



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO, APOPTÓTICO Y NECRÓTICO DEL
COMPUESTO -12,12-DICICLOHEXYL-4-HIDROXIMETIL-1-
METILBENZO[D]-PÍRIDO[4,3-H]-11,13,2,6-DIOXAZASTANNONINE (2a) EN
CULTIVOS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

RUTH NALLELY VÁZQUEZ REYNA

JURADO DE EXÁMEN

DIRECTORA: DRA. MARIA LUISA SANCHEZ ESCOBAR

ASESOR: LUIS SANCHEZ SANCHEZ

ASESOR: HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SINODAL: OCTAVIO DANIEL REYES HERNANDEZ

SINODAL: MARIA DE LOURDES MORA GARCIA



CIUDAD DE MÉXICO, 2023



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.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.

A lo largo de la vida aprendemos, crecemos y forjamos nuestro propio camino. Logramos nuestras metas paso a paso, y en cada uno de ellos hay personas que nos acompañan, nos apoyan y nos permiten lograr cada uno de nuestros sueños. Soy una persona muy afortunada, ya que en este camino he tenido el apoyo de grandes profesores, amigos y mi familia.

La culminación de este trabajo es la representación del trabajo de muchas más personas:

A mi abuela, que ya no se encuentra conmigo, pero sus enseñanzas me permitieron tener la convicción para poder lograr mis metas. A mi madre, que es el ser que más me ha apoyado y comprendido a lo largo de mi vida, a ella le debo todas mis metas y mis logros.

A mis profesores, que sin su apoyo no podría haber concluido este trabajo.

Dra. María Luisa Escobar por su orientación y apoyo en el desarrollo de esta investigación; además de toda la paciencia y el cariño; al Dr. Hugo López Muñoz por su comprensión y apoyo en mi desarrollo escolar y en el laboratorio. A mis sinodales Dr. Luis Sánchez Sánchez; Dr. Octavio Daniel Reyes y la Dra. María de Lourdes Mora García quienes aportaron sus valiosas perspectivas, recomendaciones y aportaciones.

Así mismo, quisiera agradecer a Dr. Israel Muñoz Velasco del Lab. De Microscopía Electrónica por su asistencia técnica durante la adquisición de imágenes de microscopía de fluorescencia.

M. en C. Guadalupe Gómez García y Dra. Sandra Salazar Aguilar del Laboratorio de Usos Múltiples, Laboratorio 7 2do. Piso, FES-Zaragoza, por el apoyo técnico en el desarrollo de las técnicas de fluorescencia.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por la adquisición de materiales y reactivos necesarios para el desarrollo de esta investigación a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica con los proyectos: PAPIIT IN226420, PAPIIT IN219221, y PAPIIT IN215922.

Índice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Cáncer	3
Ciclo celular	5
Procesos de muerte celular	7
Necrosis.....	9
Apoptosis.....	10
Cáncer de mama	13
Tratamientos del cáncer de mama	15
Cirugía	15
Radioterapia.....	15
Tratamientos sistémicos	15
Compuestos organometálicos	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43

RESUMEN

El cáncer es un problema de salud pública que afecta a más del 13% de la población mexicana; esta patología se desarrolla en diferentes órganos como el hígado, colón, seno, entre otros. El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia en México. Las personas que lo padecen sufren alteraciones en el tejido mamario debido al crecimiento de células tumorales. En la actualidad, existen diferentes tratamientos como cirugía, quimioterapia o radioterapia. Sin embargo, son sumamente invasivos y deterioran la calidad de vida del paciente, lo que ha impulsado el estudio de nuevos fármacos que incluye a los compuestos organometálicos. Estos compuestos están constituidos por estructuras con un elemento metal unidos mediante enlaces covalentes. Los compuestos organometálicos han demostrado tener eficacia en la inhibición de células tumorales. Por ello, el actual trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto que puedan ejercer el compuesto 12,12-Dicyclohexyl-4-hydroxymethyl-1-methylbenzo[d]-pyrido[4,3-h]-11,13,2,6-dioxazastannonine (2a) sobre la capacidad proliferativa en cultivos de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, MCF-7 y JC, así como los efectos necrótico y apoptótico.

Para evaluar la actividad antiproliferativa del compuesto 2a, se realizó la técnica colorimétrica con cristal violeta. Esto permitió obtener la concentración requerida del compuesto 2a para disminuir en un 50% la densidad celular. A partir de estos datos, fue evaluada la actividad necrótica, para lo cual se utilizó la técnica de cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados con el compuesto 2a. Posteriormente, se analizó la morfología de las células tratadas con el compuesto, así como la presencia de la proteína caspasa-3 activa a nivel de microscopía de fluorescencia.

Los resultados obtenidos indican que el compuesto 2a produce un efecto negativo en la proliferación celular de manera dosis dependiente en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y JC. Las IC₅₀ obtenidas fueron: 0.12 µg/mL para MDA-MB-231; 0.15 µg/mL para MCF-7 y 0.16 µg/mL para JC. Estos resultados muestran que existe una diferente sensibilidad al compuesto 2a, siendo la línea celular MDA-MB-

231 la más sensible al tratamiento. Por otro lado, no se detectó actividad significativa de la enzima LDH en los sobrenadantes celulares, evidenciando que la disminución celular generada con el tratamiento con el compuesto, no se debe a un efecto necrótico del mismo. Adicionalmente, se observaron cambios en la morfología celular en los cultivos tratados con el organometálico. Se pudo apreciar una disminución de tamaño celular y pérdida de adherencia, con respecto a la morfología nuclear identificada con el colorante fluorescente DAPI, se pudo apreciar una fuerte compactación del ADN. Estos cambios morfológicos indican que el compuesto 2a conduce a la eliminación celular vía apoptótica. Lo anterior fue mayormente apoyado por la presencia de la proteína caspasa-3 activa en las tres líneas celulares tratadas con el organometálico 2a. Estos resultados demuestran que el compuesto 2a presenta actividad antiproliferativa con baja actividad necrótica y con capacidad de inducir apoptosis, sugiriendo que es un buen candidato para realizar análisis más profundos sobre su potencial para su uso como terapéutico.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es un problema de salud pública y es la tercera causa de muerte en México, después de las enfermedades cardiovasculares y diabetes (OMS, 2020). En medicina el cáncer se define como un conjunto de enfermedades clínicamente diferentes; mientras que desde la perspectiva de la biología molecular esta diferenciación es prácticamente inexistente y se considera una enfermedad genética (Santos, 2008).

Existen más de 100 diferentes tipos de cáncer, aquellos que presentan alta tasa de mortalidad a nivel mundial son: cáncer de mama, colorrectal, de pulmón, y cervicouterino (Fig. 1). Las estimaciones de mortalidad por tumores malignos en México se mantienen en el 13%. Sin embargo, las proyecciones de las muertes por neoplasias a nivel mundial indican que de 2007 a 2030 la mortalidad podría aumentar cerca de 45%. A pesar de que las tasas de mortalidad en México son de las más bajas en el continente americano, los decesos por tumores malignos aumentan día con día; lo que conlleva a una carga en el sistema de salud (Reynoso, 2017).

El cáncer es el resultado de múltiples alteraciones o mutaciones en el genoma de las células. Estos genes principalmente pertenecen a dos grandes grupos, los oncogenes y genes supresores de tumores, ambos cumplen funciones reguladoras como el control de crecimiento, diferenciación y muerte celular que al adquirir alteraciones genómicas estructurales alteran el funcionamiento celular (Jiménez, 2003). Las principales alteraciones que presentan las células tumorales se encuentran en los proto-oncogenes, que al mutar se convierten en oncogenes; y los genes supresores de tumor, que pierden la función de codificar proteínas que inhiben la progresión del ciclo celular. Las diferentes familias de genes involucradas en la fosforilación de proteínas y lípidos que codifican cinasas, fosforilasas, proteasas, caspasas; desarrollan alteraciones que inducen fallas en las vías de transducción de señales intracelulares que da como resultado una proliferación

exacerbada, inestabilidad génica, se habilita la inmortalidad replicativa, adquiere resistencia a la muerte celular, adquiere adaptación a microambientes no adecuados, la inhibición por contacto observada a alta densidad celular se reduce, y además adquiere la capacidad de invadir y colonizar órganos distantes a los que generalmente no pueden llegar, en un proceso conocido como metástasis, dando como resultado afectaciones a nivel molecular, tisular y sistémico (Alberts *et al.*, 2008).

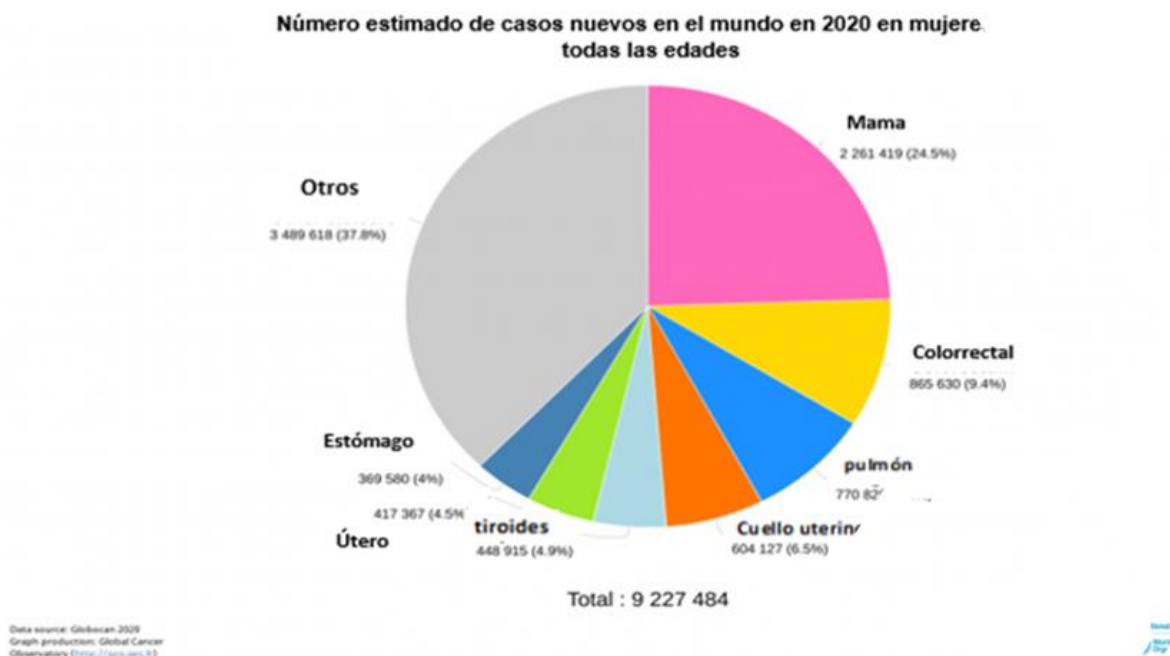


Figura 1. Número estimado de casos nuevos de cáncer en el mundo en mujeres de todas las edades. El cáncer de mama muestra el mayor porcentaje de incidencia, seguido por cáncer colorrectal, de pulmón y de cuello uterino. Tomado y modificado de GLOBOCAN, 2020.

Sin embargo, la carcinogénesis no se debe únicamente a mutaciones. Existe una población que presenta una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad por diversos factores de riesgo como la genética del individuo, tabaquismo, exposición a radiación ultravioleta, consumo de grasa animal, consumo de alcohol, sobrepeso, edad, cambios hormonales, género, gérmenes infecciosos, inmunosupresión, entre

otras. Estos factores por sí solos no son causa directa de la enfermedad; sin embargo, las personas que se encuentran expuestas a ellos pueden aumentar la probabilidad de padecerla (Valdespino, 2011).

El origen, tipo celular y tejido determinan el tipo de cáncer. El tipo más frecuente, son los carcinomas, que son derivados de células epiteliales; otro tipo son los sarcomas que derivan de las fibras musculares y el tejido conjuntivo; y la leucemia y linfomas que deriva de los glóbulos blancos, médula ósea y sistema linfático (Jiménez, 2003).

Ciclo celular

El cuerpo humano se encuentra formado por millones de células y a su vez forman los tejidos y órganos, para que se lleve a cabo este proceso es necesario que exista un balance homeostático entre el número de células nuevas y aquellas que han terminado su ciclo de vida, llevando a cabo un ciclo de división y muerte. Las células que llevan a cabo un ciclo de división multiplican su contenido celular, aumentan el tamaño de las estructuras celulares y se dividen por división mitótica que consiste en la formación de dos células hijas idénticas genéticamente a partir de una célula progenitora. Esta división es necesaria para la creación de un nuevo individuo y el reemplazo de células perdidas por muerte celular (Salazar, 2013).

El ciclo celular es llevado a cabo por dos procesos principales, que son interfase y mitosis (M). La interfase se encuentra dividida por 3 fases G1 (Gap1) que es el intervalo entre una división y el comienzo de la síntesis de DNA; S (síntesis) en el que se produce la replicación de ADN; y G2 (Gap2) que permite el crecimiento celular y síntesis de proteínas para la preparación hacia la división celular (Salazar, 2013).

Estos procesos son regulados por diferentes puntos de control o *Checkpoints* (Fig. 2) constituidos por proteínas quinasas dependientes de ciclinas cuya función es fosforilar proteínas específicas a partir de grupos de adenosín trifosfato, y ciclinas

que controlan la activación de las proteínas quinasa para que puedan fosforilar a sus proteínas diana (Alberts *et al.*, 2008).

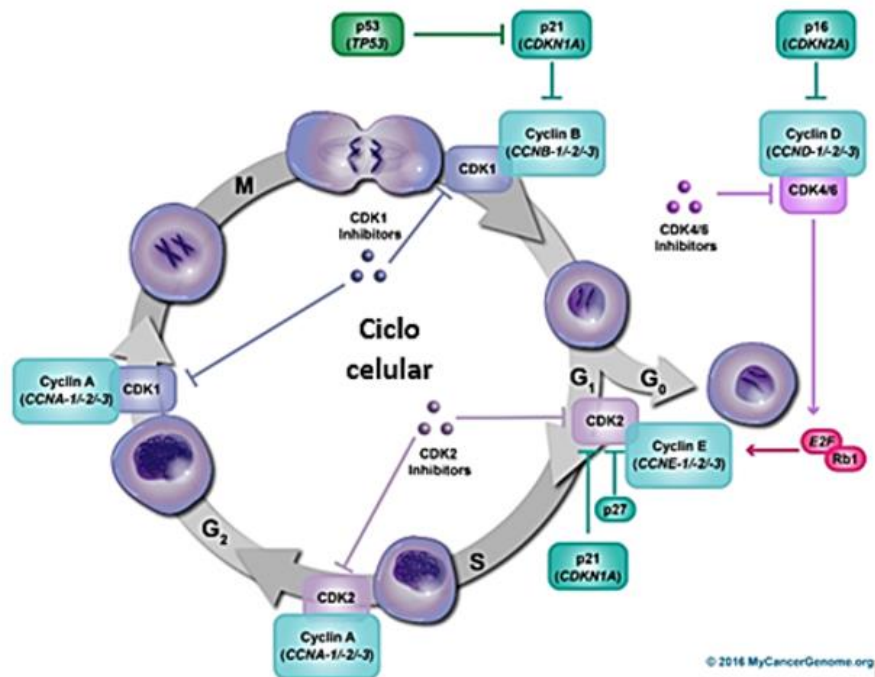


Figura 2. Proceso de división celular. Se muestran los fenómenos que ocurren en la célula para regular este proceso, indicando algunos de los puntos de control (CDK-Ciclina) que impiden o permiten el avance en el ciclo. Tomado y modificado de My Cancer Genome, 2016.

Después de un proceso de división, la célula puede entrar en una fase de quiescencia, también llamada fase G₀ o iniciar la Fase G₁ (Gap 1) durante la cual se dedica a sus actividades especializadas, manteniendo su número de cromosomas diploides y ADN no duplicado. En esta fase la cromatina comienza a descondensarse hasta llegar a una forma extendida y determinar si las condiciones externas e internas son las adecuadas para la división celular. Si el ambiente es propicio, el complejo ciclina D/CDK4-6 es liberado por la proteína p16 para catalizar la fosforilación de una proteína inhibidora denominada proteína del retinoblastoma (PRb), que se encuentra unida al factor de transcripción E2F atravesando el punto

de *restricción* que permite la transcripción de genes críticos para la continuación del ciclo celular (Salazar, 2013). El factor de transcripción E2F, se une a secuencias específicas de DNA de las regiones promotoras de genes que codifican proteínas necesarias para la entrada en la fase S y a su vez aumentan la transcripción de sus propios genes. Si la célula presenta daño en el DNA el ciclo se interrumpe en G1, mediante la activación de proteínas quinasas homologas ATM y ATR que se asocian con el lugar de daño y fosforilan proteínas diana chk1 y chk2, que a su vez fosforilan proteínas diana como p53 que puede llevar a la célula a apoptosis o estimular la transcripción de p21 cuya función es inactivar los complejos CDK/ciclina, bloqueando la progresión del ciclo celular (Alberts *et al.*, 2008).

En la fase de síntesis se lleva a cabo la replicación del ADN, produciendo una hebra nueva a partir de una hebra molde por apareamiento de bases, dando como resultado dos moléculas de ADN unidas entre sí como cromátidas hermanas por complejos proteicos. Posteriormente, en la fase G2, se inicia la condensación gradual de la cromatina y continua el crecimiento celular; al final de G2, el segundo punto de control pasa a la fase de síntesis por el complejo Ciclina B/CDK1, verifica si la fase de síntesis se llevó a cabo correctamente y en caso de que el ADN se encuentra dañado se activan los mecanismos para detener el ciclo por medio de p21 que secuestra al complejo CDK/ciclina (Salazar, 2013).

La mitosis consiste en la separación y distribución de manera equitativa de los cromosomas dando como resultado dos células diploides genéticamente idénticas. En este proceso se encuentra el tercer punto de control; el complejo promotor de la anafase (APC) se une a cdc20 y degrada a la securina, liberando a la separasa para así permitir el progreso de la anafase (Alberts *et al.*, 2008).

Procesos de muerte celular

Existen diferentes estímulos que pueden desencadenar una serie de eventos que guíen a la célula a su inminente muerte, estas rutas son complejas y pueden ser activadas por procesos controlados o accidentados. Estos procesos permiten regular la homeostasis en los tejidos además de eliminar aquellas células que no

cumplen con las características necesarias para su óptimo funcionamiento. Sin embargo, las células tumorales adquieren la capacidad de evadir la muerte celular.

Existen distintos tipos de muerte celular que se han descrito a lo largo de la historia; los dos más estudiados son la apoptosis y la necrosis. (Fig. 3)

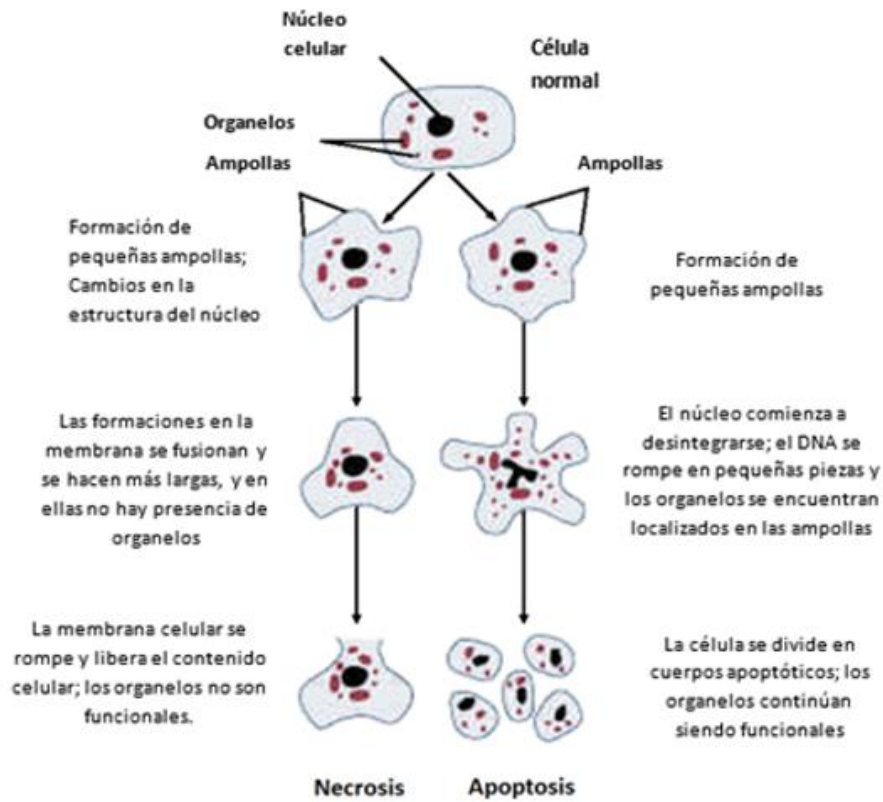


Figura 3. Procesos de muerte celular: Necrosis y apoptosis. Comparación de los cambios estructurales de las células en necrosis y apoptosis. Tomado y modificado de National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2013.

Necrosis

La necrosis es un proceso de muerte accidental que ocurre como respuesta a cambios intolerables a las condiciones fisiológicas y se caracteriza por una extensa inflamación de la célula, distensión de los orgánulos celulares, aglomeración y degradación del ADN, colapso de la membrana y fuga del contenido celular al medio. Es considerada un tipo de muerte pasiva debido a que no requiere energía (Syntichaki, 2002).

Existen diversos eventos intracelulares específicos en la célula necrótica. Uno de los primeros signos, es la disfunción mitocondrial, con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), inflamación de la mitocondria, reducción de las cantidades de ATP, disrupción de la homeostasis de calcio, activación de las proteasas calpaínas y catepsinas, ruptura lisosomal y finalmente, la ruptura de la membrana plasmática (Golstein, 2007).

Cuando el ambiente celular agota la concentración de ATP se altera el flujo de iones. El pH intracelular se modifica debido a que la disminución de ATP no permite regular correctamente la bomba ATP-asa Na^+/K^+ , por lo que la cantidad de iones sodio se regulan mediante la entrada de Ca^{2+} por el sistema de transporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; al no poder regular el incremento la concentración de calcio intracelular este permanece dentro de la célula ocasionando daños en el citoesqueleto debido a la polimerización de actina, induce la activación de proteasas, lipasas y endonucleasas dependientes de calcio, carga eléctrica en la membrana que además permite la salida de citocromo C y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS desencadenan el daño a las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, debido a que tienen la capacidad de romper puentes disulfuro y realizar modificaciones cis-trans que modifican la estructura y función de las proteínas. Cuando la célula pierde la integridad de la membrana se liberan los componentes intracelulares al exterior ocasionando una respuesta inflamatoria debido a que se liberan con el contenido intracelular ácido úrico que induce $\text{IL-1}\beta$ y Hsp70 y Hsp90 que son proteínas de choque térmico que inducen la expresión de genes relacionados con la inflamación,

además las células necróticas pueden activar el factor nuclear NF- κ B (Ramírez, 2010).

Apoptosis

Desde el desarrollo embrionario hasta la adultez, las células se encuentran programadas intrínsecamente para autodestruirse activando cadenas de señalización bien estructuradas; esto ocurre cuando existe algún factor que pueda comprometer la estabilidad celular como en la falla de su función biológica, alteración genética, células seniles. A este tipo de muerte se le denomina apoptosis.

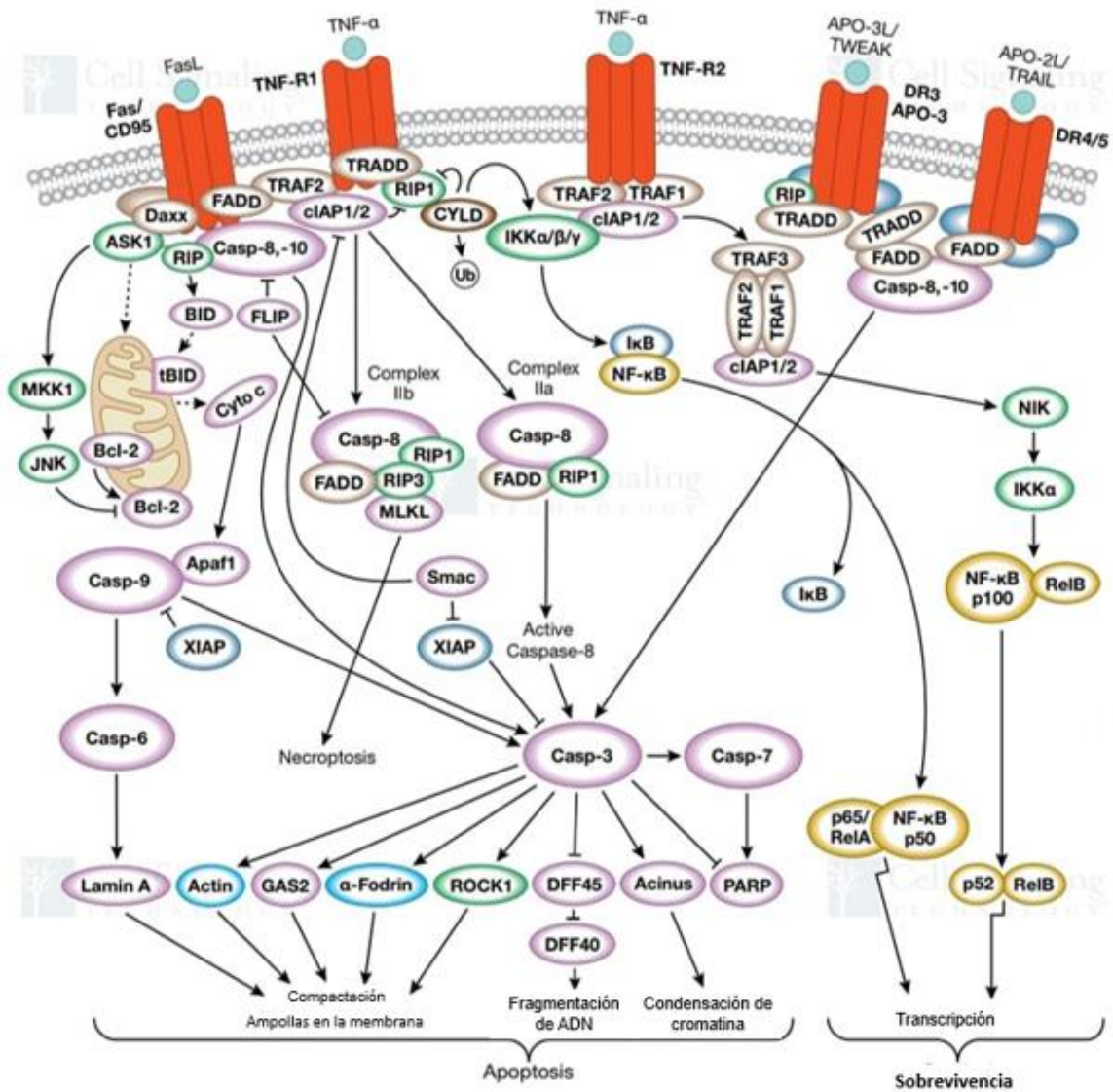
La apoptosis se caracteriza por severos cambios celulares morfológicos y bioquímicos. Morfológicamente, presenta contracción del volumen de la célula, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear, pérdida de adhesión, formación de ampollas o *bleblings*. Bioquímicamente, el ADN cromosómico es escindido por endonucleasas, se inhibe la producción de proteínas de señalización proinflamatorias, el citocromo C de las mitocondrias se reubica al citosol (Alberts *et al.*, 2008). Este proceso se observa de manera natural en procesos como el desarrollo embrionario, en células que presentan daño genómico irreparable o células T que han cumplido su función (Karp, 2009).

La apoptosis se encuentra asociada con proteasas de cisteína denominadas caspasas que son activadas por escisión proteolítica en sus residuos de ácido aspártico, y a su vez activan a otras caspasas generando una cascada proteolítica amplificadora y así desencadenar los procesos de muerte celular (fig. 4). Debido a esto también es conocida como un proceso dependiente de caspasas. Puede ser desencadenada por estímulos internos, como daño al ADN; o externos, como una respuesta inmune y estos estímulos pueden desencadenar dos vías diferentes conocidas como vía extrínseca y vía intrínseca (Alberts *et al.*, 2008).

La vía extrínseca es dependiente de la activación de los receptores de muerte CD95/FAS, factor de necrosis tumoral TNF o la familia de ligandos inductores de apoptosis (TRAIL). Estos receptores tienen un dominio en su región citoplasmática

denominado dominio de muerte (DD *-death domain-*). Cuando la célula recibe estímulos externos y se une un ligando al receptor de muerte (fig. 4) , produce un cambio conformacional en su región citosólica y recluta una molécula adaptadora FADD asociado a FAS o TNFADD asociado a un receptor TNF, lo que permite la incorporación en esa misma región de las pro-caspasas iniciadoras -8 o -10, formando un complejo de señalización inductor de muerte, estas pro-caspasas se activan y posteriormente activan a las caspasas ejecutoras -3/-6/-7 o escindir Bid, una proteína pro-apoptótica de la familia BCL-2, llevando a la célula a una señalización intrínseca (Wang *et al.*, 2005).

La vía intrínseca es una vía mediada por mitocondrias, que experimentan cambios importantes durante la apoptosis. Se encuentra regulada por la familia de proteínas BCL-2, que contiene proteínas anti-apoptóticas (BCLxl, BCL-2, BCL-W), pro-apoptóticas BH (Bax y Bak) y pro-apoptóticas BH3 (Bid, Bad, Puma y Bim). En la célula saludable, las proteínas pro-apoptóticas se encuentran inhibidas por las proteínas anti-apoptóticas. Al percibir un estímulo como daño al ADN, radiación UV, entre otros que promueven la apoptosis, las proteínas anti-apoptóticas se anulan y las proteínas Bax o Bak liberadas sufren un cambio conformacional que permite aumentar la permeabilidad de la membrana externa de las mitocondrias promoviendo la liberación de proteínas que se encuentran entre el espacio intermembranoso, como el citocromo C y Smac/DIABLO. Posteriormente, el potencial de membrana se reduce, y el citocromo C se une a Apaf-1, trifosfato de desoxiadenosina y procaspasa-9 formando un complejo activador de caspasas denominado apoptosoma. Mientras que Smac/DIABLO se une al inhibidor de proteínas apoptóticas como un antagonista. Las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak de la familia Bcl-2 se activan por la interacción de Bid. La activación de la caspasa-9 y la liberación de las proteínas pro-apoptóticas de la mitocondria, inducen la activación de las caspasas ejecutoras -3/-6/-7 (Wang *et al.*, 2005).



rev. 01/14/20

Figura 4. Rutas de señalización de la muerte celular apoptótica. El esquema muestra las diferentes rutas de señalización de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Tomado y modificado de Cell Signaling Technology, Inc. 2016

Cáncer de mama

El cáncer de mamá es una enfermedad muy común en mujeres que se inicia como una enfermedad localizada no invasiva asintomática, posteriormente, evoluciona a una etapa invasiva asintomática y alcanza las etapas más avanzadas sintomáticas. México ocupa el primer lugar de causa de muerte por neoplasia en mujeres mayores de 25 años presentando una incidencia del 15.3%; sin embargo, los casos diagnosticados en promedio son en mujeres de 58 años con una tasa de incidencia intermedia de 39 casos por cada 100,000 habitantes y una tasa de mortalidad de 10.6 casos por cada 100,000 habitantes (GCO, 2020).

La mama femenina se localiza sobre la pared torácica y se compone de 12 a 20 lóbulos que se dividen en lobulillos y éstos a su vez, en alveolos secretorios. Estos conductos convergen en forma de conductos lactíferos y forman senos lactíferos que llevan directamente al pezón. La porción glandular está situada en el centro, rodeada y atravesada por tejido adiposo y conectivo (Gonzalez, 2012).

Existen diferentes tipos de cáncer de mama determinados por el tipo específico de célula afectada. El tipo más común es el carcinoma y es un tumor que se origina en el epitelio mamario, específicamente en el seno se denominan adenocarcinomas, que comienzan en las células de los conductos o los lobulillos (Fig. 5). El carcinoma ductal *in situ* o intraductal, comienza en los conductos y se mantiene sin invadir el tejido mamario; mientras que el cáncer de seno invasivo se propaga en el tejido mamario y puede ser ductal o lobulillar. Existen otros tipos especiales de cáncer de seno invasivos como el triple negativo, inflamatorio, angiosarcoma, enfermedad de Paget del pezón y tumores filoides, pero estos son poco frecuentes (Dillon *et al.*, 2010).

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial. Ser mujer, envejecimiento, antecedentes de hiperplasia ductal atípica y densidad mamaria; son factores biológicos. Los factores relacionados con antecedentes reproductivos principalmente por hormonas ováricas, estrógenos y progesterona, que se encuentran asociados con la nuliparidad, edad del primer parto, edad temprana de

la menarca y por el uso de anticonceptivos orales y terapia de reemplazo hormonal. Así mismo, puede asociarse a otros factores relacionados con el estilo de vida, como: una alta ingesta de carbohidratos y baja en fibra, dieta rica en grasas, obesidad, sedentarismo, consumo de alcohol y tabaquismo (Arce *et al.*, 2011).

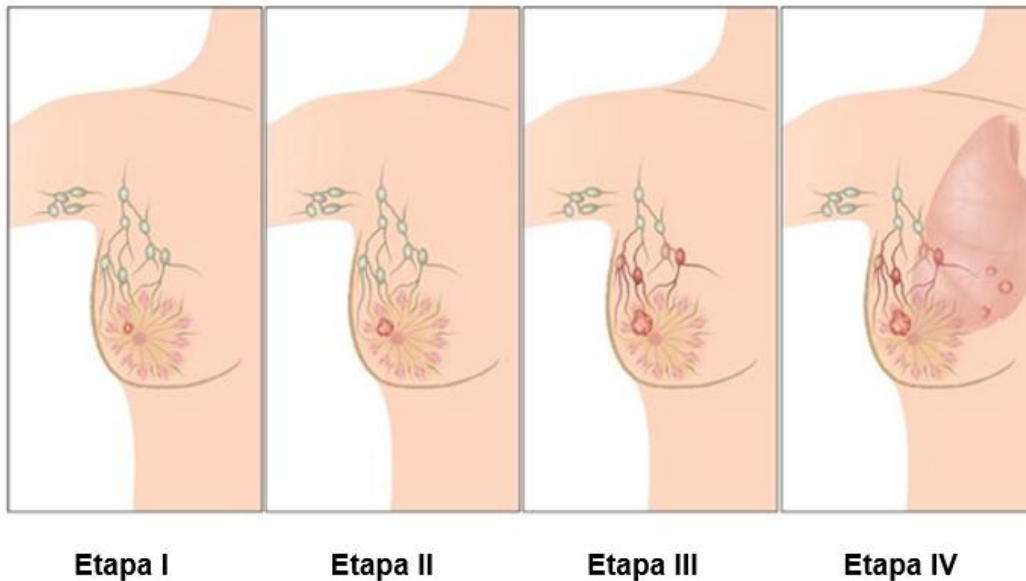


Figura 5. Estadios de cáncer de mama El desarrollo de cáncer de mama comienza en un periodo asintomático con un tumor pequeño (I), continúa su progreso en la pared muscular (II) y posteriormente afecta a los ganglios linfáticos cercanos (III) y finalmente logra diseminarse a órganos cercanos (IV). Tomado y modificado de FCPS Nuclear Medicine, 2017.

Existen diferentes pruebas que se realizan para descartar o confirmar la presencia de esta enfermedad. El método más utilizado y el mejor para detectarla en sus etapas tempranas, es la mamografía o radiografías de la mama, que permite identificar el cáncer antes de que sea lo suficientemente grande y pueda tener un tratamiento más sencillo. También existen imágenes de resonancia magnética, que utilizan imanes y ondas de radio para tomar radiografías de la mama, se practica en mujeres que tienen un alto riesgo de padecer la enfermedad. Otro método de detección es la realización de exámenes clínicos que son llevados a cabo por médicos y enfermeras, en los que se busca detectar alguna anomalía en la mama

por palpación, sin embargo, no permiten encontrar el cáncer en sus etapas iniciales (CDC, 2020)

Tratamientos del cáncer de mama

Una vez que se ha detectado la enfermedad en el paciente, es necesario que reciba un tratamiento que le permita prolongar o garantizar una mejor calidad de vida. Existen diferentes tipos de tratamientos que pueden recibir, como la cirugía, radioterapia y tratamientos sistémicos. Con base en los factores propios del paciente como la edad, género, comorbilidad, tamaño celular, entre otros, se debe tomar la mejor opción terapéutica (OMS, 2020).

Cirugía

La cirugía es un método ampliamente utilizado para el tratamiento de cáncer de seno. Esta técnica consiste en la extracción mecánica del tumor y existen dos tipos principales: la mastectomía parcial y la mastectomía total. La primera de ellas consiste en la extirpación de la parte del seno que tiene cáncer y depende de el volumen del tumor y su localización; mientras que la mastectomía total, consiste en la extirpación total de la mama, incluyendo el tejido mamario y tejidos circundantes (ACS, 2019).

Radioterapia

Esta es una técnica precisa, que utiliza radiaciones ionizantes solas o en combinaciones con otros agentes como la cirugía, quimioterapia y hormonoterapia, para erradicar las células tumorales, sin sobrepasar los límites tolerables para los tejidos normales (Rizo *et al.*, 2016).

Tratamientos sistémicos

Existen medicamentos utilizados en el tratamiento del cáncer que pueden ser administradas por vía oral o directamente al torrente sanguíneo, tienen como objetivo prolongar el periodo libre de enfermedad, reducir reincidencias y aumentar

la supervivencia sin disminuir la calidad de vida. Los tratamientos utilizados pueden ser quimioterapias, hormonoterapias y terapias blanco (Cárdenas *et al.*, 2013).

Hormonoterapia

Este tipo de tratamiento es utilizado en pacientes que tengan alguna expresión de receptores hormonales, tienen un mecanismo de acción complejo, ya que bloquean el receptor de estrógeno y tienen un efecto agonista o antagonista dependiendo de la célula blanco. A nivel celular este tipo de tratamientos bloquean el ciclo celular, y se ha mencionado un mecanismo de apoptosis, sin embargo, no se ha demostrado. El tamoxifeno es uno de los medicamentos de este grupo más utilizado en pacientes con cáncer de seno y tiene efectos secundarios adversos. Se han desarrollado otros fármacos como el toremifeno y el raloxifeno, el primero consiste en una molécula de tamoxifeno con cloro, que tiene el mismo efecto terapéutico, pero disminuye los efectos secundarios; el segundo es un derivado de benzotiofeno, con actividad similar al tamoxifeno que aún se encuentra en estudio. Aun así, el tamoxifeno sigue siendo el fármaco de referencia (Caicedo *et al.*, 2007).

Terapias blanco

También son llamadas terapias dirigidas o blanco moleculares, se refieren a fármacos que interactúan con blancos específicos situados en distintas vías intracelulares que conducen al crecimiento o progresión tumoral. Es una terapia que busca ser más selectiva produciendo el menor daño posible a las células normales (Valdespino, 2008).

Quimioterapia

La quimioterapia se ha adoptado para referirse al conjunto de medicamentos con capacidad citotóxica de diferente origen y mecanismo de acción, cuyo fin es destruir o evitar la multiplicación de las células cancerosas. Estos fármacos, pueden actuar en una o más fases del ciclo celular y sobre los mecanismos de control de la proliferación celular, buscando la máxima dosis tolerable, con el mayor porcentaje de muerte celular posible (Pérez, 2003).

Existen agentes que pueden actuar sobre el ADN, como los alquilantes; estos bloquean la replicación del ADN y la transcripción del ARN, interfiriendo así en la mitosis y síntesis de proteínas. Los derivados de camptotecinas, son fármacos de origen natural e inhiben de forma selectiva la topoisomerasa I, logrando impedir la replicación del ADN. Existen también antibióticos citotóxicos derivados de hongos, que permiten alterar el crecimiento celular (Benedí, 2006).

Cisplatino y carboplatino, son antineoplásicos derivados del platino y son ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer. Al activarse, las valencias del ion platino forman enlaces con los componentes del ADN, produciendo errores de transcripción e imposibilitando la replicación. Tienen un amplio espectro de actividad tumoral; sin embargo, el cisplatino, produce una alta concentración de urea y creatinina ocasionando lesiones renales, además de otros efectos adversos como vómitos y náuseas (Benedí, 2006).

Compuestos organometálicos

A lo largo de la historia se han utilizado diferentes fármacos basados en la química inorgánica y particularmente se han enfocado en la utilización de complejos metálicos. Estos compuestos se han utilizado en la medicina desde hace un siglo, cuando en 1910 el bacteriólogo alemán Paul Ehrlich sintetizó el compuesto arsfenamina (salvarsán) y fue el primer compuesto organometálico en comercializarse como medicamento con arsénico como elemento metálico, formado a partir de acetato de potasio y trióxido de arsénico, este fármaco fue utilizado en el tratamiento de la sífilis (Fig. 6). Otros compuestos organometálicos han sido estudiados y utilizados como agentes antibacterianos, antifúngicos y antiproliferativos con posible actividad anticancerígena, esto debido al éxito del cisplatino al ser una de las terapias mayormente aceptadas y más efectivas utilizadas actualmente (Jaouen, 2010).

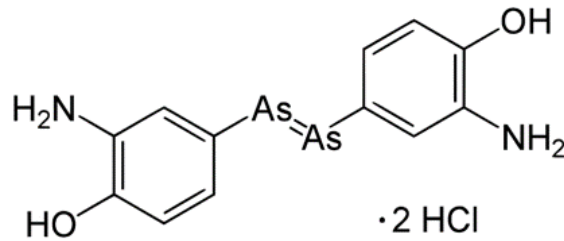


Figura 6. Estructura molecular de salvarsán, Primer fármaco organometálico, sintetizado por Paul Ehrlich.

Nuevos fármacos son sintetizados, buscando nuevas moléculas con aplicación terapéutica con mayor potencia y selectividad en el tratamiento contra el cáncer. Los compuestos organometálicos son aquellos que tienen al menos un enlace carbono-metal, están formados por un compuesto orgánico unidos por uno o varios carbonos a un metal por enlaces covalentes y; este enlace metal-carbono en la mayoría de los complejos es el que rige la actividad de la molécula. Son cinéticamente estables, generalmente sin carga y relativamente lipofílicos; tienen una variedad estructural que va de lineal a octaédrica con diferentes ligandos (Gasser, 2011).

El cisplatino es un agente antineoplásico y es un compuesto organometálico que pertenece a una clase de agentes citotóxicos conocidos como complejos de coordinación del platino (Fig. 7), con una estructura muy simple basada en el platino cuyo mecanismo de acción se activa intracelularmente, liberando dos valencias del ion platino que forma enlaces estables con los componentes de ADN alterando su configuración tridimensional, el proceso de transcripción y replicación. Fue descubierto por B. Rosenberg y fue aprobado en 1978, e inspiró la creación de otros compuestos como carboplatino y oxaliplatino. Estos compuestos se utilizan actualmente en casi todos los tratamientos del cáncer y se encuentran dentro de los fármacos más descritos. Sin embargo, este fármaco puede estimular el desarrollo de lesiones renales, originando hipomagnesemia, hipocalcemia e hiponatremia, además ocasiona vómitos, náuseas, tinnitus, hipoacusia, trombopenia y en algunos

casos puede causar alopecia. Debido a esto, es necesario el desarrollo de nuevas alternativas que muestren mejores efectos antiproliferativos con menores efectos adversos para permitir a los pacientes una mejor calidad de vida (Benedí, 2006).

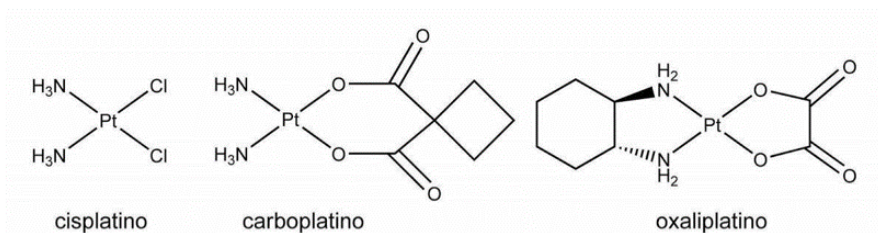


Figura 7. Estructuras moleculares de complejos de coordinación del platino.

Dentro de los complejos organometálicos se encuentran los complejos de estaño que han demostrado poseer actividad antitumoral. Estos compuestos de organoestaño son sustancias químicas con al menos un enlace covalente Sn-C. Este elemento se encuentra por debajo del tercer periodo y presenta mayor homogeneidad como principal característica, debido a que la diferencia en los valores de electronegatividad es mínima. Se ha descrito que son inmunotóxicos y disminuyen la proliferación de linfocitos humanos (Esser, 2007). Los grupos R juegan un papel importante en la actividad anticancerígena de los compuestos de estaño (IV) y su toxicidad está determinada por el número de átomos de carbono por cadena lateral. Éstos se caracterizan por la disponibilidad de posiciones de coordinación de Sn y la existencia de ligandos relativamente estables (Siwajuddin *et al.*, 2014). Diversos estudios demuestran que estos compuestos inhiben la síntesis de proteínas y la replicación del ADN, así como el metabolismo energético de las mitocondrias y al interactuar con la membrana provocando el aumento de las concentraciones de Ca²⁺ en el citoplasma (Banti, 2009).

Los complejos estannicos como el tributilestaño (IV) han demostrado tener como sitio de unión en el complejo ATP sintasa, lo que conduce a una inhibición directa de la producción de ATP y la capacidad de catalizar el intercambio Cl⁻/OH⁻ en las mitocondrias (Amir, 2014), además el dicloruro de dibutilestaño a concentraciones

más altas puede inhibir los procesos de fosforilación oxidativa en las mitocondrias (Snoeij *et al.*, 1987). Además, median la apoptosis por la activación de caspasas a través de la vía mitocondrial y por receptores de muerte. Difieren según el tipo celular y el régimen de exposición; las diferentes dosis tienen resultados que varían desde la necrosis y la apoptosis (Esser, 2007).

Se ha encontrado que estos compuestos son de gran importancia en el tratamiento del cáncer, ya que poseen actividad contra agentes tumorales por medio de la inducción de apoptosis (fig. 8), siendo incluso más efectivos que el cisplatino al activarse en células cancerosas en donde el cisplatino no puede (Siwajuddin *et al.*, 2014).

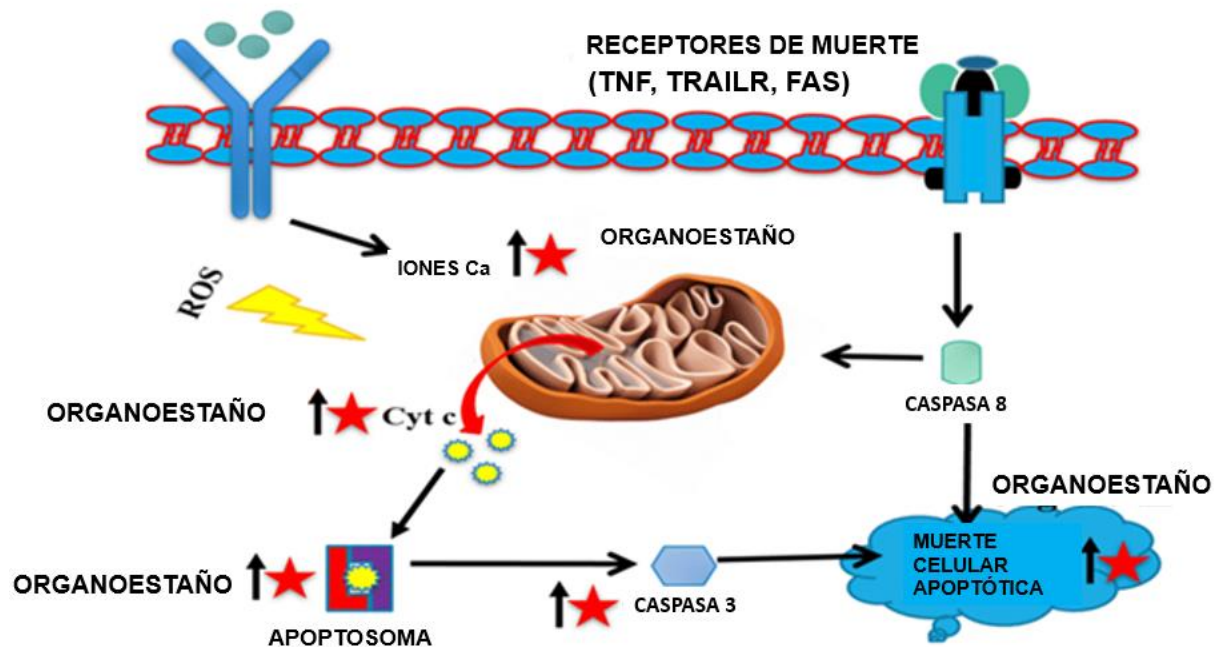


FIGURA 8. Mecanismo de acción del organoestaño. Los mecanismos moleculares de los cuales los compuestos organoestannicos (IV) inducen la muerte celular a través de la vía extrínseca mitocondrial. Tomado y modificado de Kuman, 2020.

Los compuestos de piridoxal y o-aminofenoles son compuestos organoestannicos que contienen aminofenol, clorhidrato de piridoxal y óxido de diciclohexil estaño (IV) (Galvan, 2017). Estos compuestos a base de piridoxal y su complejo metálico han

demostrado potente actividad antitumoral. Particularmente estos compuestos tienen una alta relevancia por su participación en las reacciones metabólicas.

El piridoxal es la forma activa de la vitamina B6 y es una coenzima que se absorbe en las células por medio de difusión facilitada a través de transportadores de membrana de esta vitamina y puede catalizar reacciones de transaminación, descarboxilación y racemización de aminoácidos (Galvan, 2017).

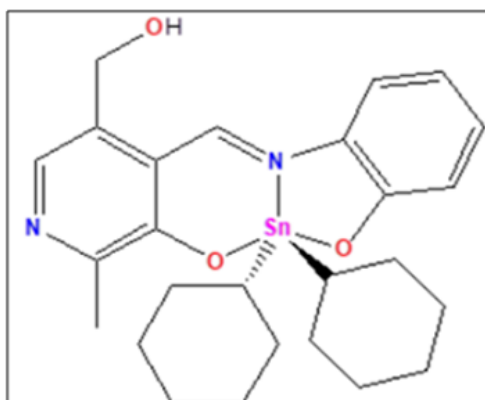


Figura 9. Estructura molecular de compuesto DMH cuyo peso molecular es de 241.26 g/mol

El compuesto -12,12-Dicyclohexyl-4-hydroxymethyl-1-methylbenzo[d]-pyrido[4,3-h]-11,13,2,6-dioxazastannone (2a) (Fig. 9) es un compuesto sintetizado a partir de clorhidrato de piridoxal, hidróxido de potasio, 2-aminofenol y dicyclohexil estaño (IV); tiene un peso molecular de 541.26 g/mol y existe un antecedente en el que se describe la actividad antiproliferativa al realizar ensayos de viabilidad con tinción con sulforodamina b. Así mismo, se reportaron valores de las IC₅₀'s para las líneas celulares SKLU-1, U-251, K-562, HCT-15, MCF-7 y MDA-MB-231 (Tabla1) (Galvan, 2017).

Tabla 1:

Valores de IC_{50} de compuesto 2a en diferentes líneas celulares

Línea celular	Compuesto 2a ($\mu\text{g/mL}$)
K-562	0.047
HCT-15	0.52
MCF-7	0.21
SKLU-1	0.16
MDA-MB-231	0.15

Este reporte muestra que bajas dosis del compuesto 2a, pueden inducir una disminución en la población celular. Sin embargo, las características necróticas y pro-apoptóticas del compuesto, no han sido exploradas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento en el número de muertes por cáncer a nivel mundial lo ubica como la segunda causa de muerte. En México, el cáncer de mama se ha convertido en el tipo de cáncer con mayor incidencia en mujeres, con un estimado de 18.55 casos por cada 100,000 habitantes y una tasa de mortalidad de 17.94 defunciones por cada 100,000 habitantes (INEGI, 2021). En la actualidad, las opciones de tratamiento que existen producen diversos efectos secundarios adversos que afectan la calidad de vida de las personas que lo reciben. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. Los compuestos de organoestaño son compuestos organometálicos que son investigados como posibles terapias contra el cáncer debido a sus enlaces carbono-metal. En este trabajo se busca evaluar el efecto antiproliferativo, apoptótico y necrótico que presenta el compuesto 2a en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, MCF-7 y JC.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema de salud pública y afecta a gran parte de la población mundial, actualmente el cáncer de mama se encuentra al frente de la lista de neoplasias malignas en mujeres mexicanas. Las opciones de tratamiento del cáncer más comunes pueden incluir cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, este tipo de tratamientos son muy invasivos y no selectivos, lo que ocasiona una gran cantidad de efectos secundarios reduciendo así la calidad de vida del paciente; además suelen ser ineficientes en pacientes con estadios avanzados.

El desarrollo de nuevos compuestos antineoplásicos como los complejos de organoestaño pueden ser nuevas opciones de exploración para lograr alternativas terapéuticas. En los últimos años se ha abordado el estudio de complejos de organoestaño derivados de piridoxal; el compuesto 2,12-Dicyclohexyl-4-hydroxymethyl-1-methylbenzo[d]-pyrido[4,3-h]-11,13,2,6-dioxazastannonine (2a) es una molécula sintetizada en el Instituto de Química de la UNAM, cuyas modificaciones estructurales podrían mejorar su actividad biológica en el cáncer de mama. Aunque se ha reportado que los compuestos de organoestaño presentan la capacidad de disminuir la población celular en un 50%, no se ha investigado si poseen la capacidad de inducir la muerte celular programada tipo I (apoptosis).

HIPÓTESIS

Existen reportes en la literatura de los compuestos derivados del estaño (IV) que presentan actividad antitumoral, también se sabe que las modificaciones estructurales de las moléculas pueden potenciar su actividad biológica. Por tanto, se puede esperar que el compuesto 2,12-Dicyclohexyl-4-hydroxymethyl-1-methylbenzo[d]-pyrido[4,3-h]-11,13,2,6-dioxazastannonine (2a), derivado de piridoxal, presente actividad antiproliferativa y apoptótica sobre líneas celulares de cáncer de mama.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiproliferativa, apoptótica y necrótica del compuesto 12,12-Dicyclohexyl-4-hydroxymethyl-1-methylbenzo[d]-pyrido[4,3-h]-11,13,2,6-dioxazastannonine (2a) en cultivos de células de cáncer de mama.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la actividad antiproliferativa del compuesto 2a en cultivos de las líneas tumorales de mama MDA-MB-231, MCF7 y JC, 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 compuesto 2a en cultivos de las líneas tumorales de mama MDA-MB-231, MCF7 y JC, mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares
- Analizar el efecto del compuesto 2a sobre la morfología celular en cultivos de las líneas tumorales de mama MDA-MB-231, MCF7 y JC.
- Identificar la presencia de la proteína caspasa-3 activa en células tratadas con el compuesto 2a para definir la presencia de la muerte celular tipo apoptótica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, MCF7 y JC se obtuvieron de *American Type Culture Collection* (ATCC) y fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos. Las líneas celulares se cultivaron con medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina, rojo fenol y bencilpenicilina, a 5% de suero de neonato de bovino (SNB) previamente desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a una temperatura de 37°C con 5% de CO_2 , y una atmósfera húmeda saturante. Los cultivos para los ensayos experimentales fueron tomados de cultivos con una densidad celular menor o igual al 70 % de saturación (cultivos proliferantes).

Preparación del compuesto

La preparación del Stock del compuesto se realizó a temperatura ambiente. Se pesaron 5 mg del compuesto y se solubilizaron en 50µl de dimetil sulfóxido (DMSO), evitando obtener una solución con cristales o precipitados. A partir de este Stock se realizaron diluciones para obtener la concentración requerida para evaluar el compuesto.

Los ensayos de la curva dosis-respuesta para obtener la IC50 del compuesto se realizó con diluciones seriadas de 0.004 a 10 µg/mL. De la solución Stock se tomaron 10 µl y se llevaron a 1 ml con medio RPMI-1640 en tubos cónicos de 1.5 ml, para obtener una concentración de 20 µg/ml, de esta solución se tomaron 500 µl y fueron llevados a otro tubo cónico el cual contenía 500µl de RPMI-1640, de esta manera se continuaron las diluciones hasta obtener una concentración de 0.004 µg/ml.

Evaluación de la actividad antiproliferativa a través de la técnica de cristal violeta

Para determinar la concentración de 2a que decrece en un 50% el número celular IC_{50} , se sembraron 7,000 células de las líneas celulares MDA-MB-231, MCF7 y JC en placas de cultivo de 96 pozos (Corning Inc.) con 100µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) y se mantuvieron con esta solución durante 24h. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y fue sustituido por el compuesto disuelto en RPMI a 5% SFB a concentraciones de 0.6 hasta 5 µg/ml. El ensayo contempló un control y la máxima concentración de vehículo utilizado. A las 24 h de exposición a los compuestos, se evaluó mediante la técnica de cristal violeta. Se retiró el medio de cultivo y las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1% durante 20 minutos, posterior a ello se retiró el fijador, se lavó la placa de cultivo con agua bidestilada y se dejaron secar al aire. Una vez secas, se agregaron 50µl de solución cristal violeta 0.1% a las placas y se mantuvieron en agitación durante 20 minutos, se retiró el exceso de colorante y se realizaron lavados con agua bidestilada y se dejaron secar al aire nuevamente. Después de secar, se agregaron 100µl de ácido acético 10% y se mantuvieron en agitación durante 20 minutos, para finalmente medir la absorbancia a 580nm en un lector de placas y fueron analizados los datos con Microsoft Office Excel mediante la ecuación de la recta para determinar la concentración con la que se disminuye un 50% de la población celular.

Evaluación de la actividad necrótica mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivos celulares

Para evaluar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, se sembraron 7,000 células de las líneas provenientes de cáncer de mama en placas de cultivo de 96 pozos (Corning Inc.) con 100µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) por 24h. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y fue sustituido por los siguientes tratamientos: Un control al que únicamente se le realizó un cambio de medio de cultivo, máxima concentración de vehículo utilizado, control positivo y la concentración empleada para preparar la IC_{50} de cada tratamiento y se mantuvo en incubación, después de 23 h se realizó un cambio de cultivo al control positivo y se sustituyó con medio fresco al 1% de tritón x-100. Cumplidas las 24h se colectó

el medio de cultivo de cada condición en placas de fondo cónico de 96 pozos (Corning Inc.) y se centrifugaron a 4000rpm a 4° C. después de centrifugar fueron tomados 40µl del sobrenadante a placas de fondo plano de 96 pozos. La actividad de la LDH se determinó con el reactivo para LDH kit Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA) agregando 40µl del reactivo a las placas con sobrenadante. Se mantuvo en agitación, a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad durante 20 minutos para su posterior evaluación de absorbancia con un lector de placas a 490nm. Los datos obtenidos fueron analizados en Microsoft Office Excel comparando al control positivo tratado con tritón x-100 como el 100% de actividad.

Evaluación de morfología celular apoptótica por microscopía de fluorescencia con tinción DAPI

Se sembraron células tumorales de cáncer de mama de las líneas MDA-MB-231, MCF-7 y JC sobre cubreobjetos en placas estériles de 6 pozos (Corning inc.) y se mantuvieron en incubación durante 24 horas con 5% de CO_2 a 37°C. Posteriormente se les retiró el medio y fueron tratados con las diferentes IC_{50} confirmadas para cada línea celular, considerando un control testigo al que únicamente se le agregó medio de cultivo fresco; un control para vehículo correspondiente a DMSO en el que fue solubilizado la IC_{50} de cada compuesto, y un control positivo con Colchicina (células con 1µg/ml de colchicina) (Sigma-Aldrich, USA).

Después de 24 horas de colocado el estímulo las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% durante 20 min. y posteriormente fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS filtrado (*Phosphate Buffered Saline*). Las células fueron permeadas con tritón x-100 al 0.2% en PBS durante 5 min a 4°C, al transcurrir el tiempo se realizar nuevamente 3 lavados con PBS filtrado y se adicionaron 10µl del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, USA), a una concentración de 3 µg/mL, se mantuvieron durante 2 minutos con el fluorocromo en una cámara húmeda; posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS filtrado y se montaron con medio de fluorescencia VECTASHIELD *Mounting Medium* (VECTOR LABORATORIES, USA) sobre portaobjetos, fueron selladas con

resina acrílica y se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta su observación. Las preparaciones fueron posteriormente observadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP).

Inmunodetección de caspasa-3 activa

Se sembraron 350,000 células tumorales de cáncer de mama de las líneas MDA-MB-231, MCF-7 y JC sobre cubreobjetos en placas estériles de 6 pozos (Corning, USA) y se mantuvieron en incubación a 37°C con 5% de CO_2 durante 24 horas. Posteriormente se les retiró el medio y fueron tratados con sus correspondientes IC_{50} confirmadas para cada línea celular, considerando un control testigo al que únicamente se le agregó medio de cultivo fresco; un control para vehículo correspondiente a DMSO en el que fue solubilizado la IC_{50} de cada compuesto y un control positivo para apoptosis con colchicina (Sigma-Aldrich, USA).

Las células fueron permeadas con tritón x-100 al 0.2% en PBS durante 5 min a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS y se colocó el anticuerpo primario: anti-caspasa-3 activa (1:200 en PBS) (LAbVision, USA) y se mantuvo durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS y posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario *goat anti-rabbit* acoplado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) (1:200 en PBS) (Invitrogen, USA) bajo condiciones de oscuridad por 2 horas, se lavaron nuevamente las muestras con PBS 3 veces y se aplicó el fluorocromo DAPI durante 2 minutos e inmediatamente se lavó con PBS 3 veces.

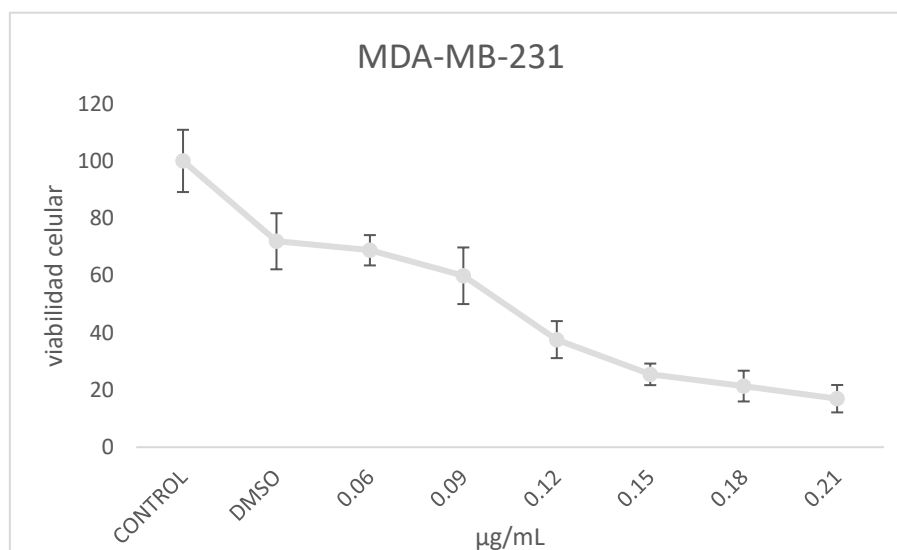
Finalmente, se montaron las muestras en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia y fueron selladas con resina acrílica. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia.

RESULTADOS

Actividad antiproliferativa en líneas tumorales de cáncer de mama

Con el objeto de determinar si el compuesto 2a tiene efecto antiproliferativo en líneas tumorales de cáncer de mama, los cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y JC fueron estimulados con distintas concentraciones del compuesto durante 24 h. Los datos obtenidos fueron utilizados para hacer el cálculo teórico por medio de la ecuación de la línea recta, para obtener la concentración necesaria para inducir una disminución del 50% de la densidad celular IC50.

Las observaciones permitieron definir que existe una disminución celular dosis-dependiente al tratar a las tres diferentes líneas celulares con el compuesto 2a (Figura 10).



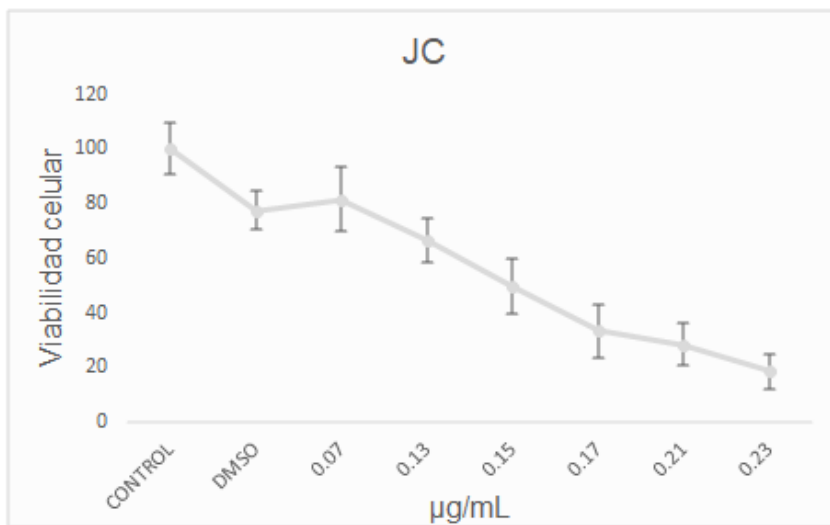
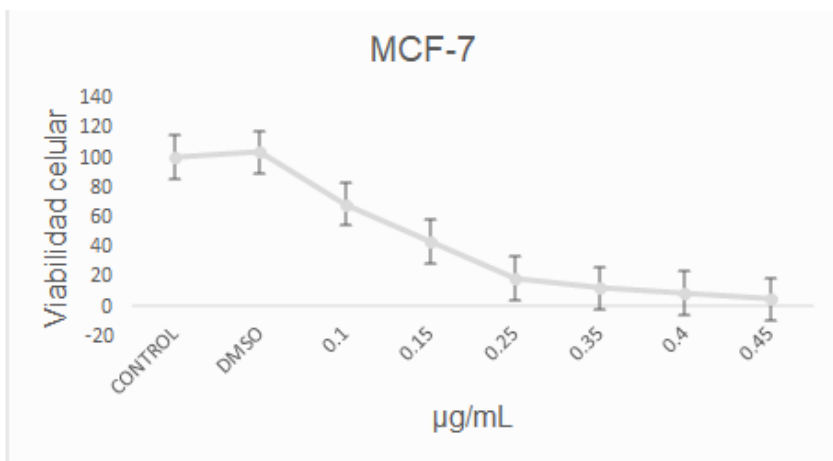


Figura 10. Efecto antiproliferativo del compuesto 2a a diferentes concentraciones durante 24 horas sobre las líneas MDA-MB-231, MCF-7 y JC. Los datos obtenidos son representativos de tres ensayos independientes con tres repeticiones cada uno. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y fue utilizado un control con medio de cultivo, DMSO como vehículo y las distintas concentraciones del compuesto 2a. Los datos fueron analizados por una prueba de ANOVA seguida por una prueba de Tukey $p < 0.05$

Con respecto a la concentración requerida del compuesto para disminuir en un 50 % el número celular (IC_{50}), se logró definir que las tres líneas celulares requieren diferentes concentraciones para alcanzar la disminución de la población al 50%, siendo MDA-MB-231, la más sensible, ya que presentó un valor de 0.12 $\mu\text{g/mL}$ (0.22 μM), mientras que para MCF-7 se requirió de 0.15 $\mu\text{g/mL}$ (0.27 μM) y para JC 0.16 $\mu\text{g/mL}$ (0.29 μM) (Tabla 2).

Tabla 2:

Valores de IC_{50} obtenidos del compuesto 2a en líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y JC.

<i>Línea celular</i>	$IC_{50}\mu\text{g/mL}$	$IC_{50}(\mu\text{M})$
<i>MDA-MB-231</i>	0.12	0.22
<i>MCF-7</i>	0.15	0.27
<i>JC</i>	0.16	0.29

Actividad necrótica por actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en cultivos celulares

Para determinar la actividad necrótica del compuesto 2a, se trataron los cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 Y JC con la concentración de IC_{50} respectivas por 24 h. Posteriormente, se determinó la presencia y actividad de la enzima citoplasmática Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares de estos cultivos. Los resultados obtenidos indican valores no significativos del porcentaje de LDH presente en los sobrenadantes (Figura 11), evidenciando con ello que no ha habido liberación extracelular de la enzima

evidenciando que no hay ruptura de membrana citoplasmática. Esto descarta la presencia del proceso necrótico en las células cancerosas tratadas con el compuesto 2a.

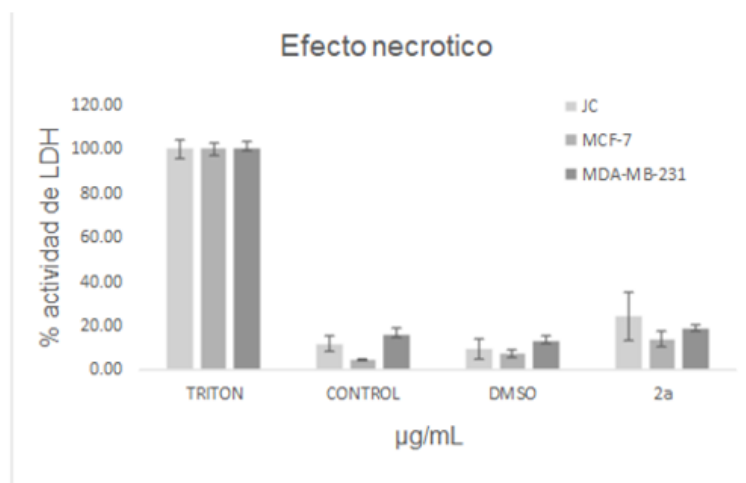


Figura 11. Actividad de LDH en sobrenadante celulares provenientes de las líneas celulares MDA-MB-231 MCF-7 y JC tratadas con el compuesto DMH. El control positivo utilizado en este ensayo fue Tritón x100, representando el 100% de la actividad necrótica. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes con tres repeticiones cada uno. Se evaluó estadísticamente la diferencia significativa de los valores obtenidos (ANOVA seguida de una prueba de Tukey $p < 0.05$)

Identificación de apoptosis en células tratadas con 2a.

Una vez que definimos que el compuesto 2a no tiene un importante efecto necrótico sobre las células tumorales tratadas con el mismo, se analizó a nivel de microscopía óptica los cambios morfológicos inducidos por el compuesto, así como la presencia de la proteasa ejecutora de la muerte tipo apoptótica, la caspasa-3 en su forma activa. Considerando que la muerte por apoptosis se caracteriza por mostrar una reducción del tamaño celular, pérdida de la adherencia, fragmentación del ADN, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos, nos enfocamos a identificar estas características. Adicionalmente, se inmunodetectó a la proteína caspasa-3 activa en células tratadas con 2a, ya que es ampliamente conocido que las caspasas ejecutoras como la 3, son responsables de los cambios morfológicos previamente mencionados. Las observaciones permitieron identificar que tras el

tratamiento con el compuesto 2a, las células sufren cambios con respecto a las células control y las tratadas con el vehículo (DMSO). Las células del control y del vehículo se observan extendidas en el plato de cultivo. Se muestran con diferentes formas dependiendo de la línea celular. Las células MDA-MB-231 (fig. 12) y JC (fig. 14), poseen una forma alargada. MCF-7 se presenta en colonias formando una estructura costrosa (fig. 13). El ADN evidenciado con la tinción con el colorante fluorescente DAPI, permitió apreciar la distribución y morfología de este componente nuclear tanto en células no tratadas como las tratadas con 2a. En las células control, se logra identificar una amplia distribución de ADN en el nucleoplasma, lo mismo sucede en las células tratadas con el vehículo DMSO. Tras ser tratadas con 2a, algunas células se contrajeron o perdieron adherencia al plato de cultivo. Las imágenes de DAPI, permiten apreciar que existe una fuerte compactación de los núcleos y en algunos casos éstos se fragmentan. Estos efectos y cambios se aprecian en las tres líneas celulares tratadas con el compuesto 2a.

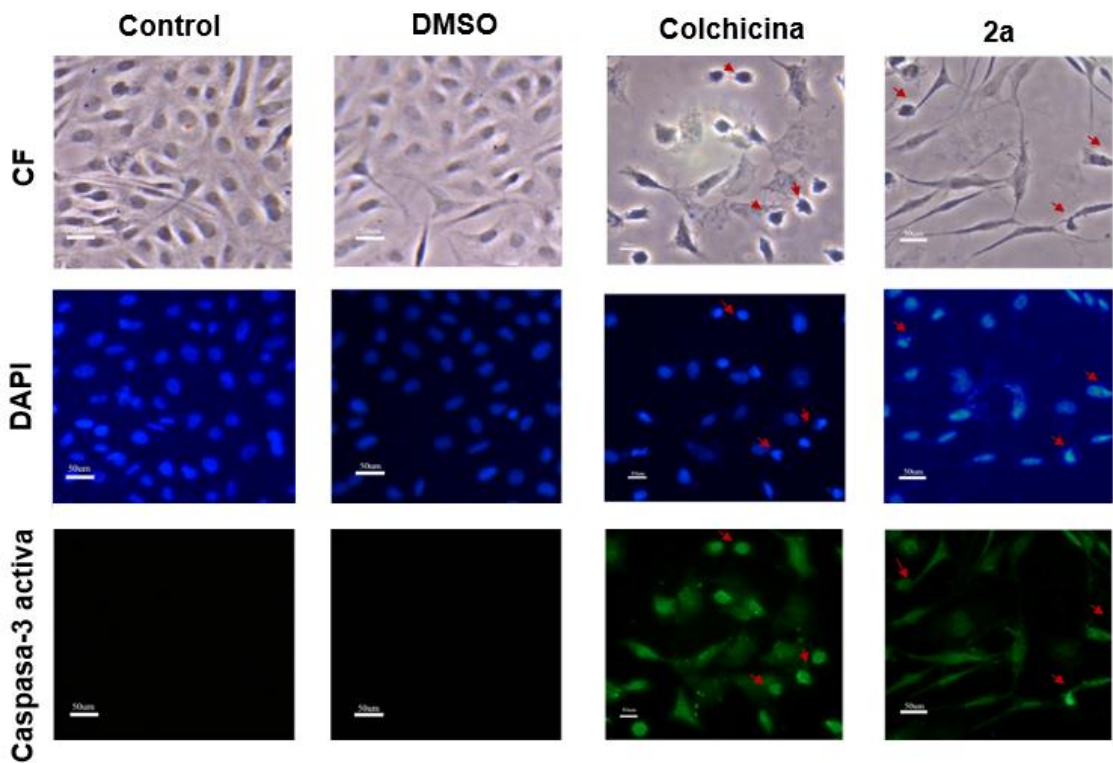


Figura 12. Efecto apoptótico del compuesto 2a en células MDA-MB-231. En las imágenes del contraste de fases (CF) se aprecia la morfología general de las células control y las tratadas. Las células control y las del vehículo, muestran una forma alargada. El control positivo para apoptosis utilizado fue colchicina (células con 1µg/ml de colchicina), con este tratamiento, las células se encuentran fuertemente compactadas y con mayor contraste, indicando una actividad apoptótica. Por otro lado, el tratamiento con el compuesto 2a, genera una disminución en la cantidad celular y compactación del citoplasma, incluso, algunas células están completamente redondeadas similares a las tratadas con colchicina (flechas). La tinción con DAPI permite apreciar la compactación del núcleo. La caspasa-3 activa, está presente en las células tratadas con 2a.

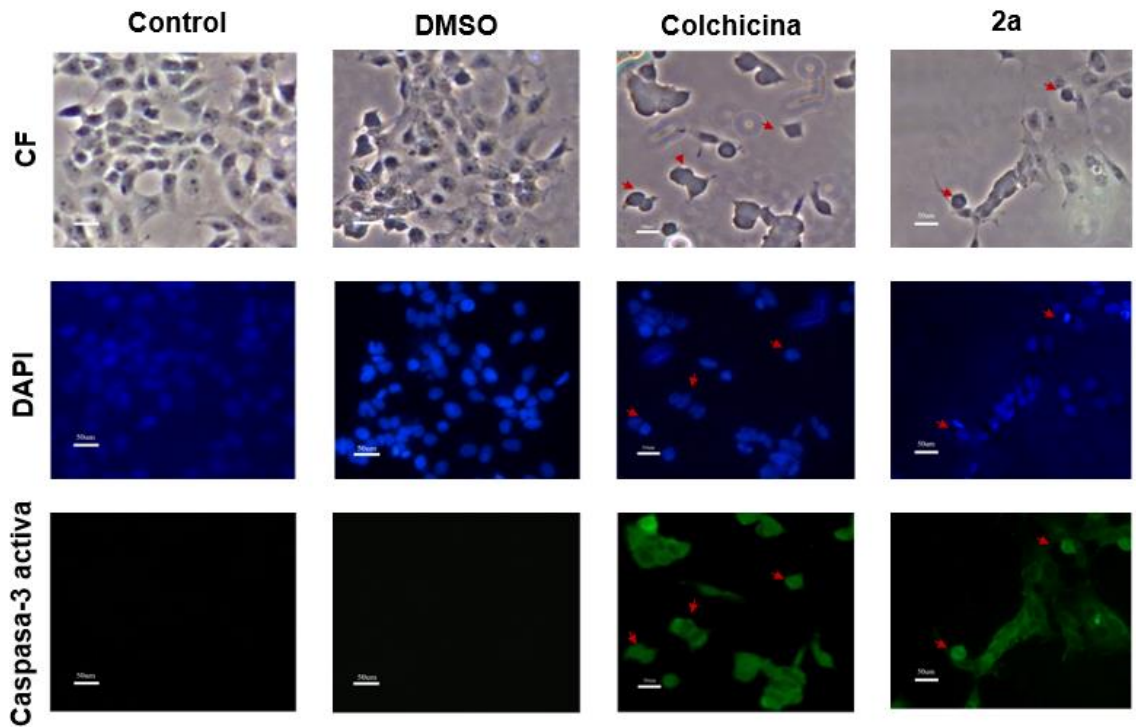


Figura 13. Actividad apoptótica del compuesto 2a en células MCF-7. Las imágenes de la iluminación con contraste de fases (CF) muestra la morfología general de todas las condiciones experimentales. Las células pertenecientes al control y vehículo (DMSO) muestran una disposición en forma de colonias, con citoplasmas extendidos sobre el plato de cultivo. Las células tratadas con colchicina cambian a una forma redondeada y reducen en cantidad. El efecto del compuesto 2a se ve reflejado en la disminución celular y en la contracción de las células. El colorante DAPI muestra los cambios en la morfología del núcleo tras el tratamiento con el compuesto 2a, ya que los núcleos están fuertemente compactados. Las caspasa-3 activa no se encuentra presente en las del control y del vehículo, diferentemente, en las células tratadas con la colchicina y con el compuesto 2a evidencian la presencia de la caspasa-3 en su forma activa.

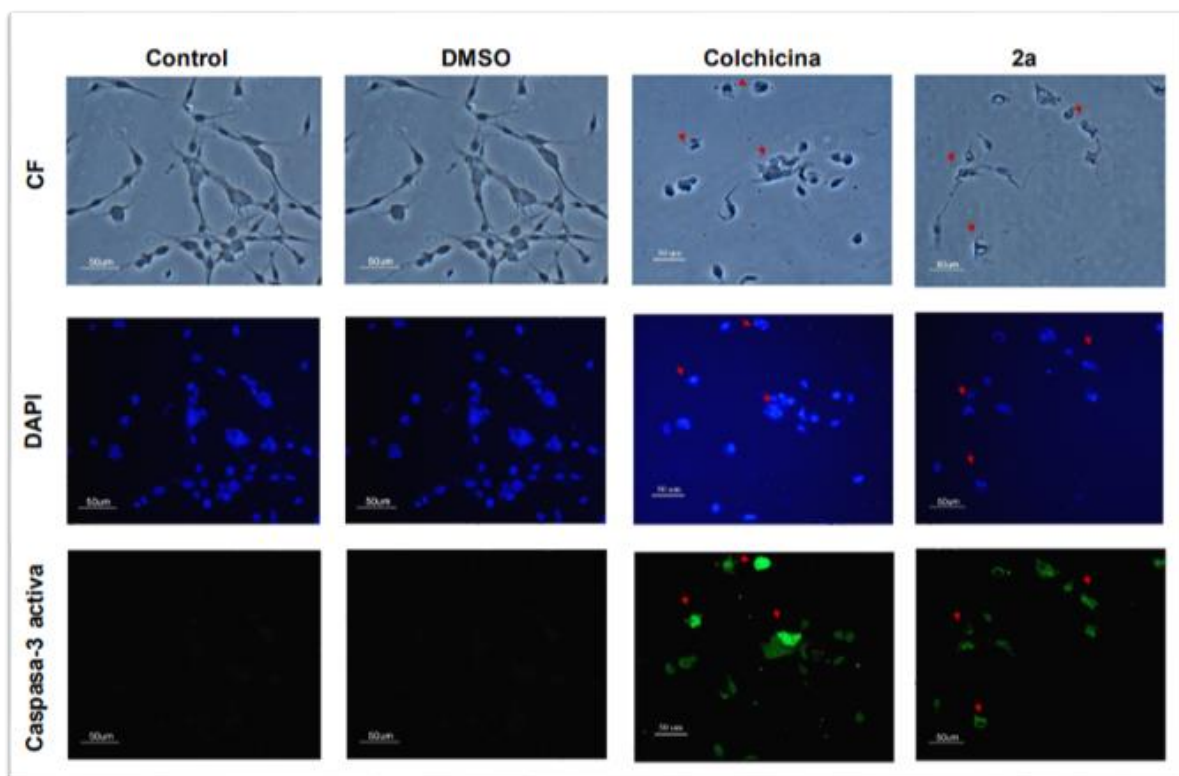


Figura 14. Actividad apoptótica del compuesto 2a en células JC. Las imágenes de la iluminación con contraste de fases (CF) muestra la morfología general de todas las condiciones experimentales. Las células pertenecientes al control y vehículo (DMSO) muestran una disposición en forma poligonal, con citoplasmas extendidos sobre el plato de cultivo. Las células tratadas con colchicina cambian a una forma redondeada y reducen en cantidad. El efecto del compuesto 2a se ve reflejado en la disminución celular y en la contracción de las células. El colorante DAPI muestra los cambios en la morfología del núcleo tras el tratamiento con el compuesto 2a, ya que los núcleos están fuertemente compactados. Las caspasa-3 activa no se encuentra presente en las del control y del vehículo, diferentemente, en las células tratadas con la colchicina y con el compuesto 2a evidencian la presencia de la caspasa-3 en su forma activa.

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte por neoplasia en México y el mundo (INEGI, 2021). En la actualidad se realizan pruebas en diferentes fármacos que puedan llevar a cabo una función quimioterapéutica que muestren eficiencia en la eliminación de las células cancerosas, pero con bajas o nulas reacciones secundaria. Teniendo en cuenta que la apoptosis es un proceso de muerte celular programado, el que al final de este, no afecta a las células que circundan a la que está siendo eliminada. Esta característica hace de la apoptosis una vía a considerar para la búsqueda de quimioterapéuticos que tengan la capacidad de inducir muerte celular tumoral apoptótica, que posean cierta preferencia por eliminar a las células cancerosas con baja o nula afectación a las células normales.

Dentro de los tratamientos actuales utilizados para eliminar a las células cancerosas se incluyen a los organometálicos como el cisplatino (Jaouen. 2010). Sin embargo, este compuesto no sólo afecta a las células malignas, sino que también afecta a las células normales, ya que tiene influencia sobre células epiteliales como las del riñón y otros órganos (Benedí, 2006). Adicionalmente, está ampliamente documentado que el tipo de eliminación celular que induce está dirigido hacia la necrosis, resultando con una importante citotoxicidad y con ello, severas reacciones secundarias que demeritan la calidad de vida de los pacientes (Martinez, 2021).

Diversos estudios han evidenciado que compuestos organometálicos poseen propiedades medicinales, lo que brinda la base para ampliar el estudio dirigido hacia este tipo de combinados y analizar su posible función como reguladores de la proliferación celular (Amir, 2014).

Entre los elementos que son empleados para generar compuestos organometálicos, se ha incluido al Estaño (Sn). Galván-Hidalgo y cols. realizaron la evaluación del efecto antiproliferativo del compuesto 2a en diversas líneas celulares de cáncer. Este grupo utilizó una técnica que implica la tinción con sulforodamina b, este es un colorante que, al estar en condiciones ácidas, se une a grupos aminoácidos básicos

de las proteínas y así permite cuantificar el contenido de proteína celular (Papadimitriou, 2019). Aunque esta técnica no mide número celular sino viabilidad, los datos arrojados por ese estudio, dan indicios de los efectos que tiene el compuesto 2a sobre células tumorales (Galván, 2017).

En el presente trabajo, se utilizó el compuesto 2a para evaluar los efectos sobre la actividad proliferativa, la actividad citotóxica y la actividad pro-apoptótica en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y JC. Para medir la proliferación celular, utilizamos la tinción con cristal violeta, una técnica que permite conocer directamente el número celular que se encuentra en cada una de las condiciones experimentales, ya que este colorante se une a componentes celulares de carga negativa. Los datos que se obtuvieron en este trabajo con respecto a la proliferación con la técnica cristal violeta, muestran una evidente inhibición en la proliferación celular en las líneas de cáncer de mama utilizadas, una respuesta dosis dependiente, ya que al aumentar la concentración del compuesto disminuye la población celular. Este ensayo permitió identificar que las líneas celulares tienen diferente sensibilidad al mismo compuesto. Por un lado, la línea celular MDA-MB-231 posee una IC₅₀ más baja (0.12 µg/mL) que las otras dos líneas celulares empleadas (MCF7/0.15 µg/mL y JC/0.16 µg/mL). Lo que indica que el compuesto 2a es más eficiente sobre el efecto antiproliferativo en las células MDA-MB-231, que en MCF7 y JC. Los valores obtenidos en nuestro grupo de trabajo con respecto a la IC₅₀ para MDA-MB-231 y MCF7 son menores que los reportados por Galván (Galván, 2017). Sin embargo, se encuentran dentro del mismo rango.

Adicional a la propiedad del compuesto organometálico de inhibir la proliferación de las células provenientes de cáncer de mama, se encontró que no tiene un efecto que induzca ruptura celular o necrosis, ya que los valores detectados de la enzima LDH liberada a los sobrenadantes de los cultivos fueron menores del 5%.

Nuestras observaciones también permitieron definir que el compuesto 2a induce a la eliminación de las células de cáncer de mama por la vía de la apoptosis, ya que las observaciones de los cambios morfológicos que sufren las células tras el tratamiento con el organometálico así lo mostraron. Los cambios observados como

el redondeamiento de la célula, la condensación, la fragmentación celular y la formación de cuerpos apoptóticos pertenecen a la clásica morfología de células en apoptosis. Es conocido que los cambios morfológicos durante el proceso de eliminación tipo apoptótica, tienen relación directa con la actividad de las proteasas llamadas caspasas. Estas tienen diferentes sustratos intracelulares siendo la caspasa-3 una de las proteasas de este tipo con mayor número de blancos de degradación. La caspasa 3, juega un papel importante en la apoptosis, debido a que permite la activación de las caspasas -6, -7 y -9 y las caspasas -8 y -10; permitiendo a la célula completar su proceso de manera ordenada (Saraste, 2000). Nuestros resultados evidencian que tras el tratamiento con el compuesto 2a, las células de cáncer de mama MDA-MB-231, MCF-7 y JC presentan una marca positiva a la detección de la caspasa-3 activa, corroborando que se está llevando a cabo la eliminación a través del proceso de muerte programado tipo 1 (apoptosis).

La mayoría de los trabajos enfocados en compuestos organometálicos con propiedades antitumorales evalúan únicamente el efecto de este sobre las células. Nuestros resultados demuestran que el compuesto 2a posee actividad antiproliferativa, que el proceso de muerte necrótico inducido por el fármaco se encuentra en niveles bajos y que desencadena una muerte celular programada. Lo anterior le brinda ventajas a este compuesto, sugiriendo la necesidad de realizar pruebas del compuesto en modelos in vivo, para estudiar su posible potencial terapéutico.

CONCLUSIONES

- El compuesto 2a afecta de manera negativa el potencial proliferativo de las células tumorales de mama MDA-MB-231, MCF-7 y JC de manera dependiente de la dosis, con valores de IC_{50} de 0.12, 0.15 y 0.16 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.
- El compuesto 2a induce baja actividad necrótica en células tumorales de mama a las concentraciones de IC_{50} determinadas para las líneas MDA-MB-231, MCF-7 y JC.
- 2a induce cambios morfológicos característicos de muerte celular programada tipo 1.
- Las líneas celulares son inducidas hacia la eliminación celular tipo apoptótica, tras el tratamiento con 2a.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008). Molecular biology of the cell, *Garland Science, New York, NY, 5th edition, 1616 pp.*, ISBN 978-0-8153-4105-5.
2. American Cáncer Society. (2019). Cáncer de seno. Cirugía para el cáncer de seno. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/cirugia-del-cancer-de-seno.html>
3. Amir Mm, Khan S, Rehman Z, Shah A, Butler I. (2014). Anticancer Activity of organotin IV carboxylates. *Inorganica Chimica Acta Volume 423, Part B (14-25)*.
4. Arce C, Bargalló E, Villaseñor Y, Gamboa C, Lara F, Pérez V, Salinas C. (2011). Oncoguía: Cáncer de mama. *Cancerología (77 – 86)*.
5. Banti C, Hadjikakou K, Sismanoglu T, Hadjiliadis N. (2019). Antiproliferative and antitumor activity of organotin (IV) compounds. An overview of the last decade and future perspectives. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.02.003.
6. Benedí J, Gómez M. (2006). Fármacos antineoplásicos. *Rev. Farmacia profesional. Vol. 20. Núm. 2. (60-65)*.
7. Caicedo J, Quintero N, Robledo J, Perry M, Ramírez C, Duarte C, Ángel M, Díaz S, Orozco A, Viaña L, Torregrosa E, Torres F, Sánchez R. (2007). Cáncer de seno y hormonoterapia. Estado actual. *Rev. Col Sir Vol. 22 No. 1*.
8. Cárdenas J, Bargalló E, Erazo A, Maafs E, Poitevin A. (2013). Consenso mexicano sobre tratamiento del cáncer mamario. Colima. Quinta Revisión.
9. Dillon D, Guidi A, Schnitt S. (2010). Pathology of invasive breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast. 4th ed. Philadelphia, (374–407)*.
10. Esser C. (2007). Immunotoxicology. *Comprehensive Medicinal Chemistry II, (215–229)*. doi:10.1016/b0-08-045044-x/00282-0.

11. Galván J, Ramírez A, Nieto A, Hernandez S, Gomez E. (2017). Schiff base Sn(IV) complexes as cytotoxic agents: Synthesis, structure, isosteric and bioisosteric replacement. *Journal of Organometallic Chemistry* 848 (332-343).
12. Galvan J, Chans G, Ramírez T, Nieto A, Hernández S, Gómez E. (2017). Tin (IV) Schiff base complexes derived from pyridoxal: Synthesis, spectroscopic properties and cytotoxicity. *Appl Organometal Chem*.
13. Gasser G, Ott I, Metzler, Nolte. (2011). Organometallic anticancer compounds. *J MED CHEM* 54: (3-25) Doi: 10.1021/jm100020w.
14. Golstein P, & Kroemer G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), (37–43). doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001.
15. González J. & Ugalde C. (2012). la glándula mamaria, embriología, histología, anatomía y una de sus principales patologías, el cáncer de mama. *Revista médica de costa rica y Centroamérica* lxxix (317-320).
16. Imigo G, Mansilla S, Delama G, Poblete M, Fonfach C. (2011). Clasificación molecular del cáncer de mama. *Universidad Austral de Chile. Cuad. Cir*; 25 (67-74).
17. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (2021). *Comunicado de prensa núm. 571/21*.
18. Jaouen, G., & Metzler-Nolte, N. (2010). Medicinal Organometallic Chemistry. *Topics in Organometallic Chemistry*. doi:10.1007/978-3-642-13185-1.
19. Jiménez L, Merchant H. (2003). Biología celular y molecular. México *Editorial prentice hall/Pearson. Primera edición. 912 pp. ISBN: 970-26-0387-0*
20. Junying Yuang. (2016). Cell Signaling Technology. Death Receptor Signaling. <https://www.cellsignal.co.uk/pathways/death-receptor-signaling>
21. Karp, G. (2009). Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. 5a ed. México D.F.: *McGraw- Hill Interamericana. 776 pp ISBN:970-106-925-0*.

22. Kaja S, Payne A, Naumchuk Y, Koulen P. (2017). Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes. *Curr Protoc Toxicol* May 2 doi: 10.1002/cptx.21.
23. Martínez F, Lopez I, Peña C, Villalba L. (2021). *revista Ocronos. Vol. IV. Nº 9–Septiembre. Pág. Inicial: Vol. IV; nº9: 59*
24. Organización Mundial de la Salud. (2020). Cáncer. Tratamiento del cáncer. *Cáncer* (who.int)
25. Papadimitriou M, Hatzidaki E, Papatotiriou I, (2019). Linearity Comparison of Three Colorimetric Cytotoxicity Assays. *Journal of Cancer Therapy, Vol.10 No.7.*
26. Ramírez M, Rojas M. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia Universidad de Antioquia Medellín, Colombia, vol. 23, núm. 2, (166-177).*
27. Reynoso N, Torres J. (2018). Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual Vol. 8, Núm. 1.*
28. Rizo D, Nájera A, Arenas M. (2016). Conocimientos básicos de oncología radioterápica para la enseñanza de pre-grado. España. *Ediciones de la universidad de castilla –La manche.* (43-50)
https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/9411/Radioterapia_open_def.pdf?sequence=4&isAllowed=y
29. Santos E. (2008). Importancia del diagnóstico en cáncer. *Centro de investigación del cáncer. Ed. Elecé Artes Gráficas. S.L.*
30. Saraste a, Pulkki K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research, Volume 45, 3, (528–537),* [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00384-3.](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00384-3)
31. Snoeij J, Penninks H, & Seinen W. (1987). Biological activity of organotin compounds—An overview. *Environmental Research, 44(2), (335–353).* doi:10.1016/s0013-9351(87)80242-6

32. Syntichaki P, & Tavernarakis N. (2002). Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?. *EMBO reports*, 3(7), (604–609). <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf138>.
33. The Global Cancer Observatory (2018). GLOBOCAN <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>.
34. Torrades, S. (2003) El origen genético del cáncer de mama. *OFFARM Vol. 22. Núm. 6.* (108-112).
35. Valdespino G. & Valdespino C. (2008). Terapias moleculares dirigidas en los pacientes con cáncer; logros y perspectivas. *Gac Méd Méx Vol 144 No. 4.*
36. Valdespino V, Valdespino V. (2011). *Iniciación y progresión del cáncer: un sistema biológico. GAMO;10* (358-365).
37. Wang Z, Liu y, & Cui Y. (2005). Pathways to caspase activation. *Cell Biology International*, 29(7), (489–496). doi:10.1016/j.cellbi.2005.04.001.