



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

MECANISMO DE ACCIÓN DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN CON  
ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
ADRIANA BERENICE VÁZQUEZ PALMA

TUTOR PRINCIPAL: DRA. NORÁH BARBA BEHRENS  
FACULTAD DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR:  
DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ  
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR  
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES  
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. junio, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# *Agradecimientos*

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química por hacer posible el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Noráh Barba por recibirme en su equipo de trabajo, por compartir su conocimiento y brindarme su apoyo en todo momento.

A la Dra. Victora Chagoya y al Dr. Marco Antonio Cerbón por formar parte del Comité Tutoral y contribuir en el desarrollo de este trabajo.

Al jurado asignado: Dra. Martha Sosa, Dra. María Elena Ibarra, Dr. Alejandro García Carracá, Dr. Emilio Rojas y Dr. Miguel Antonio Costas Basín, por la retroalimentación al trabajo escrito.

A la M. en C. Isabel Gracia Mora por recibirme en la UNEXA y el apoyo brindado para llevar a cabo los experimentos biológicos.

Al M. en C. Celedonio Gómez por su enseñanza en el laboratorio de Cultivo Celular.

A la Biol. Patricia Fierro por todo el apoyo en la resolución de problemas administrativos y en general por estar día a día en el laboratorio dedicada a los estudiantes.

A Victor Lemus y Nayeli López por llevar a cabo los análisis elementales.

A Marisela L. por su amable apoyo con la realización de los análisis de infrarrojo.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de este proyecto: otorgamiento de beca nacional (CVU 418671/No. de apoyo 322895) y proyecto CONACyT CB 2012-178851.

# *Agradecimientos II*

---

A mis padres Rosalía y José por todo el amor y apoyo incondicional que siempre he recibido de ustedes.

A mis hermanos Miguel y David por ser la parte más divertida, entusiasta y alentadora de mi día a día.

A Pedro por tu amor, apoyo y paciencia incondicional, pero sobre todo por ser mi cómplice.

Al ser que vive dentro de mí que me ha motivado a concluir este proyecto y seguir adelante con una sonrisa.

A mis compañeros del laboratorio 211 por todos los maravillosos momentos que pasamos dentro y fuera del laboratorio, en especial al Dr. Horacio López Sandoval por no dejarme caer y levantarme cuando ha sido necesario, además de ser una parte fundamental en la realización de este proyecto.

Al equipo Muégano por compartirme sus conocimientos, los buenos momentos y sus sabios consejos, en especial a la M. en C. Lucero Paniagua por ayudarme en la realización de esta tesis.

A mis compañeros de la UNEXA por compartir tan buenos momentos y por tantas enseñanzas.

A la M. en C. Rebeca Pérez por su contribución invaluable en la realización de esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa y siempre recibirme con los brazos abiertos.

Sin duda alguna agradezco a Dios y a la Vida que me han dado tanto.

# ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	I
Resumen	II
1. Introducción	1
1.1 ¿Qué es el cáncer?	1
1.2 Incidencia de cáncer en el mundo	5
1.3 Muerte celular	7
1.4 Ciclo celular	9
1.5 Tratamientos contra el cáncer	10
1.6 Cisplatino	11
2. Antecedentes	18
2.1 Química Inorgánica Medicinal	18
2.2 Compuestos de coordinación de cobre	21
2.3 Compuestos de coordinación de zinc	23
2.4 Bencimidazol y sus derivados	24
2.5 Compuestos de coordinación con derivados del bencimidazol con actividad biológica	25
3. Albendazol	42
3.1 Propiedades fisicoquímicas del albendazol	42
3.2 Propiedades espectroscópicas del albendazol	43
3.3 Propiedades biológicas del albendazol	49
4. Objetivos	52
5. Hipótesis	53
6. Desarrollo experimental	54
6.1 Reactivos	54
6.1.1 Síntesis química	54
6.1.2 Pruebas biológicas	54
6.2 Instrumentación	56
6.2.1 Síntesis química	54
6.2.2 Pruebas biológicas	54

6.3 Método de síntesis de los compuestos de coordinación	58
6.4 Pruebas biológicas	61
7. Resultados	66
7.1.1 Caracterización química de compuestos de coordinación	67
7.1.2 Compuestos de coordinación sintetizados a partir del ligante abz y el ion metálico cobre(II)	68
7.1.3 Compuestos de coordinación sintetizados a partir del ligante abz y el ion metálico zinc(II)	75
7.2 Pruebas biológicas	79
7.2.1 Citotoxicidad	79
7.2.2 Apoptosis	83
8. Conclusiones	93
9. Anexos	95

# Abreviaturas

---

2abz	2-aminobencimidazol
2cbz	2-clorobencimidazol
2cmbz	metil 2-bencimidazol carbamato
2gb	2-guanidino bencimidazol
2mbz	2-metilbencimidazol
2phbz	2-fenilbencimidazol
abz	Albendazol
bz	Bencimidazol
Cl <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50
cm <sup>-1</sup>	Centímetros subíndice menos 1
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
HCT-15	Línea celular cancerosa de colon
HeLa	Línea celular cancerosa cervicouterino
I.R.	Infrarrojo
MCF-7	Línea celular cancerosa de mama
nm	Nanómetros
ntb	tris(2-bencimidazolilmetil) amina
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PC-3	Línea celular cancerosa de próstata
SKLU-1	Línea celular cancerosa de pulmón
SRB	Sulforrodamina B
TUNEL	TdT-mediated X-dUTP-biotin Nick End Labeling
UV-Vis-NIR	Ultra Violeta-Visible-Infrarrojo Cercano

# Resumen

---

Los compuestos derivados del bencimidazol han mostrado una importante actividad biológica, como en el tratamiento de enfermedades parasitarias, así como actividad antiviral y antitumoral. En nuestro grupo de investigación se ha estudiado la actividad antineoplásica de compuestos de coordinación con metales de transición y derivados 2-bencimidazol sustituidos, encontrándose que algunos de ellos muestran dicha actividad.

En este trabajo se presenta la síntesis, la caracterización estructural y actividad citotóxica de los compuestos de coordinación obtenidos a partir de las sales de cobre(II) y zinc(II) (cloruro y bromuro) y albendazol (abz). Se obtuvieron cuatro compuestos de coordinación, dos de ellos con centro metálico cobre(II):  $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ , y los otros dos con centro metálico zinc(II):  $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Br}_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ .

La actividad biológica de estos compuestos de coordinación fue evaluada en las líneas tumorales humanas, HeLa (cervicouterino), PC3 (próstata), MCF-7 (mama) y HCT-15 (colon). Todos los compuestos de coordinación presentaron actividad citotóxica, siendo más activos los compuestos de cobre(II):  $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

Se evaluó la muerte celular por apoptosis inducida por los compuestos de coordinación  $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ , esta evaluación se realizó en las líneas tumorales humanas mencionadas anteriormente utilizando la técnica de citometría de flujo y la reacción de TUNEL. Se encontró que las líneas celulares presentaron muerte celular por apoptosis y necrosis.



# *Introducción*

# *1*

---

## 1.1 ¿Qué es el cáncer?

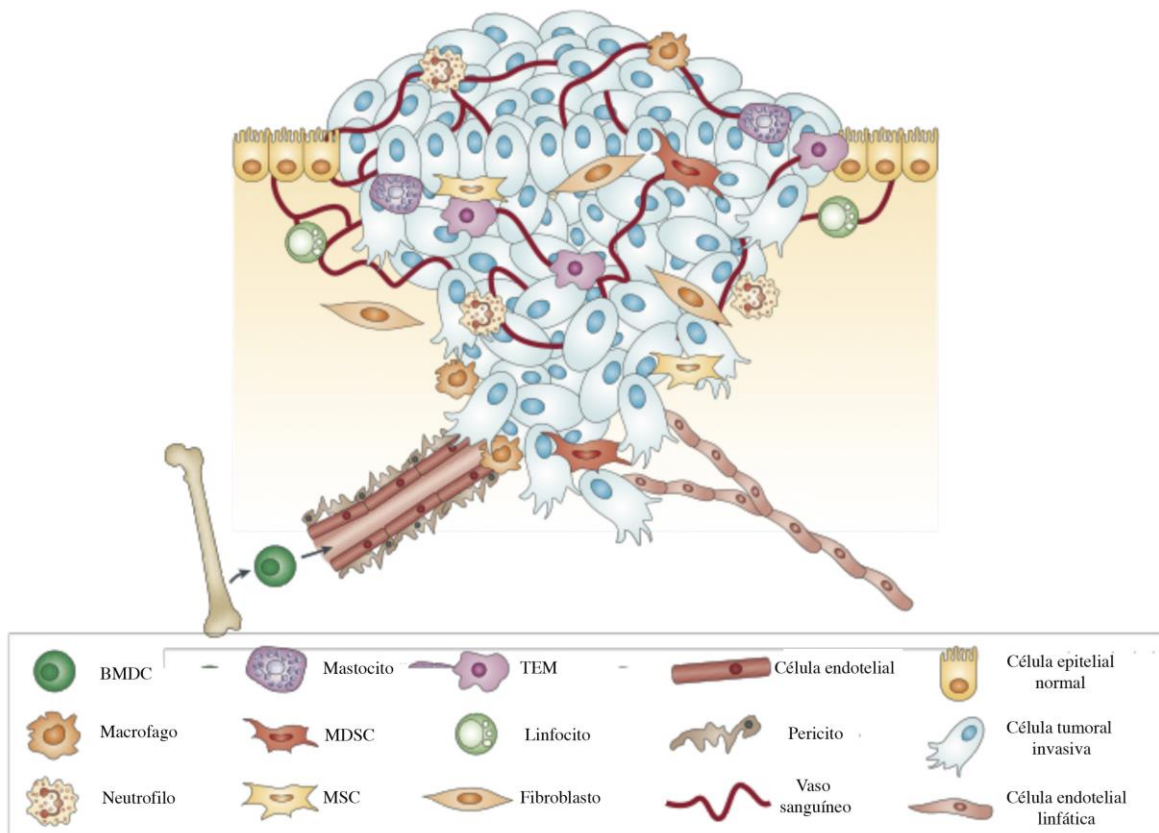
El cáncer es el crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos y puede originarse a partir de cualquier tipo de célula o tejido corporal. Bajo la denominación de cáncer se engloban, en realidad, distintas enfermedades que varían en sus manifestaciones clínicas y en su respuesta a las medidas terapéuticas, pero que comparten mecanismos desencadenantes comunes<sup>1</sup>.

El cáncer no es solo una masa de células cancerosas; la mayoría de los tumores sólidos contienen células estromales no malignas. El tipo predominante de células estromales que son encontradas en cáncer son macrófagos, linfocitos, células endoteliales y fibroblastos; además, también se pueden encontrar eosinófilos, granulocitos, células NK y células B<sup>2</sup> (Fig. 1.1). Esta variedad de células estromales en el ambiente circundante, que son reclutadas al tumor, no sólo incrementan el crecimiento de las células primarias del tumor, sino que también facilitan su diseminación metástasica a órganos distantes. La cercanía entre células tumorales, macrófagos y endotelio establecen una comunicación parácrina que conduce a estimular la intravasación y diseminación de las células tumorales<sup>3</sup>.

Una de las características más comunes en los tumores son las anormalidades cromosómicas tales como deleciones, adiciones, amplificaciones y translocaciones; estas anormalidades pueden ser adquiridas durante el desarrollo del tumor, debido a una propiedad denominada “Fenotipo Mutador” que genera un microambiente. Las células que expresan este tipo de fenotipo tienden a

seleccionar las alteraciones que les permite adaptarse mejor al medio. Sin embargo, dentro de un mismo tumor se pueden encontrar diferentes tipos de anormalidades entre las células<sup>4</sup>.

Las consecuencias de este fenotipo mutador no solo son las anormalidades cromosómicas, también se han descrito ciertas mutaciones somáticas que inducen la activación constitutiva de circuitos de señalización usualmente activados por receptores de factores de crecimiento<sup>5</sup>. Esta señalización continua, mantiene activa la proliferación de las células tumorales, según Hanahan y Weinberg esta es 1 de las 10 marcas características de cualquier tipo de cáncer.



**Fig. 1.1 Microambiente del tumor primario<sup>3</sup>.** Las células cancerosas en un tumor están rodeadas por un microambiente que comprende numerosas células incluyendo células endoteliales de la sangre y circulación linfática, fibroblastos estromales y una variedad de células derivadas de la médula ósea (BMDC) incluyendo macrófagos, células mieloides supresoras (MDSC's), monocitos que expresan TIE2 (TEM's) y células troncales mesenquimales (MSC's).

Una más de las características que comparten los diferentes tipos de cáncer es la evasión de una regulación adecuada de proliferación celular mediante la inactivación de docenas de inhibidores de crecimiento celular por diferentes mecanismos; estos supresores tales como RB y p53 limitan el crecimiento celular y la proliferación mediante diferentes mecanismos como senescencia o apoptosis<sup>6</sup>.

La activación de la apoptosis transmite la señal entre reguladores y efectores y es controlada en parte por la familia de proteínas reguladoras Bcl-2. De esta familia las proteínas Bcl-xL y Bcl-w son inhibidores de apoptosis que bloquean a las proapoptóticas Bax y Bak<sup>7</sup>.

Durante la progresión de un tumor es necesario desarrollar vasos sanguíneos que proporcionen los nutrientes requeridos, a este proceso se le denomina “Angiogénesis” y usualmente también continúa activo una vez que el tumor se ha establecido para seguir alimentando a las expansiones neoplásicas<sup>8</sup>.

De forma normal las células únicamente pueden replicarse un número limitado de veces, pero las células tumorales tienen la capacidad de tener una proliferación ilimitada. Esta capacidad para no morir ha sido relacionada al hecho de que los telómeros de las células inmortalizadas no se acortan como lo harían en las células sanas<sup>9</sup>.

La invasión y la metástasis son características que permiten a las células tumorales llegar más allá del sitio en el cual se originó. Para poder migrar, las células pierden las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular<sup>10</sup>. Este proceso de invasión se lleva a cabo en diferentes etapas, frecuentemente denominadas cascada de invasión-metastasis<sup>11</sup>.

La inflamación en estadios tempranos promueve el desarrollo de neoplasias más grandes<sup>12</sup>, ya que las células del sistema inmune pueden generar especies reactivas de oxígeno que tienen actividad mutagénica, acelerando la evolución genética hacia la formación de un tumor de características malignas<sup>13</sup>.

## 1.2 Incidencia de cáncer en el mundo

La incidencia actual de cáncer en el mundo es alta, hasta el 2012 se registraron 14.1 millones de nuevos casos, 8.2 millones de muertes y 32.6 millones de personas convivían con cáncer. También se registró que la incidencia es al menos 25% mayor en hombres que en mujeres.

A nivel mundial el tipo de cáncer con mayor incidencia es el cáncer de mama, seguido del de próstata y pulmón<sup>16</sup>. Sin embargo, los rangos de mortalidad de cáncer de pulmón superan a los de mama y al de próstata (Para todos estos datos, es tomada en cuenta únicamente la población adulta) (Figura 1.2)<sup>16</sup>.

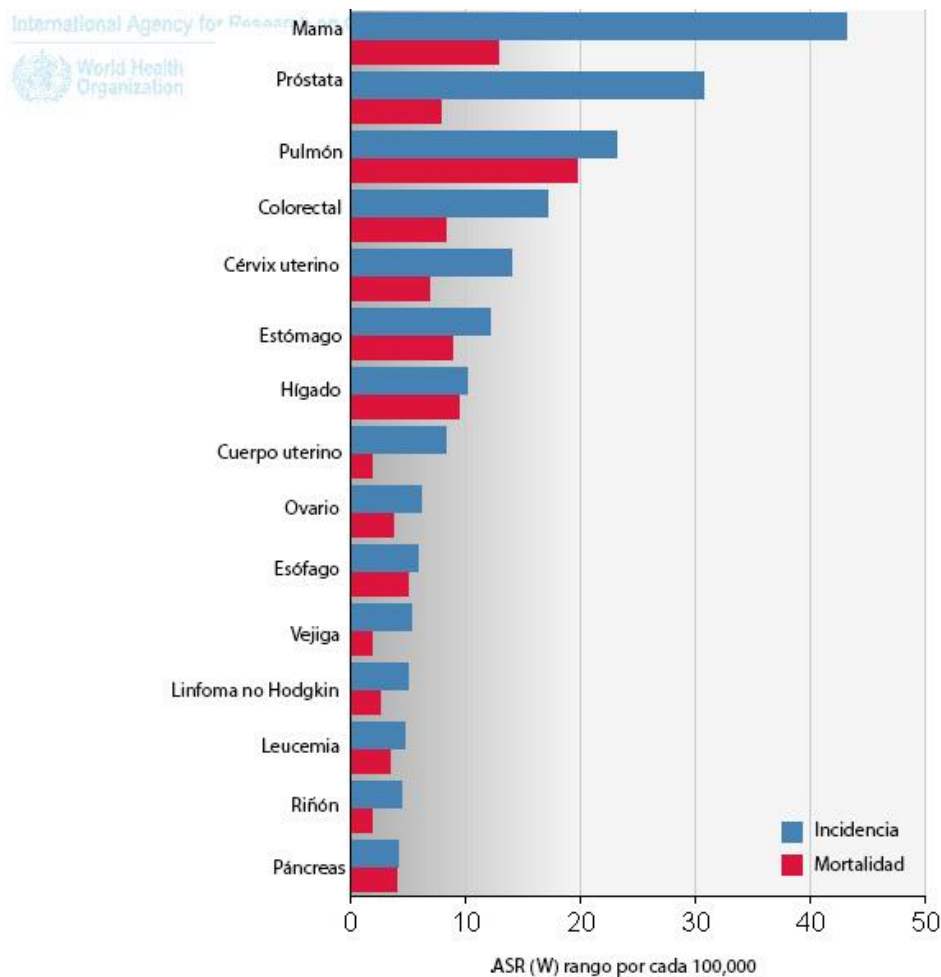


Fig. 1.2 Incidencia (azul) y mortalidad (rojo) de los distintos tipos de cáncer.

## La incidencia en México

La incidencia registrada en México hasta el año 2012, también se presentó el cáncer de mama en el primer lugar de incidencia con 35.4% del total de casos; el cáncer de próstata también se encontró en segundo lugar con una incidencia de 27.3% del total de los casos. Sin embargo, el cáncer cervicouterino supera al de pulmón y al colorectal, con una incidencia de 23.3 ocupó el tercer lugar de incidencia y las neoplasias de pulmón y colón pasaron al cuarto y quinto lugar respectivamente.

En cuanto a la mortalidad vemos que por el contrario de lo que ocurre en promedio a nivel mundial, en México el cáncer de próstata ocupa el primer lugar con una mortalidad de 11.3 muertes por cada 100, habitantes; el cáncer de mama y el cervicouterino se encuentran en segundo y tercer lugar con una mortalidad de 9.7 y 8.1 respectivamente (Figura 1.3).<sup>16</sup>

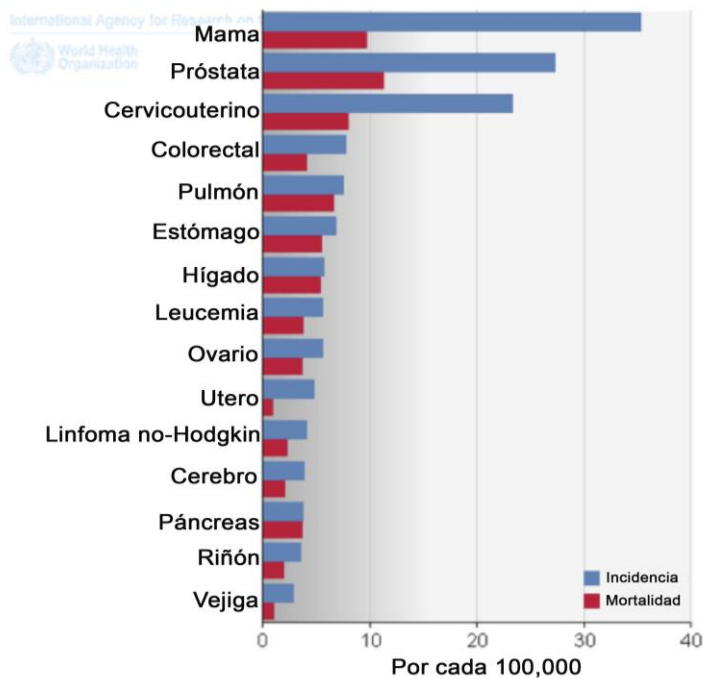


Fig. 1.3. Incidencia y mortalidad de cáncer en México.<sup>16</sup>

### 1.3 Muerte celular

La identificación de lesiones y células muertas así como de las vías involucradas es un punto importante para realizar diagnóstico y un tema de gran interés de investigación. Se han identificado diferentes tipos de muerte celular como la Apoptosis, Oncosis y Necrosis.<sup>14</sup> A continuación se describirán brevemente los tipos de muerte celular importantes en este trabajo.

#### *Necrosis*

La necrosis es un tipo de muerte celular en la cual la célula muere por un agente que causa una lesión muy grave que no puede ser reparada o curada y lleva a la célula a la muerte. Cuando una célula muere por necrosis, se hincha, la membrana celular pierde su integridad liberando el contenido del interior de la célula. La liberación del contenido celular regularmente es indeseable en el organismo ya que induce procesos inflamatorios.

#### *Apoptosis*

La apoptosis es una forma de muerte celular programada, esta ocurre durante la etapa de desarrollo e incluso en la etapa adulta de los tejidos y es la encargada de eliminar las células que se encuentran dañadas o que parezcan peligrosas para el tejido.

La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios morfológicos en la célula como la pérdida de los contactos celulares y estructuras membranales especializadas y formación de protuberancias, se presenta una disminución de turgencia que se debe aparentemente a la pérdida de líquido intracelular y iones, ocurre la condensación de la cromatina, esta se fosforila y desensambla la lámina nuclear, se fragmenta el núcleo, el retículo endoplásmico se dilata y forma

vesículas que se fusionan a la membrana plasmática, esto da lugar a que la célula se rompa en vesículas llamados cuerpos apoptóticos que contienen organelos intactos y fragmentos nucleares, los cuales son fagocitados por células vecinas. La fragmentación internucleosomal del DNA en múltiplos de 200 pb ha sido una característica de la apoptosis por mucho tiempo.<sup>15</sup>

Es importante hacer notar que no necesariamente todos los tipos celulares presentan todas las características que se mencionaron anteriormente.

En resumen, cuando una célula muere por apoptosis no se hincha ni se revienta, estas son características de una célula que muere por necrosis, en la apoptosis el contenido celular y sus organelos se compartimentalizan previo a su fagocitosis.

Cuando el proceso de apoptosis no está bien controlado, se presentan varias enfermedades como la neurodegeneración, inmunodeficiencia y cáncer como se ha mencionado anteriormente.



## 1.4 Ciclo celular

Se conoce como ciclo celular al ciclo de división y duplicación de la célula, en el cual la tarea más importante de la célula es pasar la información genética a cada una de las células hijas, cada una recibe una copia completa del genoma entero, el ciclo celular está controlado por un complejo de proteínas reguladoras conocido como *sistema de control del ciclo celular*.

El sistema de control del ciclo celular tiene como objetivo principal regular el número de células de cada tejido en el cuerpo, cuando el sistema de control no funciona bien, da lugar a una división celular excesiva que puede resultar en cáncer.

El ciclo celular de las células eucariontes puede ser dividido conceptualmente en 4 fases:

**G1** (Gap phase), es una fase de crecimiento en la cual la célula se prepara para la replicación, por lo cual duplica su tamaño, masa y organelos que ella requiera para duplicar sus cromosomas. Esta fase es la más larga del ciclo celular.

Hay dos fases G de preparación de la célula, G1 entre la fase M y la fase S y G2 entre la fase S y la mitosis, en las cuales la célula tiene tiempo para monitorear el ambiente dentro y fuera de ella detectar si las condiciones son adecuadas para llevar a cabo la fase S y la mitosis respectivamente.

**S** o fase de síntesis de ADN, en la cual se replica el ADN y se hace una copia completa de cada uno de los cromosomas.

**G2** es la segunda fase de crecimiento, en la que ocurre después de la fase S y antes de la mitosis. En esta fase continúa la síntesis de proteínas y de ARN.

**M** comprende dos partes importantes, la primera es la mitosis o división celular, en la cual los cromosomas son duplicados y distribuidos en un par idéntico para luego llevar a cabo la segunda parte que es la división citoplasma o citocinesis, en donde la célula se divide en dos células hijas idénticas.

#### 1.4 Tratamientos contra el cáncer

Existen varios tratamientos que han sido utilizados para controlar la enfermedad del cáncer, a continuación se describirán algunos de ellos.

La cirugía es un tratamiento que consiste en la extirpación del tumor por medio de un método quirúrgico.

Por otro lado también se encuentra la radioterapia, este tratamiento se basa en la radiación ionizante sobre el tumor, destruyendo las células e impidiendo su crecimiento. Esta radiación puede emplearse a tejidos tumorales y normales, sin embargo; los tejidos tumorales son más sensibles y no pueden reparar el daño y los normales sí.

La quimioterapia es un tratamiento que consiste en emplear fármacos que inhiben la proliferación de células cancerígenas, actúa sobre fases específicas del ciclo celular y la desventaja de este tratamiento es que presenta poca especificidad y puede afectar otros tejidos debido a efectos no deseados. Dentro de los fármacos más empleados en la quimioterapia se encuentra el cisplatino y dada su relevancia para este trabajo, se describirá en detalle a continuación.

## 1.6 Cisplatino

El cisplatino, [*cis*-diaminodicloroplatino(II)] o *cis*-DDP, es un compuesto de coordinación que presenta una estructura simple, el ion platino estabiliza una geometría de cuadrado plano en el cual los ligantes se encuentran en posición *cis* (Fig. 1.4)

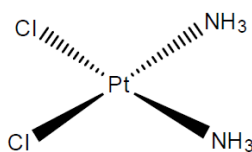
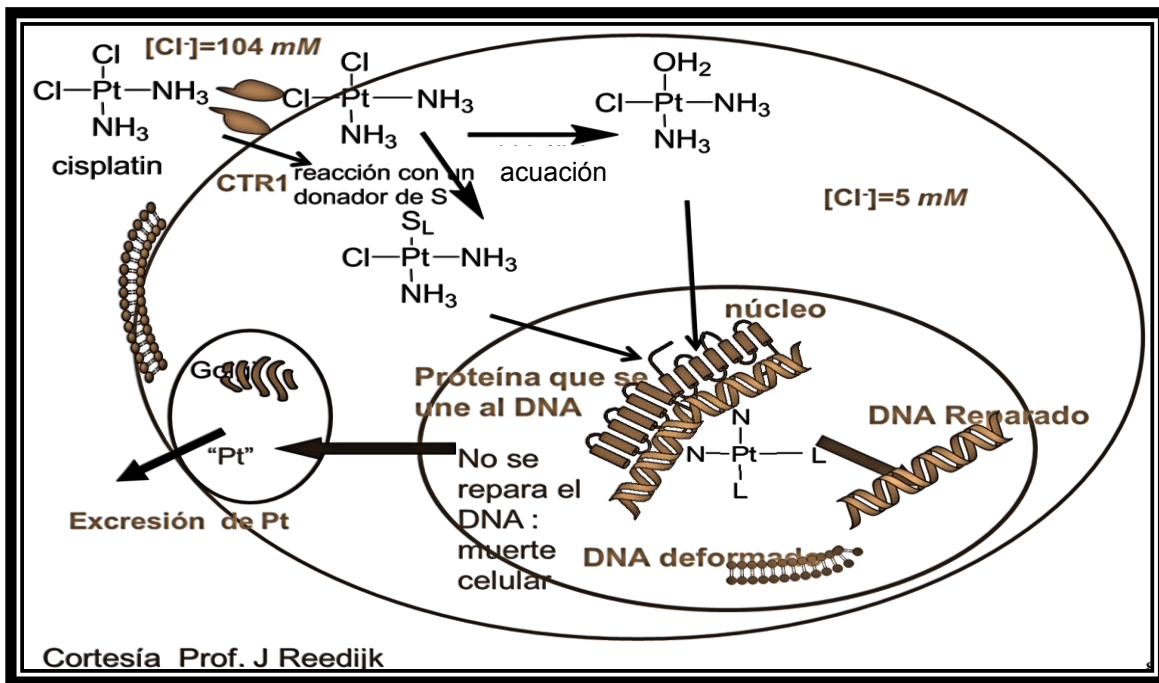


Figura 1.4 Geometría del cisplatino

Este compuesto y sus análogos son de los más importantes recursos utilizados para combatir el cáncer, ya que ha sido ampliamente utilizado desde su descubrimiento<sup>17-18</sup>. Es un medicamento potente debido a que impide los procesos celulares tales como la replicación y la transcripción, mediante la formación de aductos con el DNA lo cual conduce a una muerte celular por apoptosis<sup>18-19</sup>. Sus rangos de efectividad pueden llegar hasta más de un 90% en cáncer testicular<sup>17</sup>; sin embargo, también se ha utilizado para una amplia variedad de tumores que van desde cáncer de ovario hasta cáncer colorectal, de vejiga o pulmonar<sup>17,20</sup>.

A través de los años se ha acumulado suficiente información que sustenta la idea de que el principal mecanismo de acción del cisplatino es como se describe a continuación (Figura 1.5). El fármaco se activa intracelularmente por la sustitución de uno de los dos cloros por una molécula de agua debido a que los cloros actúan como grupos salientes. Subsecuentemente el Pt<sup>II</sup> forma uniones covalentes con el DNA, produciendo de esta manera los aductos de DNA<sup>20</sup> como se observa en la figura 1.6. El platino se une a la posición N7 del anillo de imidazol de las bases

puricas (guanina (G), y en menor cantidad, adenina (A))<sup>21</sup>. La formación de estos aductos activa varias vías de señalización como lo son aquellas involucradas en el reconocimiento del daño y reparación del mismo, arresto del ciclo celular, y apoptosis<sup>20,25</sup>.



**Fig. 1.5 Mecanismo de acción del cisplatino en la célula.** La molécula neutra del cisplatino atraviesa la membrana celular por medio de una molécula transportadora de cobre (CTR), una vez dentro de la célula, los iones cloruro son desplazados por moléculas de agua permitiendo que la molécula atraviese la membrana nuclear y se una a bases púricas del ADN deformando la doble hélice, la cual ya no puede ser reparada.

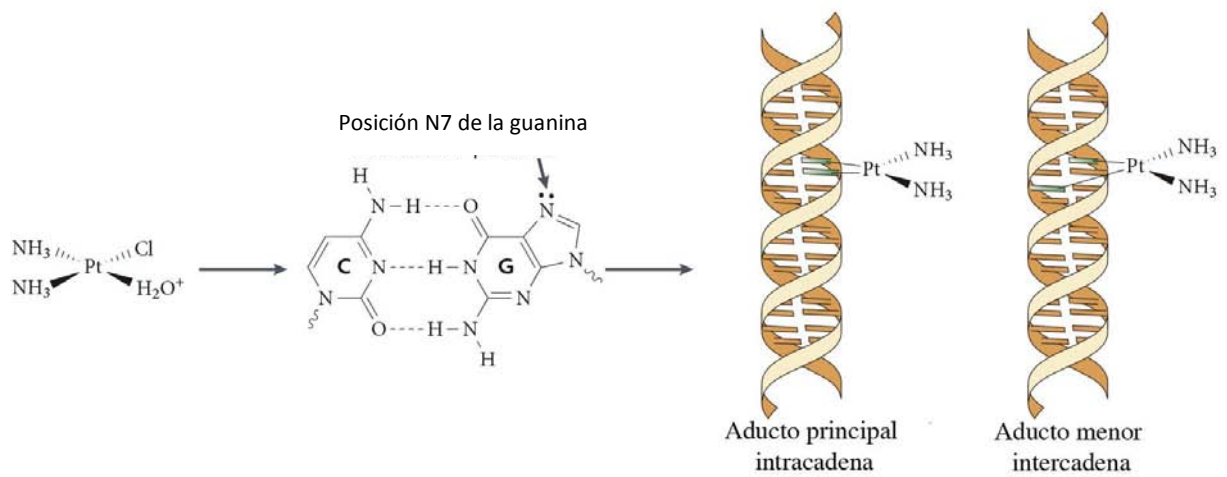


Fig. 1.6 Formación de aductos del cisplatino. El aducto se forma cuando el platino se coordina con el N7 de dos guaninas adyacentes de la misma cadena de ADN (intracadena) o de cadenas diferentes de ADN (intercadena).

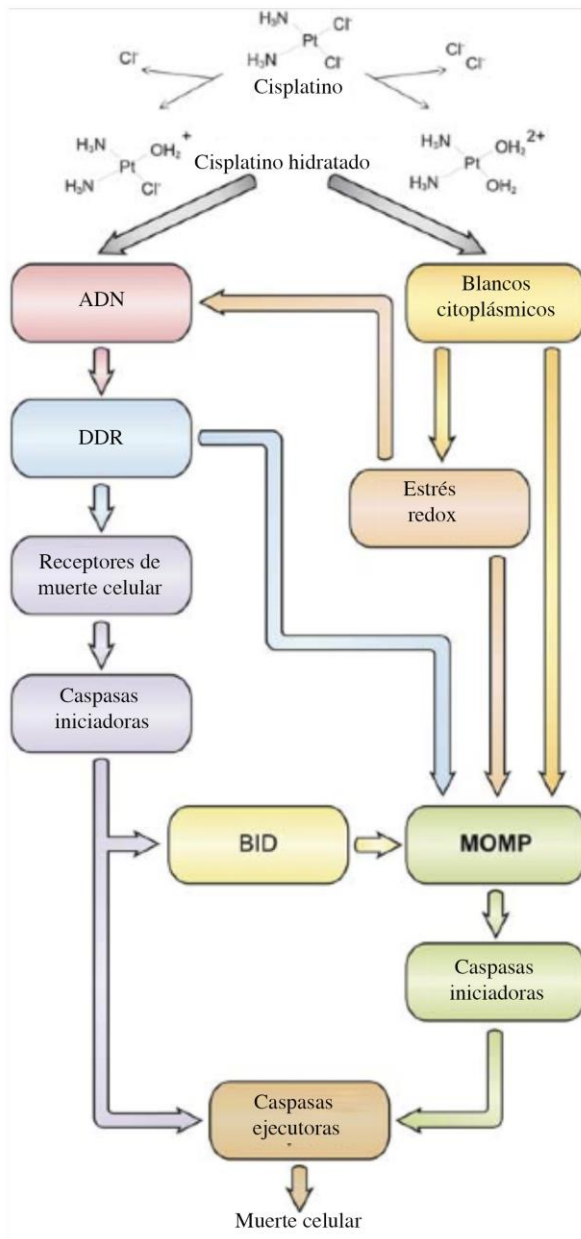


Figura 1.7 Mecanismo de acción del cisplatino.

Los aductos intra e inter-cadena son reconocidos por la maquinaria de reconocimiento de daño al DNA. Si el daño es extenso y no puede ser reparado se dispara la activación de la respuesta de daño al DNA (DDR) que frecuentemente involucra a la cinasa ATR, CHEK1 y CHEK2 y TP53. A su vez, TP53 transactiva una gran cantidad de genes cuyos productos facilitan la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP), de esta manera se inicia la apoptosis intrínseca, así como aquellos genes que codifican para componentes de la vía extrínseca de la apoptosis. MOMP pone en marcha la cascada de caspasas así como múltiples mecanismos independientes de caspasas que eventualmente sellarán el destino de la célula. Muchas otras vías de señalización unen el daño al DNA inducido por cisplatino con MOMP y la muerte celular (no mostrado). En el citoplasma, diversas proteínas pueden unirse al cisplatino con lo que se evita la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que también pueden activar a MOMP.

Los resultados de la activación de estas señales conduce generalmente a una muerte celular por apoptosis (Fig. 1.7)<sup>22</sup>. En algunos casos, las vías que controlan el crecimiento, diferenciación y respuesta al estrés, donde están involucradas proteínas tales como ART, p53, p73, JNK (MAPK8) y p38<sup>23</sup>.

Aunque el cisplatino es una de las primeras opciones en el tratamiento de cáncer, existen dos factores por los cuales su uso se puede ver limitado: la adquisición de resistencia y los efectos secundarios que provoca en los órganos sanos<sup>24</sup>.

Los mecanismos por los cuales un tumor puede ser resistente al cisplatino se han estudiado ampliamente y estos incluyen la disminución de la entrada del fármaco a las células o el incremento de su salida, neutralización del cisplino por glutatión y otras moléculas que contienen sulfuro, incremento en la reparación del DNA y defectos en la vía de señalización de apoptosis en respuesta al daño del DNA<sup>17,20</sup>. En la figura 1.8 se muestra el mecanismo de resistencia al cisplatino.

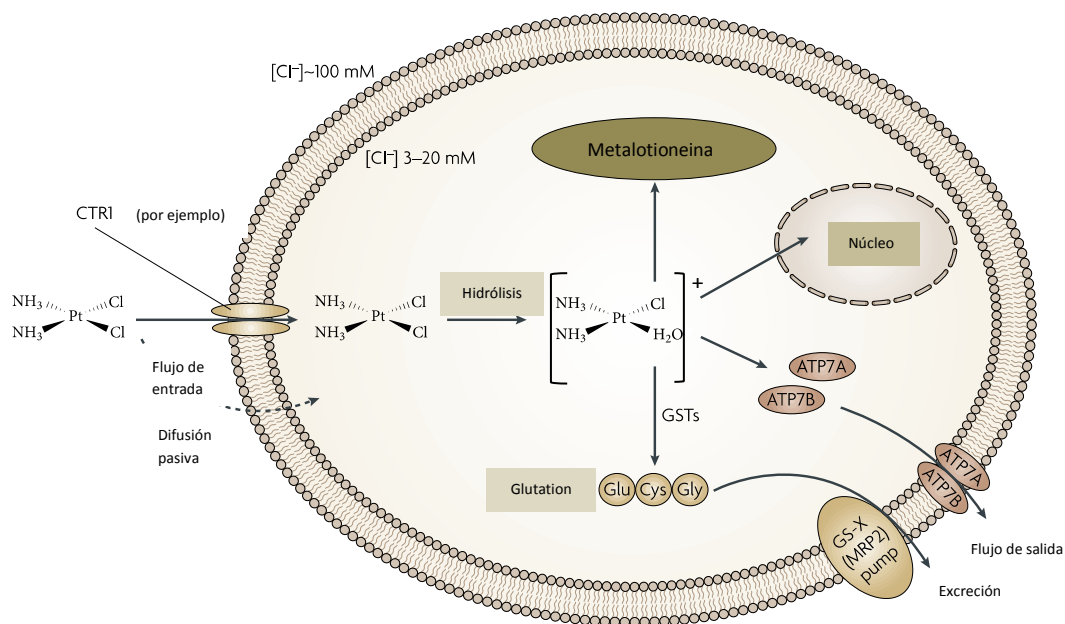


Figura 1.8 Resistencia del tumor al cisplatino mediado por niveles inadecuados de platino<sup>20</sup>. La pérdida de CTR da como resultado menos platino que entra en las células y por consecuencia resistencia a la droga. Una vez que la molécula se encuentra dentro de la célula, puede reaccionar con especies que contienen altos niveles de azufre como el glutatión o metalotioneínas en el citoplasma, por lo que la molécula es desactivada antes de entrar al núcleo y unirse al ADN por lo que causa resistencia y finalmente la excreción del platino por medio de los exportadores de cobre ATP7A y ATP7B así como los exportadores conjugados-S (GS-X) pueden contribuir a la resistencia del platino.

La mayoría de los medicamentos más resistentes contra el cáncer son diseñados en contra de una anomalía específica del cáncer, es decir, contra algunos de los marcadores del cáncer. Esta estrategia ha sido exitosa; sin embargo, en algunos casos estos agentes puede ser que no posean una gran efectividad como monoterapia, por lo que se prefiere administrarlos en combinación con algún citotóxico tal como el cisplatino<sup>20</sup>.

Usualmente los pacientes tienen una respuesta inicial buena a la quimioterapia basada en la administración del cisplatino, sin embargo, tiempo después tienen un relapso debido a la resistencia al cisplatino, ya sea adquirida o intrínseca, y esto reduce su efectividad<sup>26</sup>. La aparición de esta resistencia ha conducido a los investigadores a la búsqueda de nuevas moléculas que puedan ser administradas cuando los pacientes no respondan a dicha terapia.

Una de las ideas más recurridas es el diseño de nuevas moléculas activas, y el empleo de moléculas ya conocidas que puedan ser modificadas para mejorar su actividad citotóxica.

Una de las áreas de la química que ha obtenido buenos resultados en el diseño de moléculas activas es la Química Inorgánica Medicinal la cual busca explotar las propiedades de los iones metálicos para el diseño de nuevos fármacos.



## Referencias

1. Cortinas de Nava, Cristina. Cáncer; 2000;.
2. Fran Balkwill, *Nature Reviews Cancer*, 4 (2004) 540-550.
3. Johanna A. Joyce, Jeffrey W. Pollard, *Nature Reviews Cancer*, 9 (2009) 239-252.
4. Loeb, L., Bielas JH, Beckman RA, *Cancer Research*, 68 (2008) 3551-3557.
5. Davies M.A., Samuels, Y., *Oncogene*, 29 (2010) 5545–5555.
6. Hanahan D, Weinberg RA, *Cell*. 144 (2011) 646-74.
7. Adams, J.M., Cory, S., *Oncogene* 26 (2007) 1324–1337.
8. Hanahan, D., Folkman, J., *Cell*, 86 (1996) 353–364.
9. Blasco, M.A., *Nat. Rev. Genet.*, 6 (2005) 611–622.
10. Cavallaro, U., Christofori, G., *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 118–132.
11. Talmadge, J.E., Fidler, I.J., *Cancer Res.* 70 (2010) 5649–5669.
12. Qian, B.Z., Pollard, J.W., *Cell*, 141 (2010) 39–51.
13. Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., *Cell* 140 (2010) 883–899.
14. Trump B., Berezsky I., Chang S., Phelps P., *Toxicologic Pathology*, 25 (1997) 82-88.
15. Wyllie AH, *Nature*, 285 (1980) 555-556.
16. Globocan 2008. *Cancer World Estadistics*. <http://globocan.iarc.fr> (último acceso: 21 de 02 de 2014).
17. Dong. Pabla, Z, *Kidney International*, 73 (2008) 994–1007.
18. Ummat A., Rechkoblit O., Jain R., Roy Choudhury J., Johnson R., *Nature Structural & Molecular Biology* 19, (2012) 628-632.
19. Woods D., Turchi J.J., *Cancer Biology and Therapy*, 14 (2013) 379-89.
20. Kelland L., *Nature Reviews Cancer*, 8 (2007) 573-84.
21. Fichtinger-Schepman, A. M., van der Veer, J. L., den Hartog, J. H., Lohman, P. H., Reedijk, J., *Biochemistry*, 24 (1985) 707–713.
22. Eastman, A., *Cancer Cells* 2 (1990) 275–280.
23. Siddik, Z. H., *Oncogene* 22 (2003) 7265–7279.
24. Arany I, Safirstein RL., *Seminars in Nephrology*, 23 (2003) 460–464.
25. Galluzzi L1, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G., *Oncogene*, 31 (2012) 1869-83 .
26. Ding-Wu Shen, Lynn M. Pouliot, Matthew D. Hall, Michael M. Gottesman, *Pharmacological Reviews* 64 (2012) 706-721.

# *Antecedentes*

# 2

---

## 2.1 Química Inorgánica Medicinal

Como se describió anteriormente, el cisplatino es un compuesto inorgánico que es usado como agente quimioterapéutico para el tratamiento de cáncer, este es un ejemplo de compuestos basados en metales, esta área de la Química es llamada química inorgánica medicinal.

La química inorgánica medicinal es un área importante de la Química debido a que ofrece posibilidades para el diseño de agentes terapéuticos que no se encuentran fácilmente en compuestos orgánicos.<sup>1</sup> Los elementos inorgánicos juegan un papel crucial en los procesos biológicos y biomédicos y es evidente que muchos compuestos orgánicos usados en la medicina no tienen un modo de acción puramente orgánico; algunos son activados o biotransformados por iones metálicos incluyendo metaloenzimas, otros tienen un efecto directo o indirecto sobre el metabolismo de iones metálicos<sup>2</sup>. Algunas de las áreas más importantes de la química inorgánica medicinal se muestran en la figura 2.1

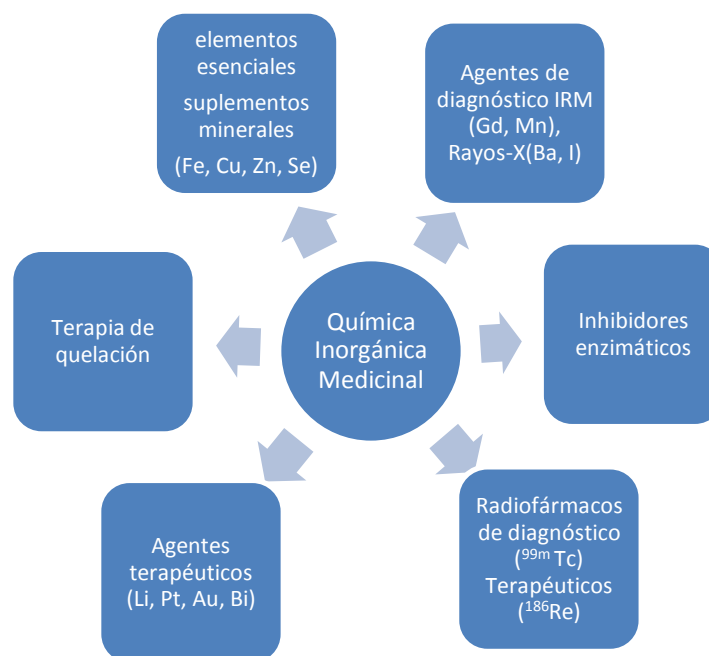


Fig. 2.1. Algunas de las áreas de la química inorgánica medicinal<sup>2</sup>.

Los iones metálicos son la parte más importante de la Química Inorgánica Medicinal ya que juegan un papel crucial en los sistemas biológicos. ¿Cuáles son las propiedades de los iones metálicos que imparten utilidad a la biología? Dado que los elementos inorgánicos comprenden la mayor parte de la tabla periódica, la diversidad de estas propiedades es igualmente amplia y se ha cubierto minuciosamente por varios libros en el campo de la Química Bioinorgánica<sup>3-5</sup>. A continuación se presenta un resumen de las propiedades químicas de los metales<sup>6</sup>:

1. Carga.
2. Interacciones con ligantes
3. Estructura y enlace

4. Carácter de ácidos de Lewis
5. Capa de valencia parcialmente llena
6. Actividad redox

La carga en los iones metálicos es muy importante, cuando estos se encuentran en solución acuosa en donde el átomo se encuentra coordinado a moléculas de agua, muestran una carga positiva pero la carga puede ser manipulada dependiendo del ambiente de coordinación, de modo que un ion metálico coordinado por diferentes ligantes puede ser catiónico, aniónico o neutro. Estas interacciones de los ligantes con los iones metálicos frecuentemente son fuertes y selectivas, además de que dan lugar a diferentes geometrías que se estabilizan alrededor de los iones metálicos. Los iones metálicos con alta afinidad electrónica pueden polarizar los grupos que están coordinados a ellos, facilitando reacciones de hidrólisis. Los metales de transición tienen un número de electrones variable en sus orbitales d, lo que hace que los compuestos de coordinación sintetizados con estos metales presenten propiedades magnéticas y electrónicas interesantes, Debido a lo anterior es que los compuestos de coordinación con iones metálicos presentan diferentes roles interesantes en los sistemas biológicos<sup>6</sup>.

Algunos de los iones metálicos más usados para la síntesis de compuestos de coordinación con actividad biológica son vanadio, platino, oro, cobre y zinc. A continuación se describen algunos de ejemplos de compuestos con algunos de estos iones metálicos.

## 2.2 Compuestos de coordinación con cobre

El cobre es un elemento escaso ( $6.8 \times 10^{-3}\%$  en masa en la corteza terrestre), este metal de transición pertenece al grupo 11 de la tabla periódica y posee una configuración electrónica  $[\text{Ar}] 3d^{10}4s^1$ , presenta estados de oxidación de +1, +2 y +3, los más importantes son +1 y +2 siendo el segundo el más estable<sup>7</sup>.

Las propiedades redox del  $\text{Cu}^{2+}$  hacen que este elemento sea esencial en los procesos biológicos, típicamente en ambientes oxidantes extracelulares, el cobre existe como  $\text{Cu}^{2+}$ , pero en condiciones reductoras dentro de la célula, este existe como  $\text{Cu}^+$  el cual tiene un potencial para ser seleccionado por ligantes con grupos donadores. Adicionalmente, el  $\text{Cu}^+$  es un  $d^{10}$  lo que le da flexibilidad en números de coordinación y arreglos geométricos, es decir puede adoptar una geometría tetraédrica, trigonal o lineal<sup>6</sup>.

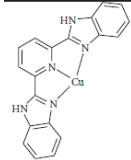
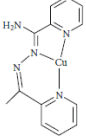
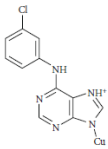
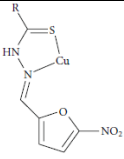
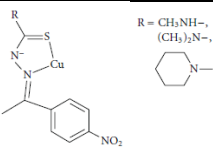
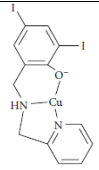
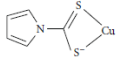
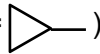
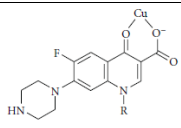
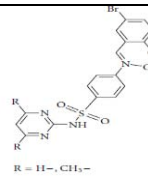
Este metal de transición presenta considerable acción bioquímica, como metal esencial o como un constituyente de varios compuestos administrados exógenamente a los humanos. El cobre presenta un papel multifacético ya que se une a la ceruplasmina, albúmina, a diferentes proteínas y a los ácidos nucleicos<sup>8</sup>.

En particular, la participación del cobre en enfermedades humanas ha sido descrita desde un punto de vista químico-médico<sup>9</sup> y bioquímico<sup>10</sup> enfocado en la fisiología molecular del transporte del cobre<sup>11</sup>.

Se ha encontrado que compuestos de coordinación con  $\text{Cu}^{2+}$  que forman quelatos presenta actividad citotóxica o inhibición enzimática<sup>12</sup>, como los compuestos de coordinación tienen bases de Schiff como ligantes, son efectivos para reducir el tamaño del tumor, retrasando la metástasis e incrementando significativamente la supervivencia del hospedador, esta actividad anticancerosa se debe a la formación del quelato y no al ligante libre<sup>8</sup>.

A continuación se muestran algunos derivados de cobre con actividad biológica (Tabla. 2.1)<sup>8</sup>.

Tabla 2.1 Compuestos de coordinación de cobre(II) que presentan actividad biológica<sup>8</sup>.

Ligante	Modo de coordinación	Tipo de compuesto de coordinación	Actividad biológica
2,6-bis(bencimidazo-2-il)piridina		LCuCl <sub>2</sub> o [LCu(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> )] <sup>+</sup>	Mimético de la proteasa
Piridil-2-carboxamidrazona		LCuCl <sub>2</sub>	Anticancerígeno
6-(2-clorobencil amino) purina		[(LH) <sub>2</sub> CuCl <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	Potente anticancerígeno, inhibidor del crecimiento celular de varios tipos de cáncer
5-nitroofuran-2-carboxaldehído tiosemicarbazona o tiofeno-2-carboxaldehído tiosemicarbazona		L <sub>2</sub> CuCl <sub>2</sub>	Antiamebiano
4-nitroacetofeno tiosemicarbazona		L <sub>2</sub> Cu	Antitrypanosoma
2,4-diyodo-6-(piridina-2-il metilamino) metil fenolato		(L-H)CuCl o [L(L-H)Cu] <sup>+</sup>	Inhibidor del proteosoma, inductor de apoptosis
Pirolidina ditiocarbamato		L <sub>2</sub> Cu	Inhibidor del proteosoma, inductor de apoptosis
Ciproflaxino (R=  ) Enoxacino (R=C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -)		L <sub>2</sub> Cu	Antibacterial
[(5-bromo-2-hidroxifenil)metilidene]amino-N-(pirimidina-2-il)benceno sulfamidas		(L-H) <sub>2</sub> Cu	Antibacterial

Así como el cobre, el zinc también juega un papel importante en los sistemas biológicos como se describirá a continuación.

### 2.3 Compuestos de coordinación de zinc

El zinc es un metal de transición cuya configuración electrónica es  $[Ar] 3d^{10}4s^2$  y presenta un estado de oxidación  $2^+$ . Este elemento juega un papel muy importante en diversos procesos celulares como la proliferación celular, la diferenciación y la defensa contra los radicales libres. El zinc actúa como una componente estructural clave en muchas proteínas y enzimas, incluyendo factores de transcripción, proteínas celulares de señalización y enzimas reparadoras de DNA<sup>1</sup>. También se ha reportado que el zinc juega un rol crítico en la regulación de la apoptosis en mamíferos, induce apoptosis en muchos tipos de células incluyendo células epiteliales de próstata y ovarios<sup>13</sup>.

Por otro lado, existe el interés en desarrollar sensores que puedan detectar selectivamente la fosforilación de proteínas ya que esta modificación post-traducciona que juega un papel muy importante en la transducción de señales en otros procesos biológicos<sup>14,15</sup>. Algunos sensores de fosforilación están basados en complejos de zinc(II). El objetivo es crear pruebas que puedan reconocer selectivamente una fosfoproteína de interés y visualizar la actividad de las proteínas kinasas y fosfatasas en células vivas, tejidos y organismos completos en tiempo real<sup>15,16</sup>. Un ejemplo de estos compuestos se muestra a continuación<sup>6</sup>:

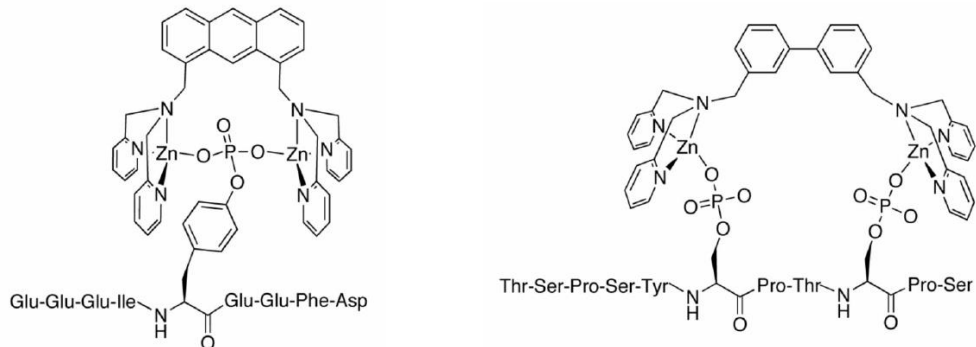


Fig. 2.2 Compuestos de coordinación para la detección de fosfoproteínas

La actividad biológica de los compuestos de coordinación no depende solamente de los iones metálicos sino también del tipo de ligantes a los que estos iones metálicos estén coordinados. Una molécula que ha sido utilizada como ligante es el bencimidazol, esta molécula y sus derivados han presentado buena actividad biológica cuando se forman compuestos de coordinación con iones metálicos<sup>14</sup>.

## 2.4 Bencimidazol y sus derivados

El bencimidazol es un heterociclo formado por la fusión de un anillo de benceno y uno de un imidazol. Este compuesto presenta tautomería debido al intercambio del hidrógeno entre los hidrógenos 1 y 3<sup>11</sup>.

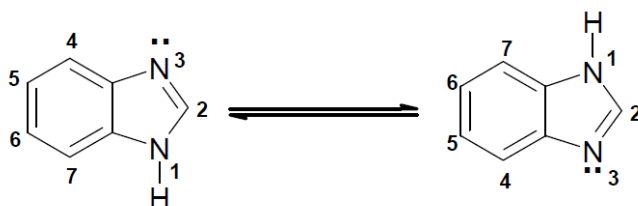


Fig. 2.3 Tautomería del bencimidazol



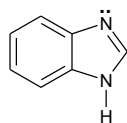
Los derivados del bencimidazol han mostrado una importante actividad biológica siendo empleados para tratar enfermedades parasitarias y se ha observado que muestran actividad antiviral, antifúngica y antitumoral.<sup>14</sup>

Un derivado del bencimidazol es el tiabendazol que se usa en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales causadas por helmintos, debido a que presenta un amplio espectro de actividad. El descubrimiento de este compuesto facilitó el desarrollo de fármacos estructuralmente relacionados, con menor toxicidad y mayor efectividad como los bencimidazoles 2-carbamato de metilo, de los cuales el albendazol y el mebendazol son los más representativos<sup>16</sup> y que han mostrado una importante actividad biológica siendo empleados para tratar enfermedades parasitarias, además de que se les ha identificado actividad antiviral y antitumorales<sup>17</sup>.

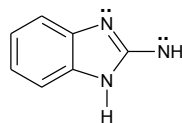
En el grupo de investigación de la Dra Noráh Barba se ha realizado la síntesis y evaluación de la actividad biológica de compuestos de coordinación 2-bencimidazol sustituidos y algunos de ellos han mostrado actividad antineoplásica, algunos ejemplos de estos compuestos se presentan a continuación.

## 2.5 Compuestos de coordinación con derivados del bencimidazol con actividad biológica

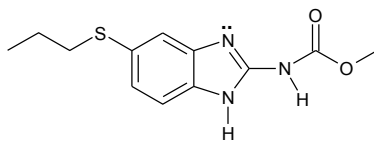
En una primera etapa se llevó a cabo la síntesis de compuestos de coordinación de cobalto(II) y zinc (II) con los ligantes bencimidazol (bz), 2-aminobencimidazol (2ab), albendazol (abz) y el tris(2-bencimidazolilmetil)amina (ntb) y se evaluó su actividad citotóxica y antiproliferativa en diferentes líneas celulares tumorales; HCT-15 (colon), HeLa (cérvico uterino) y SKLU-1 (pulmón).<sup>20</sup> La estructura de los ligantes se muestra en la siguiente figura:



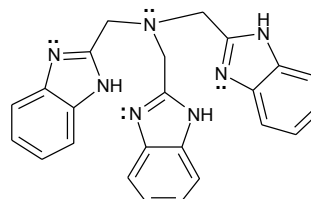
bencimidazol (bz)



2-aminobencimidazol (2ab)



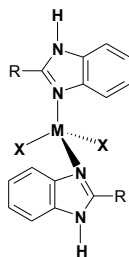
alabendazol (abz)



tris(2-bencimidazolilmetil)amina (ntb)

## 2.4 Estructura de algunos ligantes bencimidazólicos<sup>20</sup>

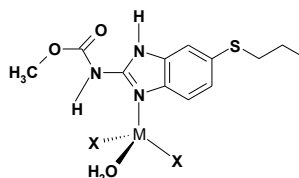
En los compuestos de coordinación que se obtuvieron, el nitrógeno del anillo bencimidazólico se coordinó en todos los casos obteniéndose compuestos con geometrías octaédricas, tetraédricas y en el caso del ligante ntb, de bipirámide trigonal.



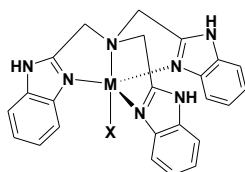
$M^{2+} = \text{Co, Zn}$   $X = \text{Cl, Br}$

bz  $R = \text{H}$

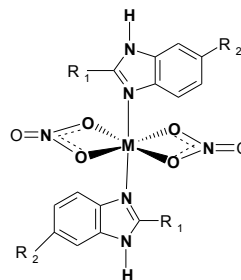
2ab  $R = -\text{NH}_2$



$M^{2+} = \text{Co, Zn}$   $X = \text{Cl, Br}$



$M^{2+} = \text{Co, Zn}$   $X = \text{Cl, Br}$



$M^{2+} = \text{Co, Zn}$

bz  $R_1 = \text{H, } R_2 = \text{H}$

2ab  $R_1 = -\text{NH}_2, R_2 = \text{H}$

abz  $R_1 = -\text{NHCOOCH}_3, R_2 = \text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

## 2.5 Compuestos de coordinación obtenidos<sup>20</sup>.

En general las esferas de coordinación se completan con los contraiones de las sales metálicas de partida y en algunos casos con moléculas de disolvente.

Tabla 2.2.  $Cl_{50}$  de algunos compuestos de coordinación con actividad anticancerígena

Compuestos	HeLa ( $\mu\text{g/mL}$ )	HCT-15( $\mu\text{g/mL}$ )
2ab	-	-
$[\text{Co}(\text{2ab})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$	100	64
Abz	-	-
$[\text{Co}(\text{abz})\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	36	79
Ntb	-	-
$[\text{Co}(\text{ntb})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	79	100
$[\text{Co}(\text{ntb})\text{Br}]\text{Br} \cdot \text{H}_2\text{O}$	54	54

Se puede observar en la tabla anterior que los compuestos con actividad anticancerígena promisorias son  $[\text{Co}(\text{abz})\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $IC_{50} = 36 \mu\text{g/mL}$ ) en la línea celular HeLa y  $[\text{Co}(\text{ntb})\text{Br}]\text{Br} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $IC_{50} = 54 \mu\text{g/mL}$ ) en las líneas celulares HeLa and HCT-15 .

Estos primeros resultados estimularon el interés en llevar a cabo la síntesis de nuevos compuestos, ahora con derivados bencimidazólicos 2-sustituídos. Se emplearon sales metálicas de cobalto(II), cobre(II) y zinc(II) con los ligantes: 2-metilbencimidazol (2mbz), 2-fenilbencimidazol (2phbz), 2-clorobencimidazol (2cbz), metil 2-bencimidazol carbamato (2cmbz) y 2 guanidinobencimidazol (2gb), algunos de los cuales han presentado actividad antitumoral<sup>14</sup>.

Las estructuras de los ligantes empleados se muestran en la figura 2.6.

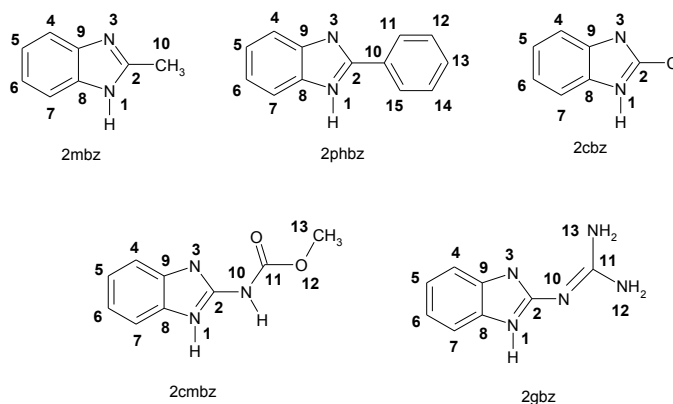


Figura 2.6. Ejemplos de bencimidazoles 2 sustituidos.

Se sintetizaron aproximadamente cuarenta compuestos de coordinación, en todos los compuestos se coordinó el nitrógeno imidazólico al ion metálico correspondiente. Cuando se empleó como contraiones los nitratos, estos se coordinaron obteniéndose compuestos con geometría octaédrica, cuando se emplearon halógenos, en muchos casos esto se coordinaron obteniéndose compuestos con geometría tetraédrica.

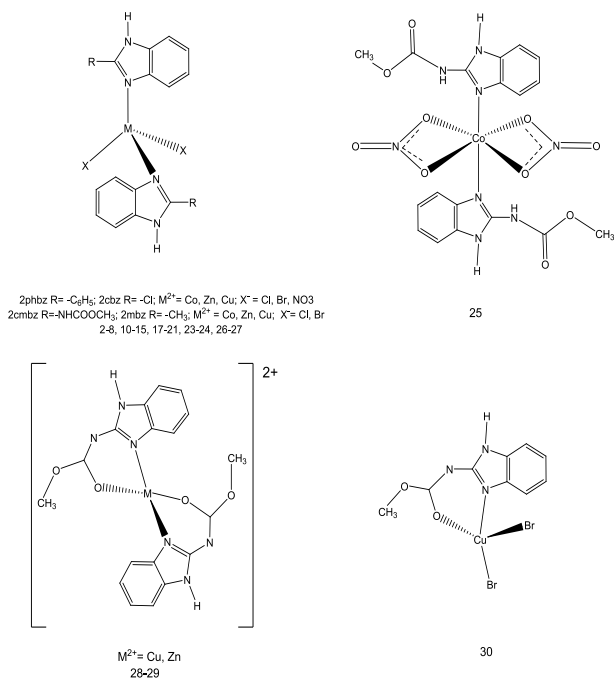


Figura 2.7. Estructura de los compuestos de coordinación con ligantes 2-bencimidazol sustituidos.

Uno de los resultados muy interesantes es la versatilidad con la cual el ligante 2-guanidinobencimidazol se coordina, obteniéndose compuestos tanto octaédricos como tetraédricos con uno o dos ligantes y con los contraiones coordinados en algunos casos; lo cual se puede observar en la figura 2.8.

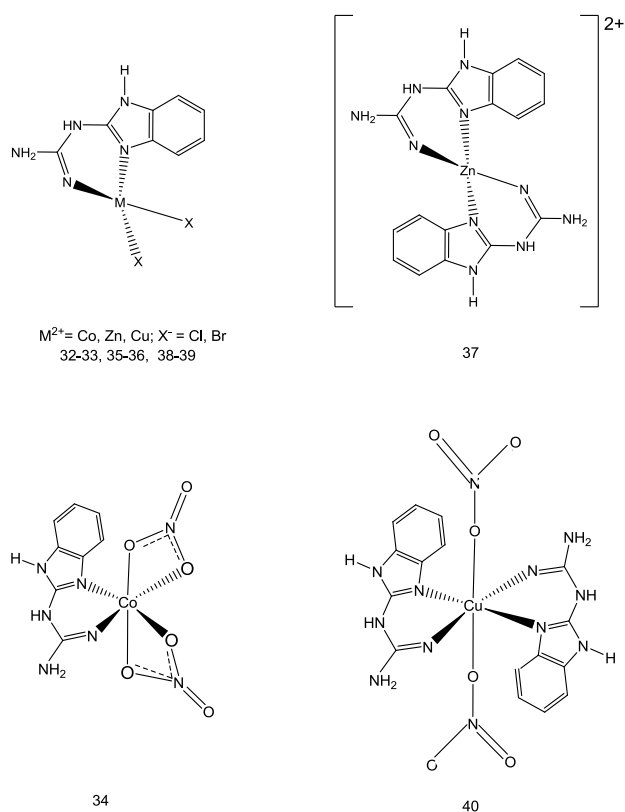


Figura 2.8. Diversos compuestos de coordinación obtenidos con el ligante 2-guanidino bencimidazol.

Se evaluó su actividad citotóxica y antiproliferativa de estos compuestos en diferentes líneas celulares tumorales: PC3 (próstata), MCF-7 (mama), HCT-15 (colon), HeLa (cérvico uterino), SKLU-1 (pulmón) y U373 (glioblastoma); de los compuestos que resultaron tener actividad antineoplásica significativa se determinó la concentración inhibitoria 50 y el tiempo de recuperación. Los resultados de la  $CI_{50}$  se muestran en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de los compuestos de coordinación.

HeLa	P.M.	CI <sub>50</sub> µg/ml	CI <sub>50</sub> µM
[Zn(2mbz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].0.5H <sub>2</sub> O <b>4</b>	527.67	22.79	43.18
[Zn(2cmbz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].EtOH <b>26</b>	564.73	27.42	48.55
[Cu(2cmbz)Br <sub>2</sub> ].0.7H <sub>2</sub> O <b>30</b>	414.54	39.63	95.59
[Zn(2gbz) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O <b>37</b>	557.79	ND	ND
[Cu(2gbz)Br <sub>2</sub> ] <b>39</b>	398.54	45.95	115.29
HCT-15	P.M.	CI <sub>50</sub> µg/ml	CI <sub>50</sub> µM
[Zn(2mbz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].0.5H <sub>2</sub> O <b>4</b>	527.67	259.71	492.18
[Zn(2cmbz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].EtOH <b>26</b>	564.73	ND	ND
[Cu(2cmbz)Br <sub>2</sub> ].0.7H <sub>2</sub> O <b>30</b>	414.54	11.08	26.72
[Zn(2gbz) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O <b>37</b>	557.79	ND	ND
[Cu(2gbz)Br <sub>2</sub> ] <b>39</b>	398.54	ND	ND

Como se observa en la tabla, solo cuatro compuestos presentaron actividad biológica significativa. La línea celular que resultó ser más susceptible a los compuestos de coordinación fue la línea celular HeLa, seguida de la línea celular HCT-15, mientras que en la línea MCF-7 no se alcanzó un valor significativo de CI<sub>50</sub>.

En la línea celular HeLa los compuestos más activos con el ion metálico zinc fueron [Zn(2mbz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].0.5H<sub>2</sub>O **4** y [Zn(2cmbz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].EtOH **26**, y con el cobre fueron [Cu(2cmbz)Br<sub>2</sub>].0.7H<sub>2</sub>O **30** y [Cu(2gbz)Br<sub>2</sub>] **39** y en la línea celular HCT-15 el compuesto [Cu(2cmbz)Br<sub>2</sub>].0.7H<sub>2</sub>O **30** fue el más activo.

Para determinar el tiempo de recuperación de las células de la línea celular HeLa tratadas con los compuestos de coordinación se midió el porcentaje de supervivencia para un periodo de 48 horas después de la exposición de los compuestos durante 24 horas. Como se observa en la figura 2.9, las células tratadas con los compuestos de coordinación con el ion metálico cobre se recuperan normalmente, mientras que las células que fueron tratadas con los compuestos de coordinación con el ion metálico zinc no se recuperaron

normalmente, lo cual indica que el modo de acción de los compuestos es diferente.

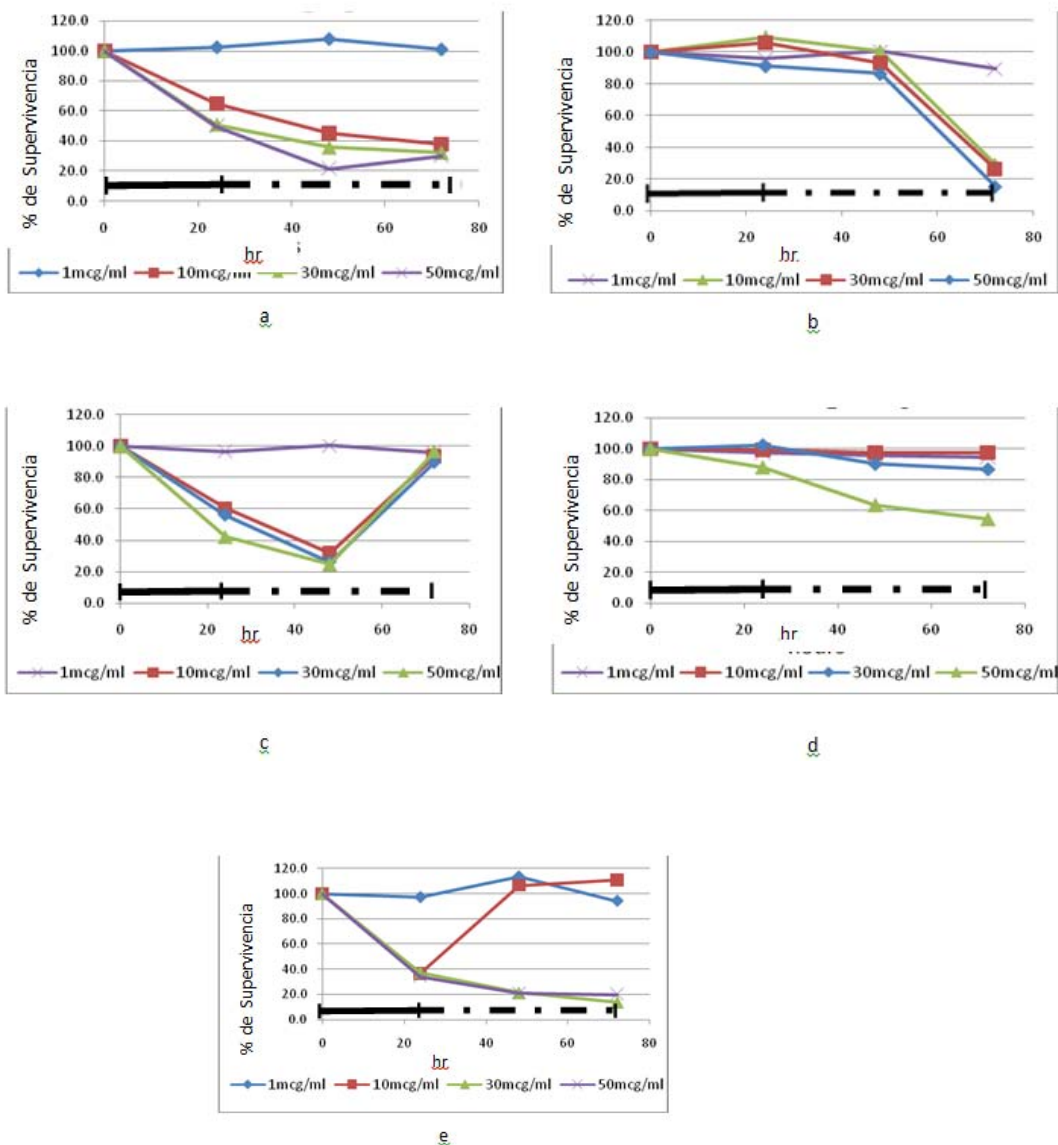


Figura 2.9 Cinética de recuperación de las células HeLa con los compuestos: **a)** [Zn(2mbz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·0.5H<sub>2</sub>O **4**, **b)** [Zn(2cmbz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·EtOH **26**, **c)** [Cu(2cmbz)Br<sub>2</sub>]·0.7H<sub>2</sub>O **30**, **d)** [Zn(2gbz)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O **37**, **e)** [Cu(2gbz)Br<sub>2</sub>] **39**<sup>17</sup>.

Se encontró que solo un porcentaje de estos compuestos presentaron actividad biológica significativa, los compuestos con cobre(II) fueron los más activos, mientras que los compuestos con zinc(II) mostraron ser muy tóxicos y los de cobalto(II) no presentaron actividad<sup>14</sup>.

De estos primeros resultados y después de probar una cantidad significativa de compuestos de coordinación con diversas estructuras, se logró obtener algunas conclusiones significativas:

- Es importante para la actividad citotóxica de los compuestos de coordinación, que los halógenos estén coordinados al centro metálico.
- Ningún compuesto con geometría octaédrica fue activo y en general los compuestos tetraédricos presentaron actividad.
- Finalmente, que los mecanismos de acción en donde el ligante bencimidazólico está unido al centro metálico de manera bidentada, son diferentes que los que siguen los compuestos de coordinación en donde los ligantes están coordinados de manera monodentada, aunque falta llevar a cabo estudios más extensos al respecto.

En otro trabajo del mismo grupo de investigación se estudió la actividad biológica de los compuestos de coordinación con el ligante clotrimazol. El clotrimazol (1-(a-2-clorotritil)imidazol, clotri) es un derivado imidazólico con actividad antifúngica y un reconocido antagonista de la calmodulina que recientemente ha mostrado que induce alteraciones morfológicas y funcionales sobre las células de cáncer de mama derivadas de la línea celular MCF-7<sup>21</sup>.



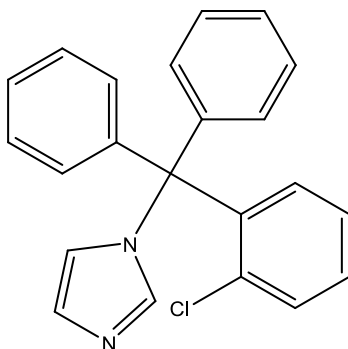


Figura 2.10. Estructura del clotrimazol

Se sintetizaron nuevos compuestos de coordinación con los iones metálicos  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Co}^{\text{II}}$ ,  $\text{Zn}^{\text{II}}$  y  $\text{Ni}^{\text{II}}$ . Al realizar la caracterización espectroscópica de los compuestos de coordinación y se encontró que la geometría que se estabiliza alrededor del ion metálico varía, la geometría más frecuente fue la geometría tetraédrica, sin embargo algunos compuestos también presentan geometría octaédrica y en algunos casos de bipirámide trigonal. A continuación se muestran las geometrías que presentan los compuestos de coordinación sintetizados a partir del ligante clotrimazol y los iones metálicos  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Co}^{\text{II}}$ ,  $\text{Zn}^{\text{II}}$  y  $\text{Ni}^{\text{II}}$ .

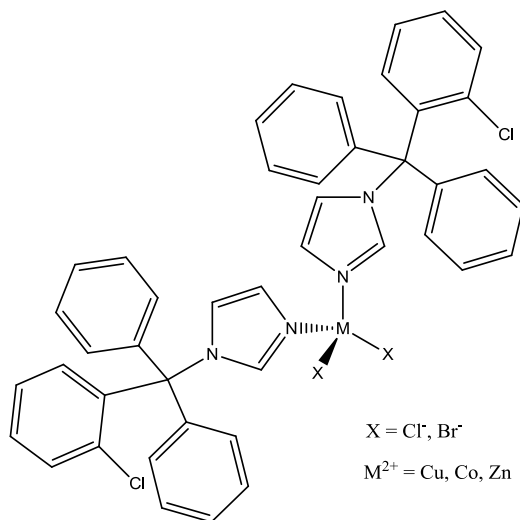


Figura 2.11 Geometría tetraédrica, la más frecuente en compuestos de coordinación con clotrimazol

Se evaluó la actividad citotóxica de estos compuestos de coordinación en las líneas celulares cancerosas humanas HeLa (cérvico-uterino), PC-3 (próstata) y HCT-15 (colon) y se determinó la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ , Tabla 2.4)

Tabla 2.4 Geometrías de compuestos de coordinación con el ligante clotrimazol.

Compuesto de coordinación	Geometría Propuesta
(1) $[Cu(\text{clotri})_2Cl_2] \cdot 5H_2O$	Tetraédrica
(1a) $[Cu_2(\text{clotri})_4\mu^2-Cl_4] \cdot 2H_2O$	Octaédrica
(2) $[Co(\text{clotri})_2Cl_2]$	Tetraédrica
(3) $[Zn(\text{clotri})_2Cl_2]$	Tetraédrica
(4) $[Ni(\text{clotri})_2Cl_2] \cdot H_2O$	Tetraédrica
(5) $[Cu(\text{clotri})_2Br_2] \cdot 5H_2O$	Tetraédrica
(5a) $[Cu_4(\text{clotri})_4\mu^4-Br_6\mu^4-O]$	Tetraédrica
(5b) $[Cu_2(\text{clotri})_4\mu^2-Br_2] \cdot 2H_2O$	Tetraédrica
(6) $[Co(\text{clotri})_2Br_2]$	Tetraédrica
(7) $[Zn(\text{clotri})_2Br_2]$	Tetraédrica
(8) $[Ni(\text{clotri})_3Br_2]$	Bipirámide Trigonal
(9) $[Cu(\text{clotri})_3NO_3]NO_3 \cdot 2H_2O$	Tetraédrica
(10) $[Co(\text{clotri})_3(NO_3)_2]$	Octaédrica
(11) $[Zn(\text{clotri})_3NO_3]NO_3 \cdot 5H_2O$	Tetraédrica
(12) $[Ni(\text{clotri})_3(OH_2)_2NO_3]NO_3 \cdot 3H_2O$	Octaédrica

La línea celular que resultó ser más sensible a la exposición de los compuestos de coordinación fue la línea celular HeLa, seguida de las líneas PC-3 y HCT-15. Se observó que los compuestos de coordinación con el ion metálico cobre resultaron ser los más activos, siendo el compuesto más efectivo el (9)  $[Cu(\text{clotri})_3NO_3]NO_3 \cdot 2H_2O$  en la línea celular HeLa con un valor de  $CI_{50}$  de 3.5  $\mu M$ . La  $CI_{50}$  con el valor más grande fue la que presentó la línea celular HCT-15 al estar en exposición al compuesto (7)  $[Zn(\text{clotri})_2Br_2]$  con un valor de 29.8  $\mu M$ .

Tabla 2.5. Concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de los compuestos de coordinación

Compuesto	Línea celular/ CI <sub>50</sub> (μM)		
	HeLa	PC-3	HCT-15
(1) [Cu(clotri) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]·5H <sub>2</sub> O	6.8	6.3	15.4
(2) [Co(clotri) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	7.0	12.8	22.7
(3) [Zn(clotri) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	7.1	11.9	26.1
(4) [Ni(clotri) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]·H <sub>2</sub> O	8.1	13.2	17.2
(5) [Cu(clotri) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]·5H <sub>2</sub> O	3.9	4.9	6.5
(6) [Co(clotri) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	20.6	25.4	26.9
(7) [Zn(clotri) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]	12.1	29.2	29.8
(8) [Ni(clotri) <sub>3</sub> Br <sub>2</sub> ]	13.6	28.5	27.1
(9) [Cu(clotri) <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> ]NO <sub>3</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.5	8.2	4.8
(10) [Co(clotri) <sub>3</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	14.1	27.0	26.5
(11) [Zn(clotri) <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> ]NO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	12.1	20.2	ND
(12) [Ni(clotri) <sub>3</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> ]NO <sub>3</sub> ·3H <sub>2</sub> O	10.9	14.7	ND
Clotrimazol	12.4	12.3	52.3
Cisplatino	5.2	19.0	4.6

Se llevó a cabo la evaluación de muerte celular por apoptosis mediante la técnica de TUNEL en la línea celular HeLa (cervico-uterino) y se observó que los compuestos (1) [Cu(clotri)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·5H<sub>2</sub>O y (9) [Cu(clotri)<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O fueron los compuestos que presentaron mayor porcentaje de apoptosis, siendo el (1) [Cu(clotri)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·5H<sub>2</sub>O el que presentó el máximo porcentaje y positividad de apoptosis en la prueba de TUNEL. La estructura de rayos X del compuesto (1) [Cu(clotri)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·5H<sub>2</sub>O se muestra a continuación:

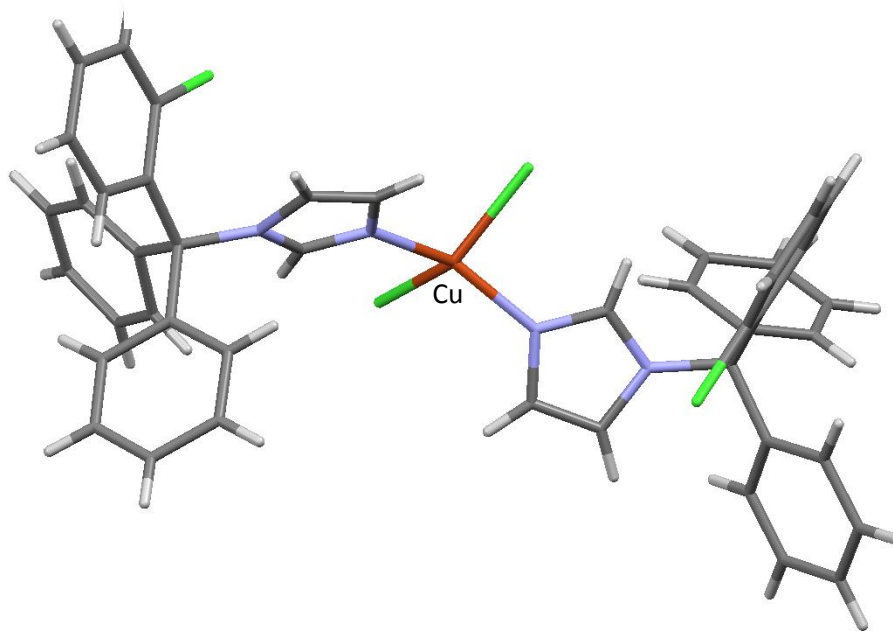


Fig. 2.12. Estructura de rayos-X del compuesto  $[\text{Cu}(\text{clotri})_2\text{Cl}_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1).

En un estudio posterior se estudió los modos de unión de los compuestos anteriores de clotrimazol con el ADN que mostraron interacciones electrostáticas uniéndose en sitios específicos, además los compuestos con cobre<sup>2+</sup> oxidan especies reactivas de oxígeno dando como resultado  $\text{Cu}^+$ , el cual daña oxidativamente al ADN<sup>22</sup>.

Siguiendo la misma línea de investigación se trabajó con el ligante secnidazol (secnim), el cual es un nitroimidazol sustituido con actividad farmacológica (figura 2.13), se emplea como antiprotozoario, antihelmíntico y antibacteriano. Se eligió este ligante debido a que su actividad se basa en la interacción con el ADN. La formación de radicales libres que involucran al grupo nitro afectan la estructura helicoidal de ADN<sup>23</sup>.

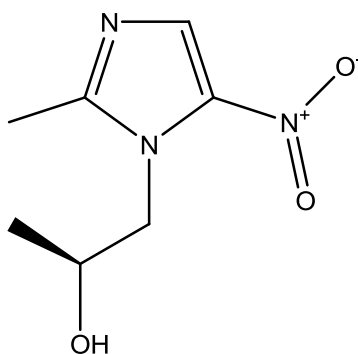


Figura 2.13. El secnidazol es un ligante nitrroimidazólico

El secnidazol se hizo reaccionar con diversas metálicas de cobalto, níquel, cobre y zinc en su estado de oxidación 2+. Se obtuvieron 13 compuestos los cuales se condensan en la tabla 2.6. Se estudió su actividad citotóxica en las líneas celulares HeLa, PC3 y HCT15 encontrándose que estos compuestos menor actividad que los descritos anteriormente.

Tabla 2.6. Compuesto de coordinación de secnidazol y  $Cl_{50}$  en  $\mu M$ .

Compuesto	Líneas celulares empleadas		
	HeLa	PC3	HCT15
(1) $[Cu(secnim)_2Cl_2]$	239.1		
(2) $[Co(secnim)_3(OH_2)Cl_2]$			
(3) $[Zn(secnim)_3(OH_2)Cl_2]$			177.5
(4) $[Ni(secnim)_2(OH_2)_2Cl_2] \cdot 5H_2O$			
(5) $[Cu(secnim)_2Br_2] \cdot 0.5H_2O$			
(6) $[Co(secnim)_2Br_2] \cdot H_2O$			277.6
(7) $[Cu(secnim)_3NO_3]NO_3 \cdot EtOH$	212.8		
(8) $[Co(secnim)_3(OH_2)NO_3]NO_3$			
(9) $[Zn(secnim)_3NO_3]NO_3 \cdot 2H_2O$	276.3	159.9	
(10) $[Ni(secnim)_3NO_3]NO_3 \cdot 2H_2O$	232.6	257.0	240.0
(11) $[Cu_2(secnim)_2(\mu_2-O_2H_5C_3)_4]$		227.9	
(12) $[Co_2(secnim)_6(O_2C_2H_3)_2(\mu_2-O_2H_5C_3)_2] \cdot H_2O$			
(13) $[Ni_2(secnim)_4(\mu_2-O_2H_5C_3)_4]$	161.4	280.9	172.7
Secnidazol	276.6		371.2
Cisplatino	5.2	19.0	4.6

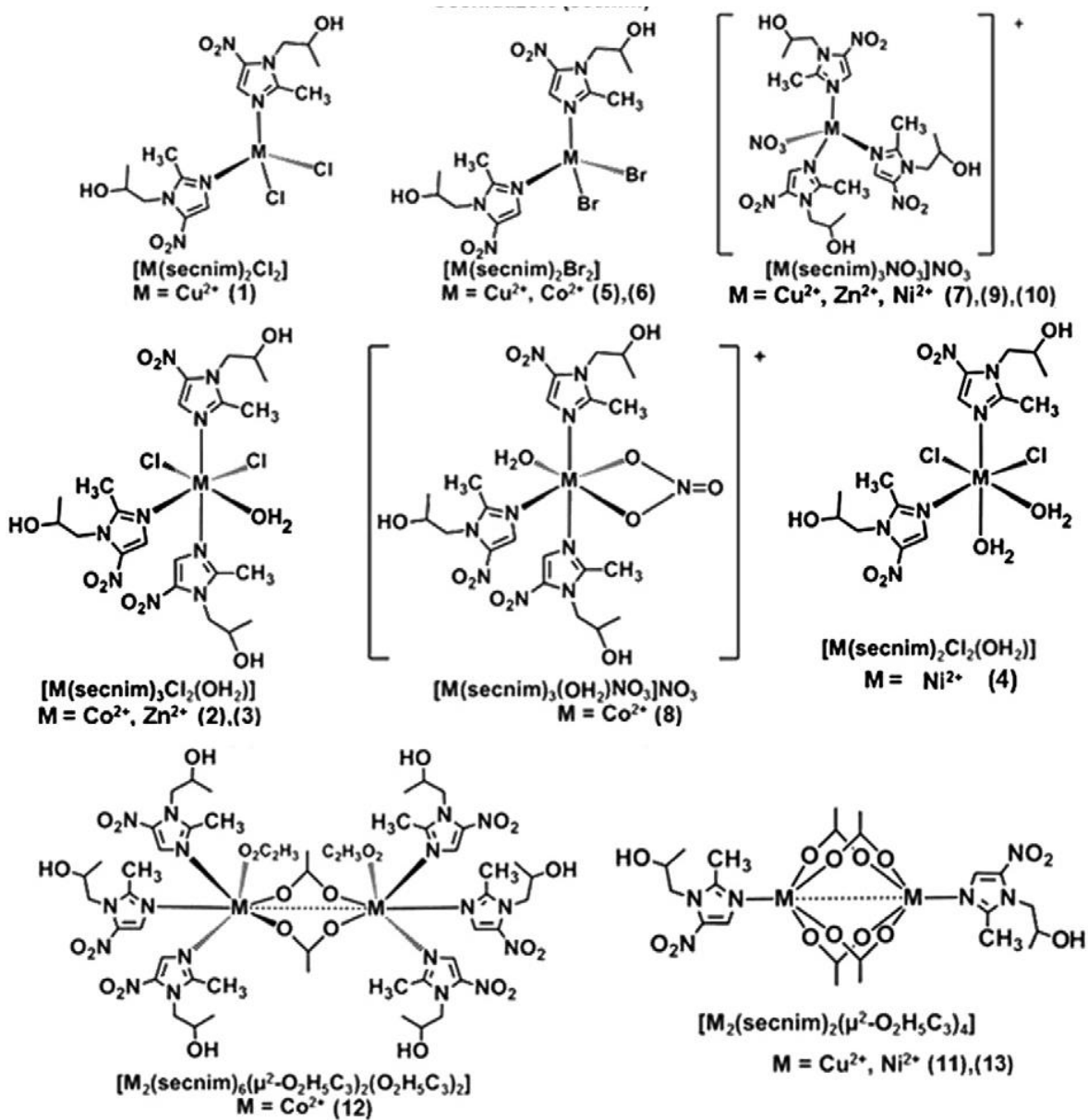


Figura 2.14. Estructuras de los compuestos de coordinación de secnidazol con algunos metales de transición<sup>23</sup>.

Se puede observar que los compuestos de coordinación presentan geometrías octaédricas y tetraédricas, así como especies mononucleares y dinucleares. Los compuestos más activos presentaron  $\text{Cl}_{50}$  entre los intervalos de 160-180  $\mu\text{M}$ , dichos compuestos son dos de zinc  $[\text{Zn}(\text{secnim})_3(\text{OH}_2)\text{Cl}_2]$  (3) y

[Zn(secnim)<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O (9) los cuales presentan geometrías octaédrica el primero y tetraédrica el segundo así como el compuesto [Ni<sub>2</sub>(secnim)<sub>4</sub>(μ<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>H<sub>5</sub>C<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] (13) que además de tener geometría octaédrica es un dímero. De acuerdo a las Cl<sub>50</sub>, las concentraciones a las que estos compuestos presentan activada biológica son muy grandes en comparación a la concentración del cisplatino, por lo que se considera que estos compuestos no presentan una buena actividad biológica.

En este contexto se centra esta investigación ya que en el grupo de trabajo se han obtenido una serie de compuestos imidazólicos y bencimidazólicos con diversos tipos de sustitución en los ligantes, compuestos tanto con geometrías diversas como con actividades antineoplásicas variables. En este caso, los compuestos de coordinación sintetizados a partir del ligante albendazol y los iones metálicos Zn<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> presentaron muy buena actividad biológica con la ventaja de que estos iones metálicos son menos tóxicos en comparación de los que se usan actualmente para el tratamiento contra el cáncer como el platino, esto da pie a una nueva alternativa de moléculas para el tratamiento del cáncer esperando que tengan menores efectos secundarios, por todo esto es importante continuar investigando este tipo compuestos para conocer su mecanismo de acción e iniciar su investigación en fases preclínicas.

Referencias:

1. Sadler P., *Chemical Biology* 12 (2008) 197-206.
2. Zijian G., Sadler P., *Angewandte Chemie International Edition*, 38 (1999) 1512–153.
3. Bertini I., Gray H.B., Stiefel E.I., Valentine J.S. *Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity*, University Science Books, CA, 2007.
4. Da Silva J, Frausto J.R., Williams RJP, *The Biological Chemistry of the Elements*, Vol. 2 Oxford University, Oxford, 2011.
5. Lippard S.J., Berg J.M. *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, 1994.
6. Hass K., Frantz K., *Chemical Review*, 109 (2009) 4921-4960.
7. Chang R., *Química*, 7ª Edición, Mc Graw Hill, 2002.
8. Iakovidis I., Delimaris I., Piperakis M., *Molecular Biology International*, 2011 (2011) 1-13.
9. Brewer G.J., *Journal of the American College of Nutrition* 28 (2009) 238-242.
10. Daniel K.G., Gupta P., Harbach R.H., Guida W.C., Dou Q.P., *Biochemical Pharmacology* 67 (2004) 1139-1141.
11. Puig S., Thiele D.J., *Current Opinion in Chemical Biology*, 6 (2002) 171-180.
12. Tripathi L., Kumar P., Singhai A.K., *Indian Journal of Cancer*, 44 (2007) 62-71.
13. Renty F., Costello L., *Journal of Cell Biochemistry*, 106 (2009) 750-757.
14. Adams J.A. *Chemical Reviews* 101 (2001) 2271-2290.
15. Lawrence D., Wang Q., *Chemical Biochemistry*. 8 (2007) 373-378.
16. Rothman D.M., Shults M.D., Imperiali B., *Trends Cell Biology*, 15 (2005) 502-510.



17. Sánchez-Guadarrama O., López-Sandoval H., Sáncgez Bartéz F., Gracia-Mora I., Höpfl H. Barba-Behrens N., *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103 (2009) 1204-1213.
18. Katritzky A.R., Ambler A.P., *Academic Press Inc.*, New York, 1963.
19. E. Lacey, *Parasitology Today*, 6 (1990) 112-115.
20. López-Sandoval H., Londoño-Lemos M. E., Garza-Velásco R., Poblano-Meléndez I., Granada-Macías P., Gracia-Mora I., Barba-Behrens N., *Journal of Inorganic Biochememistry*. 102 (2008) 1267-1276.
21. Betanzos-Lara S., Gómez-Ruiz C., Barrón-Sosa L., Gracia-Mora I., Flores-Álamo M., Barba-Behrens N., *Journal of Inorganic Biochemistry*, 114 (2012) 82-93.
22. Betanzos-Lara S., Chmel Nikola P., Zimmerman M., Barrón-Sosa L., Garino C., Salassa L., Rodger A., Brumaghim J., Gracia-Mora I., Barba-Behrens N., *Dalton Transactions*. 44 (2015) 3673-3685.
23. Betanzos-Lara S., Gracia-Mora I., Granada-Macías P., Flores-Álamos M., *Inorganica Chimica Acta*, 397 (2013) 94-100.

# Albendazol (abz) 3

---

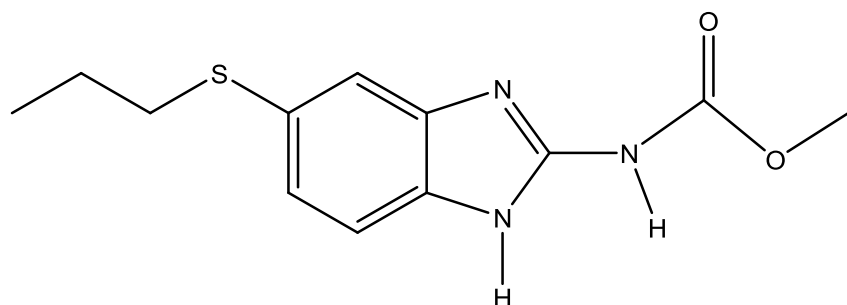
El albendazol o metil-5-(propiltiol)-2-bencimidazol-carbamato es un compuesto derivado del bencimidazol que es usado como antihelmíntico de amplio espectro y tiene otros nombres comerciales como Helmintab, Valbazen, Zentel y Colidetol.

El albendazol fue usado en este trabajo como ligante para la síntesis de compuestos de coordinación y se abreviará como abz.

## 3.1 Propiedades fisicoquímicas del albendazol

El albendazol es un polvo de color blanco con fórmula mínima  $C_{12}H_{15}N_3O_2S$  y peso molecular de 265.33 g/mol, presenta un punto de fusión de 209 °C, es soluble en DMSO, ácidos y bases fuerte, ligeramente soluble en metanol, cloroformo, acetato de etilo y prácticamente insoluble en agua.

La estructura del albendazol es la siguiente:



### 3.2 Propiedades espectroscópicas del albendazol

#### a) Espectroscopía Infrarrojo del albendazol

En el espectro de I.R. se observan las vibraciones  $\nu(\text{C}=\text{O})$ ,  $\nu(\text{COO})$ ,  $\nu(\text{C}=\text{N})$  y  $\nu(\text{C}-\text{N})$  que son las de mayor interés para este trabajo ya que estos grupos tienen átomos que pueden donar electrones y formar enlaces de coordinación con átomos metálicos.

El espectro de I.R. y las vibraciones más importantes del albendazol se muestran a continuación.

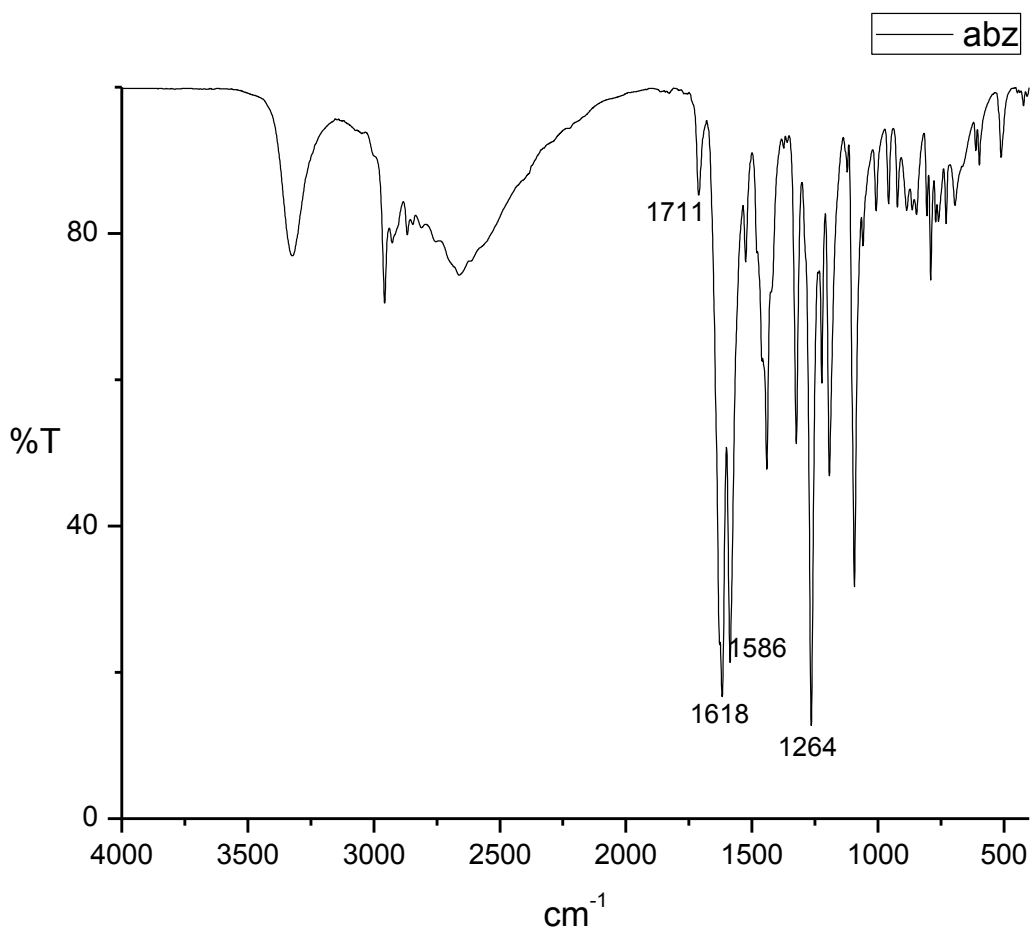


Fig. 3.2.1 Espectro de I.R. del ligante abz.

Tabla 3.2.1 Vibraciones principales en el espectro de I.R. del ligante abz.

Vibración	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )
$\nu(\text{NH})_{\text{elong}}$	3332
$\nu(\text{S-CH}_2)$	2661
$\nu(\text{C=O})$	1711
$\nu(\text{COO})$	1618
$\nu(\text{C=N})$	1586
$\nu(\text{C-N})$	1264
$\nu(\text{C=C})$	1618

**b) Espectroscopía electrónica del albendazol**

El espectro electrónico del albendazol se llevó a cabo en estado sólido empleando la técnica de reflectancia difusa, se muestra a continuación.

El albendazol presenta una transición electrónica en 30480 cm<sup>-1</sup> que se debe al sistema aromático del compuesto y corresponde a la transición electrónica  $\pi \leftarrow \pi^*$ .

Es importante hacer notar que en la región que va de 6000 a 25000 cm<sup>-1</sup> no se observan señales apreciables, lo que nos ayuda a poder caracterizar por ésta técnica los compuestos de coordinación obtenidos, los cuales presentan señales de absorción en esta zona.

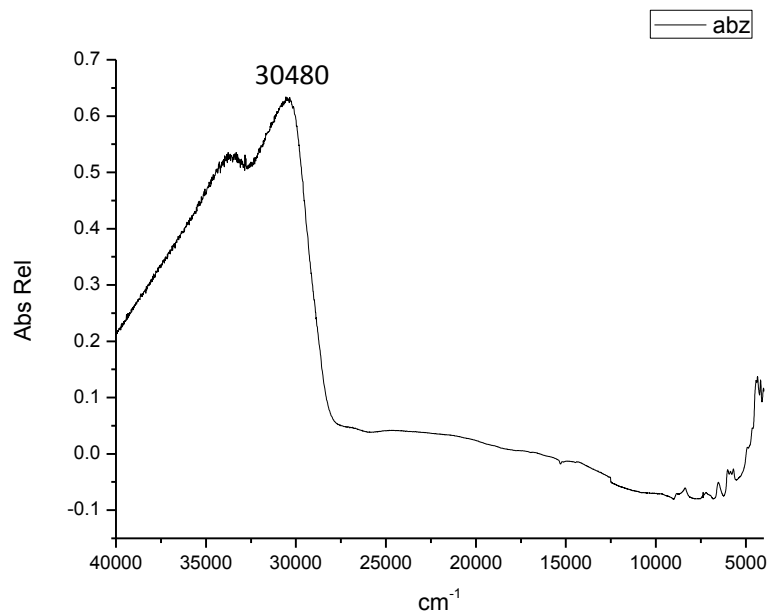


Fig. 3.2.2 Espectro electrónico UV-Vis-NIR del ligante *abz*. Se observa transición electrónica en 30480  $\text{cm}^{-1}$  que se debe al sistema aromático del compuesto.

### c) Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ del albendazol

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  del albendazol se obtuvieron usando DMSO- $\text{d}_6$  como disolvente, los desplazamientos que se observaron en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se muestran en la tabla 3.2.2.

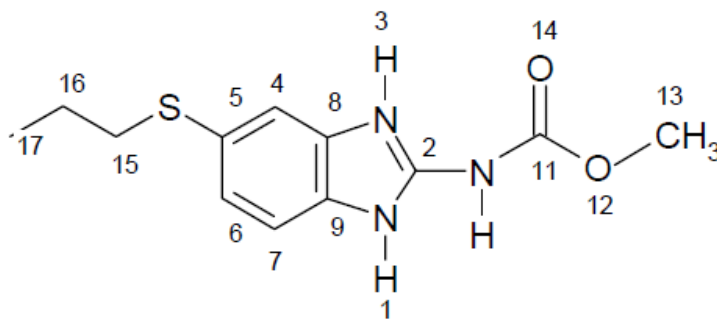
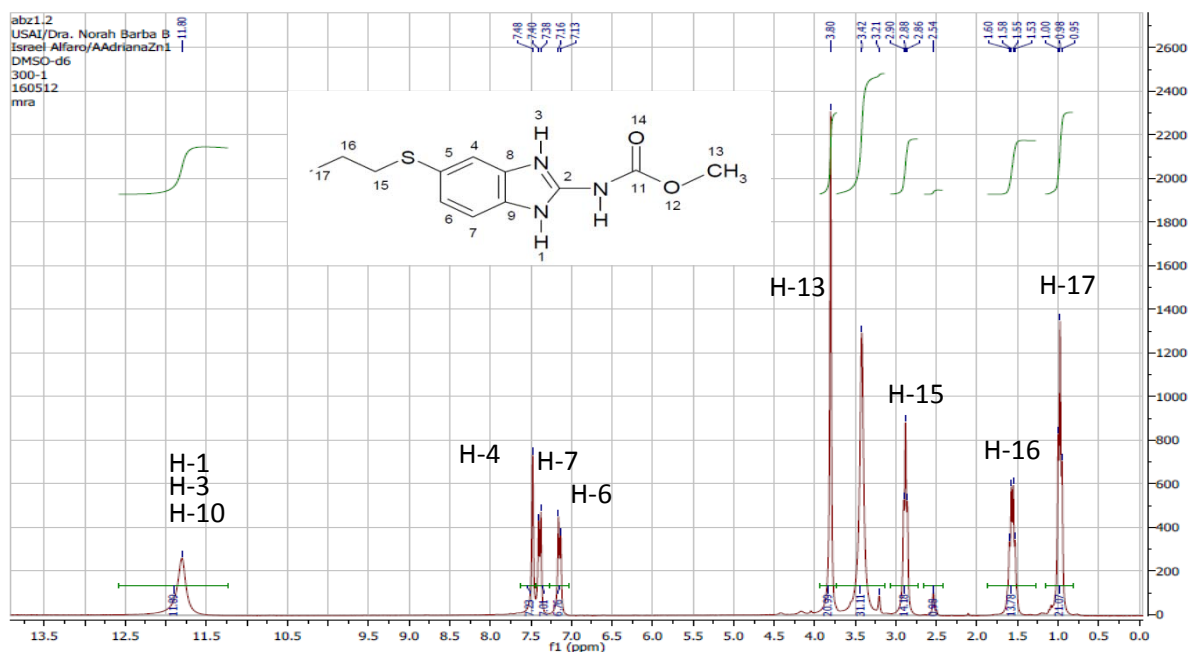


Fig. 3.2.3 Numeración de los átomos de H y C en la molécula de *abz*.

Tabla 3.2.2 Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  del abz.

Asignación	Desplazamiento químico (ppm)
H-1, H-3, H-10	11.80
H-4	7.48
H-7	7.38
H-6	7.16
H-13	3.80
H-15	2.88
H-16	1.55
H-17	0.98

Se presentan ocho señales en el espectro y se observa que la que se encuentra más desplazada es la que corresponde a H-1, H-3 y H-10 que se encuentran unidos a los nitrógenos y a continuación se presenta la señal del H-4 seguida de H-7 que se encuentran cercanos al azufre del grupo propiltiol.

Fig. 3.2.3 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  del ligante abz

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  presenta doce señales que corresponden a cada uno de los carbonos del albendazol ya que no hay carbonos equivalentes en la molécula.

La señal más desplazada es la que corresponde a C-2 que es el carbono que se encuentra unido a tres átomos de nitrógeno, seguida de C-11 que es el carbono del grupo carbamato y que se encuentra unido directamente a los oxígenos, los desplazamientos que presenta el espectro son los siguientes.

Tabla 3.2.3 Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  en DMSO- $\text{d}_6$  del abz

Asignación	Desplazamiento químico (ppm)
C-2	153.51
C-11	145.20
C-8	131.79
C-9	131.55
C-6	129.73
C-5	125.64
C-4	114.33
C-7	114.03
C-13	53.97
C-15	35.97
C-16	22.37
C-17	13.53

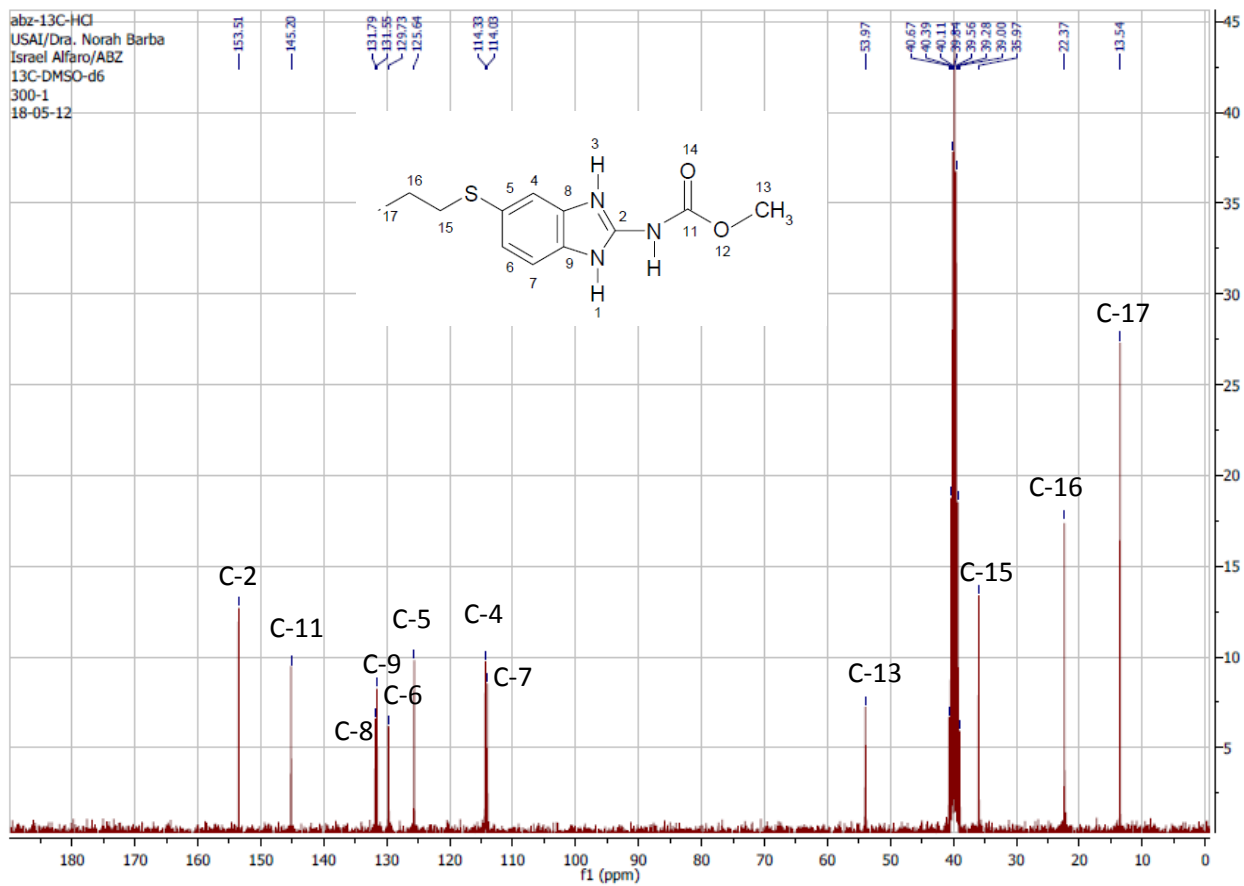


Fig. 3.2.4 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en DMSO- $\text{d}_6$  del ligante abz



### 3.3 Propiedades biológicas del albendazol

El albendazol es un derivado del bencimidazol que se utiliza a nivel mundial para el tratamiento de parásitos ocasionados por diversos nematodos intestinales e hísticos y también contra las formas larvarias de algunos cestodos. El albendazol se ha vuelto el medicamento más indicado para tratar la cisticercosis<sup>1,2</sup> y la hidatidosis quística<sup>3</sup>.

Después de su ingestión, la absorción del albendazol es variable y se intensifica por la presencia de comidas grasientas, la ingestión de alimentos grasos intensifica su función<sup>4</sup>. El albendazol es metabolizado rápidamente en el hígado y quizás en los intestinos, por esta razón es imposible detectar el albendazol en plasma después de su ingestión en una sola dosis<sup>7</sup>.

Una vez metabolizado, el albendazol es convertido en la forma de sulfóxido de albendazol, este compuesto presenta una potente actividad antihelmíntica y alcanza concentraciones plasmáticas máximas de 300 ng/mL. Se forman los enantiómeros (+) y (-) del sulfóxido de albendazol, pero solo el primero (+) alcanza concentraciones plasmáticas mucho mayores en humanos y es eliminado más lentamente que el enantiómero (-)<sup>5</sup>. Una gran parte del sulfóxido de albendazol se encuentra ligado a las proteínas plasmáticas y su semivida es de 4 a 15 h<sup>5</sup>.

El sulfóxido de albendazol se distribuye perfectamente en diversos tejidos, incluyendo los quistes hidatídicos. La formación de sulfuro de albendazol es catalizada por la monooxigenasa de flavina microsómica y las isoformas de CYP en el hígado y probablemente en el intestino. Los derivados de sulfóxido se oxidan un paso más hasta la obtención del metabolito sulfona no quiral del albendazol, farmacológicamente inactivo; dicha reacción “inclina la balanza” hacia el sulfóxido (-) y tal vez sea cineticolimitante, porque es la que rige la eliminación y la semivida plasmática del metabolito sulfóxido bioactivo (+). La inducción de las enzimas que participan en la formación de la sulfona a partir del sulfóxido (+) pudiera explicar parte de la variación amplia observada en las semividas

plasmáticas de sulfóxido de albendazol, por consiguiente, en modelos animales los bencimidazoles inducen su propio metabolismo. Los metabolitos de albendazol son excretados principalmente por la orina<sup>6,7</sup>.

En humanos, se ha demostrado que el metabolito ABZ-SO<sub>2</sub> bloquea la actividad cestódica de los cisticercos, inclusive se puede observar una involución del cisticerco. Además, se implementó la detección de los metabolitos de albendazol en plasma y líquido cefalorraquídeo de pacientes con neurocisticercosis subaracnoidea, mediante LC-MS/MS, como método de seguimiento por lo que la administración del fármaco puede ser ajustada según lo requiera el paciente ya que algunos pacientes solo absorben el 30% del fármaco, comparado con lo que pueden llegar a absorber otros pacientes<sup>8,9</sup>.

Por otro lado, los bencimidazoles producen muchos cambios bioquímicos en nematodos susceptibles, estos cambios incluyen en la inhibición de la reductasa de fumarato de mitocondrias, disminución del transporte de glucosa y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, pero es posible que su acción primaria sea inhibir la polimerización de microtubulos, al ligarse a la tubulina  $\beta$ <sup>7</sup>.

Los efectos tóxicos selectivos de los bencimidazoles se deben a que estos compuestos se ligan a la tubulina  $\beta$  del parásito, con afinidad mucho mayor de la que muestran hacia las proteínas de mamíferos<sup>7</sup>.

Referencias:

1. Sotelo J., Jung H., *Clinical Pharmacokinetics*, 34 (1998) 503.
2. García H.H., Del Brutto O.H., *Infectious Diseases Clinical North America.*, 14 (2000) 97-119.
3. Horton R. *Acta Tropica* 64 (1997) 79-93.
4. Dayan A.D., *Acta Tropica* 86 (2003) 141-159.
5. Delatour P., Garnier F., Benoit E., Caude I., *Research Veterinary Science* 50 (1991) 134-8.
6. Gracia M., Molina A., García José L., Pulido M., Prieto J., Álvarez A., *International Journal of Pharmaceutics*, 263 (2003) 123-132.
7. Goodman and Gilman, *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, undécima edición, Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith Parker, McGraw Hill 2006.
8. González-Hernández I., Ruiz-Olmedo M.I., Cárdenas G., Jung-Cook H. *Biomedical Chromatography* (2011) 267-272.
9. Castro N., Márquez-Caraveo C., Brundage R.C., González-Esquivel D., Suárez A.M., Góngora F., Jara A., Urizar J., Lanao J.M., Jung H., *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 47 (2009) 679-85.

# Objetivos

# 4

---

---

## **Objetivo general**

Sintetizar, caracterizar y evaluar la actividad antineoplásica *in vitro* de compuestos de coordinación de metil-5-(propiltiol)-2-bencimidazol-carbamato (albendazol) con los iones metálicos  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .

## **Objetivos particulares**

- Sintetizar nuevos compuestos de coordinación del albendazol con los iones metálicos  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .
- Caracterizar los compuestos de coordinación con albendazol y los iones metálicos  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  obtenidos mediante técnicas analíticas y espectroscópicas: IR, UV-Vis-NIR y Análisis elemental.
- Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados en las líneas celulares humanas tumorales a estudiar: HeLa, PC-3, MCF-7 y HCT-15.
- Determinar si la muerte celular inducida por los compuestos sintetizados es vía apoptosis empleando la técnica de TUNL en las líneas celulares humanas tumorales a estudiar HeLa, PC-3, MCF-7 y HCT-15.
- Corroborar si el porcentaje de muerte celular detectada por la técnica de TUNEL es similar al determinado por Citometría de Flujo en las líneas celulares humanas tumorales HeLa, PC-3, MCF-7 y HCT-15.

Debido a que los compuestos de coordinación con metales de transición sintetizados a partir del anillo de bencimidazol sustituido en la posición 2 presentan actividad antineoplásica, se espera que los nuevos compuestos de coordinación sintetizados con el albendazol y metales de transición cobre(II) y zinc(II) presenten una mejor actividad debido a que el albendazol es una molécula más liposoluble lo que facilitaría que los compuestos de coordinación atraviesen la membrana plasmática.

# Desarrollo Experimental

---

# 6

## 6.1 REACTIVOS

### 6.1.1 Síntesis química

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico y se utilizaron sin purificación previa.

El ligante albendazol (metil-5-[propiltio-2-bencimidazol-carbamato) que se utilizó fue de marca SIGMA. Las sales metálicas  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuBr}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  y  $\text{ZnBr}_2$ , así como los disolventes etanol y acetato de etilo fueron de marca J.T. BAKER.

### 6.1.2 Pruebas biológicas

Se utilizaron las líneas celulares cancerosas humanas: HCT-15 (cáncer de colon), PC3 (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer cervicouterino).

Se utilizó el medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con Suero Fetal Bovino (10%), aminoácidos no esenciales MEM NEAA marca Gibco® (1%) y solución antibiótica-antimicótica Gibco® (1%).

Tripsina-EDTA al 0.25% marca GIBCO®.

Tabletas de PBS TABLETS sin calcio ni magnesio, CAT No 2810305, Lot No 2861K.

Los compuestos de coordinación sintetizados se disolvieron en dimetilsulfóxido marca J.T. Baker, grado analítico.

Se utilizó como control positivo cis-diamino-dicloro-platino(II) "Cisplatino" Marca Alfa Aesar<sup>®</sup> polvo, 2g Johnson Matthey Company. Lote 23F45R. Número CAS 15663-27-1.

Se usó ácido tricloroacético al 10% como fijador de las células, ácido acético glacial al 1% para lavar las placas, ambos fueron de marca J.T.BAKER,

Se usó Azul tripano 0.4%, marca GIBCO<sup>®</sup> para realizar el conteo celular y Sulforrodamina B al 0.4% para la tinción de las células.

#### TUNEL

Se llevó a cabo la reacción de TUNEL con el kit *In Situ* Cell Death Detection Kit, POD, "Kit para la detección inmunohistoquímica y cuantificación de apoptosis (muerte celular programada) a nivel celular, basado en la técnica de marcado de fragmentos de ADN (TUNEL technology): Análisis por microscopía de luz, ROCHE", con las líneas celulares HeLa, PC3, MCF-7 y HCT-15, para los compuestos de coordinación obtenidos con el ion metálico Cu(II).

#### CITOMETRÍA DE FLUJO

Las pruebas de citometría de flujo se llevaron a cabo usando el Kit Annexin-V-FLUOS Staining Kit, "Kit para la detección y cuantificación de apoptosis y diferenciación de necrosis a nivel celular, basado en el marcado de Anexina, ROCHE". Se usaron las líneas celulares HeLa y PC-3 con los compuestos de coordinación obtenidos con el ion metálico cobre(II).

## 6.2 INSTRUMENTACIÓN

### 6.2.1 Síntesis química

Los reactivos se pesaron en una balanza analítica OHAUS Analytical Plus, modelo AP110S.

El punto de fusión de los compuestos se determinó con un equipo FISHER-JOHNS y la conductividad eléctrica se midió con un conductímetro marca ORION, modelo 140.

Los espectros de UV-Vis-NIR se obtuvieron con un espectrofotómetro CARY 5000 UV-Vis-NIR de marca VARIAN, mediante la técnica de reflectancia difusa en estado sólido, con un intervalo de 4000-5000  $\text{cm}^{-1}$  y en disolución en el intervalo de 200-800  $\text{cm}^{-1}$ . Este equipo se encuentra en el laboratorio 211 de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

Los espectros de IR se obtuvieron con un equipo FT-IR/FT-FIR Spectrum 400 y un accesorio ATR Universal de Perkin Elmer y los análisis elementales se realizaron mediante un equipo FISON EA 1108 ANALYZER utilizando cistina como patrón.

Estos equipos se encuentran en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

### 6.2.2 Pruebas biológicas

Los experimentos de citotoxicidad se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar Telstar modelo Mini-V/PCR, se utilizó una centrifuga SOL-BAT modelo J-600 y una incubadora de  $\text{CO}_2$  LabLine modelo 490.



Los cultivos celulares se llevaron a cabo en placas de 96 pozos marca Costar, las cuales se leyeron en un espectrofotómetro Labsystems Multiskan MS, modelo 325.

Los compuestos sintetizados que se ocuparon para llevar a cabo las pruebas biológicas se pesaron en una Balanza Analítica Sartorius Serie M-Power AZ214.

Se utilizó el microscopio invertido IROSCOPE modelo S1-PH y el microscopio óptico IROSCOPE modelo WB-3.

Se utilizaron micropipetas de 200 y 1000  $\mu$ L y una pipeta multicanal de 5-100  $\mu$ L marca BIOHIT.

#### TUNEL

Los cultivos celulares se realizaron en laminillas electrocargadas, se utilizaron los instrumentos mencionados anteriormente para realizar cultivo celular.

Estos equipos se encuentran en el Laboratorio de Cultivo Celular, en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

#### CITOMETRIA DE FLUJO

Se utilizó el equipo FACScan de Beckton-Dickinson, de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

### 6.3 MÉTODO DE SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN

Un compuesto de coordinación se forma a partir de un ligante y un átomo central. El ligante es una molécula que tiene uno o más átomos capaces de donar un par de electrones, por lo que actúa como una base de Lewis mientras el átomo central es un ion metálico con orbitales vacíos capaces de aceptar pares de electrones y puede actuar como base de Lewis. La interacción entre el ligante y el ion metálico lleva a la formación de un enlace covalente coordinado.

En este caso para llevar a cabo la formación del compuesto de coordinación, el ligante es el albendazol (abz) debido a que tiene dos átomos que son donadores de pares de electrones libres: el nitrógeno imidazólico y el oxígeno del grupo carbamato y los iones metálicos son el cobre(II) y el zinc(II). La reacción general de síntesis para los compuestos de coordinación es la siguiente:

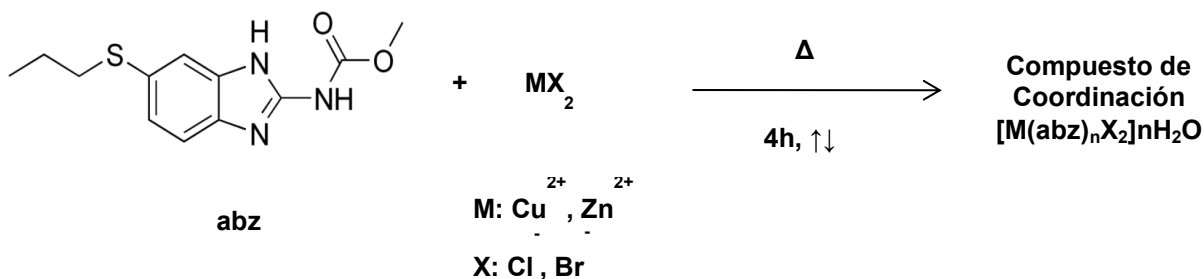


Figura 6.1. Método general de síntesis de los compuestos de coordinación.

A continuación se describen los compuestos de coordinación que se obtuvieron.

- (1)  $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2]\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  Se disolvieron 0.1326 g del ligante abz (0.5 mmol) en acetato de etilo (10 mL) en caliente, por otro lado se disolvieron 0.0824 g de  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.5 mmol) en 10 mL de etanol. Una vez que ambos estuvieron disueltos, se adicionó la solución de la sal metálica a la del ligante, se dejó en reflujo por aproximadamente 4 horas. Se observó la formación de un precipitado color verde seco, el cual se filtró al vacío. Rendimiento 30.16%. Análisis elemental (Encontrado: %C, 36.58; %H, 3.86; %N, 10.42;. Calculado para la fórmula mínima  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2\text{Cl}_2\text{Cu}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : %C, 36.43; %H, 5.60; %N, 10.62).
- (2)  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2]\cdot \text{H}_2\text{O}$  Se disolvieron 0.1327 g del ligante abz (0.5 mmol) en acetato de etilo (10 mL) en caliente, por otro lado se disolvieron 0.1116 g de  $\text{CuBr}_2$  (0.5 mmol) en 10 mL de etanol. Una vez que ambos estuvieron disueltos, se adicionó la solución de la sal metálica a la del ligante, se dejó en reflujo por aproximadamente 4 horas. Se observó la formación de un precipitado color café oscuro, el cual se filtró al vacío. Rendimiento 40.77%. Análisis elemental (Encontrado: %C, 28.20; %H, 2.83; %N, 8.37. Calculado para la fórmula mínima  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{SBr}_2\text{Cu}\cdot \text{H}_2\text{O}$ : %C, 28.44; %H, 3.38%; N, 8.29).
- (3)  $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Cl}_2]\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$  .Se disolvieron 0.1328 g del ligante abz (0.5 mmol) en acetato de etilo (10 mL) en caliente, por otro lado se disolvieron 0.0680 g de  $\text{ZnCl}_2$  (0.5 mmol) en 10 mL de etanol. Una vez que ambos estuvieron disueltos, se adicionó la solución de la sal metálica a la del ligante, se dejó en reflujo por aproximadamente 4 horas. Se observó la formación de un precipitado color blanco, el cual se filtró al vacío. Rendimiento 31.06%. Análisis elemental (Encontrado: %C, 41.59; %H, 4.16; %N, 12.12. Calculado para la fórmula mínima  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2\text{Cl}_2\text{Zn}\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ : %C, 41.54; %H, 4.79; %N, 12.11).

(4)  $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Br}_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$  Se disolvieron 0.1326 g del ligante abz (0.5 mmol) en acetato de etilo (10 mL) en caliente, por otro lado se disolvieron 0.1127 g de  $\text{ZnBr}_2$  (0.5 mmol) en 10 mL de etanol. Una vez que ambos estuvieron disueltos, se adicionó la solución de la sal metálica a la del ligante, se dejó en reflujo por aproximadamente 4 horas. Se observó la formación de un precipitado color blanco, el cual se filtró al vacío. Rendimiento 29.86%. Análisis elemental (Encontrado: %C, 37.54; %H, 3.79; %N, 11.04. Calculado para la fórmula mínima  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2\text{Br}_2\text{Zn} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ : %C, 37.68; %H, 4.08; %N, 10.99).

## 6.4 PRUEBAS BIOLÓGICAS

### a) Líneas celulares

Las líneas celulares que se utilizaron para llevar a cabo este trabajo fueron proporcionadas por la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) en el conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, en donde también se llevaron a cabo los experimentos de citotoxicidad y apoptosis. Las líneas celulares son las siguientes:

- ✓ HeLa
- ✓ PC-3
- ✓ MCF7
- ✓ HCT-15

Estas líneas celulares se conservaron de acuerdo al ATCC.

### b) Técnica de proliferación celular.

La descongelación de las células se llevó a cabo en la campana de flujo laminar. Las células se encontraban en un criotubo con DMSO y Suero Fetal Bovino. El contenido del criotubo se vertió en un tubo para centrifuga de 15 mL que contenía 9 mL de PBS.

Este tubo se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se aspiró en sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio DMEM suplementado.

Posteriormente se llevó a cabo el conteo celular de células viables utilizando la cámara de Neubauer y el colorante Azul Tripano. Se sembraron  $3 \times 10^5$  células viables en cajas de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> con 5 mL de DMEM suplementado y

se incubaron bajo una atmósfera húmeda a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Cambiando el medio cada 48 horas hasta que el cultivo llegó a confluencia.

c) Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad es un ensayo que se realiza para saber la toxicidad de los compuestos sintetizados en las células, sin embargo, no define un mecanismo de muerte celular específica.

El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo en placas de 96 pozos, en las cuales se sembraron  $2 \times 10^4$  células en cada pozo, los cuales contenían 100 µL de medio de cultivo DMEM suplementado, estas células se dejaron proliferando durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se cambió el medio y se adicionaron los compuestos de coordinación a las siguientes concentraciones finales: 0.01, 0.1, 1 y 10 µg/mL, se dejaron incubando por 24 horas en la incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se pesó un miligramo de los compuestos de coordinación sintetizados y se disolvieron en 200 µL de DMSO, se llevaron a cabo las diluciones en agua estéril para preparar las concentraciones mencionadas anteriormente. Después de las 24 horas de exposición a los compuestos, se aspiró el medio y se fijaron las células con 100 µL de ácido tricloroacético al 10% durante una hora en refrigeración (4°C). Al término del tiempo de fijación, se lavaron los pozos de las placas con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se llevó a cabo la tinción con sulforrodamina B.

d) Tinción con sulforrodamina B (SRB)

La sulforrodamina B es un colorante aminoxantano rosa brillante con dos grupos sulfónicos, los cuales se unen a los residuos de aminoácidos básicos bajo condiciones ligeramente ácidas y se disocian bajo condiciones básicas<sup>1-2</sup>. La unión de la SRB a las células es estequiométrica, por lo que la cantidad de colorante extraído de las células teñidas es directamente proporcional a la cantidad de

células, por lo tanto al teñir las células fijadas y posteriormente leer la absorbancia se puede conocer el porcentaje de células que estaban vivas al momento de la fijación y saber el porcentaje de células que murió con la exposición de los compuestos, es decir, la citotoxicidad. A continuación se describe como se realizó la tinción de las células con SRB.

Las células se tiñeron con sulforrodamina B (SRB) al 0.4% (preparada en ácido acético al 1%) durante 30 minutos. Se lavaron los pozos de las placas con ácido acético al 1% y se dejó secar a temperatura ambiente. Se solubilizó el colorante con 100 L de Tris-base 10mM (pH 10.5) durante 5 minutos con agitación suave. El colorante se leyó en el espectrofotómetro a 564 nm.

e) Reacción de TUNEL (TdT-mediated X-dUTP-biotin nick end labeling)

El ensayo de TUNEL permite determinar la fragmentación del ADN en nucleótidos de 180-200 pb, mediante a unión de una base marcada con peroxidasa por la desoxinucleotidil transferasa en los extremos 3'OH libres, la cual se revela mediante una reacción enzimática de peroxidasa con DAB.

El cultivo celular se realizó en las laminillas electrocargadas con poli L-lisina, las cuales fueron fijadas con una mezcla de 95 mL de alcohol etílico, 5 mL de ácido acético y 5 mL de agua destilada durante 30 minutos.

Después de la fijación, se llevó a cabo la hidratación de las laminillas sumergiéndolas en alcohol etílico a diferentes concentraciones (100%, 96%, 70%, 50%) y agua destilada.

Posteriormente se hizo la recuperación antigénica empleando citrato de sodio 0.1M, pH 6, en olla de presión a 121°C, 15lb, por 10 minutos.

Por otra parte se preparó la reacción de TUNEL ó de acuerdo a la instrucciones del kit *In Situ Cell Death Detection Kit, POD* de ROCHE.

Se mezclaron 50  $\mu$ L del vial 1, solución enzimática (TdT, Desoxinucleotidil transferasa terminal de timo de ternera recombinante en *E.coli*, en buffer de almacenamiento, concentración 10X) y 450  $\mu$ L del vial 2, solución de marcaje (mezcla de nucleótidos en buffer, concentración 1X).

Se adicionaron 50  $\mu$ L la reacción de TUNEL cubriendo las células en su totalidad y se incubó a 37°C durante 60 minutos en cámara húmeda y en la oscuridad.

Se lavaron las laminillas con Tris buffer-Tween 20 a pH 7.2-7.6 durante 5 minutos, posteriormente se agregó el convertidor POD (enzima peroxidasa) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

Se lavaron las laminillas una vez más con tris buffer-Tween 20, pH 7.2-7.6 por 5 minutos y después se adicionó la solución de sustrato (Diaminobencidina), se dejaron secar y se realizó el análisis en el microscopio de luz.

En el microscopio de luz se observan células con núcleos teñidos de color marrón, estas células son las positivas a la reacción de TUNEL, los resultados se miden en porcentaje de células positivas por campo.

#### f) Citometría de flujo

La técnica de citometría de flujo consiste en hacer pasar una suspensión celular en el citómetro y este permite que las células pasen en fila dentro de un flujo a través del aparato, esto permite hacer mediciones de características físicas de una sola célula.

En este caso En las etapas tempranas de la apoptosis ocurren cambios en la membrana, una de esas alteraciones de la membrana plasmática es la translocación de la fosfatidilserina de la parte interna a la parte externa de la membrana plasmática, por lo que la fosfatidilserina se expone en la superficie externa de la célula. La anexina V es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina en presencia de calcio.



Se llevó a cabo el cultivo celular en placas de 96 pozos con la línea celular HeLa, las células fueron expuestas al tratamiento con los compuestos de cobre(II) y cisplatino como control positivo y células sin tratamiento como control negativo, las concentraciones de los compuestos fueron 1 µg/mL y 10 µg/mL.

A las 24 horas de exposición al tratamiento, las células que se encontraban en el sobrenadante se aspiraron con una micropipeta y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, las células adheridas a la placa fueron desprendidas con una solución de PBS-EDTA, una vez desprendidas se colocaron en un tubo para citómetro y se juntaron con el botón que se obtuvo de la centrifugación.

Se les agregó 100µL de la solución previamente preparada del Kit ANNEXIN- V-FLUOS Staining Kit por  $1 \times 10^6$  células, esta solución contenía 20 µL Annexin-V-Fluos, 1mL de buffer y 20 µL de IP (Ioduro de Propidio). Las células se dejaron en incubación durante 15 minutos en la oscuridad y posteriormente se leyeron las muestras en un citómetro FACScan.

Para realizar la captura de resultados se consideraron 10,000 eventos totales de la suspensión celular conservando un control sin tinción y uno de cada marcaje (IP, Anexina V). La cuantificación del porcentaje de células apoptóticas se obtuvo directamente de los Dot Plots con el programa Flow Jo versión 7.6.2. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Excel 2010.

#### Referencias:

1. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R., J, *Nature Institute* 82 (1990) 1107-1112).
2. Lillie R.H.J., *Conn's Biological Stains*, 9 (1997).

# *RESULTADOS* 7

---

*7.1 Caracterización de los compuestos de coordinación*

*7.2 Pruebas biológicas*

# Caracterización de los compuestos de coordinación

## 7.1

---

### 7.1.1 Caracterización química de los compuestos de coordinación

Se obtuvieron cuatro compuestos de coordinación, dos de cobre(II) y dos de zinc(II), cuyos análisis elementales concuerdan con las fórmulas propuestas, los resultados de los análisis elementales se muestran en la tabla 7.1.

Tabla 7.1. Análisis elementales de los compuestos de coordinación.

Compuesto	Calculado/Encontrado		
	%C	% H	%N
(1) $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	36.43/36.58	5.60/3.86	10.62/10.42
(2) $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$	28.44/28.20	3.38/2.83	8.29/8.37
(3) $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$	41.54/41.59	4.79/4.19	12.11/12.12
(4) $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Br}_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$	37.68/37.54	4.08/3.79	10.99/11.04

A continuación se presenta la caracterización de los compuestos obtenidos mediante diferentes técnicas espectroscópicas.

7.1.2 Compuestos de coordinación sintetizados a partir del  
ligante abz y el ion metálico cobre(II)

1) Compuesto  $[Cu(abz)_2Cl_2] \cdot 7H_2O$

Se sintetizaron dos compuestos de coordinación con el ion metálico cobre(II), el primero se obtuvo a partir de la sal metálica  $CuCl_2$  y el ligante abz, el cual es un compuesto de color verde seco con punto de descomposición de  $200^\circ C$ .

A continuación se muestra el espectro de I.R. de este compuesto en el cual, las bandas correspondientes a las vibraciones  $\nu(COO)$ ,  $\nu(C=N)$ ,  $\nu(C-N)$  son las de mayor interés debido a que nos indican su participación en la coordinación del ligante al centro metálico.

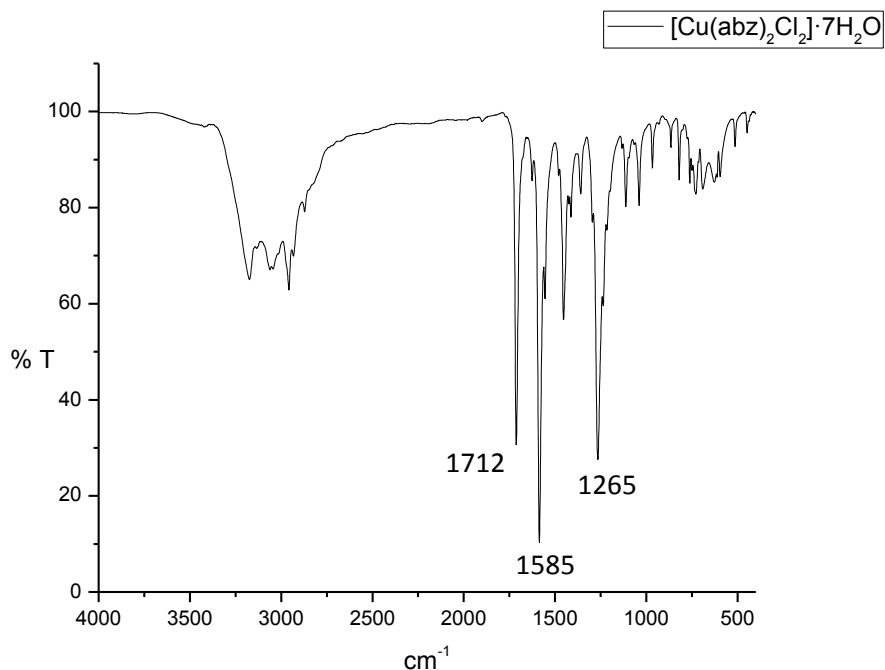


Fig. 7.1 Espectro de I.R. del compuesto  $[Cu(abz)_2Cl_2] \cdot 7H_2O$

La vibración correspondiente al grupo carbamato  $\nu(\text{COO})$  que se encuentra en  $1712 \text{ cm}^{-1}$  indica que no participa en la coordinación con el centro metálico, por otro lado se observa que las bandas correspondientes a las vibraciones  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ,  $\nu(\text{C}-\text{N})$  muestran un ligero desplazamiento con respecto a las del ligante, lo cual indica que el ion metálico se encuentra coordinado al ligante por el nitrógeno imidazólico.

Tabla. 7.2 Vibraciones en el espectro de IR del compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Vibración	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	abz	$\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
$\nu(\text{COO})$	1711	1712
$\nu(\text{C}=\text{N})$	1586	1585
$\nu(\text{C}-\text{N})$	1264	1265

El espectro electrónico UV-Vis-NIR, muestra una banda centrada en  $12\,500 \text{ cm}^{-1}$ , la cual es una banda característica para el ion metálico cobre(II) que presenta una geometría tetraédrica debida a la transición  ${}^2\text{E} \leftarrow {}^2\text{T}_2$ , por lo que se propone que el compuesto presenta dicha geometría. El espectro electrónico UV-Vis-NIR se determinó en estado sólido se muestra a continuación.

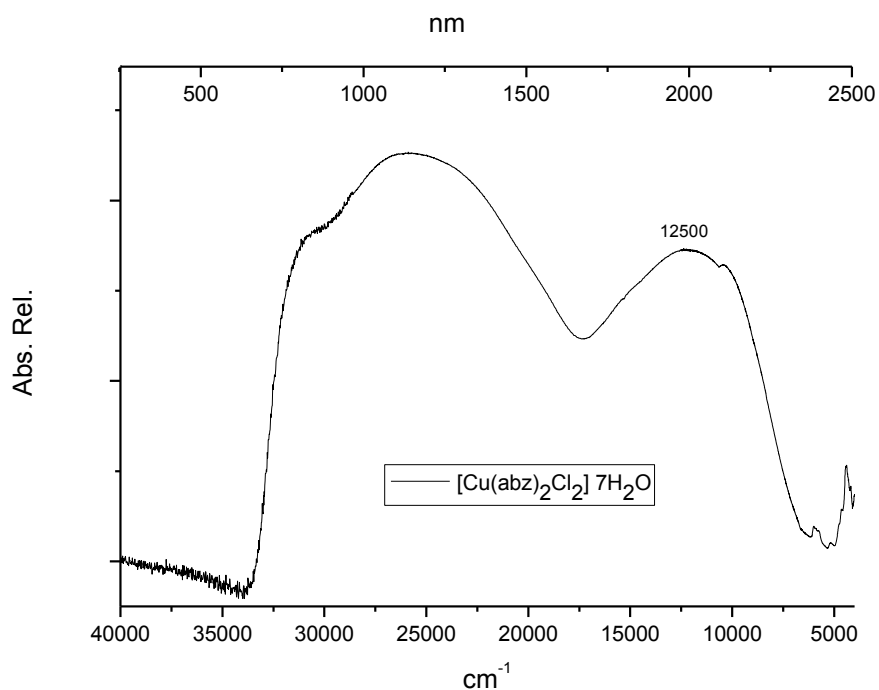


Fig. 7.2 Espectro electrónico UV-Vis-NIR del compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Por otro lado se determinó la conductividad eléctrica del compuesto en una disolución de etanol a  $25.5^\circ\text{C}$ , y se obtuvo un valor de  $27\mu\text{S}$  que de acuerdo a los valores reportados en la literatura corresponde a un no electrolito; por lo que se propone que los dos cloros se encuentran dentro de la esfera de coordinación.

De acuerdo con este resultado, los espectros de I.R. y UV-Vis-NIR y el análisis elemental; se propone que el ion metálico cobre(II) estabiliza una geometría tetraédrica y se encuentra coordinado a dos ligantes abz de manera monodentada por medio del nitrógeno imidazólico y a dos cloros, lo cual corresponde a la fórmula mínima del compuesto es  $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y a continuación se presenta la estructura propuesta.

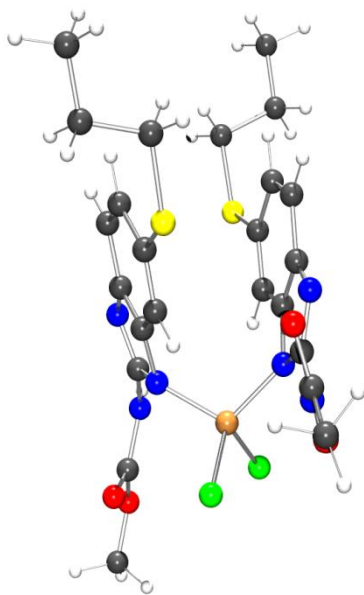


Fig. 7.3 Estructura propuesta para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

2) Compuesto  $[Cu(abz)Br_2] \cdot 2H_2O$

Este compuesto obtenido con el ion metálico cobre(II) corresponde al que se sintetizó a partir del ligante abz y la sal metálica  $CuBr_2$ , este compuesto presentó un color gris y un punto de descomposición de  $210\text{ }^\circ\text{C}$ .

El espectro de I.R. de este compuesto se muestra en la figura 7.4, en el cual se observa un desplazamiento en la banda correspondientes a la vibración  $\nu(\text{COO})$  se desplaza de  $1712$  a  $1661\text{ cm}^{-1}$  lo que indica que este grupo sí tiene un enlace con el ion metálico por lo que presenta un menor carácter de doble enlace ya que el oxígeno está donando su par de electrones al ion metálico.

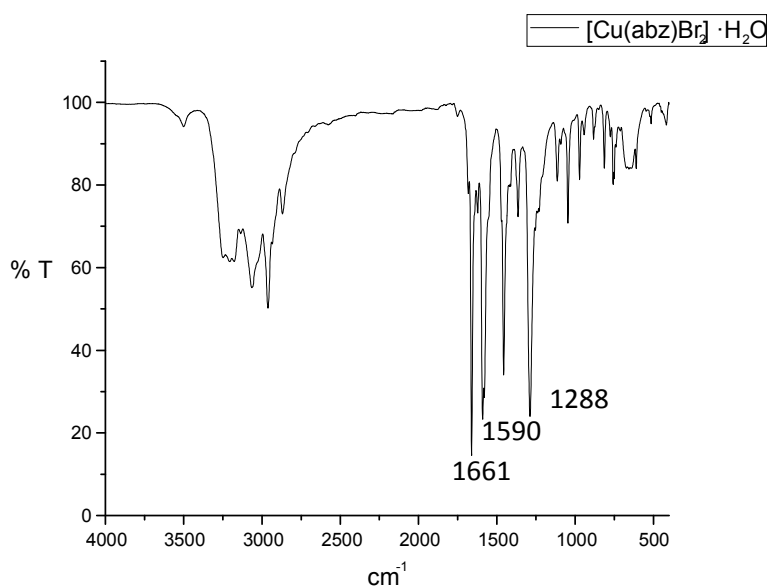


Fig. 7.4 Espectro de I.R. del compuesto  $[Cu(abz)Br_2] \cdot H_2O$

También se observa que hay un desplazamiento en las vibraciones  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ,  $\nu(\text{C}-\text{N})$ , lo que indica que el ligante se está coordinando al ion metálico por medio del nitrógeno imidazólico como en el caso anterior, por lo que se propone que el



ligante está coordinado al ion metálico de manera bidentada por medio del nitrógeno imidazólico y el oxígeno del grupo carbonilo.

Tabla. 7.3 Vibraciones en el espectro de I.R. del compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$

Vibración	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	abz	$\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
$\nu(\text{COO})$	1711	1661
$\nu(\text{C}=\text{N})$	1586	1590
$\nu(\text{C}-\text{N})$	1264	1288

En el espectro electrónico de UV-Vis-NIR se observa una banda muy ancha y desdoblada que indica que el compuesto presenta una geometría tetraédrica muy distorsionada, en la cual se lleva a cabo la pérdida de la degeneración de los orbitales  $t_2$  y  $e$ , que da lugar a transiciones electrónicas entre diferentes orbitales, los cuales generan que se observan en el espectro electrónico.

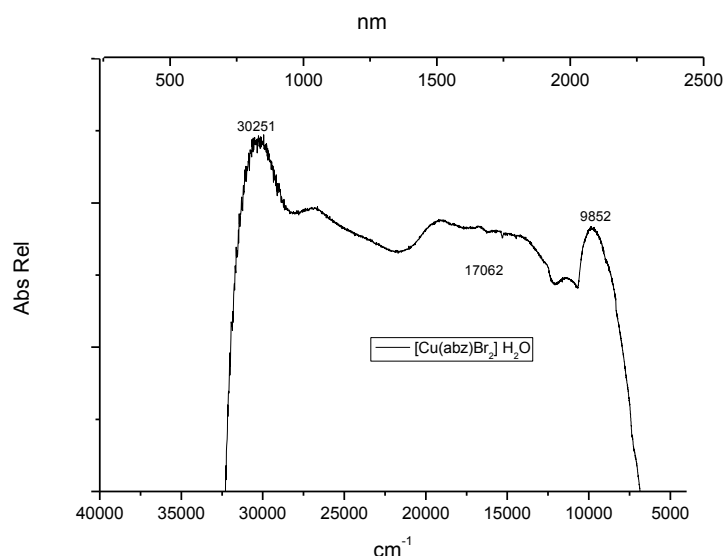


Fig. 7.5 Espectro electrónico UV-Vis-NIR del compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ .

De acuerdo con todos los resultados obtenidos, se propone que el ion metálico está coordinado de manera bidentada a un ligante abz y a dos bromos, por lo que se propone que se estabiliza una estructura tetraédrica distorsionada alrededor del ion metálico y la estructura propuesta es la siguiente.

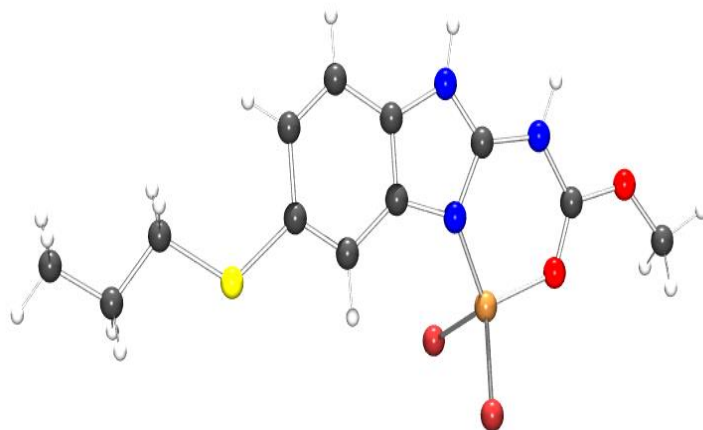


Fig. 7.6 Estructura propuesta para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$

7.1.3 Compuestos de coordinación sintetizados a partir del  
ligante abz y el ion metálico zinc(II)

3) Compuesto  $[Zn(abz)_2Cl_2] \cdot 1.5H_2O$

Se obtuvieron dos compuestos de coordinación con el ion metálico  $Zn^{2+}$ , el primero se sintetizó con el ligante abz y la sal metálica  $ZnCl_2$ , obteniéndose un polvo de color blanco con punto de fusión de  $170^\circ C$ .

A continuación se muestra el espectro de I.R. de este compuesto en el cual se observa que las bandas de vibración correspondientes a los grupos funcionales  $\nu(COO)$ ,  $\nu(C=N)$ ,  $\nu(C-N)$  se desplazan con respecto a las del ligante, lo cual indica que el ion metálico se encuentra coordinado al ligante por el nitrógeno imidazólico.

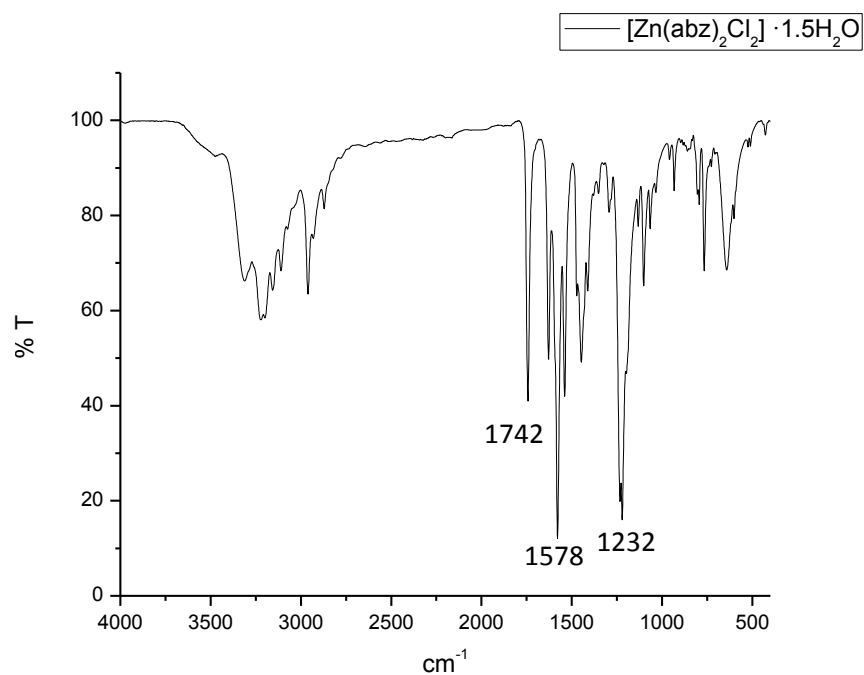


Fig. 7.7 Espectro de I.R. del compuesto  $[Zn(abz)_2Cl_2] \cdot 1.5H_2O$

Tabla. 7.4 Vibraciones en el espectro de I.R. del compuesto  $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$

Vibración	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	abz	$[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$
$\nu(\text{COO})$	1711	1742
$\nu(\text{C}=\text{N})$	1586	1578
$\nu(\text{C}-\text{N})$	1264	1232

Por otro lado se determinó la conductividad eléctrica del compuesto en disolución en etanol y se obtuvo un valor de  $6\mu\text{S}$  a  $25.5^\circ\text{C}$ , lo que nos indica que el compuesto es un no electrolito; de acuerdo con este resultado y con el análisis elemental se propone que la fórmula mínima es  $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ .

Se propone que en este compuesto el ion metálico  $\text{Zn}^{2+}$  presenta geometría tetraédrica, por lo tanto al ion metálico se encuentran coordinado a dos ligantes y dos cloros, la estructura que se propone es la siguiente:

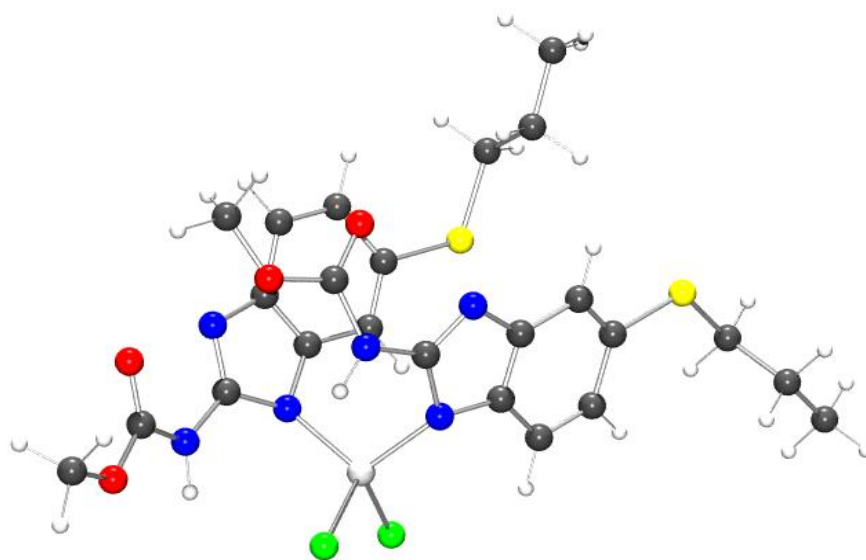


Figura 7.8 Estructura propuesta para el compuesto  $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ .

4) Compuesto  $[Zn(abz)_2Br_2] \cdot 0.5H_2O$

El segundo compuesto de coordinación que se obtuvo fue a partir de la sal  $ZnBr_2$  y el ligante abz cuyo análisis elemental se encuentra en la tabla 1. Este compuesto también fue un polvo de color blanco con punto de fusión  $210^\circ C$ .

El espectro de I.R. de este compuesto se presenta a continuación, así como las bandas que presentaron desplazamientos importantes con respecto al ligante. Se observa que al igual que el compuesto anterior, las bandas de vibración correspondientes a los grupos funcionales  $\nu(COO)$ ,  $\nu(C=N)$ ,  $\nu(C-N)$  se desplazan con respecto a las del ligante, lo cual indica que también en este compuesto el ion metálico se encuentra coordinado al ligante por el nitrógeno imidazólico.

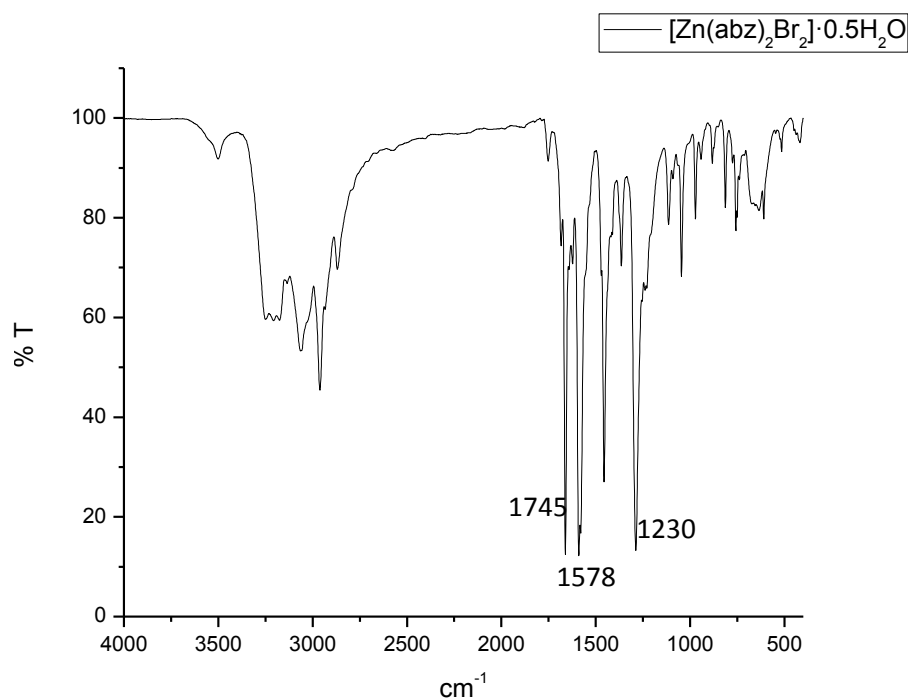


Fig. 7.9 Espectro de I.R. del compuesto  $[Zn(abz)_2Br_2] \cdot 0.5H_2O$

Tabla. 7.5 Vibraciones en el espectro de I.R. del compuesto  $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Br}_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$

Vibración	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	Abz	$[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Br}_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$
$\nu(\text{COO})$	1711	1745
$\nu(\text{C}=\text{N})$	1586	1578
$\nu(\text{C}-\text{N})$	1264	1230

También se midió la conductividad eléctrica de este compuesto utilizando etanol como disolvente y la conductividad fue de  $1\mu\text{S}$  a  $24.5^\circ\text{C}$ , por lo que este compuesto de acuerdo a la tabla 7.3 corresponde a un compuesto no electrolito.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se propone que el compuesto presenta una geometría tetraédrica en donde el ion metálico zinc(II) se encuentra coordinado a dos ligantes por medio del nitrógeno imidazólico y a dos bromos. La estructura propuesta es la siguiente.

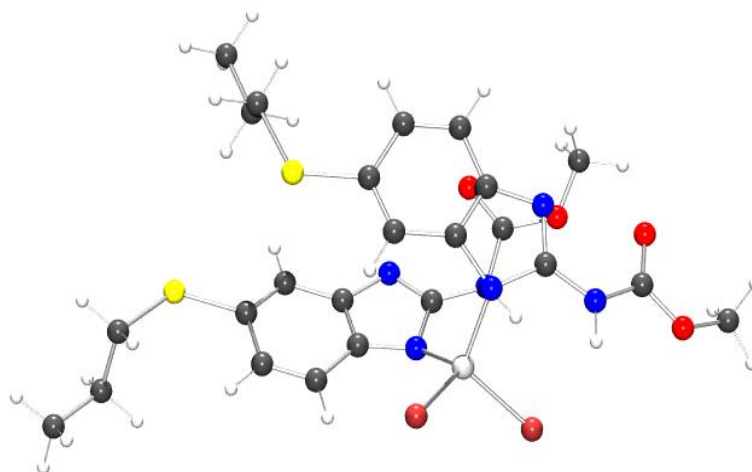


Fig. 7.10 Estructura propuesta para el compuesto  $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Br}_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$

# *Pruebas biológicas* 7.2

---

## 7.2.1 Citotoxicidad

Para determinar la actividad biológica en las líneas celulares de los compuestos de coordinación sintetizados se realizaron las pruebas de citotoxicidad en las cuales se determina el porcentaje de viabilidad celular de las líneas celulares después de ser expuestas a los compuestos de coordinación.

A continuación se muestran las gráficas de los resultados de los experimentos de citotoxicidad en las líneas celulares HeLa, PC-3, MCF-7 y HCT-15 (Fig. 7.2.1), se probaron los cuatro compuestos sintetizados, el ligante abz y el cisplatino como control positivo. El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo por el método de tinción con Sulforrodamina B (SRB).

Las concentraciones de cada uno de los compuestos 0.01µg/mL, 0.1µg/mL, 1µg/mL y 10 µg/mL a 24 horas. En donde los compuestos 1, 2, 3 y 4 corresponden a lo siguiente:

Tabla 7.2.1 Número correspondiente de cada compuesto en la figura 7.2.1.

Número	Compuesto
→ 1	$[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
→ 2	$[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$
→ 3	$[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$
→ 4	$[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Br}_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$

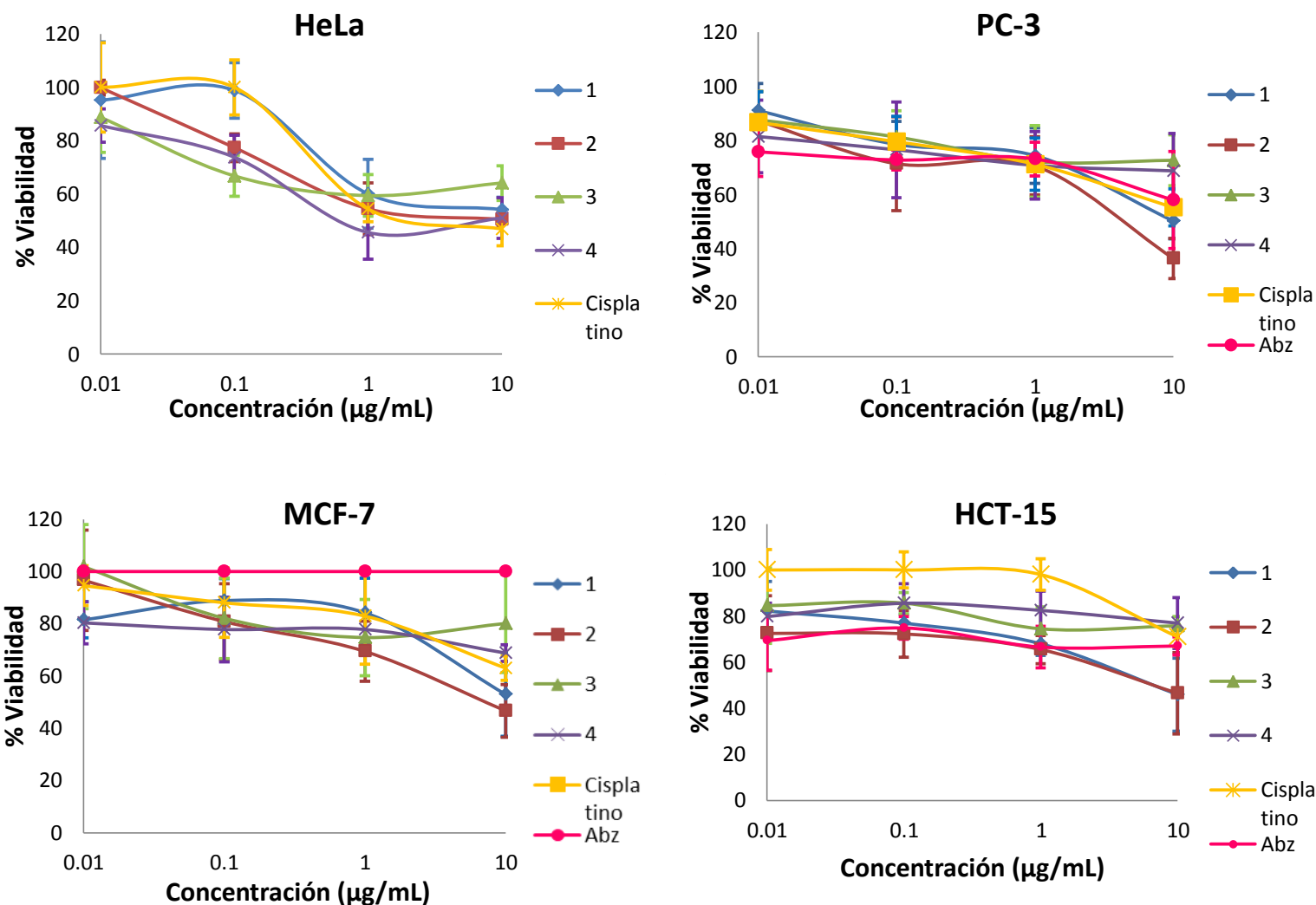


Fig. 7.2.1 Porcentaje de proliferación celular de las líneas celulares HeLa, PC-3, MCF-7 y HCT-15 expuestas a los compuestos de coordinación a 24 horas. La línea azul corresponde al compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , la línea roja al compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ , la línea verde a  $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ , la violeta a  $[\text{Zn}(\text{abz})_2\text{Br}_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ , la amarilla al cisplatino y finalmente la rosa al ligante albendazol (abz).



El ensayo de citotoxicidad muestra la capacidad que tiene cada uno de los compuestos de inhibir la proliferación de las células y provocar su muerte, en las gráficas se muestra el resultado que presentaron los compuestos para cada línea celular así como la desviación estándar, es importante mencionar que a mayor concentración del tratamiento se obtiene una desviación estándar menor. Las tablas con los resultados de cada una de las concentraciones se muestran en los Anexos.

En las gráficas se observa que en general todos los compuestos presentan actividad en todas las líneas celulares, sin embargo; los compuestos de coordinación con ion metálico cobre(II) son lo que tienen mayor inducción de citotoxicidad, siendo el compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  (2) el más activo en todas las líneas.

Se puede observar que el resultado del porcentaje de viabilidad que presentan los dos compuestos de coordinación con el ion metálico cobre(II) es semejante al del compuesto Cisplatino, el cual es usado como control positivo, esto potencialmente originado por el centro metálico. En el caso del compuesto es el compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2]\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1) es el que presenta la actividad más cercana a la del Cisplatino.

El ligante abz fue probado en las líneas celulares PC-3, MCF-7 y HCT-15 y solamente presentó actividad biológica en las líneas celulares PC-3 y HCT-15, ya que en la línea celular MCF-7 el ligante abz fue inactivo. La actividad que presenta el ligante en las líneas celulares es menor que la de los compuestos de coordinación sintetizados con los iones metálicos, por lo que se puede atribuir la actividad biológica a los compuestos de coordinación y no solamente al ligante.

A partir de estos resultados se determinó la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) de cada uno de los compuestos con diferente línea celular, este cálculo se llevó a cabo con la prueba de Probit en el programa IBM SPSS Statistics 21 (anexo 2). Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 7.2.2  $CI_{50}$  de los compuestos de coordinación sintetizados.

Concentración inhibitoria 50 de los compuestos de coordinación evaluados en cuatro líneas celulares ( $CI_{50}$ ).								
Compuesto	HeLa		PC3		MCF-7		HCT-15	
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{M}$
<b>[Cu(abz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<math>\cdot</math>7H<sub>2</sub>O</b>	7.07	8.93	9.75	12.32	36.11	45.63	9.62	12.15
<b>[Cu(abz)Br<sub>2</sub>]<math>\cdot</math>H<sub>2</sub>O</b>	4.40	8.68	3.58	7.06	6.21	12.03	13.54	26.72
<b>[Zn(abz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<math>\cdot</math>1.5H<sub>2</sub>O</b>	90.35	130.19	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>[Zn(abz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]<math>\cdot</math>0.5H<sub>2</sub>O</b>	12.54	16.39	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>Cisplatino</b>	3.061	10.16	33.63	111.69	84.50	280.64	>100	>100
<b>abz</b>	ND	ND	>100	>100	Sin Actividad	-	>100	>100

En la tabla 7.2.2 se muestran las  $CI_{50}$  de los compuestos de coordinación sintetizados, el cisplatino y el abz para cada una de las líneas celulares, se observa que las  $CI_{50}$  más bajas son las que corresponden a los compuestos con el centro metálico cobre(II), en especial el compuesto (2)  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ , la concentración inhibitoria  $CI_{50}$  es la cantidad de compuesto que se necesita para inhibir el 50% del crecimiento celular por lo que mientras menor sea el valor de  $CI_{50}$ , el compuesto es más efectivo, en este caso se puede concluir que los compuestos de ion metálico cobre(II) son más efectivos, siendo el compuesto (2)  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  el más efectivo en todas las líneas celulares .

Los compuestos presentan actividad citotóxica en las líneas celulares utilizadas, sin embargo, con el objetivo de elucidar el tipo de muerte celular que presentan las células se realizaron ensayos de Citometría de Flujo y la técnica de TUNEL.

### 7.2.2 Apoptosis

La muerte celular por apoptosis es uno de los mecanismos deseable en el tratamiento quimioterapéutico de células tumorales, ya que las células se programan durante el inicio de la fase S del ciclo celular para su eliminación. La apoptosis se caracteriza por una serie de características morfológicas como la fragmentación internucleosomal del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos y la rápida fagocitosis por las células vecinas *in vivo*<sup>1</sup>. El ensayo de TUNEL nos permite determinar la fragmentación del ADN en nucleótidos de 180-200 pb<sup>2</sup> mediante la unión de una base marcada con peroxidasa por la desoxinucleotidil transferasa del kit en los extremos 3'OH libres, la cual revela mediante una reacción enzimática de peroxidasa con DAB<sup>3</sup>. Los porcentajes fueron determinados mediante la observación de 3 campos independientes en cada portaobjetos, de cada uno los tratamientos por triplicado, obteniendo los resultados que se muestra en la tabla 7.2.2. A continuación se muestran micrografías representativas del ensayo de TUNEL (Fig. 7.2.2) a un objetivo 40X, adquiridas con el microscopio óptico (Figuras 7.2.3 y 7.2.3), en las cuales se observan células que presentaron positividad en color marrón, mientras que las que no presentaron positividad se observan en color azul.

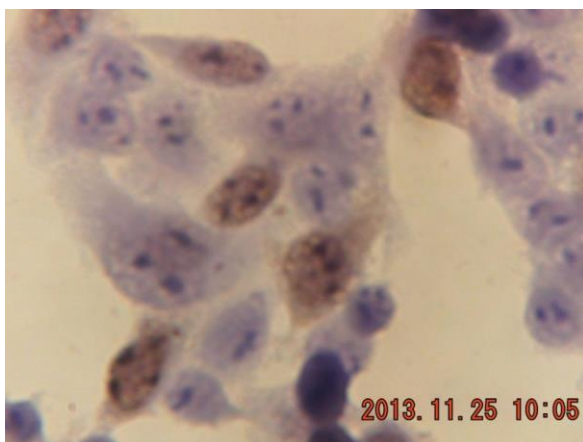


Fig. 7.2.3. Micrografía reacción TUNEL, compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  en la línea celular PC-3, 40X.

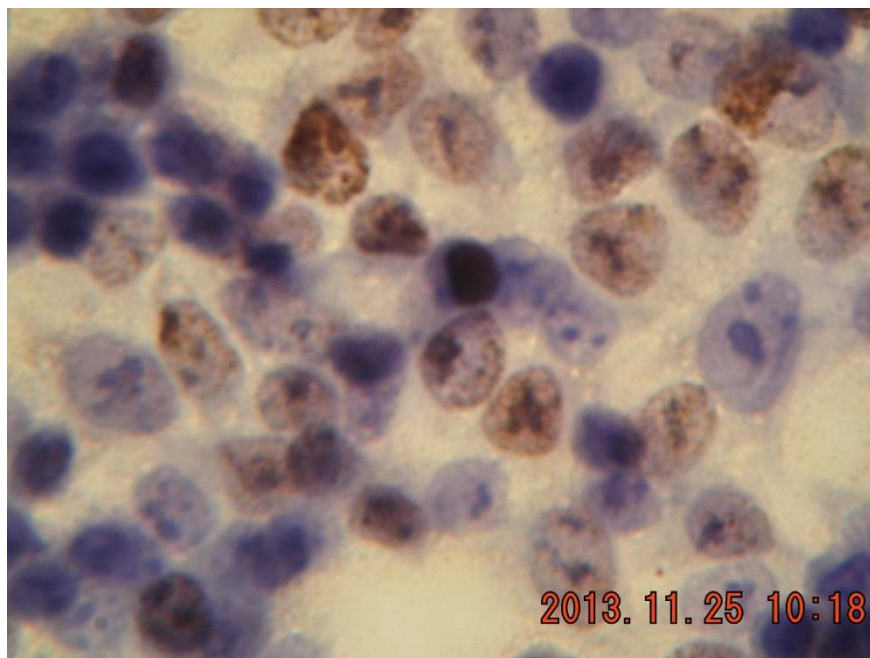


Fig. 7.2.4. Micrografía reacción de TUNEL, compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  en la línea celular HeLa, 40X.

En la tabla 7.2.3 se muestran los porcentajes de muerte celular por apoptosis que presentaron las distintas líneas celulares en las que se trabajaron, se observa que la apoptosis ocurre en mayor porcentaje en las líneas celulares PC-3 y MCF-7 con el compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  (2), siendo el porcentaje de apoptosis más elevado en la concentración 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (PC-3= 50-60% y MCF-7= 50%) esto debido a que se observa que estas líneas celulares presentan mayor sensibilidad a estos compuestos, si comparamos el cisplatino con ese compuesto en la concentración de 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , el porcentaje de apoptosis es diferente (PC-3= 30% y MCF-7= 40%), en este caso se observa que es mayor en el caso del compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  (2).

Se observa que el porcentaje de apoptosis se incrementa cuando aumenta la concentración de los compuestos probados y posteriormente el porcentaje va

disminuyendo, se propone que a bajas concentraciones de los compuestos de coordinación las células presentan genotoxicidad y se activa la muerte celular por apoptosis y por otro lado, cuando se aumenta la concentración de los compuestos de coordinación las células presentan tanto genotoxicidad como citotoxicidad, esta última debido al exceso de compuesto en la célula, para probar esto es necesario hacer más experimentos.

Tabla 7.2.3 Porcentaje de apoptosis por la reacción de TUNEL

Porcentajes de Apoptosis								
(1) [Cu(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]·7H <sub>2</sub> O								
Línea Celular	Blanco		0.1 µg/mL		1 µg/mL		10 µg/MI	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
HeLa	10%	90%	30%	70%	20%	80%	10%	90%
PC-3	20%	80%	30%	70%	30%	70%	30%	70%
MCF-7	20%	80%	40-50%	60-60%	20%	80%	10%	90%
HCT-15	10%	90%	20%	80%	20%	80%	10%	90%
(2) [Cu(abz)Br <sub>2</sub> ]·H <sub>2</sub> O								
HeLa	10-15%	85-90%	30-35%	65-70%	40%	60%	15%	85%
PC-3	50%	50%	50-60%	50-40%	40%	60%	30%	70%
MCF-7	30%	70%	50%	50%	40%	60%	30%	70%
HCT-15	10%	90%	30%	70%	20%	80%	10%	90%
Cisplatino								
HeLa	10%	90%	20%	80%	30%	70%	40%	60%
PC-3	20%	80%	30%	70%	30%	70%	40%	60%
MCF-7	30%	70%	40%	60%	40%	60%	50%	50%
HCT-15	10%	90%	30%	70%	30%	70%	40%	60%

Con la finalidad de corroborar sí el mecanismo de muerte celular es por apoptosis, se empleó la técnica de citometría de flujo, marcando con Anexina V y Yoduro de Propidio a dos de las poblaciones celulares que presentaron mejor respuesta a los compuestos de acuerdo a los valores de  $CI_{50}$ .

La Anexina V es una proteína que se une a la fosfatidilserina de la membrana celular cuando esta se encuentra expuesta debido a un proceso de muerte celular por apoptosis<sup>3</sup>, por otro lado el Ioduro de Propidio es un compuesto que se une al ADN y se utiliza para medir los índices de mortalidad celular basado en la exclusión de este compuesto según la integridad de la membrana.

En la siguiente gráfica se presentan los porcentajes que fueron adquiridos directamente de los Dot Plots del programa Flow Jo, considerando el porcentaje de las células positivas para Anexina V tomando un basal de marca para células sin tratar.

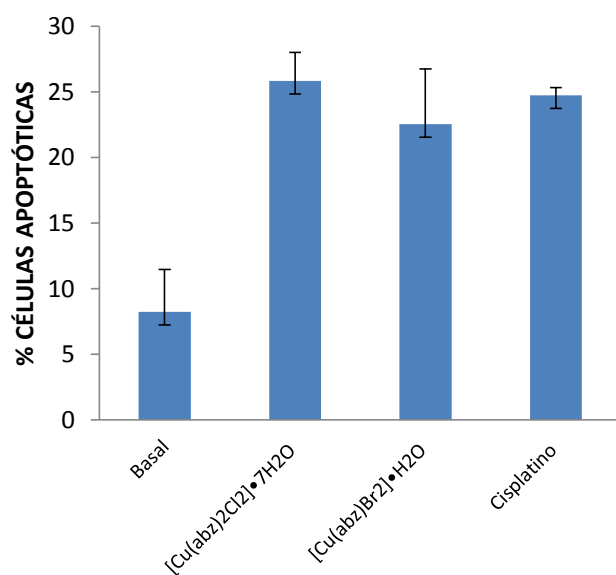
A las 24 horas se observa que el porcentaje de células apoptóticas es similar para los dos compuestos sintetizados con el ion metálico cobre(II), sin embargo es ligeramente mayor el porcentaje de apoptosis que se obtiene con el compuesto (1)  $[Cu(abz)_2Cl_2] \cdot 7H_2O$ . Las células expuestas a este compuesto presentan un porcentaje de apoptosis parecida para ambas concentraciones (1  $\mu g/mL$  y 10  $\mu g/mL$ ).

Para el caso del compuesto  $[Cu(abz)Br_2] \cdot H_2O$  se observa que a 24 horas el porcentaje de apoptosis aumenta ligeramente cuando aumenta la concentración del compuesto de 1  $\mu g/mL$  a 10  $\mu g/mL$ .

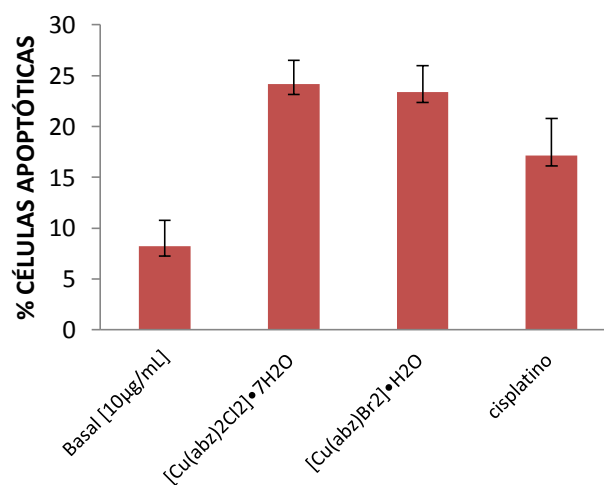
Para el caso de las células PC-3, las células que presentan mayor porcentaje de apoptosis son las que permanecieron en exposición durante 48 horas al compuesto  $[Cu(abz)Br_2] \cdot H_2O$  en una concentración de 1  $\mu g/mL$ .

Células PC-3 apoptóticas

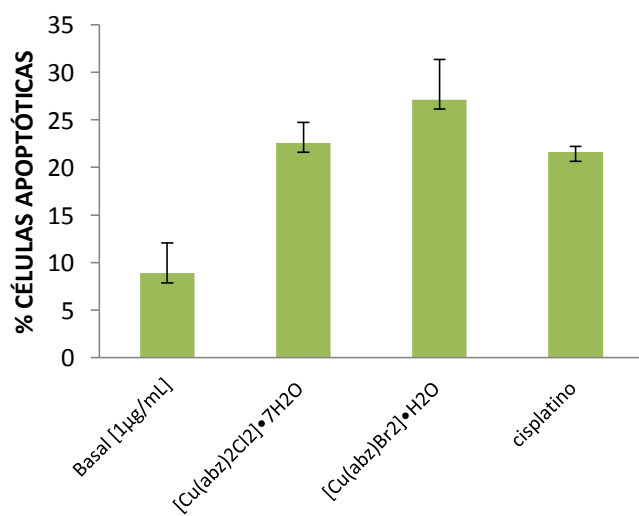
(Anexina V +) a 24 horas de tratamiento (1µg/mL)



(Anexina V +) a 24 horas de tratamiento (10 µg/mL)



(Anexina V +) a 48 horas de tratamiento (1 µg/mL)



(Anexina V +) a 48 horas de tratamiento (10 µg/mL)

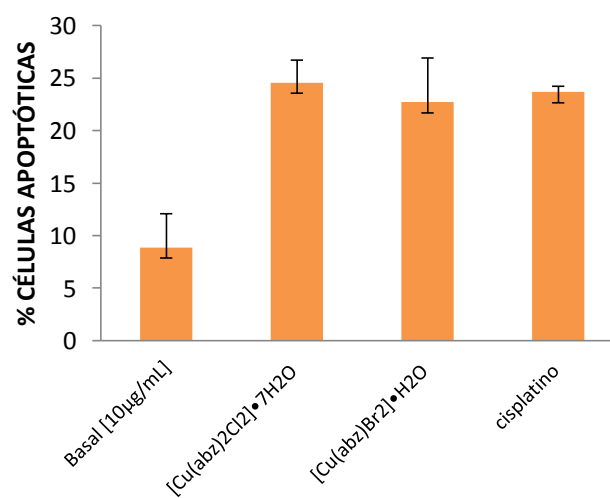


Figura 7.2.5 Porcentaje de células apoptóticas en la línea celular PC-3.

En la línea celular HeLa, se observa que a las 24 horas de exposición a los compuestos el porcentaje de células apoptóticas es similar para los dos compuestos sintetizados con el ion metálico cobre(II), sin embargo es ligeramente mayor el porcentaje de apoptosis que se obtiene con el compuesto (1)  $[\text{Cu}(\text{abz})_2\text{Cl}_2] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Las células expuestas a este compuesto presentan un porcentaje de apoptosis semejante para ambas concentraciones (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

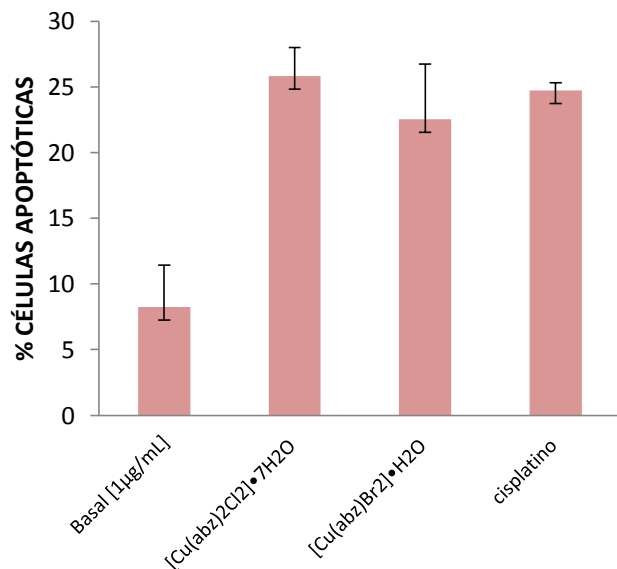
Para el caso del compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$  se observa que a 24 horas el porcentaje de apoptosis aumenta ligeramente cuando aumenta la concentración del compuesto de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las células que presentan mayor porcentaje de apoptosis son las que estuvieron en exposición durante 48 horas al compuesto  $[\text{Cu}(\text{abz})\text{Br}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$  en una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Se observa que los compuestos presentan el mismo comportamiento en ambas líneas celulares.

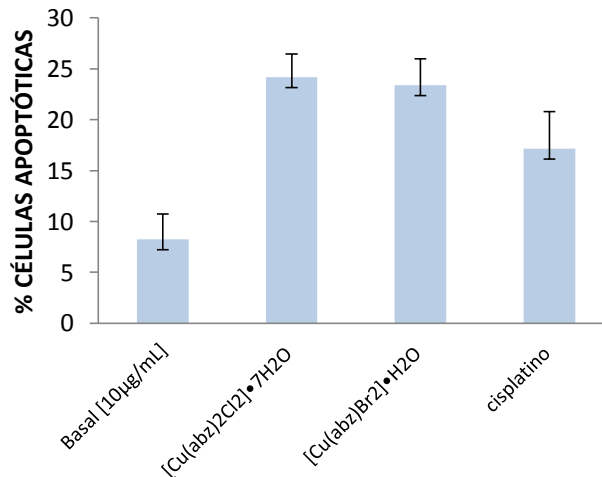


**Células HeLa apoptóticas**

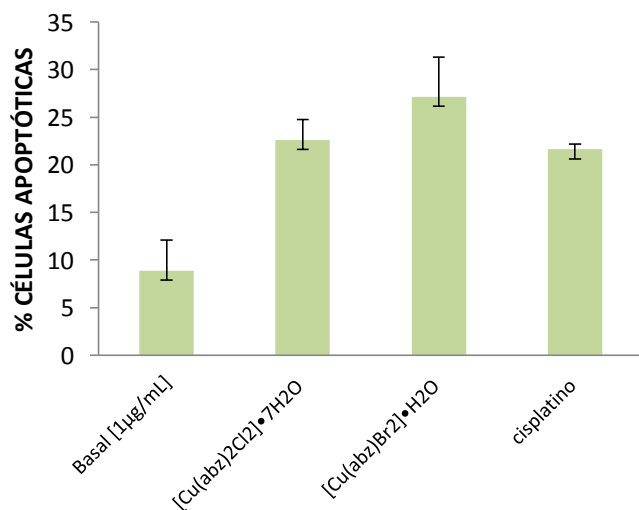
**(Anexina V +) a 24 horas de tratamiento (1µg/mL)**



**(Anexina V +) a 24 horas de tratamiento (10µg/mL)**



**(Anexina V +) a 48 horas de tratamiento (1µg/mL)**



**(Anexina V +) a 48 horas de tratamiento (10µg/mL)**

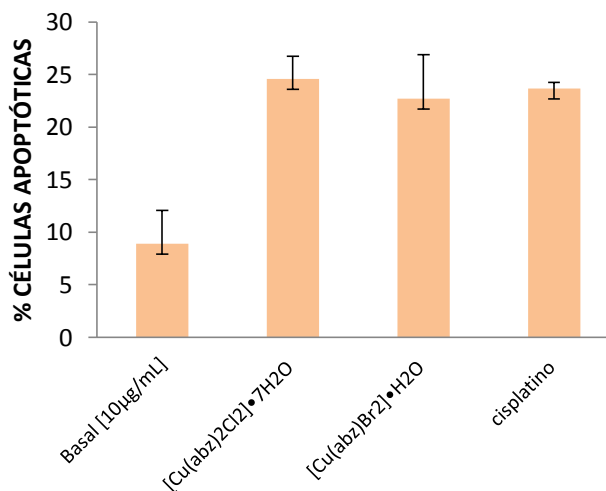


Figura 7.2.6 Porcentaje de células apoptóticas en la línea celular HeLa.

*Análisis estadístico*

Al realizar una prueba de T-Student pareada se observó que el tratamiento con **(2) [Cu(abz)Br<sub>2</sub>]·H<sub>2</sub>O** a una concentración de 10 µg/mL respecto al cisplatino en las células HeLa a 24 h sí es diferente pero no significativamente, p=0.36.

Para el caso de las células PC-3 el **(2) [Cu(abz)Br<sub>2</sub>]·H<sub>2</sub>O** a una concentración de 1 µg/mL resultó el más diferente pero no significativamente con un valor de p=0.22 24h, respecto al cisplatino.

Al comparar los compuestos entre sí **(2) [Cu(abz)Br<sub>2</sub>]·H<sub>2</sub>O** y **(1) [Cu(abz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·7H<sub>2</sub>O** a 24 horas, la diferencia más grande se encontró en las células de la línea PC-3 a una concentración de 10 µg/mLr con una p=0.17 no significativa.

A las 48 horas se obtuvo que la diferencia es significativa para el compuesto de **(1) [Cu(abz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·7H<sub>2</sub>O** al compararlo con el efecto del cisplatino sobre las células HeLa a una concentración de 1 µg/mL.

La técnica de citometría de flujo también permite conocer el porcentaje de necrosis por lo que a continuación se muestran las gráficas de comparación entre el porcentaje de apoptosis y el de necrosis en la línea celular HeLa a 48 horas.

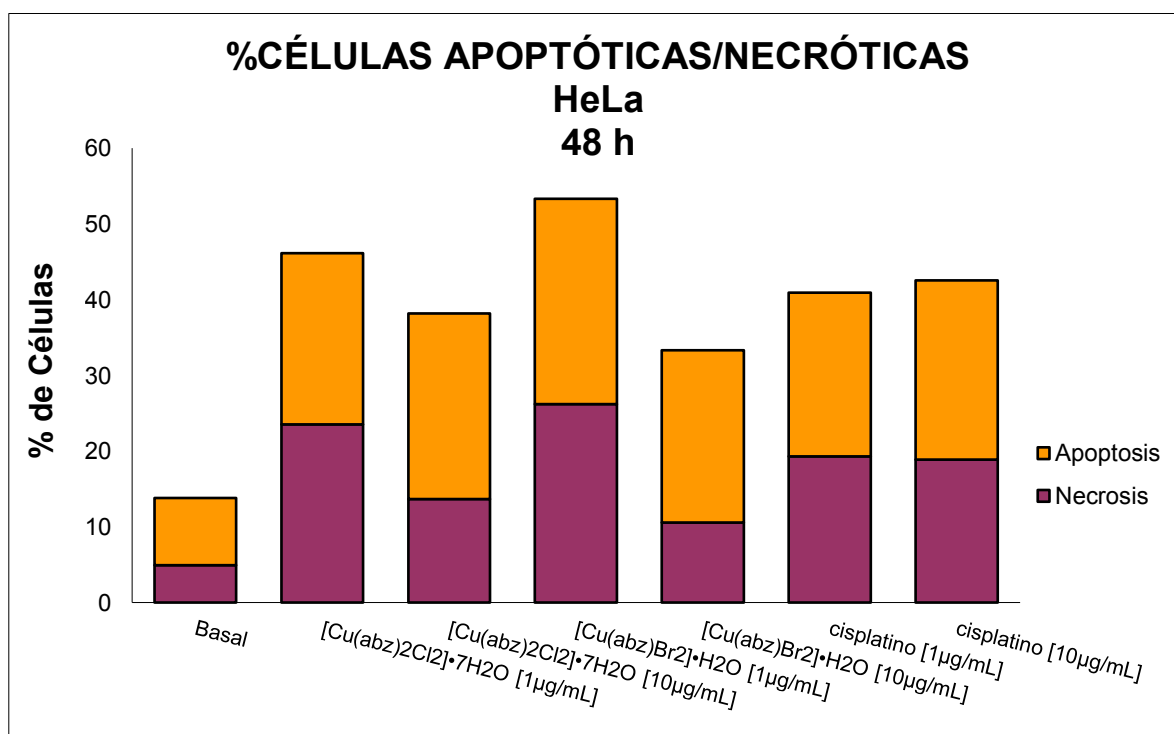


Figura 7.2.7 Porcentaje de células apoptóticas y necróticas en la línea celular HeLa a 48 horas.

Como se muestra en las gráficas, el porcentaje de apoptosis/necrosis es muy similar y no se observa que alguno de los dos predomine, además de que no coincide la suma de los porcentajes de apoptosis y necrosis con el porcentaje de viabilidad que se observaba en el ensayo de citotoxicidad. Es importante recordar que la apoptosis es un proceso complejo que incluye muchas familias de proteínas, compartimentos subcelulares y cascadas de transducción de señales<sup>5</sup>, además de que para la muerte celular se conocen otros mecanismos y no

necesariamente tiene que ser apoptosis o necrosis<sup>6</sup>, por lo que se podría proponer de que la muerte celular se lleva a cabo por otros mecanismos tales como autofagia, necroapoptosis, aponecrosis<sup>7</sup> y para elucidar el mecanismo de acción es necesario llevar al cabo más experimentos.

Por otro lado, si es posible concluir que ciertas características de los compuestos de coordinación son imprescindibles para que estos presenten actividad biológica, por ejemplo, al partir de la sal metálica bromuro de cobre (II) se forman compuestos bidentados y con geometría tetraédrica, los cuales presentan mejor actividad que los demás compuestos independientemente del ligante, esto se observa en los compuestos [Cu(2cmbz)Br<sub>2</sub>] $\cdot$ 0.7H<sub>2</sub>O (30), [Cu(clotri)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>] $\cdot$ 5H<sub>2</sub>O y finalmente [Cu(abz)Br<sub>2</sub>] $\cdot$ H<sub>2</sub>O (2). Por tal motivo es importante continuar con la investigación de estos compuestos tanto química como biológicamente.

## Referencias

1. Saraste A. Pulkki K., *Cardiovascular Research*, 45 (2000) 528-537.
2. Wyllie A.H., *Nature*, 284 (1980) 555-556.
3. In Situ Cell Death Detection Kit PO, Version 2, ROCHE.
4. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C., *Journal of Immunological Methods* 184 (1995) 39-51.
5. Ashe P.C., Berry M.D., *Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27 (2003) 199-214.
6. Majno G., Joris Isabelle, *American Journal of Pathology* 146 (1995) 3-15.
7. Leist M. Jäätela M., *Molecular Cell Biology, Nature Reviews*, 2 (2001) 1-10.

- 
- Se sintetizaron cuatro compuestos de coordinación a partir del ligante abz y los iones metálicos cobre(II) y zinc(II), todos los compuestos sintetizados presentaron geometría tetraédrica y se coordinaron de manera monodentada mediante el nitrógeno imidazólico del albendazol al ion metálico, excepto el compuesto **[Cu(abz)Br<sub>2</sub>]·H<sub>2</sub>O**, el cual se coordinó de manera bidentada por el nitrógeno imidazólico y el oxígeno del carbamato del albendazol al ion metálico formando un compuesto quelato.
  - Los compuestos de coordinación sintetizados presentan mejor actividad citotóxica en comparación al ligante abz solo.
  - Los compuestos sintetizados a partir del ion metálico zinc(II), **[Zn(abz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·1.5H<sub>2</sub>O** y **[Zn(abz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]·0.5H<sub>2</sub>O** presentaron mejor actividad citotóxica que el ligante solo, sin embargo, no fue mejor que la actividad que presentó el cisplatino.
  - Los compuestos obtenidos con las sales de cobre(II), **[Cu(abz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·7H<sub>2</sub>O** y **[Cu(abz)Br<sub>2</sub>]·H<sub>2</sub>O** presentaron mejor actividad citotóxica que el cisplatino. Dado que el ion metálico Cu<sup>2+</sup> es menos tóxico para el cuerpo humano que el Pt<sup>2+</sup> este resultado permitirá continuar con el estudio de su actividad *in vivo*. El compuesto más activo fue el compuesto **[Cu(abz)Br<sub>2</sub>]·H<sub>2</sub>O** y su actividad citotóxica es atribuible a la forma de coordinación bidentada que le da mayor estabilidad.
  - De acuerdo a los estudios realizados anteriormente con compuestos de coordinación sintetizados a partir de ligantes derivados del bencimidazol, y

comparándolos con los resultados de este trabajo. Se concluye que los compuestos que son sintetizados a partir de la sal metálica  $\text{CuBr}_2$  y que presentan geometría tetraédrica, muestran mejor actividad citotóxica.

- La actividad citotóxica es independiente de la liposolubilidad del ligante, los factores que contribuyen a que los compuestos de coordinación presenten actividad son: la geometría del compuesto, el ion metálico y el contraión.
- De acuerdo a los resultados de los estudios realizados, se propone que los compuestos presentan muerte celular por apoptosis y necrosis, por lo que es necesario realizar más estudios para poder elucidar el mecanismo de acción que presentan estos compuestos en las líneas celulares probadas.

## Citotoxicidad

- **Línea celular HeLa**

- 1) Compuesto  $[Cu(abz)_2Cl_2] \cdot 7H_2O$
- 2) Compuesto  $[Cu(abz)Br_2] \cdot H_2O$
- 3) Compuesto  $[Zn(abz)_2Cl_2] \cdot 1.5H_2O$
- 4) Compuesto  $[Zn(abz)_2Br_2] \cdot 0.5H_2O$

% de viabilidad de las células a diferentes concentraciones de los compuestos de coordinación en la línea celular <b>HeLa</b>					
Concentración (µg/mL)	$[Cu(abz)_2Cl_2] \cdot 7H_2O$	$[Cu(abz)Br_2] \cdot H_2O$	$[Zn(abz)_2Cl_2] \cdot 1.5H_2O$	$[Zn(abz)_2Br_2] \cdot 0.5H_2O$	Cisplatino
0	100%	100%	100%	100%	100%
0.01	95%	100%	89%	86%	100%
0.1	99%	77%	67%	74%	100%
1	60%	54%	60%	46%	54%
10	54%	50%	64%	51%	46%

- **Línea celular PC-3**

% de viabilidad de las células a diferentes concentraciones de los compuestos de coordinación en la línea celular <b>PC-3</b>					
Concentración (µg/mL)	$[Cu(abz)_2Cl_2] \cdot 7H_2O$	$[Cu(abz)Br_2] \cdot H_2O$	$[Zn(abz)_2Cl_2] \cdot 1.5H_2O$	$[Zn(abz)_2Br_2] \cdot 0.5H_2O$	Cisplatino
0	100%	100%	100%	100%	100%
0.01	96%	88%	90%	81%	89%
0.1	79%	71%	82%	76%	80%
1	74%	66%	72%	71%	71%
10	50%	42%	73%	69%	55%

- **Línea celular MCF-7**

% de viabilidad de las células a diferentes concentraciones de los compuestos de coordinación en la línea celular <b>MCF-7</b>					
Concentración (µg/mL)	[Cu(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]·7H <sub>2</sub> O	[Cu(abz)Br <sub>2</sub> ]·H <sub>2</sub> O	[Zn(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]·1.5H <sub>2</sub> O	[Zn(abz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]·0.5H <sub>2</sub> O	Cisplatino
0	100%	100%	100%	100%	100%
0.01	82%	97%	100%	80%	95%
0.1	89%	80%	82%	78%	88%
1	84%	69%	75%	78%	83%
10	53%	47%	80%	69%	63%

- **Línea celular HCT-15**

% de viabilidad de las células a diferentes concentraciones de los compuestos de coordinación en la línea celular <b>HCT-15</b>					
Concentración (µg/mL)	[Cu(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]·7H <sub>2</sub> O	[Cu(abz)Br <sub>2</sub> ]·H <sub>2</sub> O	[Zn(abz) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]·1.5H <sub>2</sub> O	[Zn(abz) <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> ]·0.5H <sub>2</sub> O	Cisplatino
0	100%	100%	100%	100%	100%
0.01	82%	72%	84%	80%	100%
0.1	77%	72%	86%	85%	100%
1	68%	65%	74%	82%	98%
10	46%	46%	76%	77%	71%



**Resultados por compuesto**

% de viabilidad de las células a diferentes concentraciones del compuestos de coordinación <b>[Cu(abz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·7H<sub>2</sub>O (1)</b>				
Concentración (µg/mL)	Hela	PC-3	MCF-7	HCT-15
0	100	100	100	100
0.01	95	96	82	82
0.1	99	79	89	77
1	60	74	84	68
10	54	50	53	46

% de viabilidad de las células a diferentes concentraciones del compuestos de coordinación <b>[Cu(abz)Br<sub>2</sub>]·H<sub>2</sub>O (2)</b>				
Concentración (µg/mL)	Hela (%)	PC-3 (%)	MCF-7 (%)	HCT-15 (%)
0	100	100	100	100
0.01	100	88	97	72
0.1	77	71	80	72
1	54	66	69	65
10	50	42	47	46

% de viabilidad de las células a diferentes concentraciones del compuestos de coordinación <b>[Zn(abz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·1.5H<sub>2</sub>O (3)</b>				
Concentración (µg/mL)	Hela (%)	PC-3 (%)	MCF-7 (%)	HCT-15 (%)
0	100	100	100	100
0.01	89	90	100	84
0.1	67	82	82	86
1	60	72	75	74
10	64	73	80	76

% de viabilidad de las células a diferentes concentraciones del compuestos de coordinación <b>[Zn(abz)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>]-0.5H<sub>2</sub>O (4)</b>				
Concentración (µg/mL)	Hela (%)	PC-3 (%)	MCF-7 (%)	HCT-15 (%)
0	100	100	100	100
0.01	86	81	80	80
0.1	74	76	78	85
1	46	71	78	82
10	51	69	69	77

% de viabilidad de las células a diferentes concentraciones del compuestos <b>cisplatino</b>				
Concentración (µg/mL)	Hela (%)	PC-3 (%)	MCF-7 (%)	HCT-15 (%)
0	100	100	100	100
0.01	100	89	95	100
0.1	100	80	88	100
1	54	71	83	98
10	46	55	63	71

## Análisis estadístico de $CI_{50}$

PROBIT Muertos OF Total WITH Dosis

/LOG 10

/MODEL PROBIT

/PRINT FREQ CI

/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).

## Análisis probit

### Advertencia

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

### Información sobre los datos

	Nº de casos
Válidos	24
Perdidos	0
Rechazados	0
La transformación log no se puede realizar	0
Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control	0

### Información sobre la convergencia

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	9	Sí

### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.480	.027	17.792	.000	.427
	Intersección	-.408	.029	-13.887	.000	-.437

#### Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite superior	
PROBIT <sup>a</sup>	Dosis	.533
	Intersección	-.378

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

#### Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	258.574	22	.000 <sup>a</sup>

a. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

#### Residuos y frecuencias de casillas

Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos
PROBIT	1	100	0	8.568	-8.568
	2	100	0	8.568	-8.568
	3	100	0	8.568	-8.568

4	-2.000	100	20	8.568	11.920
5	-2.000	100	26	8.568	17.815
6	-2.000	100	23	8.568	14.179
7	-1.000	100	0	18.731	-18.731
8	-1.000	100	3	18.731	-15.398
9	-1.000	100	0	18.731	-18.731
10	-1.000	100	9	18.731	-9.463
11	-1.000	100	27	18.731	8.503
12	-1.000	100	13	18.731	-5.426
13	.000	100	33	34.170	-1.250
14	.000	100	33	34.170	-1.670
15	.000	100	33	34.170	-.837
16	.000	100	53	34.170	19.001
17	.000	100	61	34.170	26.681
18	.000	100	54	34.170	19.478
19	1.000	100	50	52.877	-3.167
20	1.000	100	55	52.877	2.539
21	1.000	100	44	52.877	-8.896
22	1.000	100	44	52.877	-8.975
23	1.000	100	52	52.877	-.537
24	1.000	100	52	52.877	-.946

Residuos y frecuencias de casillas

Número	Probabilidad
1	.086
2	.086
3	.086
4	.086
5	.086
6	.086
7	.187
8	.187
9	.187
10	.187
11	.187
12	.187
13	.342
14	.342
15	.342
16	.342
17	.342
18	.342
19	.529
20	.529
21	.529

PROBIT

22	.529
23	.529
24	.529

Límites de confianza

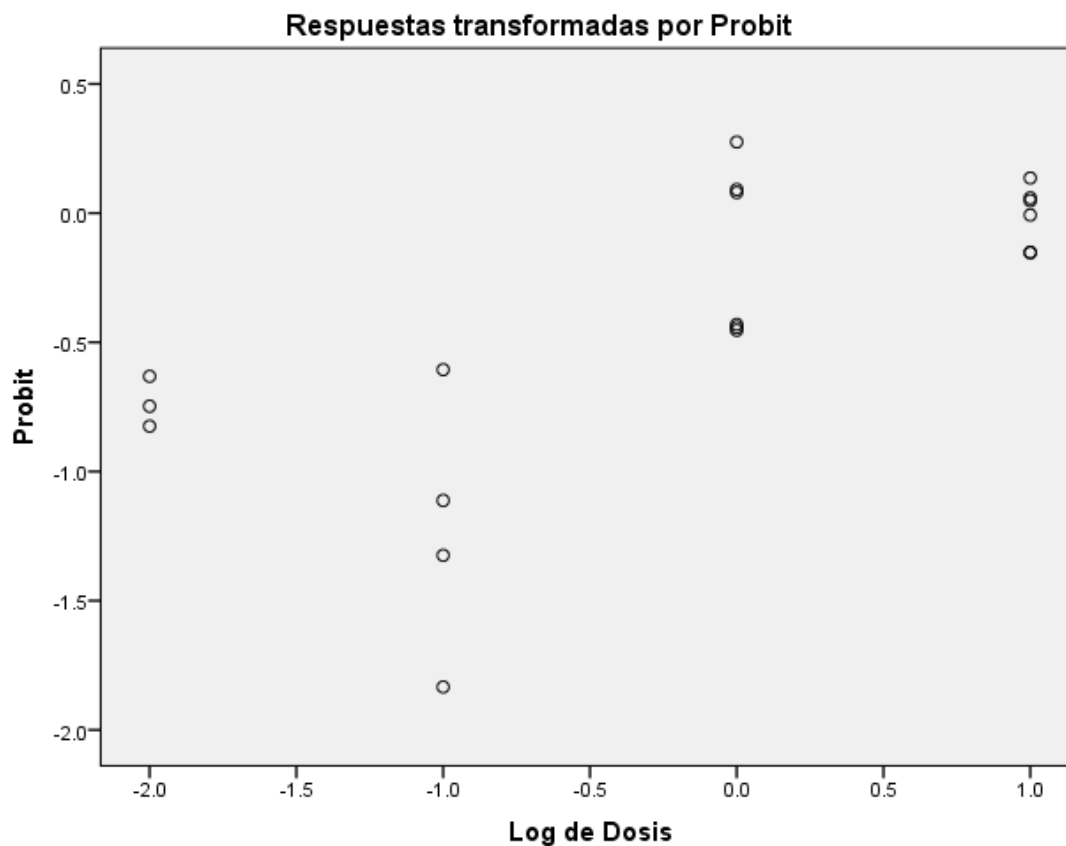
Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
.010	.000	.000	.001	-3.997	-6.564	-2.862
.020	.000	.000	.004	-3.429	-5.628	-2.446
.030	.001	.000	.007	-3.069	-5.037	-2.180
.040	.002	.000	.010	-2.798	-4.593	-1.979
.050	.003	.000	.015	-2.577	-4.233	-1.814
.060	.004	.000	.021	-2.389	-3.928	-1.672
.070	.006	.000	.028	-2.225	-3.661	-1.547
PROBIT <sup>a</sup> .080	.008	.000	.037	-2.078	-3.423	-1.435
.090	.011	.001	.047	-1.944	-3.208	-1.331
.100	.015	.001	.058	-1.820	-3.011	-1.235
.150	.049	.006	.151	-1.310	-2.208	-.822
.200	.125	.025	.341	-.904	-1.596	-.468
.250	.278	.078	.744	-.556	-1.107	-.128
.300	.572	.195	1.653	-.243	-.710	.218
.350	1.114	.414	3.813	.047	-.383	.581

.400	2.098	.783	9.099	.322	-.106	.959
.450	3.871	1.374	22.275	.588	.138	1.348
.500	7.073	2.307	55.701	.850	.363	1.746
.550	12.924	3.783	142.609	1.111	.578	2.154
.600	23.845	6.152	376.767	1.377	.789	2.576
.650	44.909	10.051	1040.614	1.652	1.002	3.017
.700	87.512	16.707	3063.278	1.942	1.223	3.486
.750	179.780	28.702	9894.088	2.255	1.458	3.995
.800	400.792	52.102	36738.865	2.603	1.717	4.565
.850	1020.380	103.781	170532.123	3.009	2.016	5.232
.900	3306.779	245.447	1183986.831	3.519	2.390	6.073
.910	4392.796	301.934	1892096.013	3.643	2.480	6.277
.920	5980.377	378.019	3149527.057	3.777	2.578	6.498
.930	8395.665	483.835	5517121.896	3.924	2.685	6.742
.940	12262.972	637.172	10322302.625	4.089	2.804	7.014
.950	18891.011	871.850	21097886.247	4.276	2.940	7.324
.960	31385.635	1259.608	48887654.399	4.497	3.100	7.689
.970	58583.833	1978.860	137447809.354	4.768	3.296	8.138
.980	134303.513	3604.262	543636444.124	5.128	3.557	8.735
.990	496569.317	9258.150	4755986253.653	5.696	3.967	9.677

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.





**Línea celular HeLa Compuesto [Cu(abz)Br<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O**

**Contrastes de chi-cuadrado**

		Chi-cuadrado	gl <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	115.360	22	.000 <sup>a</sup>

a. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis	Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>

	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
.010	.000	.000	.002	-3.454	-4.537	-2.777
.020	.001	.000	.004	-2.974	-3.910	-2.385
.030	.002	.000	.007	-2.669	-3.514	-2.134
.040	.004	.001	.011	-2.440	-3.216	-1.945
.050	.006	.001	.016	-2.254	-2.975	-1.791
.060	.008	.002	.022	-2.095	-2.770	-1.659
.070	.011	.003	.029	-1.956	-2.590	-1.543
.080	.015	.004	.036	-1.831	-2.430	-1.439
.090	.019	.005	.045	-1.718	-2.285	-1.343
.100	.024	.007	.056	-1.614	-2.152	-1.255
PROBIT <sup>a</sup> .150	.066	.025	.131	-1.182	-1.607	-.883
.200	.145	.065	.266	-.839	-1.186	-.576
.250	.285	.145	.502	-.544	-.837	-.299
.300	.525	.288	.922	-.280	-.540	-.035
.350	.922	.525	1.679	-.035	-.280	.225
.400	1.575	.897	3.062	.197	-.047	.486
.450	2.643	1.467	5.619	.422	.167	.750
.500	4.400	2.338	10.407	.643	.369	1.017
.550	7.325	3.675	19.541	.865	.565	1.291
.600	12.294	5.760	37.441	1.090	.760	1.573
.650	20.995	9.096	73.875	1.322	.959	1.868

.700	36.904	14.636	152.094	1.567	1.165	2.182
.750	67.829	24.333	333.174	1.831	1.386	2.523
.800	133.590	42.678	801.205	2.126	1.630	2.904
.850	294.366	81.827	2236.991	2.469	1.913	3.350
.900	795.427	184.822	8176.480	2.901	2.267	3.913
.910	1011.282	224.901	11188.035	3.005	2.352	4.049
.920	1312.652	278.297	15732.069	3.118	2.445	4.197
.930	1748.654	351.678	22889.982	3.243	2.546	4.360
.940	2408.861	456.621	34804.477	3.382	2.660	4.542
.950	3471.081	614.872	56145.056	3.540	2.789	4.749
.960	5331.652	871.913	98501.845	3.727	2.940	4.993
.970	9036.768	1338.981	196677.391	3.956	3.127	5.294
.980	18223.424	2366.847	493428.094	4.261	3.374	5.693
.990	55048.290	5802.486	2105326.645	4.741	3.764	6.323

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

- **Línea celular HeLa Compuesto cisplatino**

**Contrastes de chi-cuadrado**

		Chi-cuadrado	gl <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	295.596	22	.000 <sup>a</sup>

a. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
.010	.003	.000	.014	-2.515	-3.763	-1.848
.020	.007	.001	.027	-2.163	-3.252	-1.574
.030	.011	.001	.040	-1.940	-2.930	-1.398
.040	.017	.002	.054	-1.772	-2.688	-1.266
.050	.023	.003	.070	-1.636	-2.492	-1.157
.060	.030	.005	.086	-1.520	-2.326	-1.063
.070	.038	.007	.104	-1.418	-2.181	-.981
.080	.047	.009	.124	-1.326	-2.052	-.907
.090	.057	.012	.145	-1.243	-1.935	-.839
.100	.068	.015	.168	-1.167	-1.828	-.776
.150	.141	.041	.311	-.851	-1.390	-.508
.200	.251	.088	.520	-.600	-1.053	-.284
.250	.413	.168	.831	-.384	-.776	-.080
.300	.645	.289	1.302	-.190	-.539	.115
.350	.975	.466	2.031	-.011	-.332	.308
.400	1.443	.713	3.184	.159	-.147	.503
.450	2.108	1.050	5.040	.324	.021	.702
.500	3.061	1.506	8.082	.486	.178	.908

PROBIT<sup>a</sup>

.550	4.446	2.124	13.176	.648	.327	1.120
.600	6.497	2.974	21.936	.813	.473	1.341
.650	9.614	4.166	37.548	.983	.620	1.575
.700	14.531	5.891	66.741	1.162	.770	1.824
.750	22.694	8.499	125.093	1.356	.929	2.097
.800	37.280	12.696	253.497	1.571	1.104	2.404
.850	66.490	20.139	581.187	1.823	1.304	2.764
.900	137.696	35.741	1662.291	2.139	1.553	3.221
.910	164.166	41.017	2144.459	2.215	1.613	3.331
.920	198.720	47.619	2828.907	2.298	1.678	3.452
.930	245.166	56.092	3837.478	2.389	1.749	3.584
.940	309.981	67.324	5396.521	2.491	1.828	3.732
.950	405.065	82.866	7964.880	2.608	1.918	3.901
.960	554.668	105.713	12590.460	2.744	2.024	4.100
.970	816.304	142.508	22121.602	2.912	2.154	4.345
.980	1364.389	211.755	46841.836	3.135	2.326	4.671
.990	3065.840	394.564	153096.253	3.487	2.596	5.185

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

- **Línea celular PC-3 [Cu(abz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]·7H<sub>2</sub>O**

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT    Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	140.819	22	.000 <sup>a</sup>

a. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
.010	.000	.000	.001	-4.139	-5.962	-3.165
.020	.000	.000	.002	-3.538	-5.095	-2.699
.030	.001	.000	.004	-3.157	-4.546	-2.402
.040	.001	.000	.007	-2.870	-4.135	-2.178
.050	.002	.000	.010	-2.637	-3.801	-1.994
PROBIT <sup>a</sup> .060	.004	.000	.015	-2.438	-3.517	-1.837
.070	.005	.001	.020	-2.264	-3.270	-1.699
.080	.008	.001	.027	-2.108	-3.049	-1.574
.090	.011	.001	.035	-1.967	-2.849	-1.460
.100	.015	.002	.044	-1.836	-2.665	-1.354
.150	.051	.012	.125	-1.296	-1.918	-.903

---

---

.200	.136	.045	.301	-.866	-1.347	-.522
.250	.318	.130	.685	-.498	-.888	-.164
.300	.681	.309	1.557	-.167	-.510	.192
.350	1.380	.641	3.590	.140	-.193	.555
.400	2.696	1.211	8.393	.431	.083	.924
.450	5.155	2.159	19.815	.712	.334	1.297
.500	9.755	3.723	47.265	.989	.571	1.675
.550	18.461	6.321	114.539	1.266	.801	2.059
.600	35.297	10.705	284.632	1.548	1.030	2.454
.650	68.974	18.310	735.071	1.839	1.263	2.866
.700	139.731	32.039	2010.061	2.145	1.506	3.303
.750	299.344	58.311	5981.744	2.476	1.766	3.777
.800	699.231	113.104	20234.813	2.845	2.053	4.306
.850	1879.722	243.831	84099.824	3.274	2.387	4.925
.900	6523.318	638.232	507140.000	3.814	2.805	5.705
.910	8810.195	804.777	783136.626	3.945	2.906	5.894
.920	12211.653	1035.104	1255828.786	4.087	3.015	6.099
.930	17485.537	1364.838	2111224.867	4.243	3.135	6.325
.940	26109.581	1858.259	3772275.382	4.417	3.269	6.577
.950	41246.370	2641.448	7314925.081	4.615	3.422	6.864
.960	70582.742	3991.550	15931472.118	4.849	3.601	7.202
.970	136623.986	6627.959	41498087.175	5.136	3.821	7.618

.980	328711.858	12998.000	148250604.922	5.517	4.114	8.171
.990	1311514.548	37530.134	1104207119.530	6.118	4.574	9.043

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

• **Línea celular PC-3 [Cu(abz)Br<sub>2</sub>]-H<sub>2</sub>O**

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	215.944	22	.000 <sup>a</sup>

a. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
.010	.000	.000	.000	-4.578	-7.137	-3.377
.020	.000	.000	.001	-3.977	-6.189	-2.930
.030	.000	.000	.002	-3.595	-5.589	-2.646
.040	.000	.000	.004	-3.308	-5.139	-2.430
.050	.001	.000	.006	-3.075	-4.773	-2.255
.060	.001	.000	.008	-2.876	-4.463	-2.104



---

---

.070	.002	.000	.011	-2.702	-4.191	-1.972
.080	.003	.000	.014	-2.546	-3.949	-1.852
.090	.004	.000	.018	-2.404	-3.729	-1.743
.100	.005	.000	.023	-2.273	-3.527	-1.642
.150	.019	.002	.061	-1.732	-2.700	-1.215
.200	.050	.009	.139	-1.303	-2.061	-.858
.250	.116	.029	.296	-.934	-1.535	-.529
.300	.250	.081	.627	-.603	-1.093	-.203
.350	.506	.190	1.370	-.296	-.720	.137
.400	.989	.395	3.127	-.005	-.404	.495
.450	1.892	.746	7.447	.277	-.127	.872
.500	3.582	1.329	18.366	.554	.123	1.264
.550	6.782	2.291	46.806	.831	.360	1.670
.600	12.973	3.898	123.812	1.113	.591	2.093
.650	25.362	6.646	343.690	1.404	.823	2.536
.700	51.405	11.530	1019.634	1.711	1.062	3.008
.750	110.186	20.708	3326.709	2.042	1.316	3.522
.800	257.537	39.448	12507.450	2.411	1.596	4.097
.850	692.821	83.044	58958.672	2.841	1.919	4.771
.900	2406.492	210.395	417682.554	3.381	2.323	5.621
.910	3250.837	263.134	670797.035	3.512	2.420	5.827
.920	4506.984	335.409	1122632.218	3.654	2.526	6.050

.930	6455.095	437.846	1978301.483	3.810	2.641	6.296
.940	9641.592	589.431	3726120.661	3.984	2.770	6.571
.950	15236.223	826.995	7674284.541	4.183	2.918	6.885
.960	26083.019	1230.474	17943550.684	4.416	3.090	7.254
.970	50511.758	2004.225	51011311.370	4.703	3.302	7.708
.980	121606.003	3829.980	204766174.107	5.085	3.583	8.311
.990	485673.926	10610.739	1833704104.818	5.686	4.026	9.263

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 10.

- **Línea celular PC-3 cisplatino**

**Contrastes de chi-cuadrado**

	Chi-cuadrado	gl <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	118.798	22	.000 <sup>a</sup>

a. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

**Límites de confianza**

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) <sup>b</sup>	
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación n	Límite inferior

	.010	.000	.000	.000	-5.624	-8.965
	.020	.000	.000	.000	-4.786	-7.614
	.030	.000	.000	.001	-4.254	-6.759
	.040	.000	.000	.002	-3.854	-6.118
	.050	.000	.000	.003	-3.529	-5.596
	.060	.001	.000	.004	-3.252	-5.154
	.070	.001	.000	.007	-3.010	-4.767
	.080	.002	.000	.010	-2.792	-4.421
	.090	.003	.000	.014	-2.594	-4.108
	.100	.004	.000	.019	-2.412	-3.820
PROBIT <sup>a</sup>	.150	.022	.002	.073	-1.659	-2.647
	.200	.087	.018	.237	-1.060	-1.753
	.250	.284	.089	.754	-.546	-1.052
	.300	.822	.309	2.610	-.085	-.510
	.350	2.200	.824	9.839	.342	-.084
	.400	5.598	1.880	38.481	.748	.274
	.450	13.819	3.956	152.068	1.140	.597
	.500	33.630	7.986	605.642	1.527	.902
	.550	81.843	15.843	2454.575	1.913	1.200
	.600	202.051	31.423	10289.788	2.305	1.497
	.650	514.182	63.277	45617.588	2.711	1.801
	.700	1375.997	131.550	220403.890	3.139	2.119

---

---

.750	3980.684	288.447	1211942.101	3.600	2.460
.800	12992.174	688.688	8119617.009	4.114	2.838
.850	51581.038	1892.159	74820598.193	4.712	3.277
.900	292366.489	6722.536	1228201112.337	5.466	3.828
.910	444534.618	9126.410	2415475443.739	5.648	3.960
.920	700809.468	12719.078	5037107377.191	5.846	4.104
.930	1156047.075	18317.996	11303676930.717	6.063	4.263
.940	2021854.798	27524.303	27884914924.011	6.306	4.440
.950	3825035.702	43781.676	78113668355.926	6.583	4.641
.960	8089847.864	75506.939	262087433064.262	6.908	4.878
.970	20317081.786	147503.789	1161236145923.019	7.308	5.169
.980	69101358.991	359043.712	8405064103970.336	7.839	5.555
.990	475766432.398	1457522.098	190488026894757.200	8.677	6.164