



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA  
UNAM

**EFFECTO CITOTÓXICO DE COMPUESTOS PENTACOORDINADOS  
ORGANOMETÁLICOS DE ESTAÑO EN LÍNEAS  
TUMORALES HUMANAS *in vitro***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

**P R E S E N T A**

**PATRICIA MARTEL PALOMO**



MÉXICO D.F.

2014



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:	Lena Ruiz Azuara
VOCAL	Profesor:	Perla Carolina Castañeda López
SECRETARIO	Profesor:	Celedonio Gómez Ruíz
1° SUPLENTE	Profesor:	Julio Cesar Martínez Álvarez
2° SUPLENTE	Profesor:	María Isabel Gracia Mora

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Unidad de Experimentación Animal UNEXA  
Laboratorio de Cultivo Celular e Inmunohistoquímica  
Conjunto E Facultad de Química  
UNAM

**ASESOR DEL TEMA:**

---

M. en C. Celedonio Gómez Ruíz

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

M. en C. María Isabel Gracia Mora

**SUSTENTANTE:**

---

Patricia Martel Palomo

---

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES .....	5
3.1. Cáncer.....	5
3.2. El Cáncer en el mundo .....	6
3.3. Situación del cáncer en México.....	6
3.4. Frecuencia .....	7
3.5. Tipos de cáncer.....	11
3.5.1. Cáncer Cervicouterino .....	11
3.5.2. Cáncer de mama.....	12
3.5.3. Cáncer de colon.....	13
3.5.4. Cáncer de próstata.....	14
3.6. Carcinogénesis .....	15
3.7. Tratamientos contra el cáncer.....	17
3.7.1. Cirugía .....	18
3.7.2. Radioterapia.....	18
3.7.3. Quimioterapia.....	19
3.7.3.1. Tipos de Quimioterapia .....	20

---

3.7.4. Hormonoterapia .....	21
3.7.5. Inmunoterapia .....	21
3.8. Fármacos utilizados .....	22
3.8.1. Cis-platino .....	26
3.8.2. Compuestos organoestañosos.....	28
3.9. Ciclo Celular.....	30
3.9.1. Ciclinas .....	32
3.10. Apoptosis .....	34
3.10.1. Caracterización .....	34
3.10.2. Iniciación .....	36
3.10.3 Ejecución.....	37
3.10.4. BCL-2 .....	39
3.10.5. Caspasas .....	40
3.10.6. Detección de apoptosis.....	42
3.10.7. Inmunohistoquímica .....	44
3.10.8. Reacción de TUNEL .....	45
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	46
5. HIPÓTESIS .....	47
6. OBJETIVOS .....	48
7. METODOLOGÍA.....	49

---

---

7.1. Cultivo Celular.....	49
7.1.1. Descongelación de células.....	49
7.1.2. Viabilidad celular con Azul Tripano .....	50
7.2. Ensayo de citotoxicidad .....	51
7.3. Congelación celular .....	52
7.4. Inmunocitoquímica .....	53
7.5. Ensayo de TUNEL .....	54
8. RESULTADOS .....	55
8.1. Efecto citotóxico sobre líneas celulares tumorales humanas .....	55
8.2. Expresión de ciclinas por acción de compuestos organometálicos de estaño sobre líneas celulares tumorales humanas.....	61
8.3. Expresión de apoptosis en líneas celulares tumorales humanas tratadas con compuestos organometálicos de estaño.....	66
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	69
10.CONCLUSIONES.....	76
11.BIBLIOGRAFÍA .....	78

## 1. RESÚMEN

El Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, siendo una de sus características la multiplicación de células anormales extendiéndose más allá de sus límites habituales. Datos arrojados por la OMS indican que la principal causa de muerte a escala mundial, atribuyéndosele alrededor de 7.6 millones en 2008 y se pronostica que las muertes por cáncer sigan aumentando, alcanzando una cifra de 13,1 millones en 2030.

La presente investigación tiene por objeto *evaluar el efecto antineoplásico de los compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño identificados como NK-58 y NK-88 en líneas celulares tumorales humanas*. Las líneas con las que se trabajó son: PC-3 (adenocarcinoma prostático), HeLa (carcinoma de cuello uterino), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y HCT-15 (carcinoma colon rectal).

Se realizaron tres microensayos de citotoxicidad en placas de 96 pozos donde se expusieron las líneas celulares a diferentes concentraciones de cada compuesto organometálico de estaño (0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), utilizando como control positivo al cis-platino a las mismas concentraciones. Asimismo se determinó la concentración inhibitoria (CI 50) de los compuestos NK-58 y NK-88 mediante el ensayo colorimétrico de citotoxicidad con sulforrodamina B.

Se llevó a cabo el ensayo de TUNEL que evalúa la muerte celular programada por los compuestos de prueba y haciendo uso de la Inmunocitoquímica se determinó la expresión de las ciclinas D1, A y B1 en las líneas celulares mencionadas.

Con el descubrimiento de nuevas moléculas antineoplásicas se pretende desarrollar en un futuro medicamentos que permitan controlar muchos de los padecimientos oncológicos en los pacientes, para poder ofrecer un mejor manejo de la enfermedad y una mejor calidad de vida para este tipo de pacientes.



## 2. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una proliferación celular descontrolada causada por factores físicos, químicos, genéticos o biológicos <sup>(1)</sup> resultado de varias alteraciones genéticas. En este proceso se presenta la pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del ADN, así como de la segregación del material genético. Aunque las células normales tienen estrategias de defensa contra el desarrollo del cáncer, las células tumorales activan diferentes vías de escape que permiten la progresión de la neoplasia. Las células cancerosas difieren de las células normales en muchas características, incluyendo la pérdida de la capacidad de diferenciación, el aumento de invasividad y la disminución de la sensibilidad a las drogas citotóxicas. Características que resultan en una proliferación celular descontrolada <sup>(2)</sup>.

El principal objetivo de la quimioterapia es destruir las células cancerosas preservando las células normales. Sin embargo, la mayoría de los agentes utilizados en quimioterapia funciona de una manera no específica. El uso clínico de estos fármacos requiere un índice terapéutico favorable, y, conseguir una mayor esperanza de vida <sup>(3)</sup>.

Por tal motivo la investigación de nuevos compuestos orgánicos de estaño se ha incrementado notablemente. Los complejos de estaño (IV) caracterizados por la presencia de uno o más enlaces carbono-estaño, han demostrado ser citotóxicos contra líneas celulares tumorales humanas como MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y carcinoma de colon <sup>(4)</sup>. El uso de complejos de metal como agente quimioterapéutico en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas, aparece como una gran alternativa en investigación siendo de principal interés como agentes antineoplásicos <sup>(5)</sup>.

El presente trabajo tiene como objetivo demostrar que nuevas moléculas de compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño presentan actividad citotóxica en líneas tumorales humanas.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo después de las enfermedades cardiovasculares <sup>(6)</sup>. Es un grupo de enfermedades, resultado de cambios en los genes que controlan el proceso ordenado de crecimiento y muerte celular, haciendo que estas células anormales se dividan sin control <sup>(7,8)</sup>. Las vías que se alteran principalmente son las de transducción de señales mitógenas, el ciclo celular y los mecanismos de muerte celular programada o apoptosis <sup>(9)</sup>. Las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático, provocando invasión a otros tejidos (metástasis) <sup>(7,8)</sup>.

A través del tiempo el cáncer se ha descrito como una enfermedad incurable, descripción que hasta la fecha sigue persistiendo. La complejidad de esta enfermedad requiere de una gran batalla científica en todas las fronteras, hecho que ha sido el punto focal de la actual investigación. A pesar de que se han descubierto muchos nuevos medicamentos y métodos de tratamiento contra el cáncer, faltan muchos más estudios y ensayos clínicos que serán la clave para encontrar una cura contra el cáncer.

### 3.2. El cáncer en el mundo

El cáncer es una de las principales causas de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 7,6 millones de defunciones (aproximadamente el 13% del total) ocurridas en todo el mundo en 2008. Los principales tipos de cáncer son los siguientes <sup>(8)</sup>:

- pulmonar (1,37 millones de defunciones);
- gástrico (736 000 defunciones);
- hepático (695 000 defunciones);
- colorectal (608 000) defunciones;
- mamario (458 000 defunciones);
- cérvico-uterino (275 000 defunciones).

### 3.3. Situación del cáncer en México

Durante 2011 del total de defunciones en el país, 12.9% fueron por algún tumor y de éstos, 93.6% se debieron a neoplasias malignas. Entre los jóvenes menores de 20 años, se observa que 5.3% fallecieron por algún tumor, ya sea maligno o benigno, de los cuales 86.3% fueron cancerosos. En 2010, se observó que los principales tumores malignos que afectan a la población femenina adulta (de 20 años y más) que fue hospitalizada por este diagnóstico fueron el cáncer de mama (24.3%), el cérvico-uterino (9.7%) y el de colon (3.2%), tanto que para los varones

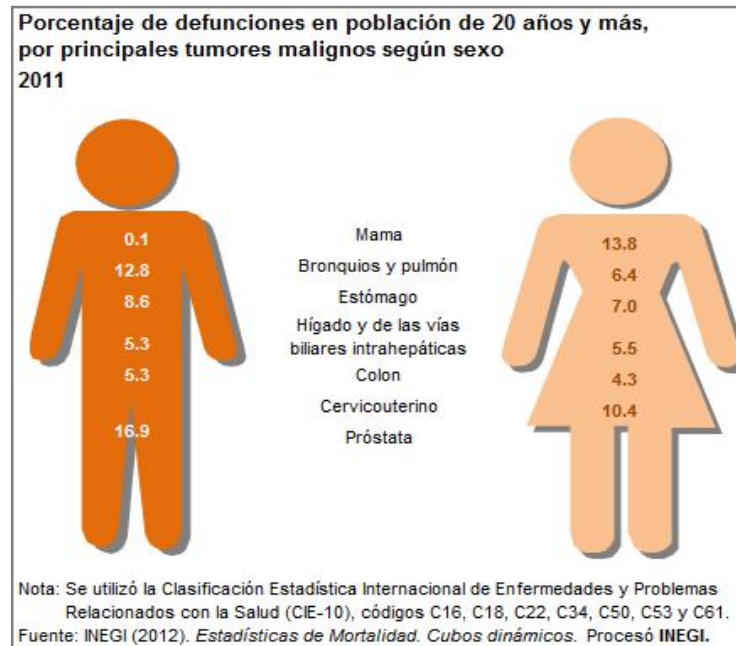
adultos se concentran en cáncer de próstata (7.9%), bronquios y pulmón (4.9%) y colon (4.6 %)<sup>(10)</sup>.

### 3.4. Frecuencia

Entre los hombres adultos, la tasa más alta de morbilidad hospitalaria por cáncer de próstata aumenta conforme avanza la edad (75 y 79 años) y en las mujeres, la tasa de morbilidad hospitalaria más alta es debida a cáncer de mama, que afecta principalmente a las mujeres de 50 a 64 años <sup>(10)</sup>.

La tasa de letalidad hospitalaria permite observar que conforme más edad tiene el paciente, más agresivo es el tumor maligno. En todos los grupos de edad la tasa de letalidad es superior en los varones en relación a las tasas de las mujeres, las diferencias más amplias se observan en los siguientes grupos de edad: 40 a 49 años, 65 a 74 años y 30 a 39 años <sup>(10)</sup>.

En 2011, entre los principales tumores malignos por lo que fallece la población de 20 años y más en México, se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres. Las mujeres mueren por cáncer de mama (13.8%), por cérvico-uterino (10.4%) y de estómago (7 %). En tanto que los hombres fallecen por cáncer de próstata (16.9%), de bronquios y pulmón (12.8%) y de estómago (8.6%) <sup>(10)</sup> como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1: Se muestra el porcentaje de defunciones en hombres y mujeres mayores de 20 años (Imagen obtenida de INEGI)**

La tasa de mortalidad observada se incrementa de forma importante a partir de los 50 años y éstas, son más altas para la población de 80 y más años; por ejemplo en 2011, se reportó que nueve de cada 100 mil adultos de 20 a 29 años fallecen a consecuencia de algún tumor maligno y se incrementa hasta 878 de cada 100 mil adultos de 80 años y más. Por sexo, se observa el mismo patrón, sin embargo las mujeres reportan tasas más altas que los varones en los grupos que van desde los 30 a los 64 años de edad y los hombres en el de 20 a 29 años y de los 65 años y más <sup>(10)</sup>.

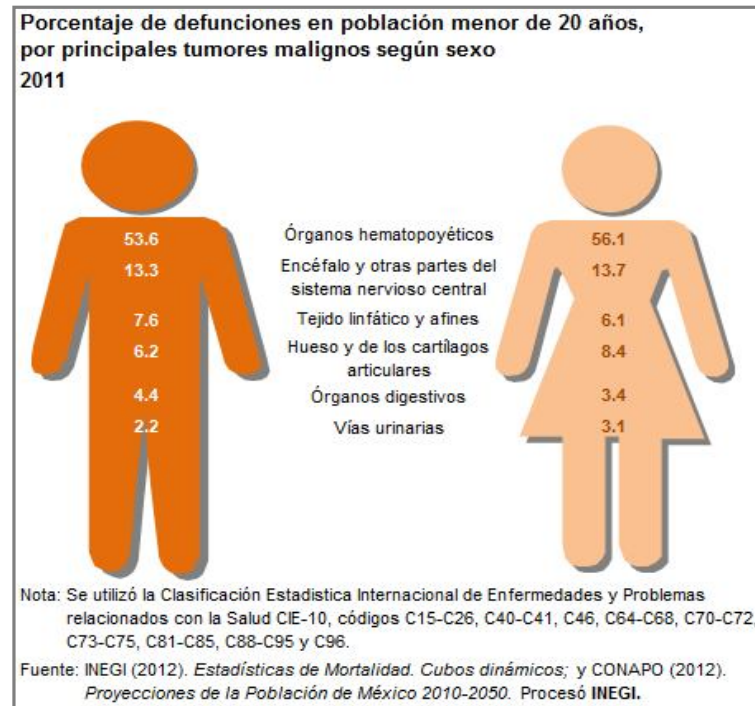
En 2010 del total de egresos hospitalarios de la población menor de 20 años por tumores malignos (33,019 casos), las principales neoplasias se presentan en los órganos hematopoyéticos (56.7%), en tejido linfático y afines (7.9%), en el encéfalo y otras partes del sistema nervioso central (6.3%), en hueso y cartílagos articulares (6.3%), en las células germinales (testículos u ovario) (3.7%) y en vías urinarias (2.9%) <sup>(10)</sup>.

Por grupo de edad y sexo, la tasa de morbilidad hospitalaria más alta en la población menor de 20 años se localiza en cáncer de los órganos hematopoyéticos, los niños de 5 a 9 años presentan la tasa más alta (65 de cada 100 mil niños y 58 de cada 100 mil niñas), seguidos de los niños de entre 0 y 4 años (51 hombres y 42 mujeres) <sup>(10)</sup>.

La población de 15 a 19 años es la que más fallece en general (5 de cada 100 casos); las mujeres (6 de cada 100) de este grupo de edad son más afectadas que los varones (5 de cada 100); situación similar se presenta para la población de 0 a 4 años, donde las mujeres superan ligeramente a los hombres; en los grupos de 5 a 9 años y de 10 a 14 años, los varones presentan tasas de letalidad ligeramente más altas que las mujeres; por ello, es importante que el diagnóstico y la atención temprana sean esenciales para atacar este padecimiento <sup>(10)</sup>.

Por sexo se observa que es mayor la proporción de mujeres que fallecen

por tumores malignos en órganos hematopoyéticos (56.1% mujeres y 53.6% hombres), seguidas por cáncer de encéfalo y otras partes del sistema nervioso central (13.7% niñas y 13.3% niños). Y la tercer causa de muerte varía para ambos sexos, siendo los tumores de tejido linfático y afines en los hombres (7.6%) y de hueso y cartílagos articulares para las mujeres (8.4 %) como se muestra en la Figura 2<sup>(10)</sup>.



**Figura 2: Se muestra el porcentaje de defunciones en hombres y mujeres menores de 20 años (Imagen obtenida de INEGI 2012).**

Más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países en vías de desarrollo. Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13,1 millones en 2030<sup>(8)</sup>.



### 3.5. Tipos de Cáncer

#### 3.5.1 Cáncer cérvico-uterino

A nivel mundial, el cáncer cérvico-uterino es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer. Sin embargo, gracias a la citología y a la histopatología se le puede detectar tempranamente y tratar oportunamente. La mayoría de las mujeres que desarrollan este cáncer tienen entre 40 y 50 años de edad. Sin embargo, cada vez es más común ver mujeres jóvenes infectadas por VPH, diagnosticadas con cáncer cérvico-uterino a edades de 20 y 30 años <sup>(11)</sup>. Hay medidas preventivas que han demostrado resultados satisfactorios como lo es la vacuna profiláctica <sup>(11, 12)</sup>.

Estudios moleculares, clínicos y epidemiológicos han permitido demostrar en forma inequívoca, una relación causal entre la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) y el Cáncer Cérvico- Uterino (CCU). Ocho genotipos de VPH, denominados de “alto riesgo” se asocian con 90% de estos cánceres y de ellos dos, los VPH 16 y 18, han sido consistentemente aislados en cerca del 70% de las mujeres con CCU en prácticamente todas las regiones del mundo. El VPH se asocia además con verrugas genitales, con otros cánceres menos comunes como el de orofaringe, vulva, vagina y pene, y con papilomatosis respiratoria recurrente <sup>(12)</sup>, sin descartar la predisposición genética que representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor <sup>(11)</sup>.

El tratamiento en el CCU es por medio de la escisión con una asa electroquirúrgica para las lesiones escamosas no invasivas. El cáncer que comienza a invadir se trata con histerectomía o con radioterapia de alta energía <sup>(11)</sup>.

### **3.5.2 Cáncer de mama**

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en el mundo. En años recientes se ha observado un incremento paulatino en su frecuencia, sobre todo en países en vías de desarrollo como México. Se concluye que el cáncer de mama es un problema de salud pública de los países desarrollados y en vías de desarrollo <sup>(13)</sup>. El cáncer de mama, aún no se puede evitar, pero la detección temprana es la única manera de reducir las tasas de morbilidad y mortalidad. La palpación de las mamas y los procedimientos de mamografía se utilizan para diagnóstico precoz <sup>(14)</sup>.

En la actualidad, el cáncer de mama, como otras formas de cáncer, es considerado el resultado de daño ocasionado al ADN. Este daño proviene de muchos factores conocidos o hipotéticos <sup>(15)</sup>. Entre algunos factores de riesgo, están: edad, sexo, antecedentes personales y familiares (los genes BRCA1, BRCA2), enfermedad mamaria preexistente, distribución geográfica, estructura corporal, factores ambientales, hormonales (exposición a estrógenos), reproductivos y alimentarios <sup>(13,15)</sup>.

### 3.5.3 Cáncer de colon

El cáncer de colon es la segunda causa principal de muerte en los países occidentales. El pronóstico asociado a esta enfermedad ha mejorado debido al diagnóstico precoz y cambios en la terapia médica. La quimioterapia adyuvante del cáncer de colon, la radioterapia y la introducción de la técnica de escisión del mesorrecto en el cáncer rectal muestran un aumento de la supervivencia, especialmente en pacientes con tumores de estadio III. La cirugía laparoscópica ha dado lugar a grandes avances en el tratamiento de muchas enfermedades como es el caso de pacientes con cáncer de colon ya que disminuye el trauma quirúrgico y las complicaciones perioperatorias <sup>(16)</sup>. Por otra parte, fármacos como la camptotecina y el oxaliplatino son tratamientos alternativos eficaces para éste tipo de cáncer<sup>(17)</sup>.

Recientes estudios han informado de una disminución del 40-50 % en el riesgo relativo del cáncer colorectal en las personas que son usuarios continuos de la aspirina u otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Sin embargo, el uso prolongado de éstos tienen efectos secundarios gastrointestinales adversos<sup>(18)</sup>.

### 3.5.4 Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es ampliamente conocido por ser dependiente de los andrógenos. Desde entonces la depleción gonadal de andrógenos ha sido el pilar del tratamiento para cáncer de próstata avanzado y sigue siendo sin duda la opción terapéutica más eficaz. Casi todos los pacientes responden a la ablación de andrógenos inicial, sin embargo, a pesar de la eficacia de la castración, el antígeno específico de próstata (PSA), indica un aumento en la transición a un estado resistente a la castración, que es invariablemente fatal <sup>(19)</sup>, ya que a pesar de la castración el cáncer crecerá a pesar de los bajos niveles de testosterona <sup>(20)</sup>.

La persistencia del receptor de andrógenos de señalización a pesar de los niveles bajos séricos de andrógenos, han sido identificados como un objetivo fundamental para el descubrimiento de fármacos en la castración de cáncer de próstata resistente. Hasta hace poco, las opciones de tratamiento médico en estos pacientes han sido principalmente limitados a segunda línea agentes hormonales tales como ketoconazol, mitoxantrona (ha demostrado el beneficio paliativo vs. prednisona), 5 docetaxel (demuestra un beneficio en la supervivencia global), y más recientemente cabazitaxel (muestra un beneficio para pacientes que han recibido ya docetaxel) <sup>(20)</sup>.

### 3.6. Carcinogénesis

La capacidad de un agente de producir una neoplasia se le denomina carcinogénesis. En el proceso de transformación progresiva de las células normales en células malignas, se produce la adquisición de autonomía por las mismas, lo que es un reflejo de una regulación y expresión anormal de su carga génica. Este proceso puede ser resultado de eventos endógenos como errores en la replicación del ADN, la inestabilidad intrínseca de ciertas bases del ADN o el ataque de radicales libres generados durante el metabolismo celular. También puede ser resultado de procesos exógenos como radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioletas, carcinógenos químicos, etc <sup>(21)</sup>. Es importante comprender que los genes implicados en la carcinogénesis son constituyentes normales del genoma humano y sus productos desempeñan un papel central en la regulación fisiológica del crecimiento celular, la división y la diferenciación. El desarrollo de tumores se debe a errores de regulación o cambios estructurales <sup>(22)</sup>.

La acción carcinógena de los distintos agentes no es única, si no, el resultado de una acción en varias etapas. Algunos autores la dividen en cuatro <sup>(22)</sup> no obstante algunos otros manifiestan que es el resultado de un procesos multi-mecanista <sup>(23)</sup>.

Las etapas más conocidas son: iniciación, promoción y progresión, así como se muestra en la Figura 3 <sup>(3,21,24,25)</sup>.

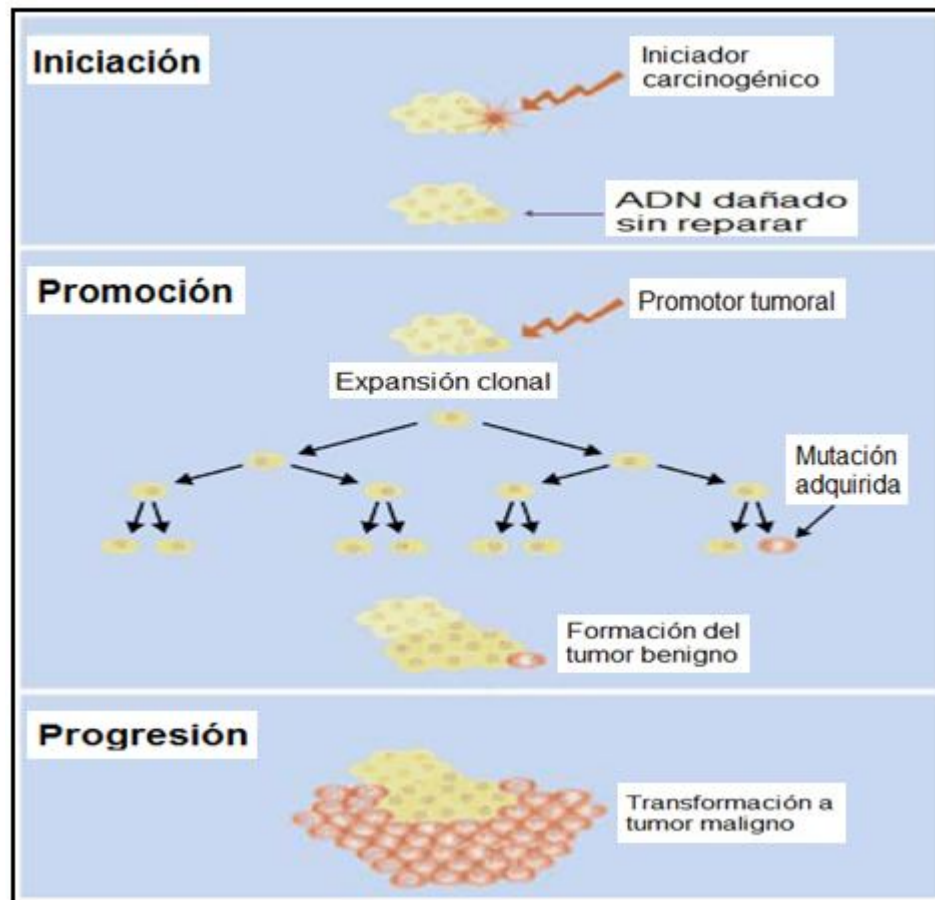


Figura 3: Descripción del Proceso de Carcinogénesis y sus tres etapas (Imagen obtenida y editada de Carcinogenesis and Epigenetics. BioFiles 2008).

### 3.7. Tratamiento contra el cáncer

Para que un tratamiento sea exitoso, se deben considerar los factores individuales y los propios del tumor <sup>(7)</sup>. El plan de tratamiento depende principalmente del tipo de cáncer y del estadio de la enfermedad. Los médicos consideran también la edad del paciente y su salud general <sup>(8)</sup>. El tratamiento es multidisciplinario, es decir, las distintas modalidades terapéuticas se combinan para proporcionar al enfermo el plan de tratamiento más adecuado que permita aumentar las posibilidades de curación de la enfermedad <sup>(26)</sup>.

Los tratamientos pueden actuar en un área específica o en todo el cuerpo, por lo que se dividen en <sup>(7)</sup>:

- Terapia local donde se extirpa o destruye el cáncer en una sola parte del cuerpo como es el caso de **la cirugía y de la radioterapia**.
- Terapia sistémica donde se administran medicamentos o sustancias por el torrente sanguíneo para destruir células cancerosas en todo el cuerpo, ejemplo de ella son la **quimioterapia, la terapia hormonal y la terapia biológica**.

### 3.7.1. Cirugía

La cirugía es un procedimiento para extirpar el cáncer. Los efectos secundarios de la cirugía dependen de muchos factores, inclusive del tamaño y lugar del tumor, del tipo de operación y del estado general de salud del paciente. Los pacientes tienen algo de dolor después de la cirugía, pero este dolor se puede controlar con medicamento. También es común que los pacientes se sientan cansados o débiles por un tiempo después de la cirugía <sup>(7)</sup>.

Está indicada en los cánceres que no se han extendido a otros órganos. También tiene un papel muy importante en el diagnóstico y estudio de extensión de la enfermedad <sup>(26)</sup>.

### 3.7.2. Radioterapia

La radioterapia usa rayos de alta energía para destruir las células cancerosas en una región determinada del cuerpo. La radiación puede administrarse en forma externa por medio de una máquina que apunta la radiación a la zona del tumor. La radiación puede administrarse también internamente; agujas, semillas, alambres o catéteres que contienen una sustancia radioactiva a través de la cual se implanta cerca del tumor. Los tratamientos de radiación no causan dolor, los efectos secundarios son temporales y la mayoría pueden tratarse y controlarse. Es posible que los pacientes se sientan muy cansados,



especialmente en las últimas semanas del tratamiento. La radioterapia puede causar también la disminución del número de glóbulos blancos en la sangre, los cuales ayudan a proteger el cuerpo contra la infección. Con radiación externa, es también común que se caiga el pelo temporalmente en la zona tratada y que la piel se ponga roja, reseca, sensible y con comezón <sup>(7)</sup>.

Hoy en día, la radiación se administra con gran precisión para combatir el cáncer <sup>(27)</sup>.

#### **3.7.3. Quimioterapia**

Es una de las modalidades terapéuticas más empleadas en el tratamiento del cáncer. Su objetivo es destruir las células que componen el tumor con el fin de reducir y/o eliminar la enfermedad, empleando una gran variedad de fármacos <sup>(26,27)</sup>.

Dependiendo del tipo de cáncer y de los fármacos que se vayan a emplear, la quimioterapia puede administrarse por vía oral o intravenosa <sup>(26)</sup>.

Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen principalmente de los fármacos y de la dosis que recibe el paciente. La caída del pelo es un efecto secundario común de la quimioterapia; sin embargo, no todos los fármacos lo

ocasionan. Los fármacos anticancerosos pueden también causar fatiga temporal, falta de apetito, náuseas y vómitos, diarrea, o llagas en la boca y labios <sup>(7)</sup>.

### 3.7.3.1. Tipos de quimioterapia

Quimioterapia adyuvante: Es la quimioterapia que se administra generalmente después de un tratamiento principal como es la cirugía, para disminuir la incidencia de diseminación a distancia del cancer <sup>(28)</sup>.

Quimioterapia neoadyuvante o de inducción: Es aquella que se inicia antes de cualquier tratamiento quirúrgico o de radioterapia con la finalidad de evaluar la efectividad *in vivo* del tratamiento. La quimioterapia neoadyuvante disminuye el estadio tumoral pudiendo mejorar los resultados de la cirugía y de la radioterapia y en algunas ocasiones la respuesta obtenida al llegar a la cirugía, es factor pronóstico <sup>(28)</sup>.

Quimioterapia paliativa: en tumores que no se vayan a intervenir quirúrgicamente por existir metástasis a distancia y cuando la finalidad del tratamiento no sea curativa <sup>(28)</sup>.

Según el modo de administración se clasifican en monoterapia y poliquimioterapia. La monoterapia es la administración de un único fármaco antineoplásico y la poliquimioterapia, es la asociación de varios agentes

antineoplásicos que actúan con diferentes mecanismos de acción, sinérgicamente, con el fin de disminuir la dosis de cada fármaco individual y aumentar la potencia terapéutica de todas las sustancias juntas <sup>(28)</sup>.

#### **3.7.4. Hormonoterapia**

Se emplea en aquellos tumores que crecen por el estímulo de alguna hormona. A estos cánceres se les denomina hormono-dependientes y los más representativos son el de mama y el de próstata. Esta modalidad consiste en el empleo de determinadas hormonas para detener o disminuir el crecimiento del tumor <sup>(7,26)</sup>.

Otro tipo de terapia hormonal es la cirugía para extirpar los órganos que producen hormonas. Por ejemplo, los ovarios pueden ser extirpados para tratar el cáncer de seno. Los testículos pueden ser extirpados para tratar el cáncer de próstata. Algunos efectos secundarios de esta terapia incluyen cansancio, bochornos, náuseas, vómitos, entre otros <sup>(7)</sup>.

#### **3.7.5. Inmunoterapia**

Es un tratamiento que consiste en utilizar el sistema inmune para destruir las células tumorales. Esto se consigue bien estimulando el propio sistema o bien introduciendo en el organismo sustancias sintéticas, semejantes a las del sistema

inmune, capaces de controlar la enfermedad <sup>(26)</sup>, como son los anticuerpos monoclonales, el interferón, la interleucina-2 y otras citoquinas <sup>(7,27)</sup>. En general, estos tratamientos tienden a causar síntomas parecidos a los de la gripe, como escalofríos, fiebre, dolor de músculos, debilidad, falta de apetito, náuseas, vómitos y diarrea. Los pacientes pueden también sangrar o magullarse con facilidad, tener erupciones de la piel o inflamación. Estos problemas pueden ser graves, pero desaparecen cuando termina el tratamiento <sup>(7)</sup>.

El diagnóstico y el tratamiento del cáncer se complementan con un apoyo psicológico <sup>(8)</sup>.

### **3.8. Fármacos utilizados**

Los diferentes fármacos antineoplásicos pueden actuar sobre una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular. La respuesta obtenida se relaciona directamente con la capacidad proliferativa de la célula, que está determinada por el tiempo de duplicación del tumor. En general, se deben administrar al menos dos fármacos que actúen sobre diferentes dianas terapéuticas y sin toxicidad cruzada. De este modo se reduce la toxicidad, se aumenta la eficacia sobre el tumor y disminuyen las posibilidades de que aparezcan resistencias <sup>(9)</sup>.

## Clasificación de los fármacos antineoplásicos

### Agentes alquilantes

Estos fármacos son los más utilizados en quimioterapia antineoplásica, lesionan el ADN e interfieren en la replicación celular <sup>(9, 29)</sup>. Su acción citotóxica es provocada mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleófilas presentes en las células, especialmente con las bases nitrogenadas del ADN <sup>(9,30)</sup>. De este modo, bloquean la replicación del ADN celular y la transcripción del ARN y, por lo tanto, la mitosis y la síntesis de proteínas <sup>(9)</sup>.

Dentro de la gran variedad de grupos que forman los agentes alquilantes, los más conocidos en la literatura son:

<b>Agentes Alquilantes</b>	
<b>Mostazas Nitrogenadas</b>	Ciclofosfamida
	Clorambucilo
	Ifosfamida
	Melfalán
<b>Alquilsulfonatos</b>	Busulfano
<b>Alquilantes Atípicos o Tetrazinas</b>	Dacarbacina
	Procarbazina
<b>Nitrosureas</b>	Carmustina
	Lomustina
<b>Etileniminas y metilmelaminas</b>	Tiotepa
	Altretamina

Tabla 1. Agentes alquilantes más conocidos para el tratamiento contra el cáncer <sup>(9,18,19,20,21)</sup>.

### Antibióticos citotóxicos

Son sustancias naturales producidas fundamentalmente por hongos capaces de alterar el crecimiento de otras células vivas <sup>(9)</sup>. Algunos antibióticos citotóxicos se muestran en la Tabla 2.

<b>Antibióticos Citotóxicos</b>	Bleomicina
	Antraciclinas
	Doxorrubicina
	Daunorrubicina.
	Epirubicina
	Actinomicina D

Tabla 2. Ejemplos de Antibióticos citotóxicos para el tratamiento contra el cáncer <sup>(9,18, 19,20,21)</sup>.

### Antimetabolitos

Estos fármacos tienen una estructura similar a la de los componentes del metabolismo intermediario celular, de modo que interfieren en su metabolismo y en concreto en la síntesis de ácidos nucleicos. Ejercen su acción principalmente sobre tumores de rápido crecimiento <sup>(9)</sup>; algunos de estos ejemplos se especifican en la Tabla 3.

<b>Antimetabolitos</b>	Análogos de pirimidinas (flourouracilo)
	Análogos de purinas (mercaptapurina)
	Antifolatos ( metotrexato)

Tabla 3. Ejemplos de fármacos antimetabólicos para el tratamiento contra el cáncer <sup>(9,29, 30, 31, 32)</sup>.

## Hormonas y antihormonas

Determinadas líneas celulares presentes en algunos tejidos hormono-sensibles muestran una específica dependencia hormonal para su crecimiento y desarrollo, como es el caso de la mama, el endometrio y la próstata en relación con las hormonas gonadales. Por el contrario, otras células, como son las del tejido linfoide, son fuertemente inhibidas por los glucocorticoides. Estos hechos constituyen el fundamento de la terapéutica hormonal de ciertos tumores denominados hormono-dependientes <sup>(30)</sup>. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 4.

<b>Hormonas</b>	Prednisolona
	Dexametasona
	Hidrocortisona
	Dietilestilbestrol (estrógeno sintético)
<b>Antihormonas</b>	Tamoxifeno
	Flutamina

Tabla 4. Hormonas y antihormonas utilizadas para el tratamiento contra el cáncer <sup>(29, 30, 31, 32)</sup>.

### Otros fármacos

Otros antineoplásicos usados en la terapia contra el cáncer se muestran en la Tabla 5.

Camptotecina
Levamisol
Vinblastina
Etopósido
Cis- platino

Tabla 5. Ejemplos de diferentes antineoplásicos presentes en la literatura y que no forman parte de un grupo específico. <sup>(29, 30, 31, 32)</sup>.

Al igual que los compuestos naturales como los Taxanos y las Camptotecinas utilizados en el tratamiento contra el cáncer, hay estudios realizados con flavonoides (encontrados en la dieta natural del hombre) como posibles tratamientos contra enfermedades neoplásicas, teniendo efecto *in vivo* el 2,4-dihidroxi-6-metoxi-3,5-dimetilchalcona, compuesto extraído de una planta llamada *Cleistocalyx operculatus* originaria de China la cual es tomada como infusión por la población de este país <sup>(33)</sup>.

#### 3.8.1. Cis-platino

Es el compuesto inorgánico cis-diaminodichloroplatino (II) en el que el platino se encuentra en estado de oxidación +2, es decir, tiene cuatro enlaces dirigidos hacia las cuatro esquinas de un cuadrado en cuyo centro se encuentra el átomo metálico. El platino forma enlaces covalentes, por lo que sus reacciones se asemejan en cierto modo a las reacciones de sustitución del carbono,



especialmente a las reacciones de alquilación. Actúa de manera preferente sobre las bases del ADN, en particular con el nitrógeno 7 de la guanina debido a su gran nucleofilia, al igual que lo hacen los agentes alquilantes. Además produce enlaces o puentes cruzados entre las dos hebras del ADN, y como consecuencia se produce una fuerte inhibición en la síntesis de ADN <sup>(30)</sup>.

El cis-platino se administra por vía intravenosa y se une también a proteínas, mediante enlaces covalentes, lo cual puede significar la pérdida irreversible de la actividad biológica. La concentración del cis-platino en plasma disminuye inicialmente con rapidez como consecuencia de su paso a los tejidos y de la excreción renal, con una semivida de 10-40 min. Se elimina principalmente por el riñón en las primeras horas (15-60 %), siguiendo después una excreción lenta durante varios días. En pequeña proporción es excretado también por bilis y saliva <sup>(30)</sup>.

El cis-platino es un compuesto utilizado para el tratamiento de las neoplasias de ovario y de testículo. También es un componente de las pautas utilizadas en el cáncer de pulmón de células pequeñas <sup>(29, 30, 31)</sup>, estómago, coriocarcinoma, vejiga urinaria, mama, corteza suprarrenal, cuello uterino, útero, cabeza y cuello, pulmón, linfoma no hodgkiniano y osteosarcoma <sup>(30, 31)</sup>. El cis-platino es mielosupresor y también produce alopecia ligera. Sin embargo, produce

náusea y vómitos intensos relacionados con la dosis, también es nefrotóxico y neurotóxico <sup>(29)</sup>.

### 3.8.2. Compuestos organoestañosos

El estaño es un metal que puede combinarse con otras sustancias químicas para formar varios compuestos. Cuando el estaño se combina con cloro, azufre u oxígeno, se le llama compuesto inorgánico de estaño. En la corteza terrestre se encuentran pequeñas cantidades de compuestos inorgánicos de estaño. También se encuentran en pasta dental, perfumes, jabones, colorantes, aditivos para alimentos y en tinturas. El estaño se combina también con carbono para formar compuestos orgánicos los cuales se usan para fabricar plásticos, envases de alimentos, cañerías de plástico, plaguicidas, preservativos para madera y sustancias para repeler ratas y ratones <sup>(34)</sup>.

Durante las últimas décadas, la investigación sobre nuevos compuestos orgánicos de estaño se ha incrementado notablemente, muy probablemente debido a la diversidad de sus aplicaciones biológicas. Entre sus variadas funciones biológicas destacan su efecto antimicrobiano, antimalárico, antiproliferativo, quimioterapéutico, radiofármaco, insulina-mimético, fungicida <sup>(4)</sup> y como agentes biocidas en pinturas antiincrustantes en barcos <sup>(35)</sup>. Por otra parte, los complejos de estaño (IV) caracterizados por la presencia de uno o más

enlaces carbono-estaño, han demostrado ser citotóxicos contra el adenocarcinoma de mama (MCF – 7) y el carcinoma de colon (WiDr) <sup>(4)</sup>.

El uso de complejos de metal como agente quimioterapéutico en el tratamiento de algunas enfermedades, aparece como una alternativa siendo de mayor interés en agentes antineoplásicos basados en metales. Aunque el diseño del compuesto a base de metal con un buen índice terapéutico es todavía bastante empírico, se han reportado en la literatura un importante número de compuestos basados en metales como bactericidas potentes. Un enfoque que podría producir resultados exitosos implica la coordinación de metales con ligandos con actividad biológica, como los antibióticos, medicamentos contra el cáncer, y algunos otros sustratos biológicamente relevantes. Con estos resultados, es importante hacer hincapié en la necesidad de más investigación sobre la síntesis, aislamiento y caracterización de nuevos compuestos orgánicos de estaño (IV) con actividad biológica importante <sup>(5)</sup>.

En este contexto cabe mencionar que el grupo de investigación del Dr. Norberto Farfán García ha sintetizado compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño, nombrados NK con posible aplicación biológica; por cuestiones de confidencialidad no es posible mostrar la estructura molecular de los compuestos.

### 3.9. Ciclo Celular

El ciclo celular es constituido por una serie ordenada de acontecimientos macromoleculares que llevan a la división celular y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales con cromosomas idénticos a los de la madre <sup>(36)</sup>. Su correcta ejecución en un organismo como el hombre, contribuye a establecer en él una integración estructural y funcional adecuada para hacer frente a las condiciones impuestas por el ambiente <sup>(37)</sup>. El control preciso de los acontecimientos del ciclo celular asegura que la replicación de sus cromosomas y la segregación a sus células hijas se produzcan en el orden apropiado y con una fidelidad extraordinariamente alta <sup>(36)</sup>.

Para que la activación celular se ponga en marcha es necesaria la acción de cualquier estímulo culminando en el correcto funcionamiento de los procesos del ciclo celular mediante reacciones de fosforilación llevadas a cabo por un conjunto específico de proteincinasas, que se encuentran presentes durante todo el ciclo celular, sin embargo, solo son activadas en momentos determinados del ciclo. La activación y desactivación de estas cinasas depende de un segundo grupo de componentes proteicos llamados ciclinas. Es por eso que las cinasas encargadas de controlar el ciclo celular son llamadas proteincinasas dependientes de ciclinas (CDK, *cyclin-dependent protein kinases*) <sup>(38)</sup>. Éstas son moléculas

heterodiméricas cuya función es fosforilar residuos de serina y treonina de proteínas reguladoras específicas <sup>(21)</sup>.

Por otro lado las ciclinas son proteínas sintetizadas durante la interfase y destruidas al final de la mitosis de cada ciclo celular, variando su concentración a lo largo de las diferentes fases <sup>(21)</sup>. El papel de las ciclinas es regular la producción de las cinasas, tanto en actividad como en especificidad de sustrato, al igual que mantener el orden de los eventos del ciclo celular. De ahí, que cada ciclina tenga una localización subcelular diferente <sup>(39)</sup>.

La presencia de ciclinas y de otras moléculas implicadas en la regulación del ciclo varía conforme avanza el ciclo (Figura 4).

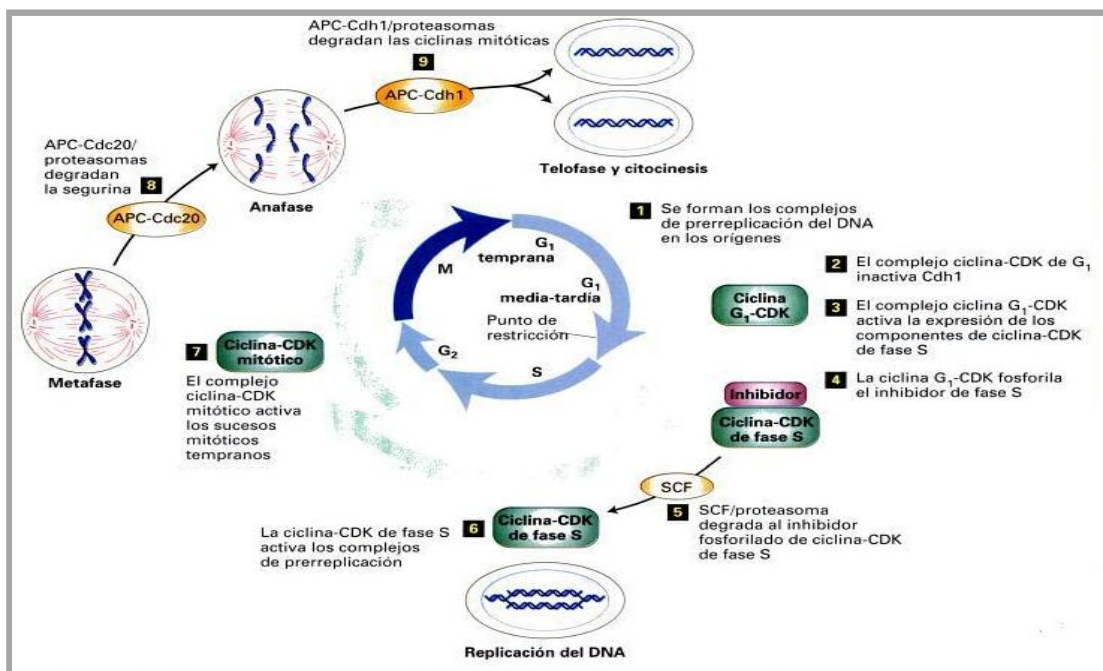


Figura 4: Regulación del ciclo celular en eucariotes. Se muestran las fases del ciclo celular y las ciclinas involucradas en cada una de ellas. (Imagen obtenida del Libro Biología molecular del gen. Ed. Médica Panamericana. 2008. pp. 154)

### 3.9.1. Ciclinas

**La ciclina D1** parece ser la responsable de establecer la decisión de entrada al ciclo celular actuando como sensor de factores de crecimiento <sup>(41)</sup>. La ciclina D1 al formar un complejo con la CDK adecuada (4 ó 6) activa la acción cinasa de esta última, cuyo sustrato principal es la proteína Rb (Retinoblastoma)<sup>(37)</sup>. También es el regulador de la progresión del ciclo celular de G1 a S <sup>(42)</sup>, siendo la actividad del complejo ciclina D/CDK máxima en las etapas temprana e intermedia de G1 <sup>(39)</sup>.

En general, el aumento en la expresión de ciclina D1 se asocia con un peor pronóstico en carcinoma de células escamosas de diferentes localizaciones como cáncer esofaríngeo, cabeza, cuello, pancreático, tiroides, pulmón <sup>(21,39)</sup>, linfomas<sup>(39)</sup>, estómago <sup>(37)</sup>, colon, mama, adenomas de la vesícula biliar, polípos adenomatosos de colon y en la hiperplasia ductal de la mama <sup>(43)</sup>. Sin embargo, en carcinoma cervical esta asociación no es tan clara porque la expresión de ciclina D1 se encuentra disminuida debido a la acción del VPH <sup>(21)</sup>.

**La ciclina A** se asocia con dos quinasas: CDK2 y CDK1. El complejo ciclina A/CDK2 se requiere para la progresión de G1-S, mientras que el complejo ciclina A/CDK1 se requiere para la transición G2-M <sup>(39)</sup>. La ciclina A, que forma un complejo con CDK1, fosforila a proteínas de la membrana nuclear además de estabilizar a la ciclina B <sup>(37)</sup>. A lo largo de G2 va aumentando alcanzando un

máximo en el momento de la fragmentación nuclear <sup>(44)</sup>.

La ciclina A, también se ha encontrado alterada en los cánceres de adenocarcinoma de mama, riñón, páncreas, en melanoma, mesotelioma, en las leucemias linfocítica aguda y mielocítica <sup>(39)</sup>, así como también en carcinomas hepatocelulares y su nivel de sobreexpresión, se relaciona con la agresividad de la enfermedad <sup>(37)</sup>.

**La ciclina B1** es clave en el paso de la fase G2 a la mitosis durante el ciclo celular. Es necesaria para el inicio de la mitosis y por ello se incrementa durante esta fase, para decaer bruscamente en la misma <sup>(43)</sup>. La Ciclina B1 interactúa con CDK1 para formar un complejo conocido como el factor promotor de maduración (MPF), promoviendo la condensación de cromosomas, la resolución lámina nuclear, y el montaje del huso mitótico <sup>(45)</sup>, paso fundamental para que el núcleo se disocie en vesículas <sup>(37)</sup>.

La ciclina B1 promueve la proliferación, la motilidad, la migración y la capacidad de las células tumorales para atravesar los endotelios vasculares. Es sobreexpresada por muchos tumores, entre los cuales están el de pulmón <sup>(43)</sup>, cáncer de cuello uterino, cáncer gástrico, el cáncer colorrectal, de cabeza y cuello escamoso y su regulación al alza está estrechamente asociado con mal pronóstico en varios tipos de cánceres incluyendo el cáncer de mama <sup>(46)</sup>.

### 3.10. Apoptosis

La apoptosis es un proceso genéticamente programado que puede volverse dañino si no está controlado y no responde a los mecanismos homeostáticos. Está asociado a enfermedades como cáncer, neurodegeneración, autoinmunidad, miocardiopatías y otras alteraciones del proceso inflamatorio inmune. Recientemente, la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de citocromo C, así como la activación de proteasas específicas conocidas como caspasas, juegan un papel crítico en el proceso de apoptosis <sup>(47)</sup>.

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso en el cual las células se autodestruyen <sup>(48)</sup>, desencadenado por condiciones fisiológicas o patológicas que constituye un mecanismo para la eliminación de células dañadas, la renovación celular y del tejido <sup>(49)</sup>.

#### 3.10.1 Caracterización

Se caracteriza por la condensación o encogimiento de los componentes del citoplasma, y condensación de la cromatina que lleva a la formación de cuerpos apoptóticos, sin pérdida de ATP <sup>(47, 49)</sup> generando fragmentos de aproximadamente 180 pares de bases, y por lo tanto el mantenimiento de una membrana plasmática intacta <sup>(50,51)</sup>, que después son fagocitados por células vecinas sin generar proceso



de inflamación, ya que no se libera contenido intracelular en el medio extracelular. Cuando hay suficiente energía para que se lleve a cabo la muerte celular será por apoptosis y si requiere energía será por medio de necrosis <sup>(47)</sup>. En la ausencia de fagocitos, los cuerpos apoptóticos pueden proceder a la lisis o necrosis <sup>(50,51)</sup>.

En la Figura 5 se observan las diferencias morfológicas entre apoptosis y necrosis. Por lo general, se necesitan varias horas desde el inicio de la muerte celular a la fragmentación celular final, aunque el tiempo depende del tipo de célula, el estímulo, y la vía apoptótica <sup>(50)</sup>.

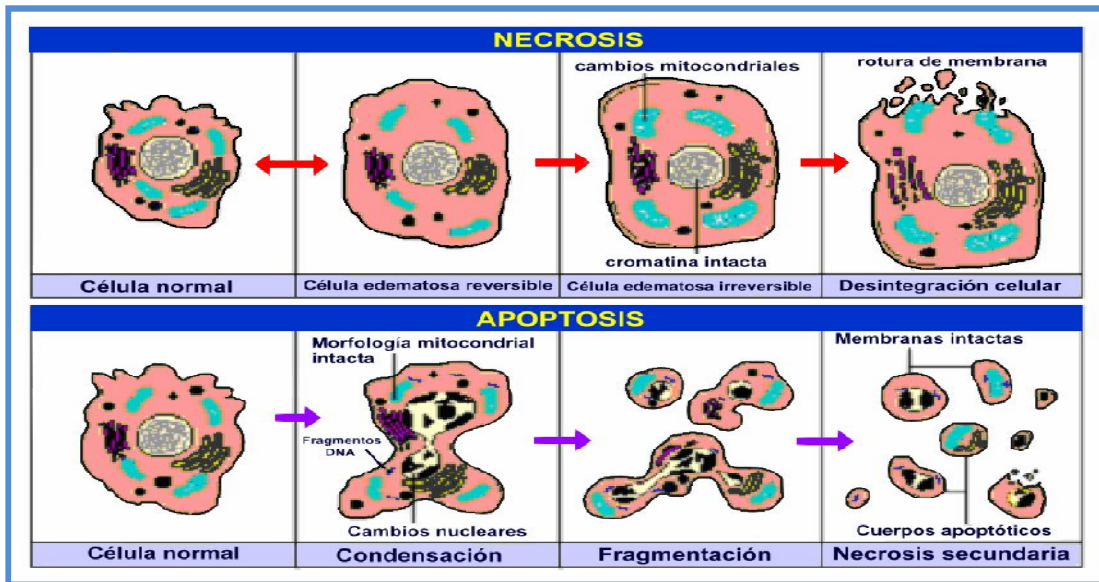
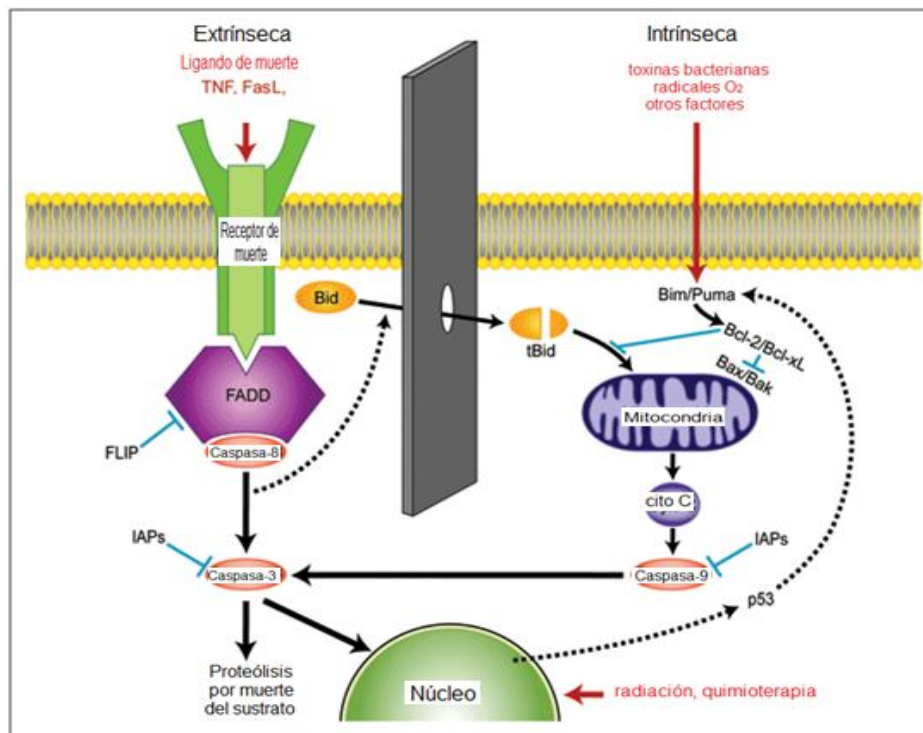


Figura 5: Diferencias morfológicas entre Apoptosis y Necrosis. (Imagen obtenida de Bases moleculares de la apoptosis. Academia Nacional de Farmacia. 2003)

### 3.10.2. Iniciación

Los procesos apoptóticos pueden ser activados bien, por una inducción negativa o interna (intrínseca) como en la pérdida de una actividad supresora, la falta de factores de crecimiento o la disminución de los contactos con las células que la rodean <sup>(48)</sup> o bien por una inducción positiva o externa (extrínseca) por un ligando unido a los receptores específicos de la membrana plasmática. La inducción positiva involucra ligandos que transducen una señal, a esa porción se le llama dominio de muerte. La inducción negativa se produce por la pérdida de la actividad supresora a cargo de una familia de proteínas específicas que se relacionan con la mitocondria liberándose citocromo C que dispara la actividad de las proteasas encargadas de ejecutar la apoptosis <sup>(47)</sup> (Figura 6) <sup>(52)</sup>.



**Figura 6: Vía extrínseca e intrínseca para la activación de la apoptosis. (Imagen obtenida y editada de Inhibición de la apoptosis de los linfocitos como nueva forma de combatir enfermedades infecciosas graves. Revista Química Viva. 2007)**

Las caspasas implicadas en la apoptosis pueden ser divididas en dos subgrupos en función de su estructura y los aspectos temporales, cuya principal función parece ser el procesamiento de citoquinas proinflamatorias y la muerte celular <sup>(51)</sup>, estas se encuentran como procaspasas que deben cortarse para ser activadas <sup>(36)</sup>.

Las caspasas iniciadoras (2, 8, 9, y 10) tienen largos predominios y son los responsables principales de iniciar la activación de la cascada de caspasas. La activación de éstas requiere la dimerización, que está mediada por la unión de sus predominios al dominio efector de muerte. Después de la activación las caspasas iniciadoras se propagan señales de muerte mediante la activación de las caspasas efectoras en una forma de cascada <sup>(51)</sup>.

#### **3.10.3. Ejecución**

Las caspasas efectoras (3, 6, y 7) generalmente contienen sólo un pequeño predominio y son responsables para el desmantelamiento real de la célula mediante la escisión de sustratos celulares. Las caspasas efectoras se convierten en su forma activa a través de la proteólisis. Las proteínas de andamiaje de la envoltura nuclear, son encendidas por las caspasas efectoras, lo que lleva a la contracción nuclear y la fragmentación <sup>(51)</sup>.

Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas entre ellas, moléculas que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el proceso apoptótico. Entre estos activadores de muerte se encuentran el TNF $\alpha$  que se une al TNFR y el ligando Fas (FasL)<sup>(53)</sup>, desencadenando la señal luego de la unión del ligando a su receptor Fas. Este receptor tiene una cola citoplásmica que cuando cambia su conformación se une a FADD (fas associated death domain proteins). FADD luego se une a procaspasa 8 donde es activada, e inicia una cascada proteolítica letal <sup>(47, 50)</sup>; a este complejo se le ha denominado DISC (complejo de señalización inductor de muerte) <sup>(54)</sup>. Sin embargo alternativamente, puede activar la cascada de caspasas indirectamente por la vía mitocondrial mediante el rompimiento de Bid, un miembro pro apoptótico de la familia Bcl-2, esto se logra cuando Bid se une a Bax de membrana sirviendo como receptor y formadores de poros el cual se adhiere a la membrana externa mitocondrial, favoreciendo la liberación de citocromo C <sup>(49, 53,54,55)</sup> logrando activar a la caspasa 9 que al igual que la caspasa 8, activan a las caspasas ejecutoras <sup>(53)</sup>.

La activación de la vía mitocondrial es inducida por diversos estímulos de daño a la integridad del ADN, por ejemplo radiación <sup>(50, 55)</sup>, estrés oxidativo o grandes cambios de la homeostasis celular <sup>(55)</sup>. El mecanismo intrínseco implica la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria como el citocromo C, el

factor inductor de la apoptosis (AIF), ATP, proteínas del shock calórico y las proteínas Diablo/Smac<sup>(47)</sup>.

#### **3.10.4 BCI-2**

Todos los miembros BCI-2 están localizados en la membrana mitocondrial externa. Son dímeros responsables de la permeabilidad de esta membrana, sea en la forma de canal iónico o a través de la creación de poros<sup>(56)</sup>. Tiene miembros proapoptóticos (Bax, Bid y bad) como antiapoptóticos (BCI-2, BCI-XL)<sup>(57)</sup>, que son activados por la proteína supresora tumoral p53<sup>(55)</sup>, al igual que las proteínas BH3, Noxa y PUMA. Cuando p53 se eleva y permanece elevada durante un tiempo prolongado se desencadena la apoptosis por inducción de la expresión de Bax, que se asocia con el complejo de poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC)<sup>(48, 53)</sup>, quedando en libertad los factores antes mencionados. El citocromo C junto con el ATP y el factor activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) forman un complejo llamado apoptosoma, que regula la activación de la caspasa 9 que a su vez activará a las caspasas 3, 6 y 7<sup>(3,54)</sup>, desencadenando la cascada de caspasas y estas encendiendo el activador de fragmentación de ADN. La familia BCI 2 podrá unirse a Apaf 1 para secuestrarla de la unión de la caspasa y suprimir el proceso de apoptosis<sup>(47, 48)</sup>.

### 3.10.5. Caspasas

Durante la apoptosis se presentan profundos cambios en las células que son mediados, en gran parte, por las caspasas. Las procaspasas son una familia de cisteín-proteasas que se encuentran como moléculas precursoras inactivas que al recibir la señal apoptogénica sufren un rompimiento proteolítico y dan lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa o caspasa. Las procaspasas constan de un prodominio N-terminal y dos subunidades, una grande p20 y otra pequeña p10 (55). El prodominio largo contiene el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD). DED y CARD pertenecientes a la superfamilia de los dominios de muerte <sup>(53)</sup>.

Las procaspasas desempeñan papeles críticos en diversas fases de la apoptosis como la fragmentación de ADN, son una serie de sustratos de la caspasa que están implicados en la reparación del ADN y la replicación. Alguno de ellos son el DFF (DNA fragmentation factor) 40 y CAD (caspase-activated DNase). Ambas proteínas son constitutivamente presente en forma de heterodímeros con proteínas inhibitoras DFF45 e inhibidor de CAD (ICAD). Al activarse, DFF40 y CAD son capaces de fragmentar ADN junto con un gran número de otras endonucleasas que participan en la apoptosis <sup>(50,51)</sup>. La activación de CAD se produce a través de la escisión de ICAD mediada por la caspasa 3, así, la célula pierde su forma probablemente causada por la escisión de las proteínas del citoesqueleto, tales como fodrina, la gelsolina y la actina <sup>(51)</sup>.

Otra proteína mitocondrial que da lugar a apoptosis independiente a la vía de caspasas es AIF (Factor inductor de apoptosis), produciendo principalmente condensación de la cromatina nuclear y fragmentación de ADN <sup>(53, 57)</sup>.

Otras proteínas mitocondriales que interviene en este mecanismo de muerte celular, a través de regulación de caspasas, es Smac/DIABLO y Omi/HtrA2. Sus efectos apoptóticos los ejercen a través de la activación de caspasas por la inhibición de una familia de proteínas inhibidoras de apoptosis, conocidas como IAP <sup>(57)</sup>. Existen unos cinco miembros de esta familia: cIAP1, cIAP2, XIAP, NAIP y survivina <sup>(53,55)</sup>. La IAP1 y 2 inhiben la activación de las caspasas efectoras (3, 7) y la caspasa ejecutora (9). La XIAP inhibe también la acción de la caspasa 3. Sin embargo, estas proteínas no son efectivas en la prevención de la actividad de las caspasas asociados con los receptores de muerte, tales como la caspasa 2 y 8. El inhibidor de la caspasa 8 se ha identificado como FLIP, que evita la apoptosis mediante la unión a la DISC <sup>(47)</sup>.

De esta forma la célula es protegida de eventuales activaciones inespecíficas de estímulos por debajo del umbral apoptótico y mantienen en estado latente a las procaspasas <sup>(55)</sup>, mediante el funcionamiento fisiológico normal, incluyendo la prevención de hinchazón mitocondrial y rotura, y mantenimiento del metabolismo mitocondrial <sup>(47)</sup>.

### 3.10.6. Detección de apoptosis

La detección de apoptosis ha adquirido gran importancia en el área del cáncer, ya que puede ser útil para conocer el mecanismo de acción de fármacos, mecanismos asociados a la naturaleza de la enfermedad, entre otros <sup>(58)</sup>.

Se ha clasificado los métodos de detección de apoptosis en: 1) alteraciones morfológicas; 2) fragmentación de ADN; 3) detección de caspasas; 4) alteraciones de membrana; y 5) ensayos mitocondriales <sup>(59)</sup>.

1) Para determinar estos cambios en la célula apoptótica se pueden utilizar tanto la microscopia de luz (campo claro, fluorescencia), como la microscopia electrónica. Por medio de la microscopia de luz se pueden apreciar cambios en la organización celular, tales como la condensación de la cromatina o la aparición de cuerpos apoptóticos y para apreciar alteraciones celulares como cambios en microvellosidades, así como alteraciones mitocondriales o del retículo endoplásmico es necesario recurrir a la microscopia electrónica <sup>(58)</sup>.

2) La fragmentación de ADN en una célula apoptótica se puede detectar mediante extracción de ADN y separación mediante electroforesis en gel de agarosa. Se ha establecido que se deben observar bandas de tamaño aproximado de 180 a 200 pares de bases. Se utilizan marcadores para pruebas fluorométricas como: 7- aminoactinomicina D, naranja de acridina, diamidino fenil indol, etidio



mono-ácido y bromuro de etidio. Uno de los ensayos históricamente significativos es el denominado Tunel, el cual es implementado para determinar los fragmentos de ADN cortados por la acción de endonucleasas, marcándolos colorimétrica o fluorescentemente mediante un proceso enzimático, y visualizándolos en microscopio de luz, de fluorescencia o citómetro de flujo <sup>(59)</sup>.

3) La activación de la caspasa 3 se utiliza como marcador temprano de la apoptosis. Este tipo de marcadores es de gran importancia, ya que la detección de apoptosis in vivo por métodos que detectan la degradación de DNA <sup>(58)</sup>.

4) Otro evento temprano presente en la apoptosis es la pérdida de la simetría de la membrana citoplasmática. Es bien sabido que la apoptosis es un proceso de muerte en el que la integridad de la membrana se mantiene, lo cual significa que la característica de ser semipermeable está presente, sin embargo se presentan cambios en su simetría. Al agregar anexina V la cual es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana, y que tiene una alta afinidad por la fosfatidil serina, por lo que aquellas células que se encuentran marcadas con anexina V, serán aquellas que se encuentran en apoptosis. La detección de anexina V se puede acompañar de una tinción con yoduro de propidio, lo cual nos permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido. Esto permite conocer si la célula se encuentra en una etapa temprana de la muerte celular, o si se encuentra en una etapa tardía en la cual ya se encuentra presente la necrosis secundaria <sup>(58)</sup>.

5) Se ha registrado que, en lo que concierne a esta vía, se puede determinar la transición de permeabilidad mitocondrial, el estado de oxidorreducción, la actividad metabólica mitocondrial, la liberación de citocromo c, proteínas reguladoras pro o anti-apoptóticas, entre otros factores. Se sabe que la pérdida de potencial transmembranal mitocondrial puede ser evaluada en citometría de flujo utilizando fluorocromos lipofílicos catiónicos permeables <sup>(59)</sup>.

### **3.10.7. Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica (IHQ) se refiere al proceso en el que se usan anticuerpos para detectar antígenos en una muestra biológica. Utilizando la unión específica de los anticuerpos con los antígenos, es posible localizar y visualizar dichos antígenos diana en las muestras gracias a los anticuerpos específicos marcados con fluoróforos o enzimas, siendo estas últimas las más utilizadas en IHQ<sup>(60)</sup>.

La IHQ utiliza como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. Las enzimas más utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina. Estos marcadores pueden unirse directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante anticuerpos secundarios biotilizados <sup>(61)</sup>.

La inmunohistoquímica permite una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio de luz. El material así estudiado puede archivar por años sin pérdida de la intensidad de la reacción. La inmunohistoquímica tiene utilidad diagnóstica en identificación de diferenciación y de marcadores pronósticos de neoplasias (marcadores tumorales)<sup>(61)</sup>.

#### **3.10.8. Reacción de TUNEL**

La reacción de TUNEL (TdT-mediated dUTP –biotin nick end –labeling), que se fundamenta en el marcaje de los terminales 3-OH de fragmentos oligonucleosómicos del DNA y que pueden ser identificados por inmunohistoquímica mediante la incorporación de trifosfatos de nucleósidos marcados con fluoresceína incorporado que es detectado por el anticuerpo anti-fluoresceína fragmento Fab de ovejas, conjugados con peroxidasa después de la reacción del sustrato, las células teñidas se analizaron bajo microscopio de luz <sup>(62, 63)</sup>. El ensayo de TUNEL, es de los métodos que resultan más confiables <sup>(58)</sup>, directo y selectivo para detectar la fragmentación del ADN, que es una característica de la apoptosis, o muerte celular programada <sup>(64,65)</sup>.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es un problema de salud pública que afecta a pacientes y familiares, buscando para el paciente oncológico una mejor calidad de vida. Dado que las personas viven más años, el riesgo de contraer esta enfermedad se encuentra en aumento. La meta ideal terapéutica del cáncer es acabar con él de manera inocua. Dentro de esta meta se involucra encontrar un fármaco que pueda activar la muerte celular selectiva de las células neoplásicas, sin dañar las células normales.

Los tratamientos contra las enfermedades neoplásicas son variados y presentan en su mayoría difíciles efectos secundarios. Una gran problemática dentro del tratamiento contra el cáncer es la resistencia a medicamentos antineoplásicos, por tal motivo el propósito del presente trabajo **es evaluar la posible actividad biológica de los compuestos organoestañosos junto con fármacos comerciales, en la viabilidad de líneas celulares tumorales humanas de diferentes tipos de cáncer que afecta de manera importante a la población de nuestro país y con ello encontrar nuevos fármacos antineoplásicos que reduzca los efectos secundarios y la múltiple resistencia.**

## 5. HIPÓTESIS

Los compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño NK-58 y NK-88 provocarán una disminución en la proliferación celular de las líneas tumorales humanas PC-3 (adenocarcinoma prostático), HeLa (carcinoma de cuello uterino), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y HCT-15 (carcinoma colon rectal), e inducirán apoptosis mediante el marcaje de ADN fragmentado, al igual que una disminución de las ciclinas D1, A y B1 sobreexpresadas en diversos cánceres.

## 6. OBJETIVOS

### Objetivo General

- ◆ Determinar el efecto citotóxico de los compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño NK-58 y NK-88, en la viabilidad de las líneas celulares tumorales humanas MCF-7, HeLa, HCT-15 y PC-3

### Objetivos particulares

- ◆ Determinar la concentración inhibitoria para disminuir al 50% la proliferación de las células cultivadas (CI 50) de cada línea tumoral humana tratadas con los compuestos NK-58 y NK-88.
- ◆ Evaluar la expresión de las Ciclinas D1, A y B1 en las células tumorales trabajadas, en contacto con los compuestos NK-58 y NK-88.
- ◆ Determinar si los compuestos NK-58 y NK-88 provocan la muerte celular por apoptosis.

## 7. METODOLOGÍA

Las líneas celulares tumorales trabajadas fueron:

**MCF-7:** Línea celular derivada de adenocarcinoma mamario humano (acrónimo de Michigan Cancer Foundation)

**HeLa:** Línea celular derivada de carcinoma de cuello uterino estadio IVB (acrónimo He\*nrietta\* La\*cks\*).

**PC-3:** Línea celular derivada de adenocarcinoma prostático grado IV.

**HCT-15:** Línea celular derivada de carcinoma colono rectal.

Compuestos trabajados:

Compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño (IV) llamados NK-58 y NK-88

### 7.1. Cultivo Celular

#### 7.1.1. Descongelación de células

Descongelar rápidamente las células contenidas en el criotubo, agitando suavemente hasta quedar descongelado.



Quitar exceso de DMSO (dimetilsulfóxido) con 9 mL de la solución de lavado (PBS) y centrifugar a 1500 rpm durante 5 min. Todo en campanas de flujo laminar.



Aspirar sobrenadante, resuspender el botón con 1 mL de medio suplementado RPMI-1640/DMEM con SFB al 10%, antibióticos y aminoácidos al 1%. Hacer conteo celular.

**7.1.2 Viabilidad celular con Azul de Tripano**

Para realizar el conteo, mezclar 50  $\mu\text{L}$  de azul de Tripano al 0.4% y 50  $\mu\text{L}$  de las células suspendidas con anterioridad y colocar 9  $\mu\text{L}$  de la mezcla en la cámara de Neubauer.



Colocar la cámara sobre el microscopio, y determinar la viabilidad celular, contando las células teñidas de azul (muertas) y las translúcidas (vivas).



$$\% \text{Viabilidad} = \frac{\text{número de células vivas}}{\text{total de células contadas}} \times 100$$

(No teñidas)                      (Teñidas v no teñidas)



Una vez contadas, sembrar aproximadamente  $3 \times 10^5$  células y cambiar el medio después de 1h. Mantener las células en cámara húmeda a  $37^\circ\text{C}$  y con 5% de  $\text{CO}_2$ , hasta llegar a confluencia (células en monocapa). Cambiar medio cada dos días.



Al llegar a confluencia, agregar 2-3 mL de Tripsina- EDTA al 0.25% para disgregar las células agitando suavemente.



Para detener la reacción de Tripsina se agrega 4-5 mL de medio de lavado, se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min., aspirar sobrenadante y resuspender el botón en 1mL de medio suplementado.



Realizar el conteo celular como se describió anteriormente y preparar una dilución celular de  $10^6$  células/mL



**7.2. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD**

Células en suspensión. Microplacas de 96 pozos



Agregar 100  $\mu\text{L}$  de medio suplementado y  $2 \times 10^4$  células por pozo. Dejar proliferar por 24 h en cámara húmeda a 37 °C y con 5% de  $\text{CO}_2$



Después de 24 h, aspirar y colocar 100  $\mu\text{L}$  de medio suplementado al pozo que servirá como blanco y 90  $\mu\text{L}$  de medio suplementado más los 10  $\mu\text{L}$  de los compuestos NK-58 y NK-88 a 0.01, 0.1, 1 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a los demás pozos.



Dejar incubar por 24 h y 48 h en cámara húmeda a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$



Fijar las células con 100  $\mu\text{L}$  de ácido Tricloroacético (TCA) al 10% durante una hora a 4 °C



Teñir con 50  $\mu\text{L}$  de sulforrodamina B (SRB) al 0.4 % (con ácido acético al 1%) durante 30 min. y lavar 4 veces con ácido acético al 1 % . Dejar secar a temperatura ambiente.



Agregar 100  $\mu\text{L}$  de Tris base (para solubilizar el colorante) 10 mM (pH 10.5) durante 5 min. Con agitación suave y leer en el espectrofotómetro a 564 nm.

**7.3. Congelación celular**

Al llegar a confluencia, agregar 2-3 mL de Tripsina- EDTA al 0.25% para disgregar las células agitando suavemente.



Para detener la reacción de Tripsina se agrega 4-5 mL de medio de lavado, se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min., aspirar sobrenadante y resuspender el botón en 1mL de medio suplementado.



Determinar la viabilidad celular con azul Tripano, si la viabilidad es muy baja no continuar.



Resuspender las células en el medio de cultivo de congelación a una concentración de  $1.5-3 \times 10^6$  células/ mL.



Rotular los crioviales con: Tipo de células, fecha, concentración y nombre de quien congeló. Almacenarlos en nitrógeno líquido ( $-190^{\circ}\text{C}$ ).

**7.4. INMUNOCITOQUÍMICA**

Fijar con 95 mL de alcohol etílico, 5 mL de ácido acético glacial y 5 mL de agua destilada, durante 30 min. a temperatura ambiente.

Rehidratar empleando alcohol etílico a diferentes concentraciones (100%, 96%, 70%, 50%) y agua.

Recuperación antigénica con citrato de sodio 0.1 M, pH 6 con Tween 20 al 0.1 % en olla de presión a 121 °C, 15 lb, 10 min. y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Adicionar peróxido de hidrógeno al 10% a las muestras durante 5 minutos.

Lavar con Tris buffer con Tween 20, pH 7.2-7.6 por 5 min.

Adicionar el anticuerpo primario a la concentración indicada, incubar 30 min. a temperatura ambiente.

Lavar con Tris buffer con Tween 20, pH 7.2-7.6 por 5 min.

Adicionar el anticuerpo secundario biotilado (solución amarilla), incubar 15 min. a temperatura ambiente.

Lavar con Tris buffer con Tween 20, pH 7.2-7.6 por 5 min.

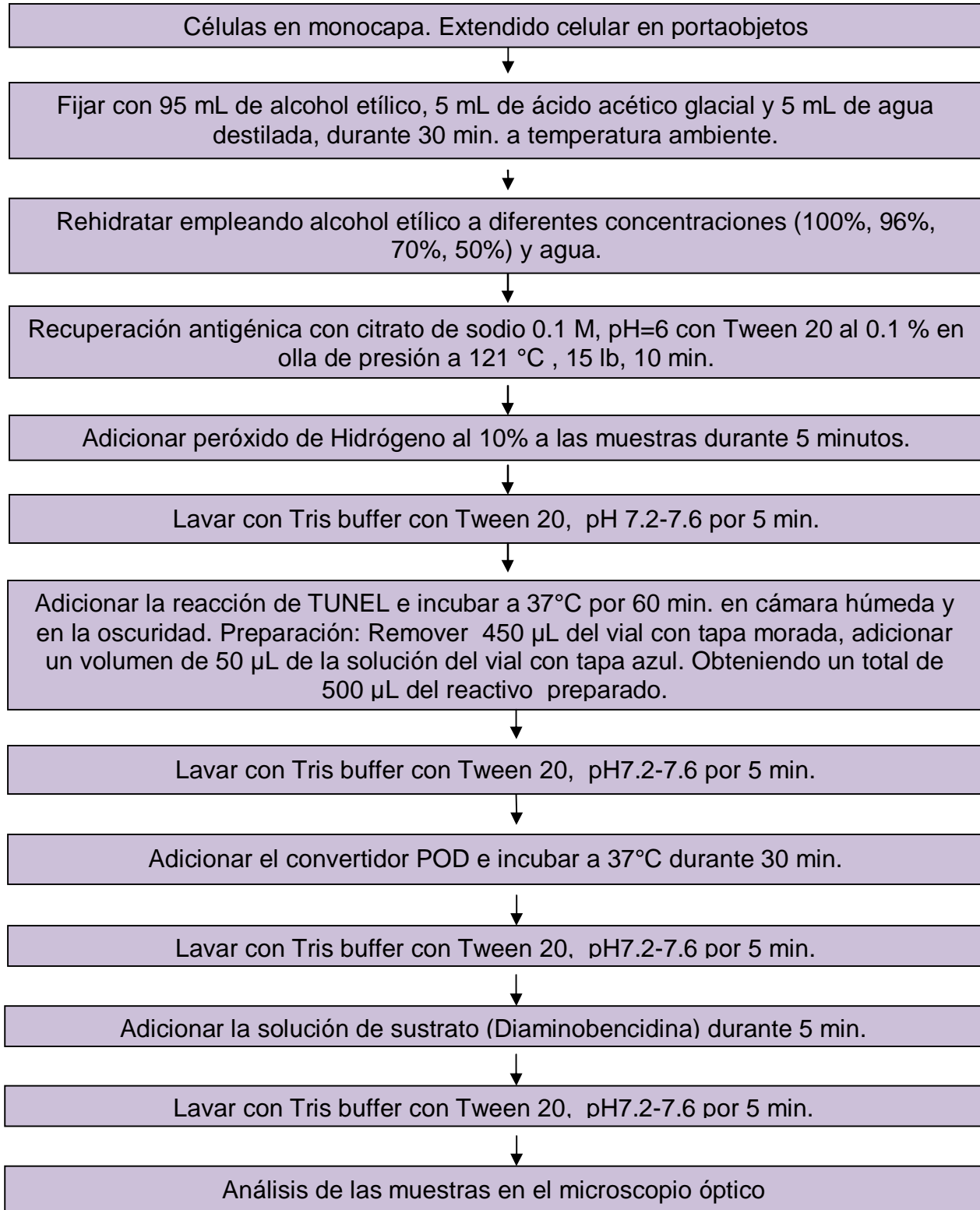
Adicionar la estreptavidina conjugada con peroxidasa (frasco con solución roja), incubar 15 min. a temperatura ambiente.

Lavar con Tris buffer con Tween 20, pH 7.2-7.6 por 5 min.

Adicionar la solución de sustrato (Diaminobencidina) durante 5 min.

Lavar con Tris buffer con Tween 20, pH 7.2-7.6 por 5 min.

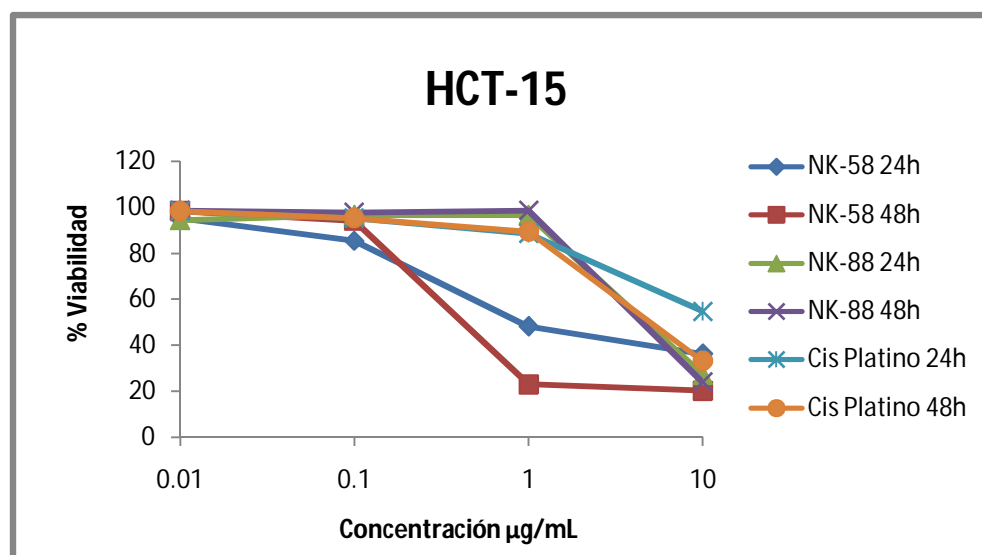
Analizar las muestras en el microscopio óptico

**7.5. ENSAYO DE TUNEL**

## 8. RESULTADOS

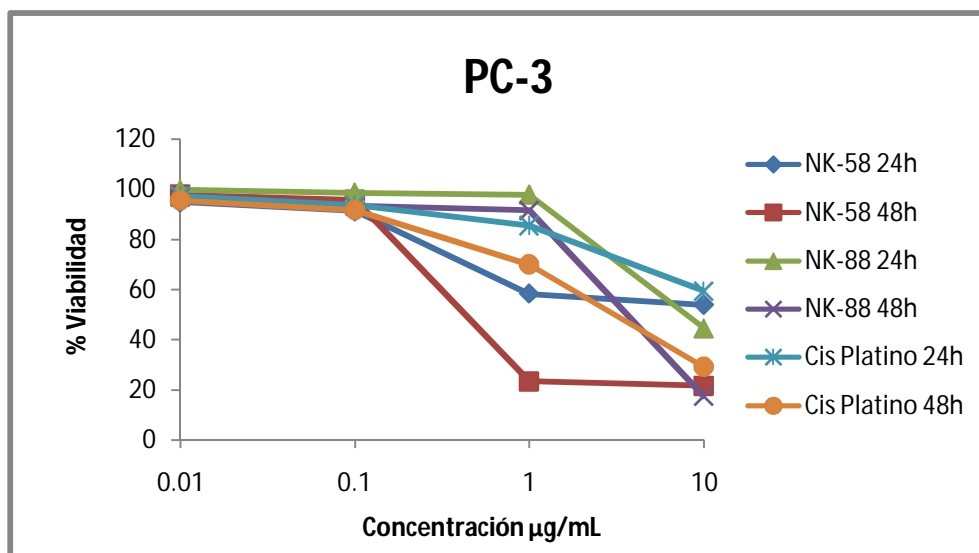
### 8.1. Efecto citotóxico sobre líneas celulares tumorales humanas

Se determinó el efecto citotóxico de los compuestos organometálicos de estaño NK-58 y NK-88 presentan efectos citotóxicos sobre las líneas celulares tumorales humanas HeLa, HCT-15, PC-3 y MCF-7 empleando el cis-platino como control positivo, a las siguientes concentraciones 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{g/mL}$ .



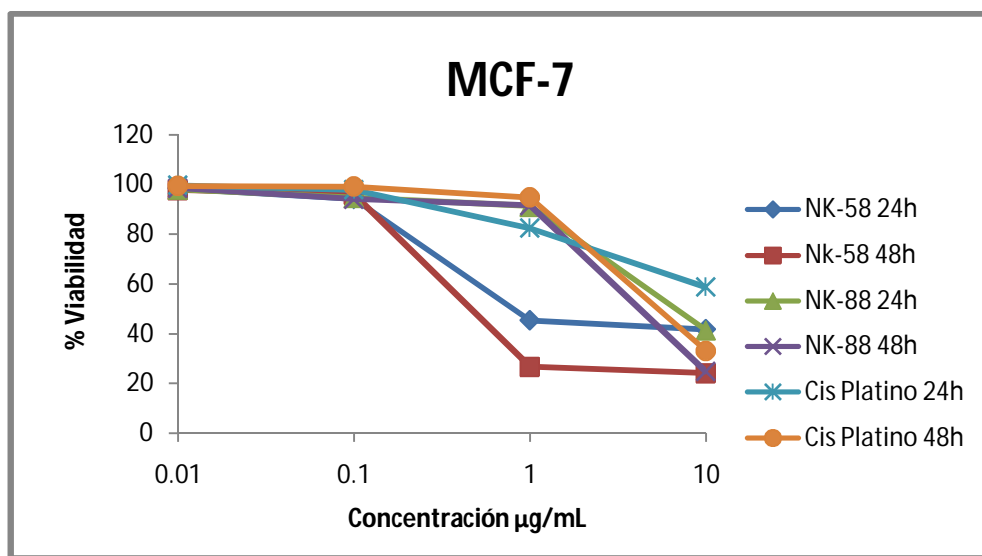
Gráfica 1: Efecto Citotóxico de los compuestos NK-58, NK-88 y cis platino sobre la línea celular HCT-15, expuesta durante 24h y 48h a cada compuesto.

En la gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos para ambos compuestos sobre la línea celular HCT-15, teniendo un porcentaje de viabilidad menor que el control positivo (cis-platino), observándose mucho mejor esta tendencia a 48h. El compuesto con mayor actividad es el NK-58 a 24h y 48h.



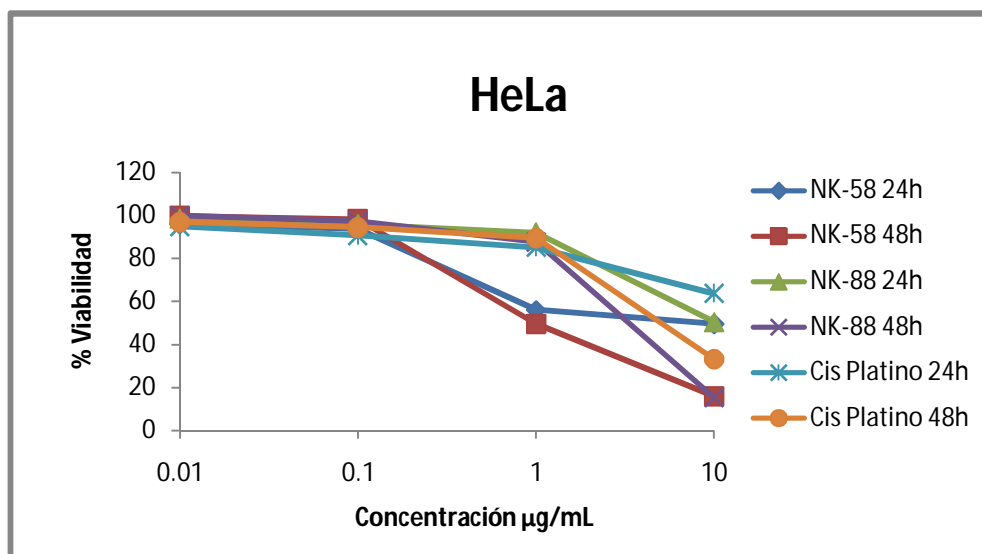
Gráfica 2: Efecto Citotóxico de los compuestos NK-58, NK-88 y cis-platino sobre la línea celular PC-3 expuesta durante 24h y 48h a cada compuesto.

En la gráfica 2 se muestra que ambos compuestos organometálicos de estaño, tuvieron una respuesta citotóxica mayor que el cis-platino, y que, de igual manera se observa un mayor efecto a las 48h que a 24 horas. Se observa nuevamente que el compuesto NK-58 tiene un buen efecto antiproliferativo a las 24h.



Gráfica 3: Efecto Citotóxico de los compuestos NK-58, NK-88 y cis-platino sobre la línea celular MCF-7 expuestos durante 24h y 48h a cada compuesto.

En la gráfica 3 se observa que los compuestos NK-58 y NK-88 presentan un mayor efecto citotóxico que el control positivo, habiendo una mayor muerte celular a 48h que a 24h. El mayor efecto de muerte celular se le atribuye al NK-58 con un buen efecto desde las 24h de exposición.



Grafica 4: Efecto Citotóxico de los compuestos NK-58, NK-88 y cis-platino sobre la línea celular HeLa expuestos durante 24h y 48h a cada compuesto.

En todas las líneas trabajadas se encontró que los compuestos tuvieron una mayor actividad citotóxica con respecto al control y HeLa no fue la excepción, habiendo una mayor actividad en el compuesto NK-58 a 24h y 48h que en el NK-88, ya que su mayor actividad se encontró a 48h con una concentración de 10 µg/mL.

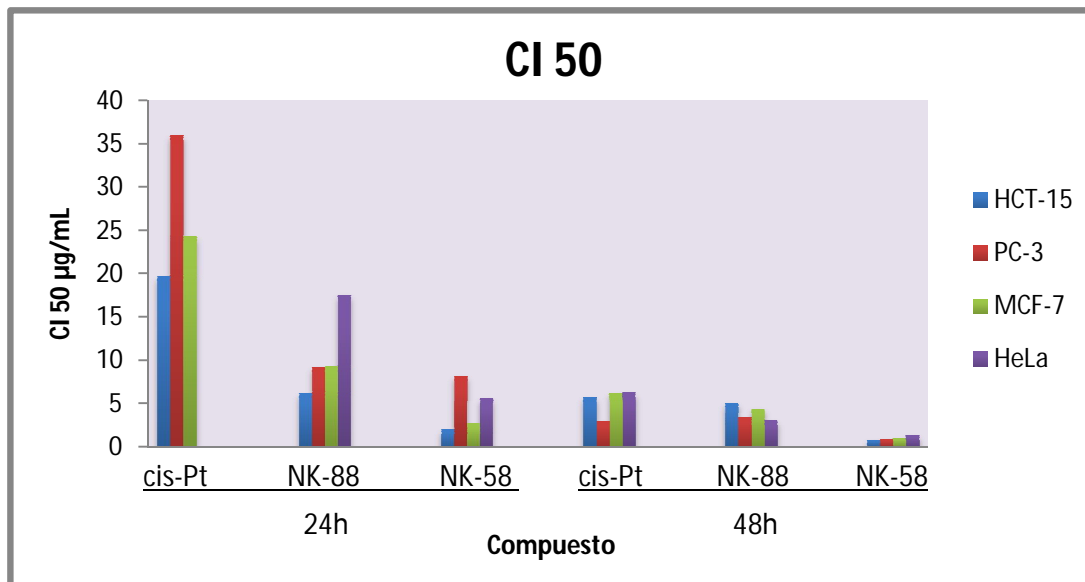


Una vez que se demostró que los compuestos tienen actividad citotóxica sobre las diferentes líneas celulares tumorales humanas, se procedió a determinar la concentración inhibitoria a la cual se muere el cincuenta por ciento de la población celular (CI-50), esta fue calculada para cada línea celular y a diferentes tiempos (Tabla 6) a partir de un programa estadístico PROBIT SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

**Tabla 6. Efecto antiproliferativo de compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño (CI50)**

	Tiempo de exposición	Línea Celular CI 50							
		HCT-15 (µg/mL)	HCT-15 (µM)	PC-3 (µg/mL)	PC-3 (µM)	MCF-7 (µg/mL)	MCF-7 (µM)	HeLa (µg/mL)	HeLa (µM)
<b>NK-58</b>	24h	2.02	4.58	8.212	18.6	2.687	6.09	5.651	12.8
	48h	0.791	1.79	0.878	1.99	1	2.27	1.341	3.04
<b>NK-88</b>	24h	6.261	10.518	9.226	15.49	9.277	15.5	17.606	29.57
	48h	5.088	8.547	3.43	5.76	4.435	7.45	3.152	5.295
<b>Cis Platino</b>	24h	19.692	65.3	36.073	>100	24.368	80.9	>100	>100
	48h	5.761	19.1	2.995	9.94	6.249	20.75	6.308	20.94

En la tabla se muestra la concentración a la cual se inhibe el 50% de la proliferación celular tratados con los compuestos NK-58, NK-88 y cis-platino expuestos a cada línea tumoral trabajada a diferentes tiempos.



Gráfica 5: Concentración inhibitoria 50 de los compuestos NK-58, NK-88 y cis-platino sobre la línea celular HeLa, PC-3, MCF-7 y HCT-15 expuestos durante 24h y 48h a cada compuesto.

Con respecto a los resultados obtenidos se observa que el porcentaje de viabilidad de las células es dependiente de la concentración de los compuestos objeto de estudio. Los datos exponen que los compuestos NK-58 y NK-88 tienen mejor efecto antiproliferativo sobre las cuatro líneas celulares, que el compuesto utilizado como control positivo tanto a 24h como a 48h.

Observando lo que muestra la Tabla 6 y la gráfica 5 podemos decir que para todas las líneas celulares utilizadas el compuesto que requiere una menor concentración para inhibir el crecimiento del cincuenta por ciento de la población es el NK-58 a 24 y 48h.

Ambos compuestos lograron inhibir el cincuenta por ciento de la población celular a dosis menores de 20µg/mL teniendo una mejor acción sobre cada línea celular que el compuesto utilizado como referencia.

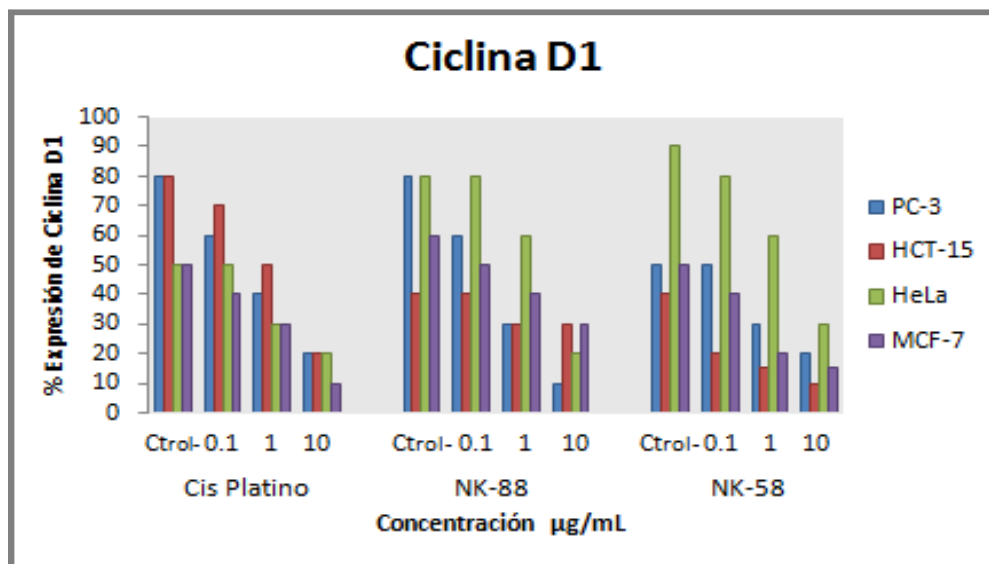
## 8.2. Expresión de ciclinas por acción de compuestos organometálicos de estaño sobre líneas celulares tumorales humanas

Los compuestos organometálicos de estaño dieron como evidencia la disminución del número celular sobre las líneas celulares trabajadas. Tal disminución pudo deberse a algún efecto sobre el ciclo celular, por este motivo las líneas celulares HCT-15, PC-3, MCF-7 y HeLa, fueron expuestas ante los compuestos NK-58, NK-88 y cis platino, para observar la expresión de diversas ciclinas. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 7, 8, 9 y gráficas 6,7, 8.

Tabla 7. Expresión de la Ciclina D1 sobre líneas celulares tratadas con diferentes compuestos.

Com puesto	µg/ mL	Línea celular															
		PC-3				HCT-15				HeLa				MCF-7			
		Ctrol-	0.1	1	10	Ctrol-	0.1	1	10	Ctrol-	0.1	1	10	Ctrol-	0.1	1	10
NK-58	%	50	50	30	20	40	20	15	10	90	80	60	30	50	40	20	15
	inten	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(2+)	(2+)	(2+)	(1+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)
NK-88	%	80	60	30	10	40	40	30	30	80	80	60	20	60	50	40	30
	inten	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)
Cis- Platino	%	80	60	40	20	80	70	50	20	50	50	30	20	50	40	30	10
	inten	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(2+)

La tabla muestra los resultados obtenidos de la inmunocitoquímica, donde nos dice la concentración de cada compuesto sobre cada línea celular, el porcentaje de expresión de la ciclina D1 y la intensidad con la cual ocurrió dicha expresión.



Gráfica 6: Expresión de Ciclina D1 sobre líneas celulares tumorales tratadas con el compuesto NK-58, NK-88 y cis -platino

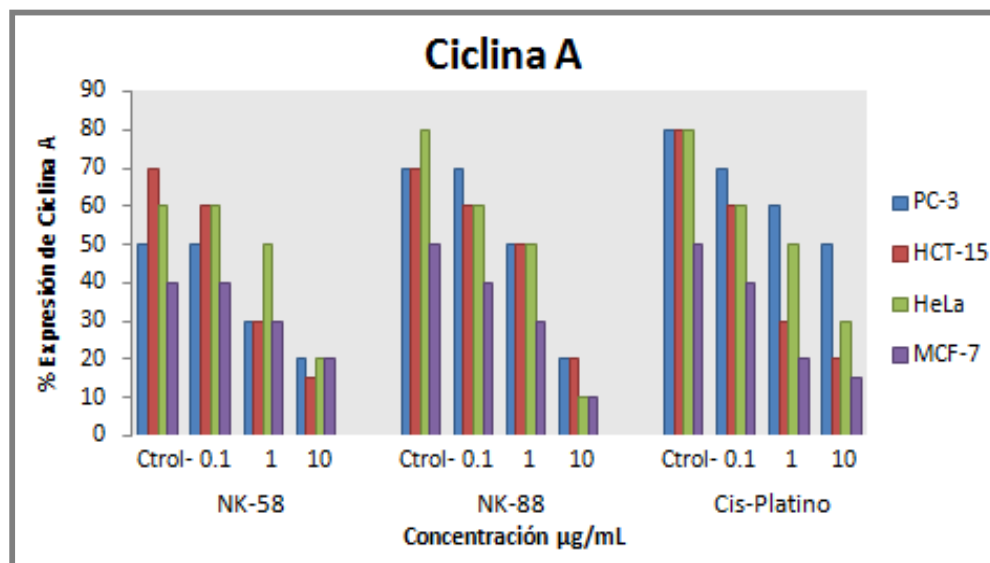
Con respecto a los resultados de la Tabla 7 y la gráfica 6, podemos decir que la intensidad de expresión de la Ciclina D1 fue de 3+ excepto para la línea HCT-15 tratada con el compuesto NK-58 que presenta una intensidad de 2+. La expresión de la Ciclina D1 disminuyó conforme aumentó la concentración de los compuestos de prueba.

En las líneas celulares MCF-7 y HCT-15 hay una disminución de la ciclina D1 cuando fueron tratadas con cis-platino (control positivo) que al ser tratadas con los compuestos NK-58 y NK-88. En todos los casos conforme aumentaba la concentración del compuesto la expresión de la Ciclina D1 disminuye.

Tabla 8. Expresión de la Ciclina A sobre líneas celulares tratadas con diferentes compuestos

Com puesto	µg/ mL	Línea celular															
		PC-3				HCT-15				HeLa				MCF-7			
		Ctrol-	0.1	1	10	Ctrol-	0.1	1	10	Ctrol-	0.1	1	10	Ctrol-	0.1	1	10
NK-58	% inten	50 (3+)	50 (3+)	30 (3+)	20 (2+)	70 (3+)	60 (3+)	30 (2+)	15 (2+)	60 (3+)	60 (3+)	50 (3+)	20 (2+)	40 (2+)	40 (2+)	30 (2+)	20 (2+)
NK-88	% inten	70 (3+)	70 (3+)	50 (3+)	20 (3+)	70 (3+)	60 (3+)	50 (3+)	20 (3+)	80 (3+)	60 (3+)	50 (3+)	10 (3+)	50 (3+)	40 (3+)	30 (3+)	10 (3+)
Cis- Platino	% inten	80 (3+)	70 (3+)	60 (3+)	50 (3+)	80 (3+)	60 (3+)	30 (3+)	20 (3+)	80 (3+)	60 (3+)	50 (3+)	30 (3+)	50 (3+)	40 (3+)	20 (3+)	15 (3+)

La tabla muestra los resultados obtenidos de la inmunocitoquímica, donde nos dice la concentración de cada compuesto sobre cada línea celular, el porcentaje de expresión de la ciclina A y la intensidad con la cual ocurrió dicha expresión.



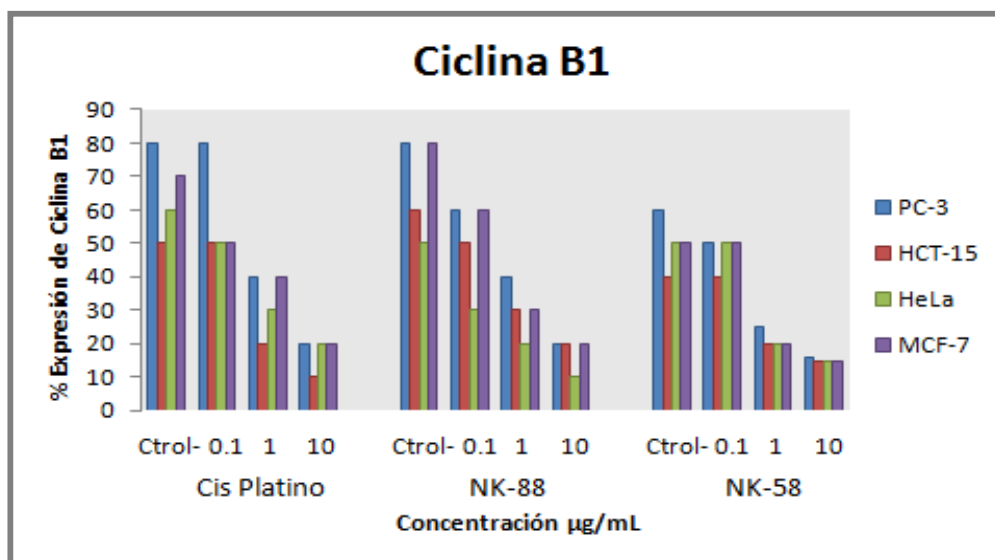
Gráfica 7: Expresión de Ciclina A en líneas celulares tumorales humanas tratadas con los compuestos NK-58, NK-88 y cis -platino

Los resultados mostrados en la tabla 8 y la gráfica 7 evidencian que la intensidad de expresión de la Ciclina A para la mayoría de las líneas celulares fue de 3+ excepto para las líneas HCT-15 y MCF-7 tratadas con el compuesto NK-58, que presenta una intensidad de 2+. La expresión de la Ciclina A disminuyó conforme aumentó la concentración de los compuestos trabajados en todos los casos. La intensidad de la expresión de la Ciclina A fue mayor en las líneas MCF-7, PC-3 y HeLa tratadas con NK-88 e igual en HCT-15, para ambos compuestos.

Tabla 9: Expresión de la Ciclina B1 sobre líneas celulares tratadas con diferentes compuestos.

Com puesto	µg/ mL	Línea celular															
		PC-3				HCT-15				HeLa				MCF-7			
		Ctrol-	0.1	1	10	Ctrol-	0.1	1	10	Ctrol-	0.1	1	10	Ctrol-	0.1	1	10
NK-58	%	60	50	25	16	40	40	20	15	50	50	20	15	50	50	20	15
	inten	(3+)	(3+)	(2+)	(1+)	(2+)	(2+)	(2+)	(1+)	(2+)	(2+)	(1+)	(1+)	(3+)	(3+)	(2+)	(2+)
NK-88	%	80	60	40	20	60	50	30	20	50	30	20	10	80	60	30	20
	inten	(3+)	(3+)	(3+)	(2+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)
Cis- Platino	%	80	80	40	20	50	50	20	10	60	50	30	20	70	50	40	20
	inten	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(2+)	(2+)	(2+)	(2+)	(2+)	(2+)	(2+)	(2+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)

La tabla muestra los resultados obtenidos de la inmunocitoquímica, donde nos dice la concentración de cada muestra sobre cada línea celular, el porcentaje de expresión de la ciclina B1 y la intensidad con la cual ocurrió dicha expresión.



Gráfica 8: Expresión de ciclina B1 sobre líneas celulares tumorales humanas tratadas con los compuestos NK-58, NK-88 y cis-platino.

Con respecto a los resultados de la Tabla 9 y la gráfica 8 podemos decir que la expresión de la Ciclina B1 fue variada, donde se contempla que las líneas tratadas con NK-58 tienen intensidades de 3+, 2+, y 1+. Las líneas tratadas con NK-88 tuvieron una intensidad de 3+ y de los controles las líneas que presentaron intensidades de 2+ fueron HCT-15 y HeLa. En todas las líneas

celulares tumorales tratadas con NK-58 y NK-88 se observa disminuida la expresión de Ciclina B1.

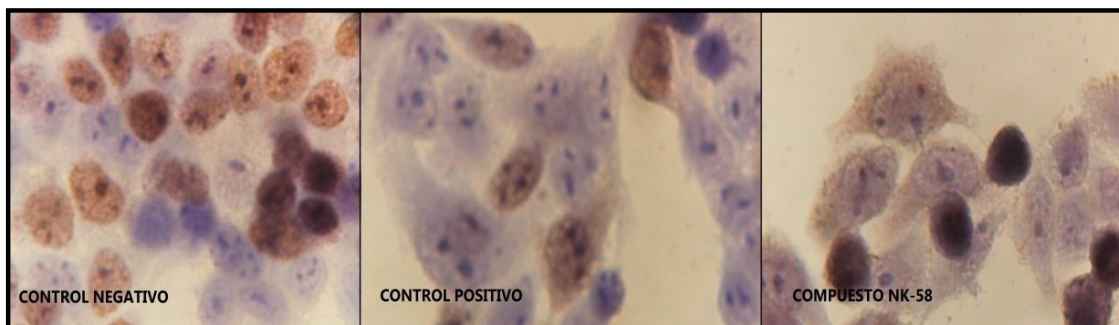


Imagen 1 : Inmunocitoquímica de la Línea celular tumoral PC-3 tratada con cis platino (control positivo) y el compuesto NK-88 a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En la Imagen 1 se observan fotografías de la inmunocitoquímica realizada, para dar una muestra de cómo se observan las células positivas o negativas al microscopio ante la presencia de diversas Ciclinas. Las imágenes fueron tomadas de la línea celular PC-3.

En el primer recuadro observamos el control negativo, células a las cuales no se les realizó ningún tratamiento, percibiendo que la cantidad de células que se encuentran es mayor, al igual que el porcentaje de células positivas (células color café). En la segunda imagen se puede ver que la cantidad de células totales disminuye al igual que el porcentaje de células positivas en las células tratadas con cis-platino a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La tercera imagen, es similar a la segunda solo que estas células fueron tratadas con el compuesto NK-88.

### **8.3. Expresión de apoptosis en líneas celulares tumorales humanas tratadas con compuestos organometálicos de estaño**

A razón de saber si los compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño NK-58 y NK-88 inducen muerte celular por apoptosis y usando como control positivo al cis-platino, se procedió a tratar a las líneas celulares HCT-15, PC-3, MCF-7 y HeLa con los compuestos antes mencionados.

Se realizó la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP –biotin nick end – labeling), ya que es un método directo y selectivo para detectar la fragmentación del ADN, que es una característica de la apoptosis <sup>(63,64)</sup>.

Durante la apoptosis las endonucleasas nucleares dividen al ADN en fragmentos de aproximadamente 180 pb, hecho que favorece esta técnica. En este ensayo, una enzima conocida como desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) identifica mellas o puntos de fragmentación en el ADN de la muestra y cataliza la adición de nucleótidos dUTP que se han marcado previamente, para la detección posterior <sup>(61)</sup>.

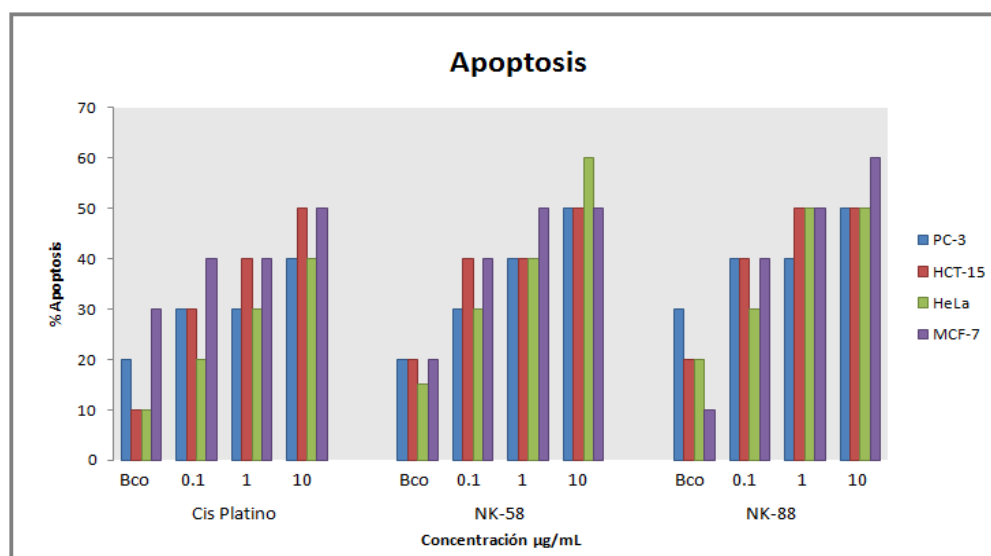
Con esta técnica se evaluaron los compuestos NK-58 y NK-88, dando los resultados que se observan en la tabla 10 y gráfica 8.



Tabla 10 : Expresión de Apoptosis en líneas celulares tratadas con diferentes compuestos.

Com puesto	µg/ mL	Línea celular															
		PC-3				HCT-15				HeLa				MCF-7			
		Ctrl-	0.1	1	10	Ctrl-	0.1	1	10	Ctrl-	0.1	1	10	Ctrl-	0.1	1	10
NK-58	%	20	30	40	50	20	40	40	50	15	30	40	60	20	40	50	50
	inten	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(2+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)
NK-88	%	30	40	40	50	20	40	50	50	20	30	50	50	10	40	50	60
	inten	(3+)	(3+)	(2+)	(2+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(3+)	(2+)	(3+)	(3+)	(2+)	(2+)
Cis- Platino	%	20	30	30	40	10	30	40	50	10	20	30	40	30	40	40	50
	inten	(3+)	(2+)	(2+)	(2+)	(3+)	(3+)	(3+)	(2+)	(3+)	(2+)	(2+)	(2+)	(3+)	(3+)	(2+)	(2+)

La tabla muestra los resultados obtenidos de la inmunocitoquímica, donde nos dice la concentración de cada compuesto sobre cada línea celular, el porcentaje de expresión de la reacción de TUNEL y la intensidad con la cual ocurrió dicha expresión.



Gráfica 9: Expresión de Apoptosis sobre líneas celulares tumorales humanas tratadas con NK-58, NK-88 y cis-platino

Con respecto a los resultados obtenidos (tabla 10 y gráfica 9) se observa que la expresión de positividad que interpretamos como aumento de apoptosis es sobreexpresada en todas las líneas celulares tratadas con los compuestos NK-58, NK-88 y cis-platino, siendo directamente proporcional a la concentración. En las líneas MCF-7, PC-3 y HeLa se observa mayor porcentaje de expresión en ambos compuestos con respecto al control, mientras en la línea celular HCT-15 el que

tiene mayor porcentaje de apoptosis es el control. La intensidad en la expresión del ADN fragmentado (3+) es mayor en el compuesto NK-58 que en el NK-88, pero ambos tienen mayor intensidad, que el control positivo ya que en él predomina una intensidad de 2+.

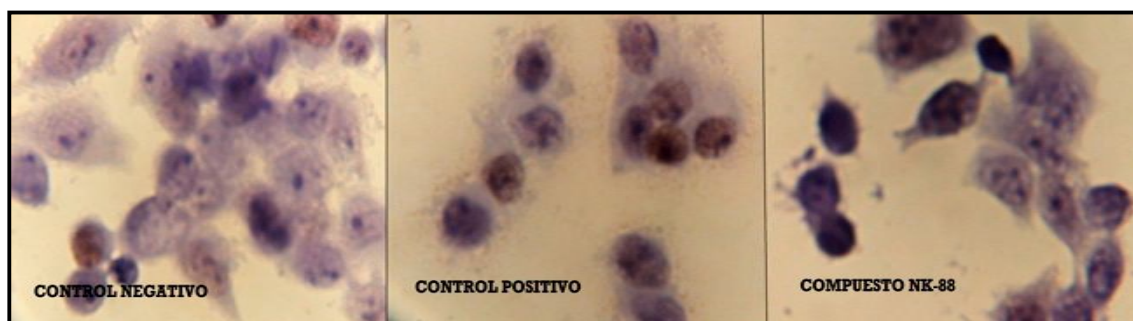


Imagen 2 : Inmunocitoquímica de la línea celular tumoral HeLa tratada con cis-platino (control positivo) y el compuesto NK-88 a una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$ .

En la Imagen 2 se observan fotografías de la inmunocitoquímica para mostrar cómo se ven al microscopio las células positivas y negativas ante la presencia del reactivo de TUNEL. Las imágenes fueron tomadas de la línea celular HeLa. En el primer recuadro observamos el control negativo, células a las cuales no se les realizó ningún tratamiento, viendo que la población de células tumorales es mayor, al igual que el porcentaje de células negativas (células azules) en comparación con las positivas (células color café). En la segunda imagen se puede ver que la cantidad de células tratadas con cis platino disminuye, pero aumenta el porcentaje de células positivas (células color café) al igual que en la tercera imagen que fue tratada con el compuesto NK-58, solo que, con una mayor intensidad de positividad.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, siendo un propósito general en la comunidad científica desarrollar nuevos tratamientos que eliminen o inhiban los procesos oncogénicos, sin dañar el comportamiento natural de las células en el cuerpo.

Sabemos que el procedimiento para que un nuevo fármaco sea cribado, primero se prueba en una variedad de líneas celulares tumorales humanas *in vitro* para saber si tiene capacidad para prevenir el crecimiento de tipos específicos de células tumorales. Si el fármaco se muestra prometedor, se realizan pruebas en animales para determinar si es eficaz y lo suficientemente seguro como para probarse en seres humanos <sup>(66)</sup>.

Tomando en cuenta lo que describe el National Cancer Institute, en este proyecto se trabajaron cuatro líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HeLa (carcinoma de cuello uterino), PC-3 (adenocarcinoma prostático) y HCT-15 (carcinoma colono rectal), para evaluar los compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño NK-58 y NK-88 proporcionados por el Dr. Norberto Farfán García, haciendo uso del cis-Diaminodicloroplatino (II) (cis-platino) como control positivo.

Para determinar que los compuestos organometálicos de estaño tienen algún efecto antiproliferativo se realizó el ensayo de citotoxicidad con Sulforrodamina B (SRB) colorante de aminoxantano, rosado brillante que posee grupos cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas, aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos. Después de eliminar el colorante no fijado, el colorante unido a las células viables se extrae con medio alcalino (Solución de Tris Base pH 10,5) <sup>(67)</sup>. Su sensibilidad es comparable con la de varios ensayos de fluorescencia y su punto final colorimétrico es estable, haciendo que esta técnica sea apropiada y sensible para medir la citotoxicidad inducida por fármacos <sup>(68)</sup>.

Con el uso de esta técnica damos como evidencia que ambos compuestos (NK-58 y NK-88) tuvieron una mayor respuesta citotóxica (dependiente de la concentración), hacia las células cancerosas que el compuesto usado como control positivo (cis-platino), observándose mayor disminución en la población celular al ser expuestos durante 48 h, esto es debido a que las células estuvieron expuestas durante más tiempo a los compuestos trabajados, sin embargo los compuestos obtuvieron muy buenos resultados a partir de las 24h de tratamiento. Este resultado se observó en todas las líneas celulares, *empleados en el presente estudio destacando en del compuesto NK-58, siendo éste, el que menor*

*concentración requirió en las cuatro líneas celulares tumorales humanas para inhibir al cincuenta por ciento de la población celular trabajada (CI 50).*

Para obtener la CI 50, se utilizó el programa SPSS (Statistical Product and Service Solutions) siendo este una importante herramienta de tratamiento de datos y análisis estadístico <sup>(69)</sup>. El análisis usado fue Probit, método de análisis estadístico que da la relación entre un estímulo (dosis) y la respuesta cuántica (tales como la muerte)<sup>(70)</sup>, arrojando valores de CI 50 con un intervalo de confianza del 95% a 24h de NK-58 para HCT-15 de 2.02  $\mu\text{g/mL}$ , para PC-3 de 8.212  $\mu\text{g/mL}$ , para MCF-7 de 2.687  $\mu\text{g/mL}$  y para HeLa de 5.651  $\mu\text{g/mL}$ , y a 48 horas para HCT-15 de 0.791  $\mu\text{g/mL}$ , para PC-3 de 0.878  $\mu\text{g/mL}$ , para MCF-7 de 1  $\mu\text{g/mL}$  y para HeLa de 1.341  $\mu\text{g/mL}$ , Para el compuesto NK-88 se obtuvieron valores de CI 50 mayores que el compuesto NK-58, pero de igual manera sus valores de CI 50 no rebasaron concentraciones de 10  $\mu\text{g/mL}$  excepto para la línea HeLa que tuvo una CI 50 de 17.606  $\mu\text{g/mL}$ , estando por debajo de las obtenidas por el control (cis-platino), esto quiere decir, que los compuestos organometálicos de estaño pueden ser escalados a estudios *in vivo* y mostrar su efectividad, ya que mostraron tener un potencial antiproliferativo en las cuatro líneas celulares e inhibir al 50 % de la población utilizando concentraciones pequeñas <sup>(66)</sup>, siendo datos confiables ya que solo caemos con un error relativo del 5%, es decir que solo el cinco por ciento de las muestras arrojaron resultados erróneos<sup>(71)</sup>.

Sabemos que el efecto que se requiere en un agente quimioterapéutico es citoestático, es decir que de forma general, interactúen en gran medida con el ADN o sus precursores, e inhiban la síntesis del nuevo material genético o agentes que causen daños irreparables sobre este <sup>(72)</sup>, actuando sobre alguna de las fases del ciclo celular, deteniendo su progresión <sup>(73)</sup>. Una vez que los compuestos de prueba demostraron tener efecto antiproliferativo, se buscó si este efecto era debido a la interrupción en algunas de las fases del ciclo celular, usando como marcadores las ciclinas D1, A y B1, reportándose en la literatura que este tipo de ciclinas están sobreexpresadas en múltiples tipos de cáncer <sup>(37,39,43,74)</sup>. Las líneas celulares tumorales humanas tratadas con los compuestos en estudio, se evaluaron por inmunocitoquímica, utilizando la unión específica de los anticuerpos con los antígenos <sup>(75)</sup>, permitiendo una localización precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio de luz <sup>(61)</sup>.

Para el compuesto organometálico NK-58 se obtuvo una disminución de la expresión de las ciclinas D1, A y B1 hasta del 40 % en todas las líneas celulares con respecto al control negativo. Solo en la línea HCT-15 presentó una expresión de Ciclina A de un 55% y para HeLa una expresión de Ciclina D1 del 60%.

Por otro lado el compuesto NK-88 presentó una disminución en la expresión de las ciclinas D1, A, y B1 de una forma variada dependiendo la línea celular, pero

en todas ellas la expresión se ve disminuida mientras aumenta la concentración del compuesto. En PC-3 la expresión de todas las ciclinas disminuyeron. En HCT-15 la ciclina A tuvo una expresión del 50%. En HeLa la ciclina A se expresó un 70% y para ciclina D1 60%. En MCF-7 la ciclina que disminuyó más en porcentaje de expresión fue B1.

Los porcentajes de disminución de la expresión de las ciclinas D1, A, y B1 del control positivo (cis-platino), fue muy parecido a la respuesta que tuvo el compuesto NK-88. En PC-3 todas las ciclinas presentaron una disminución en el porcentaje de su expresión mientras aumentaba la concentración de los compuestos de prueba. En HCT-15 las líneas que mostraron mayor descenso en el porcentaje de expresión fueron: para ciclina D1 y A. En HeLa la ciclina A tuvo una expresión del 50%. En MCF-7 la que tuvo un mejor descenso en su expresión fue la ciclina B1.

Una vez señalados los porcentajes de expresión de la ciclinas, y tomando como referencia algunos autores han establecido porcentajes de positividad (>10%) y negatividad (< 10%) de ciclinas en núcleos teñidos para células tumorales, esto quiere decir que porcentajes mayores de 10 es considerada sobreexpresión de ciclinas<sup>(60,61)</sup>. No podemos dar una definición generalizada ya que en todas las líneas tratadas con los tres compuestos (NK-58, NK-88 y cis-platino) se observó una disminución en la expresión de ciclinas.

Observando que los resultados de los compuestos de prueba tienen la misma tendencia que las del control positivo, podemos sugerir que los compuestos NK-58 y NK-88 pueden tener un efecto citoestático como el cis-platino, actuando a lo largo del ciclo celular en la Fase G1 y S<sup>(73)</sup>, lo que trae como consecuencia que se inhiban los procesos celulares de replicación y transcripción<sup>(76)</sup>, dando como consecuencia que las lesiones inducidas en el DNA activen la regulación del ciclo celular en el punto de control entre las fases G2 y M, provocando la detención en estas fases<sup>(77)</sup>, y con una posible efectividad de curación en diferentes tipos de cáncer como: testiculares, ovario, vejiga, cabeza, cuello, esófago, cuello uterino, vejiga, tiroides, endometrio, estómago, etc<sup>(3)</sup>.

Esta deducción que se ha realizado se debe a que ambos compuestos mostraron disminución en la expresión de las ciclinas D1, A y B1 al igual que el cis-platino, solo que en algunas no se observó un cambio tan significativo, esto se puede deber a que las ciclinas se siguen sintetizando para ser utilizadas, ya que algunas se sintetizan en G1<sup>(44)</sup>.

Los compuestos se evaluaron con la técnica de TUNEL con el fin de determinar si estos inducían a las células tumorales a una muerte por apoptosis, característica que puede distinguir a los cánceres que son curados con quimioterapia, gracias a su capacidad de sanar por un rápido proceso de muerte celular programada, en respuesta a agentes citotóxicos<sup>(2)</sup>.



Una manera de probarlo fue poniendo en práctica la técnica antes mencionada, ya que es un método selectivo para detectar la fragmentación del ADN, considerada característica de la apoptosis<sup>(64)</sup>. Usando como control al cis-platino y teniendo en cuenta que detiene el ciclo celular en diferentes fases, se sabe que cuando el daño inducido en la fase G2 es irreparable, la apoptosis sirve como una vía de eliminación de estas células, impidiendo que las células dañadas por el cis-platino en la fase G2 pasen a la fase de mitosis<sup>(77, 78)</sup>. La respuesta apoptótica del cis-platino es inducida por la liberación del citocromo-c desde la mitocondria al citosol<sup>(77)</sup>. Con base en lo anterior, podemos decir que los compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño NK-58 y NK-88 inducen mejor y mayor apoptosis que el cis-platino en las líneas celulares MCF-7, PC-3 y HeLa. Mientras que en la línea HCT-15 el control positivo tiene mayor porcentaje de apoptosis que en los compuestos NK-58 y NK-88, pero que de igual manera presenta actividad apoptótica.

Ya que los compuestos trabajados actúan de manera similar al cis-platino, se podría suponer que la vía por la cual estos compuestos desencadenan la muerte celular programada es por vía intrínseca.

## 10. CONCLUSIONES

- ❖ Los compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño NK-58 y NK-88 disminuyeron el porcentaje de viabilidad celular por debajo de 25% a 48 h, sin embargo para el compuesto NK-58 a 24 h de exposición presentó una actividad antiproliferativa mayor al 50%.
- ❖ El compuesto NK-58 a 24h presentó CI 50 menores a 8  $\mu\text{g/mL}$ , sobre todas las líneas teniendo mayor actividad antiproliferativa a menor concentración en: HCT-15>MCF-7>HeLa>PC-3 y a 48h presentó CI 50 por debajo de 1.4  $\mu\text{g/mL}$  sobre todas las líneas teniendo mayor actividad antiproliferativa a menor concentración en: HCT-15 >PC-3 >MCF-7 >HeLa.
- ❖ El compuesto NK-88 a 24h presentó CI 50 menores de 18  $\mu\text{g/mL}$  sobre todas las líneas, teniendo mayor actividad antiproliferativa a menor concentración en: HCT-15>PC-3>MCF-7>HeLa y a 48h presentó CI 50 por debajo de 5.1  $\mu\text{g/mL}$  sobre todas las líneas teniendo mayor actividad antiproliferativa a menor concentración en: HeLa>PC-3>MCF-7>HCT-15.
- ❖ El cis-platino en comparación con los compuestos NK-58 y NK-88 presentó CI 50 arriba de 20  $\mu\text{g/mL}$  a 24h y a 48h mayores a 3  $\mu\text{g/mL}$ . sobre todas las líneas teniendo mayor actividad antiproliferativa a menor concentración en:

HCT-15>MCF-7>PC-3<HeLa a 24h y a 48h la línea que presentó mayor actividad antiproliferativa fue: PC-3>HCT-15>MCF-7>HeLa .

- ❖ Los compuestos NK-88 y NK-58 inducen disminución en la expresión de las ciclinas D1, A, y B1 involucradas en la progresión del ciclo celular y sobreexpresadas en diversos tipos de cánceres.
- ❖ Los compuestos pentacoordinados organometálicos de estaño (NK-58 y NK-88) inducen degradación de ADN fraccionándose en aproximadamente 180 pb característica que es interpretada como muerte celular programada, en las líneas celulares PC-3, HCT-15, MCF-7 y HeLa.

**11. BIBLIOGRAFÍA**

- 1) Martínez C., Ramos C. y Montaña E.H. (2011). Hematología Esencial. Quimioterapia en Hematología y Oncología. Editorial HBG Press División.
- 2) Peralta O., Bahena M., Díaz C. E., Madrid V. (1997) Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. Salud Pública. Artículo de Revisión; 39(5)
- 3) Lúcia de Almeida V., Leitão A., Barrett R. Luisa del C., Montanari C. A., Donnici C. L., Paz L. Míriam T., (2005) Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular não Específicos que Interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova*, 28 ( 1): 118-129
- 4) Nikoloz K., Norberto F., Margarita R., J. Manuel M.S., M. Gabriela B.L., Héctor G. O., Oscar D., Rosa S., Francisco S.B., Isabel G. M. (2010). New pentacoordinated Schiff-base diorganotin (IV) complexes derived from nonpolar side chain alfa-amino acids. *Journal of Organometallic Chemistry* 695. pp. 1189-1199
- 5) Garza O. A., Camacho C. C., Sainz-Espuñes T., Rojas O. I., Gutiérrez L. R., Gutierrez M. A. y Vera M A. (2013) Novel Organotin(IV) Schiff Base Complexes with Histidine Derivatives: Synthesis, Characterization, and Biological Activity. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2013(502713): 1-12

- 6) Akulapalli, S. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*; 1(2): 1–4.
- 7) (NCI) National Cancer Institute. Disponible en: [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)
- 8) (OMS) Organización Mundial de la Salud (2013). Cáncer. Nota descriptiva 297
- 9) Benedí J., Gómez M. A. (2006). *Farmacia Profesional. Formación continuada. Fármacos antineoplásicos (I)*. Elsevier Ciencia y economía. Revisión; 20(2)
- 10) (INEGI) Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2010). Consultada 4 de Febrero de 2013. Disponible en: [www.inegi.com](http://www.inegi.com)
- 11) López S. A. y Lizano S. M. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. UNAM – INCan. Subdirección de investigación básica. Instituto Nacional de Cancerología*. pp. 31-55
- 12) O’Ryan G. M. y Valenzuela M. T. (2008). Virus papiloma humano y cáncer cérvico-uterino. *Revista Médica Chilena*; 136: 1367-1370
- 13) Rodríguez C. Sergio A. y Capurso G. M. (2006). Epidemiología del cáncer de mama. *Ginecol Obstet Mex* ;74:585-593
- 14) Molina L, Dalben I. y A. de Luca L. (2003) Análise das oportunidades de diagnóstico precoce para as neoplasias malignas de mama. *Rev Assoc Med Bras* ; 49(2): 185-90
- 15) Lugones B. M. y Ramírez B. M. (2009) Aspectos históricos y culturales sobre el cáncer de mama. *Revista Cubana de Medicina General Integral*; 25(3):160-166

- 16) Lacy M., J García J. C., Delgado S, Castells A., Taurá P., Piqué J. M. y Visa J. (2002). Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer: a randomised Trial. *The Lancet* ; 359 :2224-2229
- 17) Mariadason J.M., Arango D., Shi Q., Wilson A. J., Corner G. A., Nicholas C., Aranes M. J., Lesser M., Schwartz E. L. and Leonard H. (2003). Gene Expression Profiling-Based Prediction of Response of Colon Carcinoma Cells to 5-Fluorouracil and Camptothecin. *Cancer Research* 63:8791–8812
- 18) Sheng H., Shao J., Kirkland S. C., Isakson P., Coffey R.J., Morrow J., Beauchamp R. Daniel and DuBois R. N. (1997). Inhibition of Human Colon Cancer Cell Growth by Selective Inhibition of Cyclooxygenase -2. *The Journal of Clinical Investigation*; 99(9): 2254– 2259
- 19) Ferraldeschi R., and Bono J. (2011) Agents That Target Androgen Synthesis in Castration-Resistant Prostate Cancer. *The Cancer Journal* ; 19(1): 34-42
- 20) Dana R.D. and Scher H. I. (2013). Androgen Receptor Antagonists in Castration-Resistant Prostate Cancer. *The Cancer Journal*; 19(1): 43-49
- 21) BioCancer Resech Journal ISSN 16976452. Disponible en: [www.biocancer.com](http://www.biocancer.com)
- 22) Bankfalvi A., Carcinogenesis and tumour growth. Oral pathology. Principles of basic oral oncology. International Medical College. Disponible en: [www.med-college.de](http://www.med-college.de)
- 23) Caligur V. (2008) Carcinogenesis and Epigenetics. *BioFiles*: 3.5 (18)

- 24) Martín de Civetta M. T., Civetta J.D. (2011) Carcinogénesis. Salud Pública de México. 53: 405-414
- 25) García G. V., González M.A., Bascones M. A. (2005) Bases moleculares del cáncer oral. Revisión bibliográfica. Av. Odontoestomatol; 21(6):287-295.
- 26) Asociación Española contra el Cáncer. Disponible en: [www.aecc.es](http://www.aecc.es)
- 27) American Cancer Society. The History of Cancer. Review 2012. Disponible en: [www.cancer.org](http://www.cancer.org)
- 28) (SEOM) Sociedad Española de Oncología Médica. Disponible en: [www.seom.org/.../que-es-como-funciona-y-tipos-de-quimioterapia](http://www.seom.org/.../que-es-como-funciona-y-tipos-de-quimioterapia)
- 29) (OMS) Organización Mundial de la Salud (2004) Formulario modelo. Antineoplásicos, inmunosupresores y fármacos utilizados en los cuidados paliativos; 8:186-198
- 30) Flores J., Farmacología Humana. Quimioterapia antineoplásica II. Agentes alquilantes. Antibióticos. Agentes varios. 62:1039-1057
- 31) Fundación Femeba. Químioterapicos antineoplásicos (18). Disponible en: [www.femeba.org.ar/fundación](http://www.femeba.org.ar/fundación)
- 32) Principles of Clinical Cancer Chemotherapy and Drug Resistance. Harvard –MIT Division of Health Sciences and Technology. HST 151: Principles of Pharmacology: pp 1-20
- 33) Ye C.L., Liu J.W., Wei D.Z., Lu Y.H., Qian F.(2005). In vivo antitumor activity by 2,4-dihydroxy-6-methoxy 3,5-dimethylchalcone in a solid human carcinoma xenograft model. Cancer Chemother Pharmacol. 56: 70–74

- 34) Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Disponible en: [www.atsdr.cdc.gov/es](http://www.atsdr.cdc.gov/es)
- 35) Braga de Castro I., Oliveira de Meirelles C. A., Matthews H., Rocha B. C., Penchaszadeh P., Bigatti G. (2008) Imposex in Endemic Volutid from Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda). *Brazilian Archives of Biology and Technology*; 51(5): 1065-1069
- 36) Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser A. C., Krieger M., Scott M. P., Zipursky L. y Darnell J. (2006) *Biología celular y molecular*. (pp. 853-897) Buenos Aires Argentina. Editorial. Médica Panamericana.
- 37) Quezada M. A. (2007) El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *UAM-I*. pp. 5-12
- 38) Albert B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. (2006) *Introducción a la biología celular*. (pp. 616-617). Madrid España. Editorial Médica Panamericana.
- 39) Rodríguez L., Hernández E., Reyes J. A. (2004). *El ciclo celular: características regulación e importancia en el cáncer*. *Biología Aplicada*; 21:60-69
- 40) Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P., Gann A., Levine M., and Losick R. (2008) *Biología molecular del gen*. Buenos Aires Argentina (pp. 154-162) Editorial Médica Panamericana.
- 41) Jimenez F., Merchant H. (2003) *Biología celular y molecular*. (pp. 595-614). México. Editorial Prentice Hall.



- 42) Moyano L., Franco C., Carreño L, Robinson P. y Sánchez G. (2004). HBME-1 y ciclina D1: marcadores diagnósticos de carcinoma folicular del tiroides. *Revista Médica Chile*; 132: 279-284
- 43) Sánchez A., Garridoa M., Abdulkaderb I., Gudec F., León L. y Ruibala Á. (2009). La expresión inmunohistoquímica de ciclina B1 conlleva mayores valores de SUV en la 18F-FDG-PET de pacientes con carcinomas no microcíticos de pulmón. *Revista Española de Medicina Nuclear*; 28(2):63-65
- 44) Zapata A. (2001) La regulación del Ciclo Celular: Modelos Experimentales sencillos que resultan en Premios Nobel. *Anal. Real Acad. Farm.* 67: 1-13
- 45) Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Disponible en: <http://atlasgeneticsoncology.org>
- 46) Androic I., Krämer A., Yan R., Rödel F., Gätje R., Kaufmann M., Strebhardt K. and Yuan J. (2008) Targeting cyclin B1 inhibits proliferation and sensitizes breast cancer cells to taxol. *BioMed Central Cancer. Research article*; 8(391):1-11
- 47) Bortner D. and Cidlowski A. (2002). Cellular Mechanisms for the Repression of Apoptosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 42:259–281
- 48) Jordán J. (2003) Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM.* 22 (6): 100-106
- 49) Conte M., Silva P. (2007) Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa.* 1(1):37-58
- 50) Ziegler U., Groscurth P. (2004) Morphological Features of Cell Death. *News Physiol Sci* 19: 124-128

- 51) Fink S. L., Cookson B. T. (2005) Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*. 73 (4):1907–1916
- 52) Coto C. E. (2007) Inhibición de la apoptosis de los linfocitos como nueva forma de combatir enfermedades infecciosas graves. *Revista Química Viva*. 1(6):9-15
- 53) Cascales M. (2003) Bases moleculares de la apoptosis. *Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 69(1):36-60
- 54) Kim R., Tanabe K., Manabu E., Uchida Y. and Toge T. (2003) Death receptor-dependent and -independent pathways in anticancer drug-induced apoptosis of breast cancer cells. *Oncology Reports* 10:1925-1930
- 55) Elinos C. M., Maldonado V., Meléndez J. (2003) Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Artículo de Revisión*. 139(5): 493-499
- 56) Sosa R. D. (2012) Apoptosis. *Catedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. UNNE*. pp.1-6
- 57) Carvallo F., Gracia I., Ruiz L., Madrid V., Constantino F., *Cáncer y Apoptosis. UNAM*
- 58) Alfaro E, García C. y Dueñas A. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*; 46(4):275-280
- 59) Martínez M. (2009) Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev. Colomb. Biotecnol*; 9(2):152-166

- 60) Vallmanya F., Laborda A., Lloreta J., Cortadellas R., Placer J., Gelabert A. (2006). Expresión inmunohistoquímica de p53, p21, p16 y Ciclina D1 en el cáncer de vejiga superficial. Estudio en un soporte de tissue microarray. Actas Urológicas Españolas; 30(8):754-762
- 61) Manual de Patología General. Inmunohistoquímica. Técnicas diagnosticas de Histopatología. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/publ/patologia>
- 62) Smith C. (2012) TUNEL Assay Kits for Apoptosis Detection. 2012. Disponible en: [www.biocompare.com/Editorial-Articles/41626-TUNEL-Assay-Kits-for-Apoptosis](http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/41626-TUNEL-Assay-Kits-for-Apoptosis)
- 63) Merino N. (2001) Apoptosis: experiencias en la anatomía patológica experimental. Revista Cubana Investigación Biomédica ; 20(2):159-60
- 64) Panizo A., Vega F. (1997) . Técnicas de Inmunohistoquímica. Estudio de la apoptosis mediante la técnicas de Tunel. Revista Española de Patología; 30(3)243-245
- 65) Schinoni I. M. y Paraná R. (2006) Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado. Acta Gastroenterológica Latinoamericana; 36(4):211-217
- 66) Drug Discovery at the National Cancer Institute: Fact Sheet. (2006) U.S. Department of Health and Human Services. National Institute of Health pp. 1-5
- 67) Escobar L, Alfonso P. A., Aristizábal F. A. (2009). Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. Revista Colombiana de Biotecnología; 11(2):49-56

- 68) Vichai V. y Kirtikara K. (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*; 1(3):1112-1116
- 69) Bausela E. (2005) *SPSS*: un instrumento de análisis de datos cuantitativos. *Revista de Informática Educativa y Medios Audiovisuales*; 2(4): 62-69
- 70) Probit Analysis. NCSS Statistical Software. Chapter 575. Disponible en : [http://ncss.wpengine.netdnacdn.com/wp/Procedures/NCSS/Probit\\_Analysis.pdf](http://ncss.wpengine.netdnacdn.com/wp/Procedures/NCSS/Probit_Analysis.pdf)
- 71) Scientific European Federation Osteopaths. Las estadísticas. Disponible en: <http://scientific-european-federation-osteopaths.org/es/estadisticas>
- 72) Morales I., Valdés Y. y Proveyer S. (2004). Citostáticos: medicamentos riesgosos. *Revista Cubana de medicina*; 43(2-3)
- 73) Protocolos de vigilancia sanitaria específica. Agentes Citostáticos. Comisión de Salud Pública. Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud (2003) pp.11-89. Disponible en: [www.zerbitzu-orokorrak.ehu.es/p258-shprevct/adjuntos/Agentescitostaticos.pdf](http://www.zerbitzu-orokorrak.ehu.es/p258-shprevct/adjuntos/Agentescitostaticos.pdf)
- 74) Mandujano Á. Gabriel J., Ortiz H. C. (2011) Sarcoma sinovial. Estudio clínico-patológico e inmunohistoquímico de 21 casos con énfasis en el TLE-1, p16 y ciclina D1. *Patología Revista latinoamericana* 49(1):1-10
- 75) Inmunohistoquímica, Disponible en: [www.nitzipper.com/es/nitzipper-aplicaciones\\_bioconjugacion/inmunohistoquimica.html](http://www.nitzipper.com/es/nitzipper-aplicaciones_bioconjugacion/inmunohistoquimica.html)
- 76) López J. M., Ensuncho A. E. , Robles J. (2012) Estudio Teórico de la Reactividad Química y Biológica de Cisplatino y algunos Derivados con Actividad Anticancerosa. *Información Tecnológica*; 24(3): 3-14

- 77) Mora N. J. (2009) Fenómenos mitocondriales y nucleares relacionados con la resistencia a la apoptosis. Importancia del estrés oxidativo. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina y Odontología. Departamento de Fisiología. Universitat de València. (pp.115-195)
- 78) López R., Escudero V., Carbonell V., Pérez J. y Valenzuela B. (2012) Farmacocinética poblacional de cisplatino aplicada a la personalización de su dosificación en pacientes oncológicos. Farmacia Hospitalaria; 36(5):392-402