b) 15 min y c) 20 min de exposición a cada Casiopeína®.

Como se puede observar en la Gráfica 7, en los tiempos evaluados, no existe relación entre la concentración intracelular de

cobre y el log P de los compuestos, sin embargo, las diferencias estructurales en la longitud de la cadena del ligante secundario influyen en la velocidad de ingreso de los diferentes compuestos.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este trabajo se realizó en un intento por comprender la importancia del ligante secundario y la influencia de su estructura en el ingreso a la célula y la citotoxicidad de los complejos ternarios de cobre conocidos como Casiopeínas<sup>®</sup>. Para lograr esto se determinó la concentración intracelular de cobre por absorción atómica en un cultivo de la línea tumoral HeLa, expuesto a estos compuestos durante diferentes tiempos.

Los resultados revelaron que todos los compuestos coordinados son más citotóxicos que el  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , siendo el más activo el  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ . A pesar de que la respuesta citotóxica puede ser resultado de varios eventos moleculares, se esperaba que el incremento de lipofilicidad por efecto de la coordinación de los ligantes incrementara directamente la concentración intracelular de cobre en comparación con las células tratadas con  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y que esto a su vez se viese reflejado en el incremento de la citotoxicidad.

Al comparar los %Cu intracelular de los tres controles estructurales ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cu}(\text{phen})^{2+}$ , y  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ ) se observó que la hidrofobicidad de los compuestos, la cual se incrementa cuando el átomo de cobre está coordinado con las diiminas, favorece su transporte a través de la membrana, incrementando la velocidad de ingreso a la célula, presentando el siguiente orden:  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+} > \text{Cu}(\text{phen})^{2+} > \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . Este orden coincide con la citotoxicidad de

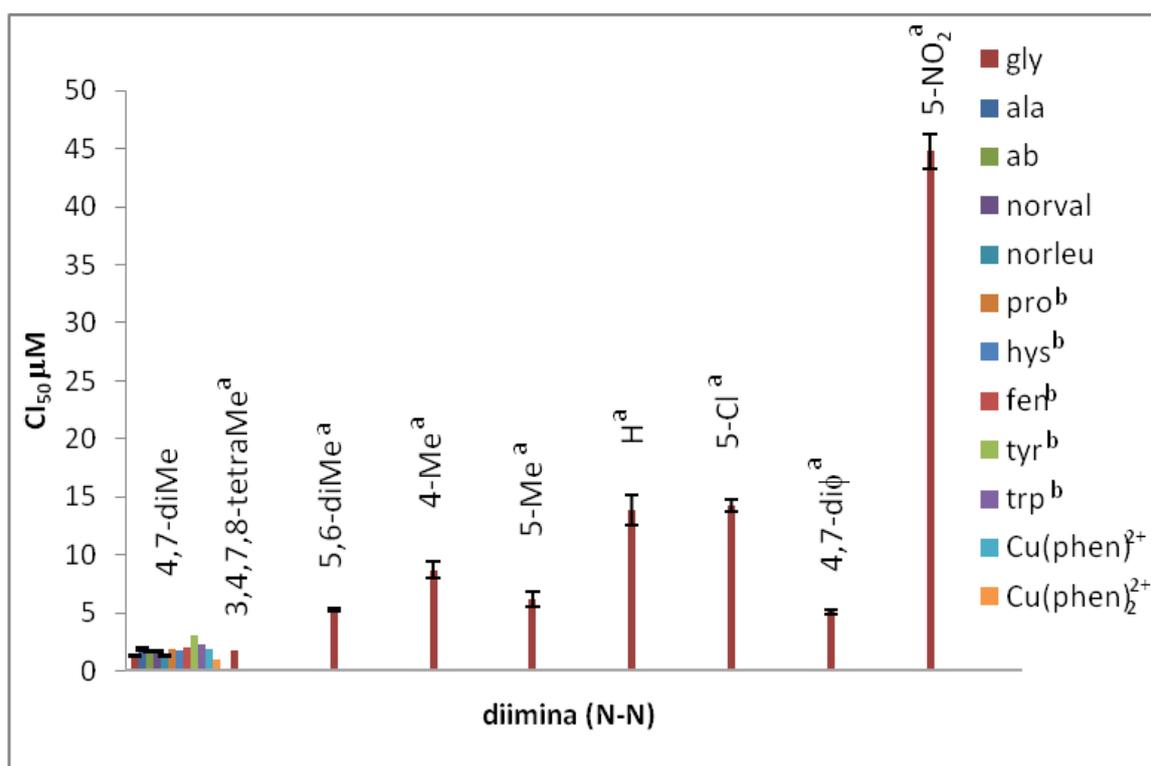
estos tres compuestos, por lo cual es razonable suponer que los ligantes favorecen el ingreso celular de cobre y de esta forma favorecen los eventos moleculares que desencadenan su efecto biológico.

Por otra parte, cuando el ligante secundario es un aminoácido, su presencia en el complejo afecta la velocidad con la que los compuestos ingresan a la célula, presentando en general picos máximos de concentración entre los 10 y 15 minutos. Estos hallazgos coinciden con el trabajo de Rivero-Müller et al.[54], en donde se observa que la viabilidad celular no difiere del control sin tratamiento si se administra al mismo tiempo Cas II-gly y trientina, un secuestrador de cobre que reduce su entrada al interior de la célula. Por el contrario, si se administra trientina 10 minutos después de la administración de Cas II-gly, el cultivo celular presenta una viabilidad equivalente a la del cultivo tratado únicamente con Cas II-gly, lo que indica que el complejo ingresa a la célula casi por completo alrededor de los 10 minutos.

Sin embargo, con los datos obtenidos no se pudo establecer correlación entre la longitud de la cadena del aminoácido y la concentración de cobre intracelular en los tiempos evaluados. Asimismo, tampoco se encontró correlación entre la concentración de cobre intracelular y la actividad antiproliferativa.

De acuerdo con Bravo y colaboradores (2008)[8], son los cambios estructurales en el ligante diimina los que influyen principalmente en la actividad biológica; sin embargo, en el trabajo

mencionado no se consideraron un gran número de variaciones estructurales en el ligante secundario. Con el objetivo de comparar la magnitud de los cambios en la actividad biológica en función de los cambios estructurales en ambos ligantes se construyó la gráfica 8, en donde se muestra la  $CI_{50}$  de complejos ternarios con variaciones estructurales en ambos ligantes.



**Gráfica 8:** Actividad antiproliferativa de las Casiopeínas<sup>®</sup>. El ligante aminoacidato se muestra a la derecha de la tabla. a. Datos recopilados de Muciño Hernández[63]; b. Datos recopilados de Bravo y colaboradores, 2008[8]; \*Dato no disponible, la posición se determinó a partir de su pKa, con respecto al de 4,7 diφ.

La Gráfica 8 muestra que el cambio de la fenantrolina genera diferencias mayores en el valor de  $CI_{50}$  que aquellas provocadas por el cambio de aminoacidato. Las  $CI_{50}$  de compuestos con diferentes aminoacidatos son muy similares entre ellas y tampoco existe diferencia significativa con respecto al valor del control estructural  $Cu(phen)^{2+}$ . Esto podría sugerir que el aminoacidato no está involucrado directamente en el mecanismo de acción. Por otro lado, la similitud en los patrones de ingreso antes discutida, lleva a pensar que es probable que el aminoacidato sea sustituido por moléculas presentes en el medio de cultivo, como histidina, metionina, cisteína y glutatión, los cuales se ha encontrado que forman complejos muy estables con cobre y facilitan la absorción del mismo a través de los transportadores de aminoácidos[64]. Debido a que las constantes de estabilidad  $Cu(a.a.)$  son muy similares en todos los casos[65], los patrones de ingreso también lo serían.

Por otro lado, hay que considerar la posibilidad de otros medios de ingreso del cobre al interior de la célula. En estudios recientes, se han encontrado que se han identificado otros dos transportadores, por los cuales se lleva a cabo la absorción de cobre: 1) el transportador de metales divalentes y 2) el transportador de cationes divalentes 1. Ambos transportadores, como su nombre lo indica, reconocen cobre(II) libre, mientras que el hCtr1 reconoce cobre (I) libre[66]. Sin embargo, todos estos transportadores son saturables y muy específicos en el reconocimiento molecular por lo que el cobre tendría que perder al ligante diimina para ingresar a la célula por alguno de estos sistemas, dando como resultado un patron de ingreso similar al del  $Cu(NO_3)_2$ .

Es por lo anteriormente expuesto, que la vía de acceso más probable para estos complejos sea el transporte no regulado, en donde los ligantes le proporciona lipofilicidad al ión metálico lo que le permite transportarse con mayor rapidez a través de la membrana sin requerir de un transportador específico para su ingreso. Así mismo, es posible que el ligante secundario sea sustituido por alguna otra molécula presente en el medio que forme complejos estables con cobre y que se encuentre en altas concentraciones como GSH.

En suma, la variación en el ligante aminoacidato influye en la concentración de cobre intracelular encontrada para los diferentes compuestos y en sus patrones de ingreso; sin embargo, no es el único factor ni el más importante en el ingreso de éstos a la célula, así como no es un factor determinante en su citotoxicidad.

## **IX. CONCLUSIONES**

La presencia de los ligantes en la estructura de estos compuestos facilita la entrada de cobre intracelular afectando la velocidad de ingreso; en consecuencia, es probable que el transporte no regulado sea la principal ruta de ingreso de estos compuestos. Sin embargo, el incremento en la concentración de cobre intracelular es independiente de la longitud de la cadena lateral del ligante aminoacidato, así como, es independiente también de la actividad antiproliferativa de los compuestos. Esto significa que el ligante aminoacidato interviene en la entrada del compuesto a la célula pero no es determinante para el mecanismo de acción de éste.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Ruiz-Azuara, L., *Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II*, S. 18802, Editor. Dic. 9, 1993, no. 172248: México.
2. Ruiz-Azuara, L., *Process to obtain new mixed copper aminoaidate from methylate phenantroline complexes to be used as anticancerigenic agents*. Nov 19, 1996, U.S. Patent application serial no. 07/628,628, Pat. 5,576,326.
3. Sánchez-Bartez, F., *Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las Casiopeínas Igli, IIgli y III-ia en linfocitos, médula ósea de ratón y linfocitos humanos en cultivo, Unidad de Experimentación Animal y Departamento de Química Inorgánica*. 2006, Universidad Nacional Autónoma de México: Ciudad de México.
4. Alemón-Medina, R., Breña-Valle, Muñoz-Sánchez, J.L., Gracia-Mora M.I., Ruiz-Azuara L., *Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas<sup>(R)</sup>)*. Cancer Chemother. Pharmacol., 2007, **60**, 219-228.
5. Carvallo-Chaigneau, F., Trejo-Solís C., Gómez-Ruiz, C., Rodríguez, A., Macías-Rosales, L., Cortés-Barberena, E., Cedillo, P., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L., Madrid-Marina, V., Constantino-Casas, F., *Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo*. Biometals, 2008, **21**, 17-28.
6. Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropón, A., Osorio-Rico, L., Sánchez-Torres, L., Gracia-Mora, I., Márquez-Rosado, L., Sánchez, A., Moreno-García, M.E., Cruz A., Bravo-Gómez. M.E., Ruiz-Ramírez, L., Rodríguez-Enríquez, S., Sotelo, J., *Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms*. Neoplasia, 2005. **7**, 564-574.
7. Hernández de la Paz, A.L., *Evaluación de la actividad antineoplásica de dos Casiopeínas usando el modelo de xenotransplatación (ratón desnudo), Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica*. 2008, Universidad Nacional Autónoma de México: Ciudad de México.
8. Bravo-Gómez, M.E., García-Ramos, J.C., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L., *Antiproliferative activity and QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonate)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glycinate)]NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopeínas<sup>(R)</sup>)*. J. Inorg. Biochem., 2009. **103**(2): p. 299-309.
9. Higby D.J., W., H.J. Jr., Albert, D., Holland, J.F., *Diamminodichloroplatinum in the chemotherapy of testicular tumors*. J. Urol., 1974. **112**, 100-104.
10. Wiltshaw, E., et al., *Cis-platinumdiamminedichloride*, in *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*, T.A. Connors, Editor. 1974, Heidelberg, Springer. p. 178-182.
11. Roohangiz, S., et al., *The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs*. J. Inorg. Biochem., 2004. **98**, 1607-1613.
12. Kuniyuki, K., Akira, K., Safaei, R., Holzer, A., Samimi, G., Mishima, M., Kuo, Y., Rochdi, M., Howell, S.B., *Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper*. Cancer Res., 2002. **62**, 6559-65.
13. Dobyán, D.C., *Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1980. **213**: 551-556.

14. Dobyan, D.C., *Long-Term consequences of cis-platinum induced renal injury: a structural and functional study*. *Anat. Rec.*, 1985. **212**, 239-245.
15. Smart, R.C., *Chemical Carcinogenesis*, in *A Textbook of Modern Toxicology*, J.W. Sons, Editor. 2004, p. 225.
16. Cancer in your country. 2008, W.H.O., WHO Global InfoBase: Data for Saving Lives. <http://www.who.int/infobase/report.aspx>.
17. Lebwohl, D., Canetta., R., *Clinical development of Platinum complexes in Cancer Therapy: an historical perspective and an update*. *Eur. J. Cancer*, 1998. **34**, 1522-34.
18. Kui, W., Jingfen, L., Ronchang, L., *The events that occur when cisplatin encounters cells*. *Coord. Chem. Rev.*, 1996. **151**, 53-88.
19. *PAC, 1997, 69, 1251 (Glossary of terms used in bioinorganic chemistry (IUPAC Recommendations 1997)) on page 1274*.
20. Greenwood, N., Earnshaw, A., *Chemistry of the Elements*, ed. P. Press. 1989, Hong Kong. p. 28
21. Wilkinson, G., et al., ed. *Copper*. *Comprehensive Coordination Chemistry; The synthesis, reactions, properties and application of coordination compounds*. Vol. Late transition elements. 1987, Pergamon Press. p 55
22. Huheey, J.E., *Inorganic Chemistry*, ed. 3<sup>a</sup>. 1983: Harper & Row, p 87
23. Arredondo, M., Nuñez, M., *Iron and copper metabolism*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005. **26**, 313-325.
24. Da Silva, F., et al, *The Biological Chemistry of the Elements*. 1991, U.S.A.: Clarendon Press Oxford. p 68
25. Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F., Santini, C., *Copper Complexes as Anticancer Agents*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2009. **9**, 185-211.
26. Huang, R., Wallqvist, A., Covell, D.G., *Anticancer metal compounds in NCI's tumor screening database: putative mode of action*. *Biochem. Pharmacol.*, 2005. **69**, 1009-39.
27. Gaetke, L., Ching-Kuang-C., *Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients*. *Toxicology*, 2003. **189**, 147-163.
28. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *The International J. Biochem. & Cell Biol.*, 2007. **39**, 44-84.
29. Wardman, P., Candeias, L.P. , *Fenton Chemistry: an introduction*. *Radiat. Res*, 1996. **145**(5), 523-531.
30. Trachootham, D., et al., *Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate*. *Cancer Cell*, 2006. **10**, 241-52.
31. Kong, Q., J.A. Beel, and K.O. Lillehei, *A threshold concept for cancer therapy*. *Med Hypotheses*, 2000. **55**(1), 29-35.
32. Oberley, T.D., Oberley, L.W. , *Antioxidant levels in cancer*. *Histol. Histopathol*, 1997. **12**, 525-535.
33. Cobine, P., Fabien, P., Winge, D., *Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 2006. **1763**, 759-772.
34. Rae, T.D., Shmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., O'Halloran, T.V., *Undetectable Intracellular Free Copper: The Requirement of a Copper Chaperone for Superoxide Dismutase*. *Science*, 1999. **284**, 805-808.
35. Lutsenko, M.J., Petris, M.J., *Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: insights from biochemical and cell biological approaches*. *J. Membr. Biol.*, 2003. **191**, 1-12.
36. Safaei, R., *Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs*. *Cancer Letters*, 2006. **234**, 34-39.

37. Harris, E.D., *Copper Transport: An overview*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1991. **196**, 130-140.
38. Harris, E.D., *The Transport of Copper*. Prog. Clin. Biol. Res., 1993. **380**, 163-179.
39. Bull, P.C., Thomas, G.R., Rommens, J.M., Forbes, J.R., Cox, D.W., *The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to Menkes gene*. Nat. Genet., 1993. **5**, 327-337.
40. Petris, M.J., Mercer, J.F., Culvenor, J.G. Lockhart, P., Gleeson, P.A., Camakaris, J., *Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking*. The EMBO J., 1996. **15**, 6084-6095.
41. Petris, M.J., Voskoboinik, I., Cater, M., Smith, K., Kim B.E., Llanos, R.M., Strausak, D., Camakaris, J., Mercer, J.F., *Copper-regulated trafficking of the Menkes disease copper ATPase is associated with formation of a phosphorylated catalytic intermediate*. J. Biol. Chem., 2002. **277**, 46736-42.
42. Gasque, L., Moreno-Esparza, R., Ruiz-Ramírez, L., Medina-Dickinson, G., *Aqua(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)(salicylaldehydato)copper(II) nitrate monohydrate*. Acta Cryst. C., 1999. **55**, 1065-1067.
43. Solans, X., Ruíz-Ramírez, L., Martínez, A., Gasque, L., 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 Cryst. C., 1993. **49**, 890-893.
44. Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2004. **44**, 239-67.
45. Griesser, R., Sigel, H., *Ternary Complexes in Solution. VIII. Complex Formation between the Copper (II)-2,2'- bipyridyl 1:1 Complex and Ligands Containing Oxygen and/or Nitrogen as Donor Atoms*. Inorg. Chem., 1970. **9**, 1238-1243.
46. Sigel, H., Huber, P., Pasternack, R., *Ternary Complexes in Solution. X. The Influence of the Size of the Chelate Rings on Stability of Mixed-Ligand Copper (II) Complexes*. Inorg. Chem., 1971. **10**, 2226-2228.
47. Bin Song, S.A.A.S., Fridrich Gregán, Nadja Prónayová, Helmut Sigel, *Stability of binary and ternary copper (II) complexes of the diphosphate analogue, methylphosphonylphosphate, in aqueous solution*. Inorg. Chim. Acta, 1998. **273**, 101-105.
48. Makoto Chikiraa, Y.T., Dai Fukitaa, Takashi Sugizakia, Norikazu Sugawaraa, Toru Yamazaki , Arihiko Sasano , Heisaburo Shindo , Mallayan Palaniandavar , and W.E. Antholine, *DNA-fiber EPR study of the orientation of Cu(II) complexes of 1,10-phenanthroline and its derivatives bound to DNA: mono(phenanthroline)-copper(II) and its ternary complexes with amino acids*. J. Inorg. Biochem., 2002. **89**, 163-173.
49. Kwik, W.L., Ang, K.P., *Complexes of (2,2'-bipyridyl) copper(II) complexes and (1,10-phenanthroline) copper(II) with some aminoacids*. J. Inorg. Nuclear Chem., 1980. **42**, 303-313.
50. Gasque, L., M., G., Ruiz-Ramírez, L., Moreno-Esparza, R., *Cu-O stretching frequency correlation with phenanthroline pKa values in mixed copper complexes*. Inorg. Chim. Acta, 1999. **288**, 106-111.
51. De Vizcaya-Ruiz, A., rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Howarth, J.A., Dobrota, M., *Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II*. Toxicology, 2003. **194**, 103-113.

52. Alemón-Medina, R., Muñoz, Sánchez, J.L., Ruiz-Azuara, L., Gracia Mora, I. and I. Gracia-Mora, *Casiopéina IIgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide*. *Toxicol. In Vitro*, 2008. **22**, 710-715.
53. Marín-Hernández A., G.-M., I., Ruiz-Ramírez, L., Moreno-Sánchez, R., *Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopéinas®) on mitochondrial functions*. *Biochem. Pharm.*, 2003. **65**, 1979-1989.
54. Rivero-Müller, A., De Vizcaya-Ruiz, A., Plant, N., Ruiz, L., Dobrota, M., *Mixed chelate copper complex, Casiopéina IIgly<sup>(R)</sup>, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of citotoxicity*. *Chemico-Biological Interactions*, 2007. **165**, 189-99.
55. Alemón-Medina, R., Breña-Valle, M., Muñoz-Sánchez, J.L., Gracia-Mora, M.I., Ruiz-Azuara, L., *Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopéinas<sup>(R)</sup>)*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2007. **60**, 219-228.
56. Bravo-Gómez, M.E., et al., *Evaluación antineoplásica de compuestos de coordinación de cobre (Casiopéinas<sup>(R)</sup>) en modelo tumoral murino*. Tesis de licenciatura, 1998, Universidad Nacional Autónoma de México: México D.F.
57. De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., *Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopéina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells*. *Toxicol. In Vitro*, 2000. **14**: p. 1-5.
58. Kachadourian, R., Brechbuhl, H.M., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., *The Role of Mitochondrial Dysfunction in CasII-gly-mediated Toxicity in Human Lung Adenocarcinoma Cells*, (por publicar)
59. Mejía, C., Ruiz-Azuara, L., *Casiopéinas IIgly and IIIia Induce Apoptosis in Medulloblastomas Cells*. *Pathol. Oncol. Res.*, 2009. (por publicar)
60. Skehan, P., et al., *New colorimetric citotoxicity assay for anticancer-drug screening* *Journal of the National Cancer Institute*, 1991. **82**, 1107-12.
61. Analysoft, Robust Business Solution, *StatPlus*, 2007, Professional Build Version, 3.5.3.0
62. Lowry, H., R.N.J., Farr A.L., Randall. R.J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.*, 1951. **193**, 265-275.
63. Muciño Hernández, M.A., *Síntesis, caracterización y evaluación in vitro de 5 compuestos del tipo Cu[(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)( $\alpha$ -aminoacido)]NO<sub>3</sub> Casiopéinas<sup>(R)</sup> en diferentes líneas tumorales humanas*. 2009, Universidad Nacional Autónoma de México: México D.F.
64. Jacob, R., Skala, J., Omaye, S., Turnlund, J., *Effect of varying ascorbic acid intakes on copper absorption and ceruloplasmin levels of young men*. *J. Nutr.*, 1987. **117**, 2109-2115.
65. Gergely, A., Sóvágó, Nagypál, Király, *Equilibrium relations of  $\alpha$ -aminoacids mixed complexes of transition metal ions*. *Inorg. Chim. Acta*, 1972, **6**, 435-439.
66. Safaei, R., Howell, S.B., *Regulation of the Cellular Pharmacology and Cytotoxicity of Cisplatin by Copper Transporters*, Teicher, B. A., *Cancer Drug Resistance*. 2006, Humana Press, p. 309-327.