



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Evaluación de las interacciones farmacológicas entre la Casiopeína III-ia y fármacos antitumorales en diferentes líneas tumorales

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. SILVIA GRACIELA DÁVILA MANZANILLA

TUTOR: DRA. LENA RUIZ AZUARA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Ciudad de México, noviembre de 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Evaluación de las interacciones farmacológicas entre la Casiopeína III-ia y fármacos antitumorales en diferentes líneas tumorales

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. SILVIA GRACIELA DÁVILA MANZANILLA

**TUTOR: DRA. LENA RUIZ AZUARA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



Ciudad de México, noviembre de 2017

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Vocal: Dr. Mariano Martínez Vázquez

Vocal: Dr. Francisco Hernández Luis

Vocal: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

Secretario: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Lugar donde se realizó el trabajo:

Laboratorio 210 y cubículo 05 (Laboratorio de Química Inorgánica Medicinal) del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio 119 del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM.

Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis, Hospital Regional General (HRG) Zona No. 1 Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro.

Comité Tutor:

Dra. Lena Ruiz Azuara

Dr. Mariano Martínez Vázquez

Dra. Carmen Mejía-Vázquez

Foros y Congresos donde se ha presentado este trabajo:

Simposio Impacto de la Química de Coordinación en 100 Años, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, diciembre de 2013 (modalidad de cartel).

Simposio de Avances y Perspectivas en Química Inorgánica y Medicinal. Taxco, Guerrero, noviembre de 2015 (modalidad oral).

Simposio Anual del Instituto de Química. Ciudad Universitaria, Ciudad de México, abril de 2016 (modalidad de cartel).

51° Congreso Mexicano de Química, SQM. Pachuca de Soto, Hidalgo, octubre de 2016 (modalidad oral).

V Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry, Jurica, Querétaro, octubre de 2016 (modalidad de cartel).

Ponente del seminario Departamental de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, febrero de 2017.

Seminario Mensual del Grupo de Casiopeinas y Q. Inorgánica Medicinal, Facultad de Química, febrero de 2017.

Invitación a participar en:

World Chemistry Conference and Exhibition. Roma, Italia, septiembre de 2017.

Biomedical Advances (ISSN: 2573-0355) <http://biomedical-advances.org/>

Environmental and Energy Resource Management Summit, Washington, D.C., noviembre, 2017.

Publicación:

Silvia Graciela Dávila-Manzanilla, Yesenia Figueroa-de-Paz, Carmen Mejía, Lena Ruiz-Azuara, Synergistic effects between a copper-based metal compound Casiopeina and cisplatin. European Journal of Medicinal Chemistry, 129 (2017) 266-274

Apoyo financiero:

Proyectos UNAM-PAPIIT 204511 e IN 218013, CONACYT 87806 y 179119 y PAIP 4290-19 y 5000-9047.

Beca CONACYT en el periodo 2013-1 – 2017-1 a nombre de Silvia G. Dávila Manzanilla (No. De Becario: 240080).

Agradecimientos

A la Dra. Lena Ruiz Azuara por la dirección de esta tesis, por su apoyo, cariño y por permitirme continuar siendo parte de su sueño durante toda mi trayectoria académica.

A los proyectos UNAM-PAPIIT 204511 e IN 218013, CONACYT 87806 y 179119 y PAIP 4290-19 y 5000-9047 por el apoyo económico.

A CONACYT por la beca otorgada en el periodo 2013-1 – 2017-1 a Silvia G. Dávila Manzanilla (No. De Becario: 240080).

A la Dra Ma. Elena Bravo Gómez por la síntesis de los compuestos CasIII-ia, CasIII-Ea, CasIII-La y VIII-gly.

A la Dra. Carmen Mejía Vázquez por la donación de la línea tumoral CHP-212, así como por las observaciones realizadas a este trabajo durante los tutorales y por facilitarme el uso de material durante la extensión de este trabajo.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por sus aportaciones a la realización de este trabajo durante los tutorales.

A la M en C. Yeshenia Figueroa de Paz por los ensayos de evaluación de las combinaciones con ADN plasmídico.

Al M en C. Adrián Espinoza Guillén por el apoyo técnico y las discusiones de resultados.

A la Dra. Goar Gevorkian, al Biólogo Experimental Gonzalo Acero y al Dr. Antonio Alvarado por permitirme hacer uso de sus instalaciones en el IIB y HRG.

A los integrantes del Laboratorio 210 por sus consejos, ayuda y compañerismo.

Dedicatorias

A mis padres, Silvia y Víctor por el largo y continuo apoyo durante mi larga carrera de estudios, por su paciencia y por siempre motivarme a perseguir mis sueños. Los quiero mucho.

A mis hermanos, Pablo, Víctor y Beatriz, por todas esas risas, cafés y experiencias que hemos compartido. Por permitirme disfrutar ser tía y disfrutar el ser niña otra vez junto a mi sobrino favorito.

A Victorcito, que tienes todo para ser feliz siempre. Te quiero mucho.

A mis abuelos, tíos, primos y sobrinos, para que la familia siempre se mantenga, como siempre, unida.

Contenido

Abreviaturas	9
Índice de figuras	10
Índice de gráficas	11
Índice de tablas	12
Resumen	13
Abstract	14
I. Antecedentes	15
1.1 Generalidades del cáncer	16
1.2 Quimioterapia	17
1.3 Quimioterapia de compuestos inorgánicos	22
1.4 Casiopeínas	25
1.4.1 Mecanismo de acción	27
1.4.2 Actividad biológica <i>in vitro</i>	30
1.4.3 Actividad biológica <i>in vivo</i>	33
1.4.4 Casiopeína III-ia	35
1.5 Terapia combinatoria y evaluación de las interacciones farmacológicas	38
1.5.1 Análisis fraccionado	41
1.5.2 Análisis isobolográfico	42
1.5.3 Ecuación del efecto medio	44
1.5.4 Superficie de respuesta	46
1.5.5 Evaluaciones de interacciones farmacológicas en Casiopeínas	47
II. Justificación	49
III. Hipótesis	53
IV. Objetivos	55
V. Material y métodos	57
5.1 Diseño experimental	58
5.2 Reactivos	60
5.3 Equipos	60
5.4 Determinación de las interacciones químicas presentes en la combinación de los compuestos	61
5.5 Descongelación y proliferación de las células tumorales	61
5.6 Determinación de la concentración inhibitoria media de los compuestos	62
5.7 Evaluación de combinaciones de compuestos	65
5.8 Determinación de las interacciones	65

5.9	Efecto de las combinaciones en el Plásmido PBR322_____	66
VI.	Resultados	67
6.1	Determinación de las interacciones químicas presentes en la combinación de los compuestos_____	68
6.2	Determinación de la concentración inhibitoria media de los compuestos_____	69
6.3	Determinación de las interacciones farmacológicas_____	72
VII.	Análisis y discusión de resultados_____	78
VIII.	Conclusiones_____	90
IX.	Bibliografía_____	92
X.	Anexos	102
	Anexo 1. Características fisicoquímicas de los compuestos de las Series A y B_____	103
	Anexo 2. Espectros de UV-Visible de los compuestos en combinación con CasIII-ia_____	116
	Anexo 3. Concentraciones de los compuestos empleados para la evaluación de las combinaciones en cultivos de la línea tumoral HeLa y CHP-212_____	122
	Anexo 4. Evaluación del paralelismo de las curvas CR por medio del programa Graph Pad Prism_____	123
	Anexo 5. Ejemplo de cálculo del índice de combinación para establecer el tipo de interacción farmacológica en una combinación de fármacos_____	127
	Anexo 6. Preparación de las disoluciones para cultivo celular____	129
	Anexo 7. Conteo de células en la cámara de Neubauer_____	131
	Anexo 8. Artículo: Synergistic effects between a copper-based metal compound Casiopeina and cisplatin. European Journal of Medicinal Chemistry_____	134

Abreviaturas

Anti-anti	Suero antibiótico antimicótico (penicilina/estreptomicina)
CasII-gly, Casiopeína II-gly	Nitrato de acua 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II)
CasIII-ia, Casiopeína III-ia	Nitrato de acua 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina acetilacetato cobre(II)
CasIII-Ea, Casiopeína III-Ea	Nitrato de acua 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II)
CasIII-La, Casiopeína III-La	Nitrato de acua 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II)
CasIII-Ma, Casiopeína III-Ma	Nitrato de acua 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II)
CasVI-gly, Casiopeína VI-gly	Nitrato de acua 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II)
CasVIII-gly, Casiopeína VIII-gly	Nitrato de acua 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II)
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CR	(curva) Concentración-respuesta
DE ₅₀	Dosis efectiva media
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM F-12	Medio Eagle modificado por Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12
FICI	Fractional inhibitory concentration index/índice de concentración inhibitoria fraccional
IC, γ	Índice de combinación
NEAA	Aminoácidos no esenciales (non-essential aminoacids)
PBS	Disolución amortiguadora de fosfatos
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido tricloroacético

Índice de figuras

Figura 1.	Porcentaje de morbilidad hospitalaria por principales tumores malignos de la población mexicana_____	17
Figura 2.	Esquema del ciclo celular y sensibilidad a agentes quimioterapéuticos__	21
Figura 3.	Compuestos de base metálica evaluados para el tratamiento de diversas enfermedades_____	23
Figura 4.	Ejemplos de quimioterapéuticos inorgánicos_____	24
Figura 5.	Ejemplos de Casiopeínas variando los ligantes primarios y secundarios	25
Figura 6.	Casiopeína II-gly_____	25
Figura 7.	Casiopeína III-ia_____	36
Figura 8.	Análisis isobolografico_____	42
Figura 9.	Serie A de compuestos evaluados en este trabajo_____	58
Figura 10.	Serie B de compuestos evaluados en este trabajo_____	59
Figura 11.	Efecto de las combinaciones en DNA plasmídico_____	77
Figura 12.	Cuadrícula para conteo de células en la cámara de Neubauer_____	132

Índice de gráficas.

Gráfica 1.	Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasII-gly_____	68
Gráfica 2.	Curvas CR de los compuestos evaluados a 24 horas en cultivos de la línea tumoral HeLa_____	70
Gráfica 3.	Curvas CR de los compuestos evaluados a 24 horas en cultivos de la línea tumoral CHP-212_____	71
Gráfica 4.	Isobogramas normalizados de las combinaciones de CasIII-ia con las seis Casiopeínas® y cisplatino_____	74
Gráfica 5.	Isobogramas normalizados de combinaciones de Casiopeínas® en cultivos de neuroblastoma (CHP-212)_____	75
Gráfica 6.	Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y epirubicina____	82
Gráfica 7.	Índice de combinación (IC) de las combinaciones de CasIII-ia y seis Casiopeínas® o cisplatino_____	87
Gráfica 8.	Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasIII-Ea_____	116
Gráfica 9.	Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasIII-La_____	117
Gráfica 10.	Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasIII-Ma_____	118
Gráfica 11.	Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasVI-gly_____	119
Gráfica 12.	Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasVIII-gly____	120
Gráfica 13.	Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y cisplatino_____	121
Gráfica 14.	Evaluación de paralelismo_____	123

Índice de tablas

Tabla 1.	Resumen de las subfamilias y fórmulas generales de las Casiopeínas®_	27
	Resumen de la actividad biológica de los compuestos en diferentes	
Tabla 2.	líneas tumorales_____	31
	Resumen de la actividad biológica <i>in vivo</i> de los compuestos de cobre_	35
Tabla 3.	Índices de combinación y su significado_____	46
Tabla 4.	Resumen de actividades de CasIII-ia y cisplatino en diversas líneas	
Tabla 5.	tumorales_____	51
Tabla 6.	Fármacos evaluados en cada una de las líneas tumorales de este	
	trabajo_____	60
Tabla 7.	Concentraciones empleadas en la determinación de la concentración	
	inhibitoria media a 24 horas_____	63
Tabla 8.	Concentración inhibitoria media de los compuestos evaluados a 24	
	horas en cultivos de las líneas tumorales HeLa y CHP-212_____	72
Tabla 9.	Interacciones farmacológicas de las combinaciones de compuestos de	
	cobre(II) y Cisplatino_____	73
Tabla 10.	Interacciones farmacológicas de las combinaciones de compuestos de	
	cobre(II) en CHP-212_____	76
Tabla 11.	Resumen de los compuestos en función de los mecanismos de acción	
	empleadas en los principales tipos de cáncer que afectan a la población	
	mexicana_____	80
Tabla 12.	Combinaciones de fármacos en combinación con 5-fluorouracilo_____	106
Tabla 13.	Combinaciones de fármacos en combinación con bleomicina_____	109
Tabla 14.	Combinaciones de fármacos en combinación con cisplatino_____	111
Tabla 15.	Combinaciones de fármacos en combinación con oxaliplatino_____	115
Tabla 16.	Concentraciones empleadas para la evaluación de los compuestos	
	individuales y las combinaciones en la línea tumoral HeLa_____	122
Tabla 17.	Concentraciones empleadas para la evaluación de los compuestos	
	individuales y las combinaciones en la línea tumoral CHP-212_____	122

RESUMEN

Las interacciones aditivas, subaditivas y superaditivas observadas en la terapia combinatoria tienen un rol importante en el tratamiento de las enfermedades, particularmente del cáncer. Los métodos de análisis de combinaciones de fármacos permiten identificar dichas interacciones. El objetivo principal de este trabajo es establecer la combinación del compuesto denominado CasIII-ia con varios análogos y el cisplatino, un fármaco de uso en la clínica. Con el propósito de establecer si la combinación de dos compuestos, CasIII-ia, y uno de sus análogos, puede mantener el 50% de su actividad antiproliferativa, pero disminuyendo la concentración molar de ambos, se evaluaron seis análogos más activos y siete fármacos de uso en la clínica, tanto en la línea tumoral Hela (adenocarcinoma cérvico-uterino) y CHP-212 (neuroblastoma). En este trabajo se encontró que los análogos presentaron la misma eficacia, pero un orden de magnitud más potentes, mientras que, de los fármacos, sólo uno de ellos, el cisplatino tenía la eficacia necesaria para continuar con la evaluación.

Con respecto a la evaluación de las combinaciones, se realizaron siete proporciones con respecto a la concentración inhibitoria media. Los resultados mostraron interacciones subaditivas, aditivas y superaditivas dependiendo del compuesto que acompañará a CasIII-ia y la concentración de cada uno. Particularmente, los compuestos con fenantrolinas tetrametiladas (CasVIII-gly 1.35 μM y CasIII-Ma 1.40 μM) presentaron las mejores interacciones superaditivas, en las cuales superaron significativamente el 50% de inhibición de la proliferación, con 90% y 75%, y disminuyendo la concentración empleada de CasIII-ia desde 41.74 hasta 4.59 μM . Al evaluar la combinación de CasIII-ia con cisplatino, se encontró un porcentaje de inhibición del 77% empleando 4.59 y 9.70 μM , respectivamente. El análisis de las combinaciones *in vivo* y en células sanas queda por ser estudiado para determinar si la disminución de las concentraciones empleadas produce una menor toxicidad.

ABSTRACT

Additive, subadditive or superadditive interactions observed in combination therapy play an important role in several treatments, particularly for cancer. There are several methods for the analysis of drug combinations, such as the isobolographic analysis which allows to establish the pharmacological interactions that exist between two drugs that are administered together in equieffective doses. To identify if the combination of two compounds can maintain 50 % of the antiproliferative activity achieved by the compounds alone while diminishing the molar concentration employed. The analysis was realized in two tumour cell lines: (HeLa) cervix-uteri and CHP-212 (neuroblastoma) using combinations of a copper-based compound named CasIII-ia and seven more active analogues or cisplatin. Seven drugs used in the clinic were assayed to determine the median inhibitory concentration, but only cisplatin was equated with the copper analogues.

Results showed that this compound exhibited additive, subadditive or antagonistic and superadditive or synergistic interactions, depending on the compound that accompanies it and the proportion of the compounds in the combination. Particularly, copper-based compounds containing tetramethylated phenanthrolines (CasVIII-gly, 1.35 μM and CasIII-Ma, 1.40 μM) presented the best superadditive interactions, achieving inhibition values of 90% and 75%, respectively, while diminishing from 41.74 to 4.59 μM the concentration of CasIII-ia. Regarding the combination of CasIII-ia/cisplatin, the highest inhibition achieved was 77 % with 4.59 and 9.70 μM , respectively. Further studies of the toxicity and biochemical level of the interactions remain to be studied on an in-vivo xenografted model.

CAPÍTULO I.

Antecedentes

I. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades del cáncer

El término cáncer se refiere a un grupo de padecimientos, producto de la proliferación anormal de una célula y cuyas células hijas han adquirido la habilidad de multiplicarse e invadir los tejidos circundantes debido a la reducción del control de su crecimiento y la alteración de las funciones celulares¹.

De acuerdo con datos de la OMS, a nivel mundial, el cáncer es la segunda causa de mortalidad². Se estima que, en el 2012, se diagnosticaron 14.1 millones de nuevos casos en países desarrollados^{2,3}, mientras que en países sub-desarrollados, este número fue de 8 millones³. Por su parte, en el 2015, esta enfermedad fue la responsable de 8.8 millones de muertes, siendo las principales causas de cáncer, para ambos sexos, los carcinomas de pulmón, hígado, colorrectal, estómago y mama².

Mientras tanto, en México y para el mismo año, los tumores malignos representaron la tercera causa de mortalidad⁴. Los principales tipos de cáncer que afectan a la población mexicana incluyen principalmente de los órganos hematopoyéticos en la población menor a 20 años, para ambos sexos, y del encéfalo y el sistema nervioso central y de las vías urinarias como segunda y tercera causa en hombres e inverso para las mujeres. En el caso de la población superior a 20 años, el principal tipo de cáncer, para ambos sexos, corresponde a tumores malignos de los órganos digestivos; seguido de tumores en los órganos genitales y respiratorios como segundo y tercer lugar en el caso de hombres y finalmente, los tumores malignos en mama y órganos genitales representan el segundo y tercer lugar en mujeres⁵. El resumen de los tipos de cáncer que padece la población mexicana se muestra en la **Figura 1**.

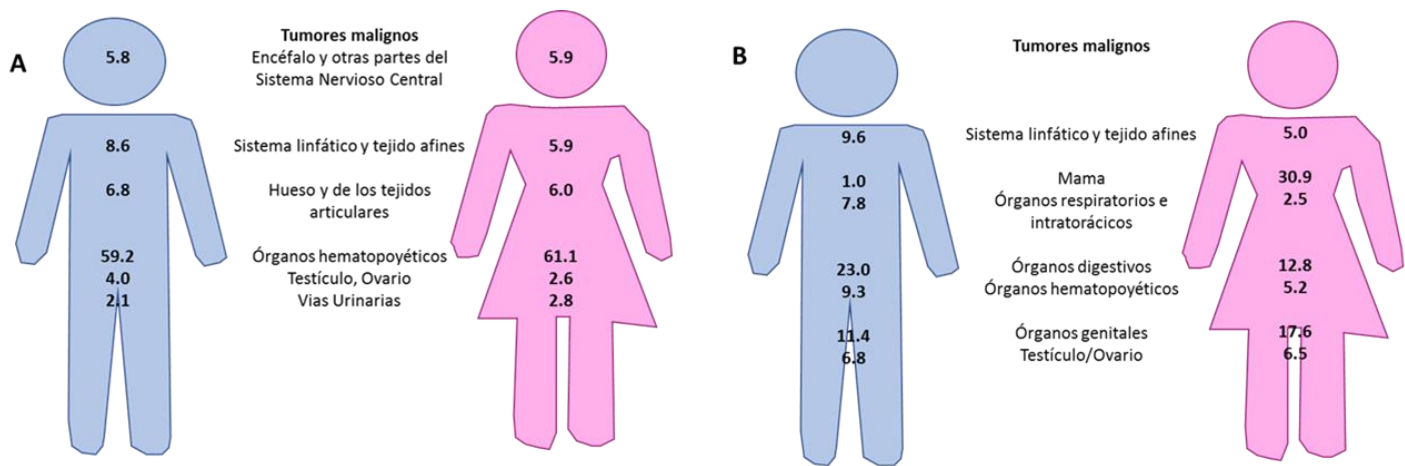


Figura 1. Porcentaje de mortalidad hospitalaria por principales tumores malignos de la población mexicana. A) En población menor a 20 años y, B) en población mayor a 20 años⁵.

A pesar de que el cáncer representa un problema importante en la salud, el diagnóstico temprano y el acceso de la población a cuidados universales ha resultado en una mejora en la supervivencia al cáncer. Dentro de los tratamientos que se aplican para tratar esta enfermedad se encuentran entre los más importantes, la cirugía, la radioterapia, la endocrinoterapia y la quimioterapia, así como combinaciones de estos. La cirugía consiste en la remoción de las células tumorales, siendo efectiva en el 100% de las células extirpadas, mientras que la radioterapia y la quimioterapia únicamente pueden eliminar a una fracción de la población de células malignas⁶. Asimismo, se han explorado el uso de otro tipo de terapias que le confieran a los tratamientos un incremento en la selectividad hacia las células tumorales, como la inmunoterapia o la terapia biológica^{6,7} o tratamientos enfocados en mejorar el pronóstico de la enfermedad, como los trasplantes de células troncales y medicina de precisión⁷.

1.2 Quimioterapia

La quimioterapia consiste en el uso de compuestos de origen orgánico como el taxol y la vincristina⁸; y de origen inorgánico, siendo los compuestos de platino los

más representativos, así como los únicos que han superado las fases clínicas en diversos países⁹.

Los compuestos antineoplásicos están diseñados específicamente para eliminar o detener la proliferación de las células cancerígenas⁸. Estos compuestos, tradicionalmente, se dividen en seis categorías, de acuerdo con sus características bioquímicas: agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antineoplásicos, agentes antimetabólicos, hormonas e inhibidores de las topoisomerasas^{8,10} o de cinasas.

Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes son compuestos altamente reactivos que actúan a través de la interacción directa con el ADN, inhibiendo así la replicación celular, específicamente forman enlaces covalentes principalmente con el N7 de la guanina, aunque en menor medida también a la adenina y a la citosina. Un agente alquilante puede unirse de manera monofuncional o bifuncional a una o dos hebras del ADN, evitando así la separación de ambas hebras. Esto produce a su vez inhibición de la síntesis de ADN, ARN y de las proteínas en tejidos que se encuentran en continua proliferación. Esta clase de antineoplásicos se consideran no dependientes del ciclo celular, es decir, ejercen su actividad citotóxica independientemente de la fase del ciclo en que las células se encuentren, sin embargo, una de las ventajas que presentan es que promueven el reclutamiento de las células en estado quiescente hacia fases activas de división, lo cual las convierte en células susceptibles al efecto de fármacos específicos del ciclo celular. Dentro de las desventajas que este tipo de compuestos puede presentar, se encuentra la capacidad de generar mielosupresión después de varias administraciones, la cual se detiene al suspenderse el tratamiento. Dentro de este grupo de compuestos, se encuentran los siguientes fármacos: ciclofosfamida, cisplatino, clorambucil, lomustina y melfalán, por mencionar algunos^{8,10}.

Antimetabolitos

Los antimetabolitos son agentes químicos que, dependiendo de su estructura, actúan como antagonistas de los metabolitos de rutas metabólicas involucradas en la síntesis de ARN y ADN. Los mecanismos de acción a través de los cuales actúan pueden llevarse a cabo, ya sea por inhibición competitiva o por inhibición no competitiva. En el primer caso, los antimetabolitos interfieren en la síntesis del metabolito, conocidos como antimetabolitos clásicos; mientras que, en el segundo caso, los antimetabolitos bloquean el acceso del sustrato natural de una enzima hacia éste, conocidos como antimetabolitos no clásicos. Los primeros resultan de la sustitución isostérica en la estructura de los metabolitos esenciales y los no clásicos no requieren compartir necesariamente la estructura ya que su acción resulta de la formación del complejo con el centro alostérico de las enzimas. En ambos casos, se lleva a la inhibición de la síntesis de ARN y ADN. Este tipo de compuestos son específicos de la fase de síntesis (S) del ciclo celular, por lo que son más activos en tumores de rápido crecimiento. En este grupo se encuentran los siguientes fármacos: 5-fluorouracilo, metotrexato y la capacitabina^{8,10}.

Antibióticos antineoplásicos

Los antibióticos antineoplásicos o antibióticos antitumorales son compuestos extraídos de microorganismos, con propiedades antibacteriana y citotóxica, pero donde predomina la segunda. Los mecanismos de acción de esta clase de compuestos son variados, por ejemplo, la bleomicina actúa como agente alquilante y promueve la generación de especies reactivas de oxígeno, las antraciclinas como la daunorrubicina y la doxorrubicina se intercalan entre las bases del ADN, la mitomicina puede actuar como agente alquilante o intercalante. Entre los efectos adversos de estos compuestos se puede encontrar la mielosupresión, toxicidad en piel y gastrointestinal, cardiotoxicidad y disfunciones hepática y renal^{8,10}.

Hormonas

Existen algunos tumores sólidos, por ejemplo, de mama, próstata o tiroides, que son sensibles a la manipulación hormonal. En función de esto, la acción de hormonas (estrógenos, andrógeno y progesteronas) o compuestos antagonistas de hormonas, como el tamoxifeno, dependerá de la expresión de receptores de éstas, los cuales una vez boqueados, inhiben la síntesis de ARNm. Otro ejemplo de este tipo de compuestos son los corticoesteroides, los cuales actúan a través del reclutamiento de células malignas, particularmente de tumores líquidos, hacia la división activa, haciéndolas sensibles hacia la acción de fármacos específicos del ciclo celular. Entre los efectos adversos que el uso de agentes hormonales presenta, se incluyen cambios en las características sexuales, en el líbido y retención de líquidos, por su parte, para los corticoesteroides se tienen además hipertensión, hiperglicemia, generación de úlceras y osteoporosis^{8,10}.

Antimitóticos

Los agentes antimitóticos son alcaloides extraídos de la vinca, siendo los más representativos la vinblastina y la vincristina o derivados del taxol, como el docetaxel y el paclitaxel. Los alcaloides de la vinca se unen a la tubulina y evitan la formación de los microtúbulos (importantes en la morfología y división celular). Los derivados del taxol evitan el desensamble de los microtúbulos inhibiendo la función normal de la célula. Dado que estos compuestos actúan durante la metafase, arretando la mitosis y promoviendo la muerte celular. Entre los efectos adversos se encuentran neurotoxicidad en el caso de la vincristina y en menor medida, la vinblastina; en el caso de los taxanos también se presenta mielosupresión adicional a la neurotoxicidad^{8,10}.

Inhibidores de las Topoisomerasas

En este grupo se incluyen las camptotecinas, el irinotecan y el topotecan, los cuales actúan a través de la inhibición de la Topoisomerasa I, una de las enzimas responsables de desenrollar el ADN durante la replicación, así como de la religación de las hebras. Estos compuestos se unen de forma covalente a la enzima, provocando su inhibición y el arresto de la célula en la fase G₂ del ciclo celular. A su vez, los alcaloides de la mandrágora, etopósido y tenipósido son inhibidores de la Topoisomerasa II, encargada igualmente de desenrollar las hebras de ADN. Las camptotecinas pueden generar diarrea y mielosupresión, mientras que los alcaloides de la mandrágora pueden presentar mielosupresión y neurotoxicidad^{8,10}.

Asimismo, es de considerar el nivel en el ciclo celular en el que los compuestos son activos, ya que podría facilitar la posterior combinación de los compuestos y seleccionar aquellos que actúen a diferentes tiempos¹¹. En la **Figura 2** se esquematizan algunos compuestos empleados en la clínica y el nivel del ciclo celular en el que son más activos.



Figura 2. Esquema del ciclo celular y sensibilidad a agentes quimioterapéuticos.

Traducido y adaptado de Seiwert y colaboradores (2007) ¹¹.

Debido a que la quimioterapia afecta de manera sistémica, es común que presente efectos tóxicos, los cuales en el mejor de los casos es desagradable sin embargo, ésta puede poner en peligro la vida, provocando incluso la muerte⁸. Es por lo anterior que continua la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas que presenten una mejora en la toxicidad, así como oportunidades con respecto a la resistencia que los diferentes tumores presentan de manera intrínseca o adquirida a los fármacos ya existentes⁹.

1.3 Quimioterapia de compuestos inorgánicos

A partir del descubrimiento del cisplatino como agente antineoplásico, la Química Bioinorgánica ha tenido un desarrollo importante, particularmente en el área de Química Inorgánica Medicinal en la cual, los esfuerzos se han enfocado en la búsqueda de compuestos activos en contra de enfermedades como el SIDA¹²¹, Alzheimer^{13,14}, artritis¹⁵, Chagas^{16,17}, leishmaniasis¹⁸, malaria^{16,19} y otras enfermedades tropicales desatendidas²⁰, así como enfermedades bacterianas^{18,21,22}. Lo anterior con el objetivo de disminuir la toxicidad y los costos de producción con respecto a los compuestos ya existentes en la clínica. Algunos ejemplos de estos compuestos se esquematizan en la **Figura 3**.

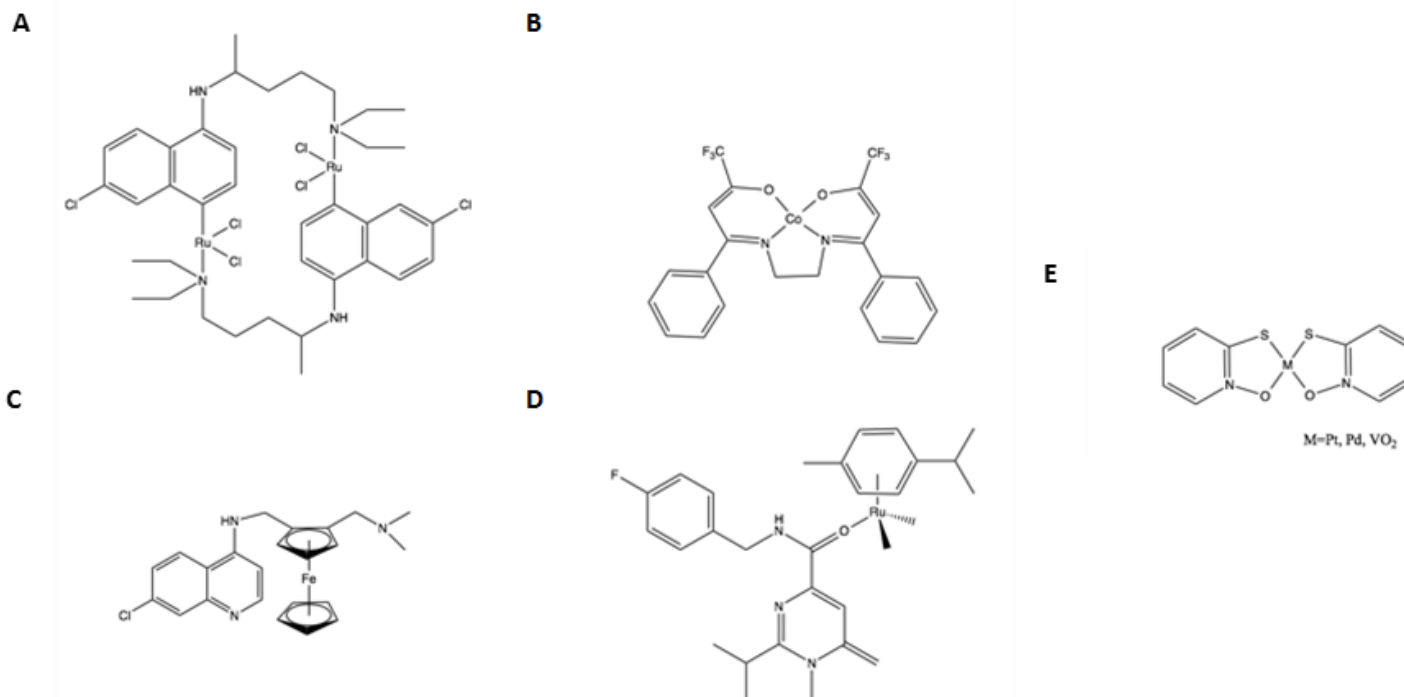


Figura 3. Compuestos de base metálica evaluados para el tratamiento de diversas enfermedades. A) Malaria: *Cloroquina de rutenio*¹⁶; B) Alzheimer: *(bis(benzotrifluoroacetato)etilendiimino)cobalto(II) (L^3Co)*^{13,23}; C) Malaria: *Ferroquina*¹⁶; D) VIH: *[RuCl(η^6 -p-cym)L²]*¹²; E) Tripanosomiasis: *compuestos de 2-mercaptopiridina N-óxido de metal*¹⁶.

Entre las ventajas que los metales aportan a las moléculas, se encuentran la facilidad de coordinarse a ligantes en una configuración en tres dimensiones, lo cual facilita la funcionalización de grupos que se ajusten más adecuadamente a las dianas moleculares. Asimismo, los estados de oxidación de los metales les permiten participar en procesos biológicos o, influir en el ingreso y biodisponibilidad del compuesto administrado. Finalmente, los metales tienen la capacidad de realizar reacciones intercambio de ligantes, y por lo tanto interaccionar con moléculas endógenas²⁴.

El uso de los metales no sólo se ha extendido al tratamiento de diversos padecimientos, si no, con respecto a los antitumorales, también se ha diversificado a

considerar a metales no esenciales como el rutenio(II) y rutenio(III), el oro(I) y oro(III) y el titanio(IV), algunos ejemplos de compuestos evaluados como antitumorales se muestran en la **Figura 4**. Los compuestos de rutenio NAMI A y KP1019 (Compuestos 4B y 4C) han sido los más notables en los últimos años ya que llegaron a la Fase Clínica II como agentes antimetastásicos²⁵; los compuestos de titanio (Compuestos 4D y 4E), los cuales fueron las primeras moléculas sin platino en llegar a Fase Clínica I²⁶. En el caso de los compuestos de oro (4A y 4F) han actividades antiproliferativas superiores al cisplatino y con el objetivo de ser usados como biomarcadores para detección del grupo tiol^{27,28}. Asimismo y, debido al éxito de compuestos de platino, el número de compuestos sintetizados con este metal se incrementa todos los días^{9,25,29}. También hay una tendencia al uso de metales esenciales, particularmente del cobre, los cuales, aprovechando que el organismo tiene medios para regular sus concentraciones y así disminuir la toxicidad inherente de los metales.

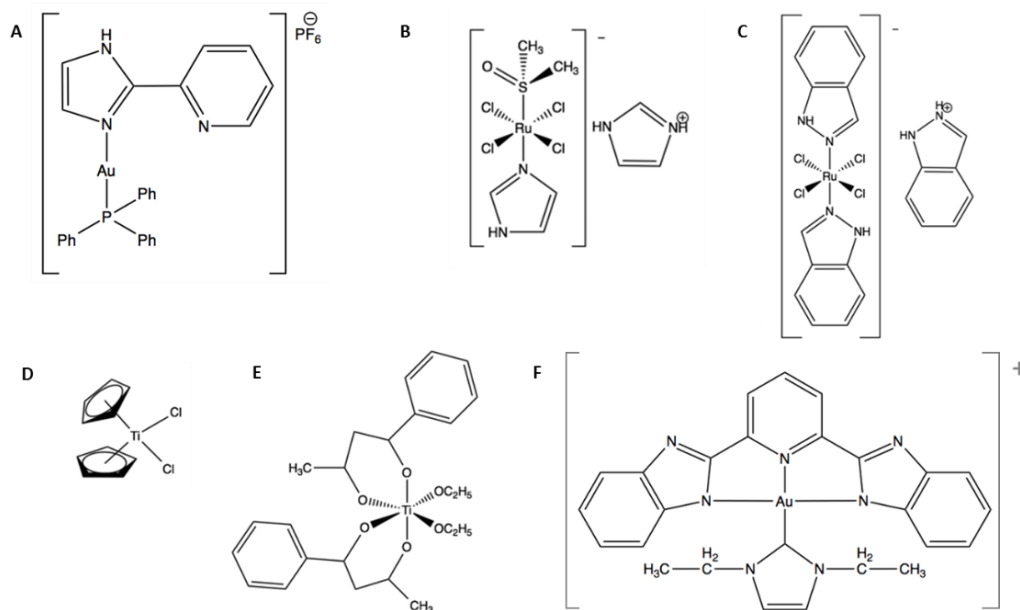


Figura 4. Ejemplos de quimioterapéuticos inorgánicos. A) $[(PPh_3Au^I)_2\{2-(2'-\text{piridil})\text{imidazolato}\}](PF_6^-)$ ²⁷; B) NAMI A²⁵ C) KP1019²⁵; D) Titanoceno³⁰²; E) $[(\text{bzac})_2\text{Ti}(\text{OEt})_2]$ ³⁰ F) $[Au^{III}(\text{N}^4\text{N}^4\text{N})(\text{NHC})]^+$ ²⁸.

1.4 Casiopeínas®

Al final de los años setenta, se inició el proyecto encaminado a preparar compuestos de metales esenciales con actividad biológica antitumoral, después de varios años de trabajo se decidió escoger al cobre por sus características y propiedades particulares, esta investigación fue encabezada por la Dra. Lena Ruiz Azuara y su equipo en la Facultad de Química, quienes han sintetizado, caracterizado y patentado una serie de agentes antineoplásicos basados en quelatos mixtos de cobre (II) registrados con el título de Marca Casiopeínas®³¹⁻³³, con fórmulas generales $[\text{Cu}(N-N)(\alpha\text{-aminoacidato})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(N-N)(O-O)]\text{NO}_3$, donde el donador $N-N$ es una diimina aromática sustituida (1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina) y el donador por oxígeno ($O-O$) es acetilacetonato (*acac*) o salicilaldehidato (*sala*) (**Figura 5**).

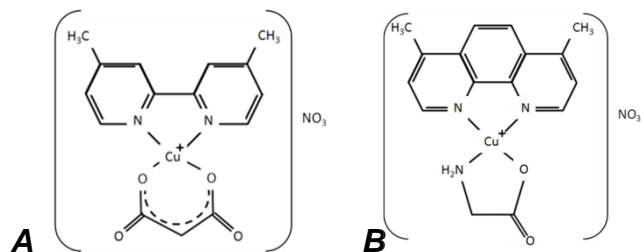


Figura 5. Ejemplos de Casiopeínas variando los ligantes primarios y secundarios. En A $[\text{Cu}(4,4'\text{-bipiridina})(\text{acetilacetonato})]^+$; en B, $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{glicinato})]^+$

Por difracción de Rayos X de monocristal, se obtuvieron las estructuras cristalinas y se observa que este tipo de compuestos tiene geometría de pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada con una molécula de agua en la posición apical, como se observa en la **Figura 6**³⁴.

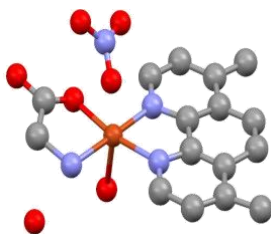


Figura 6. Casiopeína II-gly
 $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$

Actualmente, se han sintetizado más de 100 Casiopeínas, las cuales se dividen en diferentes grupos de acuerdo con los ligantes que presenten en su estructura y los cuales se resumen en la **Tabla 1**. El diseño de las Casiopeínas® toma en consideración moléculas que le brinden al cobre la posibilidad de producir citotoxicidad por medio de diferentes mecanismos de acción. En el caso del cobre, se sabe que éste es un metal que participa en diversos procesos biológicos³⁵⁻³⁷. Sin embargo, esto no lo exime de presentar efectos tóxicos, entre los que destaca la generación de ROS^{38,39,4}, las cuales pueden causar daño a través de la oxidación de los componentes celulares, alterar el balance óxido-reducción en la célula o interferir con los mecanismos de señalización celular relacionados con el estado redox^{38,40}. Por otra parte, los ligantes modifican las propiedades de transporte del cobre catiónico, las propiedades electrónicas del metal central y el reconocimiento molecular. Las 1,10-fenantrolinas (*phen*) y 2,2'-bipiridinas (*bpy*) sustituidas son ligantes bidentados donadores por nitrógeno con gran afinidad por el cobre⁴¹ y que, gracias al sistema de anillos aromáticos en su estructura pueden, en su forma libre o bien como complejos metálicos, unirse al ADN mediante interacciones intercalantes y no intercalantes^{40,42}. Por otra parte, los α -aminoácidos se seleccionaron como ligantes secundarios debido a su baja toxicidad y a su elevada afinidad por complejos Cu(II)-*bpy* Cu(II)-*phen*⁴³. A su vez, los ligantes *salal* y *acac* tienen también buena afinidad por complejos cobre(II)(*N-N*)⁴⁴ y también pueden modular las propiedades redox del centro metálico. Asimismo, se tiene la hipótesis que el ligante secundario participa mayoritariamente en el ingreso de estos compuestos a las células^{45,46}. Estas propiedades conferidas por los ligantes que los conforman, les permiten a los compuestos generar una respuesta citotóxica^{46,47} y posteriormente, una actividad antitumoral⁴⁷⁻⁴⁹, siendo los compuestos con fenantrolinas difeniladas los más activos en las pruebas que se les han realizado^{46,50,51}. Este incremento de la actividad se ha repetido en otros modelos, por ejemplo al evaluar la actividad anti $Giardia lamblia$, estos compuestos presentaron una eliminación de la población de *Giardia lamblia* cercana al 100%⁵² tras ser expuestos durante 24 h a 36 μ M.

Tabla 1. Resumen de las subfamilias y fórmulas generales de las Casiopeínas®.

Subfamilia y clave		Fórmula general
I	CasI-(N-O)	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
II	CasII-(N-O)	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
III	CasIII-Xa o xa	[Cu(N-N)(acac)]NO ₃
	CasIII-Xs o xs	[Cu(N-N)(salal)]NO ₃
IV	CasIV-(N-O)	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(N-O)]NO ₃
V	CasV-(N-O)	[Cu(5-R-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
VI	CasVI-(N-O)	[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
VII	CasVII-(N-O)	[Cu(1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
VIII	CasVIII-(N-O)	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
IX	CasIX-(N-O)	[Cu(2,2'-bipiridina)(N-O)]NO ₃

N-O: α -aminoacidato; acac, **a**: acetilacetato, salal, **s**: salicilaldehidato; N-N: diimina sustituida, donde x = letra minúscula, bipiridina o X = letra mayúscula, fenantrolina. La molécula de agua coordinada ha sido eliminada de las fórmulas por claridad.

En el presente trabajo se incluyeron en la combinación con Casiopeína III-ia [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acac)]NO₃, (CasIII-ia, **Figura 7**), los compuestos más activos en las diversas líneas tumorales⁴⁶ y pertenecen a las subfamilias II (ej. CasII-gly), III (ej. CasIII-Ea, CasIII-La y CasIII-Ma), VI, (ej. CasVI-gly) y VIII (ej. CasVIII-gly), de acuerdo a la **Tabla 1**. El detalle de los compuestos se incluye en la sección de “**Material y métodos**” y en el “**Anexo 1**”.

1.4.1 Mecanismo de acción

Con respecto al mecanismo de acción, se sugiere que los principales sitios de acción de esta familia de compuestos son el núcleo y/o la mitocondria^{53,54}, que a su vez desencadenan una serie de eventos que promueven la muerte, principalmente por apoptosis, aunque también se ha encontrado que una fracción celular podría

activar la autofagia como mecanismo de muerte celular^{55,56}. Sin embargo, la citotoxicidad causada por exposición de estos compuestos en eritrocitos⁵⁷, células que carecen de ambos organelos, genera la interrogante de la existencia de otros blancos celulares. En un estudio de expresión de genes por microarreglos, se encontró que uno de los miembros de esta familia, conocido como Casiopeína II-gly (CasII-gly, **Figura 6**) incrementó la expresión de genes que en el control se encontraban sub-expresados y disminuyó la expresión de todos aquellos genes que estaban sobre-expresados, particularmente se vio disminuida la expresión de aquellos enfocados en la proliferación celular, mientras que se incrementó la expresión de los genes involucrados en la muerte celular por apoptosis⁵⁸. Adicionalmente, en diversos estudios, tanto experimentales como teóricos, se ha encontrado la siguiente evidencia que apoya el mecanismo de acción propuesto para estos compuestos:

Incremento de las especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species, ROS). La presencia del cobre, el cual es un metal capaz de participar en la reacción tipo Fenton, en su estado reducido, promueve el incremento de especies $O_2^{\cdot -}$ e $\cdot OH$, el cual se ha observado en diversas líneas tumorales⁵⁹⁻⁶³ como en ensayos *in vitro*^{56,64} a través de la cuantificación espectrofotométrica de N-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina (5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide, DMPO) y por medio de resonancia electrónica paramagnética (*Electron paramagnetic resonance, EPR*).

Disminución de las especies antioxidantes como glutatión oxidado debido al incremento en las ROS en células de la línea tumoral HeLa⁵⁹, las cuales aumentan en presencia de un agente reductor como ácido ascórbico. También se encontró que este incremento de ROS es concomitante con apoptosis. Esta reducción de la concentración de glutatión también puede deberse a una coordinación directa con los compuestos⁶⁴⁵. Resultados similares se han reportado en células de carcinoma de pulmón⁶⁰ y neuroblastoma⁶³.

*Interferencia en la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa en mitocondria*⁵⁴. Se ha encontrado que los compuestos CasII-gly y CasIII-ia desacoplan la cadena respiratoria, inhiben la producción de ATP, modifican el potencial de la membrana mitocondrial y facilitan la liberación de Citocromo c, produciendo eventualmente apoptosis, la cual se ha encontrado ya sea por mecanismos tanto dependientes como independientes de caspasas⁴⁹.

Fragmentación de ADN. Al exponer al ADN a CasII-gly, los resultados muestran degradación del ADN, dicha fragmentación se ve incrementada cuando se agrega ácido ascórbico como agente reductor. Este efecto no se ve disminuido en presencia de superóxido dismutasa (SOD), sin embargo, sí en presencia de catalasa, lo que sugiere que sí hay producción de OH[·]⁴⁹; mientras que, la presencia de un potente secuestrante de ROS, N-acetil-L-cisteína, disminuyó la apoptosis de células de glioma C6 y las detuvo en la fase del ciclo celular G₀/G₁^{49,53,54,57,59}. Evidencia de la actividad nucleasa de los compuestos se ha observado también para CasIII-Ea [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acac)]NO₃ y en menor medida para CasIII-ia⁶⁵. Asimismo, se ha observado que esta familia de compuestos produce ruptura del ADN por medio de la hidrólisis de los grupos fosfatos o a través de un ataque radicalario en la molécula de deoxirribosa^{50,51,53,65}.

Interacción con el ADN. Rivero Müller y colaboradores (2007)⁵³ sugieren la formación de complejos ADN-Casiopeína[®]; el tipo de interacción propuesta varía dependiendo del compuesto involucrado, habiendo algunas que preferentemente actúan interaccionando con el surco menor o por intercalación en el surco mayor^{50,66}, lo cual, a su vez, ha producido una disminución de la respuesta SOS en bacterias deficientes de mecanismos de reparación de ADN⁵¹.

Estudios teóricos de modelado de la interacción de Casiopeínas con ADN por el método de funcionales de la densidad (*Density Functional Study*, DFT), así como por dinámica molecular muestran un efecto de intercalación seguido de una coordinación con los oxígenos de los grupos del fosfato^{67,68}.

Otras posibles dianas moleculares. Becco y colaboradores⁶³ evaluaron la interacción con las proteínas fibronectina, tubulina e integrina, involucradas en el ciclo celular y encontraron que el compuesto CasIII-Ea puede interaccionar con las tres, lo cual a su vez, puede provocar interferencias en el ciclo celular. En este trabajo, se determinó la CI_{50} de CasIII-ia, CasIII-Ea y CasII-gly en cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*, resultando en valores del mismo orden del fármaco de referencia nifurtimo (6 μ M).

1.4.2 Actividad biológica *in vitro*

La actividad biológica de estos compuestos podría ser consecuencia de uno o varios de los mecanismos de acción descritos anteriormente. En un estudio de relación cuantitativa estructura-actividad(QSAR) realizado previamente en el grupo de trabajo con compuestos $[Cu(N-N)(acetilacetato)]NO_3$ y $[Cu(N-N)(glicinato)]NO_3$ ⁴⁶, se encontró una correlación significativa entre la inhibición de la proliferación celular evaluada *in vitro* y las propiedades de óxido-reducción de la molécula, expresado como el $E_{1/2}$ del par Cu(II)/Cu(I), el cual está influido principalmente por el ligante diimina, provocando que los compuestos que contienen fenantrolina en su estructura, sean más activos que los compuestos con bipyridina, tanto *in vitro*, como *in vivo*, por lo que al fragmento de la molécula $[Cu(N-N)]$ se le ha asociado como el grupo farmacofórico de esta familia de compuestos y al grupo diimina se le denomina dentro del grupo de trabajo como el “ligante primario”, mientras que al grupo adicional que acompañe a este fragmento se le conoce como el ligante secundario. Al comparar la actividad de los compuestos con fenantrolina, se observó que la actividad se incrementa cuando se tienen sustituyentes donadores de densidad electrónica, lo cual

provoca un desplazamiento del potencial de media onda hacia un incremento en el carácter reductor del cobre. Este hallazgo apoya la hipótesis acerca de la generación de ROS como parte del mecanismo de acción, el cual a su vez se ha comprobado en ensayos con células^{56,59-61} y al evaluar la generación de radical hidroxilo^{56,64}.

A continuación, en la **Tabla 2**, se resumen las líneas tumorales en las cuales los algunos compuestos de esta familia han sido evaluados y que han presentado actividad citotóxica.

Tabla 2. Resumen de la actividad biológica *in vitro* de los compuestos de cobre en diferentes líneas tumorales.

Línea tumoral	Compuestos evaluados	Referencia
Carcinoma de ovario humano (CH1)	CasII-gly	De Vizcaya, 2000 ⁶⁹⁶
Leucemia murina (L1210)	CasII-gly	De Vizcaya, 2000 ⁶⁹⁶
Meduloblastoma	CasII-gly, CasIII-ia	Mejía, 2008 ⁷⁰⁷
Cérvico-uterino (HeLa)	CasII-gly 21 Casiopeínas® con variación en el ligante diimina y acetilacetato o glicinato CasII-gly CasIII-ia (c/chitosan) 13 Casiopeínas® con 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y variación en el ligante aminoacidato CasIII-ia (c/niosoma)	Alemón-Medina, 2008 ⁵⁹⁸ Bravo-Gómez, 2009 ⁴⁷⁹ Marín-Hernández, 2011 ⁷¹¹⁰ , Miranda-Calderón, 2011 ⁷²¹¹ Bravo-Gómez, 2012 ⁴⁵¹² Aguilar-Jiménez, 2016 ⁷³¹³

Cont. Tabla 2. Resumen de la actividad biológica *in vitro* de los compuestos de cobre en diferentes líneas tumorales.

Línea tumoral	Compuestos evaluados	Referencia
Cérvico-uterino (SiHa)	21 Casiopeínas® con variación en el ligante diimina y acetilacetato o glicinato	Bravo-Gómez, 2009 ⁴⁶⁹
Mama (MCF-7)	CasIII-ia 21 Casiopeínas® con variación en el ligante diimina y acetilacetato o glicinato CasII-gly	Carvalho-Chaigneau, 2008 ⁴⁷¹⁴ Bravo-Gómez, 2009 ⁴⁶⁹ Marín-Hernández, 2011 ⁷¹¹⁰
Colon (HCT-15)	21 Casiopeínas® con variación en el ligante diimina y acetilacetato o glicinato CasII-gly 12 Casiopeínas® con 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y variación en el ligante aminoacidato	Bravo-Gómez, 2009 ⁴⁶⁹ Marín-Hernández, 2011 ⁷¹¹⁰ Bravo-Gómez, 2012 ⁴⁵¹²
Glioma murino (C6)	CasII-gly	Trejo-Solís, 2005 ⁴⁹¹⁵ Marín-Hernández, 2011 ⁷¹¹⁰
Glioblastoma* (U87MG)	CasII-gly	Marín-Hernández, 2011 ⁷¹¹⁰
Melanoma murino (B16)	CasII-gly	Alemón-Medina, 2011 ⁶⁰¹⁶
Pulmón (A549, H157)	CasII-gly, CasIII-ia	Kachadourian, 2010 ⁶¹¹⁷
Próstata (PC3)	CasII-gly	Marín-Hernández, 2011 ⁷¹¹⁰
Pulmón (SKLU)	CasII-gly 12 Casiopeínas® con 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y variación en el ligante aminoacidato	Marín-Hernández, 2011 ⁷¹¹⁰ Bravo-Gómez, 2012 ⁴⁵¹²
Células escamosas orales humanas (CAL-27)	CasIII-La	Chávez-Cortéz, 2012 ⁶²¹⁸
Neuroblastoma (CHP-212)	CasIII-ia, CasIII-Ea, CasII-gly	Gutiérrez, 2013 ⁶³¹⁹

Cont. Tabla 2. Resumen de la actividad biológica *in vitro* de los compuestos de cobre en diferentes líneas tumorales.

Línea tumoral	Compuestos evaluados	Referencia
Neuroblastoma (SK-N-SH)	CasIII-ia, CasIII-Ea, CasII-gly	García-Ramos, 2016 ⁵⁶²⁰
Leucemia mieloide crónica (MEG01, K562)	CasII-Ea	Chávez-González, 2016 ⁷⁴²¹

* Probable glioblastoma

1.4.3 Actividad biológica *in vivo*

A partir de la información obtenida en las líneas tumorales, algunos de los compuestos se han evaluado en modelos *in vivo*, particularmente en rata^{46,75,76} y en el modelo de tumor xenotransplantado en ratón desnudo (nu/nu)^{47,48} para establecer la seguridad y toxicidad de esta familia de compuestos, así como su perfil farmacocinético⁷⁵ y hematotoxicidad^{75,76}. Estudios de farmacocinética también se han evaluado en perros⁷⁷ y conejos⁷⁸.

Los estudios de toxicidad de los compuestos que tenían en su estructura el ligante acetilacetato mostraron una tendencia similar a la observada en los ensayos *in vitro*, en los cuales, los compuestos más tóxicos resultaron aquellos que contenían fenantrolinas con sustituyentes donadores⁴⁶. A su vez, del trabajo anterior, se propuso que el ligante secundario, ya sea acetilacetato o glicinato, pudiera tener relevancia en el perfil farmacocinético de los compuestos, o ingreso de estos a la célula, por lo que posteriormente se evaluó la actividad antitumoral únicamente de dos de las moléculas más activas encontradas en dicho estudio, siendo estas, las Casiopeínas® III-Ma y VIII-gly: [Cu(N-N)(acetilacetato)]NO₃ y [Cu(N-N)(glicinato)]NO₃, donde N-N = 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina⁴⁸. Los resultados de este trabajo mostraron que,

efectivamente, el compuesto con glicinato presentó un incremento en la eficacia del compuesto con respecto a lo observado para el compuesto con acetilacetato.

Con respecto a los estudios farmacocinéticos en ratas, se encontraron diferencias significativas, particularmente con respecto al tiempo de vida media entre los compuestos CasIII-Ea [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ y Casiopeína III-La [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃, donde el cambio en la posición de los sustituyentes influye en los tiempos de distribución y eliminación de los compuestos⁷⁹.

La toxicidad de las Casiopeínas[®] involucra principalmente anemia hemolítica, arritmias cardíacas y disminución del ritmo cardíaco, la cual es dependiente de la velocidad de la administración del compuesto⁷⁷, sin embargo, se ha observado que estos efectos pueden llegar a ser reversibles tras el cese de exposición a los compuestos^{75-77,80}. Por otro lado, al evaluar la toxicidad en *Drosophila melanogaster*, se encontró que en los individuos expuestos a dos compuestos de cobre(II) en concentración de 1.5 mM, se redujo su viabilidad y tasa de desarrollo, pero a su vez se incrementó su longevidad con respecto a los individuos no tratados⁸¹.

En la **Tabla 3**, se resumen los ensayos biológicos *in vivo* en los cuales se han evaluado ya sea la toxicidad, farmacocinética o actividad antitumoral de algunos miembros de la familia de compuestos Casiopeínas[®].

Tabla 3. Resumen de la actividad biológica *in vivo* de los compuestos de cobre.

Actividad evaluada/modelo animal	Compuestos evaluados	Referencia
Farmacocinética/conejo	CasIII-ia	Antonio-Jarquín, 2002 ⁷⁸
Farmacocinética/rata	CasIII-ia	Romero-Ramírez, 2007 ⁸²
Toxicidad respiratoria aguda y cardiovascular/perro	CasIII-ia, CasII-gly	Leal-García, 2007 ⁷⁷
Actividad antitumoral/ratón desnudo (nu/nu)	CasIII-ia CasIII-ia, CasIII-Ma, CasVIII-gly	Carvallo-Chaigneau, 2008 ⁴⁷ Bravo-Gómez, 2013 ⁴⁸
Toxicidad aguda/ratón	12 Casiopeínas® con variación en el ligante diimina y acetilacetato	Bravo-Gómez, 2009 ⁴⁶
Hematotoxicidad/rata	CasIII-ia	Centeno-Llanos, 2012 ⁷⁶
Farmacocinética/rata	CasIII-Ea, CasIII-La	Vértiz-Serrano, 2012 ^{75,79}
Farmacocinética/perro	CasIII-ia CasII-gly	Fuentes-Noriega, 2002 ⁸³ Cañas-Alonso, 2013 ^{84,85}
Genotoxicidad/ratas	CasIII-ia	Pérez-Flores, 2014 ⁸⁶
Toxicidad/ <i>Drosophila melanogaster</i>	CasIII-ia, CasII-gly	Vidal, 2017 ⁸¹

1.4.4 Casiopeína III-ia

Dentro de la familia de compuestos de cobre(II), Casiopeínas®, el compuesto denominado CasIII-ia (**Figura 7**) ha sido seleccionado como el compuesto prueba para iniciar los ensayos de pruebas clínicas; lo anterior, debido a que la toxicidad *in vivo* de esta familia de compuestos es inherente a su actividad *in vitro*⁴⁶, por lo tanto se propuso con el objetivo de emplear un compuesto menos activo y por ende con menor toxicidad.

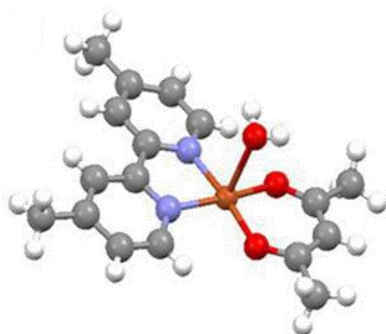


Figura 7. Casiopeína III-ia $[\text{Cu}(4,4\text{'-dimetil-2,2'\text{-bipiridina)}(\text{acetilacetionato})]\text{NO}_3$ ⁵⁶

La Casiopeína III-ia o CasIII-ia, cuya fórmula es $[\text{Cu}(4,4\text{'-dimetil-1,10-fenantrolina)}(\text{acetilacetionato})]\text{NO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, es un polvo fino de color azul claro, el cual, es soluble en agua, metanol y suero dextrosado pH=7.4 y en condiciones ambientales. El compuesto se mostró estable durante 12 h al ser evaluado en disolución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4 y 64 mM A 37°C). Por análisis termogravimétrico se observó una pérdida de masa del 1.18% a una temperatura de 60°C, correspondiente a dos moléculas de agua, así como dos pérdidas más de masa a 220 y 440°C. Al determinar el momento magnético del compuesto, se encontró que se trata de un compuesto paramagnético con un electrón desapareado, indicando que el estado de oxidación del cobre se encuentra como +2. La conductividad del compuesto corresponde a la de un electrolito 1:1, por lo que contiene una molécula de nitrato como contraion^{46,87}.

En sólido, este compuesto no presenta productos de degradación posterior a 6 meses durante 40 ± 2 °C y humedad relativa de $75 \pm 5\%$. En disolución, a su vez, es estable a fotólisis (luz UV, 1h), hidrólisis básica (NaOH 1 M) y oxidación (H_2O_2 30%, 24h). En condiciones ácidas (HCl 1 M), se observa un pico de degradación luego de un día de análisis⁸⁷. La titulación de una disolución 1 mM de este compuesto con 0.2 M de NaOH (formación) o 0.1 M de HNO_3 (descoordinación) demostró una estabilidad de este compuesto en un intervalo de pH de 6.2 a 8.5 (Datos por publicar, Tesis de Licenciatura de Javier Díaz).

Con respecto a su actividad biológica, se ha determinado la concentración inhibitoria media en las siguientes líneas tumorales humanas: HeLa (cervico-uterino dependiente de VPH), SiHa (cervico-uterino de células escamosas), MCF-7 (cáncer metastásico de mama), HCT-15 (colon)⁴⁶, CHP-212 (neuroblastoma) y SK-N-SH (neuroblastoma), todas en el orden de concentraciones micromolares, sin embargo, las concentraciones este compuesto significativamente menor este compuesto que los análogos e incluso que el cisplatino⁴⁶. Asimismo, Se observó que la Casiopeína III-ia disminuyó la viabilidad celular e indujo apoptosis sobre HCT-15 *in vitro* e *in vivo*, de manera dosis dependiente y ciclo celular independiente, a través de la activación de Bax y caspasas, aparentemente por la vía intrínseca. Por otro lado, se evaluó la sobrevida en modelos murinos: L1210 (leucemia), S180 (sarcoma), B16 (melanoma)⁸⁹. En el modelo de ratón xenotransplantado (nu/nu) con HCT-15 y administrado en una dosis de 6 mg/kg, presentó un incremento en el retraso del volumen tumoral relativo, así como en el tiempo de duplicación del tumor; el índice mitótico disminuyó, mientras que el índice apoptótico se incrementó, con respecto a los resultados observados para el control negativo y el control positivo, administrado con cisplatino⁴⁷. Por otro lado, en el caso de células no tumorales, se determinó la concentración inhibitoria media de este compuesto en linfocitos, encontrándose una concentración de 4.7 mM, aproximadamente 250 veces superior a la observada en líneas tumorales⁵⁶. Por otro lado, la evaluación del margen terapéutico de seguridad verdadero en perros se encontró en un intervalo de 4.7 a 23.6 mg/m² ⁷⁷. Estos resultados, en conjunto, sugieren un incremento en la actividad *in vivo* del compuesto CasIII-ia, con respecto a la actividad observada *in vitro*, y teniendo al cisplatino como control positivo evaluados en conjunto.

Con respecto en la toxicidad *in vivo*, en general para esta familia de compuestos, se encontró que presentan dosis letales superiores a la del cisplatino, donde la Casiopeína III-ia fue una de las menos tóxicas, en congruencia con el efecto observado de la actividad *in vitro*⁹. La Casiopeína III-ia, a dosis de 6.74 $\mu\text{mol/kg}$ y 13.5 $\mu\text{mol/kg}$ 4x6, produce adhesiones e inflamación sobre la superficie peritoneal de los

ratones nu/nu, siendo el último efecto consecuencia de la irritación crónica⁴⁷. Finalmente, en un estudio de la hematotoxicidad del compuesto en ratas Wistar, se encontró que la administración de la DL₁₀ (3 mg/kg ó 6.74 µmol/kg), produce daño hemolítico agudo de baja severidad 24 horas posteriores a la administración del mismo, manifestado como la disminución significativa de la hemoglobina, el hematocrito, el volumen corpuscular medio (VCM), el incremento en las alteraciones morfológicas de los eritrocitos y la presencia de hematuria y hemoglobinuria, siendo dicho daño reversible a los 21 días posteriores a la administración del compuesto, por lo que se concluyó que la dosis de 6.74 µmol/kg de Casiopeína III-ia es segura hematológicamente en el protocolo propuesto para el inicio de la Fase Clínica I⁷⁶. El tipo de daño es consecuencia de la generación de especies reactivas de oxígeno y es similar al daño provocado por la toxicidad asociada al cobre⁹⁰⁻⁹².

Finalmente, en un estudio *in vivo* en ratas machos, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1 se encontró que el compuesto CasIII-ia no induce daño genotóxico o citotóxico en ninguno de los modelos tratados con tratamientos agudo, subcrónico y crónico, determinado a través del ensayo de inducción de micronúcleos, sí embargo sí se observó fetotoxicidad entre los días 6-15 y administrando una dosis de 7 mg/kg⁸⁶.

1.5 Terapia combinatoria y evaluación de las interacciones farmacológicas.

Muchos tumores pueden responder a un único agente quimioterapéutico, sin embargo, dicha terapia rara vez es del tipo curativo, incluso ante carcinomas sensibles. Ante lo anterior, una de las estrategias para contrarrestar resistencia consiste en el uso de dos o más fármacos con el objetivo de mejorar la respuesta al maximizar la muerte celular y minimizar la resistencia, así como disminuir los efectos adversos. En general, las combinaciones deben satisfacer los siguientes principios⁸:

- Los compuestos en un régimen deben ser eficaces como agentes individuales e idealmente deberán ser usados en su dosis óptima y con su respectivo régimen de dosificación⁸.
- Generalmente se deben emplear compuestos con toxicidades diferentes, de manera que se evite la toxicidad aditiva; la combinación de fármacos con toxicidades similares puede llevar a una disminución de la dosis y en consecuencia, en su eficacia⁸.

Asimismo y, como ya se ha dicho, una de las desventajas de los fármacos es la posibilidad de las células a generar resistencia a ellos, que puede ser de tres tipos: intrínseca, en la que los pacientes no muestran mejora una vez que se inicia el tratamiento; adquirida, que se genera después de una aparente recuperación inicial del paciente y finalmente, resistencia cruzada, la cual es específica del mecanismo de acción y se presenta debido a un incremento en la expresión de proteínas involucrada en la eliminación de los fármacos o de los mecanismos de reparación del ADN^{93,94}. Una de las alternativas para contrarrestar estos efectos, así como disminuir la concentración de fármaco, sin que haya una disminución en la actividad, es el uso de terapias combinadas, sin embargo, el uso de mezclas implica la evaluación completa como si se tratara de un compuesto *de novo*, es decir, debe realizarse la evaluación de la actividad, eficacia y seguridad iniciando desde las fases preclínicas del desarrollo de un fármaco, así como la elucidación de los mecanismos de acción y la reformulación de los agentes involucrados en la combinación⁹⁵.

El desarrollo de los fármacos consiste en varias etapas de evaluación de eficacia para su empleo en humanos antes de ser comercializada⁹⁶. La fase preclínica del desarrollo consiste en la búsqueda de nuevas moléculas para el tratamiento de alguna enfermedad existente o el uso de moléculas ya evaluadas en modelos nuevos, en las cuales, una vez que se demuestra la actividad biológica en modelos *in vitro* e *in vivo* se procede a evaluar la eficacia en seres humanos, ingresando así la etapa de estudios clínicos.

Antes de iniciar con las evaluaciones preclínicas de una mezcla, es necesario tomar en cuenta las probables interacciones que se puedan llevar a cabo entre dos o más compuestos, las cuales pueden ser de dos tipos: las favorables o desfavorables. Las primeras se refieren a un incremento en la actividad de ambos compuestos en presencia de cantidades menores a las que se requerirían para obtener un efecto esperado, es decir, se observa un desplazamiento en la curva dosis respuesta hacia dosis menores, con respecto a la suma de las curvas de los compuestos individuales. A este efecto se le llama sinergia de potenciación. Las interacciones desfavorables se refieren a la disminución de los efectos en presencia de la mezcla de ambos compuestos, en contraste con los efectos de los compuestos individuales, esto es, un incremento en las concentraciones para obtener el efecto esperado, a lo que se conoce como antagonismo⁹⁷. La presencia de una sinergia de potenciación sugiere que ambos compuestos actúan a través de diferentes rutas metabólicas o mecanismos de acción, que se complementan para dar un mayor efecto. En contraste, una interacción antagónica puede ser competitiva: en la que el efecto total se verá reflejado en una disminución con respecto a la suma de los efectos, debido a la competencia de ambos sustratos por un mismo blanco o; no competitivo, en el que los compuestos actúan por vías independientes que interfieren entre sí, dando como resultado el decremento en la potencia. Cuando una mezcla de compuestos se comporta sin diferencia significativa con respecto a la suma de los efectos de ambos compuestos, entonces se tiene una sinergia de adición, en la que ambos compuestos actúan como agonistas competitivos con el mismo mecanismo de acción^{98,99}.

Las interacciones farmacológicas pueden observarse en tres niveles: farmacéutico, farmacocinético y farmacodinámico. Las interacciones farmacéuticas consisten en las reacciones que los compuestos presenten en disolución, previo a su administración; las interacciones farmacocinéticas se refieren a la influencia que tenga uno de los compuestos sobre la absorción, distribución, biotransformación y eliminación del otro, y; finalmente, las interacciones farmacodinámicas se refieren a la

competencia en los blancos terapéuticos de cada compuesto, y si interfieren o no en el efecto global que se evalúa⁹⁷, en este caso, la actividad antiproliferativa.

Una de las desventajas de la terapia combinatoria consiste en que generalmente se realiza de manera empírica^{100,101}, considerando los criterios antes mencionados como pautas para la combinación¹⁰¹, sin embargo, también se han propuesto diversos métodos que permitan predecir la relación dosis-efecto de los fármacos, así como de sus combinaciones, principalmente en busca de interacciones sinérgicas. La evaluación de los efectos puede llevarse a cabo por medio de los siguientes métodos: Análisis fraccionado, ecuación del efecto medio, análisis isoblográfico, método de superficie de respuesta, los cuales se describirán a continuación. La propuesta de las combinaciones debe considerar si los fármacos se administrarán de manera simultánea o secuencial, así como la diferencia entre las dosis/concentraciones: si se encuentran en el mismo orden de magnitud, se sugiere se emplee una relación constante entre ambas¹⁰⁰.

1.5.1 Análisis fraccionado

Consiste en la evaluación de compuestos en combinación, cuyo efecto es superior al producto de los efectos individuales, es decir, $0.5 \times 0.5 > 0.25$, sin embargo, el cálculo requiere que las curvas dosis-respuesta se comporten de manera lineal¹⁰⁰.

Si se consideran dos fármacos A y B, con potencias de D_A y D_B (dosis a un nivel de efecto, por ejemplo, DE_{50}) y potencia relativa descrita en la **Ecuación 1**¹⁰².

$$R = \frac{D_A}{D_B} \quad (\text{Ec. 1})$$

dado que, la combinación de dosis d_A y d_B son equipotentes a D_A y D_B . La combinación será aditiva si:

$$d_A + R d_B = D_A \quad (\text{Ec. 2})$$

1.5.2 Análisis isoblográfico

El análisis isoblográfico fue propuesto por Tallarida^{98,99,103}, y consiste en la evaluación de combinaciones de compuestos considerando dosis equiefectivas, es decir, concentraciones que generen el mismo nivel de efecto que los compuestos individuales. Experimentalmente, se evalúan “n” niveles de efecto (25%, 50%, 75%, 90%, etc.) y “m” combinaciones, con los cuales se construyen gráficas conocidas como isobogramas. La sinergia se establece cuando los valores de las concentraciones de cada compuesto se aproximan al origen y a medida que se alejan, el carácter subaditivo se incrementa, siendo el punto de referencia las líneas de aditividad de cada efecto. En la **Figura 8** se esquematizan en (A) cinco curvas de dosis-respuesta de los compuestos a, b y tres combinaciones de estos, y en (B) los isobogramas procedentes de las curvas de las combinaciones.

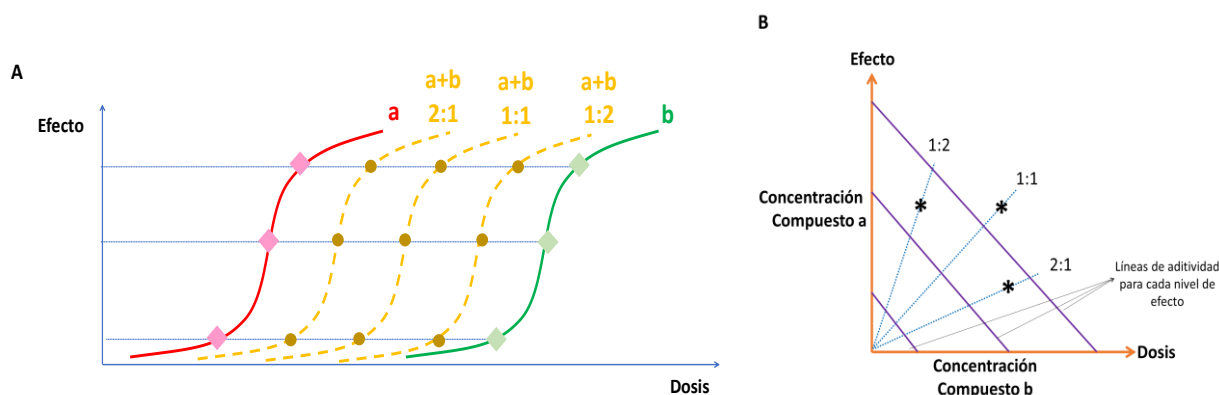


Figura 8. Análisis isoblográfico A) Curvas dosis respuesta de tres compuestos hipotéticos. Las líneas horizontales representan tres niveles de efecto y los círculos amarillos (●)

representan concentraciones equiefectivas. B) Isobogramas de las combinaciones esquematizadas en A.

Para compuestos que presentan un orden de magnitud similar¹⁰¹, la proporción de los compuestos se propone en función de la potencia relativa considerada como una razón constante (R) entre ambos, de acuerdo con la **Ecuación 3**:

$$R = \frac{\text{Dosis A}}{\text{Dosis B}} \quad (\text{Ec. 3})$$

Considerando al compuesto A como el fármaco de referencia, se pueden proponer la combinación (a,b) equivalente a una Dosis de A, de acuerdo a la **Ecuación 4**, y si se considera como referencia al fármaco B, entonces la combinación (a,b) sería equivalente a una Dosis de B en función de la **Ecuación 5**.

$$A = a + Rb \quad (\text{Ec. 4})$$

$$B = \frac{a}{R} + b \quad (\text{Ec. 5})$$

Debido a que el isobograma no permite el cálculo directo de significancia estadística, por lo que análisis posteriores son requeridos, entre los cuales se encuentra establecer a través de una prueba de "t" de student entre la dosis total administrada y la fracción del compuesto de referencia¹⁰³.

Asimismo, se puede calcular el índice de interacción, γ (**Ecuación 6**)¹⁰⁴, el cual es calculado a partir de los valores de potencia, puede indicar el tipo de la interacción farmacológica y la magnitud de esta.

$$\gamma = \frac{a}{A} + \frac{b}{B} \quad (\text{Ec. 6})$$

Entre las desventajas de este análisis, principalmente se encuentra la limitante del uso de isobogramas lineales, los cuales provienen de la combinación de compuestos con curvas dosis-respuesta paralelas, en caso contrario, se arriesga a la construcción de isobogramas no lineales, lo que dificulta su interpretación, así como la falta de significancia estadística¹⁰⁵.

1.5.3 Ecuación del efecto medio

Propuesto por Chou y Talalay (1984)¹⁰⁶, consiste en la evaluación de sinergias a través de la interpolación de los efectos obtenidos en la combinación en las ecuaciones del efecto medio de cada uno de los fármacos involucrados en la combinación. Las ecuaciones del efecto medio (**Ecuación 7**) se obtienen a través de la transformación logarítmica de las concentraciones y del efecto, tras la cual se puede realizar una regresión lineal a la recta obtenida (**Ecuación 8**), que a su vez puede realizarse por medio del programa Compusyn^{®107} diseñado por los mismos autores; este calcula el Índice de Combinación (CI), descrito en la **Ecuación 9** para compuestos mutuamente excluyentes y en la **Ecuación 10**, para compuestos no excluyentes y construye los isobogramas normalizados. A su vez permite emplear combinaciones independientemente si se trabaja a una relación constante entre ambos compuestos para cada combinación o en relación variable¹⁰¹.

$$\frac{fa}{fu} = \left(\frac{D}{D_m}\right)^m \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\log\left(\frac{fa}{fu}\right) = m\log D - m\log D_M \quad (\text{Ec. 8})$$

El cálculo de CI se lleva a cabo a través de la siguiente ecuación:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} \quad (\text{Ec. 9})$$

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} + \frac{(D)_1}{(D_x)_1} \frac{(D)_2}{(D_x)_2} \quad (\text{Ec. 10})$$

Los valores $(D_x)_1$ y $(D_x)_2$ corresponden a los valores teóricos de concentración que presentarán el valor del efecto encontrados en las combinaciones y se interpolan de la ecuación del efecto medio.

A partir de los valores de CI, se puede estimar el tipo de interacción presente en la combinación y el cual se resume en la **Tabla 4**. Este método es uno de los más empleados ya que no se ve limitado a la forma de las curvas dosis-respuesta o requiere conocimiento acerca de la exclusividad/no exclusividad de los mecanismos de acción de los fármacos involucrados¹⁰⁶.

Tabla 4. Índices de combinación y su significado.

IC	Descripción
< 0.10	Superaditividad muy fuerte
0.10-0.30	Superaditividad fuerte
0.30-0.70	Superaditividad
0.70-0.85	Superaditividad moderada
0.85-0.90	Superaditividad leve
0.90-1.10	Casi aditivo
1.10-1.20	Subaditividad leve
1.20-1.45	Subaditividad moderada
1.45-3.30	Subaditividad
3.3-10.00	Subaditividad fuerte
> 10.00	Subaditividad muy fuerte

1.5.4 Superficie de respuesta

El método de superficie de respuesta se basa en la representación gráfica en tres dimensiones del isoblograma¹⁰¹, considerando que las dosis de ambos compuestos involucrados en la combinación son las variables independientes sobre el plano cartesiano (x, y), mientras que el efecto obtenido corresponde a la variable dependiente que se eleva sobre el plano en el eje z. Posteriormente, se emplea como referencia valores de la curva dosis-respuesta como referencia de la aditividad, o a través de la construcción de hipérbolas, cuando la forma de la curva, así lo requiere²². Debido a que el uso de modelos matemáticos para ajustar el comportamiento implica el conocimiento de estadística más elaborada, el uso de este método es poco empleado en los ensayos de evaluación de combinaciones de fármacos¹⁰¹.

1.5.5 Evaluaciones de interacciones farmacológicas con Casiopeínas®

Por otro lado, los compuestos de cobre(II), Casiopeínas® se han evaluado en combinación con otros compuestos, ya sea en ensayos antituberculosos¹⁰⁸ o con agentes anticancerosos^{62,109} o exponiendo combinaciones de estos compuestos con adriamicina al ADN⁶⁵, los cuales, en todos los casos se obtuvieron combinaciones que presentaron un incremento de la actividad evaluada.

En el primer caso, se evaluaron combinaciones de una de tres Casiopeínas® (CasIII-ia, CasII-gly o CasIII-Ea) con isoniazida, rifampicina o etambutol, y evaluadas a través del método del “tablero de damas” y la determinación del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI, por sus siglas en inglés). siendo las combinaciones más activas aquellas que contenían cualquier de los compuestos de cobre y etambutol en cepas resistentes y susceptibles a los fármacos de referencia. El resto de las combinaciones resultaron ser aditivas o indiferentes¹⁰⁸.

Por otro lado, se determinó el efecto coadyuvante del compuesto CasIII-La con 5-Fluorouracilo (5FU) en concentraciones de 2.1 $\mu\text{mol/L}$ para CasIII-La y de 50, 75, 100, 150 y 200 $\mu\text{mol/L}$ para 5FU, se encontró que efectivamente se incrementaba la actividad de ambos, hasta alcanzar ~40% de inhibición para la combinación de 150+2.1 y 200+2.1 $\mu\text{mol/L}$ con respecto al 70% de inhibición (CasIII-La) y ~65% (5-FU). A su vez, se evaluó el daño citotóxico en fibroblastos de las mismas concentraciones y hasta en una concentración de 300+2.1 $\mu\text{mol/L}$, encontrándose una disminución máxima en la viabilidad celular del 60% en todos los casos⁶².

Finalmente, se han evaluado los efectos sinérgicos en la línea tumoral HeLa del compuesto CasII-gly con dieciséis fármacos de uso en la clínica, nueve compuestos no aprobados para su uso y tres antimitocondriales, todos evaluados en concentraciones menores a sus concentraciones inhibitorias medias. En este estudio, el cual se evaluó la sinergia entre los compuestos a través de la ecuación de

independencia de Bliss¹¹⁰, se encontró que al emplear combinaciones de este compuesto en concentraciones entre 0.3 y 1.0 μM con paclitaxel (1.5 μM agente antimicrotubular), ciclofosfamida (250 μM , agente alquilante), cisplatino (50 μM , agente platinante), carboplatino (150 μM , agente platinante) y gemcitabina (500 μM antimetabolito de la enzima ribonucleótido reductasa), se obtuvo un incremento en la citotoxicidad de este compuesto, mientras que con los compuestos anti-mitocondriales se encontró un incremento en la proliferación. Con el resto de los compuestos evaluados, se encontró una interacción del tipo aditivo¹⁰⁹.

CAPÍTULO II.

JUSTIFICACIÓN

II. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales tratamientos contra el cáncer es la quimioterapia, la cual involucra compuestos principalmente de origen orgánico como el taxol o la vinblastina. El Platino es el único metal empleado y aprobado para su uso en humanos en compuestos de coordinación como el cisplatino y sus derivados. Entre las desventajas que presenta cualquier compuesto con propiedades terapéuticas, se encuentra la resistencia de las células hacia estos. La resistencia a un compuesto puede llevarse a cabo de forma intrínseca, es decir, las células cuentan con mecanismos naturales que le permiten contrarrestar los posibles daños de los fármacos, o bien, se puede tratar de resistencia generada por el compuesto, en la cual las células presentan la resistencia después de un tiempo de ser expuestas a éste⁹³. Derivado de la resistencia adquirida, existe a su vez la resistencia cruzada, que se genera a partir de la exposición de las células a un compuesto una vez que se cambia la terapia: el segundo compuesto ya no es activo debido a que este actúa a través de una ruta en común con el primer compuesto⁹⁴.

Una de las estrategias para contrarrestar la resistencia de las células hacia un fármaco consiste en el empleo de mezclas de compuestos que presenten mecanismos de acción diferentes de manera que el daño a las células sea irreparable. Adicionalmente, el uso de mezclas de compuestos permite la disminución de las concentraciones para alcanzar el mismo efecto, lo que a su vez permitiría una menor exposición a concentraciones dañinas para las células normales, o la acumulación de un compuesto en un solo órgano, incrementado así el margen terapéutico de dos compuestos, sin embargo, generalmente la definición de las combinaciones generalmente se lleva a cabo directamente en pacientes y de manera empírica, por lo que es importante desarrollar e implementar métodos que permitan la evaluación de los compuestos empleados en combinación¹⁰¹.

En este trabajo se busca evaluar la actividad antiproliferativa de trece compuestos en combinación con el compuesto denominado CasIII-ia en siete proporciones para cada compuesto y en dos líneas tumorales: HeLa (adenocarcinoma cervicouterino) y CHP-212 (neuroblastoma). CasIII-ia se eligió ya que actualmente se encuentra en proceso de ser evaluado en Fase clínica 1, debido a las siguientes características:

1. Al comparar su actividad en diversas líneas celulares con respecto al cisplatino, se encontró que presenta actividad menor en líneas celulares importantes, sin embargo, superó a este compuesto en líneas tumorales cuyas opciones de tratamiento están limitadas, como son los neuroblastomas, los cuales se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Resumen de actividades de CasIII-ia y cisplatino en diversas líneas tumorales.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)					
	HeLa ⁴⁶	SiHa ⁴⁶	MCF-7 ⁴⁶	HCT-15 ⁴⁶	CHP-212 ⁶³	SK-N-SH ⁵⁶
CasIII-ia	18.2	14.5	15.9	40.5	47.5	69.7
Cisplatino	5.1	5.4	5.6	21.8	226.7	123.3

2. La evaluación de este compuesto en cultivos de linfocitos presentó un valor de 4.7 Mm⁵⁶, en contraste con el cisplatino, cuyo valor corresponde a 19 μM¹¹¹.

3. Asimismo, la actividad antitumoral observada en el modelo de ratón desnudo en contraste con el cisplatino, en la cual se obtuvo una disminución en el tamaño del tumor superior al cisplatino⁴⁷.

En contraste, la elección de los compuestos a evaluar en combinación con el compuesto CasIII-ia, se basó en la potencia observada en ensayos de inhibición de la proliferación, así como de toxicidad, eligiéndose los más potentes en ambos casos y considerando su solubilidad en agua⁴⁶. En el caso de los fármacos antineoplásicos, la bleomicina, cisplatino, epirubicina, mitomicina C, netropsina y oxaliplatino, la elección consistió en el mecanismo de acción, así como en su actividad en las líneas tumorales evaluadas. Asimismo, las líneas tumorales se eligieron como referencia de evaluación para el cernimiento de la actividad de compuestos potenciales anticancerosos (HeLa) y por la importancia epidemiológica que representan en México (HeLa y CHP-212)⁵. Cabe señalar que la netropsina no es un compuesto aprobado para su uso en humanos, sin embargo, se eligió ya que en un estudio en el cual se administró en conjunto, la adriamicina con los compuestos CasIII-ia, CasIII-Ea y CasII-gly, se encontró que este potenciaba la actividad nucleasa de las Casiopeínas[®], por lo que se decidió evaluar la actividad de un compuesto con mismo mecanismo de acción en las líneas tumorales estudiadas.

CAPÍTULO III.

Hipótesis

III. HIPÓTESIS

La Casiopeína III-ia en presencia de otros compuestos, podrá incrementar su actividad antiproliferativa *in vitro*, lo cual debe verse reflejado en una disminución de las concentraciones requeridas de ambos compuestos con respecto al efecto obtenido.

CAPÍTULO IV.

Objetivos

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar las interacciones farmacológicas *in vitro* entre una mezcla de un compuesto de coordinación de cobre (II), Casiopeína III-ia, con compuestos de la misma familia y compuestos de uso en la clínica.

Objetivos particulares

1. Evaluar las interacciones químicas entre la CasIII-ia y los siguientes compuestos: CasIII-Ea, CasIII-La, CasIII-Ma, CasII-gly, CasVI-gly, casiopeína VIII-gly, bleomicina, cisplatino, epirubicina, mitomicina C, netropsina y oxaliplatino
2. Realizar la proliferación de las líneas tumorales HeLa y CHP-212.
3. Determinar la concentración inhibitoria media de siete compuestos de coordinación de cobre(II), Casiopeínas: CasIII-ia, CasIII-Ea, CasIII-La, CasIII-Ma, CasII-gly, CasVI-gly, CasVIII-gly, y de seis compuestos con diferentes mecanismos de acción: bleomicina, cisplatino, epirubicina, mitomicina C, netropsina y oxaliplatino en las líneas tumorales HeLa y CHP-212.
4. Evaluar las interacciones farmacológicas presentes entre el compuesto CasIII-ia y cada uno de los siguientes compuestos: CasIII-Ea, CasIII-La, CasIII-Ma, CasII-gly, CasVI-gly, CasVIII-gly, cisplatino, epirubicina, mitomicina C, netropsina y oxaliplatino en las líneas tumorales HeLa y CHP-212.
5. Evaluar el efecto de las combinaciones en el plásmido PBR322 como evidencia del daño de las combinaciones en el ADN.

CAPÍTULO V.

Material y Métodos

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Las Casopeínas® se sintetizaron con base a las patentes y se caracterizaron por AE, IR UV. Los fármacos y disolventes se usaron sin purificación posterior.

5.1 Diseño Experimental

Se realizaron pruebas a dos grupos de compuestos, divididas en dos series, ejemplificadas en las **Figuras 9** y **10**. La primera serie consistió en seis compuestos de coordinación de cobre(II) de la misma familia de CasIII-ia y el segundo grupo lo conformaron fármacos ya empleados en la clínica. El análisis estadístico de las interacciones consistió en un análisis isoblográfico descrito por Tallarida⁹⁸ complementado con la prueba estadística *t* de student para establecer diferencias en los valores del índice de combinación. Asimismo, en el **Anexo 4** se incluyeron las curvas y los resultados del paralelismo de las curvas concentración respuesta determinadas en la línea tumoral HeLa y CHP-212.

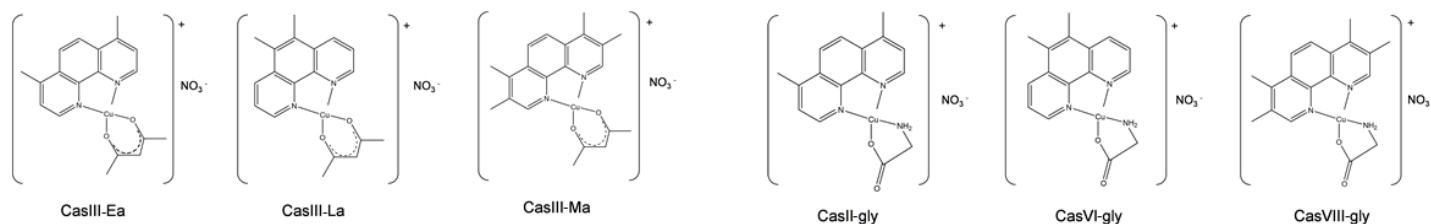


Figura 9. Serie A¹, Compuestos de coordinación de cobre(II)

- CasIII-Ea, [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃·H₂O;
CasIII-La, [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃·H₂O;
CasIII-Ma, [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃·H₂O;
CasIII-Ma, [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO₃·H₂O;
CasVI-gly, [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO₃·H₂O;
CasVIII-gly, [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO₃·H₂O.

¹ Más información acerca de los compuestos de la Serie A y de la Serie B, se encuentra en el **Anexo 1**.

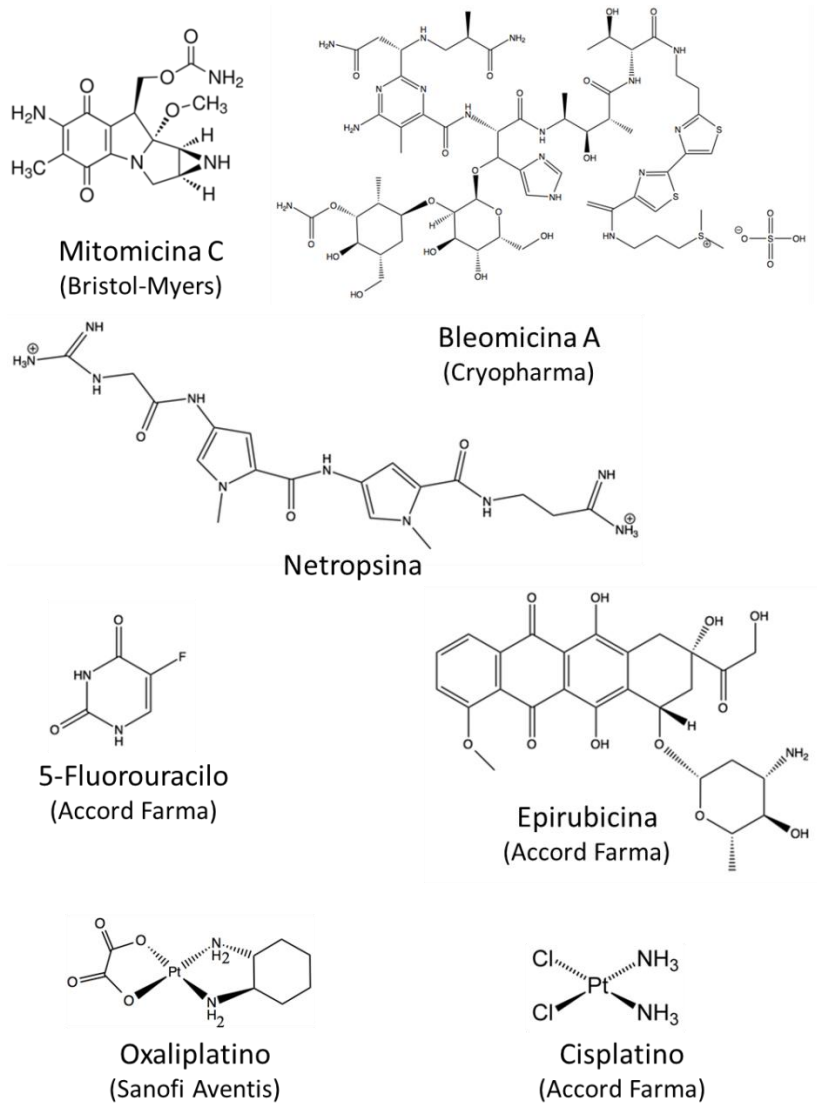


Figura 10: Serie B, Fármacos comerciales aprobados para el tratamiento de diversas neoplasias malignas, aprobados por la Federal Drug Administration y la Secretaría de Salud, a excepción de la netropsina que fue elegida por ser el único compuesto que se intercala en el surco menor del ADN.

Debido a que no todos los fármacos comerciales son activos en todas las líneas tumorales, las combinaciones se evaluaron en función de la actividad de éstos, como se indica en la **Tabla 6**, así como el mecanismo de acción a través del cual actúan.

Tabla 6. Fármacos evaluados en cada una de las líneas tumorales de este trabajo. HeLa (adenocarcinoma cérvico-uterino) y CHP-212 (neuroblastoma)

	<i>HeLa</i>	<i>CHP-212</i>	<i>Mecanismo de acción</i>
5-Fluorouracilo	X	X	Análogo del uracilo.
Bleomicina	X		Agente metilante y generador de radicales libres.
Cisplatino	X	X	El Platino se coordina con el DNA produciendo entrecruzamientos intracatenarios.
Epirubicina	X		Agente intercalante e inhibidor de la enzima Topoisomerasa II.
Mitomomicina C	X		Agente metilante.
Netropsina	X	X	Se une al surco menor del DNA.
Oxaliplatino	X	X	El Platino se coordina con el DNA produciendo entrecruzamientos intracatenarios.

5.2 Reactivos

El medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y el medio Eagle modificado por Dulbecco enriquecido con la mezcla de nutrientes F-12 (DMEM-F12), así como la disolución amortiguadora de fosfatos se adquirieron a través de ATCC; el suero fetal bovino (FBS), la disolución de aminoácidos no esenciales (*non-essential aminoacids*, NEAA), el suero antibiótico-antimicótico (anti-anti) y la disolución de tripsina-EDTA 0.25% se adquirieron a través de GIBCO. El ácido tricloroacético y el ácido acético glacial se adquirieron a través de Baker. La sulforrodamina B se adquirió a través de Sigma-Aldrich. La preparación de las disoluciones adicionales se muestra en el **Anexo 6**, mientras que el cálculo del número de células requerido para los ensayos se ejemplifica en el **Anexo 7**.

5.3 Equipos

El análisis elemental se llevó a cabo a través de un equipo Analizador EA 1108 de Fission Instruments y Espectrofotómetro de IR Nicolet Avatar 320 FT-IR.

La determinación de las interacciones químicas se llevó a cabo con los espectrofotómetros UV-visible HP 8452A (CasIII-La y CasII-gly) y ThermoScientific Genesys 10S UV-Vis (CasIII-Ea, CasIII-Ma, CasVI-gly, CasVII-gly y cisplatino). La cuantificación de la sulforrodamina B en las placas de 96 pozos se llevó a cabo con un lector de placas LabSystems Multiskan MS.

5.4 Determinación de las interacciones químicas presentes en la combinación de los compuestos

Con el objetivo de establecer si los compuestos no reaccionan entre sí y si es posible administrarlos en conjunto a partir de una disolución *stock*, se determinaron las interacciones químicas a través del desplazamiento en la banda *d-d* del cobre(II) del compuesto CasIII-ia a 602 nm por espectrofotometría UV-vis, posterior a su combinación con cada uno de los compuestos a evaluar. Las determinaciones se realizaron empleando disoluciones $1 \times 10^{-3}M$ de cada uno de los compuestos y en proporción 1:1. Asimismo, se evaluaron las interacciones químicas de otros compuestos (Netropsina, 5-Fluorouracilo, Bleomicina A, Mitomicina C y Epirubicina) con CasIII-ia.

5.5 Descongelación y proliferación de las células tumorales

Las células se descongelaron a temperatura ambiente y se depositaron en cinco mililitros de medio DMEM para las células HeLa y DMEM F-12 para las células CHP-212, ambos suplementados con FBS 10%, suero anti-anti 1% y NEAA 1%, contenidos en un tubo Falcon de 15 mL. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, tras los cuales el sobrenadante se decantó y se agregó un mililitro del mismo medio para resuspender las células. Las células resuspendidas se cultivaron en una botella de cultivo CORNING® de 75 cm² que contenía 7 mL de medio DMEM suplementado. Las botellas con las células se colocaron en la incubadora a 37 °C y 5% de atmósfera de CO₂.

Una vez que las células se adhirieron a la superficie de la botella, se cambió el medio y se dejaron proliferar hasta que la superficie de la botella presentó 80% de confluencia. Posteriormente, las células se levantaron con tripsina-EDTA 0.5x y se separaron en dos botellas con 7 mL de medio DMEM. Finalmente, y una vez que se tuvieron la cantidad de células necesarias para llevar a cabo los ensayos, las células se cosecharon y se contaron en una cámara de Neubauer con azul tripano 0.4% para su posterior cultivo en placas de 96 pozos.

5.6 Determinación de la concentración inhibitoria media de los compuestos

Uno de los requisitos del análisis isobolográfico es emplear concentraciones de los compuestos en proporciones equiefectivas, es decir que tengan el mismo efecto. Considerando lo anterior, se pueden elegir las concentraciones a cualquier nivel, por ejemplo, CI_{10} , CI_{50} o CI_{90} , por mencionar algunas. En este trabajo se eligió trabajar con proporciones de la CI_{50} debido a que durante la construcción de las curvas concentración-respuesta, este valor está asociado a un menor porcentaje de error con respecto a los puntos correspondientes a valores más cercanos a las asíntotas de la curva. Asimismo, se eligió emplear el ensayo de inhibición de la proliferación y tinción con Sulforrodamina B, propuesto por Skehan y colaboradores¹¹², como ensayo de cernimiento en la búsqueda por encontrar combinaciones de los compuestos que incrementen la actividad empleando menores concentraciones de los compuestos involucrados.

A continuación, se describe brevemente el procedimiento del ensayo de evaluación de la inhibición de la proliferación: En una caja de 96 pozos se cultivaron 20 000 células por pozo y 100 μ L de medio DMEM suplementado. Las cajas se incubaron a 37 °C y 5% de CO_2 durante 24 h, tras las cuales, el medio se retiró y se colocó medio fresco con disoluciones de los compuestos de acuerdo con lo descrito

en la **Tabla 7**. Los tratamientos se administraron por triplicado en cada placa y el procedimiento se realizó al menos tres veces de manera independiente.

Tabla 7. Concentraciones empleadas en la determinación de la CI_{50} a 24 horas y 48 horas[‡] en cultivos de las líneas tumorales HeLa y CHP-212.

Línea tumoral	Compuestos	Concentraciones evaluadas	
		$\mu\text{g/mL}$	μM
HeLa	CasIII-ia, Cisplatino	3.0, 10.0, 30.0, 100.0	Depende de la MM del compuesto
	CasIII-Ea, CasIII-La, CasIII-Ma, CasII-gly, CasVI-gly y CasVIII-gly	0.01, 0.1, 1.0, 10.0	Depende de la MM del compuesto
	Oxaliplatino [‡]	0.2, 2.0, 20.0, 200.0/	0.5, 5.0, 50.0 y 500.0
	5-Fluorouracilo [‡]	0.15, 1.50, 15.0, 150.0	1.15, 11.5, 115.0, 1150.0
	Netropsina dihidrocloruro [‡]	7.6, 12.6, 75.5, 125.8	15.0, 25.0, 150.0, 250.0
	Sulfato de bleomicina/ FeSO_4 [‡]	6.0, 9.7, 60.5 y 96.8	4.0, 6.4, 40.0, 64.0
	Mitomicina C	0.01, 0.1, 1.0, 10.0	0.03, 0.3, 3.0, 30.0
	Epirubicina hidrocloreuro	0.01, 0.1, 1.2, 11.6	0.02, 0.2, 2.0, 20.0
CHP-212	CasIII-ia	3.0, 10.0, 30.0, 100.0	7.0, 23.0, 70.0, 230.0
	Cisplatino	10.0, 30.0, 100.0, 300.0	30.0, 100.0, 300.0, 1000.0
	CasIII-Ea, CasIII-La, CasIII-Ma, CasII-gly, CasVI-gly y CasVIII-gly	0.01, 0.1, 1.0, 10.0	Depende de la MM del compuesto
	Netropsina dihidrocloruro	8.0, 13.0, 80.0, 130.0	15.0, 25.0, 150.0, 250.0
	5-Fluorouracilo	3.0, 10.0, 30.0, 100.0	20.0, 62.0, 200.0, 620.0
	Oxaliplatino	3.0, 10.0, 30.0, 100.0	8.0, 25, 80, 250

[‡]Se evaluaron a 24 y 48 h.

Las células fueron expuestas a los tratamientos durante 24 h, tras las cuales se retiró el medio y se agregaron 50 μ L de TCA 10% para fijar las células que sobrevivieron al tratamiento a la superficie de la placa. La placa se incubó durante 1 h a 4°C y posteriormente, se retiró y lavó al menos cuatro veces con agua destilada, dejándose secar toda la noche. Una vez seca la placa, se agregó a cada pozo con células, 50 μ L de Sulforrodamina B (SRB) 4% m/v en ácido acético 1% v/v durante 30 min a temperatura ambiente. Al finalizar la tinción, la SRB se retiró y cada pozo se lavó mínimo cuatro veces con ácido acético 1% v/v y se dejó secar toda la noche. Al día siguiente, se agregaron 50 μ L de disolución amortiguadora Trizma base (20 mM, pH = 10) con el objetivo de redissolver la SRB y cuantificarla a 540 nm en un lector de microplacas y considerando que la concentración de SRB es proporcional a la cantidad de células que sobrevivieron al tratamiento. A continuación, el porcentaje de inhibición (I) por pozo se calculó a partir de las absorbancias correspondientes, a través de la siguiente ecuación:

$$I = 100 - \left(100 \times \frac{T}{C}\right) \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde I: % de inhibición de los pozos con tratamiento.

T = absorbancia de los pozos con tratamiento.

C = absorbancia de los pozos sin tratamiento.

Finalmente, se construyó la curva concentración-respuesta (CR) con los valores promedio de tres ensayos independientes, considerando las concentraciones en micromolar y a través del programa Sigma-Plot de Systat.

5.7 Evaluación de combinaciones de compuestos

A partir de la CI_{50} de los compuestos, se realizaron disoluciones considerando las siguientes proporciones de los compuestos (CI_{50} CasIII-ia : CI_{50} 2° compuesto): 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Cada placa incluyó 3 réplicas para cada tratamiento y una curva (CR) de los compuestos involucrados en la combinación, con sus respectivas réplicas, sin embargo, y debido a que las concentraciones más diluidas (1:4 y 1:8) para cada compuesto presentaron actividad nula, estas fueron sustituidas por 1.33 y 1.66 veces la CI_{50} de los compuestos con el objetivo de tener efectos superiores al 50%, al interpolar los valores del efecto de las combinaciones en las curvas CR. Las concentraciones de los compuestos empleadas en combinación y para las curvas CR se incluyen en el **Anexo 3**. Finalmente, la evaluación de los efectos de las combinaciones se realizó empleando el procedimiento descrito para la determinación de la CI_{50} .

5.8 Evaluación de las interacciones

A partir de los valores de los efectos obtenidos de cada combinación, se procedió a calcular las concentraciones de los compuestos individuales que se requerirían para obtener los efectos observados experimentalmente en las combinaciones. Este cálculo se realizó a través de la construcción de las curvas del efecto medio para cada uno de los compuestos, descritas por Chou y Talalay¹⁰⁶, y a partir de sus respectivas CR. Los valores de los efectos obtenidas en los pozos que recibieron las combinaciones se interpolaron en cada una de las curvas y posteriormente se calculó el índice de combinación (IC), por medio de la **Ecuación 6**. El ejemplo detallado del cálculo del IC y la construcción de los isobogramas se encuentran en el **Anexo 5**.

$$IC(o\gamma) = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

Donde IC: índice de combinación¹⁰⁶ / γ : índice interacción¹⁰⁴

a: concentración experimental empleada del primer compuesto de la combinación

b: concentración experimental empleada del segundo compuesto de la combinación

A: concentración teórica del primer compuesto interpolada en la curva CR

B: concentración teórica del segundo compuesto interpolada en la curva CR

5.9 Efecto de las combinaciones en el Plásmido PBR322

Una vez que se identificaron las interacciones farmacológicas entre los compuestos y las concentraciones requeridas para cada caso, se evaluaron las combinaciones en el Plásmido PBR322. Este procedimiento fue realizado por la Q. Yesenia Figueroa en el cubículo 05 del Laboratorio de Química Inorgánica Medicinal. Brevemente, 300 ng de ADN plasmídico (PBR322) se incubaron durante 30 minutos o 4 horas a 37° C con y sin compuestos (proporciones 1:8 – CasIII-ia:segundo compuesto) en un volumen final de 20 μ L. El efecto se determinó por electroforesis horizontal en 1% de agarosa, disolución amortiguadora TBE (0.5% Tris/borato/EDTA) y 1 μ g/mL de bromuro de etidio. El ADN sin compuesto fue empleado como control negativo y el ADN incubado con los compuestos individuales se incubaron en las mismas condiciones. La disolución *stock* de cisplatino preparada en función de la máxima solubilidad de éste.

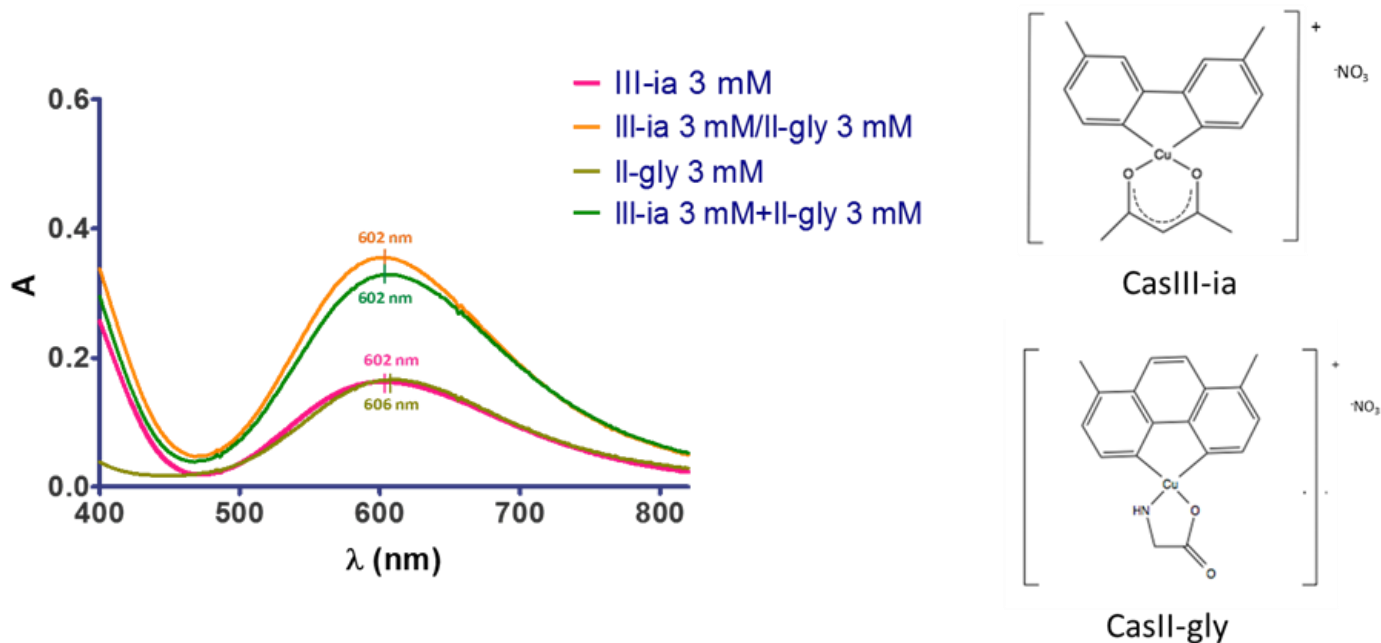
CAPÍTULO VI.

Resultados

VI. RESULTADOS

6.1 Determinación de las interacciones químicas presentes en la combinación de los compuestos

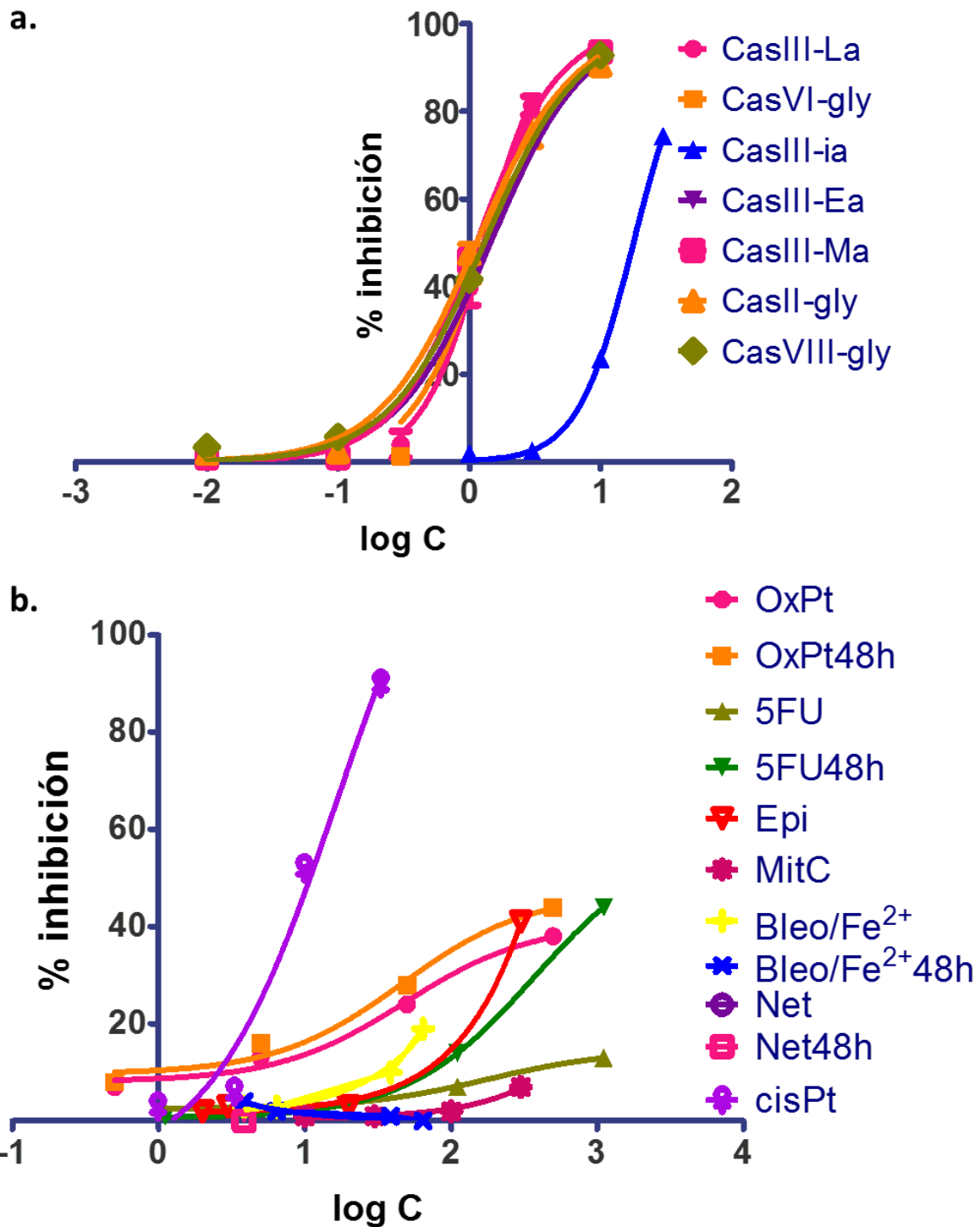
Con el objetivo de establecer la compatibilidad de los compuestos de las combinaciones y la posibilidad de administrar los compuestos en conjunto, se determinaron las posibles interacciones químicas a través del desplazamiento de la banda *d-d* del cobre(II) del compuesto CasIII-ia en presencia de los diferentes compuestos. En la **Gráfica 1** se muestra el espectro de UV-vis de la mezcla de CasIII-ia con CasII-gly. Las gráficas de los compuestos en combinación con CasIII-ia se muestran en el **Anexo 2**.



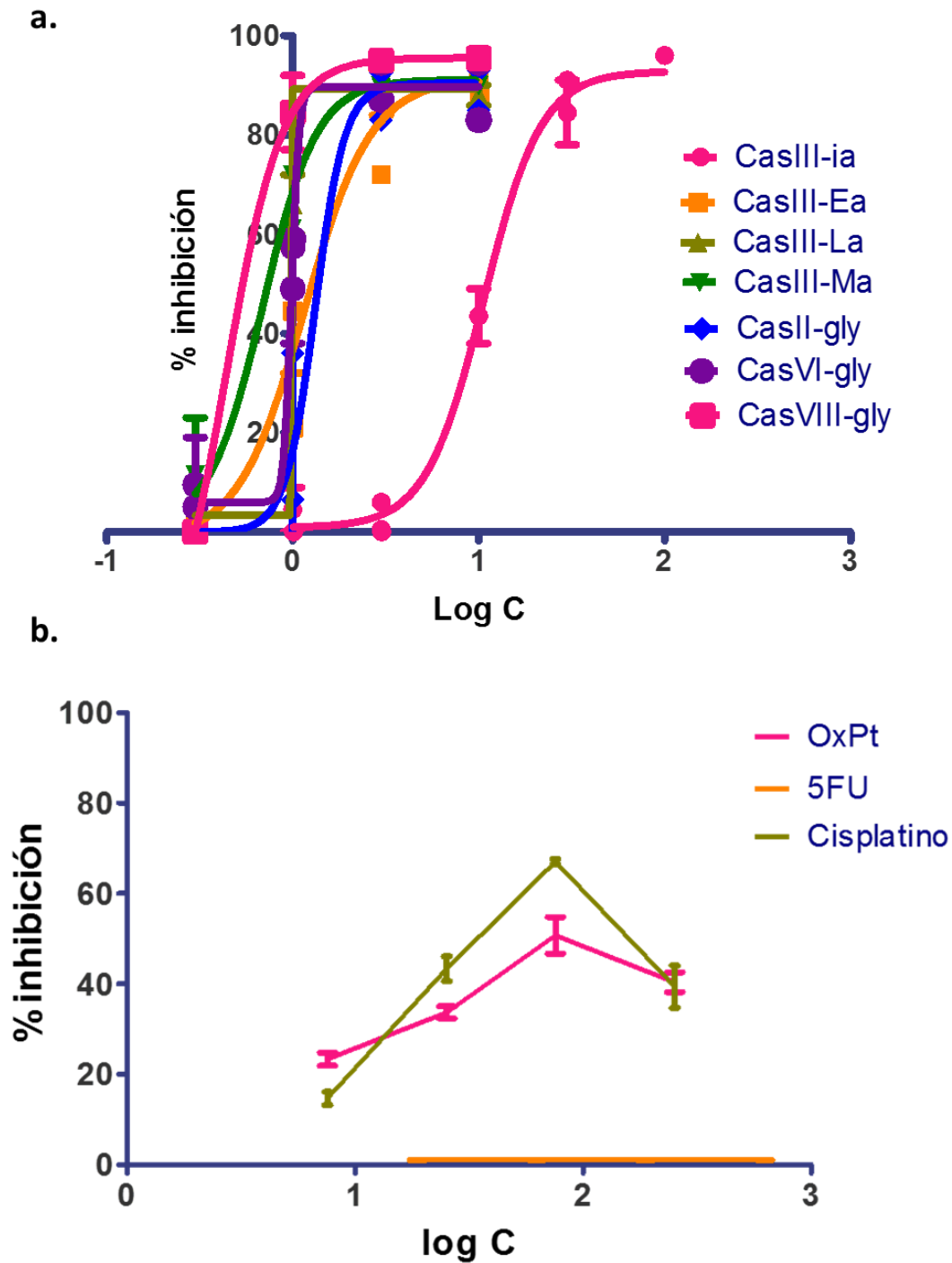
Gráfica 1. Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasII-gly, evaluada por espectrofotometría de UV-vis entre 400 y 800 nm y, a través del desplazamiento de la banda del cobre(II). III-ia: compuesto individual; II-gly: compuesto individual; III-ia/II-gly: disolución; III-ia+II-gly: suma de los espectros individuales.

6.2 Determinación de la concentración inhibitoria media de los compuestos

Por otro lado, se determinó la concentración inhibitoria media de diferentes compuestos en la línea tumoral HeLa, para posteriormente emplear cantidades proporcionales de esta concentración, de manera que la suma de las concentraciones de ambos compuestos presente efectos equivalentes. En la **Gráfica 2** se muestran las curvas CR de todos los compuestos evaluados en este trabajo en cultivos de la línea tumoral HeLa, mientras que en la **Gráfica 3** se muestra la información correspondiente a la línea tumoral CHP-212. El resumen de los valores de concentración inhibitoria en ambas líneas y todos los tratamientos se resume en la **Tabla 8**. De los fármacos ya empleados, se seleccionó únicamente el cisplatino para las evaluaciones de las combinaciones en HeLa, ya que fue el único compuesto que alcanzó la eficacia requerida para el análisis posterior y considerando la premisa de que el análisis isoblográfico evalúa combinaciones en la que ambos compuestos sean activos.



Gráfica 2. Curvas CR de los compuestos evaluados a 24 horas en cultivos de la línea tumoral HeLa. a) Compuestos de cobre(II) Casiopeínas y en b) Fármacos antitumorales: OxPt, oxaliplatino; 5FU, 5-fluorouracilo; Epi, epirubicina; MitC, mitomicina C; Bleo/Fe²⁺, Bleomicina/FeSO₄ 1:1; Net, Netropsina; cisPt, cisplatino. Los compuestos OxPt, 5FU, Bleo/Fe²⁺ y Net se evaluaron a 24 y 48 horas.



Gráfica 3. Curvas CR de los compuestos evaluados a 24 horas en cultivos de la línea tumoral CHP-212. a) Compuestos de cobre(II) Casiopeínas y en b) Fármacos antitumorales: OxPt, oxaliplatino; 5FU, 5-fluorouracilo y; cisPt, cisplatino.

Tabla 8. Concentración inhibitoria media de los compuestos evaluados a 24 horas en cultivos de las líneas tumorales HeLa y CHP-212. a) Compuestos de cobre(II) Casiopeínas y en b) Fármacos antitumorales: OxPt, oxaliplatino; 5FU, 5-fluorouracilo; Epi, epirubicina; MitC, mitomicina C; Bleo/Fe²⁺, Bleomicina/FeSO₄ 1:1; Net, Netropsina; cisPt, cisplatino. Los compuestos OxPt, 5FU, Bleo/Fe²⁺ y Net se evaluaron a 24 y 48 horas.

Compuesto	CI₅₀μM (24 h)			
	HeLa	CHP-212	Linfocitos SPH**	Macrófagos SPH**
CasIII-ia	41.74 ± 0.31	36.30 ± 3.8	4700	2470
CasIII-Ea	3.22 ± 0.035	1.93 ± 0.89	3860	1830
CasIII-La	2.83 ± 0.093	3.54 ± 0.17	35	1600
CasIII-Ma	1.57 ± 0.042	2.24 ± 0.21	¥	¥
CasII-gly	2.56 ± 0.046	3.46 ± 0.43	1720	1140
CasVI-gly	3.18 ± 0.163	2.25 ± 0.24	216	1600
CasVIII-gly	1.51 ± 0.051	1.52 ± 0.29	7644	9500
CisPt	10.90 ± 0.14	NA	¥	¥
OxPt	48.6 (48 h)*	NA	¥	¥
5FU	111.5 (48 h)*	¥	¥	¥
Bleo/Fe ²⁺ 1:1	NA	¥	¥	¥
Net	NA	NA	¥	¥
MitC	NA	¥	¥	¥
Epi	NA	¥	¥	¥

* Máxima inhibición: ~ 50%.

NA poca o nula actividad

¥No evaluados

** Evaluación realizada por la Dra. Yanis Toledano⁵²

6.3 Determinación de las interacciones farmacológicas

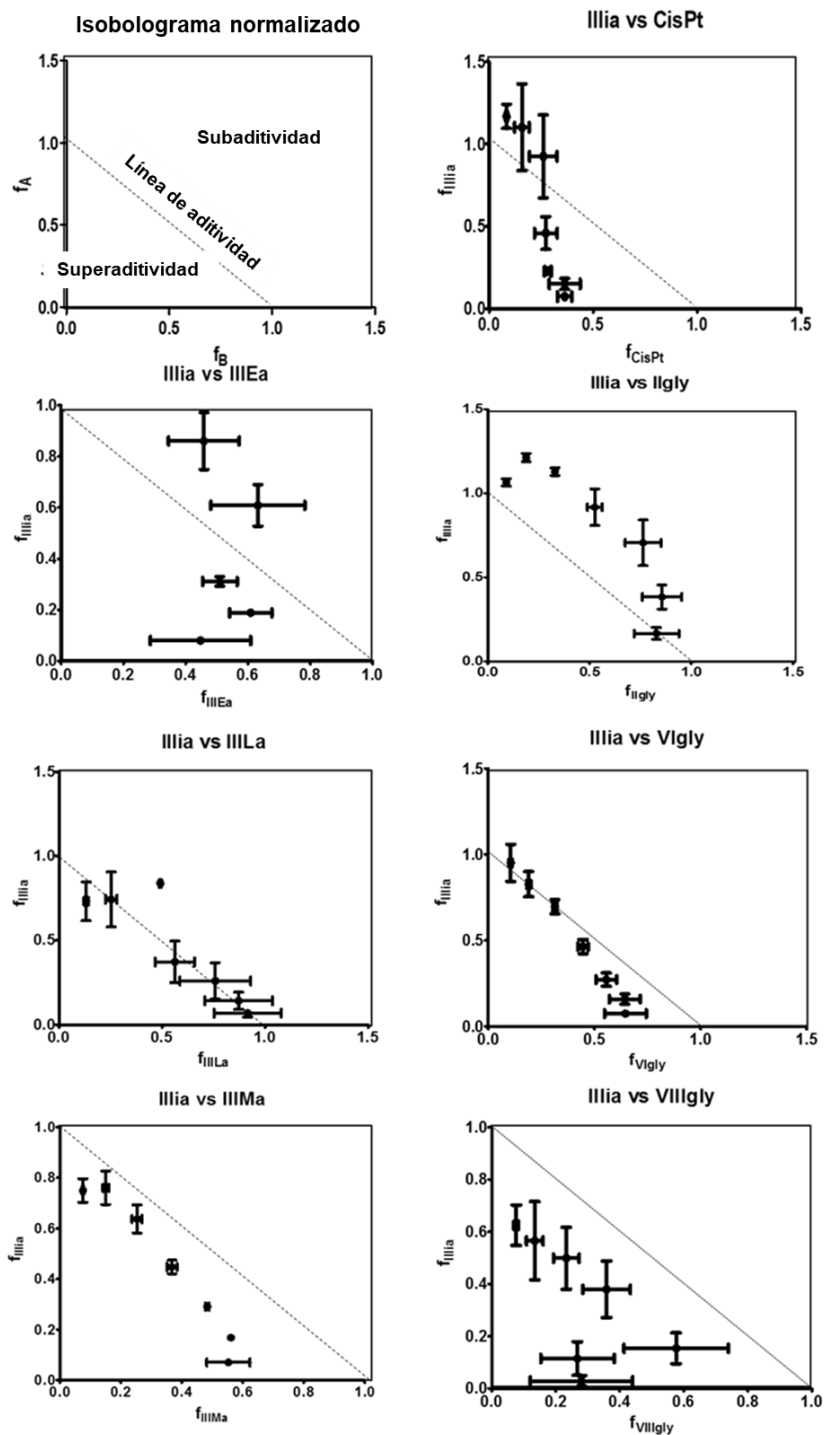
A partir de la determinación de las CI₅₀, se procedió a preparar distintas combinaciones de los compuestos, considerando concentraciones equiefectivas de ambos compuestos con respecto a las respectivas CI₅₀ de los compuestos involucrados en cada combinación. En la **Tabla 9** se muestran los valores de las concentraciones empleadas, el porcentaje de inhibición obtenido para cada una, la concentración total de ambos compuestos, el índice de combinación IC y finalmente el tipo de interacción que presentó cada una de las combinaciones evaluadas en cultivos de la línea tumoral HeLa.

Tabla 9. Interacciones farmacológicas de las combinaciones de compuestos de cobre(II) y Cisplatino.

	# ^a	μM^b		% inhibición de la combinación	μM^c Concentración total	IC \pm DE	Tipo de interacción
		1 ^o	2 ^o compuesto				
+ CasIII-Ea	1	37.15	0.35	54	37.50	1.396 \pm 0.535	<i>Aditiva</i>
	2	33.39	0.64	53	34.03	1.478 \pm 0.735	<i>Aditiva</i>
	3	27.97	1.06	56	29.03	1.319 \pm 0.450	<i>Aditiva</i>
	4	20.87	1.61	58	22.48	1.240 \pm 0.464	<i>Aditiva</i>
	5	13.77	2.16	66	15.93	0.820 \pm 0.148	<i>Aditiva</i>
	6	8.35	2.58	66	10.93	0.797 \pm 0.158	<i>Aditiva</i>
	7	4.59	2.87	75	7.46	0.527 \pm 0.354	<i>Aditiva</i>
+ CasIII-La	1	37.15	0.31	71	37.46	0.848 \pm 0.248	<i>Aditiva</i>
	2	33.39	0.57	68	33.96	0.968 \pm 0.376	<i>Aditiva</i>
	3	27.97	0.93	56	28.90	1.269 \pm 0.039	<i>Sub-aditiva</i>
	4	20.87	1.42	75	22.29	0.868 \pm 0.416	<i>Aditiva</i>
	5	13.77	1.90	74	15.67	0.926 \pm 0.518	<i>Aditiva</i>
	6	8.35	2.26	76	10.61	0.905 \pm 0.389	<i>Aditiva</i>
	7	4.59	2.52	79	7.11	0.872 \pm 0.332	<i>Aditiva</i>
+ CasIII-Ma	1	37.15	0.17	70	37.32	0.825 \pm 0.071	<i>Super-aditiva</i>
	2	33.39	0.31	66	33.70	0.911 \pm 0.108	<i>Aditiva</i>
	3	27.97	0.52	66	28.49	0.890 \pm 0.102	<i>Aditiva</i>
	4	20.87	0.79	68	21.66	0.815 \pm 0.061	<i>Super-aditiva</i>
	5	13.77	1.05	69	14.82	0.774 \pm 0.014	<i>Super-aditiva</i>
	6	8.35	1.26	70	9.61	0.729 \pm 0.017	<i>Super-aditiva</i>
	7	4.59	1.40	75	5.49	0.623 \pm 0.117	<i>Super-aditiva</i>
+ CasII-gly	1	37.15	0.28	58	37.43	1.156 \pm 0.046	<i>Sub-aditiva</i>
	2	33.39	0.51	49	33.90	1.402 \pm 0.053	<i>Sub-aditiva</i>
	3	27.97	0.84	45	28.81	1.459 \pm 0.053	<i>Sub-aditiva</i>
	4	20.87	1.28	42	22.15	1.444 \pm 0.289	<i>Aditiva</i>
	5	13.77	1.72	39	15.49	1.469 \pm 0.448	<i>Aditiva</i>
	6	8.35	2.05	42	10.40	1.239 \pm 0.336	<i>Aditiva</i>
	7	4.59	2.28	51	6.87	0.995 \pm 0.291	<i>Aditiva</i>
+ CasVI-gly	1	37.15	0.35	62	37.50	1.078 \pm 0.246	<i>Aditiva</i>
	2	33.39	0.64	63	34.03	1.052 \pm 0.188	<i>Aditiva</i>
	3	27.97	1.05	63	29.02	1.065 \pm 0.127	<i>Aditiva</i>
	4	20.87	1.59	67	22.46	0.963 \pm 0.179	<i>Aditiva</i>
	5	13.77	2.13	71	15.90	0.864 \pm 0.251	<i>Aditiva</i>
	6	8.35	2.54	73	10.89	0.834 \pm 0.320	<i>Aditiva</i>
	7	4.59	2.83	77	7.42	0.712 \pm 0.347	<i>Aditiva</i>
+ CasVIII-gly	1	37.15	0.17	76	37.32	0.702 \pm 0.119	<i>Super-aditiva</i>
	2	33.39	0.30	76	33.69	0.700 \pm 0.249	<i>Aditiva</i>
	3	27.97	0.50	74	28.47	0.732 \pm 0.224	<i>Aditiva</i>
	4	20.87	0.76	74	21.63	0.739 \pm 0.258	<i>Aditiva</i>
	5	13.77	1.02	90	14.79	0.383 \pm 0.254	<i>Super-aditiva</i>
	6	8.35	1.22	74	9.57	0.730 \pm 0.314	<i>Aditiva</i>
	7	4.59	1.35	93	6.94	0.309 \pm 0.255	<i>Super-aditiva</i>
+ CisPt	1	37.15	1.20	54	38.35	1.251 \pm 0.157	<i>Sub-aditiva</i>
	2	33.39	2.18	55	35.57	1.259 \pm 0.597	<i>Aditiva</i>
	3	27.97	3.60	56	31.57	1.185 \pm 0.637	<i>Aditiva</i>
	4	20.87	5.45	68	26.32	0.731 \pm 0.308	<i>Aditiva</i>
	5	13.77	7.30	76	21.07	0.509 \pm 0.063	<i>Super-aditiva</i>
	6	8.35	8.72	74	17.07	0.514 \pm 0.215	<i>Super-aditiva</i>
	7	4.59	n9.70	77	14.29	0.436 \pm 0.084	<i>Super-aditiva</i>

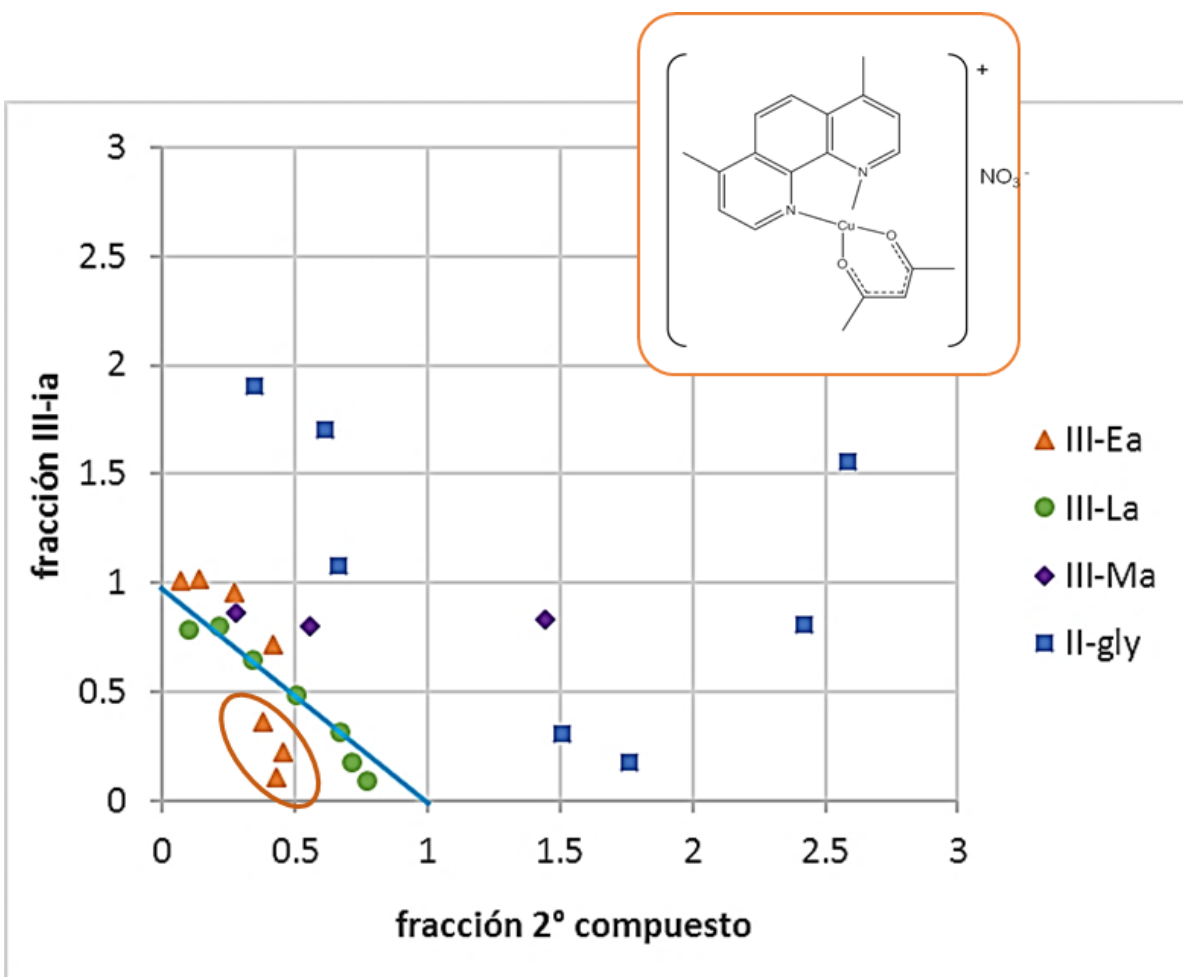
^a No. de la combinación por compuesto. ^b Concentración del compuesto en la combinación. ^c suma de las concentraciones empleadas en la combinación. El 2^o compuesto se menciona en la primera columna de la tabla.

A partir de los datos de concentraciones experimentales empleadas y las concentraciones teóricas, se construyen los isobogramas, los cuales se muestran en la **Gráfica 4** en su forma normalizada.



Gráfica 4. Isobogramas normalizados de las combinaciones de CasIII-ia con las seis Casiopeínas® y cisplatino.

Por otro lado, se realizaron las evaluaciones de las interacciones farmacológicas en neuroblastoma (CHP-212) de combinaciones del compuesto CasIII-ia con uno de los siguientes compuestos análogos: CasIII-Ea, CasIII-La, CasIII-Ma, CasII-gly. En la **Gráfica 5** se concentran los isoblogramas normalizados de las combinaciones y en la **Tabla 10** se muestran los valores de las concentraciones empleadas, el porcentaje de inhibición obtenido para cada una, la concentración total de ambos compuestos, el IC y finalmente el tipo de interacción que presentó cada una de las combinaciones evaluadas en cultivos de CHP-212,



Gráfica 5. Isoblogramas normalizados de combinaciones de Casiopeínas® en cultivos de neuroblastoma (CHP-212). La línea azul corresponde a la línea de aditividad. La elipse naranja (0) indica las combinaciones de CasIII-ia y CasIII-Ea (recuadro) que presentaron interacción superaditiva.

Tabla 10. Interacciones farmacológicas de las combinaciones de compuestos de cobre(II) en CHP-212. ^aNo. de la combinación para cada compuesto. ^bConcentración del compuesto en la combinación. ^cConcentración total de los compuestos empleados en la combinación. El segundo compuesto se menciona en la primera columna de la tabla.

	# ^a	μM^b		% inhibición de la combinación	μM^c Concentración total	IC \pm DE	Tipo de interacción
		1 ^a	2 ^o compuesto				
+ CasIII-Ea	1	32.30	0.21	51	32.51	1.072 \pm 0.064	<i>Aditiva</i>
	2	29.00	0.39	46	29.39	1.162 \pm 0.240	<i>Aditiva</i>
	3	24.30	0.64	41	24.94	1.225 \pm 0.247	<i>Aditiva</i>
	4	18.20	0.97	42	19.17	1.136 \pm 0.383	<i>Aditiva</i>
	5	12.00	1.29	52	13.29	0.737 \pm 0.063	<i>Superaditiva</i>
	6	7.30	1.54	52	8.84	0.678 \pm 0.087	<i>Superaditiva</i>
	7	4.00	1.72	57	5.72	0.537 \pm 0.124	<i>Superaditiva</i>
+ CasIII-La	1	32.30	0.39	61	32.69	0.884 \pm 0.090	<i>Aditiva</i>
	2	29.00	0.71	56	29.71	1.020 \pm 0.071	<i>Aditiva</i>
	3	24.30	1.17	57	25.47	0.988 \pm 0.114	<i>Aditiva</i>
	4	18.20	1.77	58	19.97	0.988 \pm 0.106	<i>Aditiva</i>
	5	12.00	2.37	58	14.37	0.988 \pm 0.142	<i>Aditiva</i>
	6	7.30	2.83	62	10.13	0.887 \pm 0.157	<i>Aditiva</i>
	7	4.00	3.15	63	7.15	0.864 \pm 0.030	<i>Aditiva</i>
+ CasIII-Ma	1	32.30	0.25	57	32.55	1.142 \pm 0.157	<i>Aditiva</i>
	2	29.00	0.45	56	29.45	1.355 \pm 0.563	<i>Aditiva</i>
	3	24.30	0.74	47	25.04	2.278 \pm 0.413	<i>Subaditiva</i>
	4	18.20	1.13	38	19.33	4.169 \pm 0.444	<i>Subaditiva</i>
	5	12.00	1.51	20	13.51	18.002 \pm 8.054	<i>Subaditiva</i>
	6	7.30	1.80	25	9.10	14.005 \pm 5.080	<i>Subaditiva</i>
	7	4.00	2.00	33	6.00	9.592 \pm 4.827	<i>Aditiva</i>
+ CasII-gly	1	32.30	0.39	29	32.69	2.251 \pm 1.133	<i>Aditiva</i>
	2	29.00	0.71	26	29.71	2.323 \pm 0.563	<i>Subaditiva</i>
	3	24.30	1.14	36	25.44	1.745 \pm 0.361	<i>Aditiva</i>
	4	18.20	1.73	18	19.93	4.142 \pm 2.299	<i>Aditiva</i>
	5	12.00	2.32	22	14.32	3.228 \pm 1.023	<i>Subaditiva</i>
	6	7.30	2.77	38	10.07	1.815 \pm 0.422	<i>Subaditiva</i>
	7	4.00	3.08	36	7.08	1.934 \pm 0.204	<i>Subaditiva</i>

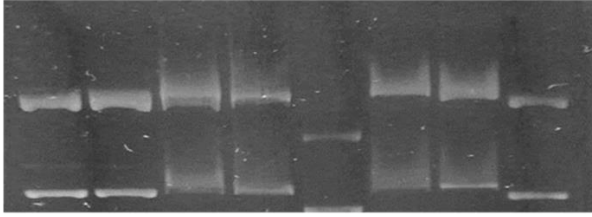
6.4 Efecto de las combinaciones en el Plásmido PBR322

Al evaluar el efecto de las combinaciones más activas en el Plásmido PBR322, con el objetivo de dilucidar si el efecto global observado está influido a nivel del daño a material genético y establecido a través de un ensayo de electroforesis. En la **Figura 11** se muestra el gel de electroforesis de los compuestos individuales y las combinaciones.

30 minutos

◆ — ia + — ◆

PBR322	ia	VIII g	Ma	CisPt	VIII g	Ma	CisPt
1	2	3	4	5	6	7	8



4 horas

◆ — ia + — ◆

PBR322	ia	VIII g	Ma	CisPt	VIII g	Ma	CisPt
1	2	3	4	5	6	7	8

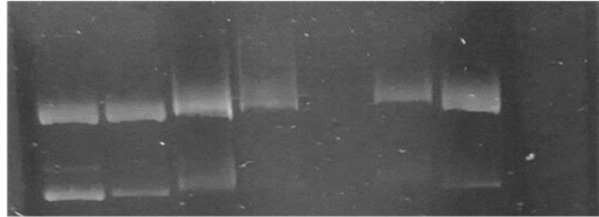


Figura 11. Efecto de las combinaciones de compuestos en el plásmido PBR322. 1) PBR322: 300ng; 2) III-ia: 4.39 mM; 3) VIII-gly 1.36 mM; 4) III-Ma: 1.31 mM; 5) cisPt: 5.00 mM; 6) III-ia: 4.39 mM/VIII-gly 1.36 mM; 7) III-ia: 4.39 mM/III-Ma: 1.31 mM; 8) III-ia: 4.39 mM/cisPt: 5.00 Mm.

CAPÍTULO VII.

Análisis y discusión de resultados

VII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El uso de más de un fármaco para el tratamiento de enfermedades es una estrategia común para aumentar la probabilidad de mejorar el estado de salud de los pacientes, particularmente en el caso de enfermedades crónicas como lo es el cáncer. Entre las herramientas para evaluar la interacción de uno o más compuestos, se encuentran los análisis isoblográfico, fraccional y a través de la ecuación del efecto medio, los cuales permiten identificar combinaciones que presenten un incremento en la actividad o una disminución de la toxicidad de ambos, siendo ambas condiciones, la situación ideal. En este trabajo se evaluó la actividad del compuesto CasIII-ia, el cual se encuentra en el proceso de ser evaluado en Fase Clínica 1, con compuestos análogos más activos en cultivos de neuroblastoma, así como con los mismos compuestos y con el cisplatino en la línea tumoral HeLa correspondiente a estadio IV de adenocarcinoma cervicouterino.

El compuesto CasIII-ia pertenece a una familia de compuestos de cobre(II), cuyos integrantes contienen en su estructura al átomo de cobre coordinado a fenantrolinas o bipyridinas sustituidas, así como a acetilacetato (acac), aminoácidos (aa) o salicilaldehidos (salal). Dentro de esta familia, es común encontrar que la actividad de los compuestos se incrementa al menos un orden de magnitud cuando se tienen fenantrolinas sustituidas con grupos electrodonadores⁴⁶, por lo que, en el grupo de trabajo, a este ligante se le conoce como el ligante primario. El ligante secundario (acac, aa o salal), en contraste, se tiene la hipótesis que facilita el ingreso de la molécula a las células⁴⁵ o acceso al tumor⁴⁶. Adicionalmente, en este tipo de compuestos es difícil separar la actividad de la toxicidad, por lo que consideramos que la combinación de compuestos muy activos con los menos activos

producirá un incremento en la actividad del compuesto con biperidina, mientras que disminuya la toxicidad de los análogos con fenantrolinas.

Por su parte, la elección de los fármacos ya empleados en la clínica se basó en la elección de compuestos que se emplearan para los tipos de cáncer evaluados, por lo que se realizó una búsqueda bibliográfica en las páginas del National Cancer Institute (NCI)¹¹³ y en el Cuadro básico y catálogo de medicamentos del Sector Salud¹¹⁴ para establecer qué compuestos están aprobados, y posteriormente clasificarlos de acuerdo con su mecanismo de acción. El resumen de dicha investigación se muestra en la **Tabla 11**. Para efectos del trabajo, se eligieron compuestos que fuesen activos en las líneas tumorales de cérvico-uterino (CU) y neuroblastoma (N).

Tabla 11. Resumen de los compuestos en función de los mecanismos de acción empleadas en los principales tipos de cáncer que afectan a la población mexicana.

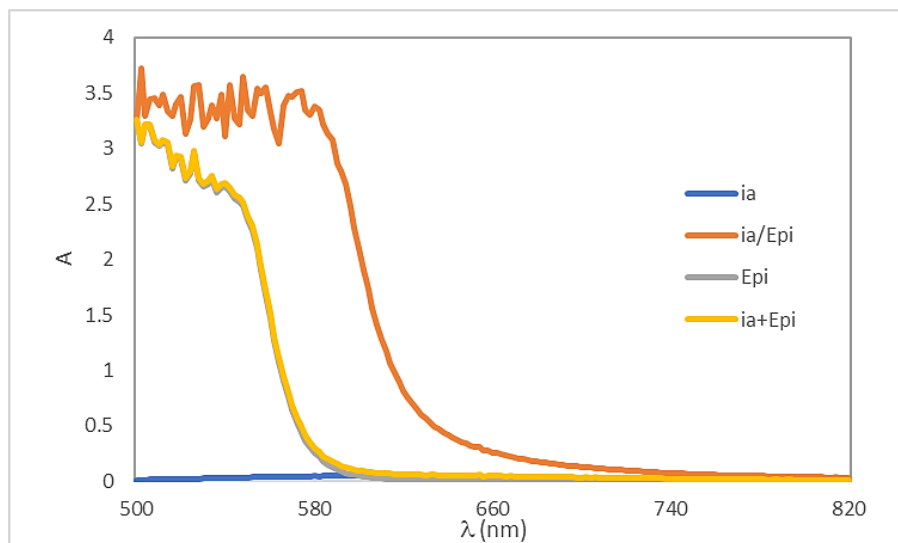
	Intercalante	Alquilante	Antitopoisomerasa	Antimitótico	Antitubular	Antimetabolito	Hormonas	Ady	#
CU		X*				X			1
M	X	X	X			X _d , X _i	X		6
CR	X	X*	X			X		X	6
P			X		X	X	X	X	2
CPP		X, X*			X	X			2
CNPP	X		X	X	X	X			0
LMC						X			0
N		X				X			0

CU: cérvico uterino; **M:** mama; **CR:** colorrectal; **P:** próstata; **CPP:** células pequeñas de pulmón; **CNPP:** células no pequeñas de pulmón; **LMC:** leucemia mieloide crónica; **N:** neuroblastoma. X*: agente platinante; X_d: antimetabolito directo; X_i: antimetabolito indirecto; X: que obligatoriamente está presente en la combinación y; #: número de combinaciones reportadas en el NCI y en el cuadro básico.

Debido a que las interacciones farmacológicas no aditivas se presentan preferencialmente cuando los compuestos actúan por mecanismos de acción diferentes, se eligieron representantes de distintos grupos para el análisis de las combinaciones: 5FU (antimetabolito), bleomicina (alquilante, incremento de ROS), cisplatino (platinante, incremento de ROS), epirubicina (alquilante), mitomicina C (alquilante), oxaliplatino (platinante), netropsina (unión en el surco menor). La netropsina se eligió como representante de los compuestos que se unen al surco menor, ya que se han encontrado efectos superaditivo en presencia de tres Casiopeínas y la adriamicina⁶³, un compuesto que comparte el mecanismo de acción, sin embargo, ningún compuesto de este tipo está aprobado para su uso como antineoplásico.

Una vez que se ha realizado la elección de los compuestos, se debe considerar que, al realizar combinaciones de fármacos, el análisis de las interacciones puede realizarse considerando una administración simultánea o diferida. En el caso de que los compuestos se administren de manera simultánea, es necesario asegurar que los compuestos no reaccionarán entre sí, es decir que no haya interacción química, dado que eso implicaría que se administraría una nueva especie formada por ambas moléculas. Es por lo anterior que se decidió una evaluar dichas interacciones y así descartar la posibilidad de realizar administraciones diferidas y en cambio, partir de una disolución stock con ambos compuestos. En la **Gráfica 1** se muestra el espectro de UV-visible de los compuestos CasIII-ia y CasII-gly individuales y en combinación. Se considera que hay una reacción si se observa un desplazamiento o un abatimiento de la banda *d-d* del cobre(II) de CasIII-ia en presencia del segundo compuesto. Los espectros del resto de los compuestos empleados en las combinaciones se encuentran en el **Anexo 2**. Un ejemplo de una interacción química se presentó en la combinación de CasIII-ia/epirubicina, ambos en concentración de 1.9×10^{-4} , en el cual el color de la disolución se observó violeta intenso, mientras que las disoluciones de los compuestos individuales tenían color azul y naranja, respectivamente, lo que significa que probablemente hubo una coordinación de la

epirubicina al cobre del compuesto CasIII-ia. El espectro de esta combinación se muestra en la **Figura 6**, el cual requería una administración diferida de los compuestos. A pesar de la intensidad de las absorbancias debido a la epirubicina, la diferencia de los espectros de absorción de la suma teórica (ia+EPI, señal amarilla) y el espectro experimental (ia/Epi, señal naranja) sugiere una fuerte interacción química entre ambos compuestos.



Gráfica 6. Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y epirubicina, el desplazamiento de la banda de la epirubicina ia: compuesto individual; epi: compuesto individual; III-ia/eipi: disolución; III-ia+eipi: suma de los espectros individuales.

Una vez que se ha establecido qué compuestos pudieran reaccionar previo a su administración, se procedió a determinar las curvas de concentración-respuesta (CR) de las Casiopeínas[®], así como de los fármacos usados en la clínica y en tratamientos de 24 horas. Los resultados se muestran en las **Gráficas 2** para HeLa y **3** para CHP-212 y se puede observar que los valores de CI_{50} coinciden con lo reportado previamente⁴⁶: el compuesto con biperidina (CasIII-ia) es un orden de magnitud menos activo que los compuestos con fenantrolina, sin embargo, todos presentan actividad y eficacia equivalente, por lo que todos los compuestos pueden ser empleados para las combinaciones, con el objetivo de disminuir las concentraciones para obtener el mismo efecto.

En el caso de los compuestos ya empleados en la clínica, únicamente el cisplatino, evaluado en HeLa, presentó la eficacia adecuada para su posterior análisis en combinación, mientras que los demás compuestos no superaron el 50 % de inhibición incluso hasta después de 48 horas de exposición. Debido a que los análisis de interacciones propuestos requieren que los compuestos sean activos, aquellos compuestos que resultaron no ser eficaces a las 24 ó 48 h se descartaron para el análisis de combinaciones, lo cual incluyó todos los fármacos evaluados en CHP-212. De acuerdo con la literatura, los compuestos bleomicina y 5FU presentan actividad a los tres días posteriores de su exposición (2.78^{115} y $10 \mu\text{M}^{116}$, respectivamente) o en concentraciones del orden de milimolar (30 y 10 mM, respectivamente¹⁰⁹). Por su parte, la mitomicina C tiene una CI_{50} de 30 nM a los dos días de exposición¹¹⁷, ya que es necesario que sea activada previamente por enzimas flavoreductasas²³, lo que para el análisis de este compuesto con las Casiopeínas® se requerirá una administración diferida. La CI_{50} del oxaliplatino está reportada de $50 \mu\text{M}^{119}$, lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo ($48.6 \mu\text{M}$), sin embargo, debido a la baja eficacia de este compuesto, el análisis de interacciones se deberá realizar de acuerdo con otro nivel de efecto, 30% de inhibición, por ejemplo. Con respecto a la epirubicina, se ha reportado su actividad antiproliferativa en HeLa a los dos días y un valor de CI_{50} de $1.72 \mu\text{M}^{120}$. El tiempo de actividad, aunado al hecho de que es necesario una administración diferida ya que este compuesto puede reaccionar con las Casiopeínas®, obliga a que se rediseñe el análisis de interacciones también para este compuesto. Es por todo lo anterior que para el análisis de combinaciones se eligió únicamente al cisplatino, en HeLa, como fármaco de referencia como un compuesto con un mecanismo de acción diferente al de los compuestos de cobre(II).

Una vez que se establecieron los compuestos que serían evaluados en combinación con CasIII-ia, se propuso evaluar siete proporciones de compuestos con respecto a las respectivas CI_{50} de cada compuesto: 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, considerando la siguiente proporción: CI_{50} CasIII-ia: CI_{50} 2do compuesto en la línea tumoral HeLa (Casiopeínas® y cisplatino) y CHP-212 (Casiopeínas®). En el caso de

los métodos de evaluación de fármacos, éstos permiten identificar aquellas combinaciones de compuestos que puedan presentar un incremento o disminución del efecto, en comparación con aquellas que presenten interacciones “indiferentes” a la presencia de ambos fármacos, es decir, que presenten interacciones aditivas. Particularmente, en el caso del análisis isoblográfico, éste se fundamenta en elegir concentraciones de compuestos que ejerzan el mismo nivel de efecto, por ejemplo, combinaciones que proporcionen la actividad evaluada en la mitad de la población, aunque el nivel puede ser a cualquier porcentaje. A su vez, se puede emplear el análisis fraccional, el cual consiste en evaluar combinaciones cuyas concentraciones se mantengan relacionadas con respecto a un valor constante. Por otro lado, también se puede emplear la determinación de índice de combinación (IC) a través de la interpolación de los efectos de la combinación en las ecuaciones del efecto medio, propuestas por Chou¹⁰². En este trabajo, se decidió la evaluación de compuestos combinados considerando concentraciones equiefectivas, pero en relaciones no constantes. Asimismo, se empleó la ecuación del efecto medio para calcular las concentraciones de los compuestos requeridas de los compuestos individuales para obtener el efecto observado de la combinación y contrastarlo con el valor experimental. A medida que el cociente de a/A o b/B disminuye, implica que se requirió una menor concentración de alguno de los compuestos (a , b) con respecto a lo esperado individualmente (A , B) para obtener el mismo efecto. La suma de ambos cocientes corresponde al valor de IC, de ahí que a medida que este valor se aproxima a cero, se considera una interacción superaditiva y subaditiva, a medida que ese valor se incrementa.

En el presente trabajo se evaluaron siete combinaciones de seis compuestos análogos y en un orden de magnitud más activos que CasIII-ia con el objetivo de disminuir la cantidad requerida para obtener el mismo efecto. Se encontró que los compuestos de cobre coordinados a fenantrolinas tetrametiladas en combinación con la CasIII-ia presentaban principalmente interacciones superaditivas, es decir, se requirió una menor cantidad de ambos compuestos para alcanzar un efecto superior.

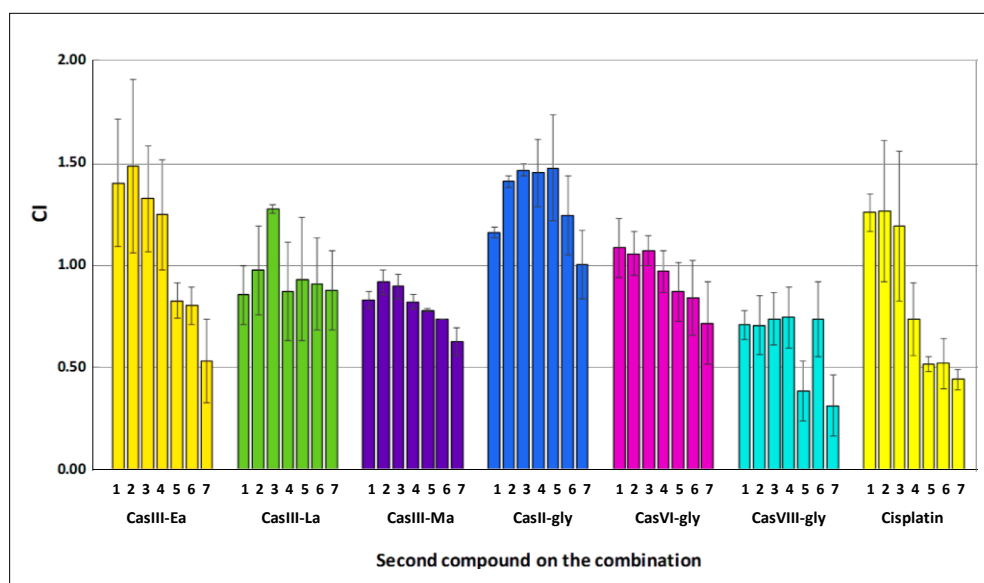
Las seis Casiopeínas® contenían fenantrolinas di o tetrametiladas, sin embargo, aquel compuesto que adicional tenía una molécula de glicinato fue la que presentó la mayor actividad, con un 90% de inhibición encontrada en la combinación CasIII-ia:CasVIII-gly 1:8 y concentración total de 5.94 μM logrando bajar la concentración de CasIII-ia desde 41.74 μM y obteniéndose a su vez, un incremento significativo en el porcentaje de inhibición, considerando que se esperaba 50%.

Al evaluar las interacciones de los compuestos dimetilados, aquellos que tenían los grupos metilo en las posiciones “4,7”, presentaron preferentemente interacciones aditivas con tendencia a subaditividad (CasIII-Ea, CasII-gly **Tabla 9**, **Gráfica 4**), mientras que en el caso de los compuestos con fenantrolinas dimetiladas en las posiciones “5,6” (CasIII-La y CasVI-gly) presentaron casi en su totalidad interacciones casi aditivas. En el caso de las interacciones superaditivas, estas pueden ser a su vez benéficas si es que la toxicidad de los compuestos no se incrementa significativamente al igual que lo observado en la actividad, por lo que no deben descartarse por completo. Por su parte, lo mismo puede decirse de las interacciones aditivas, en las cuales el efecto se conservó y se logró disminuir las concentraciones de los compuestos involucrados.

Asimismo, se realizó un estudio de paralelismo de las curvas CR de todos los compuestos evaluados en los cultivos de HeLa (**Anexo 4**). Este estudio determina si las pendientes de los compuestos comparten la misma pendiente lo cual sugeriría que los compuestos actúan por los mismos mecanismos y, para el caso del análisis isoblográfico es un requisito indispensable para obtener isobogramas lineales. En este caso, los únicos que cumplieron parcialmente con este requisito fueron el compuesto CasIII-ia y el cisplatino. Sin embargo, al trabajar con los isobogramas normalizados, la falta de paralelismo de las rectas no impide el análisis de las combinaciones a través de la ecuación del efecto medio.

Por otro lado, se evaluó el cisplatino en combinación con CasIII-ia, como un compuesto que actúa a través de un mecanismo de acción distinto al de los análogos, ya que éste platina al ADN en el N7 de la guanina^{121,122}, mientras que la CasIII-ia puede actuar a través de la generación de especies reactivas^{56,63} o interactuar con los grupos fosfato previo a su intercalación^{67,68,123}. Los resultados observados en células pueden atribuirse a la suma de los efectos concomitantes de los compuestos con respecto a la interacción con el ADN¹²⁴, incremento de ERO's⁶³, disminución de glutatión^{60,61} a diferentes tiempos y considerando la diferencia en lipofilia de las moléculas⁹ sin embargo, será necesario realizar estudios cinéticos con las combinaciones para comprobar dichas hipótesis. Asimismo, blancos y mecanismos de acción similar han sido propuestos para otros compuestos de cobre en diversas líneas celulares¹²⁴⁻¹²⁶. Con respecto a las combinaciones con cisplatino, las diferencias en las concentraciones empleadas podrían modular el tipo de interacción farmacológica observada, siendo la interacción simultánea de los compuestos con el ADN la causa del efecto subaditivo, mientras que el incremento de las ERO's en la mitocondria por el cisplatino y la disminución de los niveles de glutatión por CasIII-ia podría tener una mayor participación en el efecto total encontrado. Esto coincide con lo observado al evaluar ADN plasmídico expuesto a una combinación de CasIII-ia:Cisplatino 1:8 a treinta minutos y una hora, en la cual, a la media hora de exposición, el compuesto CasIII-ia disminuye el daño del cisplatino al administrarse en conjunto¹²⁸.

Adicionalmente, al comparar el IC de cada compuesto con respecto al incremento de la fracción del compuesto más activo en cada combinación, se encontró que el carácter superaditivo de la combinación (menor valor de IC) tendía a incrementarse conforme el compuesto más activo predominaba, como se muestra en la **Gráfica 7**.



Gráfica 7. Índice de combinación (IC) de las combinaciones de CasIII-ia y seis Casiopeínas® o cisplatino. El número inferior a la gráfica representa la fracción de cada compuesto en la combinación: CI_{50} CasIII-ia : CI_{50} Segundo compuesto. 1.- 0.89:0.11; 2.- 0.80:0.20; 3.- 0.67:0.33; 4.- 0.50:0.50; 5.- 0.33:0.67; 6.- 0.20:0.80; 7.- 0.11:0.89. Como referencia: $IC < 1$, superaditividad; $IC = 1$, aditividad; $IC > 1$, subaditividad.

Con respecto a la evaluación de las interacciones en los cultivos de células de neuroblastoma, se observó que sólo uno de los compuestos presentó tres combinaciones superaditivas “de moderada a leve”, de acuerdo con las **Tablas 4 y 10** y la **Gráfica 5**, coincidiendo con lo visto anteriormente: el carácter superaditivo se incrementó conforme el compuesto CasIII-Ea predominaba en la combinación. Las combinaciones con los compuestos CasIII-La y CasII-gly, igual que lo observado en los cultivos de HeLa, presentaron el mismo tipo de interacción: una interacción casi aditiva y subaditiva, respectivamente; mientras que el compuesto CasIII-Ma, en contraste con lo observado previamente, mostró una interacción fuertemente subaditiva, el cual a su vez se incrementaba conforme el compuesto más activo estaba más concentrado. Estos resultados apoyan el hecho de lo complicado del tratamiento del neuroblastoma, en la cual, los compuestos son muy limitados como se indica en la **Tabla 11**.

Al evaluar el daño al ADN de las combinaciones particularmente aquellas con fenantrolinas tetrametiladas (CasVIII-gly y CasIII-Ma) y cisplatino, a través del plásmido PBR322 expuesto durante 30 min y 4 horas y en proporciones 1:8 (CasIII-ia:2° compuesto). Se observó que la exposición de las combinaciones de compuestos durante 30 min aparentemente es superior con respecto al de los compuestos individuales, evidenciado como una disminución de la banda de ADN superenrollado y un incremento en la banda de ADN enrollado. En el caso de la combinación de CasIII-ia/cisPt hay una disminución del efecto platinante del cisPt en presencia de CasIII-ia, lo cual se observa al comparar el desplazamiento de la banda superenrollada, siendo mayor este desplazamiento cuando no está presente el compuesto de cobre(II). A las 4 horas, el cisplatino ha degradado por completo al ADN, ya sea en presencia y ausencia de CasIII-ia, mientras que en el caso de las combinaciones de compuestos de cobre(II), se observa un daño inverso entre ambas: CasIII-ia/CasVIII-gly incrementa ligeramente el daño, mientras que la combinación CasIII-ia/CasIII-Ma disminuye la pérdida del ADN superenrollado.

Por otro lado, durante el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, es común que los pacientes presenten recaída de la enfermedad o que los tumores desarrollen resistencia a los compuestos⁹³, por lo que una de las estrategias consiste en emplear terapias combinadas, las cuales pueden involucrar más de un compuesto simultáneamente o en combinación con terapias de distinta naturaleza, como la cirugía o la radioterapia. Sin embargo, generalmente la presencia de sinergia y aditividad se lleva a cabo de manera empírica y cualitativa, considerando esquemas de resistencia cruzada, traslape de actividades y mecanismos de acción, mientras que los efectos antagónicos son descartados del análisis posterior²⁴. Por otro lado, las evaluaciones de interacciones farmacológicas de una mezcla de compuestos suelen llevarse a cabo durante los estudios de fases clínicas, lo cual, de realizarse desde las fases preclínicas del desarrollo de un medicamento, disminuiría significativamente los costos generados. Con la combinación de Casiopeínas[®] se pretende establecer una combinación óptima de compuestos de coordinación de

cobre que permita incrementar la potencia de CasIII-ia, sin incrementar la toxicidad del compuesto que la acompañe, a través de un estudio cuantitativo como es el análisis isoblográfico, el cual es uno de los métodos más empleados para la evaluación de dos o más compuestos, siendo el cisplatino y sus derivados, una de las opciones que por excelencia se emplean en combinaciones (**Tabla 11**)¹¹³, sin embargo, el uso de este método para el análisis de combinaciones *in vitro* y para cáncer es reciente. En este sentido, se han reportado estudios *in vitro* en los últimos 3 años de combinaciones de compuestos con platino y cisplatino¹²⁹, deguelina y cisplatino¹³⁰, inhibidores de histona-deacetilasa y cisplatino¹³¹⁻¹³³, cisplatino y tetandrina¹³⁴, cisplatino y bromelaína (ecuación del efecto medio)¹³⁵ en diversas líneas tumorales, y en fase clínica, la combinación de docetaxel y carboplatino¹³⁶ es un ejemplo, sin embargo, y debido a que este análisis requiere que los compuestos involucrados en la combinación presenten curvas CR paralelas y considerando que los mecanismos de acción son mutuamente excluyentes, uno se puede apoyar de otros análisis como la ecuación del efecto medio el cual no se ve limitado por la exclusividad de los mecanismos de acción y lo cual se ve reflejado en este trabajo, en el cual, a pesar de que el único compuesto que comparte similitud en la pendiente con la curva del compuesto CasIII-ia, se pudieron observar interacciones super y subaditivas.

CAPÍTULO VIII.

Conclusiones

VIII. CONCLUSIONES

Se evaluaron combinaciones de un compuesto de cobre(II) con análogos más activos o con cisplatino, siendo las interacciones (aditiva, superaditiva y subaditiva) evaluadas a través de análisis fraccional, isobolográfico y de la ecuación del efecto medio y se encontraron combinaciones de compuestos que superaron el efecto esperado del 50% mientras disminuyeron significativamente la concentración de compuesto a emplear, particularmente del compuesto CasIII-ia. De acuerdo a los resultados obtenidos, los compuestos de cobre(II) que contienen en su estructura fenantrolinas tetrametiladas presentaron los mejores resultados en cultivos de células de adenocarcinoma de cérvico-uterino en los cuales se encontró una combinación que alcanzó el 90% de inhibición de la proliferación, empleando 4.59 y 1.35 μM de CaIII-ia y CasVIII-gly. Al interpolar de sus respectivas gráficas, se hubiese requerido >100 y 4.8 μM , respectivamente y para obtener el mismo efecto de manera individual. En el caso de la combinación de CasIII-ia con cisplatino, se observó que se obtuvieron las tres interacciones las cuales resultaron dependientes de la concentración del cisplatino en la combinación, siendo la máxima inhibición de $\sim 70\%$ para una concentración de 4.59 y 9.70 μM de CasIII-ia y cisplatino, respectivamente con respecto a 64.4 y 27.4 μM .

Los resultados, a su vez, así como lo observado en el daño a ADN plasmídico, sugieren un daño diferencial por parte de los compuestos de cobre (II), sin embargo, al extrapolar estos resultados a un esquema *in vivo*, el esquema de dosificación, la farmacocinética y farmacodinamia de los compuestos deberá ser considerada para así determinar si la toxicidad de la combinación se ve disminuida con respecto a la de los compuestos individuales. Finalmente, considerando los compuestos que presentaron interacciones super y subaditivas, sería interesante evaluar a nivel bioquímico el comportamiento de los compuestos, ya que podrían evidenciar nuevas consideraciones con respecto al mecanismo de acción.

CAPÍTULO IX.

Bibliografía

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Smart, R. C. in *A Textbook of Modern Toxicology* (ed. Sons, J.W.) 225 (2004).
2. World Health Organization. Cancer. (2017). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. (Accessed: 10th April 2017)
3. Center for Disease Control and Prevention. Global Cancer Statistics. (2015). Disponible en: <https://www.cdc.gov/cancer/international/statistics.htm>. (Accessed: 10th April 2017)
4. Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. (2015). Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>. (Accessed: 10th April 2017)
5. Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. Estadísticas a propósito del... día mundial contra el cáncer. (2017). Disponible en: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf. (Accessed: 10th April 2017)
6. Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Viñals, F., Capellá, G.. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current Pharmaceutical Design* **16**, 3–10 (2010).
7. National Cancer Institute. Types of Cancer Treatment - National Cancer Institute. Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/>. (Acceso: 13 de abril de 2017)
8. Bhosle, J. & Hall, J. Principles of cancer therapy. *Surgery* **27**, 173–177 (2009).
9. Johnstone, T. C., Suntharalingam, K. & Lippard, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chemical Reviews* **116**, 3436–3486 (American Chemical Society, 2016).
10. Thripathi, K. D. in *Essentials of Medical Pharmacology* (2008).
11. Seiwert, T. Y., Salama, J. K. & Vokes, E. E. The concurrent chemoradiation paradigm—general principles. *Concurrent chemoradiation paradigm general principles*. **4**, 86–100 (2007).
12. Carcelli, M., Bacchi, A., Pelagatti, P., Rispoli, G., Rogolino, D., Sanchez, T.W., Sechi, M. & Neamati, N., Ruthenium arene complexes as HIV-1 integrase strand transfer inhibitors. *Journal of Inorganic Biochemistry* **118**, 74–82 (2013).
13. Madeira, J. M., Beloukhina, N., Boudreau, K., Boettcher, T.A., Gurley, L., Walker, D.G., McNeil, W.S. & Klegeris, A.. Cobalt(II) β -ketoaminato complexes as novel inhibitors of neuroinflammation. *European Journal of Pharmacology*. **676**, 81–88 (2012).
14. Derrick, J. S., Lee, J., Lee, S.J.C., Kim, Y., Nam, E., Tak, H., Kang, J., Lee, M., Kim, S.H., Park, K., Cho, J. & Lim, M.H.. Mechanistic Insights into Tunable Metal-Mediated Hydrolysis of Amyloid- β Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **139**, 2234–2244 (2017).
15. Faa, G., Gerosa, C., Fanni, D., Lachowicz, J. & Nurchi, V. Gold - Old Drug With New Potentials. *Current Medicinal Chemistry* **24**, 1–1 (2017).
16. Navarro, M., Gabbiani, C., Messori, L. & Gambino, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: Recent achievements and perspectives. *Drug Discovery Today* **15**, 1070–1078 (2010).
17. Gambino, D. & Otero, L. Perspectives on what ruthenium-based compounds could

- offer in the development of potential antiparasitic drugs. *Inorganica Chimica Acta* **393**, 103–114 (2012).
18. Glišić, B. Đ. & Djuran, M. I. Gold complexes as antimicrobial agents: an overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure. *Dalton Transactions* **43**, 5950 (2014).
 19. Biot, C., Castro, W., Botté, C. Y. & Navarro, M. The therapeutic potential of metal-based antimalarial agents: Implications for the mechanism of action. *Dalton Transactions* **41**, 6335 (2012).
 20. Navarro, M. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. *Coordination Chemistry Reviews* **253**, 1619–1626 (2009).
 21. Cerecetto, H. & González, M. Synthetic medicinal chemistry in chagas' disease: Compounds at the final stage of 'hit-to-lead' phase. *Pharmaceuticals* **3**, 810–838 (2010).
 22. Medici, S., Peana, M., Crisponi, G., Nurchi, V.M., Lachowicz, J.I., Remelli, M. & Zoroddu, M.A.. Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. *Coordination Chemistry Reviews* **327**, 349–359 (2016).
 23. Gurley, L., Beloukhina, N., Boudreau, K., Klegeris, A. & McNeil, W. S. The synthesis and characterization of a series of cobalt(II) β -ketoamino complexes and their cytotoxic activity towards human tumor cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry* **105**, 858–866 (2011).
 24. Frezza, M., Hindo, S., Chen, D., Davenport, A., Schmitt, S., Tomco, D. & Dou, Q.P.. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design* **16**, 1813–25 (2010).
 25. Muhammad, N. & Guo, Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Current Opinion in Chemical Biology* **19**, (2014).
 26. Buettner, K. M. & Valentine, Ann, M. Bioinorganic Chemistry of Titanium. *Chemical Reviews* **112**, 1863–1881 (2012).
 27. Serratrice, M. *et al.* Cytotoxic gold compounds: synthesis, biological characterization and investigation of their inhibition properties of the zinc finger protein PARP-1. *Dalton Transactions* **41**, 3287 (2012).
 28. Zou, T., Lum, C. T., Chui, S. S.Y. & Che, C.M. Gold(III) Complexes Containing N-Heterocyclic Carbene Ligands: Thiol 'Switch-on' Fluorescent Probes and Anti-Cancer Agents. *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 2930–2933 (2013).
 29. Johnstone, T. C., Ga Young Park & Lippard, S. J. Understanding and Improving Platinum Anticancer Drugs – Phenanthriplatin. *NIH Public Access* **34**, 471–476 (2014).
 30. Tzuber, A. & Tshuva, E. Y. Trans Titanium(IV) Complexes of Salen Ligands Exhibit High Antitumor Activity. *Inorganic Chemistry* **50**, 7946–7948 (2011).
 31. Ruiz-Azuara, L. L. Ruiz-Azuara, "Process to obtain new mixed copper amino acidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents", 07/628843, US5107005 A, 1992, RE 35458, US RE35,458E, 1997;
 32. L. Ruiz-Azuara, "Process to obtain new mixed copper amino acidate complexes from methylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents", 628628, 5576325, 1996.
 33. Ruiz-Azuara, L. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II S.18802. (1993).
 34. Solans, X., Ruiz-Ramirez, L., Martinez, a, Gasque, L. & Moreno-Esparza, R. Mixed chelate complexes. II. Structures of L-alaninato(aqua)(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)copper(II) nitrite monohydrate and aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(nitrate)copper(II) monohydrate. *Acta Crystallographica Section C. Crystal Structures Communication* **C49**, 890–893 (1993).

35. Arredondo, M., & Nuñez, M. Iron and copper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine* **26**, 313–325 (2005).
36. Wilkinson, G. in *Comprehensive Coordination Chemistry: The synthesis, reactions, properties and application of coordination compounds*. (ed. Press, P.) (1987).
37. Da Silva, J. J. R. F. & Williams, J. R. P. *The Biological Chemistry of the Elements*. (1991).
38. Gaetke, L. M. & Chow, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* **189**, 147–163 (2003).
39. Klaunig, J. E. & Kamendulis, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **44**, 239–267 (2004).
40. Huang, R., Wallqvist, A. & Covell, D. G. Anticancer metal compounds in NCI's tumor screening database: putative mode of action. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 1009–1039 (2005).
41. Griesser, R. & Sigel, H. Ternary complexes in solution. VIII. Complex formation between the Copper(II)-2,2'-bipyridyl 1:1 Complex and ligands containing Oxygen and/or Nitrogen as donor atoms. *Inorg. Chem. Chem.* **9**, 1238–1243 (1970).
42. Makoto, C., Tomizawa, Y., Fukita, D., Sugizaki, T., Sugawara, N., Yamazaki, T., Sasano, A., Shindo, H. & Palaniandavar, A.W.E. DNA-fiber EPR study of the orientation of Cu(II) complexes of 1-10 phenanthroline and its derivatives bound to DNA: mono(phenanthroline)-copper(II) and its ternary complexes with amino acids. *Journal of Inorganic Biochemistry* **28**, 163–173 (2002).
43. Kwik, W. L. & Ang, K. P. Complexes of (2,2'-bipyridyl) copper(II) complexes and 1,10-phenanthroline copper(II) with some amino acids. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **42**, (1980).
44. Gasque, L., Medina, G., Ruiz-Ramírez, L. & Moreno-Esparza, R. Cu–O stretching frequency correlation with phenanthroline pKa values in mixed copper complexes. *Inorganica Chim. Acta* **288**, 106–111 (1999).
45. Bravo-Gómez, M. E. Dávila-Manzanilla, S., Flood-Garibay, J., Muciño-Hernández, M.A., Mendoza, Á., García-Ramos, J.C., Moreno-Esparza, R. & Ruiz-Azuara, L. Secondary ligand effects on the cytotoxicity of several Casiopeína's group II compounds. *Journal of the Mexican Chemical Society* **56**, 85–92 (2012).
46. Bravo-Gómez, M. E., García-Ramos, J. C., Gracia-Mora, I. & Ruiz-Azuara, L. Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®). *Journal of Inorganic Biochemistry* **103**, 299–309 (2009).
47. Carvallo-Chaigneau, F., Trejo-Solís, C., Gómez-Ruiz, C., Rodríguez-Aguilera, E., Macías-Rosales, L., Cortés-Barberena, E., Cedillo-Peréz, C., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L., Madrid-Marina, V. & Constantino-Casas, F.. Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *BioMetals* **21**, 17–28 (2008).
48. Bravo-Gómez, M.E., Hernández-de-la-Paz, A.L. & Gracia Mora, I. Antineoplastic Evaluation of Two Mixed Chelate Copper Complexes (Casiopeínas®) in HCT-15 Xenograft Model. *Journal of the Mexican Chemical Society* **57**, 205–211 (2013).
49. Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropón, A., Osorio-Rico, L., Sánchez Torres, L., Gracia-Mora, I., Márquez-Rosado, L., Sánchez, A., Moreno-García, M.E., Cruz, A., Bravo-Gómez, M.E., Ruiz-Ramírez, L., Rodríguez-Enríquez, S. & Sotelo, J. Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia* **7**, 563–574 (2005).
50. Serment-Guerrero, J., Cano-Sánchez, P., Reyes-Pérez, E. Velázquez-García, F., Bravo-Gomez, M. E. & Ruiz-Azuara, L. Genotoxicity of the copper antineoplastic

- coordination complexes casiopeinas® *Toxicology in Vitro* **25**, 1376–1384 (2011).
51. Serment-Guerrero, J., Bravo-Gómez, M. E., Lara-Rivera, E. & Ruiz-Azuara, L. Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action. *Journal of Inorganic Biochemistry* **166**, 68–75 (2017).
 52. Rufino-González, Y., García-Ramos, J.C, Toledano-Magaña, Y. & Ruiz-Azuara, L. Antigiardiasic effect of antineoplastic Cu(II) coordination compounds. New diseases tackled with the same action mechanism. *PLoS Pathogens* (por publicar)
 53. Rivero-Müller, A., De Vizcaya-Ruiz, A., Plant, N., Ruiz, L. & Dobrota, M. Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* **165**, 189–199 (2007).
 54. Marín-Hernández, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L. & Moreno-Sánchez, R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology* **65**, 1979–1989 (2003).
 55. Trejo-Solís, C., Jiménez-Farfán, D., Rodríguez-Enríquez, S., Fernández-Valverde, F., Cruz-Salgado, A., Ruiz-Azuara, L. & Sotelo, J. Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and JNK activation. *BMC Cancer* **12**, 156 (2012).
 56. García-Ramos, J.C., Gutiérrez, A.G., Vázquez-Aguirre, A., Toledano-Magaña, Y., Alonso-Sáenz, A.L., Gómez-Vidales, V., Flores-Alamo, M., Mejía, C. & Ruiz-Azuara, L. The mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu(II) antineoplastic compounds (Casiopeínas®) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times. *Biomaterials* **30**, 43–58 (2017).
 57. De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Müller, A., Ruiz-Ramirez, L., Howarth, J.A. & Dobrota, M. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeina II. *Toxicology* **194**, 103–113 (2003).
 58. Valencia-Cruz, A.I., Uribe-Figueroa, L.I., Galindo-Murillo, R., Baca-López, K., Gutiérrez, A.G., Vázquez-Aguirre, A., Ruiz-Azuara, L., Hernández-Lemus, E., Mejía, C. Whole Genome Gene Expression Analysis Reveals Casiopeína-Induced Apoptosis Pathways. *PLoS One* **8**, (2013).
 59. Alemón-Medina, R., Muñoz-Sánchez, J. L., Ruiz-Azuara, L. & Gracia-Mora, I. Casiopeína IIgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicology in Vitro* **22**, 710–715 (2008).
 60. Alemón-Medina, R., Bravo-Gómez, M. E., Gracia-Mora, M. I. & Ruiz-Azuara, L. Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína IIgly and cisplatin in murine melanoma B16 cells. *Toxicology in Vitro* **25**, 868–873 (2011).
 61. Kachadourian, R., Brechbuhl, H. M., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I. & Day, B. J. Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology* **268**, 176–183 (2010).
 62. Chávez-Cortéz, E. G. Efecto antineoplásico y mecanismos de acción del compuesto de coordinación de cobre [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃•H₂O sobre el carcinoma de células escamosas orales humanas in vitro. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
 63. Gutiérrez, A.G., Vázquez-Aguirre, A., García-Ramos, J.C., Flores-Álamo, M., Hernández-Lemus, E., Ruiz-Azuara, L. & Mejía, C. Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *Journal of Inorganic Biochemistry* **126**, 17–25 (2013).
 64. Alonso-Sáenz, A. L. Estudio de la reactividad de la Casiopeína II-gly y Casiopeína

- III-ia Cisteína, Glutación y 2-mercaptoetanol. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
65. Becco, L., Rodríguez, A., Bravo, M.E., Prieto, M.J., Ruiz-Azuara, L., Garat, B., Moreno, V. & Gambino, D. New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. *Journal of Inorganic Biochemistry* **109**, 49–56 (2012).
 66. Bravo-Gómez, M.E., Campero-Peredo, C., García-Conde, D., Mosqueira-Santillán, M.J., Serment-Guerrero, J. & Ruiz-Azuara, L. DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casiopeinas) and analysis of its biological meaning. *Polyhedron* **102**, 530–538 (2015).
 67. Galindo-Murillo, R., Garcia-Ramos, J. C., Ruiz-Azuara, L., Cheatham, T. E. & Cortes-Guzman, F. Intercalation processes of copper complexes in DNA. *Nucleic Acids Research* **43**, 5364–5367 (2015).
 68. Galindo-Murillo, R., Ruíz-Azuara, L., Moreno-Esparza, R. & Cortés-Guzmán, F. Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex. *Physical Chemistry Chemical Physics* **14**, 15539 (2012).
 69. De Vizcaya-Ruiz, A. *et al.* Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology in Vitro* **14**, 1–5 (2000).
 70. Mejia, C. & Ruiz-Azuara, L. Casiopeinas IIgly and IIIia Induce Apoptosis in Medulloblastoma Cells. *Pathology Oncology Research* **14**, 467–472 (2008).
 71. Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J.C., López-Ramírez, S.Y., García-García, J.D., Rodríguez-Zavala, J.S., Ruiz-Ramírez, L., Gracia-Mora, I., Zentella-Dehesa, A., Sosa-Garrocho, M., Macías-Silva, M., Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S. Casiopeina II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Archives of Toxicology* **86**, 753–766 (2012).
 72. Miranda-Calderón, J. E., Medina-Torres, L., Tinoco-Méndez, M., Moreno-Esparza, R., Ruiz-Ramírez, L., Gracia-Mora, J., Gracia-Mora, I. & Bernad-Bernad, M. J. Characterization of physical interaction between Casiopeina III-ia and chitosan. Toward a Cas III-ia drug delivery system. *Carbohydrates Research* **346**, 121–126 (2011).
 73. Zenayda Aguilar-Jiménez. Nanoencapsulación de Casiopeína III-ia en un sistema niosomal y estudio de su liberación in vitro. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.
 74. Chávez-González, A., Centeno-Llanos, S., Moreno-Lorenzana, D., Sandoval-Esquivel, M.Á., Áviles-Vázquez, S., Bravo-Gómez, M.E., Ruiz-Azuara, L., Ayala-Sánchez, M., Torres-Martínez, H. & Mayani, H. Casiopeina III-Ea, a copper-containing small molecule, inhibits the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from chronic myeloid leukemia. *Leukaemia Research* **52**, 8–19 (2017).
 75. Vértiz, G., García-Ortuño, L.E., Bernal, J.P., Bravo-Gómez, M.E., Lounejeva, E., Huerta, A. & Ruiz-Azuara, L. Pharmacokinetics and hematotoxicity of a novel copper-based anticancer agent: Casiopeina III-Ea, after a single intravenous dose in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **28**, 78–87 (2014).
 76. Centeno-Llanos, S. Evaluación de la hematotoxicidad del compuesto antineoplásico Casiopeína III-ia. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
 77. Leal-García, M., García-Ortuño, L., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., Luna-Delvillar, J., Sumano, H. Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of casiopeinas in anaesthetized dogs. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology* **101**, 151–158 (2007).

78. Antonio-Jarquín, J. Farmacocinética de Casiopeína III-i. Estudio preclínico en conejos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.
79. García-Ramos J.C., Vértiz-Serrano, G., Macías-Rosales L., Galindo-Murillo, R., Toledano-Magaña, Y., Bernal, J.P., Cortés-Guzmán, F. & Ruiz-Azuara, L. Isomeric effect on the pharmacokinetic behavior of anticancer Cu(II) mixed chelate complexes: Experimental and Theoretical Approach. *European Journal of Inorganic Chemistry* (2017). 1728-1736 10.1002/ejic.201601199
80. Hernández-Esquível, L., Marín-Hernández, A., Pavón, N., Carvajal, K. & Moreno-Sánchez, R. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeínas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* **212**, 79–88 (2006).
81. Vidal, L.M., Pimentel, E., Cruces, M. P., Hernández, S. & Ruiz-Azuara, L. Citotoxic and genotoxic actions of Casiopeína III-Ea (CasIII-Ea) in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster* *Journal of Biology and Environmental Health Part A* **6** (80) (2017).
82. Romero-Ramírez, A. Estudio preliminar de farmacocinética de Casiopeína III-ia (un nuevo anticancerígeno) en ratas, a partir del análisis de datos urinarios. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
83. Fuentes N. Inés, Ruiz R. Lena, Tovar T. Araceli, "Development and validation of methodology by HPLC of Casiopeína IIIi", *Journal of Chromatography B*, **772**, 115-121, (2002)
84. Cañas-Alonso, R. C., Fuentes-Noriega, I. & Ruiz-Azuara, L. Blood to plasma ratio, short-term stability and plasma protein binding of casiopeína IIgly, a copper (II) based compound with antineoplastic activity. *Journal of the Mexican Chemical Society* **57**, 239–244 (2013).
85. Cañas-Alonso, R. C., Fuentes-Noriega, I. & Ruiz-Azuara, L. Pharmacokinetics of Casiopeína IIgly in beagle dog: A copper based compound with antineoplastic activity. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* **2**, 28–34 (2010).
86. Pérez-Flores, G. Estudio comparativo del daño genotóxico inducido por el cisplatino y por la Casiopeína III-ia; en ratones machos, hembra, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
87. Ruiz-Azuara, L. *Ficha técnica de la Casiopeína III-ia*. (2014).
88. Uribe Gutiérrez, T. Estabilidad de Casiopeína III-ia y Casiopeína II-gly a una temperatura. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
89. Ruiz-Azuara, L. & Bravo-Gómez, M. E. Copper compounds in cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **17**, 3606–3615 (2010).
90. Hill, R. Copper toxicity I. *The British Veterinary Journal* **133**, 219–224 (1977).
91. Hill, R. Copper toxicity II. *The British Veterinary Journal* **133**, 365–373 (1977).
92. Asano, R., Kaseda, M. & Hokari, S. The effect of copper and copper- o-phenanthroline complex on cattle erythrocytes. *Nippon Juigaku Zasshi* **45**, 77–83 (1983).
93. Chung-Hae, L. & Macgregor, P. F. Drug Resistance and Microarrays. *Modern Drug Discovery* 45–49 (2004).
94. Kroll, D. J. Circumventing Antineoplastic Drug Resistance : When Tumor Cells Just Say No to Drugs. *The American Journal of Pharmaceutical Education* **59**, (1995).

95. Foucquier, J. & Guedj, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research and Perspectives* **3**, 1–11 (2015).
96. México., D. O. de la N. *Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud*. (1986).
97. Rang, H., Dale, M., Ritter, J. & Flower, R. *Pharmacology*. (2007).
98. Tallarida, R. J. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **319**, 1–7 (2006).
99. Tallarida, R. J. & Raffa, R. B. The application of drug dose equivalence in the quantitative analysis of receptor occupation and drug combinations. *Pharmacology and Therapeutics* **127**, 165–174 (2010).
100. Bijnisdorp, I. V., Giovannetti, E. & Peters, G. J. in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (ed. Cree, I. A.) 518 (Humana Press, 2011).
101. Reynolds, C. P. & Maurer, B. J. Evaluating response to antineoplastic drug combinations in tissue culture models. *Methods in Molecular Medicine* **110**, 173–183 (2005).
102. Bovill, J. G. 1 Analysis of drug interactions. *Baillieres. Clinical Anaesthesiology* **12**, 153–168 (1998).
103. Tallarida, R. J. Drug synergism: its detection and applications. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **298**, 865–872 (2001).
104. Tallarida, R. J. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain* **98**, 163–168 (2002).
105. Roell, K. R., Reif, D. M. & Motsinger-Reif, A. A. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy - Perspectives from across disciplines. *Frontiers in Pharmacology* **8**, 1–11 (2017).
106. Chou, T. C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulations* **22**, 27–55 (1984).
107. Chou, T.-C. & Martin, N. CompuSyn. (2004).
108. Barbosa, A.R., Caleffi-Ferracioli, K.R., Leite, C.Q.F., García-Ramos, J.C., Toledano-Magaña, Y., Ruiz-Azuara, L., Siqueira, V.L.D., Pavan, F.R. & Cardoso, R.F. Potential of Casiopeínas® Copper Complexes and Antituberculosis Drug Combination against Mycobacterium tuberculosis. *Chemotherapy* **16**, 249–255 (2015).
109. Robledo-Cadena, D. X. Efecto sinérgico de la casiopeína II gly con drogas empleadas en el sector clínico sobre la proliferación del cáncer cervico-uterino (CCU) de HeLa. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.
110. Bliss, C.I. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology* **26**, 585–615 (1939).
111. Haglund, C., Åleskog, A., Nygren, P., Gullbo, J., Höglund, M., Wickström, M., Larsson, R. & Lindhagen, E. In vitro evaluation of clinical activity and toxicity of anticancer drugs using tumor cells from patients and cells representing normal tissues. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **69**, 697–707 (2012).
112. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. & Boyd, M.R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute* **82**, 1107–1112 (1990).

113. National Cancer Institute. Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs>.
114. Salud, C. interinstitucional del cuadro básico y catálogo de insumos del S. in *Cuadro y Catálogo de Medicamentos del Sector Salud* 651 (2016).
115. Ujhelyi, Z., Kalantari, A., Vecsernyés, M., Róka, E., Fenyvesi, F., Póka, R., Kozma, B. & Bácskay, I. The enhanced inhibitory effect of different antitumor agents in self-micro-emulsifying drug delivery systems on human cervical cancer HeLa cells, /molecules200713226. *Molecules* **20**, 13226–13239 (2015).
116. Fried, J., Perez, A.G., Doblin, J.M. & Clarkson B.D. Cytotoxic and Cytokinetic Effects of Thymidine, 5-Fluorouracil. *Cancer Research* **41**, 2627–2632 **41**, 2627–2632 (1981).
117. Min-Hsiung Cheng, Hao-Tsai Cheng, Shih-Shen Lin, Su-Chung Young, Chien-Jung Pai, Pao-Hsin Liao, Shu-Chen Chen, Ming-Yung Chou, J.-J. Y. & C.-C. Y. Apoptotic death mode of mitomycin C-treated HeLa cells and cellular localization of mitomycin C–induced P-glycoprotein. *Drug and Chemical Toxicology* **32**, 158–168 (2009).
118. Tomasz, M. Mitomycin C: Small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry and Biology* **2**, 575–579 (1995).
119. William-Faltaos, S., Rouillard, D., Lechat, P. & Bastian, G. Cell cycle arrest by oxaliplatin on cancer cells. *Fundamental and Clinical Pharmacology* **21**, 165–172 (2007).
120. Arican-Özcan, G. & Nazmiye Soy, N. Effects of epirubicin and daunorubicin on cell proliferation and cell death in HeLa cells. *Journal of Cell and Molecular Biology* **4**, 47–52 (2005).
121. Dasari, S. & Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in Cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* **740**, 364–78 (2014).
122. García-Ramos, J. C., Galindo-Murillo, R., Cortés-Guzmán, F. & Ruiz-Azuara, L. Metal-based drug-DNA interactions. *Journal of the Mexican Chemical Society* **57**, (2013).
123. Galindo-Murillo, R., Hernandez-Lima, J., González-Rendón, M., Cortés-Guzmán, F., Ruíz-Azuara, L. & Moreno-Esparza, R. π -Stacking between Casiopeínas® and DNA bases. *Physical Chemistry Chemical Physics* **13**, 14510–14515 (2011).
124. Becco, L., García-Ramos, J., Azuara, L., Gambino, D. & Garat, B. Analysis of the DNA Interaction of Copper Compounds Belonging to the Casiopeínas® Antitumoral Series. *Biological Trace Element Research* **161**, 210–215 (2014).
125. Zhang, Z., Gou, Y., Wang, J., Yang, K., Qi, J., Zhou, Z., Liang, S., Liang, H. & Yang, F. Four copper(II) compounds synthesized by anion regulation: Structure, anticancer function and anticancer mechanism. *European Journal of Medicinal Chemistry* **121**, 399–409 (2016).
126. Borges, Layla J.H., Bull, É.S., Fernandes, C., Horn, A., Azeredo, N.F., Resende, J.A.L.C., Freitas, W.R., Carvalho, Eulógio C.Q., Lemos, L.S., Jerdy, H. & Kanashiro, M.M. In vitro and in vivo studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* **123**, 128–140 (2016).
127. Shobha Devi, C., Anil Kumar, D., Singh, Surya S., Gabra, N., Deepika, N., Kumar, Y.P. & Satyanarayana, S. Synthesis, interaction with DNA, cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptotic inducing properties of ruthenium(II) molecular ‘light switch’ complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry* **64**, (2013).

128. Davila-Manzanilla, S. G., Figueroa-de-Paz, Y., Mejia, C. & Ruiz-Azuara, L. Synergistic effects between a copper-based metal Casiopeína III-ia and cisplatin. *European Journal of Medicinal Chemistry* **129**, 266–274 (2017).
129. Pages, B. J., Garbutcheon-Singh, K. B. & Aldrich-Wright, J. R. Platinum Intercalators of DNA as Anticancer Agents. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2017**, 1613–1624 (2017).
130. Li, Z., Wu, C., Wu, J., Ji, M., Shi, L., Jiang, J., Xu, B. & Yuan, J. Synergistic antitumor effects of combined deguelin and cisplatin treatment in gastric cancer cells. *Oncology Letters* **8**, 1603–1607 (2014).
131. Gumbarewicz, E., Luszczki, J.J., Wawruszak, A., Dmoszynska-Graniczka, M., Grabarska, A.J., Jarzab, A.M., Polberg, K. & Stepulak, A. Isobolographic analysis demonstrates additive effect of cisplatin and HDIs combined treatment augmenting their anti-cancer activity in lung cancer cell lines. *American Journal of Cancer Research* **6**, 2831–2845 (2016).
132. Jarzab, A., Luszczki, J.J., Guz, M., Gumbarewicz, E., Polberg, K. & Stepulak, A. Additive Interaction of Cisplatin and Histone Deacetylase Inhibitors Combined Treatment in Rhabdomyosarcoma Cells ? ?n Isobolographic Analysis. *Anticancer Research* **37**, 1067–1074 (2017).
133. Wawruszak, A., Luszczki, J.J., Grabarska, A., Gumbarewicz, E., Dmoszynska-Graniczka, M., Polberg, K. & Stepulak, A. Assessment of Interactions between Cisplatin and Two Histone Deacetylase Inhibitors in MCF7, T47D and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines ? An Isobolographic Analysis. *PLoS One* **10**, e0143013 (2015).
134. Ye, L.Y., Hu, S., Xu, H.E., Xu, R.R., Kong, H., Zeng, X.N., Xie, W.P. & Wang, H. The effect of tetrandrine combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of A549/DDP cells and A549 cells. *Cancer Cell International* **17**, 40 (2017).
135. Pauzi, A.Z.M., Yeap, S.K., Abu, N., Lim, K.L., Omar, A.R., Aziz, S.A., Chow, A.L.T., Subramani, T., Tan, S.G., Alitheen, N.B. & Garrido, C. Combination of cisplatin and bromelain exerts synergistic cytotoxic effects against breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro. *Chinese Medicine*. 2016 **111** **2**, 132–139 (2016).
136. Pallis, A.G., Agelaki, S., Agelidou, A., Varthalitis, I., Syrigos, K., Kentepozidis, N., Pavlakou, G., Kotsakis, A., Kontopodis, E. & Georgoulas, V. A randomized phase III study of the docetaxel/carboplatin combination versus docetaxel single-agent as second line treatment for patients with advanced/metastatic non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **10**, 633 (2010).

CAPÍTULO X.

Anexos

X. ANEXOS

ANEXO 1

Características fisicoquímicas de los compuestos de la Series A y B

Serie A: Casiopeínas^{®2,3}

- i. *Nitrato de 4,4'-dimetil-2,2'-bipridina acetilacetato cobre(II) monohidratado (Casiopeína III-ia o CasIII-ia)*. Rendimiento: 90%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$: (PM = 426.92 g/mol): C, 47.83; N, 9.84; H, 4.96%. Experimental: C, 47.48; N, 9.97; H, 5.07%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1616.14, 1587.2, 1525.5, 1490.8, 1384.7 (NO_3^-), 730.9. $\mu_{\text{eff}} = 1.80$ BM. λ (1 mM disolución etanólica a 298 K) = 40.23 μS .
- ii. *Nitrato de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) monohidratado (Casiopeína III-Ea o CasIII-Ea)* Rendimiento: 86%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM = 450.94 g/mol): C, 50.61; N, 9.32; H, 4.69. Experimental: C, 50.23; N, 9.30; H, 4.55%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1622.2, 1577.6, 1521.6, 1425.2, 1384.7 (NO_3^-) 869.8, 725.1. $\mu_{\text{eff}} = 1.80$ BM. λ (1 mM disolución etanólica 298 K) = 38.48 μS .
- iii. *Nitrato de 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) dihidratado (Casiopeína III-La o CasIII-La)*. Rendimiento: 92%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM = 468.08 g/mol): C, 48.66; N, 8.96; H, 4.94%.

²Bravo-Gómez ME *et al.* Antineoplastic Evaluation of Two Mixed Chelate Copper Complexes (Casiopeínas[®]) in HCT-15 Xenograft Model. *J Mex Chem Soc* 2013; 57(3): 205–211.

³Bravo-Gómez ME *et al.* DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casiopeínas[®]) and analysis of its biological meaning. *Polyhedron* 2015; 102: 530–538. doi:10.1016/j.poly.2015.10.034.

Found: C, 48.53; N, 9.15; H, 4.99%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3483, 3070, 1606, 1581, 1517, 1384 (NO_3^-), 1431, 817, 730. $\mu_{\text{eff}} = 1.82 \text{ BM}$. λ (1 mM disolución etanólica a 298 K) = 38.9 μS .

- iv. *Nitrato de 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina acetilacetato cobre(II) monohidratado (**Casiopeína III-Ma o CasIII-Ma**)*. Rendimiento: 85%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM = 478.98 g/mol): C, 52.66; N, 8.77; H, 5.26. Experimental: C, 52.77; N, 9.11; H, 5.18%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3338, 1618, 1583, 1519, 1431, 1384 (NO_3^-), 833, 727. $\mu_{\text{eff}} = 1.76 \text{ BM}$. λ (1 mM disolución etanólica a 298 K) = 37.32 μS .
- v. *Nitrato de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) dihidratado (**Casiopeína II-gly o CasII-gly**)* Rendimiento: 89%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM = 443.9 g/mol): C, 43.29; N, 12.62; H, 4.54. Experimental: C, 43.53; N, 12.61; H, 4.70%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3305, 3253, 2945, 1600, 1579, 1383 (NO_3^-), 1430, 871, 726. $\mu_{\text{eff}} = 1.76 \text{ BM}$. λ (1 mM disolución etanólica a 298 K) = 38.8 μS .
- vi. *Nitrato de 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) monohidratado (**Casiopeína VI-gly o CasVI-gly**)*. Rendimiento: 89%. Análisis elemental calculado para $\text{CuC}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM = 425.88 g/mol): C, 45.12; N, 13.16; H, 4.26%. Experimental: C, 45.55; N, 13.22.; H, 4.19%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3421, 3261, 2923, 1632, 1525, 1385 (NO_3^-), 1430, 822, 730. $\mu_{\text{eff}} = 1.71 \text{ BM}$. λ (1 mM disolución metanólica a 298 K) = 76.1 μS .
- vii. *Nitrato de acua 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina glicinato cobre(II) monohidratado (**Casiopeína VIII-gly o CasVIII-gly**)*. Rendimiento: 83%. Análisis

elemental calculado para $\text{CuC}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM = 453.94 g/mol): C, 47.63; N, 12.34; H, 4.88%. Experimental: C, 46.97; N, 12.67; H, 4.84%. IR (KBr , v/cm^{-1}): 3395, 3300, 2937, 1620, 1533, 1385 (NO_3^-), 1434, 896, 726. $\mu_{\text{eff}} = 1.78 \text{ BM}$. λ (1 mM disolución metanólica a 298 K) = 79.2 μS .

Serie B: Fármacos antitumorales.

***i.* 5-Fluorouracilo**

$\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2\text{FO}_2$; CAS#: 51-21-8; PM: 130.08 g/mol; Parcialmente soluble en agua, soluble en metanol e insoluble en dietiléter⁴. Cl_{50} : 10 μM , (HeLa, 3 días).⁵Toxicidad oral: $\text{DL}_{50} = 115 \text{ mg/kg}$ (ratón)⁴.

El 5-fluorouracilo (5FU) es un compuesto orgánico aromático análogo al uracilo, excepto que contiene un átomo de flúor en la posición 5. Su mecanismo de acción consiste en la interferencia con el metabolismo de los nucleósidos, el cual puede ser incorporado al ADN y al ARN y producir así citotoxicidad y posterior muerte celular. El 5-fluorouracilo debe ser biotransformado a fluorodeoxouridinamonofosfato (FdUMP), el cual se une de forma covalente al sitio activo de la enzima timidilato sintetasa, inhibiendo la producción de deoxitimidinamonofosfato (dTMP), un metabolito esencial para la replicación y reparación del DNA, por lo que la disminución de su concentración causa toxicidad. La resistencia a este compuesto se ha propuesto se deba a diversas causas, entre las que se encuentran: alteración de los flujos de

⁴ Ficha de seguridad del 5-fluorouracilo. Revisada en <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924082>, el día 09 de mayo de 2017.

⁵Fried, J., Perez, A.G., Doblin, J.M., Clarkson B.D. Cytotoxic and Cytokinetic Effects of Thymidine, 5-Fluorouracil, and Culture, *Cancer Research* (1981) 41, 2627-2632

salida o ingreso, incremento en la inactivación del fármaco, mutación del blanco molecular y sobreexpresión de proteínas de la familia de Bcl-2.⁶

El 5FU se emplea principalmente para el tratamiento paliativo de cáncer de mama, colorrectal, gástrico y pancreático y puede emplearse sólo o en combinación. En la **Tabla 12** se resumen las combinaciones de este compuesto que actualmente están aprobadas para su uso en la clínica⁷.

Tabla 12. Combinaciones de fármacos en combinación con 5-fluorouracilo.

Tipo de cáncer	Fármacos en combinación (clave de la combinación)
Mama	Ciclofosfamida/adriamicina/fluorouracilo (CAF)
	Ciclofosfamida/metotrexato/fluorouracilo (CMF)
	Fluorouracilo/epirubicina/ciclofosfamida (FEC)
Colon/Recto	Leucovorina/fluorouracilo/irinotecan (FOLFIRI)
	Leucovorina/fluorouracilo/irinotecan/bevacizumab (FOLFIRI-BEVACIZUMAB)
	Leucovorina/fluorouracilo/irinotecan/cetuximab (FOLFIRI-CETUXIMAB)
	Leucovorina/fluorouracilo/oxaliplatino (FOLFOX) Fluorouracilo/leucovorina (FU-LV)
Páncreas	Leucovorina/fluorouracilo/irinotecan/oxaliplatino (FOLFIRINOX)
	Oxaliplatino/fluorouracilo/leucovorina (OFF)
Estómago	Fluorouracilo/leucovorina (FU-LV)
Cuello/Cabeza	Docetaxel/cisplatino/fluorouracilo

⁶Ning Zhang, Ying Yin, Sheng-Jie Xu and Wei-Shan Chen, 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies, *Molecules* (2008) 13:1551-1569; DOI: 10.3390/molecules13081551.

⁷ Combinaciones aprobadas para el cáncer. Revisado en NCI <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/> el día 9 de mayo de 2017.

Con respecto a sus efectos adversos, principalmente se asocian desórdenes a nivel del SNC, del cual se ha reportado que los pacientes tratados con este fármaco presentan confusión y deterioro de la memoria, probablemente debido a cambios bioquímicos y estructurales, así como inducción de la apoptosis y depresión de la proliferación en las regiones neurogénicas en el cerebro.⁸ Asimismo, se le asocia con los siguientes efectos adversos: Anomalías isquémicas en el ECG, angina de pecho (como dolor torácico); mielodepresión, neutrocitopenia, trombocitopenia, leucocitopenia, agranulocitosis, anemia, pancitopenia; mucositis (estomatitis, esofagitis, faringitis, proctitis), anorexia, diarrea acuosa, náuseas, vómitos; alopecia, síndrome de eritrodisestesia palmo-plantar; hiperuricemia; retraso en la cicatrización de heridas, epistaxis, fatiga, debilidad general, cansancio y falta de energía; broncoespasmo e inmunodepresión con un mayor riesgo de infección⁹.

ii. **Bleomicina, Sulfato de**

$C_{55}H_{84}N_{17}O_{21}S_3 \cdot H_2SO_4$; CAS#: 9041-93-4; PM: 1513.62 g/mol; Solubilidad en agua: 100 mg/mL, PBS (pH=7.2): ~10 mg/mL, DMSO: ~13 mg/mL y DMF: ~2 mg/mL. Temperatura de almacenamiento: -20 °C^{10,11}; Cl_{50} : 4.21 mg/mL¹² (2.78 μ M HeLa, 3 días); DL_{50} : 86 mg/kg (s.c. rata); DL_{50} : 240 mg/kg (i.p. rata)¹¹.

Las bleomicinas consisten en una familia antibióticos antitumorales glicopeptídicos con aproximadamente 200 compuestos caracterizadas por la

⁸Wigmore, P.M., Mustafa, S., El-Beltagy, M., Lyons, L., Umka, J., Bennett, .G., *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2010) 678:157-164.

⁹Fluorouracilo, Vademecum, revisado en <http://www.vademecum.es/principios-activos-fluorouracilo-101bc02> el día 09 de mayo de 2017.

¹⁰ Hoja de seguridad del Sulfato de bleomicina, revisada en <http://www.caymanchem.com/msdss/13877m.pdf>, el día 09 de mayo de 2017.

¹¹Reinert, T., Da Rocha B.C.S., Pereira N.F.A, de Souza S.A.A, *Journal of Cancer Research* (2013) <http://dx.doi.org/10.1155/2013/480608>

¹²ZoltánUjhelyi, Azin Kalantari, MiklósVecsernyés, EszterRóka, Ferenc Fenyvesi, Róbert Póka, BenceKozma, IldikóBácskay, The enhanced inhibitory effect of different antitumor agents in self-micro-emulsifying drug delivery systems on human cervical cancer HeLa cells, *Molecules*(2015) 20:13226-13239; doi:10.3390/molecules200713226

presencia de un hexapéptido unido a un disacárido y a una amina terminal. A su vez, contiene en su estructura una región de unión a ADN y otra región de unión a hierro, el cual es un cofactor esencial para la generación de radicales libres y la actividad citotóxica de la bleomicina, el cual se coordina con el Fe^{2+} y oxidándolo a Fe^{3+} a través de la reducción del oxígeno. Los radicales libres generados producen rupturas en una y dos hebras del ADN, lo cual ocasiona la posterior muerte celular. Asimismo, las bleomicinas promueven la degradación oxidativa del RNA celular. Los efectos de la bleomicina son específicos a las fases G2 y M del ciclo celular¹¹.

Actualmente, se emplean para el tratamiento de diversos tipos de cáncer como carcinomas de células escamosas, tumores testiculares, linfomas Hodgkin y no Hodgkin, de la vejiga, tiroides, esofágico y de la laringe. Es de resaltar que la bleomicina es el único fármaco aprobado para el tratamiento de cáncer de pene y de vulva¹³. Esta familia tiene la capacidad de acomodarse en el surco menor y posteriormente producir rupturas en una o las dos hebras del ADN a través de la oxidación de la deoxirribosa en presencia de oxígeno y un metal con actividad redox.

Tras la administración intravenosa de la bleomicina, existe una desaparición bifásica de la circulación. La vida media del compuesto en pacientes con función renal normal es de 3 h. La bleomicina se inactiva rápidamente en tejidos, especialmente en el hígado y riñones a través de la enzima bleomicina hidrolasa (BH). Su eliminación se lleva a cabo principalmente en riñones, de la cual entre el 50-70% de ésta se elimina sin metabolizarse. El cisplatino disminuye la eliminación renal de la bleomicina, lo cual puede provocar un incremento en su toxicidad. Los efectos tóxicos de esta familia de compuestos incluyen principalmente aquellos asociados a los pulmones y la piel, en los cuales se encuentra la menor cantidad de la enzima BH y, como son eritemas, hiperpigmentación, estrías, vesiculación, descamación y engrosamiento; dichos efectos surgen posterior a las tres semanas de la administración, aunque

¹³Fármacos aprobados para el cáncer. Revisado en NCI <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/> el día 9 de mayo de 2017.

alopecia, estomatitis y eventos vasculares también pueden ocurrir, sin embargo, la mayor limitante en su uso se debe generalmente, a toxicidad pulmonar¹³.

En la **Tabla 13** se resumen las combinaciones de este compuesto que actualmente están aprobadas para su uso en la clínica¹⁴.

Tabla 13. Combinaciones de fármacos en combinación con bleomicina.

Tipo de cáncer	Fármacos en combinación (clave de la combinación)
Linfoma de Hodgkin	Adriamicina/bleomicina/vinblastina/dacarbazina (ABVD)
	Adriamicina/bleomicina/vincristina/etopósido (ABVE)
	Adriamicina/bleomicina/vincristina/etopósido/prednisona/ciclofosfamida (ABVE-PC)
	Bleomicina/etopósido/adriamicina/ciclofosfamida/vincristina/procarbazona/prednisona (BEACOPP)
Linfoma de No-Hodgkin	Ciclofosfamida/vincristina/prednisona/procarbazona/adriamicina/bleomicina/vinblastina (COPP-ABV)
	Mecloretamina/adriamicina/vinblastina/vincristina/bleomicina/etopósido/prednisona (STANFORD V)
Pene	-
Cervico-uterino	_*
Cuello/Cabeza	_*
Vulva	-
Testicular	Bleomicina/etopósido/cisplatino (BEP)
	Carboplatino/etopósido/bleomicina (JEB)
	Cisplatino/etopósido/bleomicina (PEB)

* Existen combinaciones, pero ninguna incluye bleomicina.

¹⁴ Combinaciones aprobadas para el cáncer. Revisado en NCI <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/> el día 9 de mayo de 2017.

iii. Cis-diaminodicloroplatino(II), cisplatino

H₆Cl₂N₂Pt; CAS# 15663-27-1; PM: 300.04 g/mol; Muy poco soluble en agua; Estable en disolución acuosa por máximo 30 min¹⁵. Cl₅₀: 5.5 μM (HeLa)¹⁷, 226.7 μM (CHP-212). DL₅₀: 25.8 mg/kg (oral, rata), DL₅₀: 25.8 mg/kg (oral, ratón)¹⁶.

El cisplatino es uno de los compuestos más potentes que se emplea en la actualidad y desde su descubrimiento como potencial quimioterapéutico en 1965 por Rosenberg. Consiste en un átomo de Pt(II) coordinado a dos aminas y dos cloros que se encuentran posición cis, siendo el único quimioterapéutico puramente inorgánico y parteaguas del uso de metales para el tratamiento de enfermedades. Su mecanismo de acción se basa principalmente en la formación de aductos bifuncionales con el ADN, sin embargo, también se ha reportado un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno, las cuales son dependientes de la concentración y el tiempo de exposición al cisplatino; sustitución del Zn en los dominios de los dedos de zinc, o disminución de los niveles de glutatión reducido.

En la clínica, los compuestos de platino se emplean generalmente como terapia adyuvante para un amplio espectro de tumores, dentro del que se encuentran: testicular, ovario, vejiga, cuello y cabeza, esofágico, pulmón (células pequeñas y no pequeñas), mama, cérvico-uterino, estómago y de próstata. Las combinaciones que se han evaluado con cisplatino se muestran en la **Tabla 14**¹⁸.

¹⁵ Hoja de seguridad del cisplatino, revisada en <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923492>, el día 11 de mayo de 2017.

¹⁶ Florea, A.M., Büsselberg, D., Cisplatin as anti-tumor drug: Cellular mechanisms of drug activity, resistance and induced-side effects. *Cancers* (2011) 3, 1351-1371; doi:10.3390/cancers3011351.

¹⁷ Bravo-Gómez ME *et al.* Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopéinas®). *J Inorg Biochem* 2009; 103(2): 299–309.

¹⁸ Combinaciones aprobadas para el cáncer. Revisado en NCI <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/> el día 11 de mayo de 2017.

Tabla 14. Combinaciones de fármacos en combinación con cisplatino.

Tipo de cáncer	Fármacos en combinación (clave de la combinación)
Testicular	Bleomicina/etopósido/cisplatino (BEP) Carboplatino/etopósido/bleomicina (JEB) Cisplatino/etopósido/bleomicina (PEB)
Ovario	Bleomicina/etopósido/cisplatino (BEP) Gemcitabina/cisplatino
Vejiga	Gemcitabina/cisplatino
Cuello/ Cabeza	Docetaxel/cisplatino/fluorouracilo (TPF)
Esofágico	-*
Pulmón	Gemcitabina/cisplatino
Páncreas	Gemcitabina/cisplatino
Mama	-*
Estómago	Docetaxel/cisplatino/fluorouracilo (TPF)
Próstata	-*

* Existen combinaciones, pero ninguna incluye cisplatino.

Como se mencionó anteriormente, el cisplatino es uno de los mejores quimioterapéuticos existentes, sin embargo, a su vez ha promovido la búsqueda de nuevas moléculas debido a que las células tumorales han desarrollado resistencia a este compuesto y los severos efectos adversos que se presentan en los pacientes. Dentro de los mecanismos de resistencia se encuentran: disminución de la acumulación intracelular y un incremento en flujo de salida del compuesto, inactivación debido a un incremento de tioles endógenos, alteraciones del objetivo, reparación del daño causado y evasión de la apoptosis.

Por otro lado, entre los efectos adversos se encuentran principalmente nefrotoxicidad, inmunodepresión, neurotoxicidad, cardiotoxicidad y ototoxicidad¹⁶.

iv. **Epirubicina**

$C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$; CAS#: 56390-09-1; PM: 579.98; Solubilidad en agua: 1mg/mL¹⁹; CI_{50} : 1 μ g/mL (1.72 μ M; HeLa, 2 días)²¹; DL_{50} : 1350 mg/kg (oral, rata)²⁰.

La epirubicina es un epímero de la doxorubicina (adriamicina) con respecto a la posición del hidroxilo de la posición 4' del anillo de daunosamina. La epirubicina pertenece al grupo de los antibioticos antineoplásicos y su mecanismo de acción se lleva a cabo a través de la intercalación con el ADN, inhibición de la actividad de la enzima topoisomerasa II, generación de radicales libres de oxígeno y del propio compuesto, con consecuente interferencia en la síntesis de ADN, ARN y de proteínas^{20,21}.

La epirubicina se emplea principalmente para el tratamiento del cáncer temprano y avanzado de mama, ya sea sólo o en combinación con 5-fluorouracilo y ciclofosfamida. Con respecto a su toxicidad, la epirubicina ha mostrado menores efectos tóxicos que la doxorubicina: mielosupresión, náusea/vómito, alopecia, mucositis y toxicidad cardíaca.²⁰

v. **Mitomicina C**

¹⁹ Hoja de seguridad de Epirubicina consultada en http://aslb.jp/sites/default/files/MSDS/BioVision/1753_MSDS.pdf, el día 12 de mayo de 2017.

²⁰ Khasraw, M., Bell, R., Dang, C., Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review (2012) 21:2, 142-149.

²¹ Arican Özcan G., Nazmiye Soy, N., Effects of epirubicin and daunorubicin on cell proliferation and cell death in HeLa cells, Journal of cell and molecular biology (2005) 4:47-52.

²² Hoja de seguridad de Epirubicina consultada en <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927365>, el día 12 de mayo de 2017.

C₁₅H₁₈N₄O₅; CAS#: 50-07-7; PM: 334.327; Soluble en agua, metanol y acetona²².
Cl₅₀: 0.0299 μM (HeLa, 2 días)²³; DL₅₀: 30 mg/kg (oral, rata), 23 mg/kg (oral, ratón)²².

La mitomicina C pertenece al grupo de los antibióticos antineoplásicos procedente del microorganismo *Streptomyces caespitosus*. el mecanismo de acción a través del cual ejerce su actividad es a través de la alquilación bifuncional con el ADN, formando entrecruzamientos en las hebras del ADN, particularmente en secuencias del tipo CpG, inhibiendo así la mitosis y la proliferación de diversos tipos celulares. Esta actividad requiere que la mitomicina C sea activada por medio de flavoreductasas²⁴. Asimismo, los tipos de cáncer para los cuales se ha evaluado en pacientes, se incluyen: vejiga, mama, cervico-uterino, colorrectal y anal, gástrico, de cuello y cabeza, de células no pequeñas de pulmón y pancreático²⁴.

Con respecto a los efectos adversos de este compuesto, principalmente se incluyen mielosupresión y síndrome hemolítico urémico (insuficiencia renal, anemia hemolítica, trombocitopenia y defectos de la coagulación), los cuales han promovido el uso limitado de este compuesto para el tratamiento de los diversos tipos de cáncer para los cuales se ha evaluado, así como el incremento de su toxicidad cuando se ha empleado en combinación, siendo el ejemplo más representativo la combinación con el taxol²⁵.

²³Min-Hsiung Cheng, Hao-Tsai Cheng, Shih-Shen Lin, Su-Chung Young, Chien-Jung Pai, Pao-Hsin Liao, Shu-Chen Chen, Ming-Yung Chou, J.-J. Y. & C.-C. Y. Apoptotic death mode of mitomycin C-treated HeLa cells and cellular localization of mitomycin C-induced P-glycoprotein. *Drug Chem. Toxicol.* 32, 158–168 (2009).

²⁴Tomasz, M., Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective), *Chemistry and Biology* (1995) 2:575-579.

²⁵Bradner, W.T., Mitomycin C: A clinical update, *Cancer Treatment Reviews* (2001) 27: 35-50.

vi. **Netropsina dihidrocloruro**

$C_{18}H_{26}N_{10}O_3 \cdot 2HCl$; CAS#: 1438-30-8; PM: 503.39 g/mol; Solubilidad en agua: 0.95-1.05 mg/mL.²⁶

La netropsina es un antibiótico producido por *Streptomyces netropsis*, similar a la distamicina. El mecanismo de acción de ambos compuestos consiste en la unión al ADN en el surco menor y se emplean como sondas específicas de detección en regiones ricas en A-T. La actividad biológica de la netropsina y sus derivados, particularmente de híbridos de netropsina o dímeros de netropsinas se enfoca directamente como antibacterianos y antivirales, siendo los virus ADN más sensibles que los virus RNA²⁷. Por otro lado, también se ha propuesto que la netropsina y sus análogos inhiben la actividad de las enzimas topoisomeras I y II²⁸. Por otro lado, al exponer muestras de plásmido a una combinación de distamicina A y tres Casiopeínas®, se observó que la presencia de este compuesto incrementaba la actividad nucleasa en todos los casos²⁹.

²⁶ SIGMA-ALDRICH, Hoja de especificación del producto consultada en

http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/N9/N9653/N9653-BULK_SIGMA.pdf el día 19 de mayo de 2017.

²⁷Zimmer, C., Wähnert, U., Nonintercalating DNA-binding ligands: Specificity of their interaction and their use in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (1986) 47: 31-112

²⁸Beerman, T.A., Woynarowski, J.M., Sigmund, R.D., Gawron, L.S., Rao, K.E. Lown, J.W., Netropsin and bis-netropsin analogs as inhibitors of the catalytic activity of mammalian DNA topoisomerase II and topoisomerase cleavable complexes, *Biochimica et Biophysica Acta* (1991) 1090(1):52-60.

²⁹Becco L *et al.* New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. *J Inorg Biochem* 2012; 109: 49–56. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.01.010.

vii. **Oxalato(trans-L-1,2-diaminociclohexano)platino(II),Oxaliplatino**

C₈H₁₄N₂O₄Pt; CAS#: 61825-94-3; PM: 397.29 g/mol; Solubilidad en agua: 5 mg/mL³¹; CI₅₀: 50 μM (HeLa)³²;DL₅₀: 14.3 mg/kg (rata, i.p.), 19.9 mg/kg (ratón, i.p.)³⁰.

El oxaliplatino es un compuesto de platino de tercera generación, en el cual el platino está coordinado a una molécula de diaminociclohexano, el cual, al ser un grupo que no se hidroliza, se mantiene como parte del metabolito final citotóxico del compuesto y es particularmente activo en contra de cánceres digestivos. Adicionalmente, el mecanismo de acción del oxaliplatino es similar a la del cisplatino, produciendo uniones intracatenarias, intercatenarias y aductos AND-proteínas, sin embargo, la toxicidad del oxaliplatino es menor con respecto a la del cisplatino, y no genera resistencia cruzada a este compuesto o al carboplatino. Con respecto a sus efectos adversos, se ha observado que los principales sistemas afectados incluyen el Sistema hematopoyético, gastrointestinal y los nervios periféricos^{33,34}. En la **Tabla 15** se muestran las combinaciones con oxaliplatino aprobadas para su uso en la clínica³⁵.

Tabla 15. Combinaciones de fármacos en combinación con oxaliplatino.

Tipo de cáncer	Fármacos en combinación (clave de la combinación)
Páncreas	Leucovorina/5-fluorouracilo/irinotecan/oxaliplatino (FOLFIRINOX) Gemcitabina/oxaliplatino Oxaliplatino/5-fluorouracilo/leucovorina (OFF)
Colon/Recto	Capecitabina/oxaliplatino (CAPOX) 5-fluorouracilo/oxaliplatino (FOLFOX)

³⁰Hoja de seguridad de Oxaliplatino consultada en http://aslb.jp/sites/default/files/MSDS/BioVision/1577_MSDS.pdf, el día 19 de mayo de 2017.

³¹SIGMA-ALDRICH, Hoja de especificación del producto consultada en http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COfAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/O9/O9512/O9512-BULK_SIGMA_.pdf, el día 19 de mayo de 2017.

³²William-Faltaos S., Rouillard, D., Lechat, P., Bastian, G., Cell cycle arrest by oxaliplatin on cancer cells, *Fundamental and Clinical Pharmacology*(2007) 21:165-172.

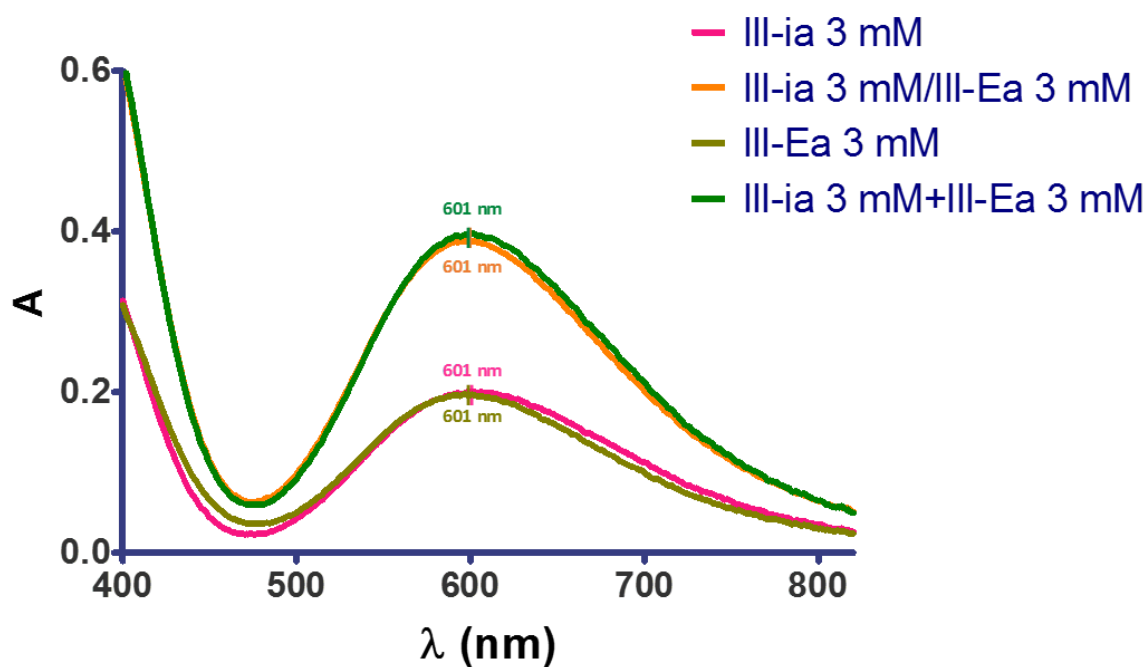
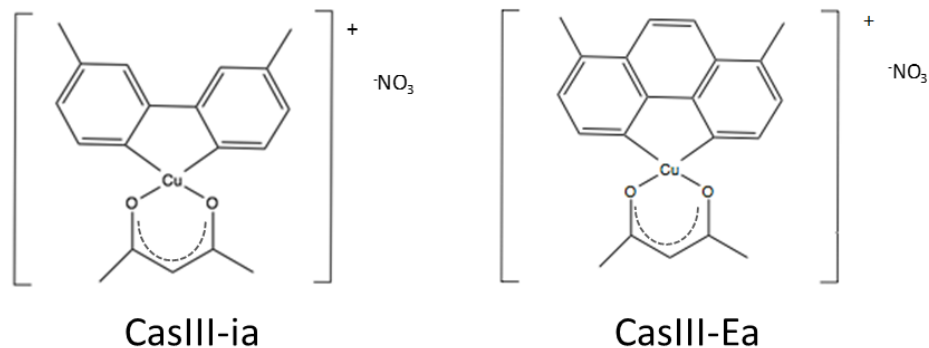
³³Florea, A.M., Büsselberg, D., Cisplatin as anti-tumor drug: Cellular mechanisms of drug activity, resistance and induced-side effects. *Cancers* (2011) 3, 1351-1371; doi:10.3390/cancers3011351.

³⁴Alcindor, T., Beauger, N., Oxaliplatin: a review in the era of the of molecularly targeted therapy, *Current oncology* (2011) 18:1, 18-25.

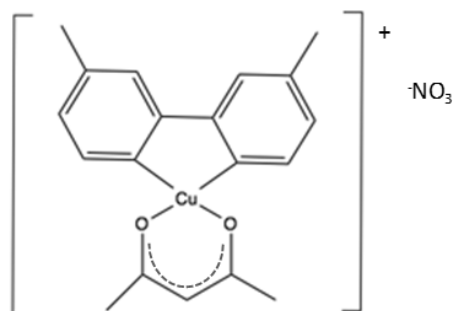
³⁵Combinaciones aprobadas para el cáncer. Revisado en NCI <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/> el día 22 de mayo de 2017.

ANEXO 2

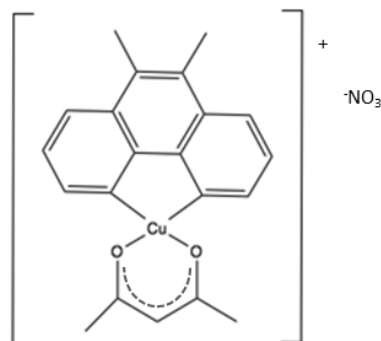
Espectros de UV-visible de los compuestos en combinación con CasIII-ia para evaluar las interacciones químicas.



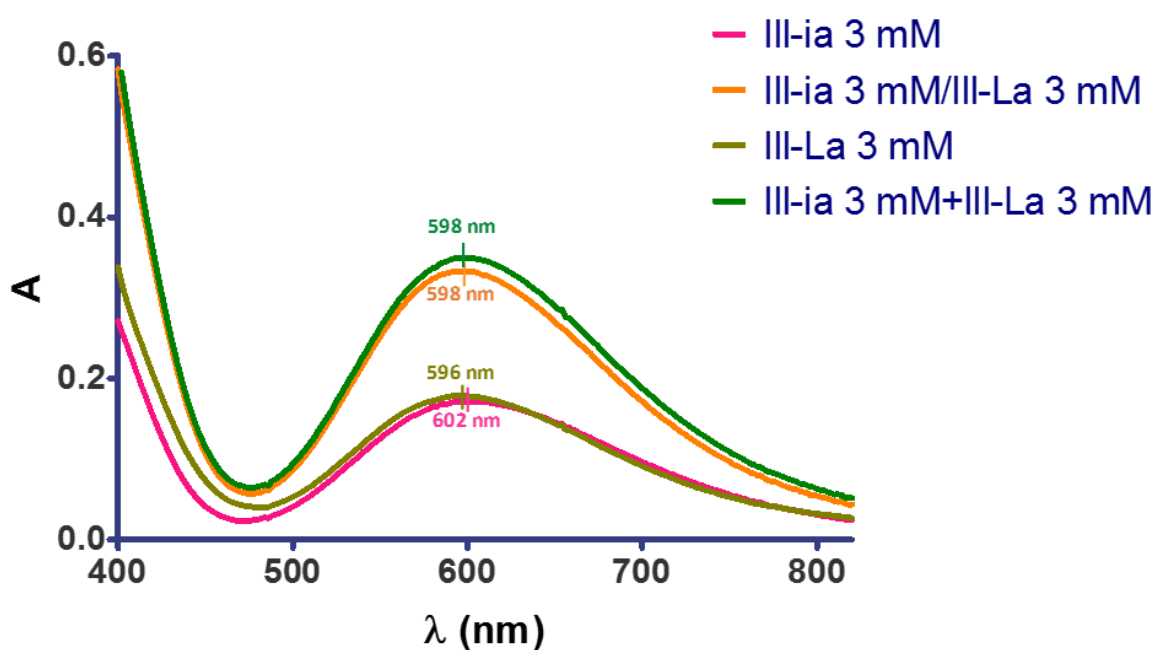
Gráfica 8. Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasIII-Ea, evaluada por espectrofotometría de UV-vis entre 400 y 800 nm y, a través del desplazamiento de la banda del cobre(II). III-ia: compuesto individual; III-Ea: compuesto individual; III-ia/III-Ea: disolución; III-ia+III-Ea: suma de los espectros individuales.



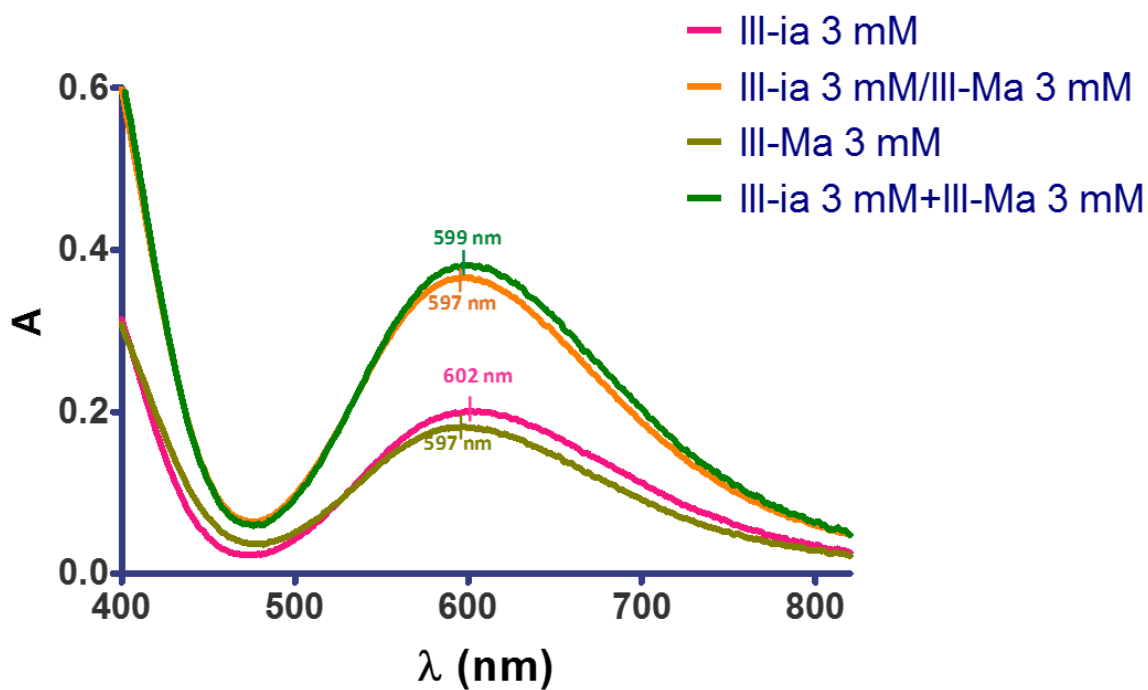
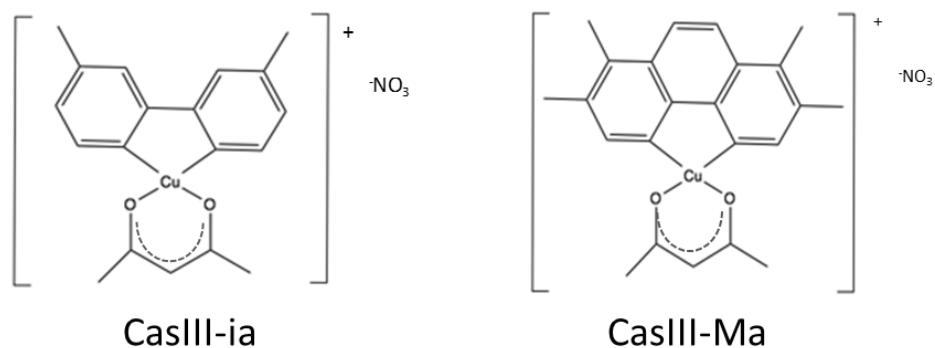
CasIII-ia



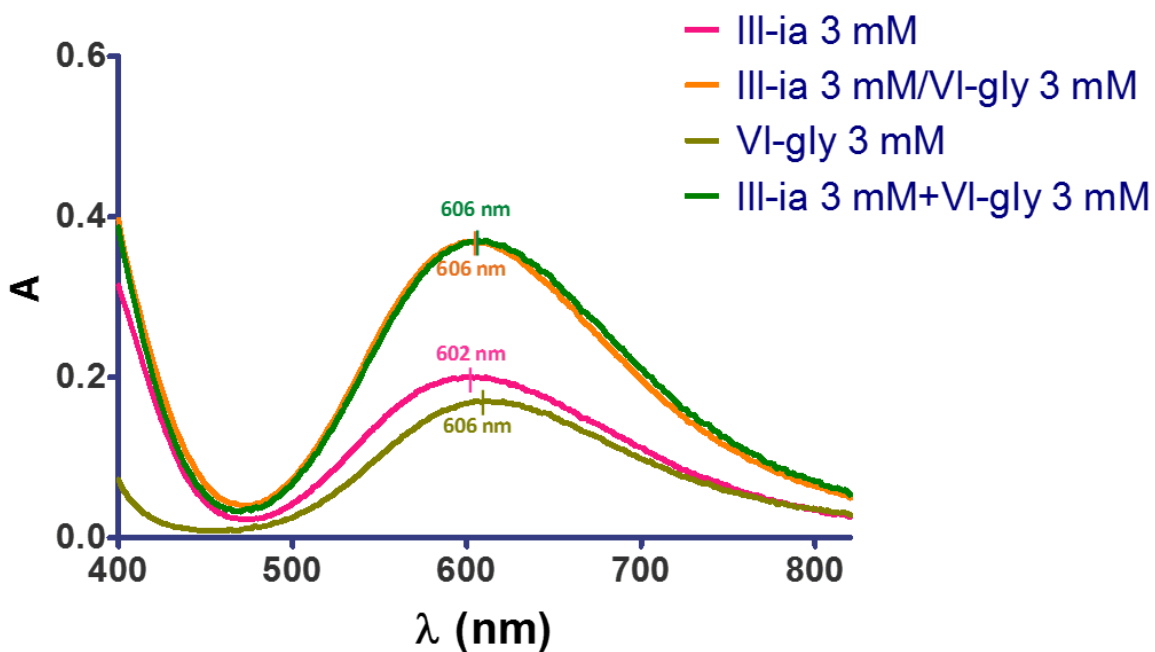
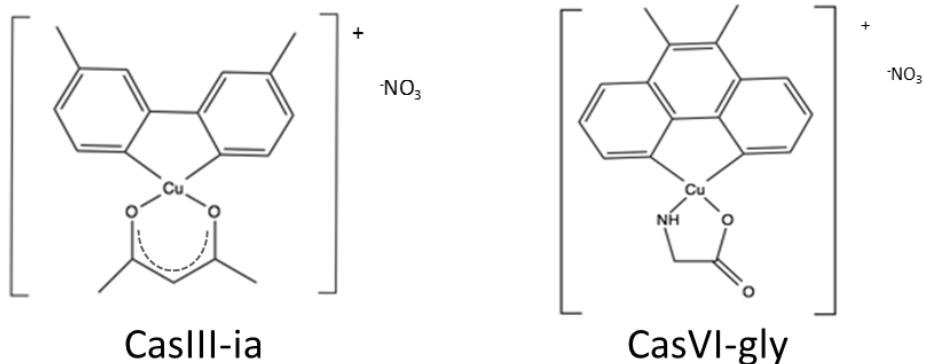
CasIII-La



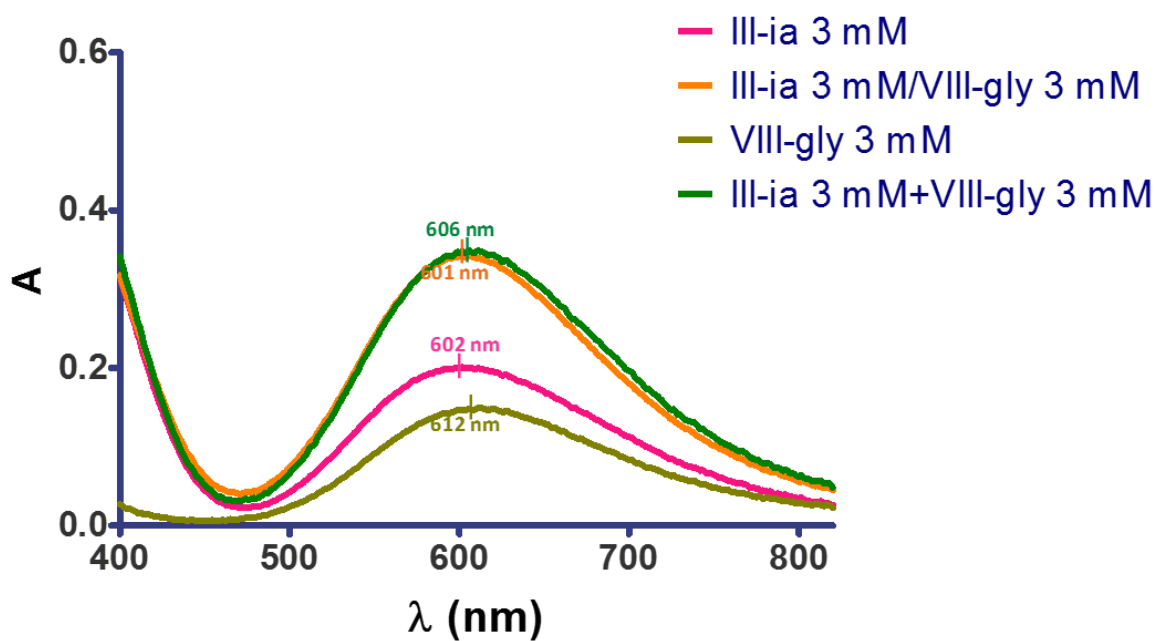
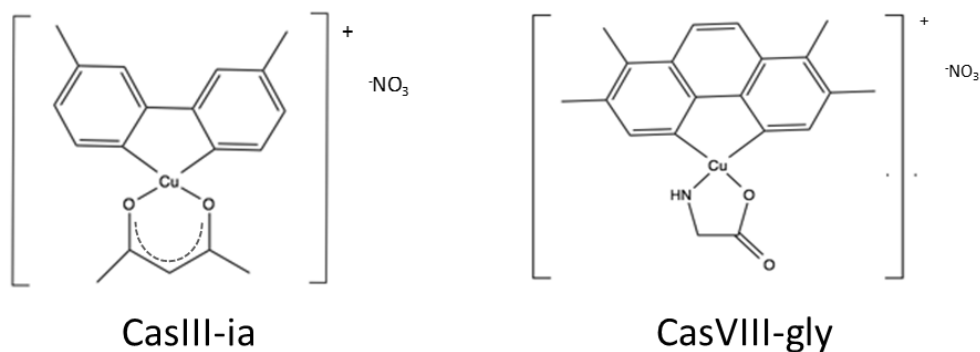
Gráfica 9. Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasIII-La, evaluada por espectrofotometría de UV-vis entre 400 y 800 nm y, a través del desplazamiento de la banda del cobre(II). III-ia: compuesto individual; III-La: compuesto individual; III-ia/III-La: disolución; III-ia+III-La: suma de los espectros individuales.



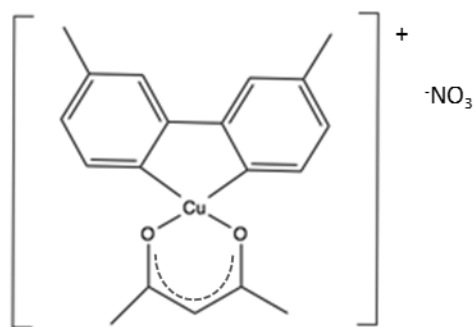
Gráfica 10. Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasIII-Ma, evaluada por espectrofotometría de UV-vis entre 400 y 800 nm y, a través del desplazamiento de la banda del cobre(II). III-ia: compuesto individual; III-Ma: compuesto individual; III-ia/III-Ma: disolución; III-ia+III-Ma: suma de los espectros individuales.



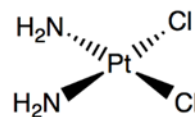
Gráfica 11. Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasVI-gly, evaluada por espectrofotometría de UV-vis entre 400 y 800 nm y, a través del desplazamiento de la banda del cobre(II). III-ia: compuesto individual; VI-gly: compuesto individual; III-ia/VI-gly: disolución; III-ia+VI-gly: suma de los espectros individuales.



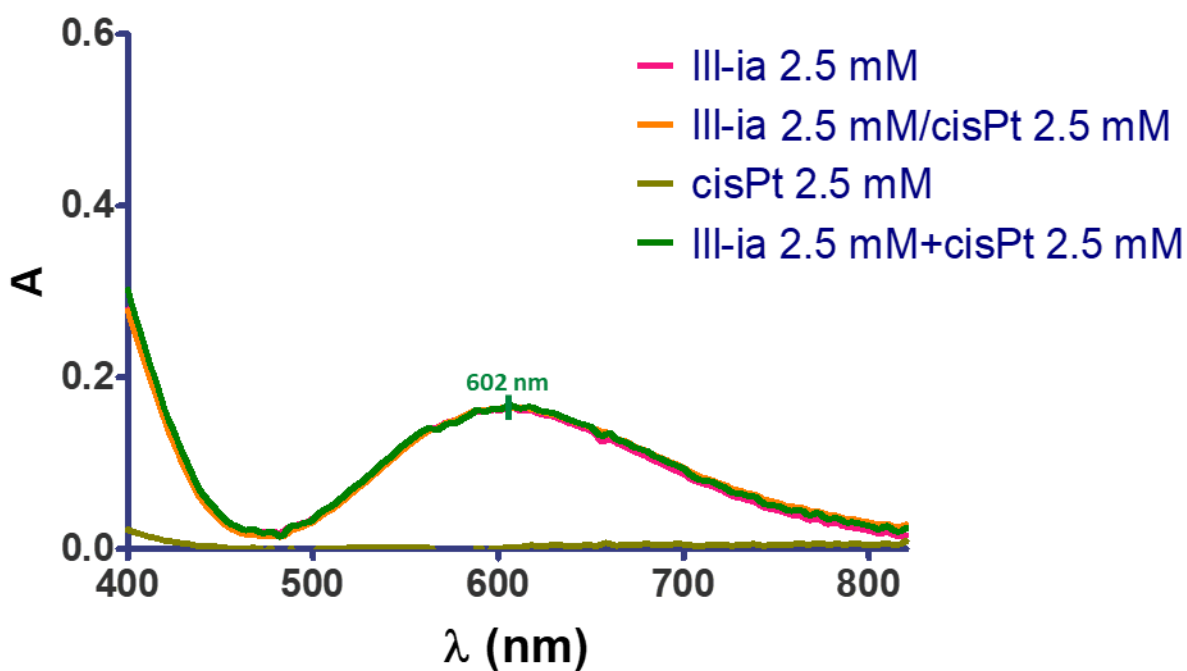
Gráfica 12. Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y CasVIII-gly, evaluada por espectrofotometría de UV-vis entre 400 y 800 nm y, a través del desplazamiento de la banda del cobre(II). III-ia: compuesto individual; VIII-gly: compuesto individual; III-ia/VIII-gly: disolución; III-ia+VIII-gly: suma de los espectros individuales.



CasIII-ia



cisPt



Gráfica 13. Interacción química entre los compuestos CasIII-ia y cisplatino (cisPt), evaluada por espectrofotometría de UV-vis entre 400 y 800 nm y, a través del desplazamiento de la banda del cobre(II). III-ia: compuesto individual; cisPt: compuesto individual; III-ia/cisPt: disolución; III-ia+cisPt: suma de los espectros individuales.

ANEXO 3

Concentraciones de los compuestos empleados para la evaluación de las combinaciones en cultivos de la línea tumoral HeLa y CHP-212.

Tabla 16. Concentraciones empleadas para la evaluación de los compuestos individuales y las combinaciones en la línea tumoral HeLa.

N	% ^a	III-ia	III-Ea	III-La	III-Ma	II-gly	VI-gly	VIII-gly	CisPt
1.66:0	166	69.29	5.35	4.7	2.61	4.25	5.28	2.52	18.09
1.33:0	133	55.51	4.28	3.76	2.09	3.4	4.23	2.02	14.5
1:0^b	100	41.74	-	-	-	-	-	-	-
8:1	89	37.15	2.87	2.52	1.4	2.28	2.83	1.35	9.7
4:1	80	33.39	2.58	2.26	1.26	2.05	2.54	1.22	8.72
2:1	67	27.97	2.16	1.9	1.05	1.72	2.13	1.02	7.3
1:1	50	20.87	1.61	1.42	0.79	1.28	1.59	0.76	5.45
1:2	33	13.77	1.06	0.93	0.52	0.84	1.05	0.5	3.6
1:4	20	8.35	0.64	0.57	0.31	0.51	0.64	0.3	2.18
1:8	11	4.59	0.35	0.31	0.17	0.28	0.35	0.17	1.2
0:1^b	0	-	3.22	2.83	1.57	2.56	3.18	1.52	10.9

^a % del compuesto en la combinación.

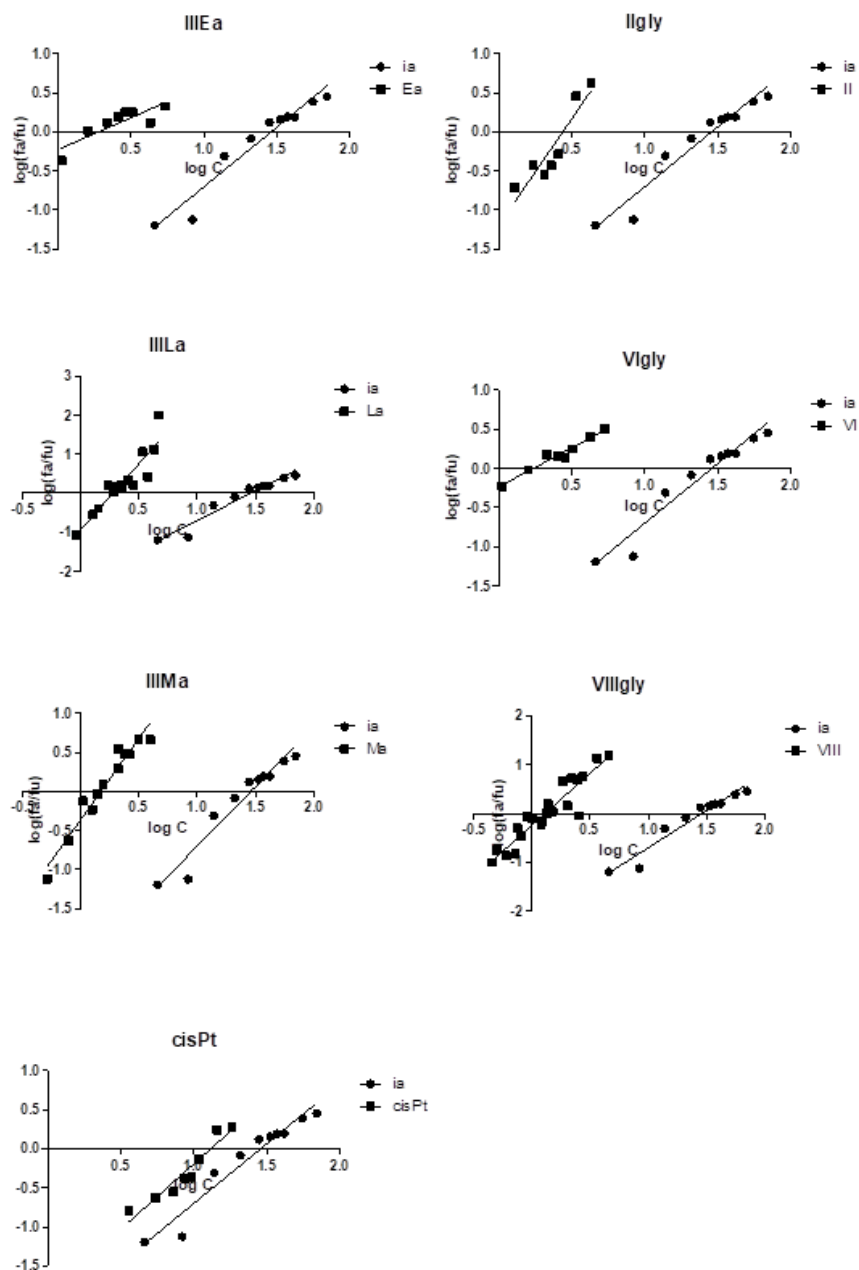
^b *Equivalente a la Cl₅₀ de los compuestos individuales.*

Tabla 17. Concentraciones empleadas para la evaluación de los compuestos individuales y las combinaciones en la línea tumoral CHP-212.

N	% ^a	III-ia	III-Ea	III-La	III-Ma	II-gly	VI-gly	VIII-gly
1:0^b	100	36.3	-	-	-	-	-	-
8:1	89	32.31	1.72	3.15	1.99	3.08	2.00	1.35
4:1	80	29.04	1.53	2.80	1.77	2.74	1.78	1.20
2:1	67	24.32	1.36	2.50	1.58	2.44	1.59	1.07
1:1	50	18.15	1.21	2.22	1.41	2.17	1.41	0.95
1:2	33	11.98	1.08	1.98	1.25	1.93	1.26	0.85
1:4	20	7.26	0.96	1.76	1.11	1.72	1.12	0.76
1:8	11	3.99	0.85	1.57	0.99	1.53	1.00	0.67
0:1^b	0	-	1.93	3.54	2.24	3.46	2.25	1.52

ANEXO 4

Evaluación del paralelismo de las curvas CR por medio del programa Graph Pad Prism.



Gráfica 14. Evaluación de paralelismo. Regresión lineal de las curvas CR de los compuestos involucrados en las combinaciones para determinar el paralelismo entre ellos.

Resumen del análisis de paralelismo de las curvas CR. ¿Son las pendientes iguales?

El análisis de paralelismo, por medio del programa Graph Pad Prism consiste en determinar si las pendientes de la curva son a) distintas de cero, b) distintos entre sí y c) si los interceptos difieren significativamente.

Compuestos: CasIII-ia y CasIII-Ea

	CasIII-ia	CasIII-Ea
Intersección en el eje:	-2.229 ± 0.1946	-0.2250 ± 0.9425
Pendiente:	1.529 ± 0.1367	0.8214 ± 0.2030
R²:	0.93399	0.7319
F=	7.0913	
P=	0.01855	

Conclusión: Pendientes significativamente diferentes de cero y entre sí, por lo que no se pudo establecer diferencias entre los interceptos.

Compuestos: CasIII-ia y CasIII-La

	CasIII-ia	CasIII-La
Intersección en el eje:	-2.229 ± 0.1946	-0.09431 ± 0.1616
Pendiente:	1.529 ± 0.1367	3.381 ± 0.3943
R²:	0.93399	0.8498
F=	21.2205	
P=	0.0001525	

Conclusión: Pendientes significativamente diferentes de cero y entre sí, por lo que no se pudo establecer diferencias entre los interceptos.

Compuestos: CasIII-ia y CasIII-Ma

	CasIII-ia	CasIII-Ma
Intersección en el eje:	-2.229 ± 0.1946	-0.3673 ± 0.05310
Pendiente:	1.529 ± 0.1367	2.093 ± 0.1619
R²:	0.93399	0.9435
F=	6.93836	
P=	0.01685	

Conclusión: Pendientes significativamente diferentes de cero y entre sí, por lo que no se pudo establecer diferencias entre los interceptos.

Compuestos: CasIII-ia y CasVI-gly

	CasIII-ia	CasII-gly
Intersección en el eje:	-2.229 ± 0.1946	-1.190 ± 0.1974
Pendiente:	1.529 ± 0.1367	2.719 ± 0.4892
R²:	0.93399	0.8604
F=	7.26979	
P=	0.01832	

Conclusión: Pendientes significativamente diferentes de cero y entre sí, por lo que no se pudo establecer diferencias entre los interceptos.

Compuestos: CasIII-ia y CasVI-gly

	CasIII-ia	CasVI-gly
Intersección en el eje:	-2.229 ± 0.1946	-0.2335 ± 0.03733
Pendiente:	1.529 ± 0.1367	0.9979 ± 0.08128
R²:	0.93399	0.9617
F=	5.462	
P=	0.03481	

Conclusión: Pendientes significativamente diferentes de cero y entre sí, por lo que no se pudo establecer diferencias entre los interceptos.

Compuestos: CasIII-ia y CasVIII-gly

	CasIII-ia	CasVIII-gly
Intersección en el eje:	-2.229 ± 0.1946	-0.2478 ± 0.05687
Pendiente:	1.529 ± 0.1367	2.132 ± 0.1880
R²:	0.93399	0.8714
F=	5.52832	
P=	0.02626	

Conclusión: Pendientes significativamente diferentes de cero y entre sí, por lo que no se pudo establecer diferencias entre los interceptos.

Compuestos: CasIII-ia y CisPt

	CasIII-ia	CisPt
Intersección en el eje:	-2.229 ± 0.1946	-1.860 ± 0.2008
Pendiente:	1.529 ± 0.1367	1.666 ± 0.2078
R²:	0.93399	0.9146
F=	0.259258	
P=	0.6186	

Conclusión con respecto a las pendientes: Si las pendientes fuesen idénticas, existe un 62% de probabilidad de elegir al azar datos con pendientes distintas. Se puede concluir que las diferencias en las pendientes no son significativas. La pendiente final de todos los datos equivale a 1.55979.

Al evaluar si las curvas comparten interceptos:

F=	39.9956
P<	0.0001

Conclusión: Si las elevaciones fuesen idénticas, existe menos de 0.01% de elegir datos al azar con elevaciones distintas. Se puede concluir que las diferencias de las elevaciones son extremadamente significativas.

ANEXO 5

Ejemplo de cálculo del índice de combinación (IC o γ) que permite establecer el tipo de interacción farmacológica presente en una combinación de fármacos.

Las curvas CR de cada uno de los compuestos involucrados en la combinación se transforman a curvas del efecto medio:

$$\log\left(\frac{fa}{fu}\right) = m\log(D) + b$$

Donde:

fa = fracción afectada por el tratamiento

fu = fracción no afectada por el tratamiento y equivale a 1-fa.

D = concentración o dosis empleada

Posteriormente y, con los datos de inhibición obtenidos de cada concentración de todos los compuestos, se calculan las ecuaciones del efecto medio para cada uno. A manera de ejemplo se considerarán las ecuaciones obtenidas para el compuesto CasIII-ia y Cisplatino.

Ecuación del efecto medio:

Casiopeína III-ia: $\log\left(\frac{fa}{1-fa}\right) = 1.52962\log DA - 2.226$

$$D_m = 28.5262$$

$$r = 0.96799$$

Cisplatino: $\log\left(\frac{fa}{1-fa}\right) = 1.6704\log DB - 1.8609$

$$D_m = 13.0017$$

$$r = 0.95378$$

El valor de D_m corresponde a la concentración (o dosis) en la cual se obtiene la mitad del efecto deseado. Este valor equivale al antilogaritmo de la intersección de la recta con el eje de las abscisas.

A partir de que cada una de las ecuaciones, se interpolan los datos del efecto obtenido para cada combinación, de manera que se calcule la concentración teórica requerida para obtener el mismo efecto:

$$\text{Casiopeína III-ia: } \log\left(\frac{0.56}{1-0.56}\right) = 1.52962 \log D_{CasIII-ia} - 2.226$$

$$D_{CasIII-ia} = 42.23 \mu\text{M}$$

$$\text{Cisplatino: } \log\left(\frac{0.56}{1-0.56}\right) = 1.6704 \log D_{cisPt} - 1.8609$$

$$D_{cisPt} = 18.35 \mu\text{M}$$

Una vez que se ha calculado la concentración teórica requerida para obtener el mismo efecto, se calcula el IC para cada combinación, a través de la ecuación:

$$IC = \frac{d_{CasIII-ia}}{D_{CasIII-ia}} + \frac{d_{cisPt}}{D_{cisPt}}$$

Donde:

IC = índice de combinación.

d = concentraciones experimentales empleadas en la combinación.

D = concentraciones teóricas requeridas para obtener el efecto.

$$IC = \frac{27.97 \mu\text{M}}{42.23 \mu\text{M}} + \frac{3.60 \mu\text{M}}{18.35 \mu\text{M}} = 1.185$$

La determinación del IC se realizó por cuatuplicado para los cultivos de la línea tumoral HeLa, mientras que para los cultivos de CHP-212 se llevó a cabo por triplicado. Finalmente, la significancia estadística se estableció a partir de t de

student considerando que no se conoce la varianza de la media poblacional, a través de la siguiente ecuación:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

El valor de t teórico con un $\alpha = 0.05$ se obtuvo de tablas considerando la distribución t de dos colas y 3 y 4 grados de libertad para HeLa y CHP-212, respectivamente.

Finalmente, los isobogramas normalizados se construyen graficando el valor obtenido de la razón d_A/D_A en el eje de las ordenadas y la razón de d_B/D_B en el eje de las abscisas, de manera que a medida que esos valores sean más cercanos a 0, la interacción superaditiva será mayor.

ANEXO 6

Preparación de las disoluciones para cultivo celular

Disoluciones para el cultivo celular.

Tripsina-EDTA

A partir de la disolución *stock* de 25x, se realiza una dilución 1:5 con disolución amortiguadora de fosfatos estéril.

Azul tripano 0.4%

La cantidad necesaria de azul tripano se disuelve en disolución amortiguadora de fosfatos. En caso de que precipite, esta suspensión se puede filtrar con filtros de 0.2 μm .

Sulforrodamina B 4%

La cantidad necesaria de Sulforrodamina B se disuelve en ácido acético 1%.

ANEXO 7

Conteo de células en la cámara de Neubauer (Hematocitómetro)

Posteriormente a que las células se cosecharon, centrifugaron y resuspendido en el volumen de medio correspondiente³⁶, se procede a su tinción con azul tripano y conteo en la cámara de Neubauer, de la siguiente forma:

Se toma una alícuota de la suspensión celular y se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se diluye con una alícuota de la disolución de azul tripano 0.4%³⁷. La mezcla se homogeniza y se toman 10 μ L, los cuales se depositan con cuidado entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos, de manera que se cubra por completo el volumen entre ambos.

Posteriormente, la cámara se coloca en el microscopio óptico con el objetivo de 10x (ó 20x), se ajusta y se procede a contar en uno de los cuadrantes marcados como L en la **Figura 9**.

³⁶ Comúnmente un mililitro, sin embargo, este volumen varía en función del tamaño del botón celular obtenido posterior a la centrifugación.

³⁷ El volumen de las alícuotas varía con el tamaño del botón celular o se puede iniciar con 50 μ L de cada una, 10 μ L:90 μ L si el botón es grande ó90 μ L:10 μ L si el botón es muy pequeño.

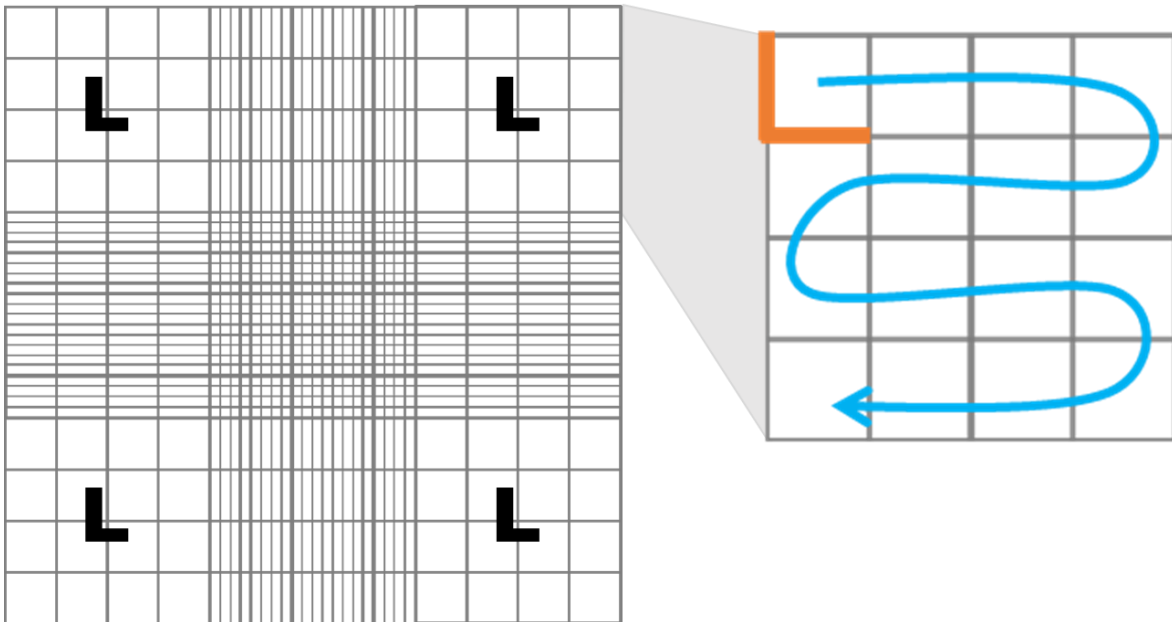


Figura 9. Cuadrícula para conteo de células en la cámara de Neubauer.

Una vez que se ha elegido el cuadrante para realizar el conteo, se procede a contar en cada una de las cuadrículas como se muestra en la **Figura 9** del lado derecho. El conteo se realiza tomando en cuentas las células en el interior de cada recuadro y, en caso de que alguna célula quedara por encima de la línea, entonces se cuentan únicamente aquellas que están posicionadas en las líneas izquierda e inferior de cada recuadro, línea naranja en la figura. Se repite el procedimiento para cada uno de los cuadrantes y se calcula el promedio de células en los cuatro cuadrantes.

Una vez que se tiene el promedio de células en la suspensión celular de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$N = \bar{x} * FD * 10,000 * V$$

Donde:

N = número de células por mililitro de suspensión celular.

\bar{x} = promedio de células en los cuatro cuadrantes.

FD = factor de dilución de suspensión celular en azul tripano 0.4%.

V = volumen total en mililitros en el que se resuspendió el botón celular.

Finalmente, para sembrar en placa el número de células requerido y, a partir del número de células por mililitro calculado, se calcula el volumen requerido de suspensión celular en el cual se tienen el número total de células requeridas para el ensayo (n) y se les agrega el volumen necesario del medio correspondiente para completar el total de medio requerido. (ej. $100 \mu\text{L}/\text{pozo} * \text{No. Pozos}/\text{placa} * \text{No. placas}$ a preparar).



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Synergistic effects between a copper-based metal Casiopeína III-ia and cisplatin

Silvia Graciela Davila-Manzanilla ^a, Yeshenia Figueroa-de-Paz ^a, Carmen Mejia ^b,
Lena Ruiz-Azuara ^{a,*}^a Department of Inorganic and Nuclear Chemistry, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av Universidad 3000, Ciudad de México, 04510, Mexico^b Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las ciencias S/N, Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, 76230, Querétaro, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2016

Received in revised form

13 January 2017

Accepted 29 January 2017

Available online 3 February 2017

Keywords:

Copper compounds

Combination therapy

Fractional analysis

Cytotoxicity

ABSTRACT

Additive, subadditive or superadditive interactions observed in combination therapy play an important role in several treatments, particularly for cancer. The isobolographic analysis allows to establish the pharmacological interactions that exist between two drugs that are administered together in equi-effective doses. In order to identify if the combination of two compounds presents synergistic interaction, the antiproliferative activity of CasIII-ia with analogue compounds or cisplatin in different molar ratios was evaluated. Results showed that this compound exhibited additive, subadditive or antagonistic and superadditive or synergistic interactions, depending on the compound that accompanies it and the proportion of the compounds in the combination. One of the combinations increased the antiproliferative activity from 50 to 77% when the cells were exposed to 4.59 and 9.70 μM to CasIII-ia and cisplatin, respectively. Further studies of the toxicity and biochemical level of the interactions still remain to be studied on a *in-vivo* xenographed model.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The World Health Organization (WHO) estimates that in 2015 approximately 9 million people around the world may die of cancer [1]. In México, in 2014, this disease was responsible for 72 thousand deaths in whole population, being prostate and lungs the more representative for men and cervix-uterine and breast for women [2].

As an alternative to cisplatin, copper-based compounds have been widely studied assuming to improve clinical effectiveness, reduce general toxicity and broaden spectrum of activity [3], [4].

Among them, Casiopeínas[®] are a family of more than 100 copper-based compounds with general formula $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ and $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$, where N-N: substituted 1,10-phenanthrolines or 2,2'-bipyridines; O-O: acetylacetonate or salicylaldehyde and; N-O: α -L-aminoacidates or peptides [5], [6]. These compounds have been evaluated in several tumour cell lines, including cervix-uterine, breast, colorectal [7], neuroblastoma [8] and medulloblastoma [9], as well as in anti-*Trypanosoma cruzi* assays [10], with differential toxicity between the analogues [7] [11], [12]. Actually, the Casiopeína III-ia compound (Fig. 1) is about to be evaluated in Phase 1 Clinical trials, mainly by two reasons: it has showed a significantly low cytotoxicity compared with the phenanthroline subgroup [7] and therefore is one of the most studied molecule in the group and because of its capacity to delay the number of days needed to double size tumour, evaluated in a nu/nu xenographed model, in contrast with Cisplatin, which exerts better activity than the *in vitro* assays [13]. Also, the body weight loss was not significant as compared to the control group. Also, studies with Casiopeínas[®] and commercial tuberculosis drugs have been done and an important synergy was found [14]. Finally, it has been found that the exposition of plasmidic DNA to combinations of Casiopeínas III-

Abbreviations: CasIII-ia, $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'}\text{-bipyridine})(\text{acetylacetonato})]\text{NO}_3$; CasIII-Ea, $[\text{Cu}(4,7\text{-dimethyl-1,10-phenanthroline})(\text{acetylacetonato})]\text{NO}_3$; CasIII-La, $[\text{Cu}(5,6\text{-dimethyl-1,10-phenanthroline})(\text{acetylacetonato})]\text{NO}_3$; CasIII-Ma, $[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetramethyl-1,10-phenanthroline})(\text{acetylacetonato})]\text{NO}_3$; CasII-gly, $[\text{Cu}(4,7\text{-dimethyl-1,10-phenanthroline})(\text{glycinato})]\text{NO}_3$; CasVI-gly, $[\text{Cu}(5,6\text{-dimethyl-1,10-phenanthroline})(\text{glycinato})]\text{NO}_3$; CasVIII-gly, $[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetramethyl-1,10-phenanthroline})(\text{glycinato})]\text{NO}_3$; Ciplatin, *cis*-Dichlorodiammine platinum(II).

* Corresponding author.

E-mail address: lenar701@gmail.com (L. Ruiz-Azuara).<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.01.045>

0223-5234/© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

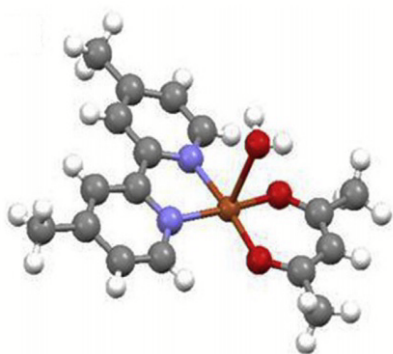


Fig. 1. CasIII-ia. [Cu(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(acetylacetonato)]NO₃. Crystal structure published by García-Ramos et al. [15].

ia, III-Ea or II-gly with Distamycin A, a minor-groove intercalator, also may increase the nuclease activity of the copper compounds [10].

Although combination therapy is employed in treatments for several diseases, it is particularly important in cancer, where it is common for patients to receive more than one drug, in order to improve their prognosis [16]. However, the risk of increasing the toxicities when two drugs are administered must be considered [16], [17]. Common toxicities may include haematological, gastrointestinal, hepatic and renal, among others [18]. Therefore, it's often better to use moderate doses of more than one drug that will cause bearable side effects in different sites, instead of very high doses of one drug that might cause severe side effects and may permanently damage one organ. The isobolographic analysis is a statistical tool that allows to evaluate the increase or decrement of the activity of the combination, at a fixed dose (e.g. IC₅₀) and ratios, in contrast with the activity of the individual drugs [19]– [21]. *Superadditive*, *subadditive* and *additive* effects are observed when the activity significantly increases, decreases or remains unchanged. Additionally, the mode of action of both drugs is suggested to be considered, as the action of one of the drugs can inhibit the effect of the other [20]. Initially, this kind of analysis was mainly employed for *in vivo* assays, however it is proposed its use now for *in vitro* screening [22].

In this work, we evaluated the effect of CasIII-ia with six more active Casiopeínas[®] (Fig. 2a) in order of increasing the activity of the former, while diminishing the toxicity of the latter, and with cisplatin, a platinum-based compound that interacts directly with the DNA by forming covalent bonds [23] (Fig. 2a). Cisplatin was selected considering the strategy of having compounds with different action mechanism. Finally, we have chosen to work with HeLa cell line, a cell derived from cervix cancer, due to the common occurrence of cervix-uteri cancer, which makes it a suitable model for neoplastic transformations and studies on chemotherapy [24].

2. Material and methods

2.1. Instrumentation

Elemental analysis was performed in a Fission Instruments Analyzer EA 1108, IR spectra were obtained employing Nicolet Avatar 320 FT-IR, conductimetric and magnetic determinations were done in a Jenway 4330 Conductivity and pH meter and a Mklmagnetic balance from Sherwood Scientific respectively. The conductimetry was recorded in 1 mM methanolic or ethanolic solutions at 298 K [28]. UV–vis spectra were recorded in a Hewlett

Packard 8452 diode array spectrophotometer. The inhibition assays were measured by a Labsystems Multiskan MS microplate reader.

2.2. Materials

Acetylacetonate, copper nitrate hemipentahydrated, Trizma buffer, sulforhodamine B and Cisplatin were purchased from Sigma-Aldrich; Glycinate and phenanthrolines were purchased from GFS Chemicals; DMEM culture medium and supplements (non-essential aminoacids (NEAA), penicillin-streptomycin and foetal bovine serum) were purchased from GIBCO; Trichloroacetic acid (TCA) and glacial acetic acid were purchased from J.T Baker and; Sterile Phosphate Buffer Solution were purchased from ATCC.

Cervical cancer cell line, HeLa was donated by Laboratory 9 at the Unidad de Investigación en Diferenciación Celular from the UMIEZ at the FES Zaragoza.

2.3. Synthesis of the compounds

Six of the most active copper compounds were chosen to accompany CasIII-ia in order of diminishing their concentration. Casiopeínas III-ia, III-Ea, III-La, and VIII-gly were synthesized by Ma. Elena Bravo-Gómez at the Inorganic Medicinal Laboratory. Casiopeínas III-Ma, II-gly and VI-gly were synthesized as described previously [5] [6];. Equimolar acetylacetonate or glycinate was added to equimolar mixtures of copper(II) nitrate and the respective phenanthroline. The resulting products were precipitated through the partial evaporation of the solvent and recrystallized from water/methanol at least two times. Identity and purity of metal complexes were analyzed by conventional techniques like elemental analysis, infrared spectroscopy, and conductimetric and magnetic measurements. Our group previously published a thorough characterization [7], [29]; data are presented here only to provide the necessary evidence to ensure the identity of the compounds.

2.3.1. Aqua(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(acetylacetonato) copper(II) nitrate hydrate (Casiopeína III-ia or CasIII-ia)

Yield 90%. Elemental Anal. Calc. for CuC₁₇N₃O₅H₁₉·H₂O: (MW = 426.92 g/mol): C, 47.83; N, 9.84; H, 4.96%. Found: C, 47.48; N, 9.97; H, 5.07%. IR (KBr, ν/cm⁻¹): 1616.14, 1587.2, 1525.5, 1490.8, 1384.7 (NO₃), 730.9. μ_{eff} = 1.80 BM. λ (1 mM ethanolic solution at 298 K) = 40.23 μS.

2.3.2. Aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(acetylacetonato) copper(II) nitrate (Casiopeína III-Ea or CasIII-Ea)

Yield 86%. Elemental Anal. Calc. for CuC₁₉N₃O₅H₁₉·H₂O (MW = 450.94 g/mol): C, 50.61; N, 9.32; H, 4.69%. Found: C, 50.23; N, 9.30; H, 4.55%. IR (KBr, ν/cm⁻¹): 1622.2, 1577.6, 1521.6, 1425.2, 1384.7 (NO₃) 869.8, 725.1. μ_{eff} = 1.80 BM. λ (1 mM ethanolic solution at 298 K) = 38.48 μS.

2.3.3. Aqua(5,6-dimethyl-1,10-phenanthroline)(acetylacetonato) copper(II) nitrate (Casiopeína III-La or CasIII-La) yield 92% elemental anal

Calc. for CuC₁₉H₁₉N₃O₅·2H₂O (MW = 468.08 g/mol): C, 48.66; N, 8.96; H, 4.94%. Found: C, 48.53; N, 9.15; H, 4.99%. IR (KBr, ν/cm⁻¹): 3483, 3070, 1606, 1581, 1517, 1384 (NO₃), 1431, 817, 730. μ_{eff} = 1.82 BM. λ (1 mM ethanolic solution at 298 K) = 38.9 μS.

2.3.4. Aqua(3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline)(acetylacetonato) copper(II) nitrate (Casiopeína III-Ma or CasIII-Ma) yield 85% elemental anal

Calc. for CuC₂₁H₂₃N₃O₅·H₂O (MW = 478.98 g/mol): C, 52.66; N, 8.77; H, 5.26%. Found: C, 52.77; N, 9.11; H, 5.18%. IR (KBr, ν/cm⁻¹):

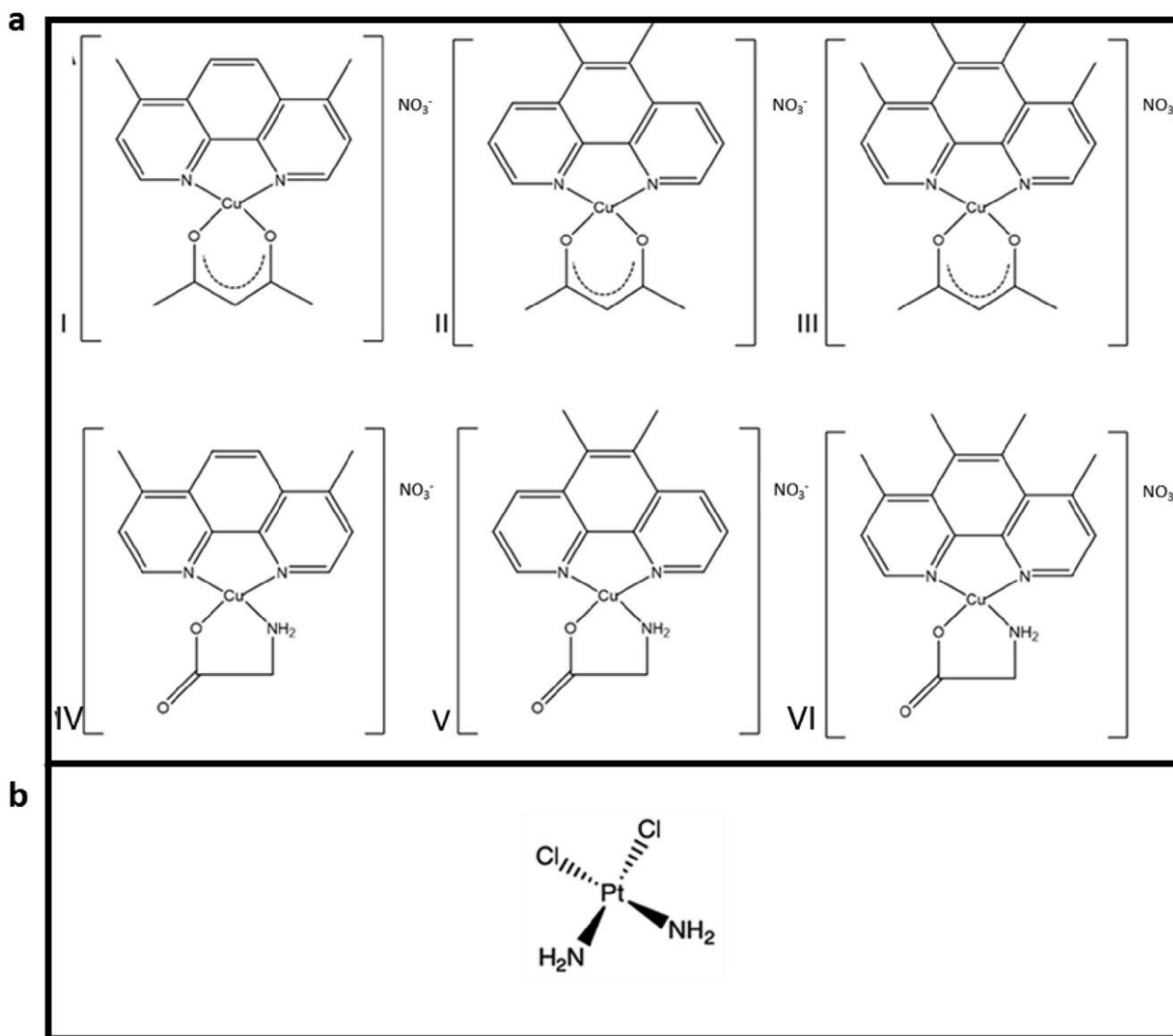


Fig. 2. Drugs used in combination with CasIII-ia. a) CasIII-Ea. (I), CasIII-La (II), CasIII-Ma (III) CasII-gli (IV), CasVI-gli, CasVIII-gli (VI) and b) Cisplatin (CisPt). (X-Ray Structures of compounds reported by Solans et al.: II [25]; García-Ramos et al.: V [26]; García-Ramos: I and III [27].

3338, 1618, 1583, 1519, 1431, 1384 (NO_3^-), 833, 727. $\mu_{\text{eff}} = 1.76$ BM. λ (1 mM ethanolic solution at 298 K) = 37.32 μS .

2.3.5. Aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glicinato) copper(II) nitrate (Casiopéina II-gly or CasII-gly)

Yield 89%. Elemental Anal. Calc. for $\text{CuC}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW = 443.9 g/mol): C, 43.29; N, 12.62; H, 4.54. Found: C, 43.53; N, 12.61; H, 4.70%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3305, 3253, 2945, 1600, 1579, 1383 (NO_3^-), 1430, 871, 726. $\mu_{\text{eff}} = 1.76$ BM. λ (1 mM ethanolic solution at 298 K) = 38.8 μS .

2.3.6. Aqua(5,6-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glicinato) copper(II) nitrate (Casiopéina VI-gly or CasVI-gly)

Yield 89%. Elemental Anal. Calc. for $\text{CuC}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW = 425.88 g/mol): C, 45.12; N, 13.16; H, 4.26%. Found: C, 45.55; N, 13.22.; H, 4.19%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3421, 3261, 2923, 1632, 1525, 1385 (NO_3^-), 1430, 822, 730. $\mu_{\text{eff}} = 1.71$ BM. λ (1 mM methanolic

solution at 298 K) = 76.1 μS .

2.3.7. Aqua(3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline)(glicinato) copper(II) nitrate (Casiopéina VIII-gly or CasVIII-gly)

Yield 83%. Elemental Anal. Calc. for $\text{CuC}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW = 453.94 g/mol): C, 47.63; N, 12.34; H, 4.88%. Found: C, 46.97; N, 12.67; H, 4.84%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3395, 3300, 2937, 1620, 1533, 1385 (NO_3^-), 1434, 896, 726. $\mu_{\text{eff}} = 1.78$ BM. λ (1 mM methanolic solution at 298 K) = 79.2 μS .

2.4. Chemical interactions

Chemical interactions were evaluated through the displacement of the maximum of absorbance of the copper(II) of CasIII-ia by UV-Vis Spectrophotometry, in the presence of the second compound. The objective of this assay was to establish if a stock solution of CasIII-ia with each of the compounds was possible to prepare and

the mixture was stable, prior to administration to the cell cultures.

2.5. Tumour cell culture growth

Cultures of tumour cell lines were proliferated in supplemented DMEM culture medium (10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 1% NEAA). The plates were incubated at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere, until the cells reached 80% of confluence. After confluence, cells were used for all IC₅₀ determination or for the pharmacological interactions evaluation.

2.6. IC₅₀ determination

The cells were harvested and cultivated in 96 well plates with 2×10^4 cells each and 100 μL of medium. The plates were incubated at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere. The next day, medium was withdrawn and 90 μL of medium, supplemented with 10 μL of the individual drugs, was added. Cell cultures were exposed for 24 h of treatment. The medium was retired and plates were fixed and stained according to the procedure described by Skehan [30].

2.7. Pharmacological interactions determination

The cells were harvested and cultivated in 96 well plates with 2×10^4 cells each with 100 μL of medium. The plates were incubated at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere. The next day, medium was retired and 90 μL of medium supplemented with the 10 μL drugs alone or in combination (IC₅₀CasIII-ia: IC₅₀Compound 2; 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1) was added. Cell cultures were exposed for 24 h of treatment. The medium was retired and plates were fixed and stained according to the procedure described by Skehan. Each plate included concentration-response (C-R) curves of each of the compounds evaluated. The results correspond to the average of 4 independent assays in triplicate for each combination.

2.8. Isobolographic analysis

To establish the pharmacological interactions of each pair of compounds in HeLa tumour cell lines, the results of the inhibition obtained for each combination were analyzed with the CompuSyn software by Chou and Martin [31], through a normalized isobolographic analysis, considering a non-constant ratio [12]. The inhibition reached by each pair of compounds was compared to their individual C-R curves. To establish if the combination is *super-additive*, *additive* or *sub-additive*, the coefficient of interaction was calculated according Equation (1),

$$CI = \frac{a}{A} + \frac{b}{B} \quad (1)$$

where *a* and *b* correspond to the concentrations of the compounds in the mixture and *A* and *B* are the concentrations needed of the individual compounds determined from the C-R curves [20]. When CI = 1, it is established as an *additive* interaction, CI < 1: *super-additive* interaction, CI > 1: *sub-additive* interaction. A two tail *t*-test was performed for each combination. Additionally, the vertical and horizontal approaches to the line of additivity were compared qualitatively through the isobolograms [16].

2.9. Plasmid DNA-Combination interactions

The evaluation of DNA damage by the three most active combinations of compounds was made through DNA electrophoresis. 300 ng of plasmidic DNA (PBR322-) was incubated for 30 min or four hours at 37 °C with or without the compounds at a final

volume of 20 μL and proportions 1:8 (CasIII-ia:2nd compound). Effect on plasmid DNA was determined by horizontal electrophoresis (1% agarose, 0.5% Tris/borate/EDTA buffer (TBE) and 1 μg/mL ethidium bromide). DNA without compounds was used as negative control. DNA exposed to the compounds alone were incubated under the same conditions. Cisplatin stock solution was prepared until maximum solubility.

3. Results

3.1. Chemical interactions

Chemical interactions were evaluated to establish if both compounds react with each other, which eliminates the possibility of preparing them both in the same tube, or if we could expose the cells to the compounds together. Fig. 3 shows the displacement of the maximum of copper(II) when CasIII-ia and CasIII-gly are mixed. The displacement of the maximum of the mixture CasIII-ia/CasIII-gly in contrast with the maximum of the sum of both spectra (CasIII-ia and CasIII-gly separately) suggests that an interaction is happening. We established that the 6 nm difference was not significant, so we proceeded to use both compounds in combination prior to use. The compounds were evaluated in a concentration of 1×10^{-3} M in distilled water.

3.2. IC₅₀ determination

IC₅₀ of all the compounds were determined to establish the level of activity of each, and thus, select a concentration that will assure the same effect in the combination, when the interaction is additive. Table 1 shows the IC₅₀ of seven Casiopeínas[®] and Cisplatin in HeLa cell line.

3.3. Combination index

The combination index (CI) is a parameter that determines if an interaction is *additive*, *subadditive* or *superadditive*. To calculate the CI of the different combinations, we used the software developed by Chou and Martin, and the normalized isobolographic analysis considering a non-constant ratio. Briefly, in order to consider if the combination shows an increase or decrease in the activity of the compounds alone, it was necessary to compare the activities of the combination with the C-R curves of the individual compounds. In Fig. 4, the C-R curves of the compounds are shown: A) for the acetylacetonate and B) for the glycinate analogues. Cisplatin C-R

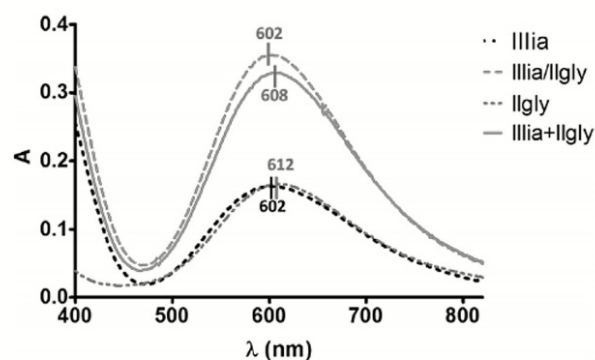


Fig. 3. Example of the displacement of CasIII-ia's copper(II) maximum by UV-Visible Spectrophotometry. IIIia: CasIII-ia alone; IIIia/Ilgly: experimental spectra of the combination; Ilgly: CasIII-gly alone and; IIIia + Ilgly: sum of CasIII-ia and CasIII-gly spectra.

Table 1

Results of IC₅₀ and the standard deviation of the Casiopeínas® and Cisplatin in HeLa tumour cell line.

Compound	IC ₅₀ μM ^a	SD
CasIII-ia	41.74	0.31
CasIII-Ea	3.22	0.035
CasIII-La	2.83	0.093
CasIII-Ma	2.37	0.042
CasII-gly	2.56	0.046
CasVI-gly	3.18	0.163
CasVIII-gly	2.86	0.051
Cisplatin	10.90	0.14

^a Data represent the average of three independent assays in triplicate.

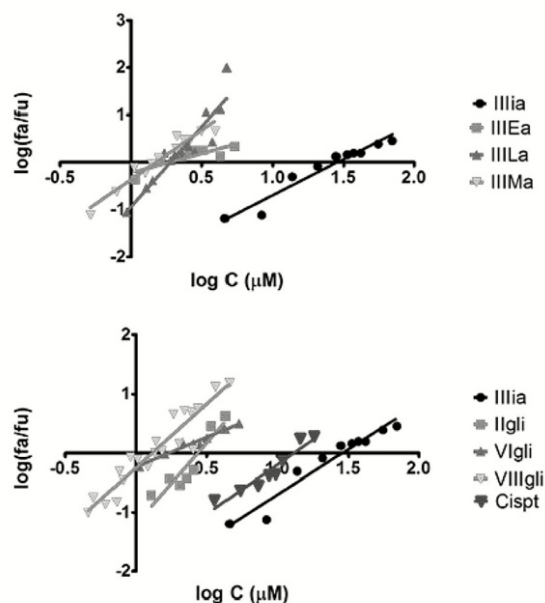


Fig. 4. Concentration-response curves of the six Casiopeínas® and Cisplatin in HeLa tumour cell line. A) Acetylacetone analogues. B) Glycinate analogues and Cisplatin. Each curve represents the average of four independent assays for the phenanthroline-Casiopeínas® and Cisplatin, while CasIII-ia's curve is the average of twenty eight independent assays as it served as a control for each compound. fa: affected fraction to the treatment; fu: unaffected fraction to the treatment.

curve is shown in Fig. 4B. Results of the CI are shown in Table 2, as well as the concentrations evaluated, the inhibition obtained and the expected concentrations for each combination. The CI represents the average of four independent assays in triplicate. The statistical significance was evaluated through a two-tail *t*-test and $\alpha = 0.05$. As it can be observed, the type of interaction depends on the compound that accompanies CasIII-ia and the concentration of each. The combinations that contained dimethylated-phenanthroline (CasIII-Ea, CasIII-La and CasVI-gly) analogues showed mainly additive interactions, only CasIII-La showed one *subadditive* interaction, but CasII-gly suggests several *subadditive* effects. In contrast, tetramethylated-phenanthrolines appeared to have a tendency towards *superadditivity*, especially as the proportion of the second compound increased in the combination. The same behaviour can be observed when cisplatin was added to the copper compound.

3.4. Plasmid DNA-Combination interactions

Plasmidic DNA exposed to the three most active combinations

(lower CI values) was carried out to establish if the observed effect was at the DNA level. Combinations of CasIII-ia with both tetramethylated-phenanthroline analogues: CasVIII-gly and CasIII-Ma were selected in 1:8 proportions and cisplatin in 5.00 mM (see experimental part) for 30 min and four hours of exposition. Fig. 5 shows the effect of the three mixtures on plasmidic DNA, as well as the effect of the compounds alone. Because it has been shown that the damage happens before the first eight hours of cells exposed to the compounds [32], in this work we proposed the evaluation of the effect at 30 min and four hours. At 30 min of exposition the damage on the DNA seems to slightly increase in the presence of the combinations of the copper compounds (the band of coiled DNA increases and the supercoiled DNA diminishes), while in the case of CasIII-ia/Cisplatin, there is a lessening on the concentration of platinated DNA, observed on the lower displacement of the DNA bands, suggesting an antagonistic effect of the combination. Subsequently, at 4 h of exposition, the DNA is completely degraded by the cisplatin, both with and without CasIII-ia; and in contrast it appears to be an inverse outcome with the copper compounds combinations: CasIII-ia/VIII-gly slightly boosts the damage and PBR322 with CasIII-ia/III-Ma slightly decreases the loss of supercoiled DNA.

4. Discussion

The use of more than one drug for the treatment of a disease is a common strategy for increasing the probability of improving the state of health of the patients, especially in chronic diseases such as cancer. Between the strategies to evaluate the interaction of two or more drugs, we can find statistical tools as the Isobolographic or the Fractional analysis, which may allow us to propose a combination of two or more compounds, in order of increasing their activity, while diminishing the toxicity of both, which it is considered the ideal situation. The present work includes the evaluation of a compound known as Casiopeína III-ia, which is about to enter Phase 1 Clinical trials. This compound belongs to a family of copper-based compounds, whose analogues include a copper atom accompanied by either substituted phenanthrolines or bipyridines, as well as acetylacetone, aminoaceticates or salicylaldehydes. Among the compounds evaluated, it is common to find that the activity increases at least an order of magnitude when electron-donor substituted phenanthrolines are coordinated to the copper atom, therefore, among the workgroup, this substituent is commonly referred as the primary ligand [7]. The secondary ligand, in contrast, is hypothesized that it is involved mainly in promoting the access of the compound to the cells [33]. Also, among this family of compounds it is difficult to separate the activity from the toxicity, therefore we believe that the combination of very active compounds with less active analogues might increase the activity of the bipyridine analogue while decreasing the toxicity of the phenanthroline analogues. On the other hand, Cisplatin was combined as a control drug of a compound that has been proved to have a mechanism of action different than CasIII-ia, since it platinates the DNA in the N7 of guanine [34] [35], while CasIII-ia interacts mainly with the phosphate group of the DNA, previous to intercalation [36]–[38]. The results observed on cells may be attributed to the sum of the concomitant effects of the compounds to the receptors of the membrane, the interaction with DNA and the increase on the ROS concentrations promoted at different times due to the difference in the lipophilicity of the copper compounds [7], but kinetic studies on these hypothesis must be done with the combinations. Similar proposed targets and mechanisms of action have been found by different groups with copper compounds on different tumour cell lines [39]–[41]. In the case of the combination with cisplatin, where CasIII-ia is able to displace cisplatin from the DNA

Table 2

Concentration Coefficient interaction of six Casiopeínas® and Cisplatin with CasIII-ia in HeLa tumour cell line.

	# ^a	μM ^b		Sum concentration of both compounds	% inhibition of the combination	μM ^c		CI ± SEM	Type of interaction
		ia	2° compound			ia	2° compound		
+ CasIII-Ea	1	37.15	0.35	37.50	54	30.40	2.02	1.396 ± 0.535	Additive
	2	33.39	0.64	34.03	53	29.55	1.84	1.478 ± 0.735	Additive
	3	27.97	1.06	29.03	56	32.50	2.31	1.319 ± 0.450	Additive
	4	20.87	1.61	22.48	58	34.28	2.55	1.240 ± 0.464	Additive
	5	13.77	2.16	15.93	66	44.34	4.24	0.820 ± 0.148	Additive
	6	8.35	2.58	10.93	66	44.34	4.24	0.797 ± 0.158	Additive
	7	4.59	2.87	7.46	75	57.75	6.42	0.527 ± 0.354	Additive
+ CasIII-La	1	37.15	0.31	37.46	71	50.78	2.67	0.848 ± 0.248	Additive
	2	33.39	0.57	33.96	68	44.96	2.53	0.968 ± 0.376	Additive
	3	27.97	0.93	28.90	56	33.39	2.16	1.269 ± 0.039	Sub-additive
	4	20.87	1.42	22.29	75	56.03	2.86	0.868 ± 0.416	Additive
	5	13.77	1.90	15.67	74	53.10	2.85	0.926 ± 0.518	Additive
	6	8.35	2.26	10.61	76	59.19	2.96	0.905 ± 0.389	Additive
	7	4.59	2.52	7.11	79	67.14	3.14	0.872 ± 0.332	Additive
+ CasIII-Ma	1	37.15	0.17	37.32	70	49.60	2.25	0.825 ± 0.071	Super-additive
	2	33.39	0.31	33.70	66	43.93	2.06	0.911 ± 0.108	Additive
	3	27.97	0.52	28.49	66	43.93	2.06	0.890 ± 0.102	Additive
	4	20.87	0.79	21.66	68	46.66	2.15	0.815 ± 0.061	Super-additive
	5	13.77	1.05	14.82	69	47.40	2.17	0.774 ± 0.014	Super-additive
	6	8.35	1.26	9.61	70	49.64	2.25	0.729 ± 0.017	Super-additive
	7	4.59	1.40	5.99	75	58.30	2.53	0.623 ± 0.117	Super-additive
+ CasII-gly	1	37.15	0.28	37.43	58	34.90	3.08	1.156 ± 0.046	Sub-additive
	2	33.39	0.51	33.90	49	27.53	2.69	1.402 ± 0.053	Sub-additive
	3	27.97	0.84	28.81	45	24.78	2.54	1.459 ± 0.053	Sub-additive
	4	20.87	1.28	22.15	42	22.74	2.43	1.444 ± 0.289	Additive
	5	13.77	1.72	15.49	39	19.52	2.25	1.469 ± 0.448	Additive
	6	8.35	2.05	10.40	42	21.80	2.40	1.239 ± 0.336	Additive
	7	4.59	2.28	6.87	51	27.64	2.75	0.995 ± 0.291	Additive
<hr/>									
	# ^a	μM ^b		Sum concentration of both compounds	% inhibition of the combination	μM ^c		CI	Type of interaction
		ia	2° compound			ia	2° compound		
+ CasVI-gly	1	37.15	0.35	37.50	62	39.08	3.29	1.078 ± 0.246	Additive
	2	33.39	0.64	34.03	63	40.40	3.35	1.052 ± 0.188	Additive
	3	27.97	1.05	29.02	63	40.27	3.34	1.065 ± 0.127	Additive
	4	20.87	1.59	22.46	67	45.06	3.56	0.963 ± 0.179	Additive
	5	13.77	2.13	15.90	71	50.77	3.83	0.864 ± 0.251	Additive
	6	8.35	2.54	10.89	73	53.02	3.94	0.834 ± 0.320	Additive
	7	4.59	2.83	7.42	77	62.43	4.37	0.712 ± 0.347	Additive
+ CasVIII-gly	1	37.15	0.17	37.32	76	59.44	2.22	0.702 ± 0.119	Super-additive
	2	33.39	0.30	33.69	76	59.10	2.23	0.700 ± 0.249	Additive
	3	27.97	0.50	28.47	74	56.10	2.24	0.732 ± 0.224	Additive
	4	20.87	0.76	21.63	74	54.95	2.11	0.739 ± 0.258	Additive
	5	13.77	1.02	14.79	90	120.33	3.80	0.383 ± 0.254	Super-additive
	6	8.35	1.22	9.57	74	54.45	2.11	0.730 ± 0.314	Additive
	7	4.59	1.35	5.94	93	160.81	4.81	0.309 ± 0.255	Super-additive
+ CisPlatin	1	37.15	1.20	38.35	54	32.18	14.51	1.251 ± 0.157	Sub-additive
	2	33.39	2.18	35.57	55	37.84	16.68	1.259 ± 0.597	Additive
	3	27.97	3.60	31.57	56	42.23	18.35	1.185 ± 0.637	Additive
	4	20.87	5.45	26.32	68	53.21	22.86	0.731 ± 0.308	Additive
	5	13.77	7.30	21.07	76	61.19	26.14	0.509 ± 0.063	Super-additive
	6	8.35	8.72	17.07	74	62.90	26.70	0.514 ± 0.215	Super-additive
	7	4.59	9.70	14.29	77	64.45	27.40	0.436 ± 0.084	Super-additive

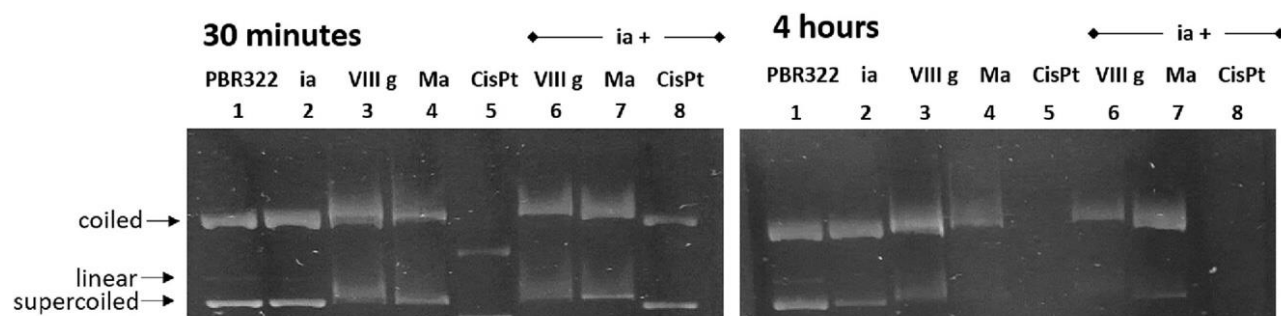
^a Number of combination per compound.^b Concentration of the compound in the combination.^c Concentration needed of the compounds alone to achieve the inhibition observed for the combination.

Fig. 5. Horizontal electrophoresis of Plasmidic DNA (PBR322) with Casiopeínas® or Cisplatin. 1) 300 ng PBR322; 2) 300 ng PBR322 + CasIII-ia 4.39 mM; 3) 300 ng PBR322 + CasVIII-gly 1.36 mM; 4) 300 ng PBR322 + CasIII-Ma 1.31 mM; 5) 300 ng PBR322 + Cisplatin 5.00 mM; 6) 300 ng PBR322 + CasIII-ia 4.39 mM + CasVIII-gly 1.36 mM; 7) 300 ng PBR322 + CasIII-ia 4.39 mM + CasIII-Ma 1.31 mM; 8) 300 ng PBR322 + CasIII-ia 4.39 mM + Cisplatin 5.00 mM.

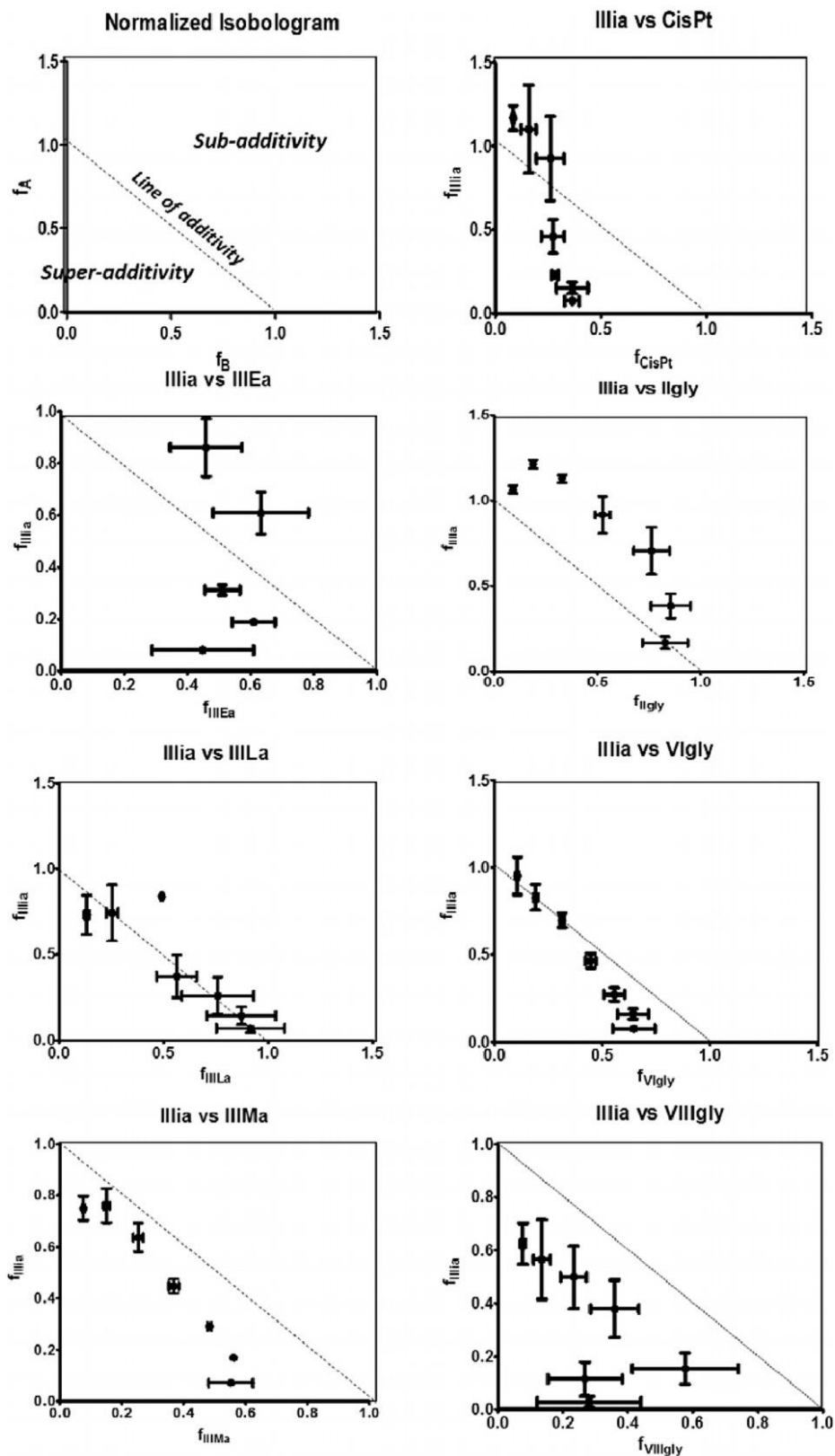


Fig. 6. Normalized isobolograms of the combination of CasIII-ia with six phenanthroline analogues and Cisplatin in HeLa cell lines. Error bars represent the standard error of the mean.

and diminish its damage, the increment in ROS concentrations in mitochondria by cisplatin and decrease on glutathione levels by the Casiopeínas^(R) may take a greater role on the global effect [42].

In the case of the Isobolographic analysis, it allows to establish the type of interaction two compounds may present when administered in combination when they are applied in equieffective concentrations. As the CI approaches to zero, the combination becomes more synergistic, in opposition to higher CI, which entails antagonistic effects. A CI of 1, means almost additive interactions. There are several requirements needed to work with the Isobolographic Analysis, for example, it is suggested that the C-R curves of the compounds proposed for the combination must be parallel, since it suggests that the mechanisms of action may be mutually exclusive, meaning that the activities of one of the compounds will not interfere with the activity of the second. Regarding the Fractional analysis, it consists on the evaluation of two or more compounds considering a constant ratio dilution of each. In the present work we decided to evaluate compounds in a non-constant ratio of equieffective concentrations, employing different proportions in the combinations (8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 2:1, 4:1, 1,8), therefore the analysis must not be considered strictly as any of the former analysis, but a combination of both [43].

Because of the biological model employed, it is difficult to separate all the mechanisms involved, therefore we only focused on the global effect of the compounds in combination and we compared it with the effect that we would have when we exposed the cells to the compounds alone. Additionally, the C-R curves allow to estimate if a combination may exert *subadditive*, *additive* or *superadditive* interactions only by looking at the form of the curves. Chou proposes that a combination of two drugs that have parallel C-R curves are likely to show non-additive interactions due to the hypothesis that this behaviour suggests non-mutually exclusive mechanisms of action [43]. The results reported here, from the C-R curves, agree with the proposal, and only those compounds that share similar slope, have combinations that present *super* or *sub-additive* interactions with CasIII-ia, as shown in Fig. 6, where only the tetramethylated-phenanthroline analogues and cisplatin appear to have synergistic behaviour proportional to the concentration of the second compound. Because of the latter, the mathematical method proposed, considering both fractional and isobolographic analysis might help in the identification of probable *superadditive* interactions, as it is difficult to find compounds that share values of slope. Moreover, it is also to note that the effect of the combination depends on the proportion of the compounds, with behaviours of the isobolograms that cross the line of additivity, specifically when CasIII-ia is mixed with Cisplatin. In this case, the *superadditivity* observed proportional to the increment in the fraction of Cisplatin in the mixture.

Finally, CasIII-ia has very low toxicity in normal (peripheral blood Lymphocytes IC₅₀ 4700 μM and the analogues CasII-gly 1720 μM, CasIII-Ea 3860 μM [15] and CasVIII-gly 764 μM (unpublished work) compared with tumour cells such as HeLa 41.7 μM for CasIII-ia, CasIII-Ea 3.22 μM, CasII-gly 2.56 μM and CasVIII-gly 2.86 μM (see Table 1) while Cisplatin shows IC₅₀ of 19 μM for peripheral blood Lymphocytes [44] and IC₅₀ 5.1 μM for HeLa [7]. Although combinations have not been tested yet in lymphocytes, considering the low toxicity of the analogues, we assume that Casiopeínas in general have very low toxicity in normal cells.

5. Conclusions

The increased activity of the combinations found for the tetramethylated-phenanthroline analogues and cisplatin with CasIII-ia may serve for further *in vivo* analysis in order to diminish the activity of the Casiopeínas^(R) with phenanthroline, in which their

toxicity increases proportional to their activity. Furthermore, one of the combinations yielded a 90% inhibition of the proliferation when the cells were exposed to 4.59 and 1.35 μM to CasIII-ia and CasVIII-gly, respectively, in contrast with more than 100 μM of CasIII-ia and 4.81 μM of CasVIII-gly proposed by the individual C-R curves. The damage of plasmidic DNA suggests a differential effect of the compounds when applied in combination, as shown by horizontal electrophoresis. However, features as the dose schedule, pharmacokinetic and pharmacodynamics properties have to be considered if any of the combinations are to be scaled in animal models, in order of establishing if the toxicity diminishes with the concentrations employed. Finally, the biochemical level of the interactions for the *superadditive* and *subadditive* combinations remains to be studied as it might yield new considerations in the mechanism of action of the compounds.

Funding

SGDM would like to acknowledge CONACYT for the scholarship No. 240080. This work was supported by the UNAM-PAIP grant 5000-9047, UNAM-PAPIIT grant 204511 and CONACYT 179119.

Acknowledgements

The authors thank Dr Mariano Martínez Vázquez for the helpful discussion in the analysis of the results and Exp Biol. Gonzalo Acero and Dr Goar Gevorkian from Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM and Dr. Antonio Alvarado from the Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis, IMSS for allowing Silvia Dávila use their laboratories for the determination of the CI₅₀.

References

- [1] World Health Organization, 2007 [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2007/np31/en/>.
- [2] Perfiles oncológicos del los países, 2015 [Online]. Available: <http://www.who.int/cancer/country-profiles/es/> (Accessed 8 November 2015).
- [3] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, Advances in copper complexes as anticancer agents, *Chem. Rev.* 114 (1) (2014).
- [4] L. Ruiz-Azuara, M.E. Bravo-Gómez, Copper compounds in cancer chemotherapy, *Curr. Med. Chem.* 17 (31) (2010) 3606–3615.
- [5] L. Ruiz-Azuara, Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos, Tipo II S.18802 172248 (1993).
- [6] L. Ruiz-Azuara, "Process to Obtain New Mix Copper Aminoacidate from Methylate Phenanthroline Complexes to Be Used as Anticancerigenic Agents," 5,576,326.
- [7] M.E. Bravo-Gómez, J.C. García-Ramos, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes. (Casiopeínas^(R)), *J. Inorg. Biochem.* 103 (2) (2009) 299–309.
- [8] A.G. Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, J.C. García-Ramos, M. Flores-Alamo, E. Hernández-Lemus, L. Ruiz-Azuara, C. Mejía, Copper(ii) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line chp-212, *J. Inorg. Biochem.* 126 (3) (2013) 17–25.
- [9] C. Mejía, L. Ruiz-Azuara, Casiopeínas Igly and IIIia induce apoptosis in medulloblastoma cells, *Pathol. Oncol. Res.* 14 (4) (2008) 467–472.
- [10] L. Becco, A. Rodríguez, M.E. Bravo, M.J. Prieto, L. Ruiz-Azuara, B. Garat, V. Moreno, D. Gambino, New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas^(R): interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity, *J. Inorg. Biochem.* 109 (2012) 49–56.
- [11] M. E. Bravo-gómez, A. Laura, H. De, and I. Gracia-Mora, "Antineoplastic Evaluation of Two Mixed Chelate Copper Complexes (Casiopeínas(R)) in HCT-15 Xenograft Model," vol. 57, no. 3, pp. 205–211, 2013.
- [12] A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Muller, L. Ruiz-Ramirez, G.E.N. Kass, L.R. Kelland, R.M. Orr, M. Dobrota, Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells, *Toxicol. Vitro.* 14 (1) (2000) 1–5.
- [13] F. Carvallo-chaigneau, I. Gracia, L. Ruiz-azuara, V. Madrid-marina, D.I. Sobre, E. Infecciosas, CAS III-IA INDUCE APOPTOSIS EN HCT -15 A TRAVÉS DE MECANISMO DEPENDIENTES DE CASPASAS IN VITRO Y TIENE EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS, 2003.
- [14] A.R. Barbosa, K.R. Caleffi-Ferracioli, C.Q.F. Leite, J.C. García-Ramos, Y. Toledano-Magaña, L. Ruiz-Azuara, V.L.D. Siqueira, F.R. Pavan, R.F. Cardoso, Potential of

- Casiopeínas® copper complexes and antituberculosis drug combination against *Mycobacterium tuberculosis*, *Chemotherapy* 16 (61) (2015) 249–255.
- [15] J.-C. García-Ramos, Y. Toledano-Magaña, A.G. Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, A.L. Alonso-Sáenz, V. Gómez-Vidales, M. Flores-Alamo, C. Mejía, L. Ruiz-Azuara, he mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu(II) antineoplastic compounds (Casiopeínas®) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times, *Biometals*, (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-016-9983-8>.
- [16] B. Al-Lazikani, U. Banerji, P. Workman, Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era, *Nat. Biotechnol.* 30 (7) (Jul. 2012) 679–692.
- [17] F.L. Mitchell, S.M. Miles, J. Neres, E.V. Bichenkova, R. a. Bryce, Tryptophan as a molecular shovel in the glycosyl transfer activity of *Trypanosoma cruzi* transsialidase, *Biophys. J.* 98 (9) (2010) 38–40.
- [18] A. Remesh, Toxicities of anticancer drugs and its management, *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.* 1 (1) (2012) 2.
- [19] R.J. Tallarida, Drug synergism: its detection and applications, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298 (3) (2001) 865–872.
- [20] R.J. Tallarida, An overview of drug combination analysis with isobolograms, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319 (1) (2006) 1–7.
- [21] R.J. Tallarida, R.B. Raffa, "The application of drug dose equivalence in the quantitative analysis of receptor occupation and drug combinations, *Pharmacol. Ther.* 127 (2) (2010) 165–174.
- [22] Z. Li, C. Wu, J. Wu, M. Ji, L. Shi, J. Jiang, B. Xu, J. Yuan, Synergistic antitumor effects of combined deguelin and cisplatin treatment in gastric cancer cells, *Oncol. Lett.* 8 (4) (Oct. 2014) 1603–1607.
- [23] "Cellular processing of platinum ANTICANCER DRUGS." [Online]. Available: <http://www.nature.com/nrd/journal/v4/n4/pdf/nrd1691.pdf>. (Accessed 23 May 2016).
- [24] D. Ferreira, F. Atega, R. Chaves, The importance of cancer cell lines as in vitro models in cancer methylome analysis and anticancer drugs testing, in: *Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer*, InTech, 2013.
- [25] X. Solans, L. Ruiz-Ramirez, a. Martinez, L. Gasque, R. Moreno-Esparza, Mixed chelate complexes. II. Structures of L-alaninato(aqua)(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)copper(II) nitrite monohydrate and aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(nitrate)copper(II) monohydrate, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* C49 (5) (1993) 890–893.
- [26] J.C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, A. Tovar-Tovar, A.L. Alonso-Saenz, V. Gómez-Vidales, M. Flores-Alamo, L. Ortiz-Frade, F. Cortes-Guzmán, R. Moreno-Esparza, A. Campero, L. Ruiz-Azuara, The pi-back-bonding modulation and its impact in the electronic properties of CuII antineoplastic compounds: an experimental and theoretical study, *Chem. - A Eur. J.* 20 (42) (2014) 13730–13741.
- [27] J.-C. García-Ramos, Estudio de la actividad nucleasa de quelatos mixtos de Cu(II): Casiopeínas, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- [28] G. S. Girolami, T. B. Rauchfuss, and Agelici, R.J., *Synthesis and Technique in Inorganic Chemistry*, third ed., U.S.A.: University Science Books.
- [29] M.E. Bravo-Gómez, C. Campero-Peredo, D. García-Conde, M.J. Mosqueira-Santillán, J. Serment-Guerrero, L. Ruiz-Azuara, DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casiopeínas??) and analysis of its biological meaning, *Polyhedron* 102 (2015) 530–538.
- [30] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M.R. Boyd, New Colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (13) (Jul. 1990) 1107–1112.
- [31] T.-C. Chou, N. Martin, *CompuSyn*, 2004.
- [32] A.I. Valencia-Cruz, L.I. Uribe-Figueroa, R. Galindo-Murillo, K. Baca-López, A.G. Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, L. Ruiz-Azuara, E. Hernández-Lemus, C. Mejía, Whole genome gene expression analysis reveals Casiopeína-induced apoptosis pathways, *PLoS One* 8 (1) (2013).
- [33] M.E. Bravo-Gómez, S. Dávila-Manzanilla, J. Flood-Garibay, M.A. Muciño-Hernández, Á. Mendoza, J.C. García-Ramos, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Azuara, Secondary ligand effects on the cytotoxicity of several Casiopeína's group II compounds, *J. Mex. Chem. Soc.* 56 (1) (2012) 85–92.
- [34] S. Dasari, P. Bernard Tchounwou, Cisplatin in Cancer therapy: molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (Jul. 2014) 364–378.
- [35] J.C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, Metal-based drug-DNA interactions, *J. Mexican Chem. Soc.* 57 (3) (2013).
- [36] R. Galindo-Murillo, J. Hernandez-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza, π -Stacking between Casiopeínas® and DNA bases, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (32) (2011) 14510–14515.
- [37] R. Galindo-Murillo, J.C. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, T.E. Cheatham, F. Cortes-Guzman, Intercalation processes of copper complexes in DNA, *Nucleic Acids Res.* 43 (11) (2015) 5364–5367.
- [38] R. Galindo-Murillo, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza, F. Cortés-Guzmán, Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (44) (2012) 15539.
- [39] C. Shobha Devi, D. Anil Kumar, S.S. Singh, N. Gabra, N. Deepika, Y.P. Kumar, S. Satyanarayana, Synthesis, interaction with DNA, cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptotic inducing properties of ruthenium(II) molecular 'light switch' complexes, *Eur. J. Med. Chem.* 64 (2013).
- [40] L.J.H. Borges, É.S. Bull, C. Fernandes, A. Horn, N.F. Azeredo, J.A.L.C. Resende, W.R. Freitas, E.C.Q. Carvalho, L.S. Lemos, H. Jerdy, M.M. Kanashiro, In vitro and in vivo studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines, *Eur. J. Med. Chem.* 123 (2016) 128–140.
- [41] Z. Zhang, Y. Gou, J. Wang, K. Yang, J. Qi, Z. Zhou, S. Liang, H. Liang, F. Yang, Four copper(II) compounds synthesized by anion regulation: structure, anticancer function and anticancer mechanism, *Eur. J. Med. Chem.* 121 (2016) 399–409.
- [42] R. Kachadourian, H.M. Brechbuhl, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, B.J. Day, Casiopeína® induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells, *Toxicology* 268 (3) (2010) 176–183.
- [43] J.G. Bovill, 1 Analysis of drug interactions, *Baillieres. Clin. Anaesthesiol.* 12 (2) (Jun. 1998) 153–168.
- [44] C. Haglund, A. Åleskog, P. Nygren, J. Gullbo, M. Höglund, M. Wickström, R. Larsson, E. Lindhagen, In vitro evaluation of clinical activity and toxicity of anticancer drugs using tumor cells from patients and cells representing normal tissues, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 69 (3) (Mar. 2012) 697–707.