



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA BIOLOGÍA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACION EXPERIMENTAL ZARAGOZA

**ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTÓXICA DE
COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS CON ESTAÑO EN
CULTIVOS DE CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER
CERVICOUTERINO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

AMARANTHA LIZETH LOPEZ MENDEZ

ASESOR M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO D.F. MAYO 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA BIOLOGÍA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

UNIDAD MULTIDICIPLINARIA DE INVESTIGACION EXPERIMENTAL

ZARAGOZA

PROYECTO DE TESIS

**ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTÓXICA DE
COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS CON ESTAÑO EN
CULTIVOS DE CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER
CERVICOUTERINO**

Tutor:

M. en C. Luis Sánchez Sánchez.

Presenta:

Amarantha Lizeth López Méndez

Mexico D.F. Marzo de 2015.

F E S
ZARAGOZA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **LÓPEZ MÉNDEZ AMARANTHA LIZETH**, con número de cuenta **308092396**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **5 de mayo** a las **16:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. JOSÉ M. V. HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

VOCAL M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SECRETARIO Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SUPLENTE Biól. REYNALDA ROLDAN PÉREZ

SUPLENTE M. en C. YOLANDA CÓRDOVA GALAVIZ

El título de la tesis que presenta es: **Actividad Antiproliferativa y Citotóxica de Compuestos Organometálicos con Estaño en Cultivos de Células Tumorales de Cáncer Cervicouterino.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 20 de marzo de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

A Zaira y Alex mis hermanos

A Javier e Irma mis papas

A Fernando

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez por darme la oportunidad de ingresar a su laboratorio, su apoyo para la realización de este trabajo, su paciencia, su confianza y sus enseñanzas durante mi estancia.

Al Dr. Hugo López Muñoz, por darme su tiempo y ser siempre muy amable con sus correcciones.

Al M. en C. José Misael Vicente Hernández, por hacerme ver mis errores y compartir sus Conocimientos conmigo.

A la M. en C. Yolanda Córdova Galaviz por su valiosa aportación en tiempo y conocimiento

A la Biol. Reynalda Roldan Pérez

Índice	Página
Resumen	1
Introducción	2
Marco Teórico	3
La célula	3
Ciclo celular	3
Regulación del ciclo celular	5
Muerte celular	8
Apoptosis	8
Necrosis	9
Cancer	10
Cancer Cervicouterino (CaCu)	11
Virus del Papiloma Humano (VPH)	13
Diagnóstico y tratamiento del cáncer cervicouterino.	14
Cirugía, Radiación, Quimioterapia, Vacunas	16
Compuestos Organometalicos	18
Compuestos Organometalicos de Estaño (COE)	20
Planteamiento del problema y Justificación	26
Hipótesis	26
Objetivo General	26
Objetivos Específicos	27
Material y Métodos	27
Resultados	32
Discusión	41
Conclusión	44
Bibliografía	45
Apéndice	51

Resumen

El cáncer cervicouterino es un problema de salud pública pues es el tercer tipo de cáncer con mayor prevalencia en México y la segunda causa de muerte de las mujeres del país. Los estudios epidemiológicos han establecido la infección del virus del papiloma humano (VPH) como la causa principal de cáncer invasivo de cuello uterino y sus lesiones precursoras. Las terapias actuales han sido benéficas para el decremento de esta enfermedad, sin embargo, se caracterizan por ser costosas, tener efectos secundarios graves y en muchos casos los tumores generan resistencia a los fármacos. Es por ello que se genera la necesidad de seguir buscando nuevas opciones terapéuticas. El desarrollo de agentes anticancerosos basados en metales ha atraído una atención creciente en la investigación, básicamente en un intento de reducir los efectos secundarios. Es por ello que en el presente estudio se evaluó la actividad antiproliferativa y citotóxica de compuestos organometálicos con estaño en cultivos de líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, los CI50 obtenidos bajo la técnica de inserción de cristal violeta fueron 0.68, 2.36, 2.53, 0.71 $\mu\text{g/ml}$ para la línea CaSki, 0.51, 0.27, 12.78, 11.14 $\mu\text{g/ml}$ en HeLa, y por último 10.84, 8.85, 10.30 y 8.99 $\mu\text{g/ml}$ para ViBo. En líneas no tumorales la actividad antiproliferativa se dedujo por marcaje con carboxifluoresceína donde se encontró que también se reduce pero no de manera significativa. El nivel de citotoxicidad medido a través de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa de los 4 compuestos fue insignificante en líneas tumorales, no así en linfocitos donde los niveles obtenidos hablan de la falta de selectividad de estos compuestos. Los efectos de citotoxicidad obtenidos demuestran una relación de las estructuras con su actividad biológica. De los cuatro diseños generados para estas moléculas solo el grupo funcional fenilamino cumplió el objetivo de la creación de estos compuestos pues pudo reducir el efecto citotóxico, sin embargo es dependiente de la concentración. Se descarta la posibilidad de seguir estudiando estos estudios pues se les considera poco selectivos y altamente citotóxicos.

Introducción

Las células son sistemas con una estructura sofisticada que desarrollan diversos procesos, esto implica que en ellas debe coordinarse un enorme número de actividades; por ello no debe sorprender que ocasionalmente se produzcan errores (Wayne et al. 2006). Un claro ejemplo que se produce como consecuencia de una función celular anormal es el cáncer. El cáncer es una enfermedad multifactorial la cual contiene diversas anomalías fenotípicas (Alberts *et al.* 2006) y es una de las principales causas de muerte en el mundo. En 2012 se produjeron un aproximado de 14.1 millones de nuevos casos de cáncer y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer (GLOBOCAN, 2012). En el ámbito nacional, para 2011 el cáncer representó la tercera causa de muerte entre las mujeres con 35,303 defunciones (15.4%), mientras en los hombres fue la cuarta causa con 33,509 muertes (11.8%). Existen más de 200 tipos diferentes de cáncer (NCI, 2011). Cada uno de ellos posee características particulares, que en algunos casos son completamente diferentes al resto de los otros cánceres, pudiendo considerarse enfermedades independientes, con sus causas, su evolución y su tratamiento específico, la mayor parte de éstos toma el nombre del órgano de origen. Uno de ellos es el Cáncer Cervicouterino (CaCu) que representa un problema de salud pública, ya que es el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado y la cuarta causa de muerte por cáncer en las mujeres en el mundo, representando el 9% (529,800) del total de nuevos casos de cáncer y un 8% (275,100) del total de muertes por cáncer entre las mujeres en 2008 (Sánchez-Barrientos, 2012). La presencia de tumores malignos en el cuello del útero, es el tercer tipo de cáncer con mayor prevalencia en México. Según el INEGI, el porcentaje más alto de prevalencia en este tipo de padecimiento se concentra en la población de entre 45 a 49 años, que representa el 15.1% de las pacientes con tumores malignos. Las mujeres de entre 40 y 44 años y las de 50 a 54 años alcanzan una proporción de 14% y 13.2% respectivamente (SPPS, 2013). Los estudios epidemiológicos han establecido la infección del virus del papiloma humano (VPH) como la causa central de cáncer invasivo de cuello uterino (ICC) y sus lesiones precursoras. Las terapias actuales han sido benéficas para el decremento de esta enfermedad, sin embargo, se caracterizan por ser costosas, tener efectos secundarios graves y en muchos casos los tumores generan resistencia a los fármacos. Es por todo esto, que se

genera la necesidad de seguir buscando nuevas opciones para el tratamiento del cáncer, dentro del quehacer investigativo. El desarrollo de agentes anticancerosos basados en metales se inició con el complejo de coordinación *cis*-diclorodiaminoplatino (II), clínicamente conocido como cisplatino (Abramkin *et al.* 2010; Jungwirth *et al.* 2012; Beck y Brubaker, 1973). La búsqueda de nuevos compuestos contra el cáncer basados en metales se ha centrado en los complejos antes mencionados, sin embargo algunos otros metales han atraído una atención creciente en la investigación, básicamente en un intento de reducir los efectos secundarios.

Marco Teórico.

La célula

La célula es la unidad estructural y funcional básica de los seres vivos. De modo que los procesos que asociamos a los organismos tienen su origen en ella. Es el vehículo para la información hereditaria que define las especies, la célula incluye la maquinaria para recolectar materias primas del medio ambiente, y para construir fuera de ellos una nueva célula en su propia imagen con una nueva copia de la información hereditaria. Todas las células comparten ciertas características estructurales además de que están compuestas por los mismos tipos de moléculas (moléculas pequeñas, incluyendo azúcares simples, nucleótidos y aminoácidos, así como otras sustancias que son universalmente necesarios para la formación de macromoléculas y su síntesis) que participan en los mecanismos básicos para el metabolismo energético (Alberts *et al.* 2006). En organismos pluricelulares más complejos, se guarda una estrecha interrelación entre sí, organizándose en una estructura jerarquizada que funciona de manera coordinada, con diferentes células especializadas para desarrollar funciones particulares y colaborando para mantener un estado de homeostasis en donde las condiciones de un ambiente relativamente constante son sostenidas para la sobrevivencia (Cooper & Hausman, 2011).

Ciclo celular

La única manera de hacer una nueva célula es duplicar una célula ya existente. Todos los organismos vivos, desde las bacterias unicelulares a los mamíferos pluricelulares, son producto de las reiteradas rondas de crecimiento y división celular. Las etapas a través de las cuales una célula pasa desde una división celular a la siguiente constituyen el ciclo celular; que permiten a una célula transmitir su información genética a la siguiente generación de células. Los detalles del ciclo celular varían de un organismo a otro. Aun así existen ciertas características que son universales (Alberts *et al.* 2006).

El ciclo de la división de la mayoría de las células consiste en cuatro procesos coordinados: crecimiento celular, replicación del ADN, distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas y división celular (Cooper & Hausman, 2011). Que con base a las actividades celulares visibles con un microscopio óptico el ciclo celular puede dividirse en dos fases principales: la fase M y la Interfase. La fase M incluye: (1) el proceso de mitosis y la citocinesis, en la que toda la célula se divide en dos células hijas. La Interfase, el periodo entre las divisiones celulares, es un intervalo donde la célula crece y efectúa diversas actividades metabólicas, también proporcionan tiempo a la célula para controlar el ambiente interno y externo para asegurarse de que las condiciones son adecuadas y los preparativos están completos antes de que la célula se comprometa a los principales trastornos de la fase S y la mitosis, se incluyen la fase G1 (Gap 1), que corresponde al intervalo entre la mitosis y el comienzo de la replicación del ADN, la célula es metabólicamente activa y está creciendo, pero no se replica su ADN. Seguidamente tiene lugar la fase S (síntesis), durante la que se produce la replicación del ADN y es también el periodo en el que la célula sintetiza las histonas adicionales que se necesitarán cuando la célula duplique el número de nucleosomas en sus cromosomas. Tras finalizar la síntesis del ADN se produce la fase G2 (Gap 2), durante la que prosigue el crecimiento de la célula y en la que se sintetizan proteínas en preparación para la mitosis (Cooper & Hausman, 2011, Karp, 2014). Mientras que la fase M suele durar solo alrededor de 1h en las células de mamíferos, la interfase puede extenderse por días, semanas o más tiempo, según el tipo celular y las condiciones imperantes (Karp, 2014). (Figura 1).

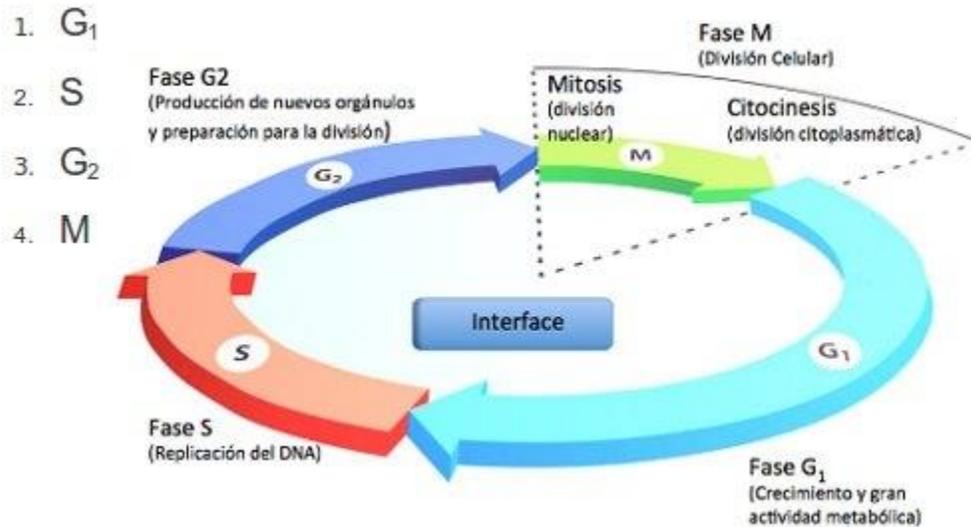


Figura 1. Representación esquemática de las fases del ciclo celular (Fuente: *alabimn Journal*, Colmener, 2011)

Después de la fase M las células hijas pueden entonces entrar en G₀ (en esta fase no hay división celular pero no se interrumpen los eventos metabólicos generales de la célula) o volver a entrar al ciclo cuando hay necesidad de crecimiento y reparación. En la mayoría de los tejidos de un organismo solo una pequeña porción de células esta en ciclo celular, siendo la mayoría células en G₀, Las células en G₀ pueden permanecer durante días, semanas o años antes de proliferar pues conservan la capacidad de reiniciar el ciclo y repoblar un tejido o en ocasiones nunca más dividirse (Burgués *et al*, 2005).

Regulación del ciclo celular.

El sistema de control central del ciclo celular que es un dispositivo bioquímico que actúa cíclicamente, compuesto por un conjunto de proteínas interactivas y dependientes entre sí que induce y coordina los procesos que duplican y dividen los contenidos de la célula. Durante un ciclo celular típico, el sistema de control está regulado por unos factores de retraso que pueden parar el ciclo en unos puntos de control determinados. En ellos existen señales de retroalimentación que pueden retrasar el propio sistema de control, evitando que se desencadene el proceso siguiente sin que el anterior haya terminado adecuadamente (Fink *et al*. 2005).

De entre estas proteínas se destacan las enzimas de acción fosforilante denominadas cinasas dependientes de ciclinas (CDK 1, 2, 4 y 6) (Kim & Zhao, 2005). Entre las moléculas que están vinculadas a la actividad de las CDK se encuentran otras cinasas (CDK7, Wee1, Myt1), fosfatasa (cdc25A, B y C), proteínas inhibidoras (CKIs) y sus coenzimas las ciclinas. El ensamblaje cíclico entre ciclinas y CDK, su activación y desensamblaje son los procesos centrales que dirigen el ciclo celular (Mesa *et al.* 2003). Existen dos clases de ciclinas: las ciclinas mitóticas, las cuales se unen a las CDK durante G2, y forman el Factor Promotor de Mitosis (FPM), el cual induce a la célula a entrar en mitosis; la segunda clase son las ciclinas G1, las cuales se unen a las CDK durante G1 e inducen el paso de G1 a fase S. Las ciclinas están sujetas a una regulación por retroalimentación negativa, excepto la ciclina D, quien es expresada mientras se mantenga el estímulo mitógeno, aunque esto no implica que no tenga que ser degradada (Quezada, 2007).

Los inhibidores de las CDK son proteínas supresoras de tumor que bloquean la actividad de los complejos CDK/ciclinas e impiden la progresión de fases específicas del Ciclo. Dos familias de inhibidores de CDK han sido descritas. La familia INK4 (inhibidor de cinasa 4) se compone de las proteínas p15, p16, p18 y p19, todas ellas interactúan con las CDK 4 ocasionándoles un cambio conformacional que impide su unión con la ciclina D. La familia CIP (proteínas inhibidoras de CDK) incluye a las proteínas p21, p27 y p57, que bloquean a las ciclinas A, B y E y a las CDK 1 y 2 o a los complejos ya formados por estas (Kim y Zhao, 2005). p53 es otra proteína importante, es un factor de transcripción cuya actividad está involucrada en múltiples procesos celulares (arresto del CC, apoptosis, diferenciación celular, etc.). Se dice que esta proteína está ubicada en el centro de las vías de respuesta al estrés, activándose (por modificaciones post traduccionales) cuando existe daño al ADN, hipoxia, activación de oncogenes, entre otras señales.

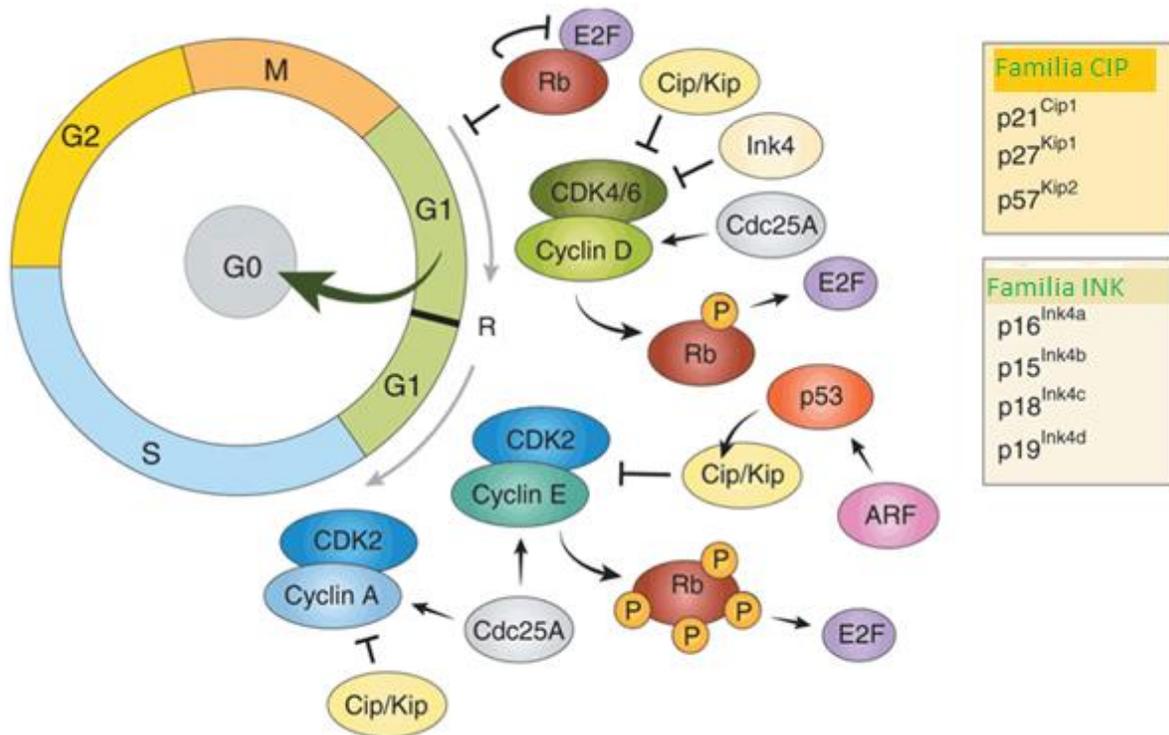


Figura 2. Regulación del ciclo celular. Se muestra la progresión vinculada de la proteína Rb dentro de la fase G1 del ciclo con los factores de transcripción E2F. Con el fin de entrar en la fase S, las células deben activar secuencialmente CDK4 / 6 y CDK2. Estas cinasas se expresan a través del ciclo celular, pero sólo se activan tras la formación de complejo con sus correspondientes ciclinas. Durante la fase G1 temprana, señales mitogénicas desencadenan la activación del complejo D CDK4 / 6-ciclina, que desactiva parcialmente por la fosforilación de Rb. Los Factores E2F posteriormente liberados median la expresión de genes proliferativos incluyendo ciclina E y Cdc25A. Esto transfiere a la célula más allá del punto de restricción (R), que compromete a la entrada de la fase S. La activación del complejo CDK2-ciclina E resulta en la hiperfosforilación de Rb y la liberación completamente a E2F. La expresión de otros genes E2F, como la ciclina A, facilitan la progresión a través de la fase S. Los Inhibidores incluidos los miembros de las familias INK4 y Cip / Kip, inhiben la acción mitogénica de las CDK. ARF, p53 y pueden bloquear la progresión del ciclo celular a de : través de p21Cip1.(Fuente: Nature, 2015)

Esta regulación tan organizada permite entender que cada proceso se da en un momento especial y eficiente, por ejemplo, en el cuerpo humano, donde se regeneran constantemente los epitelios (como los de cavidades intestinales), así como células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos); e incluso, algunas células pueden accionar su ciclo como mecanismo de defensa (los hepatocitos en la regeneración del hígado); todo ello para mantener no solo la

integridad sino también las funciones biológicas adecuadas del organismo frente a las condiciones que le impone el ambiente (López-Casillas, 2002).

Muerte Celular.

El desarrollo de los organismos multicelulares implica no sólo la proliferación y diferenciación celular, sino también la muerte celular que puede considerarse como un mecanismo adaptativo, cuando el organismo ya no requiere de cierto tipo celular o como mecanismo de defensa en caso de que otros puntos no pudieran corregir algún error. Es un proceso fundamental para mantener la homeostasis de cualquier organismo. En los organismos adultos, la muerte celular debe estar equilibrada con la renovación celular, y la mayoría de los tejidos contienen células madre que son capaces de reemplazar las células que se han perdido. Las anomalías de la muerte celular están asociadas con una amplia variedad de patologías, incluyendo el cáncer, las patologías autoinmunes y los trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer. Existen diferentes tipos de muerte celular, siendo los más importantes necrosis y apoptosis, estos dos tipos de muerte presentan diferencias basadas en su morfología y bioquímica (Díaz *et al.* 2005).

Apoptosis

A pesar de que las células pueden morir como resultado de eventos traumáticos impredecibles, como la exposición a agentes químicos, tóxicos, la mayoría de las muertes celulares en los organismos multicelulares ocurren como consecuencia de un proceso fisiológico normal de muerte celular programada, la apoptosis, que juega un papel clave tanto en el desarrollo embrionario y en tejidos adultos.

Uno de los primeros cambios morfológicos que presentan las células que inician este proceso de muerte, consiste en la condensación del citoplasma y la reducción del volumen celular, acompañada de los cambios en la estructura del núcleo, la cromatina se condensa y forma cúmulos densos adosados a la membrana nuclear, esto es seguido de la formación de protuberancias de la membrana nuclear y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina (Caballero, 2002). De

manera análoga, la membrana celular se fragmenta formando racimos de vesículas de tamaño variable que contienen orgánulos intactos que no se fusionan con lisosomas, a estas vesículas se les denomina cuerpos apoptóticos (Adams *et al*, 2007). *In vitro* los cuerpos apoptóticos terminan por desintegrarse, pero *in vivo*, éstos son rápidamente fagocitados por células vecinas, en un proceso en el que participan antígenos de superficie como la fosfatidilserina que sólo en estas circunstancias se presenta en la lámina externa de la membrana celular de los cuerpos apoptóticos (Fink *et al*, 2005) por lo tanto una de las consecuencias fisiológicas más relevantes de la muerte por apoptosis, es que no se libera material intracelular al medio intersticial, este tipo de muerte está restringida a células individuales y nunca resulta en la muerte de células vecinas, en las que no se haya activado el programa de muerte (Amaravadi *et al*. 2007).

La apoptosis puede ocurrir por diferentes vías, las más ampliamente estudiadas son dos; la vía extrínseca y la vía intrínseca, en la primera se encuentra implicado un receptor de muerte y la segunda se encuentra mediada por la mitocondria, pero ambas causan una activación de ciertas proteínas que intervienen en la apoptosis, estas incluyen , las proapopticas, como las caspasas, enzimas inductoras y efectoras así como el factor activador de proteínas apoptoticas , también proteínas antiapoptoticas de la familia Bcl2. (Baynes *et al*. 2008).

Necrosis

En la necrosis hay ganancia de volumen celular (oncosis), ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular. Desde el punto de vista morfológico se la ha definido como el espectro de cambios post mórtem en un tejido por la acción progresiva de enzimas propias de las estructuras lesionadas (Buja *et al*. 1993). Durante la necrosis los orgánulos se hinchan y el volumen celular aumenta considerablemente. Estos cambios han sido asociados con alteraciones en el control osmótico, que resulta de una depleción de ATP y la consecuente disfunción de los transportadores iónicos de membrana. Todo esto lleva a una pérdida del potencial de membrana. Finalmente, las membranas de los organelos celulares se fisuran y se pierde la integridad de la membrana celular, permitiendo que el contenido citoplasmático se vacíe al espacio intersticial exponiendo un gran número de antígenos, que el sistema inmune reconoce como ajenos y frente a los cuales, reacciona

tratando de eliminarlos; durante este proceso se activan varios componentes celulares del sistema inmune, como los macrófagos y los neutrófilos que liberan H_2O_2 dañando a cualquier célula con la que entran en contacto. El resultado es la destrucción de muchas células del tejido circundante. La muerte por necrosis generalmente va acompañada de una respuesta inflamatoria seguida de un proceso de cicatrización que en ocasiones se asocia al desarrollo de fibrosis (Gómez y Zentella, 1998).

Cáncer

Las células sanas no se dividen a menos que sean estimuladas para hacerlo a través de la maquinaria homeostática del cuerpo; tampoco sobreviven cuando incurren en un daño irreparable; ni se separan de un tejido para empezar colonias nuevas en otro sitio del cuerpo, cuando estas influencias reguladoras que protegen al cuerpo del caos y la autodestrucción se descomponen, la célula antes sana se vuelve en una cancerosa que ignora las señales que inhiben el crecimiento, se encuentran exentas a los mecanismo de autodestrucción lo que resulta en una serie de mecanismo dañados que van atrofiando al organismo y sus funciones básicas de sobrevivencia (Karp, 2014). El cáncer es un proceso multifactorial, en el cual intervienen factores biológicos, químicos y físicos, que contribuyen a su desarrollo; dentro de los biológicos se encuentran los agentes infecciosos, como virus y bacterias, en los químicos se pueden mencionar sustancias cancerígenas como el benceno así como la contaminación en general y dentro de los físicos, se encuentran la radiación ionizante, los rayos UV entre otros. Todos estos factores muestran una característica en común, provocan cambios en el genoma, sin embargo, la mayoría de los cánceres requiere de múltiples mutaciones para que se desarrollen. (Hernández *et al.* 1999). Estas mutaciones aportan a las células los atributos que las hacen ser consideradas cancerígenas: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anticrecimiento, potencial replicativo sin límite, evasión de la apoptosis, transformación del metabolismo celular, evasión del sistema inmune, modificación de los mecanismos de adhesión, angiogénesis sostenida e invasión del tejido y metástasis, (Wayne *et al.* 2006; Hsu and Sabatini, 2008). (Figura 3). Esto se debe a la alteración a nivel génico de los reguladores tanto negativos como positivos del ciclo celular. Además, alteraciones en el

sistema inductor de muerte que de manera normal eliminaría a células con daños irreparables, hacen que estas células se acumulen y formen tumores malignos (Alberts *et al.* 2006). Los tumores no son cuerpos extraños sino que derivan de tejidos normales, pueden ser benignos (localizados, no invasivos) o malignos (invasivos, metastásicos). Estos últimos son los responsables de casi todas las muertes debidas a cáncer. El cáncer se puede clasificar a partir del tejido y el tipo de célula, del cual se originan, en 1) leucemias y linfomas que son el cáncer de los tejidos formadores de las células sanguíneas, producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras, 2) Sarcomas o Mesenquimales que se encuentran en tejido conectivo, como huesos, cartílago, nervios, vasos sanguíneos, músculo y tejido adiposo, 3) carcinomas epiteliales que se encuentran en tejido epitelial, como la piel o en los epitelios que revisten cavidades y órganos, y 4) neuroectodérmicos, que proceden de componentes celulares del sistema nervioso central y periférico, incluyen gliomas, glioblastomas, neuroblastomas y medulomas. (Boticario, 2005)



Figura 3. Conjunto de ventajas adquiridas por las células tumorales durante el desarrollo cancerígeno. Modificado de Hanahan *et al.* 2011.

Cáncer cervicouterino (CaCu).

A nivel mundial, el cáncer de cuello uterino es una de las neoplasias más frecuentes y letales en las mujeres. Se estima que cada año se diagnostican aproximadamente 500.000 casos nuevos de este cáncer, de los cuales el 83% (410.000 casos) se dan en países en vías de desarrollo¹. La baja incidencia en países desarrollados se debe, al menos en parte, a la efectividad de los programas de cribado organizados y al cribado oportunista basados en la citología cérvico-vaginal (prueba de Papanicolaou) (SEE, 2006). En 2012, se diagnosticaron un estimado de 12,170 casos de cáncer invasivo del cuello uterino, y un estimado de 4,220 mujeres murieron durante la enfermedad. Esta enfermedad tiene una historia clínica de larga evolución que inicia con los cambios en el epitelio cervical (displasias), que gradualmente van acentuándose hasta que en un término de 15 a 20 años se transforman en carcinoma invasor. No todas las displasias evolucionan en cáncer: Algunos estudios han demostrado que el 30% tienen regresión espontánea principalmente las displasias leves; alrededor del 20% se mantienen en forma estacionaria y un 45% son las que progresan al cáncer. Los estudios internacionales han demostrado que la displasia leve puede evolucionar al carcinoma *in situ* en 5 a 7 años, que se requieren de 10 a 13 años para su progresión a cáncer micro invasor y de éste a invasor dos años más. Sin embargo, en el 10% de las pacientes las lesiones pueden progresar de *in situ* a invasor en períodos menores de un año (Castellanos, 2003).

El CaCu es un tumor epitelial, que se propaga por extensión local e infiltración linfática. La dispersión de la parte superior de la vagina, los paramétrios, la vejiga y el recto es la forma más habitual de propagación. Los casos de cáncer cervicouterino primarios se originan a partir de los tejidos epiteliales que recubren la mucosa cervical, del epitelio escamoso poliestratificado plano o del epitelio glandular. Puede verse una variedad de subtipos histológicos, que varían en grado de diferenciación y características morfológicas.

Ahora se entiende que la infección cervical persistente con genotipos de VPH de alto riesgo (tipos) es necesario para el desarrollo de cáncer CaCu y su lesión precursora inmediata (precáncer), neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de grado 3 (NIC3). Series de casos epidemiológicos han demostrado que casi el 100% de los casos de cáncer cervical dan positivo para el VPH.

Virus de Papiloma humano

El virus del papiloma, pertenece a la familia Papillomaviridae. Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Infechan epitelios de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles. La partícula viral del papiloma humano tiene una cápside icosaédrica sin envoltura, con un diámetro aproximado de 55 nm que contiene al genoma viral. Los capsómeros están hechos de dos proteínas estructurales: L1 en mayor proporción y L2 (López & Lizano, 2006). El genoma del VPH se compone de ADN circular de doble cadena, aproximadamente de 8kb. Está organizado en tres regiones: la región que corresponde a las proteínas de expresión tempranas (E1 a E8), la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) y la región regulatoria superior, la cual no se transcribe. Una vez en el interior celular, el genoma viral es dirigido al núcleo, donde se replica de forma episomal; sin embargo cuando ya se ha generado el carcinoma de cérvix, el genoma viral puede encontrarse integrado al genoma celular, preservando siempre los oncogenes E6 y E7 y perdiendo o interrumpiendo uno o más genes virales. Las proteínas tempranas E6 y E7 son responsables de la transformación carcinogénica provocada por los virus de alto riesgo. La proteína E6 impide la translocación de p53 al núcleo y propicia su degradación por ubiquitinización, promueve la sobreexpresión de la telomerasa, e interactúa negativamente con Bax. E7 se une a proteínas supresoras de tumores de la familia de pRb y promueve la duplicación celular. Mientras que E1 y E2 son las proteínas responsables de la replicación viral (Benuto y Berumen, 2009; López & Lizano, 2006; Motoyama *et al*, 2004) (Figura 4).

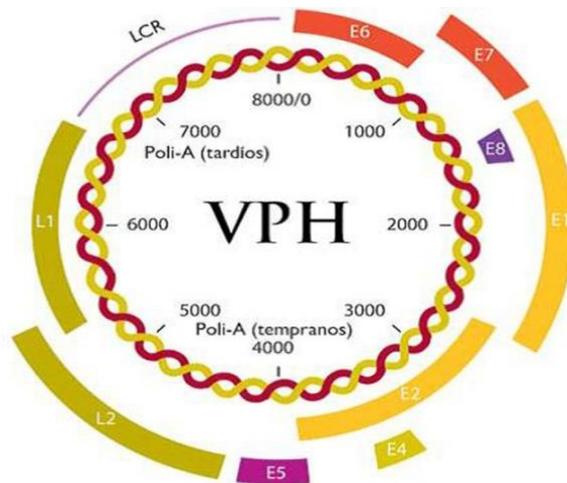


Figura4. Estructura genómica del VPH. Fuente: López & Lizano. 2006.

A pesar de los esfuerzos mundiales dirigidos a la prevención y erradicación de las enfermedades provocadas por este agente etiológico, los virus del papiloma humano, se mantienen ocasionando una de las infecciones sexuales más comunes transmitidas en todo el mundo; al menos 14 tipos de ellos están clasificados como de elevado riesgo oncogénico (VPH AR), entre los cuales VPH16 y VPH18 causan alrededor del 70 % de todos los cánceres cervicales y afectan aproximadamente a 500 000 mujeres cada año (Lizano et al. 2009)

El establecimiento de la relación de causalidad entre el VPH y el cáncer cervical, junto con una comprensión de la epidemiología y la historia natural de la infección por VPH, ha dado lugar a un nuevo modelo de carcinogénesis cervical: la adquisición del VPH, la persistencia del VPH (vs liquidación), la progresión de las lesiones precancerosas, y la invasión, lo que ayuda a orientar las intervenciones apropiadas para prevenir el cáncer cervical (López & Lizano, 2006)

Diagnóstico y tratamiento del cáncer cervicouterino

Aunque los programas de cribado de citología cervical, que detectan y tratan a la neoplasia intraepitelial cervical III (NIC III), pueden prevenir el 85% de los cánceres de cuello uterino invasivo, este sigue siendo la causa más común de muerte por cáncer entre las mujeres en el mundo en desarrollo. Barreras para los programas de cribado basados en la citología se incluyen los siguientes: la falta de fondos; falta de acceso a los profesionales

que los llevan a cabo, mala interpretación de pruebas de citología; conflictos con las parejas masculinas relativas a la participación en el cribado; de la mujer el miedo, la vergüenza y el rechazo del proceso del examen de la pelvis; y la necesidad de recuperación para la evaluación de resultado de la prueba anormal (Belinson *et al.* 2009). Aunque existe un programa nacional de Detección Oportuna del Cáncer (DOC), mediante la prueba de Papanicolaou (Pap) desde 1974 en México, el CaCu sigue siendo una de las principales causas de muerte para las mujeres mexicanas (Palacio-Mejia *et al.* 2009).

El examen de Pap, citología de cérvix o citología vaginal no es un examen de diagnóstico. Es una prueba de tamizaje que detecta a las mujeres que pueden tener una morfología celular anómala en el cuello del útero a diferencia de las mujeres sanas. Tanto las displasias como los cambios epiteliales por VPH pueden ser identificados por medio de la citología cervical y deben ser confirmadas mediante colposcopia y toma de biopsia. La detección de la displasia de cérvix también puede ser llevada a cabo por una colposcopia (exploración óptica del cuello uterino), gracias a esta exploración óptica también se puede dar paso a la toma de una muestra para biopsia (Sossa, 2001). Como técnicas complementarias a la citología para el diagnóstico del cáncer de cérvix, se tienen los procedimientos que han surgido con el advenimiento de la biología molecular y los equipos de búsqueda automática como el uso de anticuerpos para la proteína L1 y la detección genética del VPH (Castellanos, 2003).

El tratamiento también varía de acuerdo con el tipo de cáncer y su etapa. La etapa del cáncer hace referencia a cuánto ha crecido y si el tumor se ha diseminado o no desde su ubicación original. Entre las distintas terapias que existen podemos diferenciar entre aquellas en las que el tratamiento se localiza solamente en la región afectada por el tumor, y terapias cuya aplicación está generalizada a todo el organismo.

Tratamientos localizados: en tumores localizados el tratamiento consiste principalmente en cirugía y radioterapia, los cuales ejercen un control local de la enfermedad erradicando o reduciendo el tumor en el lugar primario. Cuando estos tratamientos se hacen en estadios tempranos, resultan curativos pero si se hace cuando el tumor está en un estado avanzado o metastasis, entonces el efecto que existe se reduce o pasa desapercibido (Hinojos *et al.* 2000).

Cirugía

La cirugía fue el primer tipo de tratamiento utilizado para combatir el cáncer y hasta la fecha sigue siendo la opción más utilizada para remover tumores sólidos. En la actualidad se utiliza para tratar el cáncer que no ha formado metástasis, pero también se puede aplicar para eliminar el cáncer que ha pasado a otros tejidos, como nódulos linfáticos y vasos sanguíneos, para asegurar que todo el tejido afectado ha sido extraído. Las cirugías que se utilizan en el CaCu son: criocirugía, cirugía con láser, biopsia de cono, histerectomía básica y radical (Noriega *et al.* 2008).

Radiación

Desde que en 1915 y 1917 Regaud, Forsell, Bailey y Heymm sentaron los principios y técnicas de aplicación de radioterapia en el tratamiento del carcinoma uterino, en 1932 se utilizó como agente terapéutico de elección (Noriega *et al.* 2008). La radiación utiliza ciertas longitudes de onda de alta energía como los rayos gamma para eliminar las células malignas. Esta técnica se puede utilizar a varios niveles para destruir a las células transformadas o para prevenir que las células normales o malignas proliferen y formen tumores. En éste tratamiento se llegan a eliminar a todas las células que se encuentran en proliferación, incluyendo a células no tumorales. Se ha demostrado que para la sobrevivencia de las pacientes con cáncer invasor es muy importante que el tratamiento de radioterapia se haya completado en 8 semanas (NCI, 2012).

Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento con fármacos que puede eliminar o detener la proliferación de células tumorales. Sin embargo, también puede dañar células sanas, lo que produce efectos secundarios (NCI, 2012). La quimioterapia busca atacar y destruir las células cancerosas: estas se dividen muy rápidamente, desafortunadamente las células sanas que se encuentran en constante división son igualmente susceptibles a los efectos de la quimioterapia. Los ejemplos más típicos son las células de la médula ósea, los folículos pilosos y el epitelio oral. La mucosa oral será más frecuentemente afectada en este tipo de tratamiento y por consiguiente se manifiestan desde el eritema o ulceraciones locales hasta la pérdida total del epitelio con hemorragia e intenso dolor (Hinojosa *et al.* 2000). La xerostomía (sensación de boca seca provocada por deficiencia en la salivación) es menos

frecuente y suele ser reversible, al contrario de las infecciones, cuyo potencial es elevado, ya que hay inmunosupresión y ausencia de integridad del epitelio (Infante *et al*, 2000).

Vacunas

La Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) ha aprobado dos vacunas para prevenir la infección por VPH: Gardasil® y Cervarix®. Ambas vacunas son muy efectivas en la prevención de infecciones por los tipos 16 y 18 de VPH, dos de los VPH de alto riesgo que causan la mayoría (70%) de los cánceres de cuello uterino y de ano. Gardasil impide también la infección por los tipos 6 y 11 de VPH, los cuales causan 90% de las verrugas genitales (Koutsky *et al.*2002)

La vacuna Gardasil es producida por Merck & Co., Inc. Es una vacuna cuadrivalente porque protege contra cuatro tipos de VPH: 6, 11, 16 y 18. Gardasil se administra en una serie de tres inyecciones en tejido muscular por un periodo de 6 meses. Fue aprobada por la FDA para su uso en mujeres con el fin de prevenir el cáncer de cuello uterino y algunos cánceres vulvares y vaginales causados por los tipos 16 y 18 de los VPH; así también, fue aprobada para su uso en hombres y mujeres para la prevención de cáncer de ano y lesiones anales precancerosas también para la prevención de verrugas genitales causadas por los tipos 6 y 11 de los VPH. La vacuna ha sido aprobada para estos usos en hombres y mujeres de 9 a 26 años de edad (Garland *et al.* 2007).

La vacuna Cervarix es producida por GlaxoSmithKline (GSK), es bivalente porque está dirigida a dos tipos de VPH: 16 y 18. También se administra en tres dosis por un periodo de 6 meses. La FDA ha aprobado Cervarix para usarse en mujeres de 9 a 25 años de edad para la prevención del cáncer cervical causado por los tipos 16 y 18 de los VPH (Kreimer *et al.* 2011).

No se ha comprobado que una de estas dos vacunas contra los VPH proporcione protección completa contra la infección persistente por otros tipos de VPH, aunque hay datos iniciales que sugieren que ambas vacunas podrían proporcionar protección parcial contra algunos otros tipos de VPH que pueden causar cáncer de cérvix. En general, cerca de 30% de los casos de cáncer de cuello uterino no podrán prevenirse con estas vacunas.

También, en el caso de Gardasil, 10% de los casos de verrugas genitales no se evitarán con esta vacuna. Ninguna de estas vacunas impide otras enfermedades de transmisión sexual ni tratan la infección por VPH o el cáncer de cuello uterino. Las vacunas contra VPH funcionan como inmunizadores que protegen contra infecciones virales. Los investigadores supusieron que los componentes de superficie únicos a los VPH podrían crear una reacción de anticuerpos capaz de proteger al cuerpo contra la infección y que estos componentes podrían usarse para formar la base de una vacuna. Los componentes de superficie de VPH pueden actuar entre sí para formar partículas semejantes a virus (VLP) que no son infecciosas porque no tienen ADN. Sin embargo, estas partículas pueden pegarse a células y estimular el sistema inmunitario para que produzca anticuerpos que puedan impedir que papilomavirus completos infecten células en encuentros futuros. Aunque las vacunas contra VPH pueden ayudar a impedir la infección futura por VPH, no ayudan a eliminar las infecciones por VPH ya presentes (Paavonen *et al.* 2009, Romanowski *et al.* 2011).

Todos estos tratamientos a excepción de la vacuna que sirve como preventivo, son invasivos y tienen efectos colaterales, además no impiden la reincidencia del cáncer y muchas veces se limitan a las fases tempranas de la enfermedad. Muchos fármacos empleados en la quimioterapia resultan perjudiciales para la salud, principalmente porque llegan a afectar de forma indistinta diversos tejidos sanos, incluso algunos de ellos resultan ser carcinogénicos. Está visto que el desarrollo de tumores secundarios o recurrentes puede deberse al tratamiento del cáncer primario, y esta es una de las complicaciones más devastadoras del tratamiento del cáncer. Debido a que las terapias usadas contra el cáncer no resultan suficientemente satisfactorias, se han desarrollado diversas líneas de investigación encaminadas a buscar alternativas terapéuticas (ACS, 2011).

Compuestos Organometálicos

Los compuestos basados en metales gozaban de un amplio uso en los procedimientos terapéuticos antiguos, pero debido a su escasa selectividad y alta toxicidad fueron progresivamente abandonados en favor de compuestos orgánicos más seguros, ya sea sintéticos o aquellos aislados de fuentes naturales. La exitosa aplicación de los complejos metálicos en el tratamiento de numerosas enfermedades humanas es un área en expansión

en la investigación biomédica y de química inorgánica. El cáncer es el principal objetivo de esta incipiente área de estudio (Gerasimchuk *et al.* 2007). Desde el descubrimiento del cisplatino, se ha intentado sintetizar compuestos basados en metales de transición que sean más efectivos y que minimicen los efectos secundarios en quimioterapia. Como alternativa a las terapias citotóxicas en el tratamiento del cáncer, la terapia de diferenciación se ha llevado a cabo en numerosos estudios, intentando hacer que las células tumorales maduren y dejen de proliferar sin control (Gasser *et al.* 2011). A pesar de su enorme éxito, estos compuestos de platino presentan dos inconvenientes principales: son ineficaces contra los tumores resistentes al platino, y tienen efectos secundarios graves, como la nefrotoxicidad. Este último inconveniente es la consecuencia del hecho de que el objetivo final de estos fármacos es ubicuo. Además, como consecuencia de su particular estructura química, el cisplatino, en particular, ofrece pocas posibilidades de mejoras racionales para aumentar su especificidad tumoral y por lo tanto reducir los efectos secundarios no deseados (Gianferrara *et al.* 2009).

En este contexto, los compuestos organometálicos, definidos como complejos metálicos que contienen al menos un enlace covalente metal-carbono directo, recientemente se han encontrado para ser candidatos prometedores de fármacos contra el cáncer. Los compuestos organometálicos tienen una gran variedad estructural (que va de lineal a octaédricos e incluso más allá), tienen estereoquímica mucho más diversa que los compuestos orgánicos (por un complejo octaédrico con seis ligandos diferentes, existen 30 estereoisómeros), y por diseño ligando racional, pueden proporcionar control sobre propiedades cinéticas clave (tales como la velocidad de hidrólisis de los ligandos). Además, son cinéticamente estables, por lo general sin carga, y relativamente lipófilos y su átomo de metal está en un estado de oxidación bajo. Debido a estas diferencias fundamentales en comparación con los complejos metálicos de coordinación clásica, los compuestos organometálicos ofrecen amplias oportunidades en el diseño de nuevas clases de compuestos medicinales, potencialmente con nuevos modos de metales específicos de acción. Basándose en la amplia gama de estudios para conocer y entender el mecanismo seguido por los compuestos de platino, se considera que los organometales debido a su estructura química, favorecen la interacción de estos complejos con la doble hélice de ADN inhibiendo su replicación (Gasser *et al.* 2011). Otros complejos de platino han sido

sintetizados y biológicamente evaluados por sus propiedades antitumorales, de los cuales cerca de cuarenta han entrado a ensayos de fase clínica I, pero sólo dos carboplatino y oxaliplatino han recibido la aprobación en todo el mundo (Abu-Surrah & Kettunen, 2006). El carboplatino actúa bajo el perfil del cisplatino, sin embargo, con menos efectos secundarios, mientras que el oxaliplatino se utiliza en una terapia de combinación contra el cáncer colorrectal metastásico.

Las propiedades antitumorales de varios iones metálicos diferentes y sus complejos han sido evaluadas, pero sólo unos pocos medicamentos a base de metales no-platino se encuentran actualmente en los estudios clínicos, los más prometedores contienen iones rutenio y galio (Abu-Surrah & Kettunen, 2006). Las investigaciones preclínicas y clínicas han confirmado que es posible el desarrollo de agentes de metal con nuevos modos de acción diferentes al del cisplatino (Ott & Gust, 2007). Por lo tanto, los complejos con hierro, cobalto, o átomos centrales del oro han mostrado resultados prometedores en estudios preclínicos y compuestos con átomos centrales de titanio, rutenio, o galio ya han sido evaluados en ensayos de fase I y fase II. El complejo de ciclopentadienil con titanio, dicloruro de titanoceno (Cp_2TiCl_2) se encuentra en ensayos clínicos y un derivado ferroceno del Tamoxifeno es un candidato para el tratamiento del cáncer de mama. Otros complejos metálicos que han mostrado potencial actividad anticancerígena son los complejos de Rh (I), Rh (III), Ir (I), Ir (II), Ir (IV), Os (II) y Os (III). Muchos complejos de platino y no metal de platino tales como paladio, rutenio, rodio, cobre, y lantano, con ligandos aromáticos que contienen N-como piridina, imidazol y 1,10-fenantrolina, y sus derivados (cuyas propiedades de donante son algo similares a la purina y bases de pirimidina), han demostrado propiedades antitumorales muy prometedores in vitro e in vivo en sistemas de modelos resistentes al cisplatino o cisplatino contra-insensible líneas celulares (Zhao y Lin, 2005).

Compuestos Organometálicos de estaño (COE)

Dentro de la gama de metales, el estaño es un metal que ya sea como tal o en sus aleaciones y sus compuestos químicos, tiene una asombrosa versatilidad, es un elemento que tiene una larga asociación con la humanidad, con su primer uso, probablemente, para

fortalecer el cobre por la formación de la aleación cobre-estaño, un evento que marcó el comienzo de la Edad de Bronce, alrededor de 3500 A.C.(van der Kerk *et al.*1976). Entre sus aplicaciones se encuentran: la estabilización de cloruro de polivinilo (PVC) producción de biocidas, desincrustantes, desinfectantes de superficies, fungicidas y bactericidas por mencionar algunas (Gasser *et al.* 2011). En los últimos años, la química de los compuestos orgánicos de estaño ha recibido mucha atención debida a su amplia gama de aplicaciones tales como en la catálisis, agroquímica y su potencial actividad antitumoral. Su química estructural también ha ganado la atención debido a la amplia gama de posibles geometrías que este tipo de compuestos puede adoptar, la perspectiva teórica ha establecido que el estaño tiende a aumentar su número de coordinación siempre que sea posible. Así, con frecuencia se han encontrado interacciones intra e intermoleculares secundarias para los compuestos orgánicos de estaño en estado sólido. La citotoxicidad inducida por los COE se ha asociado a varios mecanismos: inhibición de la síntesis de macromoléculas, alteración del metabolismo energético de la mitocondria, reducción de la síntesis de ADN e interacción directa con la membrana celular provocando un incremento de la concentración de calcio. La promoción de daño oxidativo y al ADN se han detectado *in vivo*. La interacción de los compuestos orgánicos de estaño con el ADN es principalmente de dos tipos: 1) Interacción electrostática, en la que los compuestos orgánicos de estaño interactúan con los fosfatos aniónicos del ADN. 2) La intercalación, en la que los compuestos orgánicos de estaño se insertan en los pares de bases apiladas de ADN (Alama *et al.* 2009, Gerasimchuk *et al.* 2007).

Los COE son conocidos por producir efectos en varias líneas celulares tumorales, pero poco se sabe acerca de su mecanismo de acción, en la figura 5 se observa el mecanismo propuesto para algunos complejos de metales tales como el estaño, platino, etcétera.

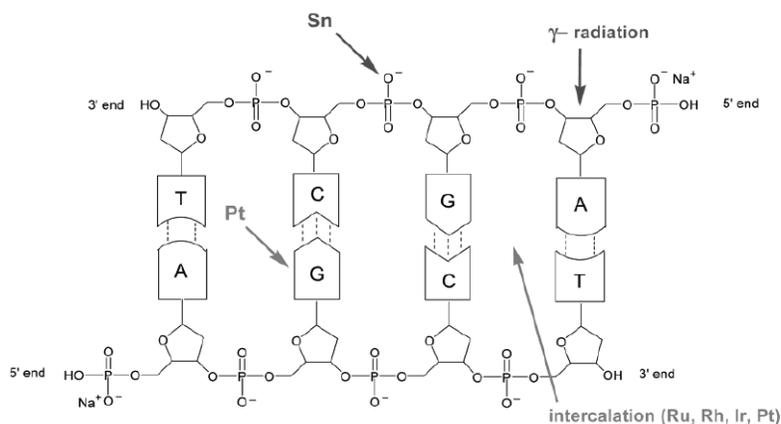


Figura 5. Mecanismos de acción propuestos para compuestos organometálicos. (Tomado de Gerasimchuk *et al.* 2007)

Los COE que son estables en el ambiente fisiológico se han desarrollado como, agentes antineoplásicos, radiofarmacéuticos para diagnóstico y terapia, así como biosensores. Los complejos organometálicos proveen una plataforma versátil para el diseño de fármacos. Los enlaces carbono-metal ejercen importantes efectos electrónicos y estéricos, que pueden ser usados para controlar su actividad biológica. Algunos COE son lo suficientemente inertes para actuar como andamios para diseñar compuestos que interactúen estereoespecíficamente con biomoléculas y puedan actuar por ejemplo; como inhibidores enzimáticos (Pizarro *et al.* 2010). En los COE estudiados no se ha observado la generación de fenómenos de resistencia, mostrando una ventaja con el cisplatino y sus análogos

Los carboxilatos orgánicos de estaño han sido uno de los grupos de compuestos antineoplásicos más extensivamente estudiados desde que fue observado que reducen significativamente el tamaño de los tumores cuando se prueban *in vivo*. Así mismo, los derivados trifenílicos de estaño han mostrado una alta actividad citotóxica con diferentes líneas celulares de origen humano como se describe en la literatura (Camacho-Camacho *et al.* 2008). Se ha establecido que los compuestos organoestánicos (IV) son muy importantes en la quimioterapia del cáncer pues tiene propiedades que les permiten inducir muerte por apoptosis (Siegmann-Louda *et al.* 2004) En el 2007 Valla y colaboradores publicaron una revisión de los compuestos de estaño con potencial terapéutico, desde el punto de vista estructural considerando los complejos de tipo carboxílico bidentado simétrico. Camacho-Camacho y colaboradores (2008), concluyeron a partir de sus resultados y de lo reportado

en investigaciones anteriores, que los derivados trifenílicos de estaño presentan una alta actividad antiproliferativa frente a diferentes líneas celulares tumorales de origen humano. Se ha demostrado que los complejos di-n-butilestaño y tri-n-butilestaño clorado poseen la capacidad de inducir apoptosis en estudios *in vitro* de timocitos de rata. Estos organoestaños inhiben la síntesis del ADN e incrementan la síntesis de ARN. Incrementan los iones Ca^{2+} que se relacionan con el citocromo C de la mitocondria y activan las caspasas, al final se produce la fragmentación de ADN. El Dietilestañodicloro (1,10-phenanthro) inhibe el crecimiento de células cancerosas y evita el cambio de la superficie de la membrana celular (Xiao *et al.*1993). Recientemente Blower (2004) describió trece compuestos de origen organoestánico que resultan de interés farmacéutico, mientras que Appel describió varios aspectos toxico-cinéticos de ciertos puntos en compuestos organoestánicos. Estudio el sistema monooxigenico para dar detalles de la interacción de estos compuestos con el ADN, aunque pudo entender la importancia de la relación estructura-función, no define de manera clara el mecanismo de acción. Series de complejos organoestánicos que contenían ligandos tipo salicilaldoxamina que se coordinaron con di-n-butilestaño mostraron resultados prometedores en estudios *in vitro* en MCF-7 una línea de cáncer de mama. (Gielen *et al.* 1992)

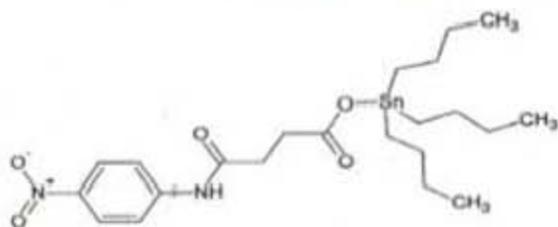
Ahmad y colaboradores, observaron que los ésteres trisustituidos de estaño tienen una actividad biológica mayor a los disustituidos, esta relación se conserva en pruebas con bacterias, hongos y de citotoxicidad (Ahmad *et al.* 2008). En 2008, Ramos-Organillo y colaboradores utilizan un método de síntesis modificado de Marcel Gielen para obtener complejos de estaño trisustituidos derivados de ligantes carboxilados, en esta técnica utilizan trietilamina como base y un solvente orgánico no coordinante del que obtuvieron resultados positivos como agente reductor de proliferación en líneas de cáncer colorectal. Alama y colaboradores (2009), reconocen diferentes mecanismos relacionados con compuestos organometalicos de estaño, como son la inhibición de la síntesis de macromoléculas, alteración del metabolismo energético, reducción de la síntesis de ADN, algunos de los cuales se han demostrado *in vivo*; estos efectos han sido observados particularmente con complejos con número de coordinación cinco (Alama *et al.* 2009).

Los resultados de los estudios de actividad biológica de los compuestos organometálicos de estaño son prometedores pero hay un problema práctico que debe mencionarse: la solubilidad. La solubilidad en medio acuoso es crucial para poder aplicarse como agentes terapéuticos. Aunque no se descarta que si se usan aditivos o formas nuevas de administración/liberación este problema pueda superarse. Un sustituyente polar puede incrementar la solubilidad de estos compuestos, se requieren estudios químicos y farmacológicos para descifrar una relación estructura-actividad con lo cual se pueda realizar el diseño racional de nuevos fármacos basados en estos compuestos.

Es evidente la importancia en la química de los farmacéuticos como la cinética, la estereoquímica y sus mecanismos de reacción, estas características tienen un gran significado pues representan la relación entre la estructura y las características cinéticas, que se deben contemplar en el diseño de derivados organometálicos y su actividad antitumoral. Por ejemplo se han reportado los compuestos poly-oxaalkilistanicos con funcionalidad en siete líneas tumorales humanas (Gielen *et al.* 2005).

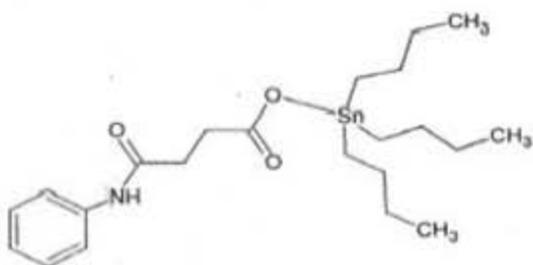
En una búsqueda en la literatura, se encontró un informe en el que se mencionan 2 análogos de tiazol sustituidos conectados a 3-propanamida, lo que contribuyó a una actividad antitumoral contra varias líneas celulares (Messery *et al.* 2012) Además, la incorporación de un 5-nitro-2-amino en el resto del anillo tiazol en algunos compuestos contribuyen a la alta bioactividad en el rango nanomolar. Jha *et al.* Han demostrado que sólo el éster metílico del grupo butenilo 1,4-dioxo-2- en derivados de arilaminas tiene actividad contra Molt 4 humano / C8 y CEM linfocitos T así como las células L1210 murinas, con valores de CI_{50} en el rango 2.2- 37 M. Recientemente Nitulescu *et al.* Describen la potencia inhibidora de derivados de 3-aminopirazol en proteínas cinasas que juegan un papel central en la señalización celular y están implicados en patologías malignas. Con el fin de establecer relaciones estructura-actividad para los compuestos de tributilestaño con ligandos aminobutanoico 4-oxo-4-arilo, se estudió la influencia de los sustituyentes del tipo de anillo aromático y los nitro en la actividad anti-proliferativa y citotóxica.

Tributilestanil4-oxo-(4-nitrofenil)aminobutanoico



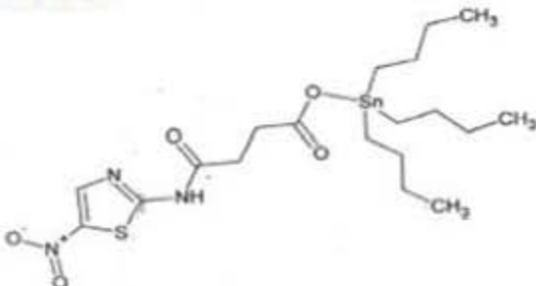
TBSn1-L1, L2o L3
 Molecular Formula = $C_{27}H_{39}N_2O_5Sn$
 Formula Weight = 527.24164
 Composition = C(50.12%) H(8.81%) N(5.31%)
 O(15.17%) Sn(22.52%)
 Monoisotopic Mass = 528.164621 Da
 Nominal Mass = 528 Da
 punto de fusión = 85-86 °C
 Soluble en diclorometano, cloroformo.

Tributilestanil4-oxo-4-(fenilamino)butanoato



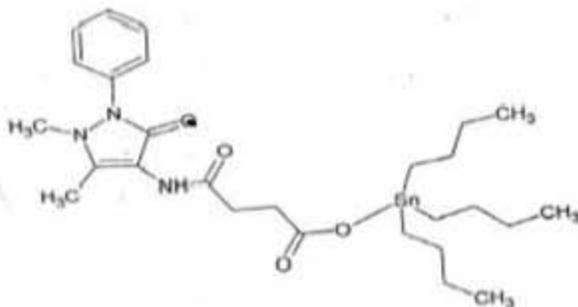
TBSn2-L1C
 Molecular Formula = $C_{27}H_{37}NO_5Sn$
 Formula Weight = 482.24408
 Composition = C(54.79%) H(7.73%) N(2.90%)
 O(9.95%) Sn(24.62%)
 Monoisotopic Mass = 483.179543 Da
 Nominal Mass = 483 Da
 punto de fusión = 61 °C
 Soluble en diclorometano, cloroformo.

Tributilestanil4-oxo-4(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)amino) butanoato



TBSn3-L2
 Molecular Formula = $C_{19}H_{29}N_3O_5SSn$
 Formula Weight = 534.25742
 Composition = C(42.71%) H(6.23%) N(7.87%)
 O(14.97%) S(6.00%) Sn(22.22%)
 Monoisotopic Mass = 535.11629 Da
 Nominal Mass = 535 Da
 punto de fusión = 134-135 °C
 soluble en diclorometano, cloroformo.

Tributilestanil4-oxo-4((5-oxo-1-fenil-1,5-dihidro-1H-pirazol-4-y)amino) butanoato.



TBSn4-L1
 Molecular Formula = $C_{27}H_{43}N_3O_5Sn$
 Formula Weight = 592.35802
 Composition = C(54.75%) H(7.32%) N(7.00%)
 O(10.80%) Sn(20.04%)
 Monoisotopic Mass = 593.227556 Da
 Nominal Mass = 593 Da
 punto de fusión = 140-141 °C
 soluble en diclorometano, cloroformo.

Figura 6. Estructura química de los compuestos TBSnx-Lx, así como su nombre asignado según la IUPAC.

Planteamiento del Problema & Justificación

El cáncer cervicouterino es un problema de salud pública pues es el tercer tipo de cáncer con mayor prevalencia en México y la segunda causa de muerte de las mujeres del país. Las terapias actuales no han sido del todo benéficas para el decremento de esta enfermedad, se caracterizan por ser costosas, tener efectos secundarios graves y en muchos casos los tumores generan resistencia a los fármacos o su mecanismo de acción provoca daños en el organismo al ser citotóxico. Es por ello que se genera la necesidad de seguir buscando nuevas opciones terapéuticas. Actualmente el desarrollo de agentes anticancerosos basados en organometales ha atraído una atención creciente en la investigación, los enlaces carbono-metal ejercen importantes efectos electrónicos y estéricos, que pueden ser usados para controlar su actividad biológica. El estaño se considera lo suficientemente inerte para actuar como andamio para diseñar compuestos que interactúen estereo-específicamente con biomoléculas y puedan actuar de manera selectiva, evitando los efectos secundarios. Es por ello que en el presente estudio se evaluó la actividad antiproliferativa y citotóxica de compuestos organometalicos de estaño derivados del tributilestaño en cultivos de líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo obteniendo una CI_{50} para cada una de las ellas.

Hipótesis

Se ha observado que diversos compuestos organometalicos de estaño tienen una alta actividad citotóxica contra varias líneas celulares de origen humano, así mismo se sabe que la modificación y diseño de estos compuestos con los grupos funcionales adecuados ha reducido esta citotoxicidad, por lo que se espera que los compuestos organometalicos TBSnx-Lx derivados del tributilestaño, exhiban una actividad antiproliferativa y no necrótica en las líneas de CaCu HeLa, CaSki y ViBo.

Objetivo General

Evaluar la actividad antiproliferativa y necrótica de compuestos organometalicos de estaño en cultivos de células de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo así como en cultivos de células linfocíticas no tumorales.

Objetivos particulares

- Determinar el efecto antiproliferativo de los compuestos organometalicos de estaño en las líneas de CaCu: HeLa, CaSki y ViBo, mediante la determinación de la concentración requerida del compuesto para abatir en un 50% el número celular (CI_{50}), a través de la técnica de tinción con el colorante cristal violeta.
- Valorar la actividad necrótica de los compuestos organometalicos de estaño en cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo mediante la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares.
- Valorar el efecto antiproliferativo y necrótico de los compuestos organometalicos de estaño en cultivos de linfocitos, mediante el marcaje celular con carboxifluoresceina y la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares, respectivamente.

Material y método

Cultivo de células tumorales provenientes de cérvix.

Las líneas celulares provenientes de CaCu: HeLa, CaSki y ViBo, fueron sembradas en cajas de Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), con 10 ml de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grunenthal, MEX), al 5 % de suero de ternera neonata (SNT; Gibco, USA) que previamente fue desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nuair, USA) a 37 °C, al 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación. La saturación de los cultivos fue hasta de un 70 % de confluencia para realizar los ensayos.

Preparación de los Stoks de cada compuestos TBSnx-Lx

Estos compuestos fueron otorgados por el laboratorio de la Dra. Irma Rojas O. En un proyecto de colaboración académica FES-Zaragoza-UAM-Xochimilco para su valoración

antiproliferativa y citotóxica (Fig. 6). 1 mg de cada compuesto fue solubilizado en 100 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) en un tubo cónico de plástico de 600 μ l y se almacenó a -4 °C hasta su utilización.

Determinación de la concentración que abate el 50 % del número celular de cultivos de células tumorales (CI₅₀).

Se cultivaron células de las líneas tumorales CaSki, HeLa y ViBo en cajas de plástico de 96 pozos (Corning, USA), a una densidad de 7,500 células/pozo en 100 μ l de RPMI-1640 al 5 % de suero de ternera recién nacida (SNT) por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionaron las concentraciones de compuesto que van de 0.07-10 μ g/ml, durante 24 h. El control para el vehículo empleado para solubilizar los compuestos organometálicos fue el DMSO, el cual se utilizó a una concentración máxima de 10 μ l/ml de medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de SNT; al control testigo únicamente se le realizó el cambio de medio por medio de cultivo fresco. 24 horas después al estímulo, se procedió a evaluar el número celular de acuerdo a la técnica de incorporación de cristal violeta descrita por Kueng *et al*, 1989. Para ello se retiró el medio de cultivo de la caja de cultivo y las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, USA) en agua desionizada por 15 minutos, al término de los cuales se retiró el fijador para posteriormente lavar las células con agua desionizada. A continuación se dejó secar al aire y se agregó el colorante cristal violeta (Sigma-Chemical Co.) al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos. Se eliminó el exceso de colorante a través de lavados con agua desionizada y nuevamente se dejó secar al aire. Por último, el colorante incorporado en el núcleo de las células fue solubilizado con ácido acético (J.T. Baker, MEX) al 10 % en agitación por 20 minutos. Finalmente se midió la absorbancia en un lector de placas (ChroMate Awareness Technology Inc. USA) a 600 nm. Cada uno de los tratamientos se realizó por sextuplicado. En cada caso los resultados se analizaron por regresión lineal para la obtención de la concentración que abate el 50 % de la población celular (CI₅₀).

Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima LDH.

En una caja de 96 pozos se sembró 7,500 células de cada una de las tres líneas provenientes de CaCu; CaSki, HeLa y ViBo con 100 μ l de RPMI al 5 % de SNT, por 24 h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos: un control al que únicamente se le hace cambio de medio de cultivo, un control positivo al cual se le hizo el cambio de medio, un control para DMSO con la concentración empleada para preparar la CI_{50} correspondiente y el tratamiento con los diferentes compuesto TBSnx-Lx con la concentración CI_{50} correspondiente a cada línea celular. A las 23 h de tratamiento, al cultivo control positivo se le realizó un nuevo cambio de medio de cultivo por medio fresco al 1 % de tritón X-100 y se dejó que el ensayo completara las 24 h de tratamiento.

Para la determinación de la actividad de la enzima LDH liberada al medio de cultivo, los sobrenadantes de los cultivos se recolectaron de manera individual en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml y se centrifugaron a 2,000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes se trasparos a una placa de 96 pozos, 50 μ l por pozo, para su evaluación. La actividad de LDH se determinó con el kit Cyto Tox 96 (Promega, USA), del cual se agregaran 50 μ l de la mezcla de reacción. Se dejó incubar a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 20 min. La evaluación se realizó a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de Elisa (ChroMate Awareness Technology Inc. USA). Por último los datos se analizaran haciendo una comparación relativa al control y el control positivo tratado con tritón X-100. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Efecto de los compuestos TBSnx-Lx sobre la proliferación de linfocitos humanos marcados con carboxifluoresceína.

En tubos vacutainer con EDTA, se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y se colocaran (5 ml) en tubos cónico de vidrio de 15 ml (Pirex, USA), con 5 ml de Histopak (Sigma-Aldrich USA) (un total de 4 tubos), se centrifugó (centrífuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm. Esta velocidad fue aumentando gradualmente (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejó centrifugar por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 μ l se retiro el plasma y se

colecto el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendieron con 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugo a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). El total de células quedo contenido en un solo tubo con un volumen total de 4ml. Se sembraron las células en una caja de Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, y se incubaron durante 1h en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecían en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugo la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Con una alícuota de 20 μ l, se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Para marcar las células linfocíticas con carboxifluoresceina (CSFE) (Zigma-Aldrich, USA) los linfocitos se resuspendieron en 4 ml de PBS con 10 μ l de carboxifluoresceina y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS al 5 % de SFB, se centrifugaron a 1500 rpm (dos veces) y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina (FHG), los linfocitos se transfirieron a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de 10⁶ células/ml de RPMI-1640 al 20% de SFB y 25 μ /ml de fitohemaglutinina/ml (diluida en PBS) (Micro Lab S.A., Méx.). La preparación de los tratamientos se realizó en ese momento: control solo con medio de cultivo con y sin FHG, control para el vehículo al cual se le agrega la cantidad de DMSO empleada en la preparación de la concentración CI₅₀ más alta obtenida para células tumorales de CaCu, y en las concentración de CI₅₀ de cada uno de los compuestos probados. Las células contenidas en cada tubo cónico se sembraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l y se incubaron en condiciones de cultivo por 72 h. Para la evaluación, las células se cosecharon extrayendo todo el medio de cultivo, y colectando en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml. Se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, el sobrenadante fue colectado para su evaluación de actividad de la enzima LDH, se resuspendió el botón celular en 1 ml de verseno frío y se incubo por 5 min a temperatura ambiente; se centrifugó nuevamente y se retiró el verseno.

Posteriormente se resuspendió con 500 μ l de PBS y se agregó 500 μ l de paraformaldehído al 2%. Las células fueron evaluadas por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACS Aria II y los datos se procesaron con el programa FACSDiva versión 6.1.2. Los datos fueron analizados haciendo una comparación con respecto al control positivo para proliferación, de células tratadas únicamente con FHG.

Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima LDH en cultivos de linfocitos humanos.

En tubos vacutainer con EDTA, se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y se colocaron (5 ml) en tubos cónico de vidrio de 15 ml (Pirex, USA), con 5 ml de Histopaque (un total de 4 tubos), se centrifugaron (centrífuga; Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y se aumentó gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejó centrifugar por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 μ l se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo se transfirió a tubos limpios y se resuspendieron con 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). El total de células quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4ml. Las células se sembraron en una caja de Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, y se incubaron durante 1h en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecieron en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugo la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendio nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 μ l, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer. Los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de 10^6 células/ml de RPMI-1640 al 20% de SFB y 25 μ /ml de fitohemaglutinina/ml (Micro Lab S.A., Méx.). La preparación de los tratamientos se realizó en ese momento: control solo con medio de cultivo con y sin FHG, control positivo al cual en este momento no se agrega tritón X-100, control para el vehículo al cual se le agrego la cantidad de DMSO empleada en la preparación de la concentración CI50 más alta obtenida

para células tumorales de CaCu, y las concentración CI50 para cada línea. Las células contenidas en cada tubo cónico fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l y se incubaron en condiciones de cultivo por 72 h. Para la evaluación, a las 71 h de tratamiento al control positivo se agregaron 2 μ l tritón X-100 y se homogenizaron pipeteando suavemente el medio de cultivo, se mantuvo en incubación por 1 h más. A las 72 h de cultivo a las células se les extrajo todo el medio de cultivo, y se colectaron en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml de manera individual. Se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, y se traspasaron 50 μ l de cada muestra y de cada tratamiento a una placa de 96 pozos para su evaluación. La actividad de LDH se determina con el kit Cyto Tox 96 (Promega, USA), del cual se agregan 50 μ l de la mezcla de reacción. Se incubo a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 20 min. Se evaluó a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de elisa (Image tecan spectra). Los datos se analizaran haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

Resultados

Actividad antiproliferativa en células tumorales

Para determinar el efecto antiproliferativo de los compuestos organometálicos, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron tratadas con los compuestos TBSn 1-4 en un rango de concentraciones de 0 a 10 μ g/ml, ciertos ensayos se ajustaron a las demandas y observaciones de compuesto por línea. La actividad antiproliferativa fue expresada como la concentración requerida del compuesto que abate en un 50% el número celular (CI₅₀) (Figura 7, 8 y 9, tabla 1).

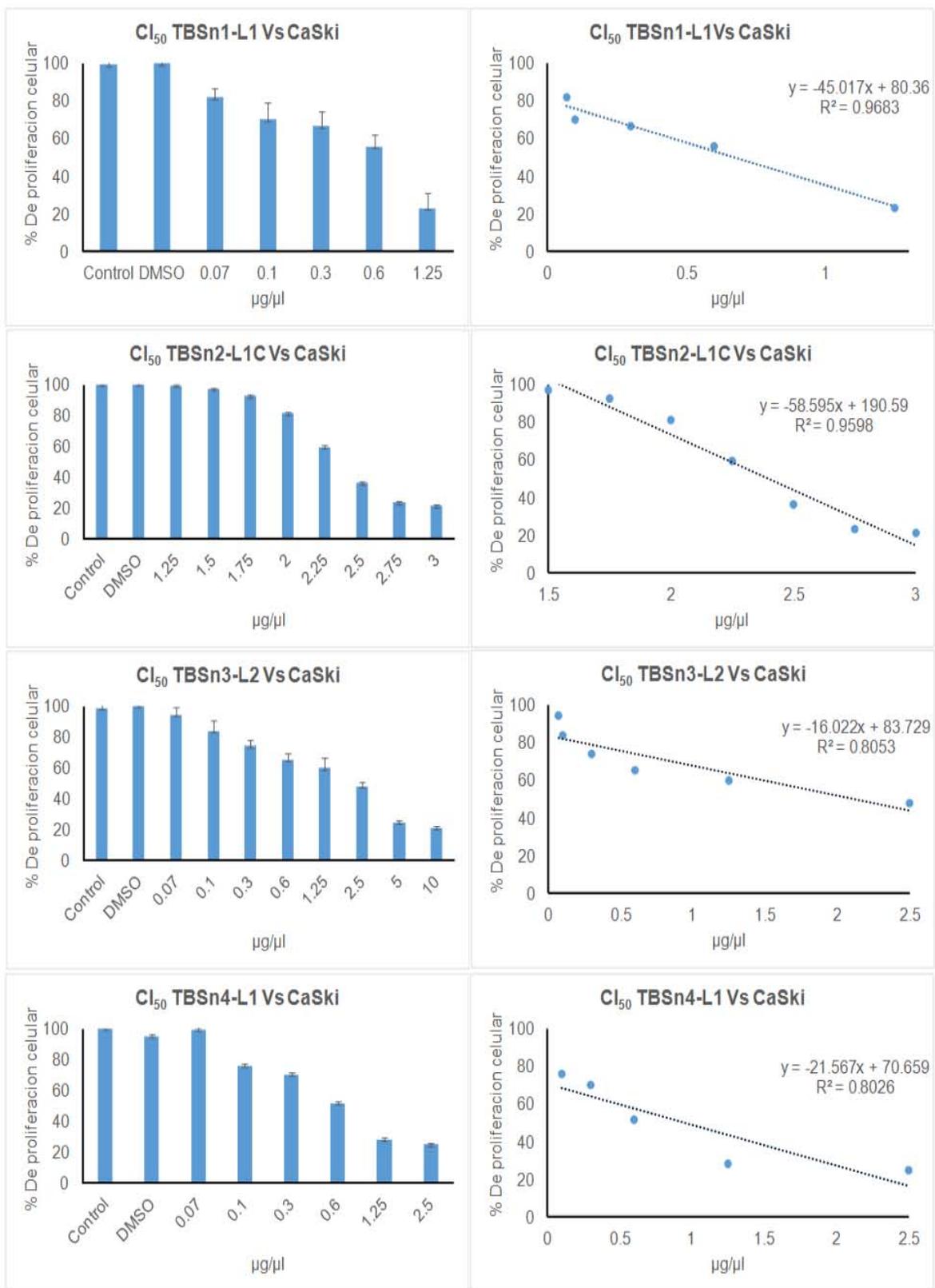


Figura 7. Actividad antiproliferativa de los compuestos organometálicos en cultivos de la línea tumoral de

CaCu, CaSki

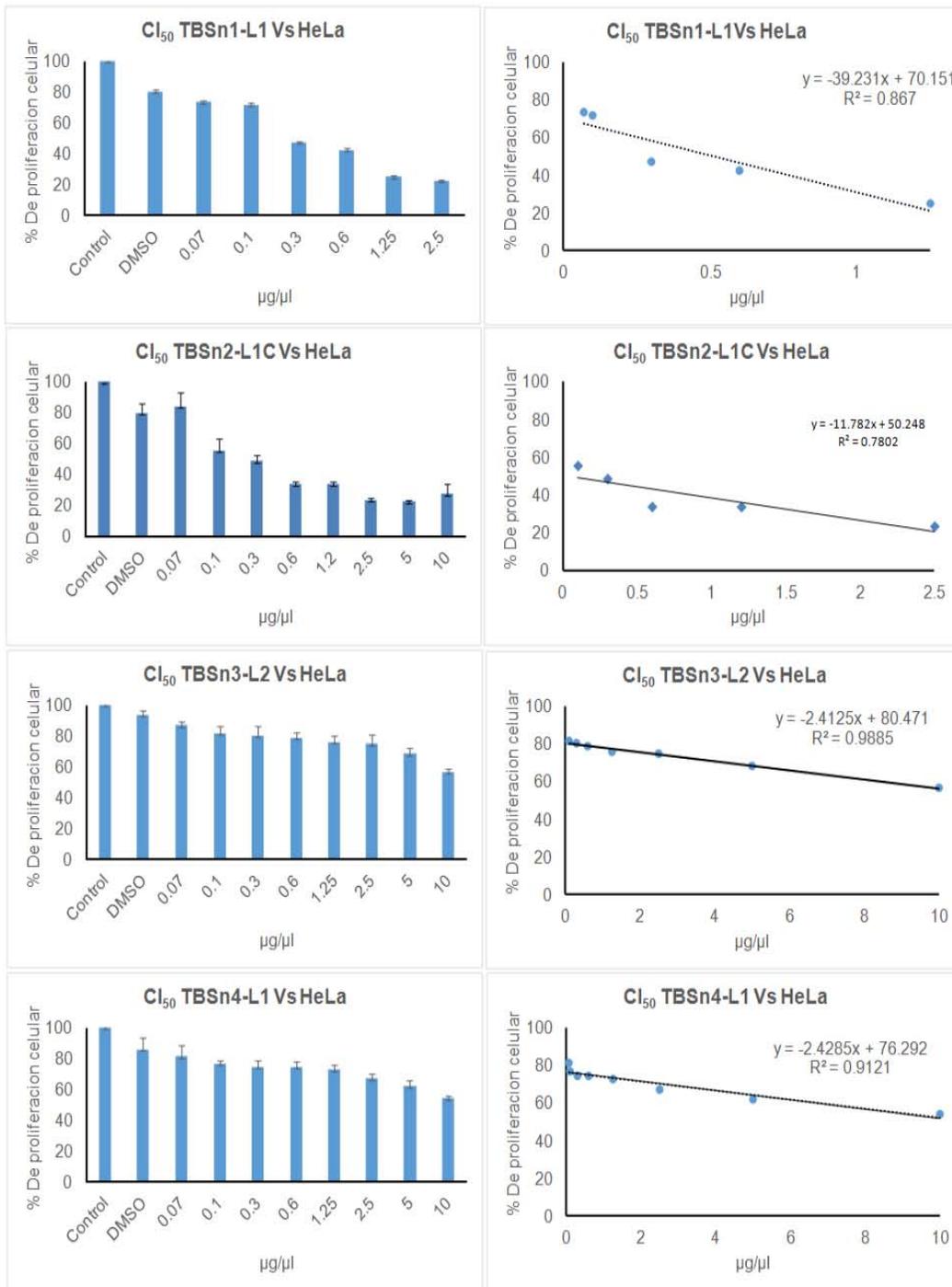


Figura 8. Actividad antiproliferativa de los compuestos organometálicos en cultivos de la línea tumoral de

CaCu, HeLa

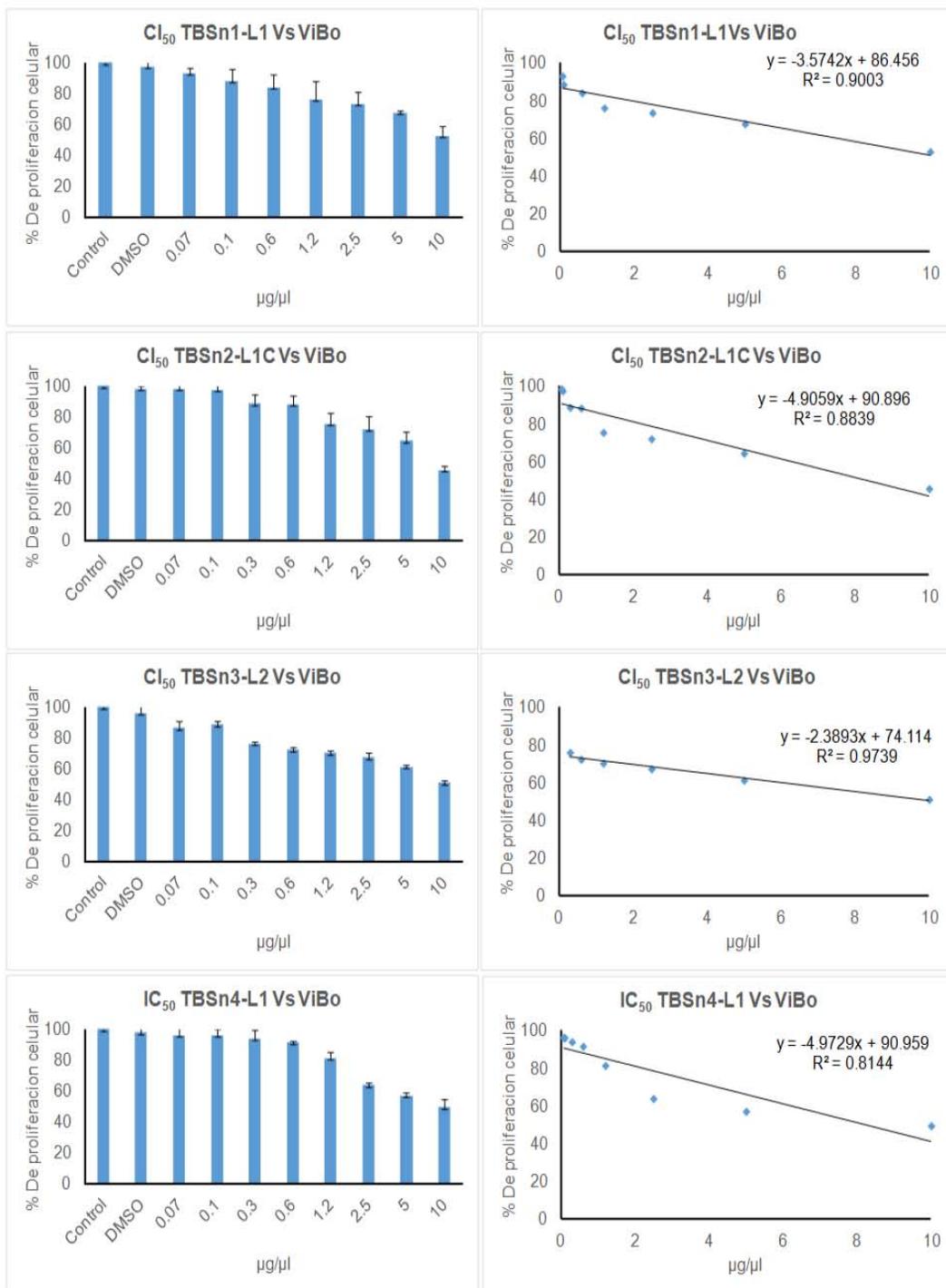


Figura 9. Actividad antiproliferativa de los compuestos organometálicos en cultivos de la línea tumoral de CaCu, ViBo.

CI₅₀ µg/ml			
Compuesto	CaSki	HeLa	ViBo
TBSn1-L1	0.68	0.51	10.84
TBSn2- L1C	2.36	0.27	8.85
TBSn3-L2	2.53	12.78	10.30
TBSn4- L1	0.71	11.14	8.99

Tabla1. CI₅₀ obtenidas para cada uno de los compuestos en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo.

Los resultados obtenidos establecen que los compuestos organometálicos TBSn 1-4 afectan el potencial proliferativo de las tres líneas tumorales de una manera dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementa la concentración del compuesto, el número celular disminuye. No obstante que las tres líneas celulares provienen de un carcinoma cervical, cada línea celular presentó sensibilidad diferente a cada uno de los compuestos. Por ejemplo, las células ViBo mostraron ser las más resistentes o menos sensibles a los cuatro TBSn, con las CI₅₀ más altas en concentración, mientras que las células HeLa y CaSki fueron más sensibles o menos resistentes.

Actividad citotóxica (necrótica) de los TBSn en células tumorales.

Con el propósito de establecer si los compuestos TBSn 1-4 presentan actividad citotóxica en células tumorales, cultivos de células tumorales de CaCu HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con su respectiva CI₅₀ y la actividad necrótica fue evaluada cuantificando la actividad de la enzima citoplasmática Lactatodeshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos y considerada un marcador de muerte celular necrótica, ya que la única forma de que esta enzima esté en el sobrenadante de los cultivos celulares es que la membrana celular esté dañada, perdiendo su continuidad (Figura 10, Tabla 2)

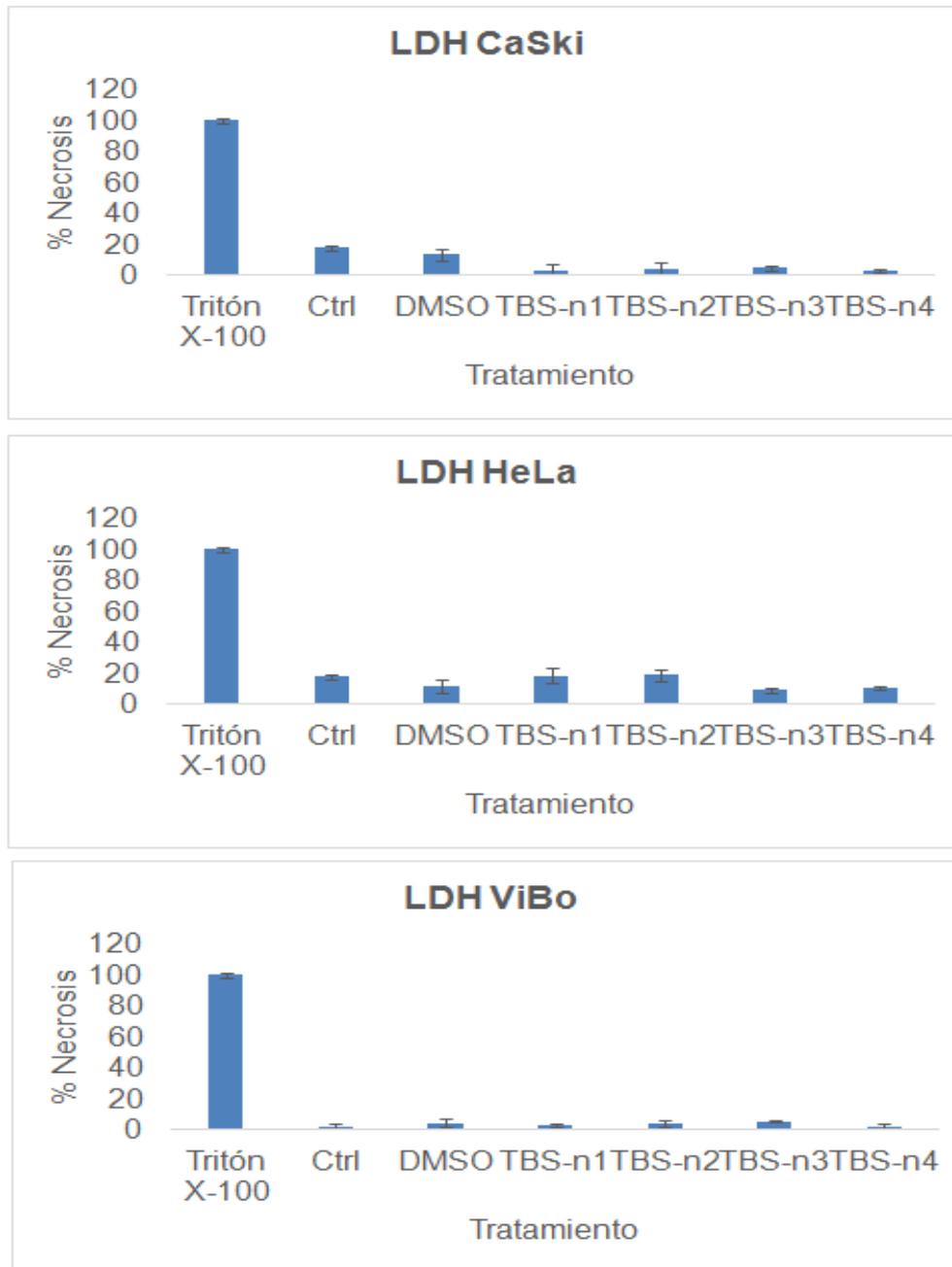


Figura 10. Actividad citotóxica (necrótica) de los TBSn en cultivos de células tumorales de cérvix HeLa, CaSki y ViBo.

CI₅₀ µg/µl Compuesto	CaSki %	HeLa %	ViBo %
Control	17.57	17.57	1.49
DMSO	13.20	11.58	4.41
TBSn1-L1	2.77	18.40	2.97
TBSn2- L1C	3.97	18.66	3.81
TBSn3-L2	4.5	9.04	5.43
TBSn4- L1	2.5	10.66	2.19

Tabla 2. Porcentaje de liberación de la enzima lactato deshidrogenasa con respecto a las CI₅₀'s obtenidas para cada uno de los compuestos organometálicos de cada línea celular.

Como se puede apreciar en la figura 10, los compuestos TBSnx-Lx 1-4 no presentaron actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en los sobrenadantes de los cultivos de células tumorales, indicando que el decremento en el número celular observado en los cultivos tratados con estos compuestos, es debido a causas diferentes a la muerte celular por necrosis.

Actividad antiproliferativa de los TBSnx-Lx en cultivos de células linfocíticas.

Con la finalidad de establecer si los compuestos TBSnx-Lx 1-4 presentan actividad antiproliferativa con acción selectiva, cultivos de células linfocíticas humanas, provenientes de sangre periférica fueron estimulados con las CI₅₀'s y el efecto en el potencial proliferativo de estas células fue evaluado mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína y cuantificado por citometría de flujo. (11, tabla 3).

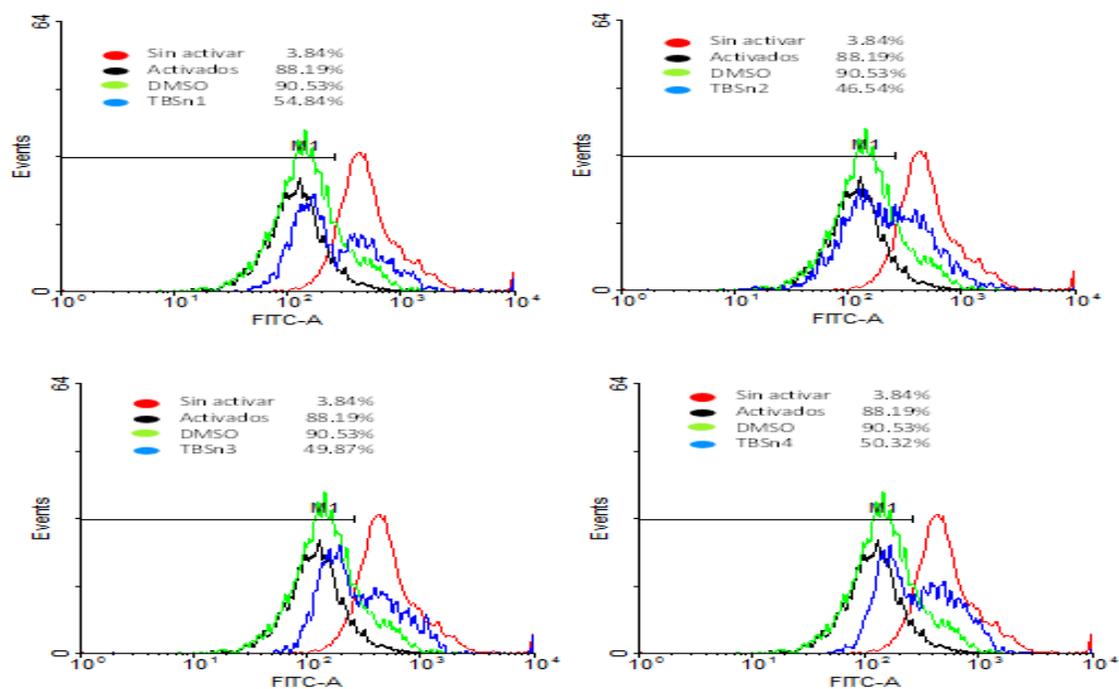


Figura 11. Representación esquemática de la actividad antiproliferativa de los compuestos organometálicos TBSnx-Lx en cultivos de células no tumorales (linfocitos). Solo se presentan las concentraciones más altas de CI₅₀ de cada compuesto.

COMPUESTO	μg/ml	LINFOCITOS ACTIVADOS %	VEHÍCULO %	TRATAMIENTO %	DISMINUCIÓN DE PROLIFERACIÓN %
TBSn1	10.84	88.19	90.53	54.84	37.81
TBS n2	8.85	88.19	90.53	46.54	47.22
TBS n3	10.3	88.19	90.53	49.87	43.45
TBS n4	8.99	88.19	90.53	50.32	42.94

Tabla 3. Porcentaje de proliferación de células linfocíticas bajo diferentes concentraciones de los compuestos TBSnx-Lx

Los resultados mostrados en la figura 11 establecen que los compuestos TBSnx-Lx afectan el potencial proliferativo de las células linfocíticas en un 37 a 47% a concentraciones de 8 a 10.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, indicando que la actividad antiproliferativa de los TBSnx-Lx no es selectiva.

Actividad citotóxica (necrótica) de los TBSnx-Lx en cultivos de células linfocíticas.

El hecho de que los TBSn afectaron el potencial proliferativo de las células linfocíticas de manera significativa (Figura 11, tabla 3) y con la intención de determinar si esta disminución en la densidad celular es debida a una muerte necrótica, cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana fueron estimulados con las respectivas CI_{50} 's de los TBSnx-Lx obtenidas para cada una de las células tumorales y la actividad de la enzima citoplasmática LDH fue cuantificada en los sobrenadantes de los cultivos tratados con los TBSn 1-4 (Figura 12, tabla 4).

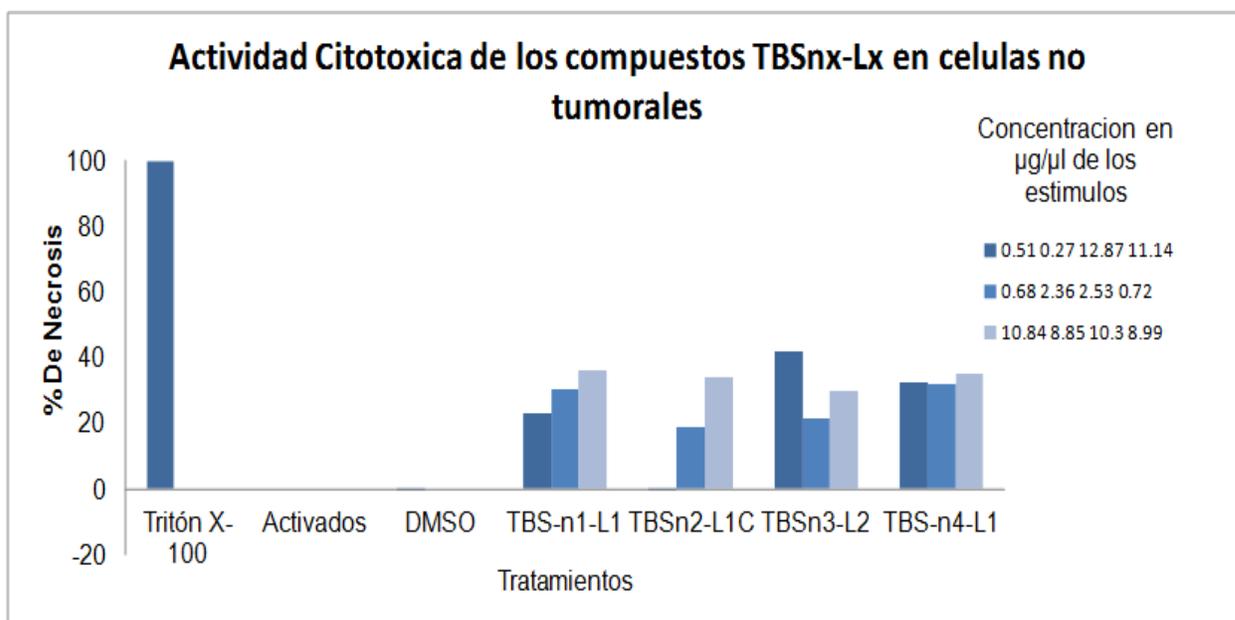


Figura 12. Actividad citotóxica (necrótica) de los compuestos organometalicos en células no tumorales (linfocitos.)

Compuesto	% De Actividad de LDH					
	CI ₅₀ (µg/µl)	LDH (%)	CI ₅₀ (µg/µl)	LDH (%)	CI ₅₀ (µg/µl)	LDH (%)
TBSn1-L1	0.68	30.44	0.51	23.11	10.84	36.06
TBSn2-L1C	2.36	19.03	0.27	0	8.85	33.83
TBSn3-L2	2.53	21.57	12.87	41.66	10.30	29.96
TBSn4-L1	0.72	31.83	11.14	32.49	8.99	35.22

Tabla 4. Porcentaje de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en sobrenadantes de cultivos de células linfocíticas tratadas con las CI₅₀ obtenidas para cada uno de los compuestos organometálicos de cada línea celular probadas en células no tumorales (linfocitos).

Los resultados obtenidos en la figura 12, establece que los compuestos TBSn inducen a las células linfocíticas a liberar la enzima citoplasmática LDH en un 19 a 42%, dependiendo de la concentración, sugiriendo que los TBSn 1-4 son citotóxicos para las células linfocíticas, induciendo una muerte necrótica en éstas.

Análisis de Resultados

Los datos obtenidos para estos compuestos nos demuestran que el potencial proliferativo ciertamente está siendo afectado y que esto está asociada a una relación dosis respuesta. Podemos ver que la línea que requirió más concentración de los cuatro compuestos fue la línea ViBo, mientras CaSki presentan niveles cinco veces más bajos, siendo así la línea que mayor susceptibilidad presenta, para el caso de HeLa podemos observar dos tipos de comportamiento y esto es dependiendo del compuestos con el que se relaciona, esto nos indica que las líneas tienen una susceptibilidad diferente y que en los compuestos estudiados la actividad antiproliferativa varía en cuanto a las concentraciones requeridas por línea, esto podría asociarse a la diferencia de grupos funcionales entre las estructuras de los compuestos, su forma de interacción y su mecanismo de acción en cada línea celular, pues esta podría variar dependiendo del origen que tiene cada una de estas líneas, pues HeLa y CaSki transcriben activamente el ARN y sintetizan las oncoproteínas E6 Y E7 del VPH (VPH18, VPH16), mientras que ViBo no presenta esta característica. Gasser *et al.* 2011 hablan de los compuestos organometálicos y de cómo estos ofrecen

amplias oportunidades en el diseño de nuevas clases de compuestos medicinales, potencialmente con nuevos metales con modos específicos de acción. Distintos compuestos organometálicos de Sn han demostrado tener actividad antiproliferativa en diversas líneas tumorales humanas. Si bien en todas ellas se ha observado pérdida de viabilidad, también es cierto que la magnitud del efecto ha sido distinta, como cabe esperar teniendo en cuenta el origen y las características fenotípicas de cada una de las líneas celulares estudiadas. El éxito del desarrollo de inhibidores de ciertas cinasas por el rutenio por Meggers y colaboradores demuestra de forma impresionante esta capacidad (Gasser et al. 2011). En comparación con un estudio donde se valoró la actividad citotóxica de compuestos organometálicos derivados de estaño SnCy3(DMNI), SnCy3(BZDO), SnCy3(DMFU), SnPh2(BZDO)2 en las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas PANC-1, de eritroleucemia k562, y en dos líneas de glioblastoma multiforme U87 y LN-229, los compuestos mostraron una alta actividad antiproliferativa ante todas las líneas tumorales con valores de CI₅₀ entre 150- 700 nM. La distribución del ADN celular tras la incubación de las células con los complejos organometálicos revelan que, mientras los compuestos provenientes de ciclohexiltinas derivadas de la posición 5, SnCy3(DMNI), SnCy3(BZDO), SnCy3(DMFU) inducen apoptosis en la mayoría de las líneas celulares, el carboxílico octaédrico de Sn, SnPh2(BZDO)2 no afecta la viabilidad celular en ninguna línea, lo que indica que en este tipo de compuestos existe una posible diferencia en sus mecanismos citotóxicos.

En la evaluación de liberación de la enzima LDH, los valores no se consideran relevantes para ser considerados inductores de muerte por necrosis, sin embargo se ha observado que la pérdida de viabilidad celular es mayor que el grado de apoptosis producido por los compuestos organometálicos, lo cual sugiere que, además de apoptosis, otros mecanismos de muerte celular deben dar cuenta a la elevada citotoxicidad provocada por estos compuestos, tales como el proceso de necrosis frecuentemente asociado a muchos fármacos antitumorales organometálicos (Gasser et al. 2011). Cada uno de los TBSnx-Lx varío en cuanto a su actividad necrótica, pues a pesar de que en unos la concentración varia como en el TBSn4-L1 (CaSki 0.71µg/ml, HeLa 11.14µg/ml y ViBo 8.99µg/ml) el efecto necrótico en células tumorales es escaso mientras que para las células linfocíticas este parámetro fue alto lo que demuestra que este efecto no depende de la concentración y que

este derivado es naturalmente citotóxico, por lo que se descarta como posible candidato para continuar con estudios posteriores. Se ha observado que la apoptosis inducida por los derivados de Sn, puede ser dependiente o no de la actividad de caspasas. Por lo que se sugiere realizar técnicas que deliberen estos resultados y determinen cuál es el proceso por el cual se da una pérdida de proliferación celular, como la de caspasa 3 para verificar si el derivado TBSn2-L1c que fue el que presentó menor toxicidad induce apoptosis. Por otro lado también sería conveniente realizar el análisis del efecto de los compuestos sobre otras líneas celulares de cáncer diferente a la de CaCu (pulmón, mama, próstata, etc.) con la intención de determinar si su efecto antitumoral es independiente del tipo del tumor, o es específico de tumores de CaCu.

Los compuestos evaluados tienen una estructura tetraédrica que se obtuvo gracias a su unión con diversos grupos funcionales teniendo como base al tributil estaño. Los compuestos triorganoestánicos adoptan cuatro coordenadas es decir estructuras tetraédricas distorsionadas en disolventes no coordinantes como se deduce de los estudios de RMN, están bastante bien conocidos como bactericidas y fungicidas (Gielen *et al.* 2005)

.Wu *et al.* 2009 menciona que los grupos tetra-coordinados tienen una fuerte tendencia a incrementar su coordinación y por lo tanto una mayor capacidad de interactuar con grupos funcionales de proteínas y/o ácidos nucleicos presentes en el organismo. El conocimiento de uniones selectivas y específicas de especies organometálicas a sitios donadores en estructuras biológicas, y aun en moléculas pequeñas biológicamente relevantes, es muy importante para la elucidación del mecanismo de acción de estos compuestos en humanos (Katsoulakaou *et al.* 2008). Aparentemente las pequeñas diferencias en la estructura de los compuestos TBSn_x-L_x les dan una actividad biológica distinta, implicando una relación directa entre la estructura de la molécula, su actividad biológica, el ambiente de coordinación del metal; y que el ligando aniónico también tiene relación con el grado de actividad de los compuestos organometálicos (Rojas-Oviedo *et al.* 2014). En estos derivados el fenilamino del TBSn2-L1C parece ser el mejor grupo, pues su interacción con el resto de la molécula y el estaño a su vez permiten que la interacción con las células cancerosas y linfocíticas intervenga en su proliferación pero no de manera necrótica. Le seguirían en orden de menor actividad citotóxica el nitro fenil amino del TBSn1-L1, el (5-

nitro-1,3-tiazol-2-il) amino del TBSn3-L2 y por ultimo (5-oxo-1-fenil-1,5-dihidro-1-H-pirazol 2,3 dimetil-4-il) amino del compuesto TBSn4-L1.

Es evidente que la explotación de las distintas propiedades de los complejos metálicos de compuestos biológicamente activos merece más atención. Se espera que la llegada de los complejos organometálicos en los ensayos clínicos mejorara la aceptación de tales compuestos en la industria farmacéutica y apoyar a nuevas investigaciones en el fascinante ámbito de las drogas organometálicos y sus dianas biológicas.

Conclusiones.

Los compuestos organometálicos derivados del trifalestano si ejercen una baja en la capacidad proliferativa en las líneas HeLa, CaSki y ViBo provenientes de CaCu.

Las concentraciones a la cual se disminuye la densidad celular en un 50 % para las células provenientes de CaCu para la línea CasKi son: 0.68, 2.36, 2.53 y 0.72 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Las concentraciones a la cual se disminuye la densidad celular en un 50 % para las células provenientes de CaCu para la línea HeLa son: 0.51, 0.27, 12.87 y 11.14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Las concentraciones a la cual se disminuye la densidad celular en un 50 % para las células provenientes de CaCu para la línea ViBo son: 10.84, 8.85, 10.30 y 8.99 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

La línea celular más susceptible fue CasKi y la que mayor resistencia presento fue ViBo.

Los compuestos TBSnx-Lx presentan gran variabilidad en los IC50 obtenidos, lo que aparenta una interacción distinta entre la estructura de estas moléculas con las células.

Los porcentajes de muerte por necrosis obtenidos para estos compuestos organometálicos pueden considerarse insignificantes, sin embargo en células linfocíticas no tumorales el nivel de esta enzima es considerable, por lo que se infiere que estos compuestos si bien no son citotóxicos para células tumorales, no discrimina ante células no tumorales por lo que se considera que estos compuestos no permiten obtener beneficio en su utilización.

De los grupos funcionales que se utilizaron para la síntesis de estos compuestos, es el fenilamino es el que otorgo menor citotoxicidad, le siguen el nitro fenil, 5-nitro-1,3-tiazol-2-il y fue el 5-oxo-1-fenil-1,5-dihidro-1-H-pirazol, 2-3 dimetil (4-il) amino el que presento una citotoxicidad más elevada.

La hipótesis solo se cumplió en la parte de antiproliferación, pues estos compuestos fueron capaces de reducir el nivel celular para las tres líneas celulares. Los efectos de citotoxicidad obtenidos demuestran una relación de las estructuras con su actividad biológica. De los cuatro diseños generados para estas moléculas solo el grupo funcional fenilamino cumplió el objetivo de la creación de estos compuestos pues pudo reducir el efecto citotóxico, sin embargo es dependiente de la concentración. Se descarta la posibilidad de seguir estudiando estos compuestos pues se les considera poco selectivos y altamente citotóxicos.

Literatura citada

- Abramkin, S.A, U. Jungwirth, U. Valiahdi., Dworak C., Habala L., Meelich K., Berger W., Jakupec M.A., Hartinger C.G, Nazarov A.A., Galanski M., and Keppler K. (1R,2R,4R)-4-Methyl-1,2-cyclohexanediamine) oxalatoplatinum(II): A Novel Enantiomerically Pure Oxaliplatin Derivative Showing Improved Anticancer Activity in Vivo, *J. Med. Chem*: 53(20), 7356–7364 (2010).
- Abu-Surrah, A.S., Kettunen, M. (2006), *Platinum Group Antitumor Chemistry: Design and development of New Anticancer Drugs Complementary to Cisplatin*, *Current Medicinal Chemistry*, Vol.13, 1337-1357, 0929-8673/06.
- Adams, J.M., y Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cáncer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337
- Ahmad, M. S., Hussain, M., Hanif, M., Ali, S., Qayyum, M., & Mirza, B. Di- and Triorganotin (IV) Esters of 3,4-Methylenedioxyphenylpropenoic Acid: Synthesis, Spectroscopic Characterization and Biological Screening for Antimicrobial,

- Cytotoxic and Antitumor Activities. *Chemical Biology & Drug Design* , 71, 568-576. (2008).
- Alama, A., Tasso, B., Novelli, F., & Sparatore, F. Novel Organotin as Antitumor Agents. *Drug Discovery* , 50-53. (2009)
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y P. Walter. (2006). *Introducción a la biología celular: Cáncer*, 2 Ed. Editorial Panamericana, Madrid. Pp: 726-736
- Amaravadi, R.K. y Thompson, C.B. (2007). The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clinical Cancer Research*. 13,7271-7279.
- American Cancer Society- ACS. (2011). *Cancer Facts and Figures 2011*. Atlanta, GA: American Cancer Society. Retrieved December 27, 2011.
- Baynes J. M. y Dominiczak M. H. (2008). *Bioquímica médica*. 2a edición. Editorial Elsevier. España, 703 pp.
- Beck, D.J. y R.R. Brubaker, Effect of cis-Platinum(II)Diamminodichloride on Wild Type and Deoxyribonucleic Acid Repair-Deficient Mutants of Escherichia coli1, *J. Bacteriol*: 116(3), 1247–1252 (1973).
- Belinson J.L.,Robert G.P.,Chritine E.,Francisco G., Eduardo P.C., Suzanne E.B., Eduardo Y.G. and Jennifer Brainard. 2009. The Mexican cervical cancer screening trial. Self-sampling for human papillomavirus with unaided visual inspection as a secondary screen. *Int Gynecol Cancer* 2009;19:27-32.
- Benuto Aguilar RE, Berumen Campos J. 2009. Virus oncogénicos: el paradigma del virus del papiloma humano. *Dermatología Rev Mex*; 53:234-42.
- Boticario B. C. (2005). ¿Una alimentación sana puede prevenir el cáncer? *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 71: 609-633.
- Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 1208-1214.
- Burgués J., Pontones J., Vera C., Jiménez J., y Ozonas M., 2005. Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urol. Esp.* 29 : 846-859.
- Caballero A., Moran J., (2002). Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica. *REB*. 21:235-244.

- Camacho-Camacho, C., Rojas-Oviedo, I., Paz-Sandoval, M., Cardenas, J., Toscano, A., Gielen, M., et al. Synthesis, structural characterization and cytotoxic activity of organotin derivatives of indomethacin. *Applied Organometallic Chemistry* , 22, 171-176. (2008).
- Castellanos Morales Martha Rocío. 2003. Cáncer cervicouterino y el VPH. Opciones de detección. *Rev Fac Med (Mex)* 2003; 46 (2): 63-66.
- Cooper G. M., Robert E. H., *La Célula*, 2011, 5° edición. Marbán Libros S.A. Madrid, España.
- Díaz L., Chiong M., Quest A., Lavandero S. y A. Stutzin. (2005). Mechanisms of cell death: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Cell Death and Differentiation*; 12:1449–1456
- D.W. Siegmann-Louda, C.E. Carraher Jr., in: C.E. Carraher et al. (Eds.), *Macromolecules Containing Metal and Metal-like Elements, Biomedical Applications*, vol. 3, Wiley Interscience, New York, 2004, p. 57 (Capítulo 7).
- Fink S. Cookson T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*; 4:1907–1916.
- Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *New England Journal of Medicine* 2007; 356(19):1928–1943.
- Gasser, G., Ott, I., and Metzler- Nolte, N. (2011). Organometallic anticancer compounds. *J. Med. Chem.* 54, 3-25.
- Gerasimchuk, N., Maher, T., Durham, P., Domasevitch, K. V., Wilking, J., & Mokhir, A. Tin(IV) Cyanoximates: Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity. *Inorganic Chemistry* , 46, 7268-7284. (2007).
- Gianferrara,T., Bratsos, I., and Alessio, E. (2009). A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action. *Dalton Trans.* 2009. Oct. 7.; (37.): 7588.-98-Epub. 2009. Jun.5.7588-7598.
- Gómez EO, A. Zentella A. 1998. Apoptosis y muerte celular programada. *Boletín de educación bioquímica de México*; 17:105-114
- GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Consultado 20/08/2014.

- Hanahan D., Robert A.W., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144, Marzo 4, 2011. Elsevier Inc.
- Hernández M. y M. Ríos. (1999). Oncogenes y cáncer. Revista Cubana de Oncología; 15:131-9.
- Hinojosa-García Luz María, Dueñas-González Alfonso. 2000. Papel de la quimioterapia en el tratamiento del carcinoma cervicouterino. Rev Inst Nal Cancerol (Mex); 46:47-57
- Hsu PP, Sabatini DM. 2008. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. Cell; 703-707
- Infante-Cossío P, Gutiérrez-Pérez JL, Bullón-Fernández P. 2000. Complicaciones de la radioterapia y la quimioterapia en pacientes con cáncer en la cavidad bucal. En: Ceballos-Salobreña A, Bullón-Fernández P, Gándara-Rey JM, Chimenos-Küstner E, Blanco-Carrión A, Martínez-Sahuquillo Márquez A. Medicina bucal práctica. Santiago de Compostela: Danú; 2000. p. 646-57.
- J. Xiao, J. Cui, Y. Su, J. He, J. Yao, J. Ch. Pharm. Sci. 2 (1993) 45.
- Jungwirth, U., D. Xanthos, J. Gojo, A. K. Bytzeck, W. Korner, P. Heffeter, S. A. Abramkin, M. A. Jakupiec, C.G. Hartinger, U. Winderberger, M. Galanski, B.K. Keppler and W. Berger. Anticancer Activity of Methyl-Substituted Oxaliplatin Analogs, Mol. Pharmacol: 81(5), 719–728 (2012).
- Karp G., Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos. Séptima Edición. Mc Graw Hill- education. Interamericana, editors. Version en español. 2014.
- Katsoulakaou, E., Tiliakos, M., Papaefstathiou, G., Terzis, A., Raptopoulou, C., Geromichalos, G., et al. Diorganotin (IV) complexes of dipeptides containing the α -aminoisobutyryl residue (Aib): Preparation, structural, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of [(n-Bu)₂Sn(H-1L)](LH=H-Aib-L-LEu-OH, H-Aib-L-Ala-OH). Journal of Inorganic Biochemistry, 102, 1397-1405. (2008).
- Kim, Y. T. and Zhao, M. (2005). Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. Yonsei Medical Journal, vol 46, num 5, pp. 597-613.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. New England Journal of Medicine 2002; 347(21):1645–1651
- Kreimer AR, Gonzalez P, Katki H, et al. Efficacy of a bivalent HPV 16/18 vaccine against anal HPV 16/18 infection among young women: a nested analysis within the Costa Rica Vaccine Trial. Lancet Oncology 2011; 12(9):862–870.

- Kreimer AR, Rodriguez AC, Hildesheim A, et al. Proof-of-principle evaluation of the efficacy of fewer than three doses of a bivalent HPV 16/18 vaccine. *Journal of the National Cancer Institute* 2011; 103(19):1444–1451
- Lizano S.M., Adela C.G., Adriana C.P., Infeccion por virus del papiloma humano: *Epidemiologia, Historia natural y carcinogénesis. Cancerologia4* (2009): 205-216.
- López-Casillas F. (2002). El ciclo celular bien vale un galardón. *Ciencia enero-marzo*: 74-77.
- López-Saavedra A, Lizano-Soberón M. 2006. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*; 1: 31-55.
- López S., Soberón L., Cáncer Cervicouterino y el virus de papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología 1* (2006):31-55
- M. Gielen, M. Biesemans, R. Willem, *Appl. Organomet. Chem.* 19 (2005) 440.
- M. Gielen, R. Willem, M. Biesemans, M. Bualam, A. El Khloufi, D. De Vos, *Appl. Organomet. Chem.* 6 (1992) 287.
- Mesa V., Lomanto L., Ortiz O., Breton C., Gomez A. (2003). El ciclo celular. *Med UNAB.* 16: 21-29.
- S. M. El-Messery, G. S. Hassan, F. A. M. Al-Omary, H. I. El-Subbagh, *Eur. J. Med. Chem.* 2012, 54, 615.
- Motoyama S, Ladines-Llave C, Villanueva SL, Maruo T. 2004. The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis *Kobe J. Med. Sci*; 50:9-19
- National Cancer Institute at the national institutes of Health <http://www.cancer.gov/aboutnci/servingpeople/nci-budget-information>. consultado 20/08/2014.
- Noriega G. El tratamiento actual del cáncer cervicouterino. *Ginecol Obstet Mex.* 2008;76(2):131-9.
- Ott, I., Gust R. (2007) Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs, *Archive der Pharmazie*, Vol.340, No.3, (March 2007), pp.117-26, 0365-6233
- Palacio-Mejía LS, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B, Hernández-Ávila M. Regional differences in breast and cervical cancer mortality in Mexico between 1979-2006. *Salud Pública Mex.* 2009;51 Suppl 2:208-19.

- Paavonen J, Naud P, Salmerón J, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009; 374(9686):301–314.
- Pizarro, A. M., Habtemariam, A., & Sadler, P. J. Activation Mechanisms for Organometallic Anticancer Complexes. *Topics in Organometallic Chemistry* , 32, 21–56. (2010).
- P.J. Blower, *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. A* 100 (2004) 633.
- Quezada R.M.A. 2007. El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *UAM-I. ContactoS* 65, 5–12 (2007)
- Rojas-Oviedo I., Carlos C.C., Luis S.S., Jose C., Hugo L.M., Hugo E.R., Israel V. and Ruben A.T. (2014). Synthesis and characterization of tributyltin derivatives from 4-oxo-4-(arylamino)butanoic acids and their in vitro biological activity against cervical cancer cell lines. *Wileyonlinelibrary.com* DOI 10.1002/AOC.3231.
- Romanowski B. Long term protection against cervical infection with the human papillomavirus: review of currently available vaccines. *Human Vaccines* 2011; 7(2):161–169.
- Sabatini D.M., Peggy P.H. 2008. *Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond*. Cell 134, September 5, 2008 Elsevier Inc.
- Sánchez-Barrientos, 2012. Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008. *Gaceta Medica* .2012;148:42-51.
- Secretaria de la Salud. Subsecretaria de Prevencion y Promocion de la Salud (SPPS). <http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>.
CONSULTADO 14/03/2015.
- Sociedad Española de Epidemiología. (2006). *Virus del Papiloma Humano y Cáncer: Epidemiología y Prevención. Prevención del cáncer de cuello uterino en España*. 4º monografías de la sociedad española de epidemiología.
- Sossa M., 2001. Caracterización de células del epitelio escamoso del cérvix. Tesina de licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://pci.unalmz1.edu.co/Tesis/yesidsossa.pdf>. consultado 1 de Septiembre 2010.

- van der Kerk, G. Organotin Chemistry: Past, Present, and Future. In J. J. Zuckerman, Organotin Compounds: New Chemistry and Applications (pp. 1-25). Washington, DC. (1976).
- Wayne N. Becker ; Lewis J. Kleinsmith ; Jeff Hardin. (2006). El mundo de la célula. Ed. Prentice Hall. 6ª Edición. Madrid. Pp. 20-50.
- Wu, X., Kang, W., Zhu, D., Zhu, C., & Liu, S. Synthesis, crystal structure and biological activities of two novel organotin(IV) complexes constructed from 12-(4-methylbenzoyl)-9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11-carboxylic acid. Journal of Organometallic Chemistry , 694, 2981-2986. (2009).
- Zhao, G., Lin, H. (2005), Metal complexes with aromatic N-containing ligands as potential agents in cancer treatment. Current Medicinal Chemistry- Anticancer Agents. Vol.5, No.2, (March 2005), 137-147, 1568-0118. www.intechopen.
http://www.nature.com/mt/journal/v20/n5/fig_tab/mt20122f1.html

APÉNDICE

Preparación de Reactivos:

Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que atrae iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

- ✚ Tris base 3.04 g (SIGMA, U.S.A)
- ✚ Cloruro de sodio 8.00 g (SIGMA, U.S.A)
- ✚ Cloruro de potasio 0.04 g (SIGMA, U.S.A)
- ✚ Etilen- diamen- tetra- acético (EDTA) 0.40 g (SIGMA, U.S.A)

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCl 1 M y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

- ✚ Cloruro de sodio 8.00 g (SIGMA, U.S.A)
- ✚ Cloruro de potasio 0.20 g (SIGMA, U.S.A)
- ✚ Fosfato mono-ácido de sodio 2.16 g (SIGMA, U.S.A)
- ✚ Fosfato di-ácido de potasio 0.20 g (SIGMA, USA)

El Cloruro de Sodio se disuelve, el Cloruro de Potasio, el Fosfato mono-ácido de sodio y el Fosfato di-ácido de potasio se disuelven en 900 ml de H₂O bi-destilada. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 micras, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

Colorante Cristal Violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g. de NaOH y 4.28 ml. de ácido fórmico aforados a 500 ml con agua bidestilada. Una vez preparada la solución se filtra y posteriormente se usa.

Glutaraldehído

A 1.57 ml de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 ml de agua bidestilada, se almacene a 4 °C.

Solución de ácido acético (10 %)

A 10 ml de ácido acético glacial (J. T. Baker) se le agrega 90 ml de agua bidestilada.