



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en diferenciación celular y cáncer

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

Laboratorio No. 6, 2do piso, UMIEZ

Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del
compuesto *tributylestanil4-oxo-4(5-nitro-1,3-tiazol-2il)*
amino) butanoato (TBSn3) en líneas celulares de cáncer
cervicouterino

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Sandoval Licea Karen

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Hugo López Muñoz

Cd. Mx., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **SANDOVAL LICEA KAREN**, con número de cuenta **312116475**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **02 de abril de 2019** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA
- VOCAL** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
- SECRETARIO** Dr. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
- SUPLENTE** M. en C. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ
- SUPLENTE** Dr. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ



El título de la tesis que presenta es: **Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del compuesto tributilestanil4-oxo-4(5-nitro-1,3-tiazol-2il) amino) butanoato (TBSn3) en líneas celulares de cáncer cervicouterino.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 22 de febrero de 2019

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN


VQ. BO.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

A mis padres, Guillermo y Elena

A mis tíos Alberto, Pablo, David y Mari

A Max †

*“No hay obstáculos imposibles;
solo hay voluntades fuertes y débiles”*

- Julio Verne

Agradecimientos

A la Máxima Casa de Estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Al Dr. Hugo López Muñoz, por ser un buen profesor e inspirar a sus alumnos y contagiar el amor por la biología.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez, por permitirme estar en su equipo de trabajo y acercarme a la investigación. Por sus aportaciones y observaciones para enriquecer y mejorar mi trabajo.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández, por su amabilidad y disposición de ayudarnos, por sus correcciones y su contribución a mi trabajo.

A la M. en C. Reynalda Roldan Pérez, por el tiempo dedicado a revisar mi trabajo, por las observaciones y mejoras recomendadas en mi trabajo.

Al Dr. Alberto Monroy García, por las observaciones y correcciones realizadas en este trabajo y por el tiempo invertido.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de los proyectos PAPIIT IN220916, PAPIIT IV216718, CONACyT 253979 y CONACyT 255881

Agradecimientos

A mis padres por apoyarme, ayudarme y acompañarme en este proceso.

A mis tíos por apoyarme durante mis estudios.

A Sofía por ser mi compañera de laboratorio, por estar conmigo en este proceso, por animarme, aconsejarme, entenderme y apoyarme en los momentos difíciles y de miedo.

A Karely, Helios, Janet, Renata y Libertad por ser buenos amigos, escucharme, comprenderme, por las experiencias que compartimos y por la amistad que a pesar de la distancia se mantiene.

A Ilse por ser buena amiga, aconsejarme, alentarme y ayudarme cuando lo necesito.

A Rafa y Toledo por apoyarme en los momentos difíciles, por darme ánimos y por siempre estar en la disposición de ayudarme.

A Fernando por ayudarme en los experimentos de laboratorio, aclarar mis dudas y aconsejarme sobre el futuro.

A mis compañeros del laboratorio Mayra, Denisse, Iván, Elena, Bety, Helena, Mónica, Braulio, Jorge, Fer y Uriel.

A Carlos por ayudarme en lo académico, por el tiempo compartido y lo que ello implica.

Índice de contenido

RESUMEN.....	XI
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. LA CÉLULA	1
1.2. CICLO CELULAR.....	1
1.3. MUERTE CELULAR	3
1.3.1. Necrosis	5
1.3.2. Apoptosis	6
1.3.3. Vías de la apoptosis.....	8
1.4. CÁNCER:.....	11
1.5. CÁNCER CERVICOUTERINO (CACU):.....	13
1.6. TRATAMIENTOS	17
1.6.1. Tratamiento quirúrgico:	17
1.6.2. Tratamiento no farmacológico:.....	17
1.6.3. Tratamiento no farmacológico:.....	17
1.7. ORGANOMETÁLICOS:.....	18
1.8. COMPUESTOS DE ORGANOESTAÑO (COE):.....	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	25
6.1. CULTIVO CELULAR DE LAS LÍNEAS TUMORALES HELA, CASKI Y VIBO.....	25
6.2. EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE LA TÉCNICA DE INCORPORACIÓN DE CRISTAL VIOLETA.....	25
6.3. DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR POR NECROSIS A TRAVÉS DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA ENZIMA LDH.....	26
6.4. EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR APOPTÓTICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON TINCIÓN DE DAPI.	26
6.5. INMUNODETECCIÓN DE CASPASA-3 ACTIVA MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	27
6.6. INMUNODETECCIÓN DE CASPASA-3 ACTIVA POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	27
6.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	28
6.8. DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD EN LINFOCITOS HUMANOS MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE LDH. ...	29
7. RESULTADOS.....	30
7.1. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE COMPUESTO TBSN3 EN CÉLULAS TUMORALES HELA, CASKI Y VIBO. 30	
7.2. EFECTO NECRÓTICO DEL COMPUESTO TBSN3 EN CÉLULAS TUMORALES.....	32
7.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA DEL TBSN3 MEDIANTE LA OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR APOPTÓTICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON TINCIÓN DE DAPI E INMUNODETECCIÓN DE CASPASA-3 ACTIVA OBSERVADA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.	33

7.4. EFECTO APOPTÓTICO: PRESENCIA DE CASPASA-3 ACTIVA CUANTIFICADA POR CITOMETRÍA DE FLUJO ...	36
7.5. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL COMPUESTO TBSN3 EN LINFOCITOS HUMANOS.....	38
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
9. CONCLUSIONES	44
10. BIBLIOGRAFÍA.....	45
11. APÉNDICE.....	57

Resumen

El cáncer es una enfermedad en la que un grupo de células anormales crecen de forma incontrolable ignorando las reglas normales de la división celular, dentro de los principales tipos de cáncer con mayor incidencia en mujeres se encuentra el cáncer cervicouterino, actualmente los tratamientos más comunes contra este cáncer son la cirugía, radioterapia y quimioterapia, sin embargo, algunos agentes quimioterapéuticos pueden causar necrosis tisular, además de ser poco específicos afectando células normales que están en constante división generando efectos secundarios y resultan ineficientes en estadios avanzados de la enfermedad, en consecuencia, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra esta enfermedad, y en este sentido, se sabe que los compuestos de organoestaño presentan actividad antitumoral, inducen muerte por apoptosis y presentan menor toxicidad general. Por ello, en este trabajo se estudió el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del compuesto Tributilestanil4-oxo-4(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) amino) butanoato (TBSn3) en las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el compuesto TBSn3 posee actividad biológica como agente antitumoral ya que los ensayos de proliferación muestran que el compuesto TBSn3 abate en un 50% a las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo a concentraciones de 0.4 $\mu\text{g/mL}$, 0.427 $\mu\text{g/mL}$ y 0.8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Evaluando la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos en las concentraciones de IC_{50} obtenidas, se obtuvo que el compuesto TBSn3 no induce muerte necrótica a las células tumorales y es por ello que se evaluaron características morfológicas que indiquen la presencia de muerte apoptótica mediante el marcaje con DAPI, lo que permitió observar fragmentación de la cromatina, condensación del ADN y reducción del tamaño de los núcleos, además, se observó la presencia de caspasa-3 activa por microscopía de fluorescencia y se cuantificó por citometría de flujo obteniendo porcentajes para las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo de: 57.3%, 50.7% y 65.4 % respectivamente. Finalmente, se evaluó el efecto del compuesto TBSn3 en cultivos de linfocitos obteniendo que el compuesto no afecta la proliferación de estos, además la cuantificación de la enzima LDH se muestra que no induce efecto necrótico en los cultivos de linfocitos. Estos resultados permiten establecer al TBSn3 como candidato para realizar estudios *in vivo* y su posterior evaluación como agente terapéutico contra el cáncer.

1. Marco Teórico

1.1. La célula

La célula es la unidad fundamental (Alberts *et al.*, 2006), funcional y estructural básica de la vida que compone al cuerpo humano y al de todos los seres vivos (Sepúlveda, 2012). La biología molecular considera a la célula como un complejo sistema de macromoléculas organizadas y autodirigidas capaz de crecer, reproducirse, transformar energía (Gama, 2004), procesar información, responder a estímulos y llevar a cabo reacciones químicas (Lodish *et al.*, 2005), rodeadas de una membrana que contienen una solución acuosa concentrada de sustancias químicas y dotadas con la capacidad de crear copias de sí mismas mediante el crecimiento y la división en dos células (Alberts *et al.*, 2006). La división de una célula conlleva la formación de otras dos exactamente iguales a la de origen, con sus mismos componentes y sus mismas funciones (Macarulla *et al.*, 2009).

1.2. Ciclo celular

El ciclo celular es la base para la reproducción de los organismos (Lomanto *et al.*, 2003) en donde las células divididas pasan a través de una secuencia regular de crecimiento y división celular, conocida como el ciclo celular (Hunt *et al.*, 2011).

Posee dos fases principales, la interfase y la mitosis (Passarge, 2007). La interfase es la fase más larga del ciclo celular y comprende tres etapas; fase G1, fase S, fase G2 (Lagunas *et al.*, 2014) y la fase M (mitosis) o de división celular como su nombre lo indica es la división de todo el material celular para originar dos células hijas (Alberts *et al.*, 1998). Durante la interfase la célula crece y copia sus cromosomas en preparación para la división celular (Campbell y Reece, 2005). La fase G1 es un periodo de crecimiento general y duplicación de los organelos citoplasmáticos (Curtis *et al.*, 2006) así como de producción de todas las proteínas necesarias para la síntesis de ADN (Rodríguez *et al.*, 2004). El proceso clave de la replicación del ADN tiene lugar en la fase S, periodo en el cual también se sintetizan muchas histonas y otras proteínas asociadas con el ADN. Cuando termina, el núcleo contiene el doble de ADN y proteínas nucleares (Rodríguez *et al.*, 2004). Durante la fase G2, comienzan a ensamblarse las estructuras directamente asociadas con la mitosis y la citocinesis (Curtis *et al.*, 2006).

La progresión a través del ciclo de las células eucariotas es impulsada por CDKs, que forman complejos bipartitos con diferentes ciclinas (Coudreuse y Nurse, 2010).

De entre estas proteínas se destacan las enzimas de acción fosforilante denominadas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs 1, 2, 4 y 6) y sus subunidades activadoras las ciclinas, proteínas regulatorias positivas (A, B, D y E) (Gutiérrez *et al.*, 2002).

La actividad de las CDKs está modulada por inhibidores específicos y por cambios en la fosforilación de la subunidad catalítica en respuesta a insumos tales como la disponibilidad de nutrientes, el tamaño de la célula y la activación de mecanismos de puntos de control (Coudreuse y Nurse, 2010).

En la fase G1 temprana cdc2 está inactiva. Luego se activa en G1 tardía por la asociación con las ciclinas de G1, como la ciclina E. Una vez que la célula pasó el punto de restricción de la fase G1, la ciclina E se degrada y la célula entra en la fase S (Passarge, 2007). Al inicio de la síntesis del ADN en la fase S, se sintetiza la ciclina A seguida por la síntesis de la B, que ocurre durante el intervalo entre la fase S y la fase G2, degradándose ambas al final de la mitosis (Pines y Hunter, 1991).

Para lograr esta fidelidad, las células han desarrollado mecanismos de vigilancia que monitorean la estructura de los cromosomas y coordinan la reparación y la progresión del ciclo celular (Zhou y Elledge, 2000).

La función normal del punto de restricción es esencial para mantener el control de la proliferación celular, y está controlada por la vía del retinoblastoma (CDK4 y CDK6-ciclina D1-Rbp16/ink4a) (Sánchez-Martínez *et al.*, 2015). El punto de control

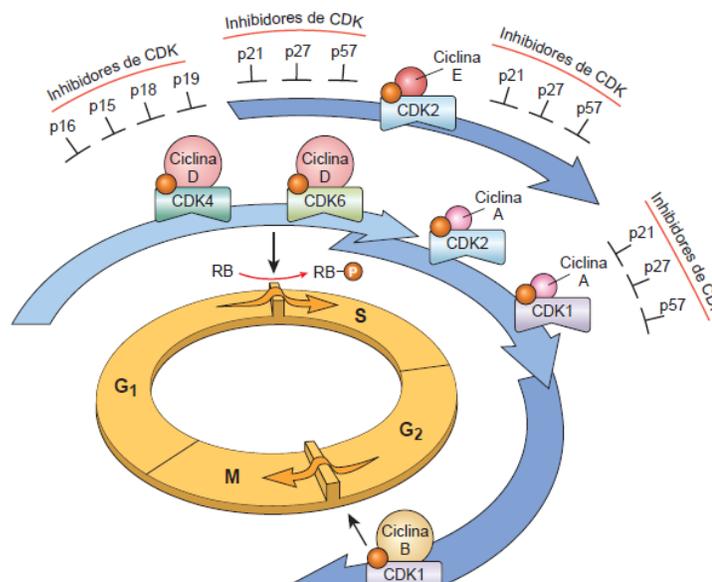


Figura 1. Ciclo celular. Complejos ciclina/cdk formados durante las fases del ciclo celular.

Disponible en <http://grupob2patologiausac.blogspot.com/2014/08>

G2/M evita que las células entren en la mitosis y un punto de control G2/M negligente puede conducir a inestabilidad genómica y riesgo de cáncer (Wang *et al.*, 2015).

Durante la replicación del ADN y la división celular pueden ocurrir múltiples errores (Passarge, 2007). Una falla en la regulación en el mecanismo de control del ciclo celular lleva a una proliferación celular excesiva y como consecuencia a la aparición del cáncer. El cáncer resulta de múltiples alteraciones genéticas que controlan la proliferación celular, la diferenciación o la muerte celular (Stewart *et al.*, 2003).

1.3. Muerte celular

Los organismos multicelulares están constituidos por un número predeterminado de células, que es característico para cada especie. Ese número resulta de la suma de dos procesos, a saber, (a) la multiplicación celular y (b) la muerte y eliminación de un número igual de células redundantes (Dubin y Stoppani, 2000).

La muerte de las células en los tejidos humanos y en otros organismos multicelulares es un hecho normal y no produce alteración de las funciones (Elena, 2002), puede ocurrir como consecuencia de una agresión celular aguda o de un programa de suicidio codificado internamente (Ross y Pawlina, 2007). La muerte celular se produce de dos maneras, una desordenada y otra ordenada (Silverthorn, 2008).

Por criterios morfológicos y bioquímicos, se han definido diferentes clases de muerte celular (Ramírez y Rojas, 2012), típicamente discutida dicotómicamente como apoptosis o necrosis (Fink y Cookson, 2005). A continuación, se muestra un cuadro describiendo las diferencias entre la muerte necrótica y apoptótica (Cuadro 1).

Necrosis**Apoptosis****Características morfológicas**

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de la integridad de la membrana • Hinchamiento del citoplasma • Lisis celular total • Sin formación de vesículas • Desintegración (hinchamiento) de los organelos | <ul style="list-style-type: none"> • Formación de ampollas en la membrana, pero sin pérdida de la integridad • Encogimiento del citoplasma y la condensación del núcleo • Fragmentación de las células en pequeños cuerpos • Formación de cuerpos apoptóticos • La mitocondria se vuelve permeable debido a la formación de poros involucrando proteínas de la familia bcl-2 |
|---|---|

Características bioquímicas

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de la regulación de la homeostasis de iones • Sin requerimiento de energía (proceso pasivo) • Digestión al azar de ADN • Fragmentación del ADN posterior a la lisis | <ul style="list-style-type: none"> • Proceso fuertemente regulado que involucra la activación de enzimas • Dependiente de energía (ATP) • Fragmentación no aleatoria de ADN • Libramiento de varios factores (citocromo c, AIF) por la mitocondria en el citoplasma • Activación de la cascada de caspasas • Alteraciones en la membrana, por ejemplo, la translocación de fosfatidilserina desde el lado citoplasmático hasta el lado extracelular de la membrana |
|--|--|

Importancia fisiológica

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Afecta a grupos de células contingentes • Provocada por alteraciones no fisiológicas • Fagocitosis por macrófagos • Respuesta inflamatoria significativa | <ul style="list-style-type: none"> • Afecta a células individuales • Inducida por estímulos fisiológicos (falta de factores de crecimiento, cambios en el ambiente hormonal) • Fagocitosis por células adyacentes o macrófagos • Sin respuesta inflamatoria |
|---|---|

Cuadro 1. Principales diferencias entre apoptosis y necrosis tomado y modificado de Kunapuli et al., (2006)

1.3.1. Necrosis

La muerte celular por necrosis ocurre en las células que no han alcanzado su tiempo de vida completo y que por medio de un estímulo externo son forzadas a interrumpir sus funciones vitales y alterar su integridad física (Enríquez-Mejía, 2013), se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia (Lizarbe, 2007). En general, esto es causado por un patógeno o por estrés oxidativo (Enríquez-Mejía, 2013).

La muerte necrótica comienza con la pérdida de la capacidad de la célula para mantener la homeostasis (Ross y Pawlina, 2007), así, las células que sufren necrosis dejan de producir proteínas y ATP. Estructuralmente, los organelos de las células se hinchan y se vuelven no funcionales durante las etapas iniciales de la necrosis (Nanji y Hiller-Sturmhöfel, 1997), los fluidos intracelulares, así como las proteínas y organelos se liberan al exterior (Enríquez-Mejía, 2013).

El contenido celular liberado induce posteriormente una respuesta inflamatoria en el tejido afectado. Esta respuesta está mediada por tres componentes: (1) ciertas células del sistema inmunológico que son atraídas; (2) pequeñas moléculas llamadas citoquinas que están involucradas en la comunicación celular; y (3) especies reactivas de oxígeno (es decir, radicales de oxígeno). Esta respuesta inflamatoria posterior, que a menudo se considera parte integrante de la necrosis, provoca daños adicionales al tejido (Nanji y Hiller-Sturmhöfel, 1997).

En la necrosis existe un daño celular generalizado debido a la acción de una proteína denominada factor alfa de necrosis tumoral o TNF- α . Este factor es secretado por los leucocitos de la sangre durante la inflamación y eliminación de tejidos dañados. El TNF- α es reconocido por las células a través de una proteína receptora localizada en la membrana celular. Dado que muchas células tienen en sus membranas moléculas receptoras al TNF- α , este es reconocido tanto en las células dañadas como por las sanas, lo que implica que en el proceso necrótico haya cierto grado de desorden (Delgadillo, 2002).

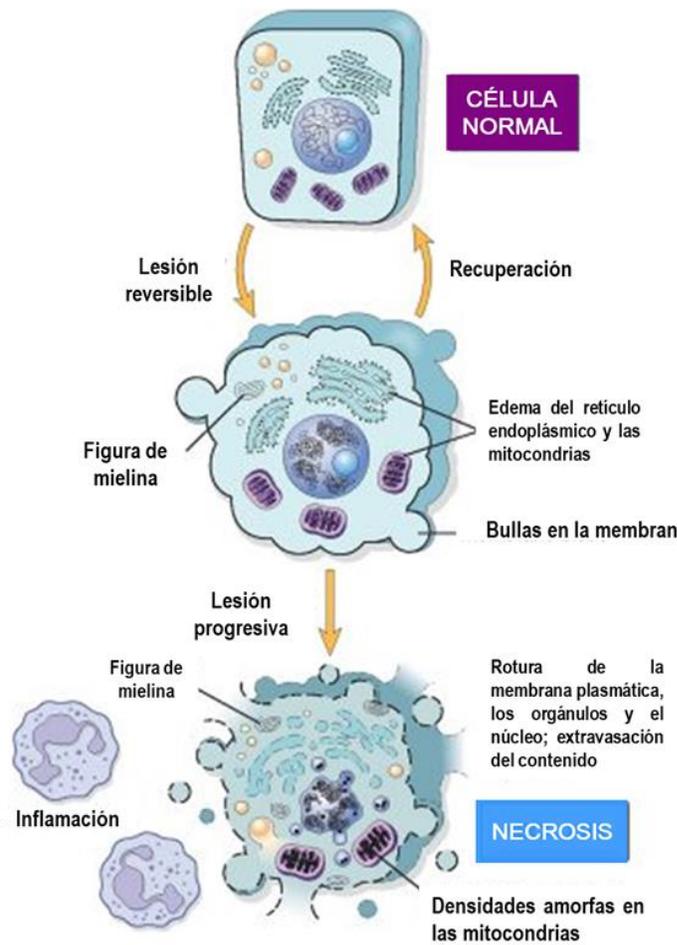


Figura 2. Proceso de muerte necrótica. Tomado de Kumar *et al.*, (2010).

1.3.2. Apoptosis

Cuando las células ya no se necesitan, o cuando se convierten en una amenaza para el organismo, sufren una muerte celular programada suicida, o apoptosis (Guyton y Hall, 2011).

La apoptosis involucra la participación activa de las células afectadas en una cadena de autodestrucción que ocasiona la alteración de la estructura de la membrana, reducción del tamaño celular, disminución del volumen del núcleo (Flores-Balcázar *et al.*, 2015), destrucción de sus proteínas, citoesqueleto y organelos, (Muñoz y Cuca, 2016), la cromatina nuclear se condensa y se fragmenta al poner en marcha una endonucleasa endógena formando cuerpos apoptóticos como consecuencia de la ruptura del citoesqueleto y la pérdida de anclaje de la membrana (Oliveri, 2000).

Los cuerpos apoptóticos están constituidos por restos de citoplasma rodeados de membrana celular y son eliminados al entorno extracelular, donde son endocitados por células fagocíticas, lo que evita la lesión y la consiguiente respuesta inflamatoria (Ramírez *et al.*, 1999).

En la apoptosis existe un orden en el proceso de eliminación celular desencadenado por diversas causas, como la falta de factores de crecimiento, a nivel molecular, por el encendido de genes específicos (Delgadillo, 2002). El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda o de ejecución, se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis, por último, en la tercera etapa o de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (Hengartner, 2000).

Los principales componentes efectores de la apoptosis son las caspasas, una familia de proteasas de cisteína que rompen sus sustratos después de los residuos de aspartato. Hay alrededor de una docena de caspasas de mamíferos que existen en las células como zimógenos inactivos (Vaux y Korsmeyer, 1999); pueden ser agrupadas de acuerdo a su especificidad o a su similitud en la secuencia de aminoácidos, desde un punto de vista funcional las caspasas pueden ser vistas como “iniciadoras” o bien como caspasas “efectoras” que degradan otros sustratos proteicos dentro de la célula para disparar los procesos apoptóticos (Rojas *et al.*, 2009). Las caspasas iniciadoras son: la 2, la 8, la 9 y la 10, y la recientemente propuesta caspasa 4; y las caspasas ejecutoras son la 3, la 6 y la 7 (Martínez, 2008).

La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo. Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteólisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora (Angosto, 2003).

Los principales sustratos de las caspasas efectoras incluyen: proteínas quinasas y otras proteínas transductoras de señales, tales como proteínas de la matriz nuclear y del citoesqueleto, enzimas modificadoras de la cromatina, proteínas reparadoras del ADN y subunidades inhibitoras de ciertas endonucleasas, que son en parte responsables de la digestión del genoma. Estos eventos de degradación proteolítica son irreversibles y conducen a la muerte de la célula (Rojas *et al.*, 2009). Las caspasas 3, 6 y 7 son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003). Se han descrito muchas cascadas apoptóticas, tales como las intrínseca y extrínseca (Ashe y Berry, 2003).

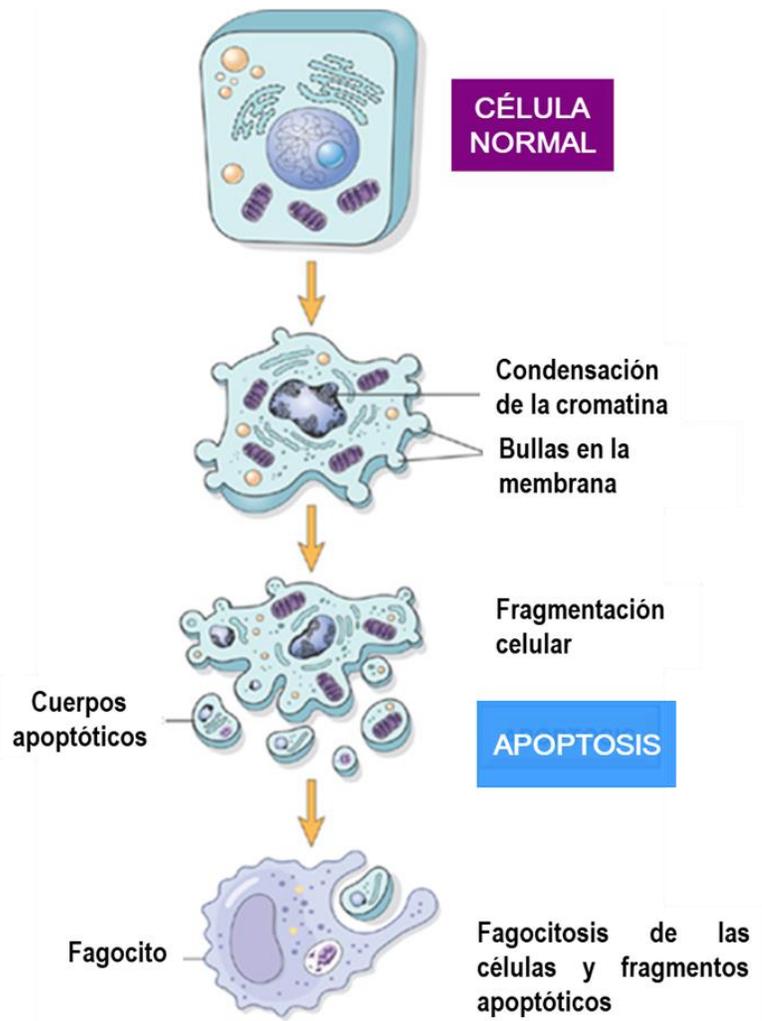


Figura 3. Proceso de muerte apoptótica. Tomado de Kumar *et al.*, (2010).

1.3.3. Vías de la apoptosis

1.3.3.1. Vía extrínseca

Las vías de señalización extrínseca que inician la apoptosis implican interacciones mediadas por receptores transmembrana. Éstos involucran receptores de muerte que son miembros de la superfamilia del gen receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (Elmore, 2007).

Los receptores de muerte más conocidos son el Fas y el TNFR1 (receptor TNF), son proteínas transmembrana con sus dominios receptores expuestos en la superficie de la célula (Cascales, 2003). La unión de un ligando de muerte a un

receptor de muerte resulta en la formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y el complejo completo de ligando-receptor-adaptador se conoce como DISC (complejo de señalización que induce muerte). El DISC, inicia el ensamblaje y activación de la pro-caspasa 8 (Sosa *et al.*, 2012); la caspasa 8 puede entonces activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003). La caspasa 8 al igual que la caspasa 9 inicia una cascada amplificadora de activación que conduce al desmantelamiento celular, a la formación de cuerpos apoptóticos y a la fagocitosis de la célula (Cascales, 2003).

La caspasa 8 puede activar a Bid (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) y ésta inducir la liberación del citocromo C y Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) de la mitocondria para formar el apoptosoma y activar también la vía intrínseca (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003).

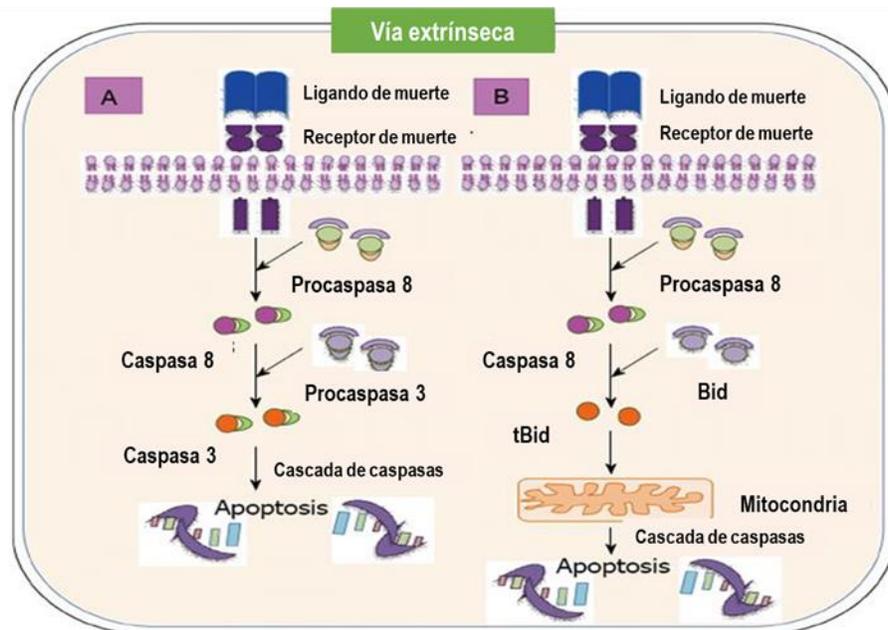


Figura 4. Vía extrínseca de la apoptosis. Tomada y modificada de Larrubia *et al.*, (2013).

1.3.3.2. Vía intrínseca

La vía intrínseca es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes, daño del ADN (Rojas *et al.*, 2009), estrés y otras señales que provocan la translocación a la mitocondria de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003). Esta familia agrupa a varias moléculas involucradas en la permeabilidad de la mitocondria, pudiéndose distinguir entre moléculas anti-apoptóticas (A1, bcl-2, bcl-w, bcl-xL, bfl-1, brag-1, mcl-1 y NR13) y pro-apoptóticas (bad, bak, bax, bcl-xs, bik, bid, bim y hrk (Pedrera *et al.*, 2010).

La vía intrínseca, requiere la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales tales como el citocromo y smac/diablo (Angosto, 2003). La liberación del citocromo C al citosol, se acompaña de pérdida del potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003). El citocromo liberado al citosol se une a Apaf-1, que en presencia de dATP, provoca que Apaf-1 oligomerice en un complejo heptamérico conocido como apoptosoma, la procaspasa 9 es reclutada entonces a este apoptosoma donde se activará por autoescisión proteolítica. Una vez activa se disocia del complejo y proteoliza a la procaspasa 3 dando lugar a su forma activa (Vázquez, 2013), mientras que smac/diablo se une y antagoniza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP) (Angosto, 2003).

La evasión de la apoptosis (muerte celular programada) es uno de los eventos cruciales que una célula desarrolla durante su proceso tumorigénico (Jave-Suárez *et al.*, 2015), las células afectadas no activan el proceso de apoptosis, porque sus alteraciones genéticas no lo permiten y escapan a los puntos de control que posee nuestro organismo suprimiendo las señales que permiten la muerte de las células mutadas, iniciando así una proliferación descontrolada y agresiva (Serrano, 2001).

INTRINSIC PATHWAY OF APOPTOSIS (Mitochondria Mediated Programmed Cell Death Pathway)

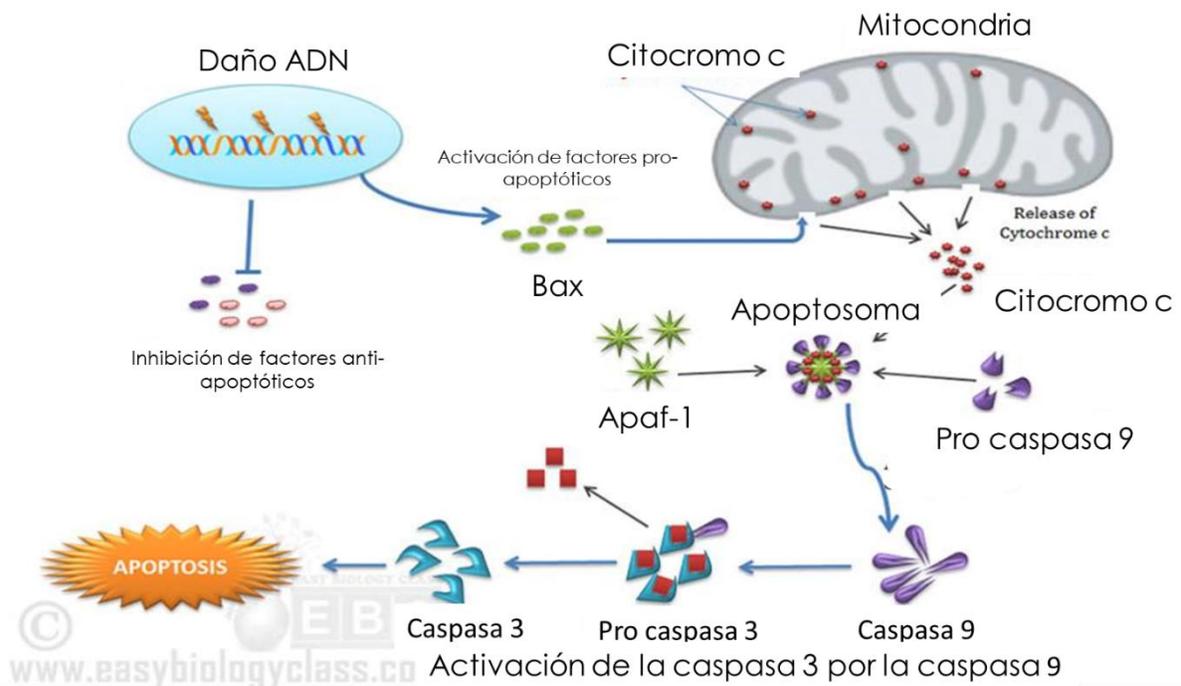


Figura 5. Vía intrínseca de la apoptosis. Disponible en

https://www.easybiologyclass.com/intrinsic-pathway-of-apoptosis-apoptosis-molecular-mechanism-part-1/?fbclid=IwAR3vuJy6yuMI_pb_hn0Y_Hrhu5loOGJYySWd2nWgKHU6citNj89PB4bMmw4

1.4. Cáncer:

El cáncer es una enfermedad en la que un grupo de células anormales crecen de forma incontrolable ignorando las reglas normales de la división celular (Hejmadi, 2010), caracterizado por una proliferación excesiva, que no guarda relación alguna con las demandas fisiológicas del órgano implicado, dando como resultado una masa anormal (tumor) (Granados *et al.*, 2006) el cual crece dañando tejidos vecinos, se nutre del organismo y altera su fisiología (Sánchez, 2013).

Existen cientos de formas distintas, siendo tres los principales subtipos: los sarcomas, que proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. Los carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales de los tejidos glandulares de la mama y de la próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. En el tercer subtipo se encuentran las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas (Goldman, 2009).

Hanahan y Weinberg han identificado seis fenotipos o sellos distintivos de cáncer: células con potencial proliferativo ilimitado, independencia ambiental para el crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis, invasión y metástasis a diferentes partes del cuerpo (Baskar *et al.*, 2012).

El cáncer ocurre por una variedad de aberraciones cromosómicas (Nojima, 1997) así como una serie de mutaciones sucesivas en los genes, de modo que estas mutaciones cambian las funciones celulares (Hassanpour y Dehghani, 2017). En el cáncer, hay alteraciones esenciales en el control genético de la división celular, lo que resulta en una proliferación celular descontrolada. Las mutaciones se producen principalmente en dos clases de genes: los protooncogenes y genes supresores de tumores (Tume-Farfán, 2014).

Los protooncogenes son genes incluidos en el genoma humano que regulan el crecimiento y la diferenciación celular. Sus proteínas se expresan en diferentes momentos del ciclo y son imprescindibles para su regulación (Vich *et al.*, 2014). La ocurrencia de mutaciones en éstos puede resultar en variantes alteradas u oncogenes que codifican para proteínas que desencadenan señales positivas de proliferación que mantienen a la célula estimulada para pasar de una mitosis a otra (Hernández y Ríos, 1999).

Los genes supresores de tumores son aquellos que inhiben la proliferación celular por lo que su mutación puede dar lugar a procesos tumorales. El cáncer se produce por la acumulación de alteraciones en estos genes (Reverter, 2016). Las funciones de control de los genes supresores de tumores que suprimen el desarrollo del cáncer incluyen el desencadenamiento de respuestas celulares al daño, siendo la más importante apoptosis o el arresto del ciclo celular que puede ser transitorio o permanente cuando resulta en senescencia celular (Daya-Grosjean y Sarasin, 2005). Para que un gen supresor de tumor promueva el desarrollo tumoral, ambas copias del gen deben ser inactivadas porque una copia es suficiente para controlar la proliferación celular. Estas mutaciones actúan recesivamente (Imran *et al.*, 2017).

Los oncogenes se activan a través de dos mecanismos: ya sea por infección de células por virus tumorales o por mutación de protooncogenes celulares (que normalmente son normales) a oncogenes (Imran *et al.*, 2017). Los virus, las bacterias y los rayos de radiación son otros factores de carcinogénesis, que comprenden alrededor del 7% de todos los cánceres (Hassanpour y Dehghani, 2017).

Existen agentes que incrementan la frecuencia de las mutaciones en los organismos expuestos. Estos agentes se denominan carcinógenos o cancerígenos y pueden ser factores físicos, químicos o biológicos (Alberts *et al.*, 2010).

Factores de riesgo:

Una consecuencia potencial de los daños son las alteraciones permanentes en la estructura del ADN que pueden generar mutaciones, transformación carcinogénica y muerte celular. Los daños en el ADN pueden generar cambios en la expresión de genes, crecimiento celular e incluso tumores (Tafurt y Marín, 2014).

- **Carcinógenos físicos:** Son radiaciones que alteran la estructura y la secuencia del ADN. Ejemplos de ello son: la radiación ultravioleta, la radiación ionizante, las partículas alfa, beta y gamma, el choque térmico o las radiaciones electromagnéticas (Salazar, 2013).
- **Carcinógenos químicos:** Los compuestos químicos tienen un papel en la formación de mutaciones genéticas y células cancerosas (Hassanpour y Dehghani, 2017), tienen la capacidad de alterar la estructura del ADN al reaccionar directamente con ella o intercalarse entre los nucleótidos. Ejemplos: los colorantes de acridina, la formalina, el ácido nitroso, agentes

alquilantes, el benzopireno, el ácido bórico, el LSD, entre otros (Salazar, 2013).

- **Carcinógenos biológicos:** Un poco más del 20% de la incidencia mundial de cáncer está ligada a agentes infecciosos como virus, bacterias y parásitos. Es bien sabido que algunos virus pueden inducir cáncer debido a que cargan oncogenes en sus genomas. Además, es necesario tener en cuenta que cualquier agente infeccioso que provoque inflamación también puede iniciar cáncer, debido a que la presencia de una respuesta inflamatoria prolongada va acompañada de un grave estrés celular y consecuentemente puede llevar a la acumulación de daño al ADN, mutaciones y eventualmente promover el cáncer (Yuzhalin y Kutikhin, 2012).

1.5. Cáncer cervicouterino (CaCu):

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha declarado que el cáncer cervicouterino es una enfermedad en la que se presentan cambios en las células que cubren las paredes del cuello uterino (OPS, 2015).

El cuello uterino es la porción inferior del útero, tiene dos porciones bien delimitadas: la que protruye dentro de la vagina: “el exocérvix”, y el canal endocervical. El exocérvix está tapizado por un epitelio escamoso no queratinizado similar al epitelio vaginal. El canal endocervical o endocérvix está formado por una hilera de células cilíndricas mucíparas que revisten la superficie y las estructuras glandulares (Cardinal, 2008). Estos dos tipos de células se encuentran en un lugar llamado zona de transformación (ACS, 2016).

El 90% de los casos de cáncer cervicouterino surgen en el epitelio escamoso metaplásico de la zona de transformación; el otro 10 % son adenocarcinomas cervicouterinos derivados del epitelio cilíndrico del endocérvix (OMS, 2007). La mayoría de los otros cánceres cervicales son adenocarcinomas. Los adenocarcinomas son cánceres que se originan de células glandulares. El adenocarcinoma cervical se origina en las células de las glándulas productoras de mucosidad del endocérvix. En los últimos 20 a 30 años, se ha notado que los adenocarcinomas cervicales parecen ser cada vez más comunes. Con menor frecuencia, el cáncer de cuello uterino tiene características tanto de los carcinomas de células escamosas como de los adenocarcinomas. Estos tumores se llaman carcinomas adenoescamosos o carcinomas mixtos (ACS, 2016).

La historia natural de esta enfermedad implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales preinvasoras (neoplasias intraepiteliales-NIE-I, II y III o carcinoma *in*

situ -CIS-, de acuerdo a la proporción del grosor del epitelio cervical comprometido (Serman, 2002).

El cáncer cervicouterino ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad en mujeres de 15-64 años a nivel mundial, mientras que en México ocupa el tercer lugar en incidencia y el segundo lugar en mortalidad en mujeres de 15-64 años (Globocan, 2018).

De acuerdo con datos de INEGI (2018) en México de los 4 052 casos registrados, para el grupo de 65 y más años se registraron 1 442 decesos (35.6%), seguido del grupo de 45 a 54 años con 898 muertes (22.2%) y el de 55 a 64 años con 892 decesos (22.0%).

Dentro de los factores de riesgo para la aparición del cáncer cervicouterino se citan: la edad de la primera relación sexual, la multiparidad, la promiscuidad sexual, la infección por el virus del papiloma humano (HPV) y el tabaquismo (Martínez *et al.*, 2010).

Factores de riesgo para desarrollar CaCu:

- Inicio de relaciones sexuales tempranas: Se ha especulado que el riesgo incrementado de VPH es debido a una predisposición biológica del cérvix inmaduro durante la adolescencia que puede ser más susceptible a infecciones persistentes de VPH y por lo tanto tener un mayor riesgo de desarrollo del cáncer (Louie *et al.*, 2009).
- Multiparidad: La multiparidad ha estado ligada a la presencia de lesiones premalignas y malignas de cuello de útero muchas veces asociada a los desgarros producidos por los partos, los cuales en el proceso de reepitelización producen atipias celulares (Salvent *et al.*, 2012).
- Múltiples parejas sexuales: en esta etapa el proceso metaplásico del cérvix uterino es más activo, presentarán una mayor probabilidad de introducir el virus VPH en sus células metaplásicas y activar la transformación de las células en neoplásicas (Fernández *et al.*, 2014).
- Tabaquismo: El hábito de fumar también incrementa el riesgo de cáncer cervicouterino, pues la nicotina, una vez en el torrente sanguíneo, al llegar al cuello uterino se transforma en un oncogén capaz de inducir cambios mitogénicos en las células cervicales. Algunos estudios sugieren que las mujeres fumadoras tienen dos veces más riesgo que las no fumadoras, por

la acción de los elementos carcinogénicos del humo del tabaco (Espín *et al.*, 2012).

- Infección por virus del papiloma humano: El VPH se considera el agente causal más importante para el carcinoma cervicouterino (Alonso *et al.*, 2005).

El virus papiloma humano (VPH) corresponde a un virus ADN, que infecta piel y mucosas, es miembro de la familia papovavirus. Produce una amplia variedad de lesiones, de especial importancia neoplasias intraepiteliales del tracto genital inferior y cáncer (Howley y Lowy, 2001).

El VPH es un virus altamente epiteliotrópico y posee una gran especificidad de especie. Hasta el momento se han identificado más de 150 tipos de VPH, de ellos 40 infectan al epitelio anogenital y 12 están reconocidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como cancerígenos. Atendiendo a su capacidad transformante y a su asociación con el desarrollo del cáncer cervicouterino, los mismos son clasificados como de alto (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 y 59) y de bajo (6 y 11) riesgo de desarrollar cáncer (Domínguez *et al.*, 2018). De particular importancia son aquellos clasificados como de alto riesgo oncogénico (15 tipos), capaces de llevar al desarrollo de cáncer. Las cepas de alto riesgo incluyen HPV-16 y HPV-18 (Rivera *et al.*, 2002). Este virus de doble cadena de ADN se ha vinculado a diferentes alteraciones moleculares con la carcinogénesis cervical como: alteraciones en el receptor del factor del crecimiento epidérmico (RFCE), la sobreexpresión del HER-2-neu, la mutación del H-ras y K-ras y la amplificación/sobreexpresión del c-myc (Sánchez *et al.*, 2005).

Su genoma se puede dividir en tres zonas: La región larga de control (RLC), la región temprana (E), y la región tardía (L). La región RLC corresponde al 15% del genoma viral y contiene los promotores que inician la replicación y controlan la transcripción (Torres, 2011). Se conocen seis genes tempranos: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (aunque se considera que E4 es en realidad un gen tardío), y dos tardíos: L1 y L2. Los genes tempranos codifican proteínas involucradas en la replicación y regulación viral, así como en su capacidad carcinogénica. Por otro lado, los genes tardíos codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral (Lupiani y Fraga, 2008).

Las diferencias genóticas entre los tipos de papilomavirus vienen marcadas por los diferentes aminoácidos que constituyen la proteína L1. Son las características de esta proteína las que hacen que el virus pueda ser tratado como de "bajo o alto riesgo" y por ello su genotipo específico es el que se usa para poder clasificar a estos virus (Serena-Gómez *et al.*, 2011). Aunque todos esos virus comparten una organización genética similar, cada tipo puede ser identificado por sus diferencias específicas en las secuencias de ADN (Sarduy, 2009).

El ciclo de los VPH está estrechamente ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas. El VPH inicia su ciclo productivo infectando a las células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes (Sanabria, 2009). Al igual que con otros virus, parece que la infección por VPH requiere la presencia de receptores secundarios para una infección eficiente, y se ha sugerido que este papel puede ser desempeñado por el sitio α -6 integrina (Doorbar, 2006). Una vez ocurrida la infección el virus se establece dentro del núcleo de las células basales (Sanabria, 2009).

El ciclo de vida del VPH puede dividirse en dos etapas: una productiva y otra no productiva. En la etapa no productiva, el genoma vírico permanece como un elemento extracromosomal en forma de episoma (elemento genético autorreplicativo). Al ocurrir la infección por VPH, el genoma viral es sintetizado en las células basales a partir de copias episomales, afectando a la progenie, en donde una célula perpetuará la infección, y aquella destinada al cambio de estrato epitelial, presentará la expresión de genes tardíos, dando inicio a la fase vegetativa del ciclo de vida del VPH. Finalmente, el ADN viral es empaquetado en la cápside y los viriones son liberados para reiniciar un nuevo ciclo de vida (Grillo-Ardila *et al.*, 2008). El virus necesita la maquinaria replicativa de la célula para la síntesis del ADN vírico, la cual es poco eficiente en las células diferenciadas. El virus estimula la progresión de la fase celular G1-S en una célula diferenciada y de esta forma produce un ambiente adecuado para la replicación del ADN. En la etapa productiva, el genoma vírico se amplifica de modo que aumenta el número de copias presentes en la célula y se expresan los genes tardíos que codifican las proteínas de la cápside (Cruz *et al.*, 2004).

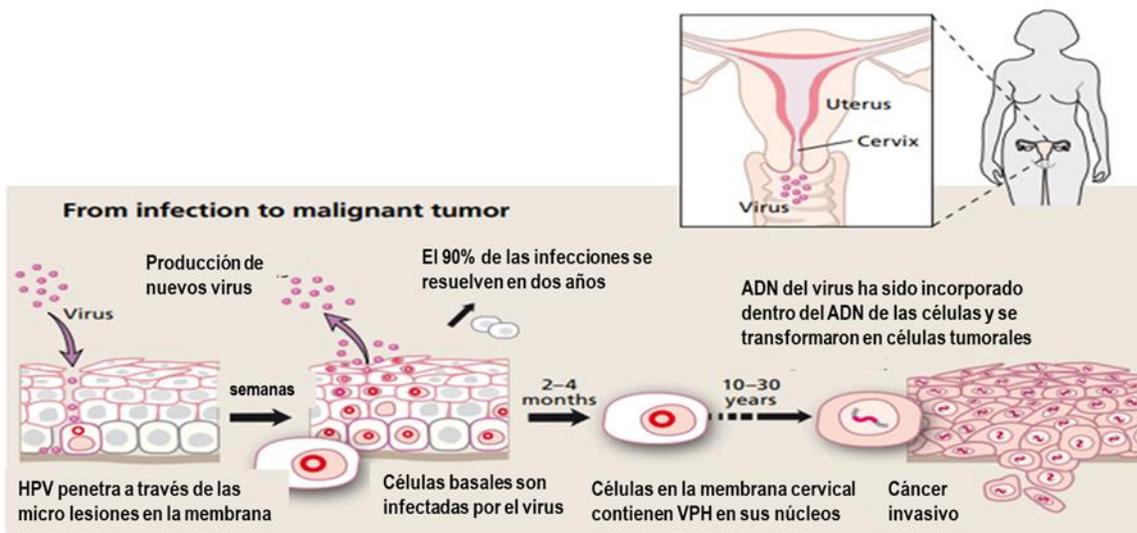


Figura 6. Infección por VPH. Tomada de Jonsson (2008).

1.6. Tratamientos

1.6.1. Tratamiento quirúrgico:

La cirugía consiste en quitar diversas cantidades de tejido del área con cáncer y sus alrededores. Esta es una opción para las mujeres en etapas iniciales de cáncer cervicouterino (OPS, 2015).

Existen tres tipos de cirugía para el cáncer invasivo:

- La biopsia de cono: quitar un área del cérvix en forma de cono.
- La histerectomía simple: quitar el útero, removiendo menos tejido.
- La histerectomía radical: quitar tejido en los bordes del útero y, a menudo, nódulos linfáticos en la pelvis y los alrededores. Los tubos y ovarios usualmente no se quitan a menos que parezcan anormales (OPS, 2015).

Con la realización de la cirugía se obtienen muchos factores pronósticos que obtiene el tamaño del tumor primario, profundidad de la invasión estromal, presencia o ausencia de márgenes del tumor cerca de la vagina o parametrios y estado ganglionar (Secretaría de Salud, 2010).

1.6.2. Tratamiento no farmacológico:

La radiación es un agente físico que se utiliza para destruir las células cancerosas. La radiación utilizada se llama radiación ionizante porque forma iones (partículas cargadas eléctricamente) y deposita energía en las células de los tejidos que atraviesa. Esta energía depositada puede matar las células cancerosas o causar cambios genéticos que resultan en la muerte de las células cancerosas (Baskar *et al.*, 2012).

La radioterapia no causa dolor, pero sí puede causar efectos secundarios que se pueden tratar o controlar. La mayoría de los efectos secundarios desaparecen cuando termina el tratamiento (OPS, 2015).

1.6.3. Tratamiento no farmacológico:

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. Cuando el cáncer se ha extendido a otros órganos, la quimioterapia puede usarse sola. La mayoría de los fármacos para el cáncer cervicouterino se inyectan en la vena. Algunos fármacos pueden tomarse oralmente (OPS, 2015).

Los agentes que dañan el ADN son los quimioterapéuticos más ampliamente usados y eficaces para el tratamiento del cáncer (Ricci y Zong, 2006). Algunos agentes quimioterapéuticos pueden causar necrosis tisular, además de ser citotóxicos y afectar a las células poseedoras de una tasa de metabolismo alta, como las células cancerosas; sin embargo, otros tejidos que presentan esta característica se ven afectados, como es el caso de las células hematopoyéticas (Jiménez y Garro, 2003). Sin embargo, la ineficiencia en estados avanzados de la enfermedad, su alta toxicidad y su baja selectividad ha generado la búsqueda de nuevos compuestos que sean menos citotóxicos, selectivos y de bajo costo. Al respecto, el estudio de la actividad antitumoral del organoestaño (IV) como posible compuesto antitumoral, con ligandos biológicamente activos ha atraído particular interés hacia el diseño de agentes potencialmente antitumorales (Hadi y Rilyanti, 2010).

1.7. Organometálicos:

Los compuestos organometálicos se definen como complejos metálicos que contienen al menos un enlace covalente metal-carbono. Los organometálicos tienen una gran variedad estructural, una estereoquímica más diversa que la de los compuestos orgánicos y permite el diseño racional de ligandos para controlar su actividad. Además, se obtienen compuestos estables, sin carga, relativamente lipofílicos (Gasser *et al.*, 2010); sin embargo, algunos se descomponen fácilmente por acción de los organismos vivos, mientras que otros no pueden ser biodegradados (Yarto *et al.*, 2004).

Algunos de los compuestos organometálicos se utilizan en la industria y otros en la agricultura (Yarto *et al.*, 2004). Los compuestos organometálicos proveen una plataforma versátil para el diseño de fármacos. Los enlaces carbono-metal ejercen importantes efectos electrónicos y estéricos, que pueden ser usados para controlar su actividad biológica (Pizarro *et al.*, 2010).

1.8. Compuestos de Organoestaño (COE):

En el caso de complejos organoestaño existe al menos un enlace Sn-C y presentan una fórmula general $[SnR_nX_{4-n}]$, donde $n = 1-4$, R es un ligando alquilo o arilo y X puede ser un halógeno, un hidrógeno, un metal o un grupo unido al estaño a través de un átomo de oxígeno, azufre, nitrógeno, halógeno, etc. (Ceballos, 2014). Las estructuras de todos los compuestos activos organoestánicos antiproliferativos están caracterizadas por (I) la disponibilidad de la coordinación de posiciones en el estaño y (II) en la aparición de uniones ligando-estaño relativamente estables (Hadjikakou y Hadjiliadis, 2009).

Se han desarrollado una gran cantidad de aplicaciones industriales y biológicas de los compuestos organoestaño, como por ejemplo en la elaboración de fungicidas o pesticidas y también en la industria farmacéutica como agentes antitumorales (Ceballos, 2014), sin embargo, fue hasta la década de 1980 cuando se empezaron a estudiar en detalle las propiedades antiproliferativas de estos compuestos (Crowe *et al.*, 1980). La gran posibilidad de variación de los fragmentos orgánicos y ligandos ligados al metal ha resultado en distintos compuestos diorganoestánicos y triorganoestánicos (IV) con alta actividad antiproliferativa *in vitro* contra una variedad de cánceres sólidos y hematológicos (Alama *et al.*, 2009).

Esta selectividad en la actividad antitumoral en contra de diferentes células cancerígenas puede ser atribuida a las estructuras diferentes y los sustituyentes diferentes en el ligando de esos complejos (Amir *et al.*, 2014), depende del número, labilidad y tipo de ligando salientes enlazados al átomo de estaño, así como del número y tipo de ligando alquilo o arilo que tienen enlazados (Arakawa, 2000).

Se ha observado que la actividad que presentan los compuestos de estaño (IV) en los tratamientos contra el cáncer es debida a su capacidad para inducir apoptosis en las células cancerosas (Tabassum y Pettinari, 2006). Han sido implicados una gran cantidad de procesos a nivel celular para intentar explicar la alta actividad citotóxica de estos derivados de estaño, procesos como por ejemplo la inhibición en la síntesis de ADN y otras macromoléculas, la interacción directa del derivado organoestaño con la membrana celular o el aumento de la concentración intracelular de iones Ca^{2+} (Ceballos, 2014), se ha sugerido que estos compuestos tienen efectos antiproliferativos a través de la unión a grupos tiol de las proteínas por lo tanto difieren del comportamiento de varios complejos citotóxicos de otros metales (Jaouen y Metzler-Nolte, 2010).

La inhibición de la síntesis macromolecular, el metabolismo de la energía mitocondrial y la reducción de la síntesis de ADN, así como la directa interacción con la membrana celular (incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico), han sido implicados en la citotoxicidad organoestánica. Además, el aumento del daño oxidativo y el daño al ADN ha sido detectado *in vivo*. El daño oxidativo y el incremento de la concentración de los iones de calcio intracelular parecen ser los mayores factores que contribuyen a la apoptosis inducida por el triorganoestaño en muchas líneas celulares (Alama *et al.*, 2009). En modelos *in vitro* se ha reportado que los compuestos organoestánicos pueden causar un ataque directo al ADN a través de la neutralización de carga de los fosfodiésteres de ADN y que puede causar daño indirecto por medio de otros efectores celulares como la perturbación de la homeostasis del Ca^{2+} (Tiano *et al.*, 2001). En algunos COE que se han investigado, la porción activa se une a los grupos fosfato en el esqueleto del ADN, además se altera el metabolismo intracelular de fosfolípidos en el aparato de Golgi

y el retículo endoplásmico (Gerasimchuk *et al.*, 2007). En el caso concreto de compuestos organoestaño, el modo de acción parece estar más relacionado con enlaces de tipo covalente entre el fragmento organoestaño y los grupos tiol de las proteínas (Khan *et al.*, 2006).

Se ha encontrado que los compuestos organoestánicos inhiben de manera indirecta o directa a través de la regulación de genes la oxidasa de función mixta (MFO) la cual es importante para la biosíntesis de esteroides con un complejo proceso entre la mitocondria y el retículo endoplásmico liso, también se ha encontrado que los compuestos organoestánicos inhiben el proteosoma (Pagliarani *et al.*, 2012).

En los COE estudiados no se ha observado la generación de fenómenos de resistencia, mostrando una ventaja con el cisplatino y sus análogos (Appel, 2004). Los organoestaños muestran una actividad antiproliferativa *in vitro*, en algunos casos, es más alta que la actividad correspondiente de cisplatino o de otros fármacos usados en el tratamiento clínico de quimioterapia de cáncer (Hadjikakou y Hadjiliadis, 2009). Los complejos organoestaño (IV) muestran propiedades muy atractivas en comparación con los complejos de platino ya que presentan menor toxicidad general. Pero lo más importante es que los complejos de estaño no desarrollan la letal resistencia de las células malignas, como sí ocurre en tratamientos con compuestos de platino (Gómez-Ruiz, 2010).

Todas estas ventajas en comparación con el platino han impulsado el desarrollo de nuevos derivados organoestaño (IV) con una amplia gama de ligandos como tiolatos, carboxilatos, amidas y otros, con el fin de estudiar las posibles relaciones estructura/propiedades citotóxicas, así como estructura/actividad (Gómez-Ruiz, 2010). Por ello, en este trabajo se evaluará la actividad antiproliferativa, citotóxica (necrótica) y apoptótica del organoestaño Tributilestanil4-oxo-4(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) amino) butanoato representado en la siguiente molécula:

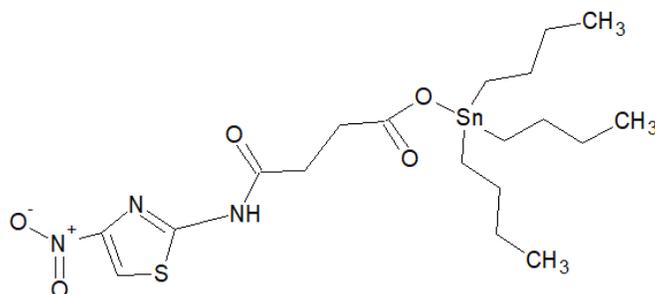


Figura 7. Tributilestanil4-oxo-4(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) amino) butanoato

2. Planteamiento del problema

Los tratamientos para el cáncer (radioterapia y quimioterapia), resultan ser poco selectivos, afectando a las células normales. El mecanismo de acción de los quimioterapéuticos está basado en la actividad necrótica de estos compuestos, la cual es la principal responsable de los efectos secundarios que generan estos fármacos. Por ello existe la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer cervicouterino. En ese sentido, los compuestos organometálicos como los organoestaños actualmente son investigados como posibles candidatos a ser utilizados en la terapia contra el cáncer debido a sus enlaces carbono-metal, el estaño en estudios preliminares sugiere que induce muerte por apoptosis y presenta menor toxicidad general; es por ello que en este trabajo se pretende estudiar el efecto antiproliferativo y necrótico del compuesto Tributilestanil4-oxo-4(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) amino) butanoato (TBSn3) en las líneas de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

3. Justificación

El cáncer cervicouterino es considerado un problema de salud pública. En México, desde el año 2006, es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. En el año 2015, se registraron 3,071 casos nuevos de tumores malignos del cuello uterino, con una tasa de incidencia de 6.01 casos por cada 100,000 habitantes femeninas mayores de 10 años.

Actualmente los tratamientos contra el cáncer como la radioterapia y la quimioterapia resultan ineficientes en estadios avanzados de la enfermedad además de ser poco selectivos, afectando a las células normales deteriorando la calidad de vida del paciente, en consecuencia es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra esta enfermedad, y en ese sentido, se ha encontrado que los compuestos organometálicos como el compuesto Tributilestanil4-oxo-4(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) amino) butanoato (TBSn3) pueden tener una importante actividad antiproliferativa en diferentes tipos de cáncer de modo que resulta fundamental incrementar la investigación sobre este tipo de compuestos con la intención de encontrar nuevos fármacos para combatir esta enfermedad.

4. Hipótesis

Se ha reportado que algunos compuestos organometálicos presentan actividad antiproliferativa y citotóxica en células tumorales, por ello se espera que el compuesto organometálico modificado Tributilestanil 4-oxo-4(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) amino) butanoato (TBSn3) presente actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en células tumorales de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo.

5. Objetivos

5.1. General:

Evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del compuesto organometálico Tributilestanil4-oxo-4(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) amino) butanoato (TBSn3) en cultivos de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo provenientes de cáncer cervicouterino, así como en cultivos de células linfocíticas humanas.

5.2. Particulares:

- Determinar la actividad antiproliferativa del TBSn3 en cultivos de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, expresada como la concentración necesaria del compuesto para inducir un decremento del 50% en la densidad celular, mediante la técnica de tinción por Cristal Violeta.
- Determinar la actividad necrótica del TBSn3 en cultivos de células de CaCu mediante la cuantificación de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de las líneas celulares tratadas con el compuesto.
- Evaluar el efecto apoptótico del compuesto TBSn3 en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo a través de la observación de características morfológicas propias de células apoptóticas por contraste de fases y la tinción nuclear con el fluorocromo DAPI, así como la inmunodetección de la caspasa-3 activa observada por microscopía de fluorescencia y cuantificada por citometría de flujo.
- Evaluar la actividad antiproliferativa del compuesto TBSn3 en linfocitos de sangre periférica humana, mediante el marcaje con carboxifluoresceína (CFSE) cuantificada por citometría de flujo.
- Determinar si el compuesto TBSn3 induce muerte necrótica en linfocitos humanos mediante la detección de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares.

6. Procedimiento experimental

6.1. Cultivo celular de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo

Las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Las tres líneas se cultivaron en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), con 10 mL de RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% con suero neonato de ternera (Gibco, USA) previamente desactivado a 57°C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a una temperatura de 37°C y con 5% de CO₂.

HeLa, línea celular establecida de un adenocarcinoma proveniente del cérvix, estas células están infectadas con VPH 18.

CaSki, de acuerdo con ATCC la línea celular fue establecida de células derivadas de metástasis en el intestino delgado, provenientes de carcinoma epidermoide de cérvix, estas células tienen integrado el genoma del VPH 16.

ViBo, esta línea celular es un carcinoma de células epidermoides provenientes del cérvix, no metastásicas derivadas del cérvix, es VPH negativo.

6.2. Evaluación de la proliferación celular mediante la técnica de incorporación de cristal violeta.

Se cultivaron células de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo en placas de 96 pozos (Corning, USA) a una densidad de 4,000 células por pozo en 100 µl de RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% con suero de neonato de ternera (Gibco, USA), durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se retiró el medio y se agregó el compuesto TBSn3 en diferentes concentraciones. En las condiciones de control y blanco únicamente se cambió el medio por medio fresco. En el vehículo se agregó DMSO (Sigma-Aldrich, USA) diluido en medio de cultivo. A las veinticuatro horas se evaluó el efecto antiproliferativo del compuesto en las células mediante la técnica de cristal violeta. Esta técnica consistió en retirar el medio de las células y fijarlas en glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 1.1% durante 20 minutos, posterior a esto se retiró el glutaraldehído y las células se lavaron con agua desionizada. La placa se dejó secar al aire para agregar colorante cristal violeta al 0.1% en ácido fórmico por 20 minutos. Se retiró el cristal violeta y se eliminó el exceso de colorante con lavados de agua desionizada y se dejó secar al aire. Finalmente, para solubilizar el colorante se agregó ácido acético (Sigma-Aldrich, USA) al 10% y se mantuvo en agitación durante 20 minutos. Para concluir el procedimiento se leyó la absorbancia en un lector de placas (TECAN, USA) a 590 nm. Se realizó una regresión lineal para obtener el valor de IC₅₀.

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

Se cultivaron células de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo en una placa de 96 pozos a una densidad de 4,000 células por pozo con RPMI-1640 al 5% con suero de neonato durante 24 horas. Posteriormente se retiró el medio y se adicionó el compuesto TBSn3 en las concentraciones de IC₅₀ correspondientes para cada línea celular con RPMI-1640 sin rojo. En el control, el control positivo (Tritón x-100), así como el basal, se retiró el medio sustituyéndolo por RPMI-1640 fresco sin rojo.

Para medir la actividad de la enzima LDH en el sobrenadante se colocó Tritón x-100 al control positivo durante una hora. Posteriormente se recuperó el medio de cada pozo en una placa de 96 pozos de fondo cónico, tomando en cuenta las siguientes condiciones; blanco, control, control con vehículo (DMSO, Sigma-Aldrich, USA), concentraciones de IC₅₀ respectivas para cada línea, así como el control positivo, una vez recuperados los medios la placa se centrifugó durante 5 minutos a 2000 revoluciones por minuto. La actividad de LDH se determinó con el kit Cyto Tox 96 (Promega, USA), para lo cual se agregó 40 µl de mezcla de reacción a 40µl de sobrenadante de cada condición experimental. Se incubó durante 25 minutos en ausencia de luz y posteriormente se evaluó la lectura en un lector de placas (TECAN, USA) a 490 nm. Los datos de analizaron tomando como referencia el control positivo como un 100%.

6.4. Evaluación de la morfología celular apoptótica por microscopía de fluorescencia con tinción de DAPI.

Se cultivaron células sobre cubreobjetos limpios y estériles en una placa de 24 pozos (Corning, USA) a una densidad de 20,000 células por pozo en un volumen de 500µl de RPMI-1640 suplementado con suero de neonato al 5% durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se estimularon las células con las siguientes condiciones: Control (cambio de medio por medio fresco), Vehículo (DMSO, Sigma-Aldrich, USA), control positivo de muerte apoptótica con camptotecina (Sigma-Aldrich, USA) y las concentraciones correspondientes a las IC₅₀ de cada línea celular. Las células adheridas a cubreobjetos fueron fijadas con paraformaldehído al 2% durante 20 minutos, transcurrido el tiempo las células se lavaron 3 veces con PBS filtrado. Las células, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS a 4°C durante 5 minutos, posteriormente las células se lavaron nuevamente 3 veces con PBS filtrado durante 3 minutos cada lavado. Las células se incubaron con 10µl de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, USA) durante un minuto a temperatura ambiente, posteriormente las muestras se lavaron con PBS filtrado 3 veces con una duración de 3 minutos por lavado, las células fueron preparadas con medio de montaje para fluorescencia VECTASHIELD Mounting Medio (Vector

Laboratories, USA). Las muestras se sellaron con resina de acrílica transparente, finalmente se observaron por microscopía de epifluorescencia (Nikon, JAP).

6.5. Inmunodetección de caspasa-3 activa mediante microscopía de fluorescencia.

Se cultivaron células en una placa de 96 pozos (Corning, USA) a una densidad de 4,000 células por pozo en un volumen de 100µl de RPMI-1640 suplementado con suero de neonato al 5% durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se estimularon las células con las siguientes condiciones: Control (cambio de medio por medio fresco), Vehículo (DMSO, Sigma-Aldrich, USA), control positivo de muerte apoptótica con camptotecina (Sigma-Aldrich, USA) y las concentraciones correspondientes a las IC₅₀ de cada línea celular. Las células adheridas se fijaron con glutaraldehído al 2.5% con paraformaldehído al 4% en PBS durante dos horas, transcurrido el tiempo las células se lavaron 3 veces con PBS filtrado. Las células, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS a 4°C durante 5 minutos, posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS filtrado durante 3 minutos cada lavado. Una vez permeadas las células, se agregó 15µl de anticuerpo primario por pozo, anticaspasa-3 activa (anticuerpo producido en conejo, SIGMA) en relación 1:500 en PBS y se dejó en reposo durante 24 horas a 4°C. El anticuerpo primario se lavó con PBS filtrado tres veces y se agregó 15µl de anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FIT-C (anticuerpo de ratón, anti conejo, anti caspasa-3 activa) con relación 1:1000 en PBS a cada pozo. La placa se protegió de la luz durante dos horas y posteriormente se lavó el anticuerpo con PBS filtrado 3 veces. La placa fue observada por microscopía de epifluorescencia (Nikon, JAP).

6.6. Inmunodetección de caspasa-3 activa por citometría de flujo.

Las células HeLa, CaSki y ViBo fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 20,000 células por pozo con un volumen de 500µl de RPMI-1640 suplementado con suero de neonato al 5% durante 24 horas. Posterior a las 24 horas se estimularon las células de acuerdo a las siguientes condiciones: Control (cambio de medio por medio fresco), Vehículo (DMSO, Sigma-Aldrich, USA), control positivo de muerte apoptótica con camptotecina (Sigma-Aldrich, USA) y las concentraciones correspondientes a las IC₅₀ de cada línea celular. Posterior a la estimulación los cultivos se dejaron incubar por 24 horas.

Trascurridas las 24 horas se recuperó el medio de los cultivos y se despegaron las células con verseno o tripsina de las diferentes condiciones pasándolas a tubos para citometría, a continuación se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y las células se fijaron con 500µl metanol al 50% en PBS filtrado durante 60 minutos a 4°C, transcurrido el tiempo las células fueron lavadas tres veces por centrifugación a 1800 rpm durante 5 minutos cada lavado, terminados los lavados se agregó 50µl de anticuerpo primario, anticaspasa-3 activa (anticuerpo

producido en conejo, SIGMA) en una relación 1:1000 en PBS filtrado y se dejó con el anticuerpo durante 24 horas a una temperatura de 4°C. Posterior a las 24 horas las muestras se lavaron tres veces con PBS filtrado, se agregó 50µl de anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FIT-C (anticuerpo de ratón, anti conejo, anti caspasa-3 activa) en una relación de 1:500 de PBS. Durante 2 horas las muestras se mantuvieron protegidas de la luz a una temperatura de 37°C. Transcurrido el tiempo las muestras se lavaron tres veces con PBS filtrado. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo (BD FACAS Aria II, USA).

6.7. Evaluación del efecto antiproliferativo en linfocitos de sangre periférica.

Los linfocitos se obtuvieron de 20 mL de sangre periférica de un donador aparentemente sano, tomando la muestra en tubos vacutainer con EDTA (BD Franklin Lakes N.J., USA), posteriormente se agregó 5 mL de sangre a tubos cónicos de vidrio de 15 mL (Pirex, USA) los cuales contenían previamente 5 mL de hitopaque (Sigma-Aldrich, USA).

A continuación, los linfocitos se marcaron agregando 50µl de carboxifluoresceína (2µl de carboxifluoresceína/ 1mL de RPMI-1640 al 20%de SFB) durante 15 minutos protegidos de la luz. Se realizaron dos lavados agregando 5mL de medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de SFB, la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm y se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo RPMI-1640 al 20% de SFB. Los linfocitos se activaron con fitohemaglutinina (20µl fitohemaglutinina/ 1mL RPMI-1640) y se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL (Corning, USA) a una densidad de 1×10^6 células/mL de RPMI-1640 al 20% de SFB y fitohemaglutinina.

Los linfocitos se cultivaron considerando los siguientes tratamientos: control sin activar (con CSFE y sin PHA), control activado (con CSFE y con PHA), control sin marca y activado (Sin CSFE y con PHA), control sin activar y sin marca (Sin CSFE y sin PHA). Las células contenidas en cada uno de los tubos eppendorf se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad de 200,000 células/pozo en 200µl de RPMI-1640 al 20% de SFB. Se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ a una atmósfera húmeda por 72 horas.

El cultivo se estimuló considerando las siguientes condiciones: control sin activar (con CSFE y sin PHA), control activado (con CSFE y con PHA), control sin marca y activado (Sin CSFE y con PHA), control sin activar y sin marca (Sin CSFE y sin PHA), vehículo (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) e IC₅₀ correspondientes a cada línea tumoral del compuesto TBSn3.

Transcurridas las 24 horas se colectaron los linfocitos en tubos de citometría (un tubo por condición) y se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó 500µl de verseno, se realizaron dos lavados, y el botón celular se resuspendió en 500µl de PBS filtrado. Finalmente, las muestras se

analizaron con el citómetro de flujo (BD FACAS Aria II, USA) y los datos obtenidos fueron procesados en el programa Flowing Software 2.5.1.

6.8. Determinación de citotoxicidad en linfocitos humanos mediante la evaluación de LDH.

Transcurrido el tiempo de incubación con los estímulos, el control (células marcadas y activadas con medio de cultivo RPMI-1640 con SFB al 20%) se lisaron agregando tritón X-100 al 2% durante una hora. Posterior al tiempo se recuperó 100 µl de cada condición en una placa de fondo cónico, se centrifugó la placa a 1500 rpm durante 5 minutos, Para evaluar el % de LDH presente en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos, se colectó 40µl/pozo del sobrenadante y se transfirió a una placa nueva de 96 pozos y se adicionó 40µl/pozo de la mezcla de reacción del Kit Cyto Tox 96® Non-Radiactive Cytotoxicity Assay (Promega, Corporation, USA) y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Finalmente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 490nm en un lector de placas tipo ELISA (Awareness Technology INC, ChroMate, USA).

7. Resultados

7.1. Actividad antiproliferativa de compuesto TBSn3 en células tumorales HeLa, CaSki y ViBo.

Para determinar el efecto antiproliferativo del compuesto TBSn3 en cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, éstas fueron tratadas con el compuesto TBSn3 en concentraciones de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas y el número celular fue evaluado por la técnica de tinción de cristal violeta determinando así la concentración que abate en un 50% el número celular (IC_{50}) (**Fig.8, Tabla 1**).

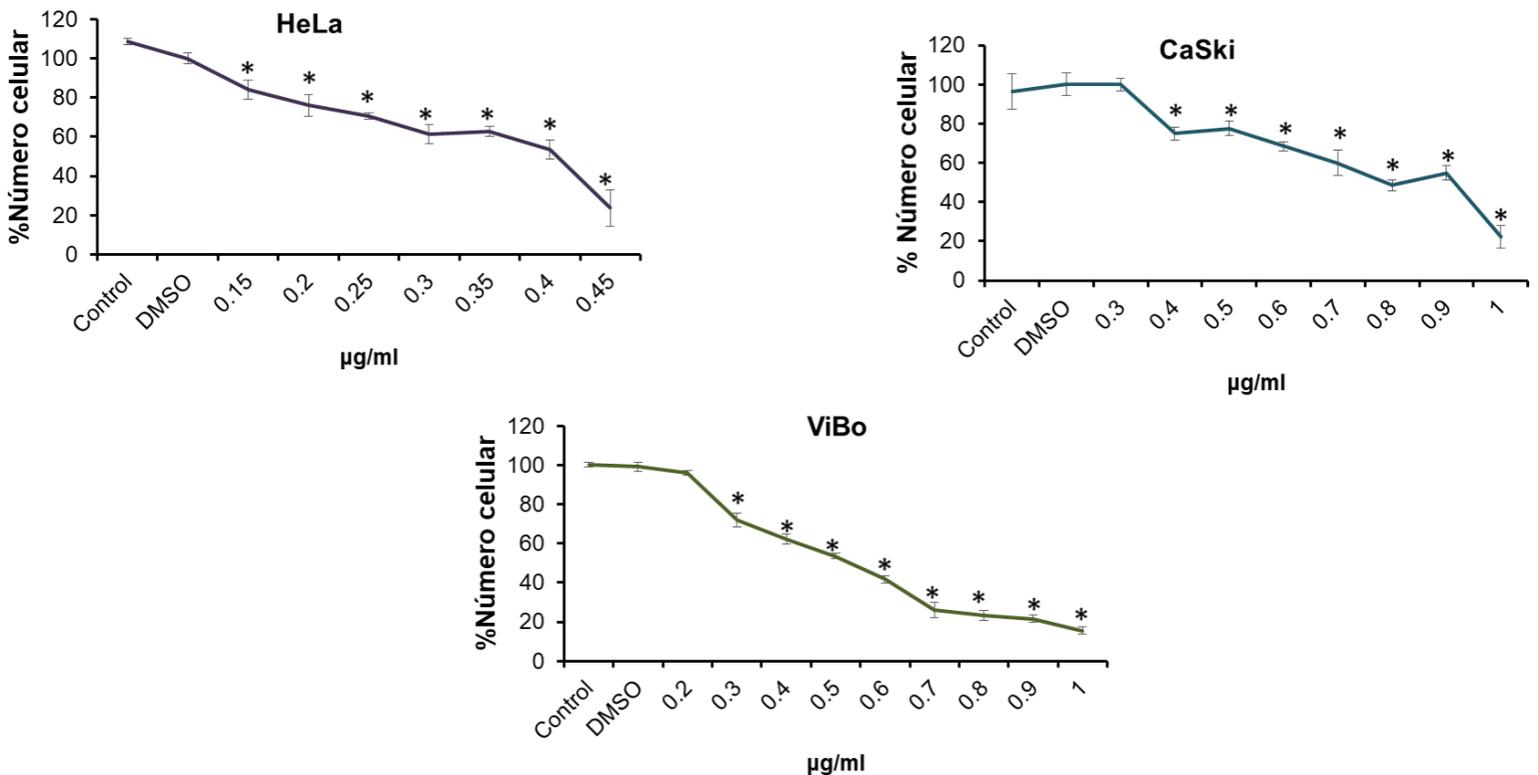


Figura 8. Efecto antiproliferativo del compuesto TBSn3 en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo. Los datos obtenidos son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados mediante una prueba de ANDEVA seguido de una prueba de Tukey ($p < 0.05$ vs control). Los asteriscos muestran las concentraciones que presentan diferencia significativa respecto al control.

Línea celular	IC ₅₀ µg/mL	IC ₅₀ µM
HeLa	0.4	7.48
CaSki	0.8	7.99
ViBo	0.427	14.97

Tabla 1. Valores de la concentración del compuesto TBSn3 que inhiben en un 50% el número celular (IC₅₀), para las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo expresada en µg/mL.

Como se observa en la **Figura 8** el compuesto TBSn3 afectó el potencial proliferativo en las tres líneas celulares de manera dosis-dependiente, en donde a mayor concentración del compuesto disminuye el número celular. La **Tabla 1** muestra los valores de IC₅₀ para cada línea celular.

7.2. Efecto necrótico del compuesto TBSn3 en células tumorales

Para determinar si el compuesto TBSn3 induce a las células tumorales muerte por necrosis, la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo tratados con el compuesto TBSn3 fue evaluada. La actividad de la enzima LDH fue considerada como un marcador de muerte necrótica o de la pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática (**Fig. 9, Tabla 2**).

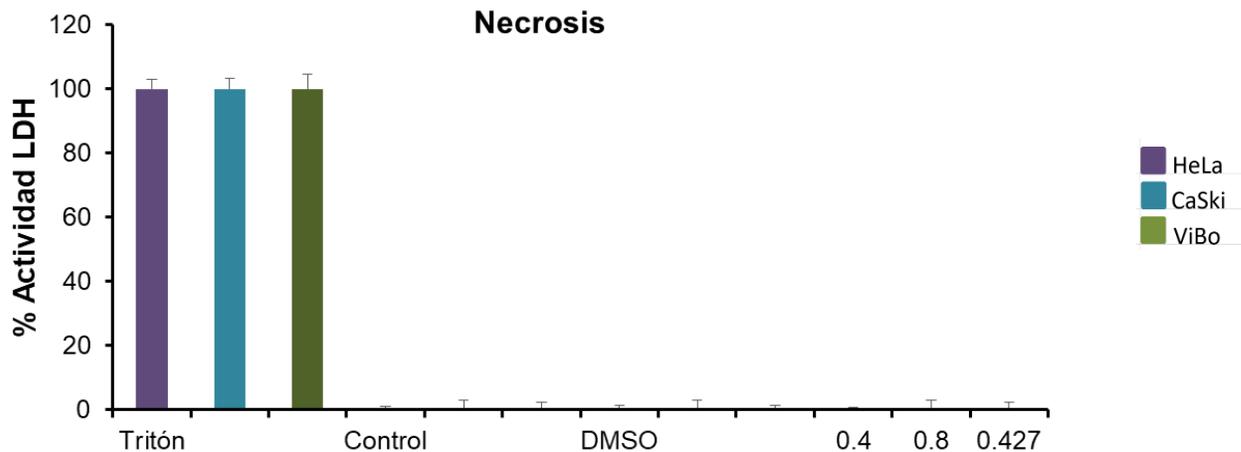


Figura 9. Actividad de LDH presente en los sobrenadantes de células tumorales tratadas con el organoestaño TBSn3. Cultivos de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo fueron tratados con el compuesto TBSn3 en las concentraciones de IC₅₀ respectivas para cada línea celular y se tomó como control positivo a necrosis Tritón-x100 la actividad de la enzima LDH (Lactato deshidrogenasa) presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares fue determinada mediante el kit Cyto Tox 96. Los datos mostrados son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados con una prueba de ANDEVA seguida de una prueba de Tukey ($p < 0.05$ vs control).

Línea celular	% LDH
HeLa	0%
CaSki	0%
ViBo	0%

Tabla 2. Actividad de LDH presente en los sobrenadantes de cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo. tratados con TBSn3 a sus correspondientes concentraciones de IC₅₀.

Los valores mostrados en la **Figura 9** y la **Tabla 2** indican que el compuesto TBSn3 induce muerte apoptótica en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo, ya que no hay presencia de actividad de LDH, por lo que la disminución celular se debe a otro tipo de muerte.

7.3. Evaluación de la actividad apoptótica del TBSn3 mediante la observación de la morfología celular apoptótica por microscopía de fluorescencia con tinción de DAPI e inmunodetección de caspasa-3 activa observada por microscopía de fluorescencia.

La muerte por apoptosis se caracteriza por reducción del tamaño, pérdida de la adherencia, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos, entre otras. Para determinar si el compuesto TBSn3 induce a las células HeLa, CaSki y ViBo a una muerte apoptótica, se sometió a los cultivos de cada línea celular a las concentraciones de IC₅₀ obtenidas para cada línea celular durante 24 horas, posteriormente fueron teñidas con el fluorocromo 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y la morfología celular fue evaluada por microscopía de contraste de fases. El uso de anticuerpos permitió la detección de caspasa-3 activa en los cultivos celulares de las tres líneas (Fig. 10).

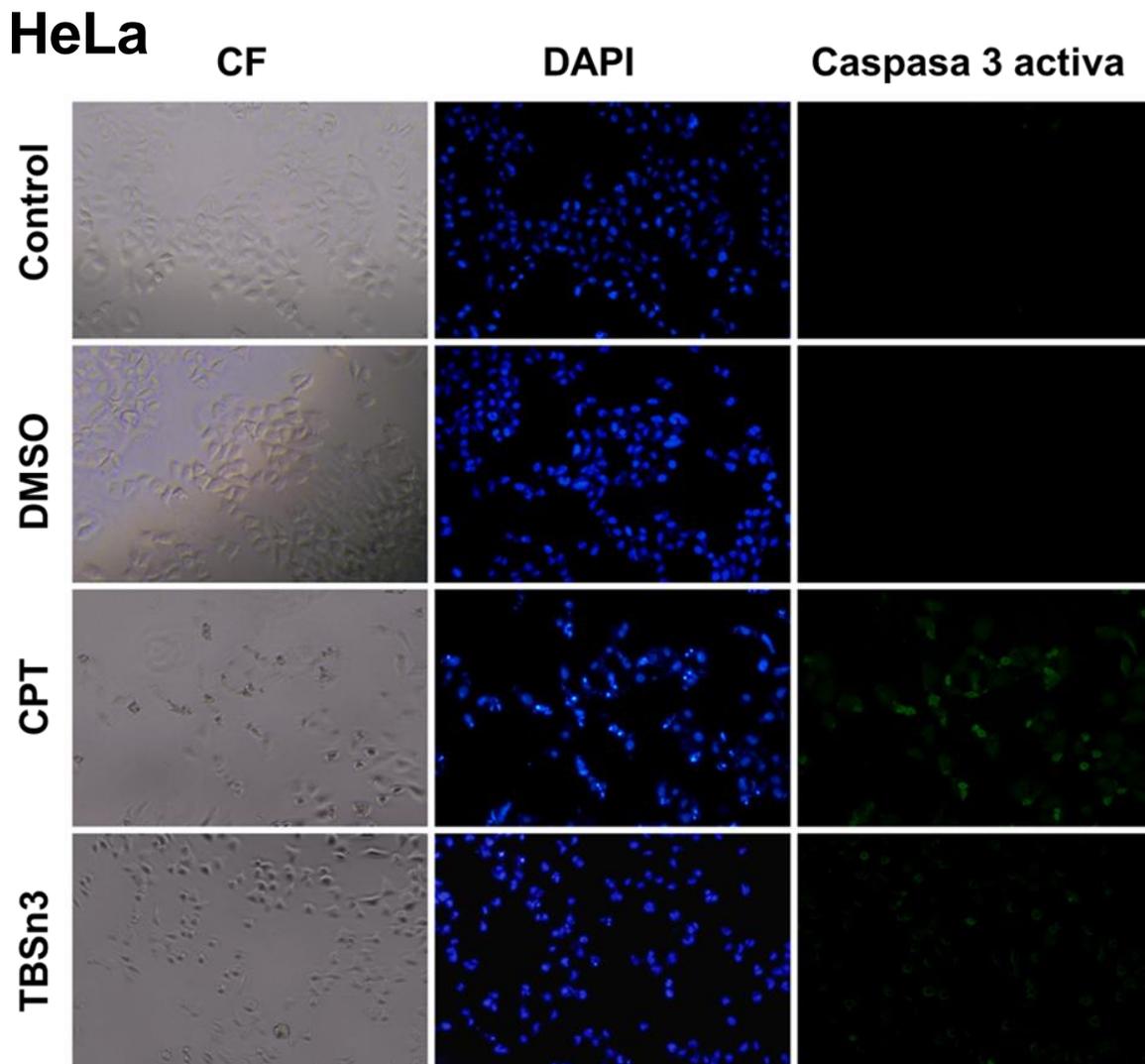


Figura 10. Efecto apoptótico del compuesto TBSn3. La morfología de las células tumorales HeLa se observa en contraste de fases (CF). Efecto en la morfología nuclear del compuesto TBSn3 observado en el marcaje con DAPI. Se observa la presencia de caspasa-3 activa en el control positivo (CPT) y en el compuesto TBSn3. Ensayo representativo de tres repeticiones.

CaSki

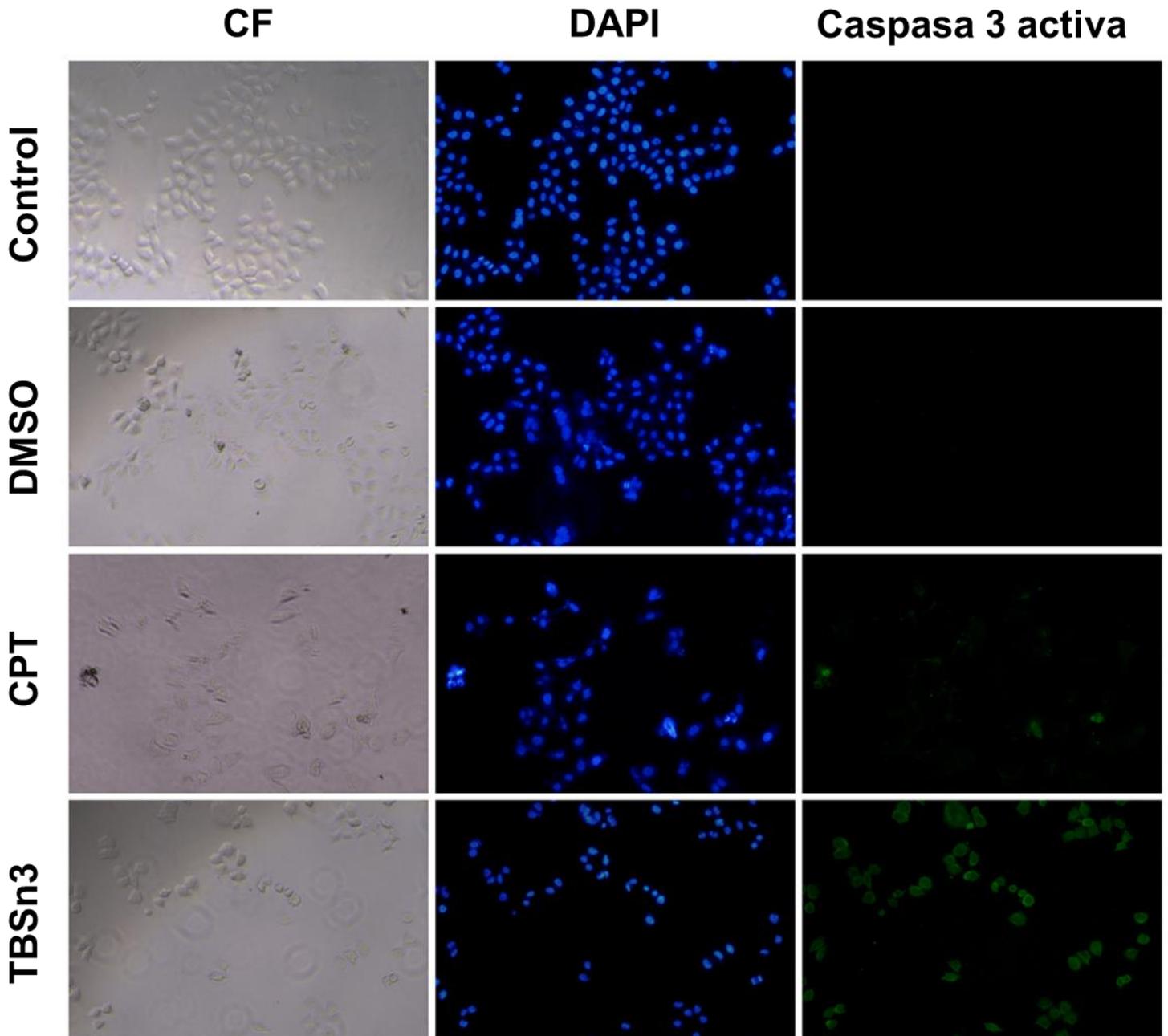


Figura 11. Efecto apoptótico del compuesto TBSn3. La morfología de las células tumorales CaSki se observa en contraste de fases (CF). Efecto en la morfología nuclear del compuesto TBSn3 observado en el marcaje con DAPI. Se observa la presencia de caspasa-3 activa en el control positivo (CPT) y en el compuesto TBSn3. Ensayo representativo de tres repeticiones.

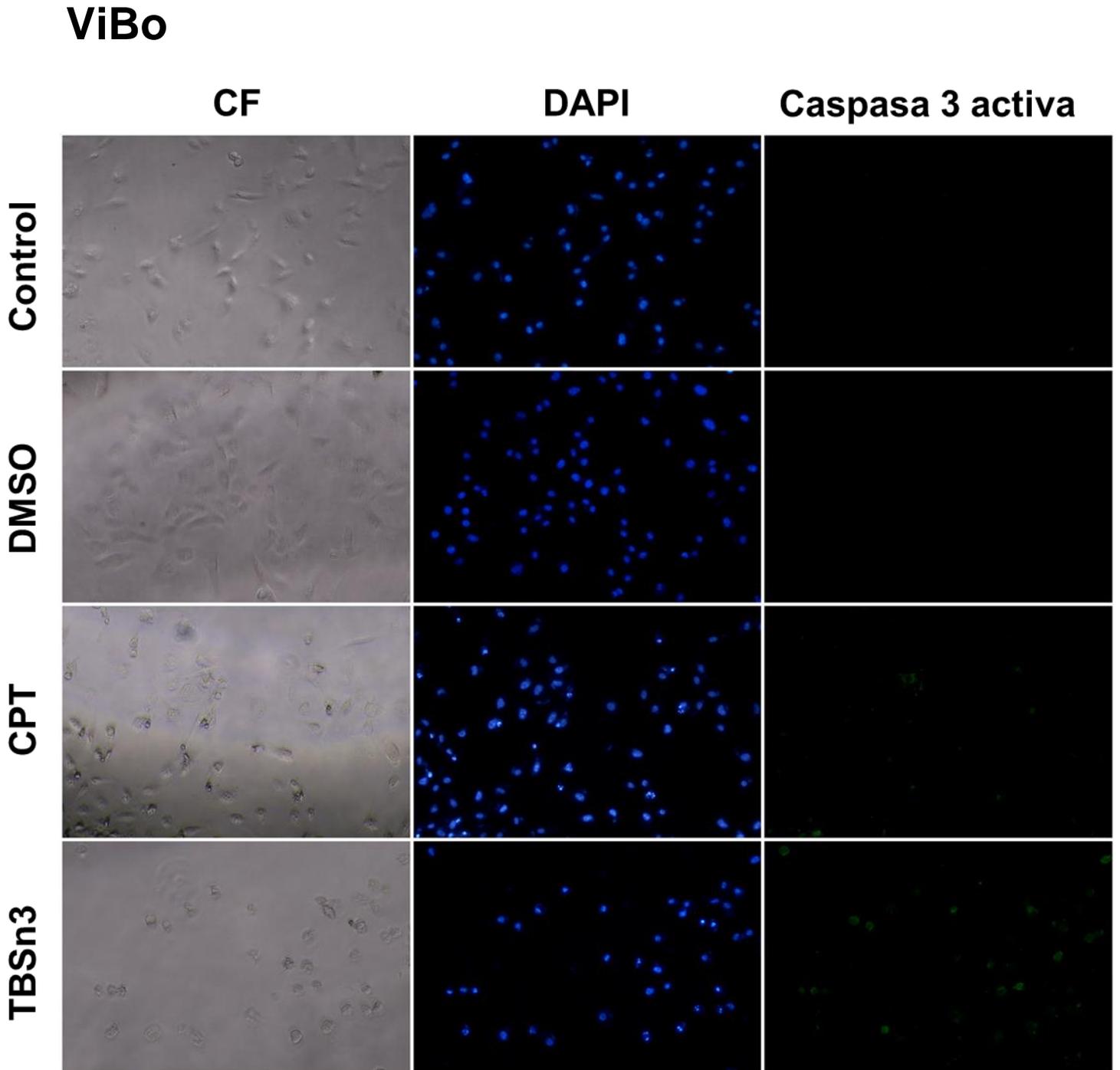


Figura 12. Efecto apoptótico del compuesto TBSn3. La morfología de las células tumorales ViBo se observa en contraste de fases (CF). Efecto en la morfología nuclear del compuesto TBSn3 observado en el marcaje con DAPI. Se observa la presencia de caspasa-3 activa en el control positivo (CPT) y en el compuesto TBSn3. Ensayo representativo de tres repeticiones.

Las imágenes mostradas en las **Figuras 10, 11 y 12** indican que las células del control y DMSO (contraste de fases), se encuentran adheridas a la placa, con morfología poliédrica, citoplasma extendido conservando sus proyecciones citoplasmáticas y de tamaño regular, por otro lado, en las células tratadas con camptotecina (CPT), así como con el compuesto TBSn3, se observa que las células han perdido la adherencia, redujeron su tamaño, y perdieron sus proyecciones citoplasmáticas y en algunas se observan cuerpos apoptóticos. Mientras que en el marcaje con DAPI en la CPT y el compuesto TBSn3 se observa reducción del tamaño del núcleo, condensación de la cromatina y fragmentación de ADN, sugiriendo que el compuesto TBSn3 induce muerte apoptótica.

7.4. Efecto apoptótico: presencia de caspasa-3 activa cuantificada por citometría de flujo

Con el propósito de corroborar si el compuesto TBSn3 induce muerte apoptótica en las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo, éstas fueron tratadas con el compuesto TBSn3 durante 24 horas con la concentración de IC₅₀ respectiva para cada línea celular y la caspasa-3 activa fue cuantificada por citometría de flujo (**Fig.13, Tabla 3**).

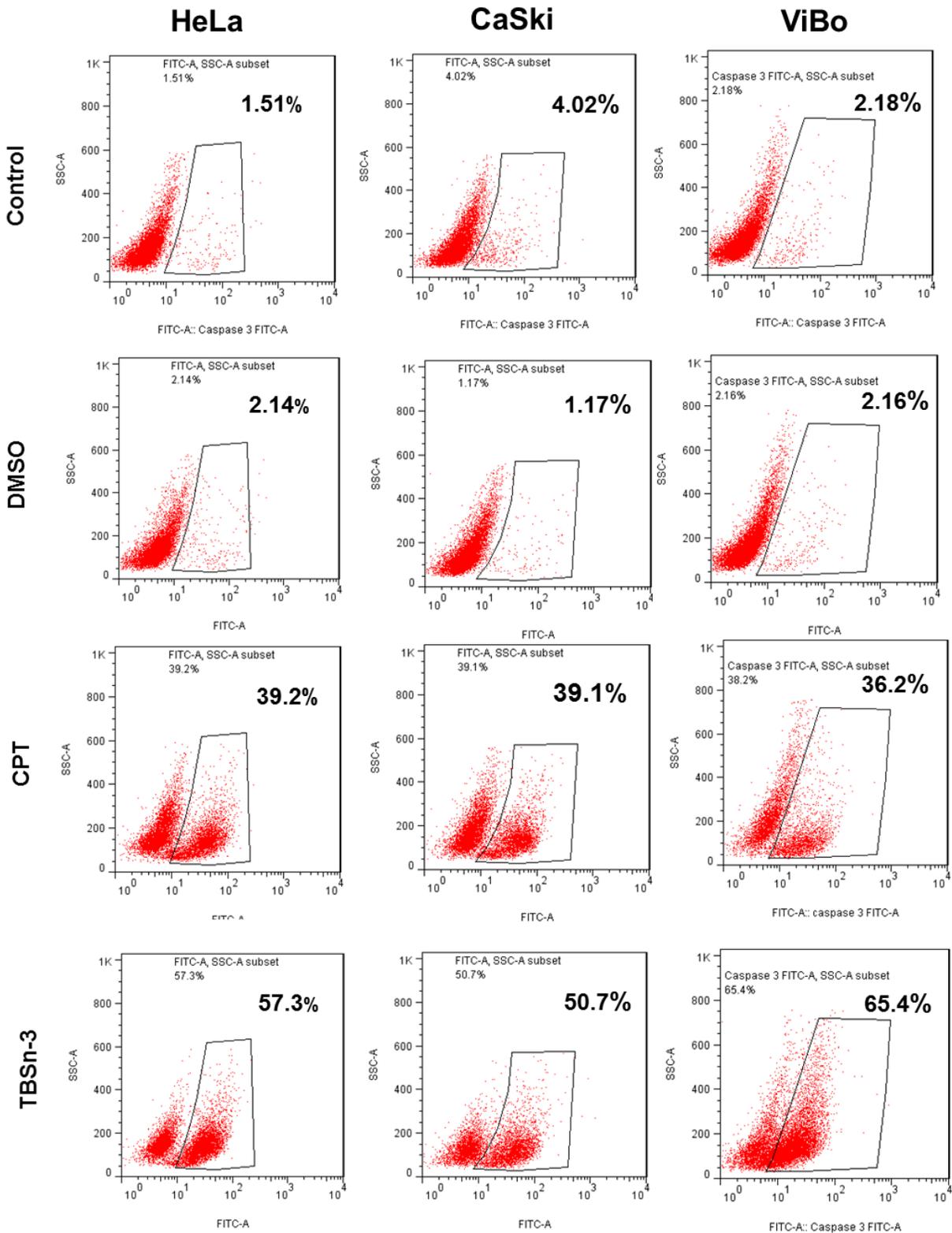


Figura 13. Cuantificación de células positivas a la caspasa-3 activa en las líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo tratadas con el compuesto TBSn3. Los valores son representativos de tres ensayos independientes.

R-2: % of Vis	HeLa	CaSki	ViBo
Control	1.51	4.02	2.18
DMSO	2.14	1.17	2.16
CPT	39.2	39.1	36.2
TBSn3	57.3	50.7	65.4

Tabla 3. Porcentaje de células con presencia de caspasa-3 activa en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo. Evaluadas a las 24 horas después del tratamiento con el compuesto TBSn3.

Los resultados mostrados en la **Figura 13** y la **Tabla 3**, establecen que el compuesto TBSn3 induce a las células tumorales de CaCu a una muerte apoptótica, dependiente de caspasa 3.

7.5. Actividad antiproliferativa del compuesto TBSn3 en linfocitos humanos

Debido a que el compuesto TBSn3 mostró efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer cervicouterino HeLa, CaSki y ViBo, se evaluó el efecto antiproliferativo del compuesto TBSn3 en cultivos de células de linfocitos humanos para determinar si el compuesto es selectivo. Los linfocitos se obtuvieron de sangre periférica humana y fueron tratados con las concentraciones de IC₅₀ correspondientes a cada línea celular durante 24 horas, el efecto antiproliferativo se evaluó mediante el marcaje con carboxifluoresceína.

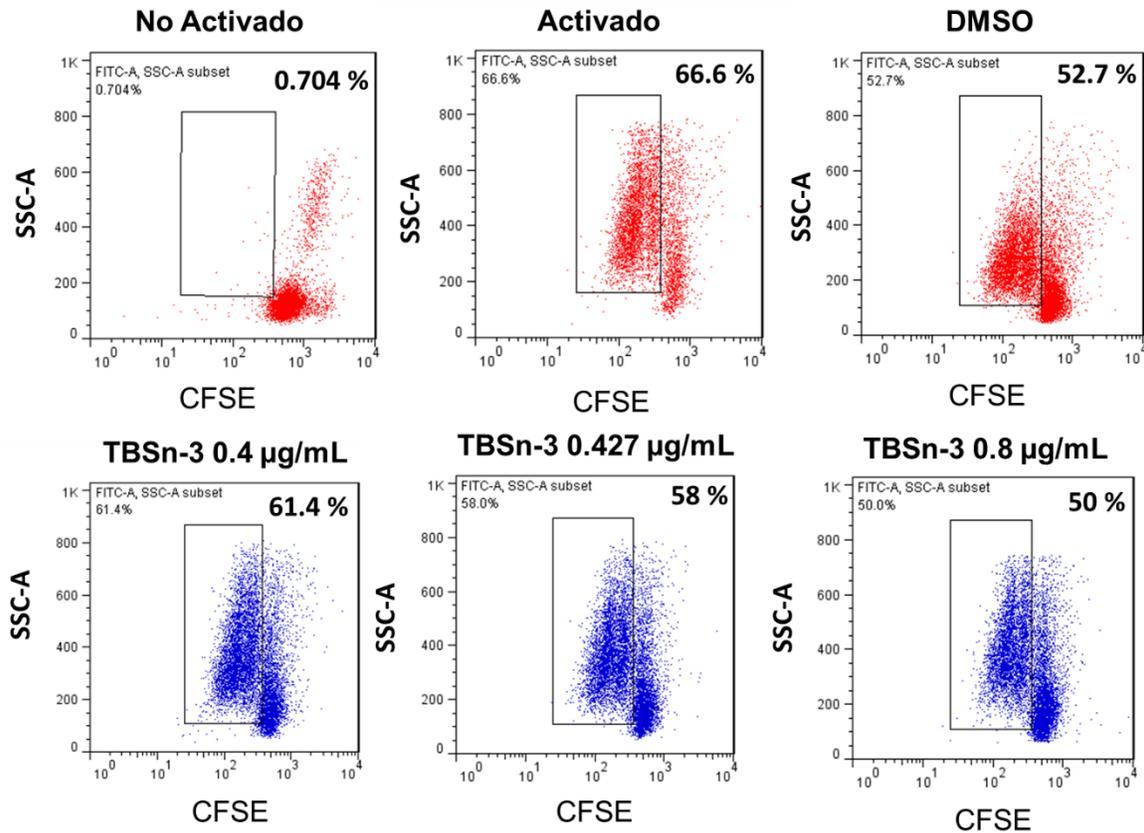


Figura 14. Efecto antiproliferativo del compuesto TBSn3 en linfocitos humanos, mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína, evaluada por citometría de flujo. Los linfocitos fueron tratados con el compuesto TBSn3 en las concentraciones de IC₅₀ correspondientes a cada línea celular. Ensayo representativo de 3 realizados de manera independiente.

Los resultados mostrados en la **Figura 14** y **Tabla 4** establecen que el TBSn3 a las concentraciones de 0.4 y 0.8 µg/mL no afectan el potencial proliferativo de las células linfocíticas, sugiriendo que este compuesto podría ser de acción selectiva.

Tratamiento	% Proliferación
Activados	66.6 %
DMSO	52.7 %
TBSn3 0.4 µg/mL	61.4 %
TBSn3 0.8 µg/mL	58 %
TBSn3 0.427 µg/mL	50 %

Tabla 4. Porcentaje de proliferación de linfocitos a las 24 horas después del tratamiento con el compuesto TBSn3. Se observa inhibición del 25.5% como máximo en los linfocitos humanos. Valores representativos de tres ensayos independientes.

Para determinar si el compuesto TBSn3 tiene un efecto necrótico en las células linfocíticas, se evaluó la actividad de la enzima LDH en el sobrenadante del cultivo de linfocitos (**Fig.15, Tabla 5**).

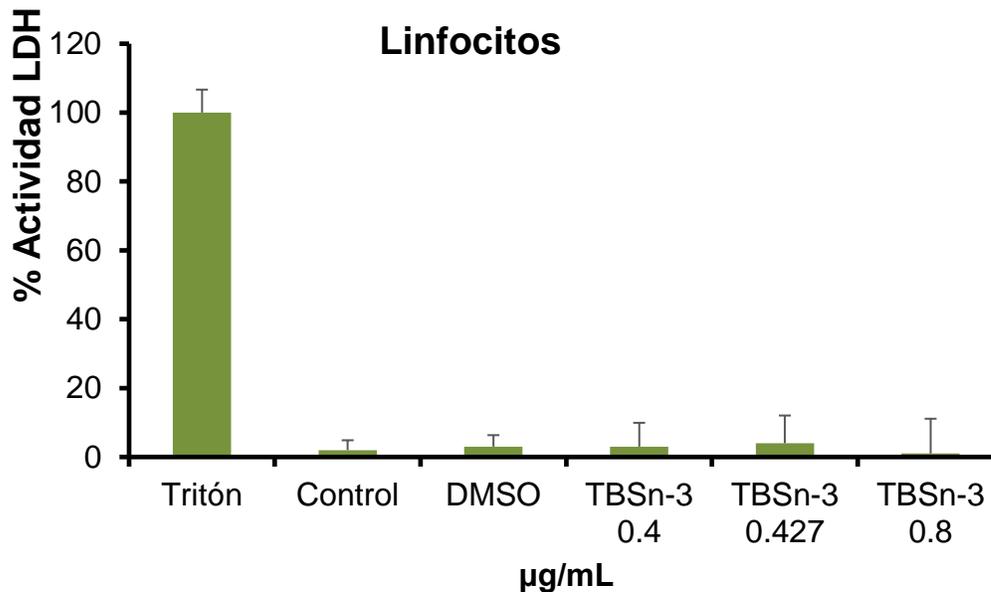


Figura 15. Determinación de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos tratados con el compuesto TBSn3. Los valores muestran de 4%, 3% y 1%. Lo que sugiere que no se induce muerte necrótica.

Concentración TBSn3	% LDH
0.4 (HeLa)	3%
0.8 (CaSki)	1%
0.427 (ViBo)	4%

Tabla 5. Porcentajes de actividad de LDH en sobrenadantes de cultivos de linfocitos tratados con el compuesto TBSn3.

Los resultados obtenidos muestran un bajo porcentaje de actividad de LDH por lo que el compuesto TBSn3 no presenta efecto necrótico en los cultivos de linfocitos.

8. Discusión de resultados

Desde que se descubrió que los átomos de platino y estaño poseen propiedades químicas en común como agentes antitumorales, se ha propuesto que los complejos de estaño son terapéuticos potenciales alternativos al cisplatino y a otros agentes anticancerígenos similares (Varela-Ramírez *et al.*, 2011). El estudio de los compuestos de organoestaño con una variedad de ligandos biológicamente activos muestran una interesante actividad antitumoral atrayendo particular interés hacia el

diseño de agentes potencialmente antineoplásicos (Aydinoglu *et al.*, 2016; Hadi y Rilyanti, 2010).

Las últimas investigaciones han sido llevadas a cabo para probar su actividad antitumoral y se ha observado que distintas especies diorganoestánicas, así como triorganoestánicas, muestran potencial como agentes antineoplásicos (Tian *et al.*, 2005). Es notable que la mayoría de los complejos de carboxilatos organoestánicos tienen una mayor actividad antitumoral que los fármacos estándar usados contra las diferentes líneas celulares, indicando que esos complejos tienen un gran potencial para su uso futuro como quimioterapéuticos (Amir *et al.*, 2014).

El ligando conectado al estaño central desempeña un papel importante, ya que los derivados del butilo son más activos que los etilos (Aydinoglu *et al.*, 2016). Se ha demostrado que los derivados carboxilados de tri-n-butil- y tri-fenilestaño (IV) tienen una alta actividad citotóxica contra varias líneas celulares de origen humano como se describe en la literatura (Camacho-Camacho *et al.*, 2012).

El compuesto TBSn3 es un derivado de organoestaño el cual fue probado en líneas celulares de cáncer de cérvix: HeLa, CaSki y ViBo, los resultados indican que éste tiene un efecto antiproliferativo en dichas células con IC₅₀ de 0.4 µg/mL, 0.8 µg/mL y 0.427 µg/mL respectivamente. Siendo CaSki la línea más resistente al compuesto. Las concentraciones de IC₅₀ son bajas al igual que las reportadas en la literatura, como es el caso de los compuestos IST-FS 29 e IST-FS 35, los cuales son trietil y tributil (IV) lipiniltiolatos respectivamente, éstos fueron estudiados en líneas celulares cancerígenas exhibiendo valores de IC₅₀ en el rango de 0.6-12.4µM para IST-FS 29 y 0.16-1.8 µM para IST-FS 35 (Alama *et al.*, 2009). Otro compuesto parecido al compuesto TBSn3 es el compuesto organoestánico trifenilestanil 2-fenil-1,2,3-triazol-4-carboxilato el cual fue probado contra las células HeLa exhibiendo una IC₅₀ de 0.00447 µg/mL y fue más activo que el cisplatino (Varela-Ramírez *et al.*, 2011). Algunos compuestos organoestánicos (IV) de la L-Cisteina han mostrado tener alta toxicidad celular contra las células del carcinoma epitelial de cuello uterino HeLa (Chasapis *et al.*, 2004).

Una vez evaluado el efecto antiproliferativo se determinó si el compuesto induce muerte celular mediante necrosis evaluando la actividad de la enzima LDH. Los resultados de LDH muestran que el compuesto *Tributilestanil4-oxo-4(5-nitro 1,3-tiazol-2-il) amino) butanoato* no presenta actividad citotóxica en ninguna línea celular respecto a las concentraciones de IC₅₀ obtenidas, representando así una ventaja sobre otro tipo de compuestos organometálicos que inducen muerte necrótica y son poco específicos teniendo efectos secundarios agresivos. Los estudios de citotoxicidad frente a diversas líneas celulares humanas y murinas mostraron que la mayor selectividad, potencia, así como menos toxicidad corresponde a los n-butil derivados (Galván, 2016). Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto necrótico del compuesto TBSn3 nos indican que posee

ventajas frente a otros organoestaños debido a su nula inducción de muerte necrótica.

En el caso de Cisplatino Laskar *et al.* (2018) reportan IC_{50} de 5.99 μ M, 5.66 μ M y 7.66 μ M en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo respectivamente, así como los porcentajes de LDH obtenidos fueron 57%, 26% y 17% para HeLa, CaSki y ViBo respectivamente. Contrastando estos datos con los obtenidos en las concentraciones de IC_{50} del compuesto TBSn3 y los porcentajes de actividad de LDH, el compuesto TBSn3 presenta mejores características que el cisplatino debido a que presenta nula actividad de LDH lo que nos indica que no causa muerte necrótica en comparación con los altos porcentajes de actividad de LDH del cisplatino, en particular en la línea celular HeLa.

Para la camptotecina Laskar *et al.* (2018) obtuvieron IC_{50} de 0.94 μ M, 1.80 μ M, 1.92 μ M y porcentajes de LDH 3%, 2% 0% para las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo respectivamente. En comparación con la camptotecina el compuesto TBSn3 presenta características similares al no inducir muerte necrótica lo que representa una ventaja para el compuesto TBSn3 pues es buena opción para ser estudiado como candidato a quimioterapéutico.

La morfología celular y nuclear en las células tratadas con el compuesto TBSn3 permite observar características como pérdida de adherencia, reducción del tamaño, núcleos pequeños, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos. Características particulares de muerte apoptótica como describe De Toro (2006). El marcaje con DAPI permitió identificar características apoptóticas, para corroborar se realizó detección de caspasa-3 activa por microscopía y en las figuras 10, 11 y 12 se observa la presencia de dicha caspasa corroborándose de manera cualitativa que el compuesto TBSn-3 induce muerte apoptótica.

Así mismo es importante corroborar mediante una técnica cuantitativa la presencia de caspasa-3 activa obteniendo los porcentajes de 57.3 % para HeLa, 50.7 % para CaSki y 65.4 % para ViBo. Los porcentajes nos permiten demostrar que el compuesto TBSn3 induce a las células tumorales a una muerte apoptótica. Se ha reportado que el cloruro de cobre de trifenilestaño benzimidazoletiol (TPT-CuCl₂) induce apoptosis en las células HeLa. Distintos reportes previos han demostrado que algunos de los compuestos organoestánicos tienen la capacidad de infligir muerte celular vía apoptosis (Varela-Ramírez *et al.*, 2011). Florea *et al.* (2004) han demostrado que el cloruro de trimetilestaño modifica los niveles de calcio intracelular en células HeLa por medio de la liberación de calcio principalmente de los almacenamientos internos de calcio.

Gennari *et al.* (2000) sugieren que la apoptosis inducida por compuestos organoestánicos es activada por un incremento del Ca²⁺ y continua por la liberación

de ROS y citocromo C de la mitocondria, así como por la activación de caspasas que finalmente resultan en la fragmentación de ADN (Florea *et al.*, 2004). Los organoestaños pueden promover la peroxidación lipídica en membranas celulares y causa el estrés oxidativo en organismos vivos (Shpakovsky *et al.*, 2014). Los compuestos organoestánicos (IV) tienen la capacidad de unirse con el ARN y el ADN mediante la interacción electrostática de la fracción Sn (IV)⁺ con el oxígeno cargado negativamente de un grupo fosfato (Shah *et al.*, 2015).

Es importante evaluar el efecto antiproliferativo del compuesto TBSn3 en células no tumorales (linfocitos humanos) con la finalidad de evaluar si el compuesto tiene un efecto antiproliferativo importante en células normales. Los resultados obtenidos muestran los siguientes porcentajes de proliferación 88.7% en la concentración de 0.4 µg/mL, 83.6%, en la concentración de 0.427 µg/mL y 74.5% en la concentración de 0.8 µg/mL. Se evaluó si el compuesto TBSn3 tiene efecto necrótico en los linfocitos humanos (figura 15), los datos obtenidos indican que el compuesto TBSn3 no induce de manera importante muerte necrótica. Stridh *et al.* (2001) mostraron que el TBT, en concentraciones de exposición relevantes toxicológicamente, dicta un riesgo definitivo a las células de sangre periférica humana por inducción de apoptosis y a las células T activadas, por la inducción de necrosis. Además, Carraher y Roner (2014) reportan que los organoestaños son tóxicos para el sistema inmune. El mecanismo de muerte celular inducido por DBT o TBT fue investigado desde el ángulo de apoptosis en linfocitos T. Los resultados revelaron que DBT indujo la muerte celular independiente de caspasas (necrosis), mientras que el TBT indujo la muerte celular dependiente de caspasas (apoptosis). Comparando los resultados obtenidos en el presente trabajo con los reportados por Carraher y Roner (2014), el compuesto TBSn-3 muestra ventaja sobre otros compuestos de organoestaño al no afectar de manera importante la proliferación de los linfocitos, además de no inducir muerte necrótica de manera significativa.

9. Conclusiones

- El compuesto TBSn3 afecta el potencial proliferativo de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo.
- El TBSn3 no induce muerte por necrosis en los cultivos de células de cáncer cervicouterino.
- El TBSn3 produce muerte por apoptosis a las células tumorales tratadas
- Las IC₅₀ del TBSn3 no afecta la proliferación de linfocitos humanos, ni induce en ellos muerte por necrosis.

10. Bibliografía

- ACS. (2016). *¿Qué es cancer de cuello uterino (cervical)?*. Recuperado de: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/prevencion-y-deteccion-temprana/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>
- Alama, A., Tasso, B., Novelli, F., & Sparatore, F. (2009). Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents. *Drug discovery today*, 14(9-10), 500-508.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (1998). *Essential Cell Biology* (vol. 2). United States of America: Garland. pp. 640-641.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2006). *Introducción a la Biología Celular* (2ª ed.). México: Médica Panamericana. pp. 1-2.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2010). *Biología molecular de La Célula* (5ª ed.). Omega: España. pp. 1225-1226.
- Alonso, R. P. de., Lazcano, P. E. C., & Hernández, A. M. (2005). *Cáncer Cervicouterino: Diagnóstico, Prevención y Control* (2ª ed.). Médica Panamericana: México. pp. 57-58.
- Amir, M. K., Khan, S., Zia-ur-Rehman., Shah, A., & Butler, I. S. (2014). Anticancer activity of organotin(IV) carboxylates. *Inorganica Chimica Acta*, 423(74), 14-25.
- Angosto, M. C. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 69(1), 37-64.
- Appel, K. E. (2004). Organotin compounds: toxicokinetic aspects. *Drug metabolism reviews*, 36(3-4), 763-786.
- Arakawa, Y. (2000). Invasion of Biofunctions by organotin-immune system, brain nervous system and endocrine system. *Biomedical Research on Trace Elements*, 11(3), 269-286.
- Ashe, C. P., & Berry, D. M. (2003). Apoptotic signaling cascades, *Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27(2), 199-214.

- Aydinoglu, S., Biver, T., Figuccia, S., Fiore, T., Montanaro, S., & Pellerito, C. (2016). Studies on DNA interaction of organotin (IV) complexes of *meso*-tetra (4-sulfonatophenyl) porphine that show cellular activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 163(34), 311-317.
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3), 193-199.
- Camacho-Camacho, C., Rojas-Oviedo, I., Garza-Ortiz, A., Cárdenas, J., Toscano, R. A., & Gaviño, R. (2012). Synthesis, structural characterization and *in vitro* cytotoxic activity of novel polymeric triorganotin(IV) complexes of urocanic acid. *Applied Organometallic Chemistry*, 27(1), 45-51.
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2005). *Biología* (7ª ed.). España: Médica Panamericana. pp. 221-222.
- Cardinal, L. H. (2008). Anatomía e histología normal del cuello uterino, la vagina y la vulva. In S. A. Tatti. *Colposcopia y Patologías del tracto genital inferior*. Argentina: Médica Panamericana. pp. 4-5.
- Carraher, C. E., & Roner, M. R. (2014). Organotin polymers as anticancer and antiviral agents. *Journal of Organometallic Chemistry*, 751(8), 67-82.
- Cascales, A. M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 69(1), 36-64.
- Ceballos, T.J. (2014). *Estudio de las propiedades biológicas y catalíticas de nuevos complejos organometálicos* (Doctoral dissertation). Universidad Rey Juan Carlos, España.
- Chasapis, C. T., Hadjikakou, S. K., Garoufis, A., Hadjiliads, N., Bakas, T., Kubicki, M., & Ming, Y. (2004). Organotin(IV) Derivatives of L-Cysteine and their *in vitro* Anti-Tumor Properties. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2(1-2), 43-54.
- Coudreuse, D., & Nurse, P. (2010). Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature*, 468(7327), 1074-1079.
- Crowe, A. J., Smith, P. J., & Atassi, G. (1980). Investigations into the antitumour activity of organotin compounds. I. Diorganotin dihalide and dipseudohalide complexes. *Chemico-Biological Interactions*, 32(1), 171-178.

- Cruz, H. E. de la., Mohar, B. A., & Lizano, S. M. (2004). Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano. *Revista de Oncología*, 6(5), 263-271.
- Curtis, H., Barnes, N. S., Schnek, A., & Flores, G. (2006). *Invitación a la Biología* (6ª ed.). España: Médica Panamericana. pp. 95-96.
- Daya-Grosjean, L., & Sarasin, A. (2005). The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1-2), 43-56.
- De Toro, G. (2006). Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Actas Hispanoamericanas de Patología*, 1(1), 1-13.
- Delgadillo, D. M. (2002). Muerte celular programada. *Revista Casa del Tiempo, UAM*, 66-70.
- Domínguez, B. S. R., Trujillo, P. T., Aguilar, F. K., & Hernández, M. M. (2018). Infección por el virus del papiloma humano en adolescentes y adultas jóvenes. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 44(1), 1-13.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110(5), 525-541.
- Dubin, M., & Stoppani, A. O. M. (2000). Muerte celular programada y apoptosis. Función de las mitocondrias. *Medicina (Buenos Aires)*, 60(3), 375-386.
- Elena, G. A. (2002). Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Revista Argentina de Anestesiología*, 60(6), 391-401.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- Enríquez-Mejía, M. G. (2013). Fisiopatología del lupus eritematoso sistémico. *Revista de Medicina e Investigación*. 1(1), 8-16.
- Espín, F. J. C., Almeida, C. A., Acosta, G. Y., Valdés, M. M., & Rivera, O. M. (2012). Acerca del cáncer cervicouterino como un importante problema de salud pública. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 28(4), 735-746.

- Fernández, B. H., Gerez, M. S., Ramírez, P. N., & Pineda, B. A. (2014). Caracterización de la terminación voluntaria del embarazo en adolescentes. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 40(2), 197-205.
- Fink, L. S., & Cookson, T. B. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells, *Infection and Immunity*, 73(4), 1907-1916.
- Florea, A. M., Dopp, E., & Büsselberg, D. (2004). Elevated Ca^{2+} \i transients induced by trimethyltin chloride in HeLa cells: types and levels of response. *Cell Calcium*, 37(3), 251-258.
- Flores-Balcázar, C., Rosales-Pérez, S., Caro-Sánchez, C., Gallardo-Alvarado, L., & Gordillo-Bastidas, D. (2015). Nutrientes de la Dieta y Apoptosis como Mecanismos Reguladores del Cáncer. *Archivos de Medicina*, 11(1), 1-8.
- Galván, H. J. M. (2016). *Síntesis, caracterización y actividad citotóxica de complejos organometálicos de estaño (IV) y rutenio (II) derivados de ligantes fisiológicamente activos* (Doctoral dissertation). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Gama, F. M. A. (2004). *Biología: Biogénesis y microorganismos* (2ª ed.). México: Pearson Educación. pp. 103-104.
- Gasser, G., Ott, I., & Metzler-Nolte, N. (2010). Organometallic anticancer compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(1), 3-25.
- Gennari, A., Viviani, B., Galli, C. L., Marinovich, M., Pieters, R., & Corsini, E. (2000). Organotins induce apoptosis by disturbance of $[Ca^{2+}]$ \i and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 169(2), 185-190.
- Gerasimchuk, N., Maher, T., Durham, P., Domasevitch, K. V., Wilking, J., & Mokhir, A. (2007). Tin (IV) cyanoximates: synthesis, characterization, and cytotoxicity. *Inorganic chemistry*, 46(18), 7268-7284.
- Goldman, A. (2009). *Manual de Enfermería Oncológica*. Argentina: Instituto Nacional del Cáncer. pp. 7-8.
- Gómez-Ruiz, S. (2010). Evolución y desarrollo de complejos metálicos con aplicación potencial como agentes antitumorales. *Investigación Química*, 106(1), 13-21.

- Granados, S., Quiles, J. L., Gil, A., & Ramírez-Tortosa, M. C. (2006). Lípidos de la dieta y cáncer. *Nutrición Hospitalaria*, 21(2), 44-54.
- Grillo-Ardila, C. F., Martínez-Velásquez, M. Y., & Morales-López, B. (2008). Virus del Papiloma Humano: Aspectos Moleculares y Cáncer de Cérvix. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 59(4), 310-315.
- Gutiérrez, C., Ramírez-Parra, E., Castellano, M. M., & Pozo, J. C. del (2002). G 1 to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(6), 480-486.
- Guyton, C. A., & Hall, J. E. (2011). *Tratado de Fisiología Médica* (12ª ed.). España: Elsevier. pp. 40-41.
- Hadi, S., & Rilyanti, M. (2010). Synthesis and *in vitro* anticancer activity of some organotin(IV) benzoate compounds. *Oriental Journal of Chemistry*, 26(3), 775-779.
- Hadjikakou, S. K., & Hadjiliadis, N. (2009). Antiproliferative and anti-tumor activity of organotin compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 253(1-2), 235-249.
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127-129).
- Hejmadi, M. (2010). *Introduction to Cancer Biology* (2ª ed.). United Kingdom: Bookboon. pp. 6-7.
- Hengartner M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Hernández, M. M., & Ríos, H. M. D. L. Á. (1999). *Oncogenes y Cáncer*. *Revista Cubana de Oncología*, 15(2), 131-139.
- Howley, P., & Lowy, D. (2001) Papillomaviruses and their replication. *Fields Virology*, 2(1), 2197-2229.
- Hunt, T., Nasmyth, K., & Novák, B. (2011). The cell cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 366(1584), 3494-3297.
- Imran, A., Qamar, H. Y., Qurban, A. L. I., Naeem, H., Riaz, M., Amin, S., Kanwal, N., Ali, F., Sabar, M. F., & Nasir, I. A. (2017). Role of Molecular

Biology in Cancer Treatment: A Review Article. *Iranian Journal of Public Health*, 46(11), 1475-1485.

- INEGI. (2018). *Características de las defunciones registradas en México durante 2017*. Recuperado de: http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf?fbclid=IwAR23Jrpw_ZW7_5h_3lz9JTbyZ-LPAPYxb0Ksdr3cqR8Ce8qUWXkYtuRRrjk
- Jaouen, G., & Metzler-Nolte, N. (2010). *Medicinal Organometallic Chemistry*. Alemania: Springer. pp. 45-46.
- Jave-Suárez, L. F., Ratkovich-González, S., Olimón-Andalón, V., & Aguilar-Lemarroy, A. (2015). Modulación de la apoptosis por el virus del papilloma humano, *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2), 200-205.
- Jiménez., & Garro, R. L. (2003). *Agentes Bacterianos a los que se Exponen los Pacientes de Oncología del Hospital San Juan de Dios* (Tesis de Licenciatura). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Jonsson, R. (2008). The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2008. *Scandinavian Journal of Immunology*, 68(6), 553-553.
- Khan, M. I., Baloch, M. K., Ashfaq, M., & Stoter, G. (2006). *In vivo* toxicological effects and spectral studies of new triorganotin (IV)-N-maleoyltranexamates. *Journal of Organometallic Chemistry*, 691(11), 2554-2562.
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2010). Cellular responses to stress and toxic insults: Adaptation, injury and death. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8(1), 3-42.
- Kunapuli, S., Rosanio, S., & Schwarz, E. R. (2006). "How Do Cardiomyocytes Die?" Apoptosis and Autophagic Cell Death in Cardiac Myocytes. *Journal of Cardiac Failure*, 12(5), 381-391.
- Lagunas, C. M. C., Valle, M. A., & Soto, C. I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 17(2), 98-107.
- Larrubia, J. R., Lokhande, M. U., García-Garzón, S., Miquel, J., Subirá, D., & Sanz-de-Villalobos, E. (2013). Role of T cell death in maintaining immune

tolerance during persistent viral hepatitis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(12), 1877-1889.

- Laskar, S., Sánchez-Sánchez, L., Flores, S. M., López-Muñoz, H., Escobar-Sánchez, M. L., López-Ortiz, M., Hernández-Rodríguez, M., & Regla, I. (2018). Identification of (1S, 4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-dithiocarbamate-nitrostyrene hybrid as potent antiproliferative and apoptotic inducing agent against cervical cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 146, 621-635.
- Lizarbe, I. M. A. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 101(2), 1-33.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., & Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular* (5ª ed.). Argentina: Médica Panamericana. pp. 1-2.
- Lomanto, D. L. D., Ortiz, C. O. L., Bretón, P. C. O., Gómez, L. A. I., & Mesa, C. V. M. (2003). El ciclo celular, *MedUNAB*, 6(16), 21-29.
- Louie, K. S., Sanjose, S. de, Diaz, M., Castellsague, X., Herrero, R., Meijer, C. J., Shah, K., Franceschi, S., Muñoz, N., & Bosch, F. X. (2009). Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *British Journal of Cancer*, 100(7), 1191-1197.
- Lupiani, C. M. P., & Fraga, H. M. E. (2008). Vacunas del Papiloma Humano: Se amplía el calendario vacunal. *Canarias Pediátrica*, 32(1), 11-16.
- Macarulla, T., Ramos, F. J., & Tabernero, J. (2009). *Cáncer*. España: Amat. pp. 12-13.
- Martínez, M. P. A., Díaz, O. I., Carr, P. A., Varona, S. J. A., Borrego, L. J. A., & Torre, A. I. de la (2010). Análisis de los principales factores de riesgo relacionados con el cáncer cérvico uterino en mujeres menores de 30 años. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 36(1), 52-65.
- Martínez, T. A. C. (2008). *Estudios bioquímicos del IMMUNEPOTENT CRP y de su mecanismo de citotoxicidad sobre células HeLa* (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Muñoz, C. D. R., & Cuca, S. L. E. (2016). Cytotoxic compounds from plant sources and their relationship with inhibitor of apoptosis proteins. *Revista Colombiana de Cancerología*, 20(3), 124-134.

- Nanji, A. A., & Hiller-Sturmhöfel, S. (1997). Apoptosis and necrosis. *Alcohol Health & Research World*, 21(4), 325-30.
- Nojima H. (1997). Cell cycle checkpoints, chromosome stability and the progression of cancer. *Human Cell*, 10(4), 221-230.
- Oliveri, R. (2000). Apoptosis en la insuficiencia cardíaca. *Revista Argentina de Cardiología*, 68(4), 603-607.
- OMS. (2007). *Control integral del cáncer cervicouterino: Guía de prácticas esenciales*. Suiza: OMS. pp. 35-36.
- OPS. (2015). Tratamiento del Cáncer Cervicouterino. Recuperado de: http://www.ulaccam.org/upfiles/5_Tratamiento_CACU_1490371178.pdf
- Pagliarani, A., Nesci, S., & Ventrella, V. (2012). Toxicity of organotin compounds: Shared and unshared biochemical targets and mechanisms in animal cells. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 978-990.
- Passarge, E. (2007). *Genética: Texto y Atlas (3ª ed.)*. España: Médica Panamericana. pp. 124-125.
- Pedrera, M., Gómez-Villamandos, J. C., Molina, V., Risalde, M. Á., Romero-Palomo, F., Rodríguez-Sánchez, B., Ruiz-Villamor, E., & Cordón, P. J. S. (2010). Mecanismos Inductores y Vías de la Apoptosis en la Diarrea Vírca Bovina. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 23(1), 69-82.
- Pines, J., & Hunter, T. (1991). Cyclin-dependent kinases: a new cell cycle motif. *Trends in Cell Biology*, 1(5), 117-121.
- Pizarro, A. M., Habtemariam, A., & Sadler, P. J. (2010). Activation mechanisms for organometallic anticancer complexes. *Medicinal Organometallic Chemistry*, 32(1), 21-56.
- Ramírez, A. M. E., & Rojas, L. M. (2012). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*, 23(2), 166-177.
- Ramírez, C. R. J., Carracedo, A. C., Moreno, A. C., & Guerra, P. F. (1999). Apoptosis y enfermedad. *Alergología e Inmunología Clínica*, 14(6), 367-374.
- Reverter, V. N. (2016). *Principios de Terapia Génica (Grado en Enfermería)*. Universidad de Valladolid, España.

- Ricci, M. S., & Zong, W. X. (2006). Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *The Oncologist*, 11(4), 342-357.
- Rivera, Z. R., Aguilera, T. J., & Larraín, H. A. (2002). Epidemiología del virus papiloma humano (HPV). *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 67(6), 501-506.
- Rodríguez, F. L., Hernández, B. E., & Reyes, E. J. A. (2004). El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biología Aplicada*, 21(2), 60-69.
- Rojas, M., Salmen, S., & Berrueta, L. (2009). Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*, 4(3), 92-106.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular Molecular* (5ª ed.). Médica Panamericana: China. pp. 98-99.
- Salazar, M. A., Sandoval, R. A., & Armendáriz, B. J. (2013). *Biología Molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGraw-Hill: México. pp. 80-81.
- Salvant, T. A., Rodríguez, L. O., Leyva, L. M., Gamboa, R. M., & Columbié, G. M. (2012). Comportamiento del cáncer cervicouterino en el municipio San Antonio del Sur de Guantánamo. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 38(2), 190-198.
- Sanabria, J. (2009). Virus del papiloma humano (HPV). *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 13(4), 168-187.
- Sánchez, H. J. A., Huerta, P. M. I., Rivera, T. J. A., & Rosales, P. M. (2005). Infección por VPH y cáncer cervicouterino. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 52(4), 222-233.
- Sánchez, N. C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553-562.
- Sánchez-Martínez, C., Gelbert, L. M., Lallena, M. J., & Dios, A. de (2015). Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(17), 3420-3435.
- Sánchez-Torres, L. E., & Diosdado, V. F. (2003). Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Técnica Pecuaria en México*, 41(1), 49-62.

- Sarduy, N. M. (2009). Correlación citohistológica en las neoplasias intraepiteliales cervicales y en la identificación del VPH en esas lesiones. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 35(1), 1-11.
- Secretaría de Salud. (2010). Diagnóstico y Tratamiento de Cáncer de Endometrio. CENETEC. Recuperado de: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/433_GP_C_Ca_cervicouterino/GER_Cxncer_cervicouterino.pdf.
- Sepúlveda, S. J. (2012). *Texto Atlas de Histología: Biología Celular y Tisular*. México: McGraw-Hill. pp. 1-2.
- Serena-Gómez, E., Bologna-Molina, R. E., Nevarez-Rascon, A., & Rocha Buelvas, A. (2011). Prevalencia del VPH en el Proceso de Malignización de Lesiones de Vías Aerodigestivas Superiores. *International Journal of Odontostomatology*, 5(1), 5-12.
- Serman, F. (2002). Cáncer cervicouterino: Epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano. Perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 67(4), 318-323.
- Serrano, J. (2001). La apoptosis (muerte celular programada): Inducción a la apoptosis por fitopreparados y nutracéuticos. *Natura Medicatrix*, 19(5), 234-240.
- Shah, F. A., Sabir, S., Fatima, K., Ali, S., Qadri, I., & Rizzoli, C. (2015). Organotin (IV) based anti-HCV drugs: synthesis, characterization and biochemical activity. *Dalton Transactions*, 44(22), 10467-10478.
- Shpakovsky, D. B., Banti, C. N., Mukhatova, E. M., Gracheva, Y. A., Osipova, V. P., Berberova, N. T., Albov, D. V., Antonenjo, T. A., Aslanow, L. A., Milaeva, E. R., & Hadjikakou, S. K. (2014). Synthesis, antiradical activity and *in vitro* cytotoxicity of novel organotin complexes based on 2, 6-di-*tert*-butyl-4-mercaptophenol. *Dalton Transactions*, 43(18), 6880-6890.
- Silverthorn, D. U. (2008). *Fisiología Humana: Un enfoque integrado* (4ª ed.). Argentina: Médica Panamericana. pp. 81-82.
- Sosa, R. D., Brandan, N., & Jeréz, J. (2012). Catedra de Bioquímica-Apoptosis. UNNE. Recuperado de: <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/apoptosis.pdf>.

- Stewart, Z. A., Westfall, M. D., & Pietenpol, J. A. (2003). Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(3), 139-145.
- Stridh, H., Cotgreave, I., Müller, M., Orrenius, S., & Gigliotti, D. (2001). Organotin-Induced Caspase Activation and Apoptosis in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Chemical Research in Toxicology*, 14(7), 791-798.
- Tabassum, S., & Pettinari, C. (2006). Chemical and biotechnological developments in organotin cancer chemotherapy. *Journal of Organometallic Chemistry*, 691(8), 1761-1766.
- Tafurt, C., Y., & Marín, M. M. A. (2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Revista Biosalud*, 13(2), 95-110.
- Tian, L., Yu, Q., Zheng, X., Shang, Z., Liu, X., & Qian, B. (2005). Synthesis, characterization and *in vitro* antitumour activity of di- and tri-organotin derivatives of fenbufen. *Applied Organometallic Chemistry*, 19(5), 672-676.
- Tiano, L., Fedeli, D., Moretti, M., & Falcioni, G. (2001). DNA damage induced by organotins on trout-nucleated erythrocytes. *Applied Organometallic Chemistry*, 15(7), 575-580.
- Torres, J. F. (2011). Cáncer de Cuello Uterino y VPH: Aspectos Moleculares. *Biociencias*, 6(2), 91-95.
- Tume-Farfán, L. (2014). Implicaciones del estudio de inestabilidad del ciclo celular en la biología del cáncer. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 45(3), 200-209.
- Varela-Ramírez, A., Costanzo, M., Carrasco, Y. P., Pannell, K. H., & Aguilera, R. J. (2011). Cytotoxic effects of two organotin compounds and their mode of inflicting cell death on four mammalian cancer cells. *Cell Biology and Toxicology*, 27(3), 159-168.
- Vaux, D. L., & Korsmeyer, S. J. (1999). Cell Death in Development. *Cell*, 96(2), 245-254.
- Vázquez, T. C. A. de la (2013). *Estudio de la apoptosis inducida por la inhibición de la vía de la PI3K/AKT* (Doctoral dissertation). Universitat de Barcelona, España.
- Vich, P., Brusint, B., Álvarez-Hernández, C., Cuadrado-Rouco, C., Diaz-García, N., & Redondo-Margüello, E. (2014). Actualización del cáncer de

mama en Atención Primaria (I/V). *Semergen-Medicina de Familia*, 40(6), 326-333.

- Wang, J., Wang, G., & Khan, M. F. (2015). Disorder of G2-M checkpoint control in aniline-induced cell proliferation in rat spleen. *Plos One*, 10(7), 1-14.
- Yarto, M., Gavilán, A., & Castro, J. (2004). La contaminación por mercurio en México. *Gaceta ecológica*, (72), 21-34
- Yuzhalin, A. E., & Kutikhin, A. G. (2012). Integrative systems of genomic risk markers for cancer and other diseases: future of predictive medicine. *Cancer Management and Research*, 4(16), 131-135.
- Zhou, B. B. S., & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), 433-439.

11. Apéndice

Preparación de reactivos

- **Medio de cultivo RPMI-1640**

RPMI-1640 (Laboratorio Microlab)	10.42 g
NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 mL con agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado con vacío a través de una membrana con poro de 0.47 µm. El medio de cultivo se complementa con 5% de suero de neonato. Se almacena a 4°C.

- **Desactivación del suero**

El suero de ternera neonatada se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca en baño maría a 56°C durante 30 minutos.

- **Verseno**

Etilen-diamen-tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.40 g
Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	8.00 g
Cloruro de potasio (KCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.40 g
Tris (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Una vez disueltos completamente se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000 mL con agua bidestilada. El verseno se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm² y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C.

La solución fue utilizada para desprender los cultivos de las líneas HeLa y CaSki.

- **Tripsina**

La tripsina se utilizó para el desprendimiento de la línea celular ViBo.

Es preparada al 0.05% en verseno en condiciones estériles.

- **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)**

Fosfato diácido de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.20 g
Fosfato monoácido de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2.16 g
Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	8.0 g
Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.20 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se filtra por medio de membranas con diámetro de 22 μm . La solución se esteriliza a una presión de 1.20kg/cm² y temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se almacena a 4°C.

- **Glutaraldehído**

Se utilizan 1.57 mL de Glutaraldehído (70% v/v) se agregan 98.43 mL de agua bidestilada.

- **Solución de Cristal Violeta**

Hidróxido de sodio (NaOH) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma-Aldrich, E.U.A)	4.28 g
Cristal Violeta (Sigma-Aldrich, E.U.A)	1.0 g

Se preparan 500 mL de Cristal Violeta en una concentración de 0.1%

Previamente se prepara una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 Mm con un pH de 6. Posteriormente se adiciona el Cristal Violeta, se diluye y se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

- **Solución de ácido acético**

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

- **Paraformaldehído**

Paraformaldehído al 2% en PBS, se disuelve a baño maría sin que la temperatura rebase los 60°C.

- **Camptotecina**

Se disuelven 5 mg de camptotecina en 1 mL de DMSO. Se almacena a temperatura ambiente.

- **Paraformaldehído/glutaraldehído**

Calentar en baño maría a 60°C 20 mL de PBS y agregar 0.8 g de paraformaldehído, una vez disuelto, se coloca la solución en hielo. A la solución fría se le agrega 0.8 mL de glutaraldehído y se mezcla.