



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

ZARAGOZA, LAB 6, 2° PISO

**Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de
compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV)
derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal en la
línea celular de cáncer de cérvix CaSki**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

FLORES ORTEGA LUIS DANIEL

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



**F E S
ZARAGOZA**

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.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de los proyectos:

PAPIIT-IN219221

PAPIIT-IN215922

“Una parte de nuestro ser sabe que es de aquí de donde procedemos. Ansiamos volver, y podemos hacerlo. Porque el cosmos también está dentro de nosotros. Estamos hechos de materia estelar, y somos el medio para que el cosmos se conozca a sí mismo”

-Carl Sagan

Agradecimientos

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez, por la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, por brindarme todos los recursos y conocimientos necesarios para la elaboración de este trabajo, por las lecciones aprendidas a su lado y las herramientas que me ayudaron a afianzar mi pasión por la ciencia.

A la Dra. Elizabeth Gómez del Instituto de Química, por proporcionar los compuestos evaluados en el presente trabajo

Al Dr. Hugo López Muñoz, por inspirar la pasión por la investigación, por su invaluable conocimiento y consejos en las metodologías, y por siempre tener respuesta para cualquier pregunta imaginable.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández, por aportar sus conocimientos y brindarme el material necesario, por incluso llegar a aconsejarme fuera de sus horas de trabajo

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por su apoyo y conocimientos en las metodologías, en especial aquellas relacionadas con la microscopia, gracias por darme la llave para abrir esa puerta a un mundo oculto y contagiar el amor por su profesión

Al Dr. Israel Muñoz Velasco por su asistencia técnica prestada para el desarrollo de la presente.

A Dios, gracias por el sitio que me regalaste en la vida, por la salud, por las oportunidades, por los tropiezos y por todas las lecciones que he aprendido, pero, sobre todo, gracias por la gente que has puesto en mi camino.

A mi madre, María Cristina Ortega, este logro es tan tuyo como lo es mío, eres la persona a quien más admiro en el mundo y mi mayor aspiración es llegar a ser tan gran ser humano como lo eres tú. Gracias por tu inteligencia, tu amor incondicional, por confiar en mí desde el día en que nací y por ser mi principal motor para hacer cumplir mis sueños, te amo.

Al Vicho, mi hermano y mi mejor amigo, gracias por iluminar mi vida con tantas sonrisas y momentos épicos, por ser mutuos confidentes cada que quebrábamos un florero de la casa. Crecer a tu lado y tenerte en mi vida ha sido el mejor regalo de reyes, pues sé que jamás estuve, estoy, ni estaré solo, tú también eres parte del motor que me impulsa a ser mejor.

A mi abuelito, sin restar merito a mi madre quien ha sido suficiente mamá y papá ella sola, por ser una figura paterna para mí, por las veces que hemos reparado, instalado e incluso descompuesto algunas cosas de la casa, por el sentido del humor que tanto te caracteriza, y por las lecciones que me enseñas al dejarme vivir tu vida a través de tus relatos.

A mis padrinos, Jorge y Male, por ser grandes ejemplos y guías en mi vida, por cada regaño y consejo, pues ustedes forman parte del ser humano que soy ahora.

A Jol, Merly, Alex, Alma, Agustín, Alejandra, Charly, Brenda, Gavino, Marina, por siempre mostrar su amor y afecto, y hacerme sentir la persona más afortunada por la familia que tengo, gracias por impulsarme a siempre buscar más en esta vida.

A Yael, Eric, Checha, Xime, Ferchis, Frifri, Vero, Carla, Cris, Daiwik, Janet, Stef, Brayan y Pepillo, por compartir los buenos momentos y por estar unidos en los no tan buenos, por todas las risas que pasamos juntos, las fiestas y las canciones cantadas a todo pulmón. Mención especial a Choss, gracias por compartir tu tiempo aquel fin de semana para enseñarme a estudiar, esa herramienta particular me trajo hasta acá.

A mis reales, Brayan, Omar y Peña, por abrirnos paso a golpes desde prepa, siempre echar desorden juntos, inventar grandes momentos y apoyarme en mi carrera en la NBA, los tqm

A los mf's, Aldo, Uro, Roro, Dianap y Pat, por cada tarea, exposición y examen que organizamos juntos jaja, por cada fies..., digo, practica de campo, por compartir sueños e impulsarnos juntos en nuestra vida profesional, la universidad habría sido gris sin ustedes a mi lado

A Brenda, por acompañarme en la etapa más divertida y emocionante de mi vida hasta el momento, por siempre alentar mutuamente nuestra pasión por la ciencia y por andar de chillones por el cambio climático en una playa del caribe

A Ferxo, por siempre brindarme células, por ayudarme a ser paciente con el trabajo y hacer una broma por cada experimento fallido, por el relajo y por convertirse en otro de mis reales.

A Elena, Ivan, Dany, Dany, Ana, Alexa, Yorch, Uri, Karen, Moni, Vic, Nat, Alan y David, por hacer que el L6 2° piso de la UMIEZ se sintiera como un hogar, por todas las risas que vivimos mientras realizaba este trabajo, por su apoyo y sobre todo por su amistad. Mención especial a Ana Mor, por todas las aventuras que vivimos por primera vez y por vivir juntos uno de los momentos más raros de la vida universitaria, fue mas fácil pasarlo gracias a ti.

Índice

Agradecimientos.....	4
1. Resumen.....	1
2. Marco Teórico.....	2
2.1. La célula.....	2
2.2. Ciclo celular.....	2
2.3. Muerte Celular.....	4
2.3.1. Necrosis.....	4
2.3.2. Apoptosis.....	5
2.4. Cáncer.....	8
2.4.1 Cáncer de Cérvix.....	10
2.4.2 Tratamientos.....	13
2.5. Compuestos de Organoestaño.....	14
3. Planteamiento del problema.....	21
4. Justificación.....	22
5. Hipótesis.....	23
6. Objetivos.....	24
7. Método.....	25
7.1. Cultivo celular.....	25
7.2. Preparación de la solución stock de los compuestos 4C, 4E y 4F.....	25
7.3. Actividad antiproliferativa de los compuestos 4C, 4E 4F mediante la técnica de incorporación de cristal violeta.....	25
7.4. Determinación de la muerte celular necrótica a través de la presencia de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares.....	26
7.5. Evaluación de la morfología celular apoptótica por microscopia de fluorescencia con tinción de DAPI.....	26
7.6. Evaluación de muerte por apoptosis mediante inmunodetección de caspasa-3 activa por microscopia de fluorescencia.....	27
7.7. Análisis Estadístico.....	27
8. Resultados.....	28
9. Discusión de Resultados.....	35
10. Conclusiones.....	37
11. Referencias.....	38
12. Apéndice.....	45

1. Resumen

El cáncer de cuello uterino es la séptima neoplasia más frecuente en la población mundial y la cuarta más común entre las mujeres. En los países en vías de desarrollo el acceso a medidas preventivas es limitado y, a menudo, el cáncer de cuello uterino no se identifica hasta que se encuentra en un estado avanzado y se presentan los síntomas. Los tratamientos que eliminan las células cancerosas suelen generar reacciones citotóxicas y no selectivas que destruyen las células no tumorales que crecen y se dividen con rapidez, generando efectos que demeritan la calidad de vida del paciente.

Debido al éxito del cisplatino como tratamiento contra el cáncer, aumentó el interés general en el desarrollo de complejos organometálicos con actividad anticancerígena, menor toxicidad y mecanismos antitumorales específicos dentro de los cuales, los complejos de organoestaño (IV) de bases de Schiff que contienen piridoxal se les ha reportado actividad antitumoral y carácter inductor de apoptosis.

Con el propósito de aportar información, en el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de los compuestos de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal (4C, 4E y 4F) de reciente síntesis en la línea celular de cáncer de cérvix CaSki.

Los resultados obtenidos mostraron que los compuestos 4C, 4E y 4F presentaron actividad antiproliferativa de manera dosis-dependiente con IC₅₀ de 1.82, 1.95 y 1.62 μ M, respectivamente. En cuanto a la actividad citotóxica (necrótica), los cultivos de células CaSki presentaron valores <10% de actividad de LDH, al ser tratadas con los compuestos 4C, 4E y 4F, lo que sugiere que el decremento en el número celular es debido a un proceso diferente al de la necrosis. Finalmente, la observación de células con una morfología con características propias de células apoptóticas, así como, la observación de células positivas a la caspasa-3 activa, determinadas por microscopia de contraste de fase, tinción con DAPI e inmunolocalización de caspasa-3 activa respectivamente en los cultivos tratados con estos compuestos, sugiere que inducen a las células tumorales a una muerte apoptótica. Considerando todos los resultados juntos, estos compuestos 4C, 4E y 4F podrían ser considerados excelentes candidatos para ser estudiados como agentes anticancerígenos con potencial terapéutico.

2. Marco Teórico

2.1. La célula

Los seres vivos estamos compuestos por células, fábricas químicas intrincadamente organizadas que toman materia de su entorno y utilizan estos materiales para generar copias de sí mismas (Alberts *et al.*, 2015). Sin embargo, la comprensión de que los organismos están compuestos por células es de origen relativamente reciente. El crédito sobre este descubrimiento generalmente se le da a Robert Hooke, por la introducción de la palabra “célula” en 1665 para indicar las estructuras que ahora consideramos los componentes básicos de los tejidos (Mummery *et al.*, 2021). Pero no fue hasta casi dos siglos después en 1839 que Matthias Schleiden informara la presencia de células nucleadas en las plantas y posteriormente, su colega Theodore Schwann observara el mismo fenómeno en tejidos animales, concluyendo que “todos los organismos están compuestos por una o más células” y que “la célula es la unidad estructural de la vida”, dos principios de la actual Teoría Celular (Hadju, 2002).

Tendría que pasar una década más para la llegada del tercer principio de la Teoría Celular, propuesto por Rudolf Virchow en 1855 el cual postuló “las células solo se originan a partir de una célula preexistente” (Iwasa y Marshall, 2020). El mecanismo que permite el origen de células a partir de otras células vivas se denomina ciclo celular.

2.2. Ciclo celular

El ciclo celular es la progresión ordenada de las células a través de etapas específicas durante las cuales el ADN se replica y distribuye a dos células hijas (proliferación) (Alberts *et al.*, 2015). Este ciclo se divide en cuatro fases. Después de la división celular, las células hijas pueden entrar a un estado fisiológico de “reposo” (G0) donde la célula realiza su función, o pasar por un periodo de crecimiento (G1) donde se sintetizan proteínas celulares, ARN, membranas y otras macromoléculas. A G1 le sigue un periodo de síntesis de ADN (S) y luego otro periodo de crecimiento (G2). A G2 le sigue la mitosis (M), durante la cual se produce la condensación cromosómica, la ruptura de la envoltura nuclear, la formación de los husos mitóticos, la unión de los cromosomas a los husos y la separación de las cromátidas hermanas. El ciclo celular se completa con la separación de las dos células hijas (citocinesis) (Poon, 2015).

La progresión dentro del ciclo celular es estrictamente controlada por una serie de proteínas serina/treonina cinasas dependientes de ciclina bien conservadas denominadas CDK. La actividad de las CDK se controla en tres niveles. Primero, las CDK se activan por su interacción con proteínas llamadas ciclinas. Mientras que las CDK se expresan constitutivamente a lo largo del ciclo celular, el nivel de las ciclinas varía a lo largo del mismo. Los complejos específicos ciclina-CDK

funcionan en diferentes fases del ciclo celular (Cooper y Hausman, 2019) (**Figura 1**).

Como segundo nivel de regulación las ciclinas están controlados tanto por la síntesis regulada como por la proteólisis mediada por ubiquitina. La inducción de miembros de la familia de la ciclina D (necesarios para la progresión a través de G1) es provocada por una señal extracelular o factor de crecimiento, lo que permite coordinar la división de células individuales de acuerdo con las necesidades del organismo en su conjunto. Estas señales extracelulares inician la entrada de células en reposo o no proliferantes de G0 a G1 (Yang y Sheridan, 2014) (**Figura 1**).

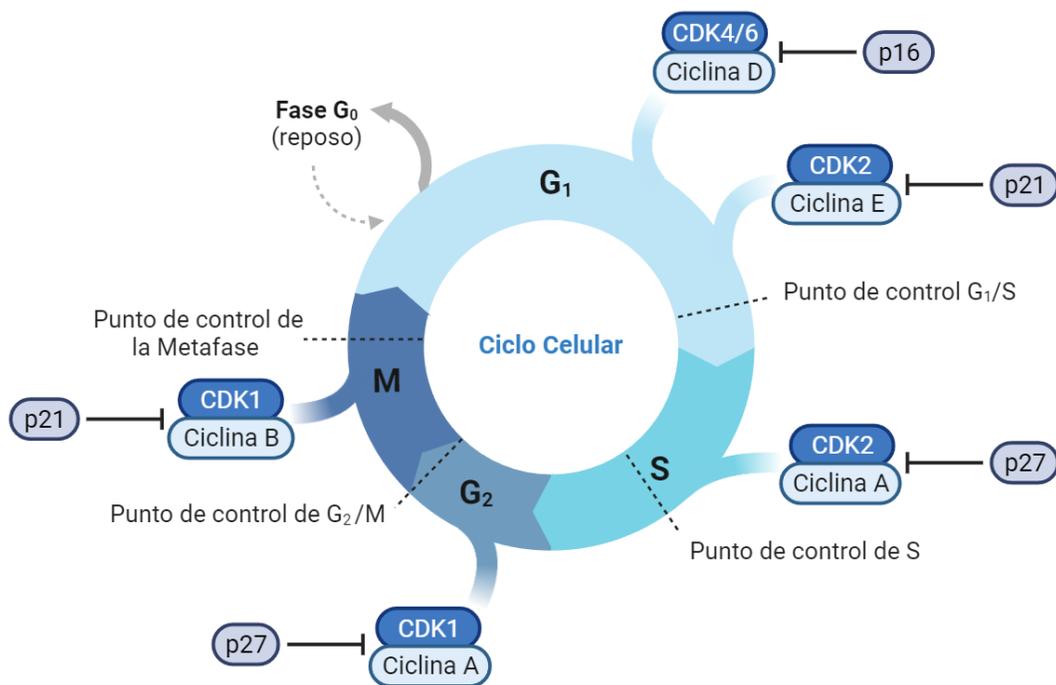


Figura 1. Fases del ciclo celular (G₁, S, G₂ y M), fase G₀, complejos ciclina-CDK que lo regulan y puntos de control de éste. Figura basada en el modelo de Cooper y Hausman (2017) modificado en <https://www.biorender.com/>.

Un tercer nivel de regulación se logra mediante mecanismos de vigilancia denominados puntos de control, estos monitorean varios eventos, detectando daños en el ADN e induciendo la detención del ciclo celular y los mecanismos de reparación del ADN para garantizar que cada etapa del ciclo se complete antes de que se inicie la siguiente etapa. Las vías del punto de control del daño del ADN inhiben la expresión de ciclinas, activan su degradación y promueven las fosforilaciones inhibitoras de CDK para detener las células en las fases G₁, S o G₂ (Weitzman *et al.*, 2021) (Figura 1).

Los puntos de control del ciclo celular son reversibles, lo que permite reanudar la progresión del ciclo celular después de que se hayan reparado todos los defectos y completado los procesos correctamente, sin embargo, en caso de que los daños sean demasiado graves y no puedan repararse por completo, los mismos mecanismos de control inducen una detención permanente del ciclo celular (senescencia celular) o desencadenan la muerte celular (Ventura y Giordano, 2019).

2.3. Muerte Celular

La muerte también es considerada una de las propiedades más básicas de la vida, pues sólo las entidades vivas encaran este proceso. Como organismos multicelulares, existe un esfuerzo constante por mantener un equilibrio homeostático entre la cantidad de células nuevas que se generan a través de la mitosis y la cantidad de células dañadas o no requeridas que se eliminan del cuerpo (D'Arcy, 2019).

Las células de mamíferos expuestas a perturbaciones irreversibles del microambiente intracelular o extracelular pueden activar una de las muchas cascadas de transducción de señales que finalmente conducen a su desaparición. Cada uno de estos modos de muerte celular regulada (apoptosis, autofagia, *anoikis*, ferroptosis, necroptosis, piroptosis por mencionar algunos) se inicia y propaga mediante mecanismos moleculares que muestran un grado considerable de interconectividad. Además, cada tipo de muerte celular regulada puede manifestarse con un espectro completo de características morfológicas que van desde completamente necrótico hasta completamente apoptótico (Galluzzi *et al.*, 2018).

De acuerdo con el NCCD (por sus siglas *Nomenclatures Committe on Cell Death*) (2018) menciona que dichos morfotipos, junto con los mecanismos mediante los cuales se eliminan las células muertas y sus fragmentos, se han empleado históricamente para clasificar la muerte celular en tres formas diferentes: muerte celular tipo I o apoptosis; muerte celular tipo II o autofagia; y muerte celular tipo III o necrosis (Galluzzi *et al.*, 2018).

2.3.1. Necrosis

La necrosis es una forma no controlada de muerte celular inducida por una lesión externa, como hipoxia o inflamación. En contraste con la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular independiente de energía, donde la célula se daña tan gravemente por un choque repentino (radiación, calor, productos químicos, hipoxia, etc.) que no puede funcionar (D'Arcy, 2019).

El aspecto morfológico de la necrosis suele ser el de la oncosis. La expresión oncosis define una morfología de muerte celular con hinchazón citoplasmática, ruptura mecánica de la membrana plasmática, dilatación de organelos citoplasmáticos (mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi), concluyendo en la liberación del contenido citoplasmático al medio

exterior, generando una respuesta inflamatoria en organismos superiores (**Figura 2**) (Kroemer *et al.*, 2005).

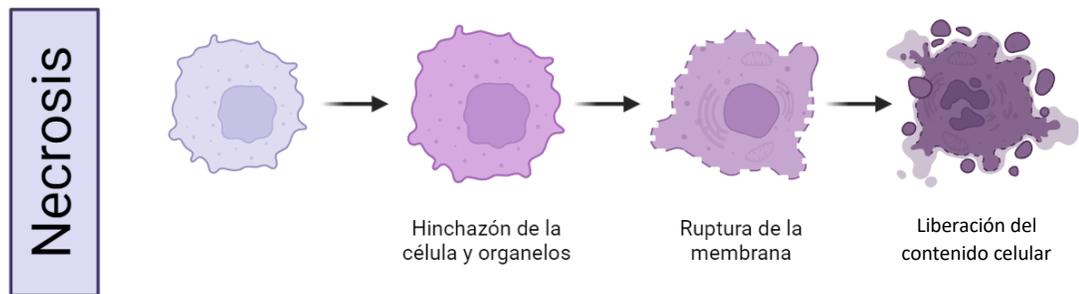


Figura 2. Características morfológicas de la muerte celular necrótica. Imagen basada en el modelo de Cooper y Hausman (2017) y modificada en <https://www.biorender.com/>.

2.3.2. Apoptosis

La apoptosis es la muerte celular programada que involucra el desmantelamiento controlado de los componentes intracelulares sin derramar su contenido en el entorno circundante (Lodish *et al.*, 2016). Las características morfológicas de la apoptosis incluyen la fragmentación del ADN cromosómico como resultado de la escisión entre nucleosomas, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, y finalmente el encogimiento de la célula y su rotura en fragmentos encerrados de membrana llamados cuerpos apoptóticos (**Figura 3**). La eliminación de los restos celulares es mediada por la expresión de las llamadas señales de “cómeme” en la superficie celular (Cooper y Hausman, 2019).

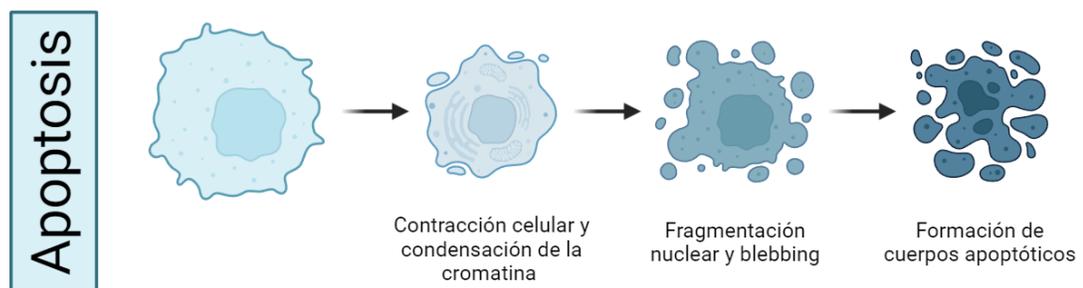


Figura 3. Características morfológicas de la muerte celular apoptótica Imagen basada en el modelo de Cooper y Hausman (2017) y modificada en <https://www.biorender.com/>.

La apoptosis es ejecutada por las caspasas, cisteína proteasas con especificidad de escisión de aspartato en las proteínas sustrato. Todas las caspasas recién sintetizadas existen como zimógenos catalíticamente inactivos en las células (Chai y Shi, 2014). Estos zimógenos de procaspasa

requieren procesamiento enzimático para lograr una conformación completamente activa. Existen dos vías apoptóticas que pueden distinguirse por las caspasas adaptadoras e iniciadoras involucradas, la vía extrínseca o intrínseca (McIlwain *et al.*, 2013).

Vía intrínseca

La vía intrínseca, también conocida como la vía mitocondrial, se desencadena por la desregulación o el desequilibrio en la homeostasis intracelular por agentes tóxicos o daños en el ADN. Se caracteriza por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, que da como resultado la liberación de citocromo C en el citosol. La liberación del citocromo C al citosol es promovida por proteínas proapoptóticas de la familia BCL-2, como BAX y BAK (Bertheloot *et al.*, 2021).

El citocromo C se une y promueve la oligomerización del factor activador de proteasa apoptótica 1 (APAF-1) en una forma heptamérica. APAF-1 contiene un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) que interactúa con la CARD de procaspasa 9 para formar el apoptosoma, un complejo masivo compuesto por el citocromo C, APAF-1 y procaspasa 9. Dentro del apoptosoma, la procaspasa 9 se activa a caspasa 9 y escinde las proformas de las proteasas caspasa 3 y caspasa 7 y desencadena su función efectora de la apoptosis (Bertheloot *et al.*, 2021).

Vía extrínseca

En la vía extrínseca (también conocida como apoptosis mediada por receptor de muerte), las señales extracelulares son reconocidas por receptores de muerte en la membrana plasmática e inducen la muerte. Esta señal de inicio puede provenir del medio ambiente, sistema inmunitario o células vecinas. Los ligandos de muerte son reconocidos por sus respectivos receptores específicos de muerte en la superficie celular. La región intracelular de estos receptores de muerte, tras la ligadura de sus respectivos ligandos, reclutan a la proteína con dominio de muerte asociado a FAS (FADD) y la proteína con dominio de muerte asociado a TNFRSF1A (TRADD). Ambos adaptadores contienen dominios de muerte, y las interacciones homotípicas entre estos dominios (también presentes en la procaspasa-8) están involucradas en el reclutamiento de procaspasa-8 en el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) donde se activa. La caspasa 8 activada escinde directamente la procaspasa-3 y procaspasa-7, activando estas caspasas para ejecutar la muerte celular (Ketelut y Fitzgerald, 2022).

La apoptosis intrínseca y extrínseca comparten componentes comunes de la vía: las caspasas efectoras-3 y -7, las cuales se encuentran en el extremo terminal de la cascada de caspasas y son cruciales para la apoptosis (**Figura 4**). La activación de las caspasas-3 y -7 da como resultado los rasgos

morfológicos característicos de la apoptosis y también marca el punto de no retorno en esta vía de muerte celular. Estas caspasas escinden una serie de sustratos, incluida la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), la proteína quinasa asociada a Rho I (ROCK1), la ATPasa 11A/C, la proteína 8 relacionada a Xk, y el inhibidor de la ADNasa activada por caspasa (ICAD). Una vez activadas, la caspasa-3 y la caspasa-7 median múltiples pasos en la apoptosis. La activación de ROCK1 por escisión mediada por caspasa-3 (además de modular el ensamblaje del filamento de actina-miosina y la contractilidad celular) fosforila la cadena ligera de miosina (MLC). Una vez fosforilada, la MLC inicia los eventos físicos que impulsan la formación de ampollas en la membrana: contracción de actinmiosina, deslaminación del citoesqueleto cortical y contracción celular. Además, las caspasa-3 y -7 activan varias otras procaspasas (es decir, caspasa-2, -6, -8 y -10) escindiéndolas proteolíticamente en sus formas activas y amplificando aún más la señal de apoptosis (Ketelut y Fitzgerald, 2022).

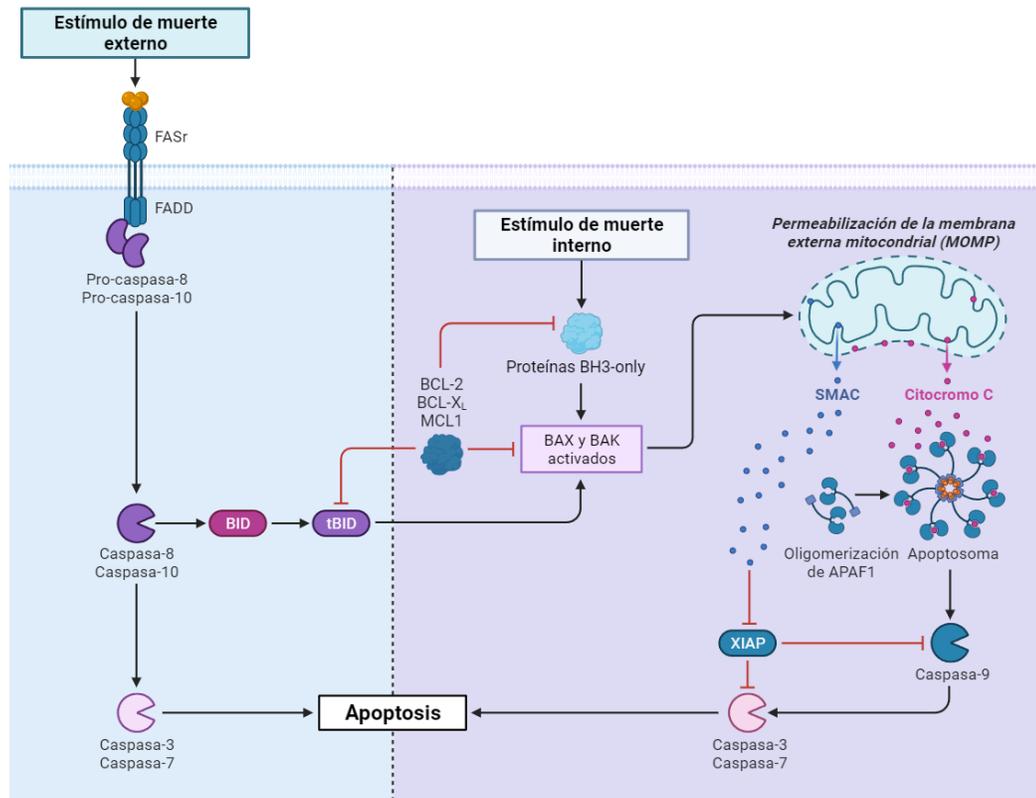


Figura 4. Rutas de señalización de la vía intrínseca (izquierda) y extrínseca (derecha) de la muerte celular apoptótica. Imagen basada en el modelo de Cooper y Hausman (2017) y modificada en <https://www.biorender.com/>.

Como se ha descrito hasta el momento, para garantizar la transmisión fiel de las secuencias genómicas al ADN de la progenie, todas las células vivas

expresan factores de vigilancia específicos que activan una red de vías de señalización para regular la detención del ciclo celular, la reparación del ADN, la muerte celular programada y la destrucción celular (Wang, 2019). Sin embargo, cuando se pierden estos mecanismos a causa del daño genético, las células empiezan a dividirse sin existir una señal de proliferación, fallan en percibir las señales que restringen la división celular y muerte, un desequilibrio en estas rutas de señalización pueden favorecer el estado carcinogénico de la célula, propiciando la aparición del cáncer (Lodish *et al.*, 2016).

2.4. Cáncer

El cáncer tiene dos propiedades definitorias, la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y la capacidad de invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos. Es la combinación de estas propiedades que hacen que el cáncer sea particularmente peligroso (Alberts *et al.*, 2015).

La célula progenitora original que da lugar a un tumor no adquiere inicialmente todas las características de una célula cancerosa. Por el contrario, el proceso de formación del cáncer llamado oncogénesis o tumorigénesis, es un proceso de múltiples pasos que involucra la mutación y selección de células que crea progresivamente un tipo celular de rápida proliferación que escapa a las restricciones del crecimiento normal, creando una oportunidad para mutaciones adicionales (Cooper y Hausman, 2019).

En el 2000, Hanahan y Weinberg propusieron los sellos distintivos del cáncer (**Figura 5**), un modelo para analizar las complejidades de la enfermedad neoplásica. Estas comprenden seis capacidades biológicas que las células normales adquieren a medida evolucionan progresivamente hacia un estado neoplásico y les permiten volverse tumorigénicas y finalmente malignas (Hanahan y Weinberg, 2011).

Estos sellos incluyen la señalización proliferativa sostenida, evasión de los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalización replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis. Cada uno de estos cambios fisiológicos representa la ruptura exitosa de un mecanismo de defensa anticancerígeno integrado en células y tejidos (Hanahan y Weinberg, 2000).

En el 2011, se agregaron dos sellos habilitadores: la inestabilidad del genoma, que genera la diversidad genética que acelera su adquisición, y la inflamación, que fomenta múltiples funciones distintivas; y dos sellos emergentes de

generalidad potencial a la lista: la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción inmune (Hanahan y Weinberg, 2011).

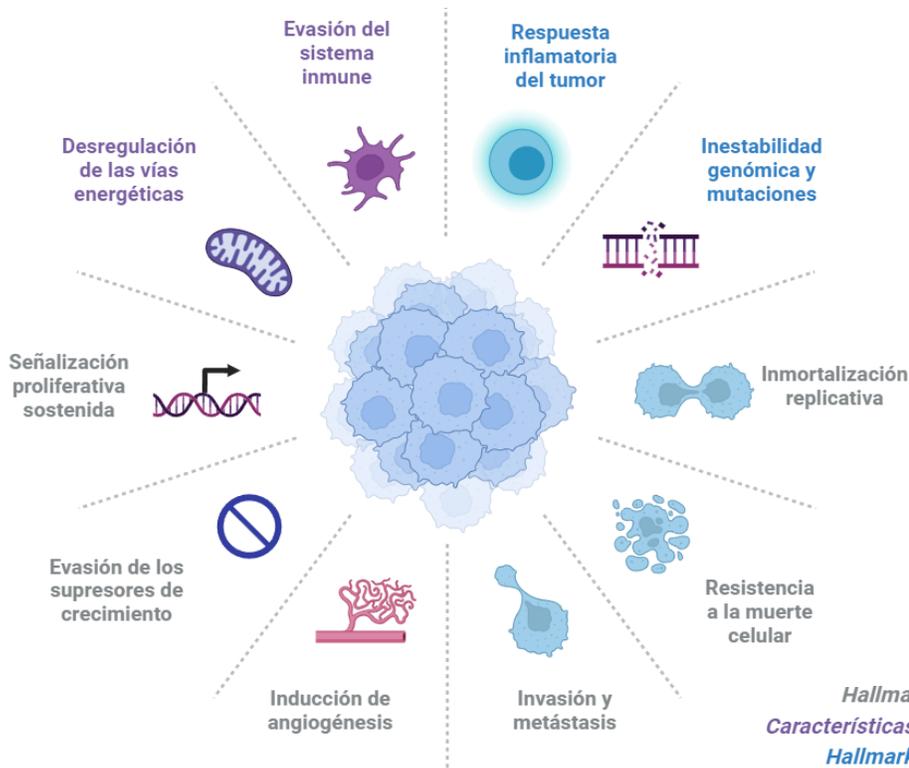


Figura 5. Características o sellos distintivos del cáncer. Imagen basada en el modelo de Hanahan y Weinberg (2011) y modificada en <https://www.biorender.com/>.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo: en 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones, es decir, casi una de cada seis muertes registradas, siendo los tipos de cáncer más comunes el de mama, pulmón, colon, recto y próstata.

El cáncer se clasifica tradicionalmente según el tipo de tejido y célula a partir del que surgen. Los carcinomas surgen de las células epiteliales y son los más comunes en los seres humanos. Los sarcomas surgen del tejido conectivo o de las células musculares. Las leucemias y linfomas, derivados de los glóbulos blancos y sus precursores (Alberts *et al.*, 2015).

Dado que el desarrollo de la malignidad es un proceso complejo de varios pasos, muchos factores pueden afectar la probabilidad de desarrollar cáncer, y es

demasiado simplista hablar de causas únicas de la mayoría de los tipos de cáncer. No obstante, muchos agentes, incluidos la radiación, los productos químicos y los virus, inducen cáncer tanto en animales de experimentación como en seres humanos. A éstos se les denomina carcinógenos (Cooper y Hausman, 2019). La radiación y la mayoría de los carcinógenos químicos actúan dañando el ADN e induciendo mutaciones. Otros, por su parte, contribuyen al desarrollo del cáncer al estimular la proliferación celular, a éstos se les denominan promotores tumorales. Además, varios tipos de virus (llamados virus tumorales) causan cáncer. Los cánceres causados por virus incluyen el cáncer de hígado y el carcinoma de cuello uterino, que en conjunto representan del 10 al 20% de la incidencia mundial de cáncer (Cooper y Hausman, 2019).

2.4.1 Cáncer de Cérvix

El cáncer de cuello uterino es la séptima neoplasia más frecuente en la población mundial y la cuarta más común entre las mujeres, con un estimado de 604,000 casos nuevos y 342,000 muertes en 2020. En países desarrollados la tendencia a la mortalidad es descendente debido a una mejora en las condiciones sociales y la respuesta de los sistemas de salud. Por lo tanto, constituye un indicador de desigualdad, ya que la mortalidad tiende a concentrarse a las regiones más desfavorecidas. Alrededor del 90% de los casos nuevos y muertes en todo el mundo en 2020 ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos (WHO, 2022).

En México, para el 2020 el cáncer de cuello uterino es el segundo más diagnosticado y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, con un estimado de 9,439 nuevos casos y 4,335 muertes. Una tasa de incidencia de 12.6 y de mortalidad de 5.7 por 100,000 mujeres (IMSS, 2022).

Para entender este padecimiento debemos explicar la morfología del cuello uterino. Este es la porción final, inferior y estrecha del útero (matriz) que conecta el útero con la vagina (canal de parto). El cuello uterino tiene una organización epitelial compleja y comprende el epitelio estratificado del ectocérvix, el epitelio cilíndrico del endocérvix y la zona de transformación cervical (NCI, 2022).

La ubicación de la unión escamoso-cilíndrica con relación al orificio cervical externo varía en la vida de una mujer y depende de factores como la edad, el momento del ciclo hormonal, los traumatismos del parto y el uso de anticonceptivos o el embarazo. Tras la pubertad y durante el período reproductivo, los genitales femeninos crecen por influencia estrogénica. El cuello uterino se hincha y agranda y el conducto cervical se alarga. Esto conlleva la eversión del epitelio cilíndrico de la parte inferior del conducto cervical hacia el exocérvix. La acción del tampón del moco que cubre las células cilíndricas se perturba cuando el epitelio cilíndrico se ve expuesto al entorno vaginal ácido.

Cuando la acidez vaginal destruye reiteradamente las células del epitelio cilíndrico, produce la aparición de las células de reserva subyacentes, un tipo especializado de células madre, cúbicas, subcilíndricas, que proliferan y se diferencian formando el epitelio escamoso metaplásico. Por metaplasia entendemos el cambio o reemplazo de un tipo de epitelio por otro (Egawa *et al.*, 2015).

La principal causa del cáncer de cuello uterino se encuentra la infección prolongada (persistente) por los tipos de virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo. Hay alrededor de 14 tipos de VPH de alto riesgo. Dos de estos, el VPH16 y el VPH18, causan la mayoría de los cánceres relacionados con el VPH (Rossi y Carozzi, 2019).

Lesiones en la barrera epitelial defensiva estratificada provocan que esta infección pueda desarrollarse. Se cree que la infección por VPH de la capa epitelial basal que mantiene el ectocérvix estratificado resulta más típicamente en la expresión regulada del VPH que facilita la infección persistente (Figura 6) (Doorbar y Griffin, 2019).

Una vez adquirida la infección persistente, el virus de VPH puede infectar a las células de reserva cervical y transformarlas en células atípicas con anomalías nucleares y citoplasmáticas. La proliferación y la expansión no controladas de estas células pueden conducir a la formación de un epitelio displásico anormal que puede persistir como displasia o evolucionar a cáncer invasor al cabo de varios años (NCI, 2020).

Los cánceres de cuello uterino llevan el nombre del tipo de célula donde comenzó el cáncer. La mayoría de los cánceres de cuello uterino (hasta un 90%) son carcinomas de células escamosas. Estos cánceres, que también se conocen como carcinomas epidermoides, se originan en las células del ectocérvix. Por otra parte, los adenocarcinomas de cuello uterino, que también se conocen como adenocarcinomas cervicales, se originan en las células glandulares del endocérvix (Herrington, 2019).

Algunos factores de riesgo aumentan la probabilidad de que una persona con infección por VPH de alto riesgo presente una infección prolongada, tales como: tener un sistema inmunitario debilitado, fumar cigarrillos o estar expuesto de manera pasiva al humo de tabaco, comenzar a tener relaciones sexuales a edad temprana, entre otros (Cohen *et al.*, 2019).

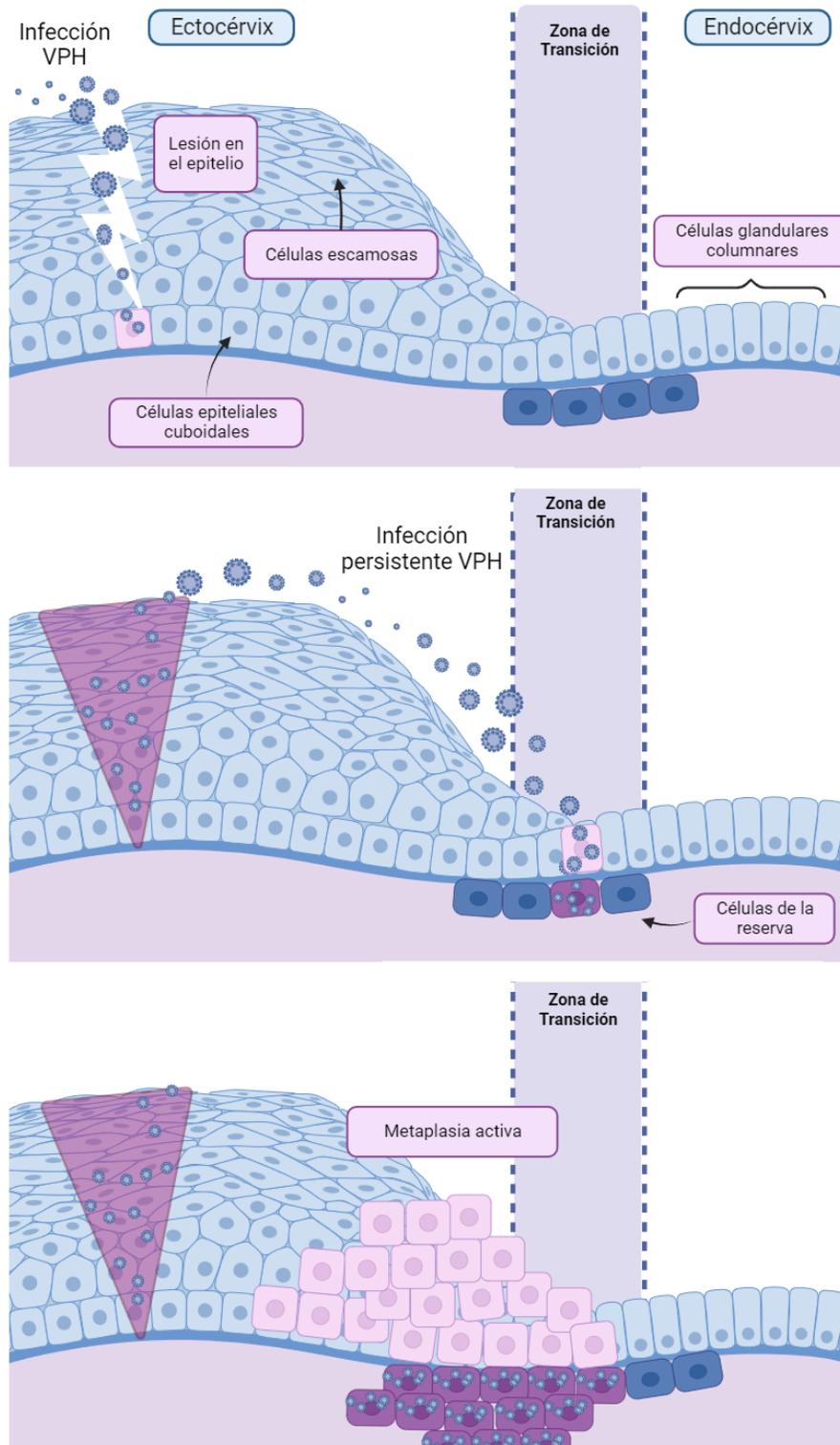


Figura 6. Representación de la infección viral del VPH y el desarrollo del cáncer cervical. Figura basada en el modelo de Doorbar y Griffin (2019), creado en <https://www.biorender.com/>.

2.4.2 Tratamientos

La etapa y la extensión de la progresión del cáncer de cuello uterino determina el tratamiento necesario y este puede ser uno o una combinación de cirugía, radiación y quimioterapia

Cirugía

La cirugía es una técnica comúnmente utilizada y exitosa para combatir varios cánceres en etapa temprana, ya que implica la extirpación física del tejido canceroso. Los tipos de cirugía utilizados para tratar el cáncer de cuello uterino incluyen el procedimiento de escisión electro quirúrgica con asa (LEEP) el cual consiste en extirpar el tejido anormal del cuello uterino mediante un aro o bucle de alambre fino para eliminar tejido anormal (BC Cancer Cervix Screening, 2022).

En la traquelectomía se extirpa el cuello uterino, esta puede ser simple donde se extirpa solo el cuello uterino o radical donde se extirpan el cuello uterino, los tejidos cercanos y la parte superior de la vagina (NCI, 2022).

O en casos más avanzados, la histerectomía: En este procedimiento se retira el útero mediante cirugía. Es una manera de tratar el cáncer de cuello uterino porque se extirpa el cuello del útero y algunas otras estructuras que lo rodean, las diferentes histerectomías que se usan pueden ser: histerectomía total o completa, histerectomía radical e histerectomía radical modificada (Burmeister *et al.*, 2022).

Radioterapia

En la radioterapia, se usan rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para impedir la multiplicación de la células cancerosas al dañar su ADN. Los dos tipos principales de radioterapia son la radioterapia externa y la radioterapia interna (braquiterapia) (Vordermark, 2016).

En la radioterapia externa se usa una máquina que envía radiación desde el exterior del cuerpo hacia el área en la que se encuentra el cáncer.

En la radioterapia interna, se usa una sustancia radiactiva sellada en agujas, semillas, alambres o catéteres que se colocan directamente en el cáncer o cerca de este (Vordermark, 2016).

Quimioterapia

El papel del cisplatino como agente activo en el tratamiento del cáncer de cuello uterino recurrente se estableció a fines de la década de 1980. Otros agentes activos incluyen ifosfamida, bleomicina, 5-fluoracilo, mitomicina C, paclitaxel, gemcitabina y topotecán (Kumar y Gupta, 2016).

El ADN es el objetivo intracelular primario de los medicamentos anticancerígenos, esto es debido a la interacción que existe entre moléculas pequeñas y el ADN, causando daño al material genético y bloqueando la división de las células, lo que resulta en la muerte celular (Woods y Turchi, 2013).

La cirugía rara vez puede extirpar todas las metástasis, y los tratamientos que eliminan las células cancerosas suelen generar reacciones citotóxicas y no selectivas que destruyen las células no tumorales que crecen y se dividen con rapidez (Cheung *et al.*, 2013). El daño a las células sanas debido a estos tratamientos puede causar efectos secundarios directamente relacionados con la actividad necrótica de éstos, que demeritan la calidad de vida del paciente, tales como: cansancio, caída de cabello, anemia, náuseas y vómitos, estreñimiento, aparición de úlceras, cambios en piel y uñas como sequedad o cambio de color, problemas renales, problemas de fertilidad y cambios de peso. (American Cancer Society, 2019). Por esta razón surge la necesidad de encontrar alternativas para el tratamiento del cáncer.

Debido al éxito del cisplatino como tratamiento contra el cáncer, aumentó el interés general en el desarrollo de complejos metálicos con actividad anticancerígena (Ndagi *et al.*, 2017). No obstante, los fármacos a base de platino son poco selectivos, por lo que ocasionan efectos secundarios graves, además, pueden generar resistencia a múltiples fármacos durante la quimioterapia (Wheate *et al.*, 2010). Esto impulsó la síntesis y estudio de complejos con metales biológicamente benignos, en lugar de metales tóxicos como el platino, con actividad anticancerígena, menos toxicidad y mecanismos antitumorales específicos (Galván y Changs., 2017).

Se han sintetizado numerosos compuestos a base de metales con propiedades anticancerígenas prometedoras. Entre estos se encuentran los compuestos organoestánnicos (IV) que han despertado el interés debido a su respuesta farmacológica y su carácter inductor de apoptosis (Galván *et al.*, 2020).

2.5. Compuestos de Organoestaño

Como se mencionó anteriormente, a pesar de que los medicamentos a base de platino tienen una gran eficacia, también tienen serios inconvenientes como la resistencia a los medicamentos, efectos secundarios indeseables, efecto nefrotóxico y alta toxicidad. Debido a este impacto negativo, se diseñaron y sintetizaron muchos compuestos a base de metales distintos del platino (Yusof *et al.*, 2020).

Los compuestos organometálicos se definen como complejos metálicos que contienen al menos un enlace covalente metal-carbono. Estos tienen una gran

variedad estructural y una estereoquímica más diversa que la de los compuestos orgánicos (Gasser *et al.*, 2011).

Dentro de los organometálicos, los compuestos organoestánnicos están ampliamente disponibles, ya que han encontrado una variedad de aplicaciones industriales y agrícolas, y son adecuados como materiales de partida para la síntesis de nuevos derivados (Alama *et al.*, 2009). Dada la gran posibilidad de variación de las fracciones orgánicas y los ligandos donantes unidos al metal, estos compuestos proveen una plataforma versátil para el diseño de fármacos, dando como resultado varios compuestos con actividad antitumoral, mayor eficacia y menor toxicidad (Yusof *et al.*, 2020; Hadjikakou *et al.*, 2009).

Se ha encontrado que la mayoría de los compuestos de organoestaño (IV) inducen la muerte celular a través de la apoptosis, específicamente la vía mitocondrial (Syed *et al.*, 2021; Girasolo *et al.*, 2017), además, se ha demostrado su participación en la detención del ciclo celular (Asanagi *et al.*, 2016; Attanzio *et al.*, 2020).

Si bien los compuestos de organoestaño (IV) son cruciales para los efectos antiproliferativos, el diseño del ligando también desempeña un papel importante en el transporte y la orientación a un sitio específico dentro de las células cancerosas (Alama *et al.*, 2009).

Compuestos de organoestaño (IV) de bases de Schiff

Las bases de Schiff y sus derivados se conocen como ligandos versátiles, con un notable comportamiento quelante y una alta flexibilidad de coordinación (Liu y Hamon, 2019). Esto puede resultar en propiedades biológicas muy diferentes, aunque solo pueden diferir ligeramente en sus estructuras moleculares, lo que los hace útiles para diseñar fármacos o agentes terapéuticos basados en metales que ofrecen un mayor efecto terapéutico, mayor biodisponibilidad y biodistribución (Galván y Ramírez., 2017) (Yusof *et al.*, 2020).

A los compuestos de organoestaño (IV) de bases de Schiff se les ha evaluado actividad antimicrobiana (Saroya *et al.*, 2022) y, además, ha sido bien documentada su actividad antiproliferativa *in vitro* en cultivos de las líneas celulares tumorales MCF-7 (mama humana) (Kapila *et al.*, 2021), MIA PaCa-2 (páncreas), A2780 (ovario), BE2-C (neuroblastoma), SJ-G2 (glioblastoma) (Yusof *et al.*, 2020), A549 (pulmón), PC-3 (próstata) (Devi *et al.*, 2022), Caco-2, HCT-116, HT-29 (colon) (Yu *et al.*, 2022), HL-60 (leucemia) (Hong *et al.*, 2014) y HeLa (cervix) (**Tabla 1**).

Autor	Compuesto	Sustituyente	IC50 μ M
(Wang <i>et al.</i> , 2022)	Compuestos de diorganoestaño (IV) de bases de Schiff diacilhidrazona	R=Metilo	21,88 \pm 0,85
		R=Fenilo	7,54 \pm 0,69
		R=Butilo	0,81 \pm 0,07
(Tan <i>et al.</i> , 2017)	Complejos de organoestaño (IV) de base de Schiff basados en salicilaldehído-o-aminofenol	R ₁ =Nitro R=Fenilo	9,25 \pm 0,21
		R ₁ =H R=Fenilo	8,56 \pm 1,17
		R ₁ =H R=Butilo	7,16 \pm 1,61
		R ₁ =Nitro R=Butilo	2,62 \pm 1,04
(Liu <i>et al.</i> , 2017)	Complejo de organoestaño (IV) derivado de base de Schiff de hidrazona (1) chlorosalicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (2)2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde isonicotinoyl hydrazone	(1) R=Metilo	15.23 \pm 1.15
		(1) R=Fenilo	0.89 \pm 0.50
		(2) R=Metilo	14.50 \pm 1.16
		(2) R=Fenilo	0.68 \pm 0.17
(Yang <i>et al.</i> , 2016)	Complejos de organoestaño (IV) derivados de la base de Schiff N'-[(1E)-(2-hidroxi-3-metoxifenil)metiliden]piridina-3-carbohidrazona	(1) R=Metilo	10.975 \pm 1.011
		(1) R=Butilo	0.399 \pm 0.142
		(1) R=Fenilo	0.824 \pm 0.193
		(2) R=Butilo	0.588 \pm 0.230
		(2) R=Fenilo	1.731 \pm 0.21
(Hazra <i>et al.</i> , 2016)	Complejos de organoestaño (IV) de base de Schiff sulfonados	R=Etilo	27,67 \pm 0,81
		R=Butilo	2,43 \pm 0,54

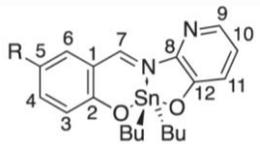
Tabla 1. Muestra los valores de IC50 (efecto antiproliferativo) de diversos compuestos de organoestaño de bases de Schiff sobre la línea celular de cáncer cérvix HeLa, expresados en μ M.

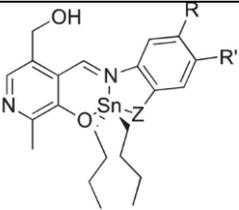
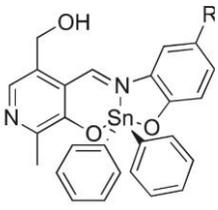
A nivel celular, han sido implicados en una gran cantidad de procesos para tratar de explicar su alta actividad citotóxica, procesos como la inhibición en la síntesis de ADN mediante su unión al grupo fosfato (Devi *et al.*, 2022), interacción por enlace de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Yusof *et al.*, 2020) o por interacción intercalante (Abbas *et al.*, 2022), además, se ha reportado la inducción de apoptosis por alteración de $[Ca^{+2}]$ y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gennari *et al.*, 2000).

Compuestos de organoestaño (IV) de bases de Schiff que contienen piridoxal (vitamina B6)

Los compuestos evaluados en este trabajo usan complejos de base de Schiff derivados de la vitamina B6 (VB6), estos son compuestos importantes debido a sus propiedades dirigidas a los tumores. Se sabe que VB6 es captado por las células a través de una vía de difusión mediada por transportador de membrana transportadora (VTC) de VB6. Dado que las células cancerosas tienen una gran demanda de VB6, los compuestos que tienen este resto podrían lograr la entrada mediada por VTC en las células tumorales con preferencia a las normales (Galván y Changs, 2017).

Sobre los compuestos pentacoordinados de diciclohexil estaño (IV) derivados de ligandos tridentados que contienen piridoxal que serán evaluados en este trabajo, son nulos los estudios puesto que es un compuesto de reciente síntesis. Los antecedentes más cercanos son sobre complejos de organoestaño (IV) a partir de ligandos de bases de Schiff reportados por Galván y Ramírez (2017) los cuales son compuestos de diciclohexilestaño y otros bis(trimetilsilil)metilestaño, Galván y Changs (2017) siendo compuestos de dibutilestaño y difenilestaño, y los reportados por Galván *et al.* (2020) siendo compuestos dibutilestaño. Sin embargo, para ninguno de estos se ha reportado su actividad en la línea celular tumoral CaSki. Se les ha reportado actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales U-251 (glioblastoma), K-562 (leucemia), HTC-15 (adenocarcinoma colorrectal humano), MCF-7, MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano) y SKLU-1 (adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas) (**Tabla 2**).

Autor	Molécula	Línea Celular	Grupo R	IC50
(Galván et al., 2020)		U-251 (glioblastoma)	3A (H)	0,51 ± 0,03
			3H (NO ₂)	0,25 ± 0,01
		K-562 (leucemia)	3A (H)	0,33 ± 0,03
			3H (NO ₂)	0,25 ± 0,01
		HTC-15 (colon)	3A (H)	1,36 ± 0,02
			3H (NO ₂)	0,83 ± 0,03
		MCF-7 (mama)	3A (H)	1,28 ± 0,1
			3H (NO ₂)	0,34 ± 0,02
		MDA-MB-231 (mama)	3A (H)	0,49 ± 0,03
			3H (NO ₂)	0,27 ± 0,02
		SKLU-1 (pulmón)	3A (H)	0,48 ± 0,03
			3H (NO ₂)	0,35 ± 0,02

Autor	Molécula	Línea Celular	Grupo R	IC50
(Galván y Chans., 2017)		U-251 (glioblastoma)	3A (H)	0,43 ± 0,03
			3E (OCH ₃)	0,50 ± 0,04
			3F (NO ₂)	0,70 ± 0,02
			3J (NO ₂)	0,16 ± 0,007
		K-562 (leucemia)	3A (H)	0,24 ± 0,010
			3E (OCH ₃)	0,12 ± 0,010
			3F (NO ₂)	0,46 ± 0,040
			3J (NO ₂)	0,22 ± 0,010
		HTC-15 (colon)	3A (H)	1,08 ± 0,04
			3E (OCH ₃)	1,10 ± 0,10
			3F (NO ₂)	1,60 ± 0,10
			3J (NO ₂)	0,45 ± 0,04
		MCF-7 (mama)	3A (H)	0,56 ± 0,03
			3E (OCH ₃)	0,64 ± 0,02
			3F (NO ₂)	0,93 ± 0,08
			3J (NO ₂)	0,21 ± 0,007
		SKLU-1 (pulmón)	3A (H)	0,62 ± 0,010
			3E (OCH ₃)	0,53 ± 0,010
	3F (NO ₂)		0,67 ± 0,050	
	3J (NO ₂)		0,12 ± 0,008	
		U-251 (glioblastoma)	4A (H)	1,01 ± 0,06
		K-562 (leucemia)		0,37 ± 0,01
		HTC-15 (colon)		1,05 ± 0,10
		MCF-7 (mama)		0,64 ± 0,03
SKLU-1 (pulmón)				
		0,57 ± 0,03		

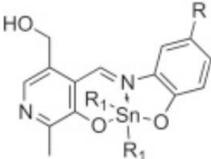
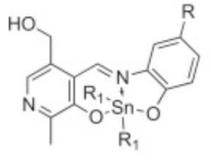
Autor	Molécula	Línea Celular	Grupo R	IC50
(Galván y Ramírez, 2017)	 <p>2a-2g R₁=Cy</p>	U-251 (glioblastoma)	2A (H)	0,19 ± 0,01
			2E (OCH ₃)	0,22 ± 0,01
			2F (NO ₂)	0,28 ± 0,01
		K-562 (leucemia)	2A (H)	0,047 ± 0,03
			2E (OCH ₃)	0,099 ± 0,01
			2F (NO ₂)	0,130 ± 0,01
		HTC-15 (colon)	2A (H)	0,52 ± 0,05
			2E (OCH ₃)	0,47 ± 0,02
			2F (NO ₂)	0,50 ± 0,05
		MCF-7 (mama)	2A (H)	0,21 ± 0,01
			2E (OCH ₃)	0,28 ± 0,03
			2F (NO ₂)	0,21 ± 0,02
	SKLU-1 (pulmón)	2A (H)	0,16 ± 0,02	
		2E (OCH ₃)	0,19 ± 0,01	
		2F (NO ₂)	0,31 ± 0,03	
	MDA-MB-231 (mama)	2A (H)	0,15 ± 0,01	
		2E (OCH ₃)	0,25 ± 0,01	
		2F (NO ₂)	0,44 ± 0,02	
	 <p>3a-3g R₁= -CH₂-Si(CH₃)₃</p>	U-251 (glioblastoma)	3A (H)	0,13 ± 0,01
			3E (OCH ₃)	0,32 ± 0,01
			3F (NO ₂)	0,29 ± 0,02
		K-562 (leucemia)	3A (H)	0,08 ± 0,01
			3E (OCH ₃)	0,20 ± 0,01
			3F (NO ₂)	0,15 ± 0,01
HTC-15 (colon)		3A (H)	0,64 ± 0,01	
		3E (OCH ₃)	0,49 ± 0,001	
		3F (NO ₂)	0,36 ± 0,02	
MCF-7 (mama)		3A (H)	0,14 ± 0,01	
		3E (OCH ₃)	0,20 ± 0,01	
		3F (NO ₂)	0,22 ± 0,004	
SKLU-1 (pulmón)		3A (H)	0,13 ± 0,01	
		3E (OCH ₃)	0,34 ± 0,03	
		3F (NO ₂)	0,21 ± 0,01	
MDA-MB-231 (mama)		3A (H)	0,29 ± 0,02	
		3E (OCH ₃)	0,35 ± 0,02	
		3F (NO ₂)	0,22 ± 0,01	

Tabla 2. Muestra los valores de IC₅₀ (efecto antiproliferativo) de los compuestos de organoestaño de base de Schiff que contiene piridoxal, y su derivado, sobre diferentes líneas celulares tumorales, expresados en μM estudiados por el grupo de trabajo de Galván (2017,2017 y 2020)

En los tres ensayos realizados por Galván *et al.* (2017, 2017 y 2020) es de destacar que la concentración de compuesto requerida para lograr una IC50 es menor que aquella correspondiente al cisplatino.

Es así que el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de los compuestos 10,10-Diphenyl-5-methoxy-10-stanna-1,6-diaza-9,11-dioxatetracycle[8.7.0.0^{1,80.12,17}]heptadeca-1,3,5,7,13,15-hexaene (**4C**), 10,10-Diphenyl-5-nitro-10-stanna-1,6-diaza-9,11-dioxatetracycle[8.7.0.0^{1,80.12,17}]heptadeca-1,3,5,7,13,15-hexaene (**4E**) y 10,10-Diphenyl-1,6-diaza-10-stanna-9,11-dioxatetracycle[8.7.0.0^{1,80.12,17}]heptadeca-1,3,5,7,13,15-heptaene (**4F**) (**Figura 7**) en la línea celular de cáncer de cérvix CaSki proveniente de carcinoma epidermoide de cuello uterino y positiva a virus de papiloma humano.

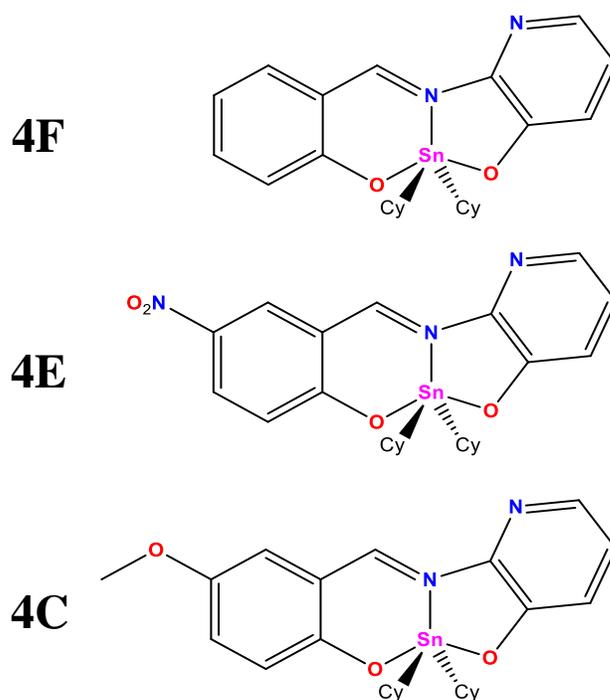


Figura 7. Estructura molecular de los compuestos pentacoordinados de diciclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal 4F, 4E y 4C. (Cortesía de la Dra. Elizabeth Gómez del Instituto de Química, UNAM)

3. Planteamiento del problema

Los tratamientos quimioterapéuticos que eliminan las células cancerosas resultan ineficientes en pacientes terminales y/o metastásicos y suelen generar efectos colaterales que afectan a las células no tumorales, demeritando la calidad de vida del paciente. Por esta razón surge la necesidad de encontrar alternativas quimioterapéuticas conformadas de compuestos o fármacos con actividad antiproliferativa, baja actividad citotóxica, inductora de muerte celular programada y de acción selectiva para el tratamiento del cáncer

Por ello es importante evaluar la actividad antitumoral de diversos compuestos, entre los que destacan los compuestos de organoestaño (IV) por la actividad antiproliferativa y apoptótica que presentan en cultivos de células tumorales in vitro.

Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se pretende evaluar si los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal, **4C**, **4E** y **4F**, poseen actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis, con baja o nula actividad necrótica, en cultivos de células tumoral de cérvix CaSki.

4. Justificación

El cáncer de cuello uterino es la séptima neoplasia más frecuente en la población mundial y la cuarta más común entre las mujeres. En los países en vías de desarrollo el acceso a medidas preventivas es limitado y, a menudo, el cáncer de cuello uterino no se identifica hasta que se encuentra en un estado avanzado y se presentan los síntomas. En México, en el 2020 el cáncer de cuello uterino fue el segundo más diagnosticado y la segunda causa de muerte en mujeres.

Como consecuencia, las acciones para su prevención y tratamiento tienen especial relevancia en los sistemas de salud, por lo que es necesario investigar nuevas alternativas que posean un mejor potencial antiproliferativo, apoptótico y con menor o nula actividad necrótica.

En este sentido se han encontrado que los compuestos de organoestaño (IV) presentan actividad antitumoral, por ello, el estudio de los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal resulta de sumo interés.

5. Hipótesis

Se ha descrito que los compuestos de organoestaño (IV) muestran actividad antiproliferativa y apoptótica en algunas líneas celulares tumorales, por lo que se espera que los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal presenten actividad antiproliferativa y apoptótica en la línea celular tumoral CaSki y presenten baja actividad necrótica.

6. Objetivos

Objetivo General: Evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal 4C, 4E y 4F en cultivos de la línea celular de cáncer de cérvix CaSki

Objetivos Particulares:

- Determinar si los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal 4C, 4E y 4F presentan actividad antiproliferativa en la línea celular tumoral CaSki, expresada como la concentración requerida del compuesto para inducir el decremento del 50% de la densidad celular (IC50) a través de la técnica de incorporación de cristal violeta.
- Evaluar la actividad necrótica de los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal 4C, 4E y 4F en la línea celular tumoral CaSki, a través de la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares.
- Evaluación de la actividad inductora de apoptosis de compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal 4C, 4E y 4F a través de la observación de características morfológicas típicas de células apoptóticas por microscopia de contraste de fases y tinción con el fluorocromo DAPI, así como la presencia de caspasa-3 activa determinada mediante microscopia de epifluorescencia.

7. Método

7.1. Cultivo celular

En este trabajo se usó como modelo la línea celular tumoral CaSki, proveniente de un carcinoma epidermoide de cuello uterino y positiva a virus de papiloma humano tipo 16, fue establecida a partir de una metástasis en el mesenterio del intestino delgado, que sirve como modelo para el estudio del carcinoma cervical avanzado. Esta línea se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC Rockville, MD). Las células se sembraron en 10 mL de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina y rojo fenol, adicionado con 5% de suero de neonato bovino (SNB) previamente desactivado a 57° C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de CO₂ y una atmosfera saturada de humedad. Para realizar los ensayos, los cultivos se desarrollaron en un 60-70% de saturación de la densidad celular.

7.2. Preparación de la solución stock de los compuestos 4C, 4E y 4F

Los compuestos pentacoordinados de diciohexil estaño (IV) fueron donados por la Dra. Elizabeth Gómez Pérez, Profesora investigadora del Instituto de Química de la UNAM. Los compuestos fueron preparados de la siguiente manera: 1mg de compuesto será disuelto en 100 µL de DMSO en tubos tipo ependorff. A partir del stock se tomó la cantidad necesaria del compuesto para preparar las concentraciones que se aplicaron en las curvas dosis respuesta y en los demás ensayos.

7.3. Actividad antiproliferativa de los compuestos 4C, 4E 4F mediante la técnica de incorporación de cristal violeta

Se realizaron cultivos de la línea celular tumoral CaSki en placas estériles de plástico de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) a una densidad de 7000 células por pozo en 100 µL de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA) al 5% con SNB por 24 horas. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de CO₂ y una atmosfera saturada de humedad. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y se estimularon las células a diferentes concentraciones del compuesto en RPMI al 5% de SNB. En las condiciones de control y basal se cambió únicamente el medio por medio fresco. En el vehículo se agregó DMSO (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración equivalente a la concentración máxima empleada en la curva dosis-respuesta. Posteriormente se dejó incubando durante 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas del tratamiento se procedió a evaluar el número celular utilizando la técnica de cristal violeta, se retiró el medio de la placa y las células se fijaron con 40 µL de glutaraldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 1.1% durante 20 minutos, una vez transcurrido el tiempo se retiró el glutaraldehído, se enjuagó la placa y se dejó secar al aire, posteriormente se agregaron 30 µL de colorante cristal violeta al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico durante 20 minutos. Una vez transcurridos los 20 minutos se enjuagó la placa para retirar el exceso de colorante,

se dejó secar al aire y se adicionarán 100 μL de ácido acético, la muestra se leyó a 590 nm por espectrofotometría en un lector de placas (Chrome Manager). Los datos obtenidos se analizaron en Microsoft Excel 365, graficando una curva dosis respuesta, posteriormente se realizó una regresión lineal para obtener el valor de la IC_{50} (Concentración en la que disminuye el 50% del número celular).

7.4. Determinación de la muerte celular necrótica a través de la presencia de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares

Se realizaron cultivos de la línea celular tumoral CaSki en placas estériles de plástico de 96 pozo de fondo plano (Corning, USA) a una densidad de 7000 células por pozo en 100 μL de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA) al 5% con SNB por 24 horas. Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de CO_2 y una atmosfera saturada de humedad. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y se trataron con las siguientes condiciones: Un control testigo únicamente con medio de cultivo, un control con DMSO (Sigma-Aldrich, USA) con la concentración empleada para preparar la IC_{50} correspondiente y las concentraciones de la IC_{50} correspondientes para cada línea celular. A las 23 h después del tratamiento se agregaron 10 μL de una solución de Tritón X-100 al 9% (la dilución final es 1:9 por lo que la concentración final es de 0.9%) en RPMI-1640 durante 1 hora para lisar las células.

El efecto necrótico fue determinado mediante la liberación de la enzima citoplasmática Lactato Deshidrogenasa (LDH) utilizando el kit CytoTox 96 (Promega, USA). De acuerdo con las especificaciones del fabricante, una vez cumplidas las 24 horas de tratamiento, la placa de cultivo fue centrifugada a 4000 rpm y 40 μL del sobrenadante fue recuperado y transferido a una placa de 96 pozos estéril, posteriormente se adicionaron 40 μL de la mezcla de reacción del kit a cada pozo. La placa se mantuvo a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 20 minutos. Se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas (Chromate Manager). Los datos obtenidos se analizaron utilizando Microsoft Excel 365, tomando como referencia el control positivo como un 100%.

7.5. Evaluación de la morfología celular apoptótica por microscopia de fluorescencia con tinción de DAPI

Se realizaron cultivos de la línea celular tumoral CaSki en placas estériles de plástico de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) a una densidad de 7000 células por pozo en 100 μL de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA) al 5% con SNB por 24 horas. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 37° con 5% de CO_2 y una atmosfera saturada de humedad. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y se trataron con las siguientes condiciones: Un control testigo únicamente con medio de cultivo, un control para DMSO con la concentración empleada para preparar la IC_{50} correspondiente, un control positivo con cisplatino a una concentración de 5.66 μM reportada para la línea celular

tumoral CaSki por Laskar *et al.* (2018) y las concentraciones de las IC50 correspondientes para cada compuesto.

Una vez pasadas las 24 horas se fijaron las células con 50 μ L de paraformaldehído al 2% por 20 minutos, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS filtrado, cada uno de 3 minutos. Las células se permearon con Tritón X-100 al 0.3% en PBS a 4°C durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se hicieron nuevamente 3 lavados con PBS filtrado durante 3 minutos. Posteriormente se agregaron 5 μ L/ml de fluorocromo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich, USA) y se dejó actuar durante un minuto a temperatura ambiente. Se hicieron nuevamente 3 lavados con PBS filtrado durante 3 minutos. Finalmente se agregaron 50 μ L de PBS filtrado y se observaron las células por microscopia de campo claro y epifluorescencia (Nikon Eclipse TS2R-FL, JAP).

7.6. Evaluación de muerte por apoptosis mediante inmunodetección de caspasa-3 activa por microscopia de fluorescencia

Se realizaron cultivos de la línea celular tumoral CaSki en placas estériles de plástico de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) a una densidad de 7000 células por pozo en 100 μ L de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA) al 5% con SNB por 24 horas. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) a 37°C con 5% de CO₂ y una atmosfera saturada de humedad. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y se trataron con las siguientes condiciones: Un control testigo únicamente con medio de cultivo, un control para DMSO con la concentración empleada para preparar la IC50 correspondiente para cada compuesto y un control positivo con cisplatino a una concentración de 5.66 μ M.

Una vez pasadas las 24 horas se fijaron las células con 50 μ L de paraformaldehído al 2% por 20 minutos, posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS filtrado, cada uno de 5 minutos. Las células se permearon con Tritón X-100 al 0.3% en PBS a 4°C durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo nuevamente se hicieron 3 lavados con PBS filtrado durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 30 μ L/mL de anticuerpo primario anticaspasa-3 activa (anticuerpo producido en conejo, SIGMA) 1:500 en PBS durante 24 horas a 4°C. Se hicieron 3 lavados con PBS filtrado durante 5 minutos y se agregaron 30 μ L/mL de anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FITC durante 2 horas, protegiendo la placa de la luz. Se lavó el anticuerpo con PBS filtrado durante 5 minutos y finalmente se agregaron 50 μ L de PBS filtrado y se observaron las células en campo claro con iluminación de contraste de fases y por microscopia de epifluorescencia (Nikon Eclipse TS2R-FL, JAP).

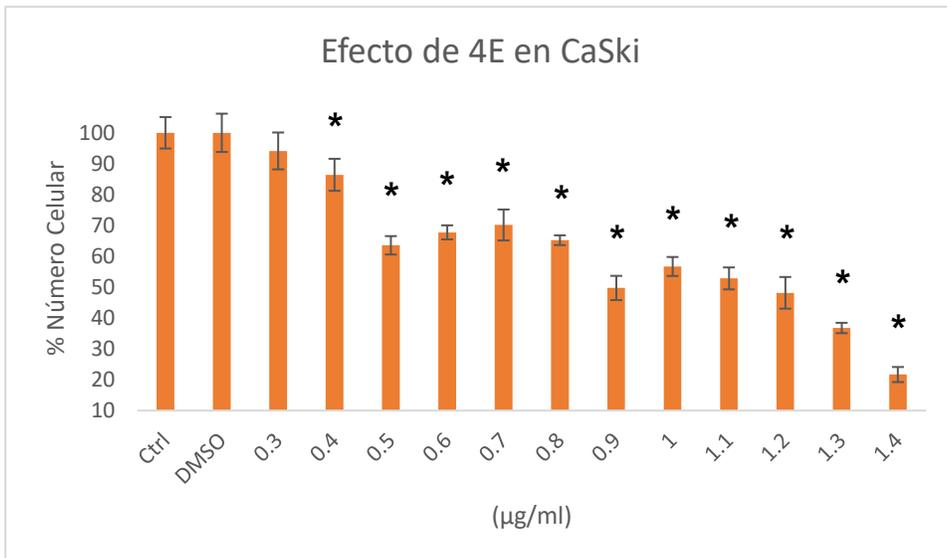
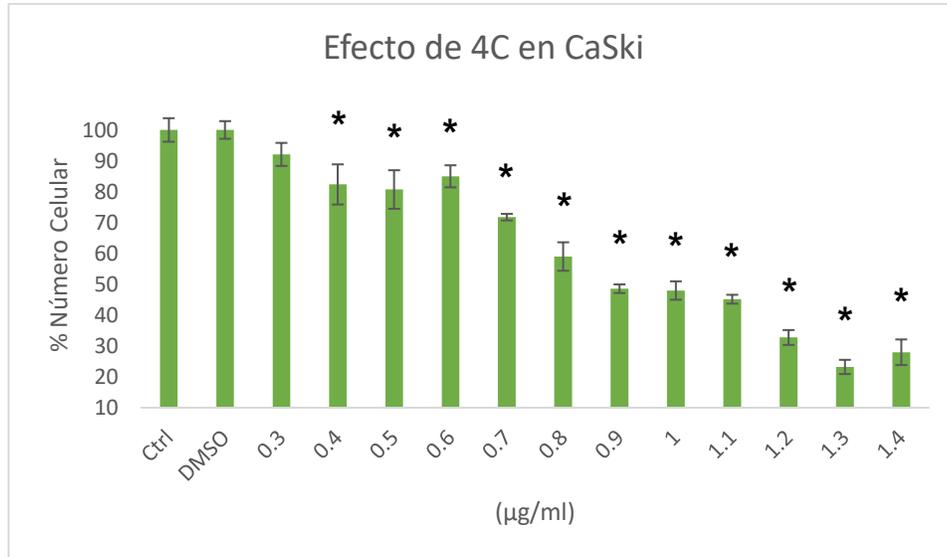
7.7. Análisis Estadístico

Para calcular la media y la desviación estándar, los datos experimentales fueron procesados en el programa Microsoft Excel 365. Se utilizó el programa IBM SPSS *Statistics* para aplicar un análisis de varianza (ANDEVA) para la comparación entre medias, seguido de la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre los pares de medias con un nivel de significancia de 0.05.

8. Resultados

Efecto Antiproliferativo de los compuesto 4C, 4E y 4F

Con el propósito de determinar si los compuestos 4C, 4E y 4F presentan actividad antiproliferativa en células tumorales, cultivos de células CaSki fueron estimulados con diferentes concentraciones de los compuestos (**Figura 10**). La actividad antiproliferativa fue expresada como la cantidad requerida de compuesto para inducir una disminución del 50% en el número celular (IC50) (**Tabla 3**).



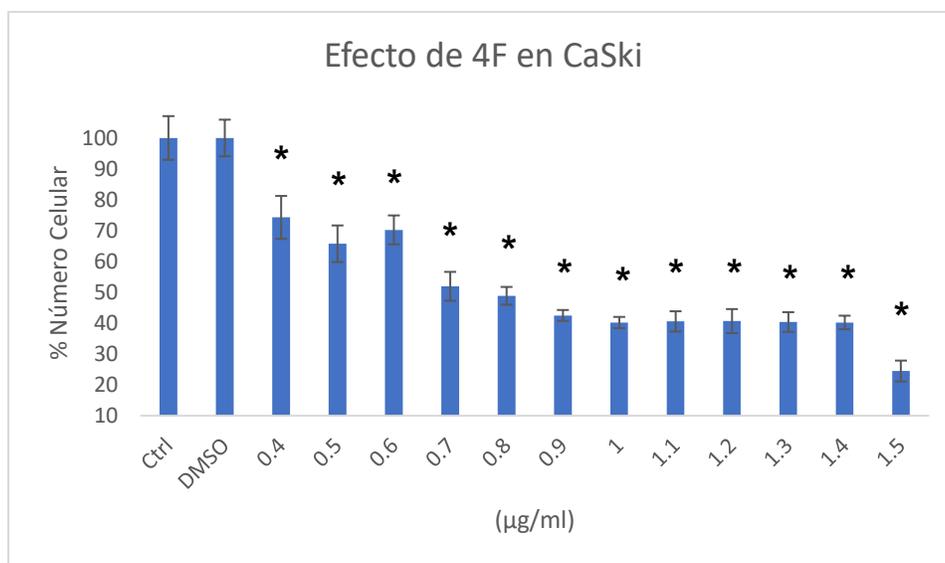


Figura 10. Actividad antiproliferativa de los compuestos 4C, 4E y 4F sobre la línea celular de cáncer de cérvix CaSki. Los datos obtenidos son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron analizados mediante una prueba de ANDEVA seguida de Tukey * diferencia significativa $p < 0.05$ vs Control. Las barras representan la desviación estándar

Compuesto	IC50 µg/ml	IC50 µM
4C	0.96±0.047	1.82 ± 0.075
4E	1.06±0.071	1.95 ± 0.131
4F	0.81±0.040	1.62 ± 0.096

Tabla 3. Valores calculados de las IC50 de los compuesto 4C, 4E y 4F, expresados en µg/ml y µM

Los resultados obtenidos muestran que todos los compuestos presentan una actividad antiproliferativa en los cultivos de la línea celular tumoral CaSki. Además, se observa que a medida que aumenta la concentración de los compuestos, el número celular se reduce, teniendo un efecto dosis-dependiente.

Efecto Necrótico de los compuestos 4C, 4E y 4F

Después de confirmar la actividad antiproliferativa de los compuestos 4C, 4E y 4F sobre la línea tumoral CaSki, se procedió a evaluar si esta actividad es producto de una muerte de tipo necrótica. Para ello, cultivos de células CaSki fueron tratadas con los compuestos 4C, 4E y 4F a sus respectivas IC50 y la evaluación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de los cultivos celulares fue determinada (**Figura 11**) y considerada como un indicador de la pérdida de integridad de la membrana celular, un evento característico en una muerte por necrosis.

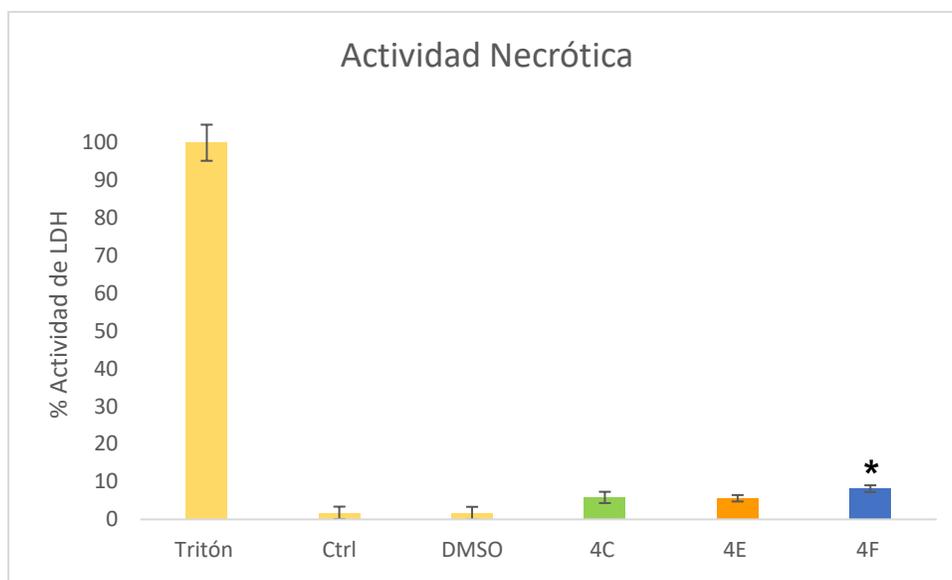


Figura 11. Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en el sobrenadante de los cultivos celulares de la línea celular tumoral CaSki estimulados con las concentraciones IC50 de los compuestos 4C, 4E y 4F, expresadas en porcentaje comparado con un control positivo de células lisadas con Tritón X-100. Resultados de 3 ensayos independientes donde cada condición fue evaluada por sextuplicado. Prueba ANDEVA con una $p < 0.05$

Tritón X-100	Control	DMSO	4C	4E	4F
100±4.7	1.73±1.64	1.62±1.70	5.82±1.49	5.60±0.85	8.14±0.90

Tabla 4. Valores de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en el sobrenadante de cultivos celulares de la línea celular tumoral CaSki estimulados con las concentraciones de IC50 de los compuestos 4C, 4E y 4F. Comparado con control positivo de células tratadas con Tritón X-100

Los resultados obtenidos (**Tabla 4**) establecen que el hecho de que las células CaSki presenten valores $< 10\%$ de actividad de LDH, al ser tratadas con los compuestos 4C, 4E y 4F, sugiere que el decremento en el número celular es debido a un proceso diferente al de la muerte necrótica.

Actividad apoptótica de los compuestos 4C, 4E y 4F

Una vez determinado que las IC50 de los compuestos 4C, 4E y 4F no generan una respuesta necrótica sobre la línea celular de cáncer de cérvix CaSki, se evaluó la actividad inductora de la apoptosis de los compuestos a través de la observación de características morfológicas propias de células apoptóticas mediante microscopía de contraste de fases y epifluorescencia. Las células fueron teñidas con DAPI y la

presencia de la caspasa-3 activa fue determinada mediante inmunodetección y considerada un marcador bioquímico de la apoptosis.

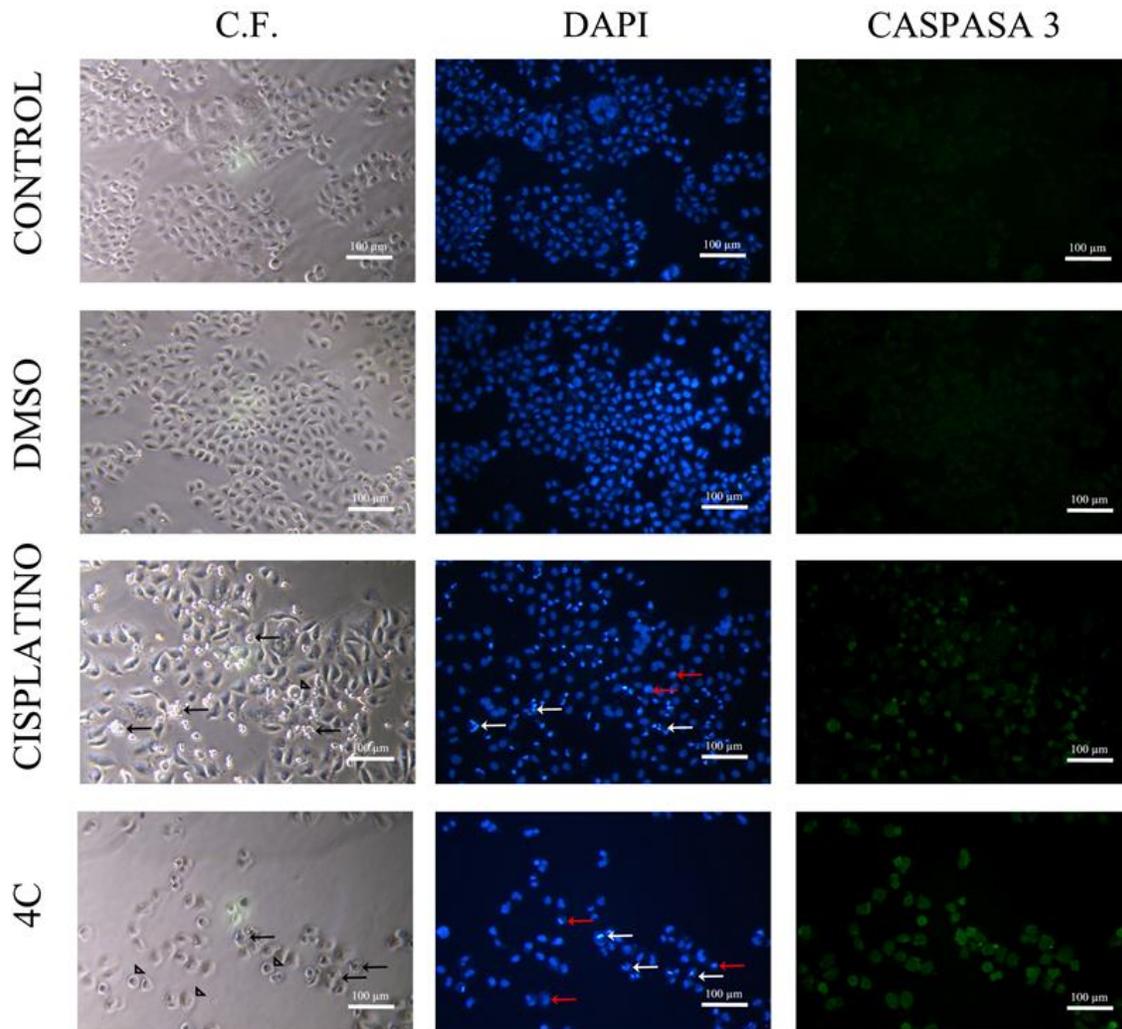


Figura 12. Efecto apoptótico del compuesto 4C. La morfología de las células tumorales CaSki se observa en el contraste de fases (C.F.), donde los triángulos negros indican células redondeadas debido a la pérdida de proyecciones citoplasmáticas y, por ende, pérdida de la morfología poliédrica típica de la línea celular tumoral; las flechas negras señalan cuerpos apoptóticos y posible formación de *blebbing*. El efecto sobre la morfología nuclear se observa en la tinción con DAPI, donde las flechas rojas indican la condensación nuclear y las flechas blancas la fragmentación de la cromatina. La inmunodetección de caspasa-3 se observa en el cisplatino y en el compuesto 4C que corresponde al marcaje verde.

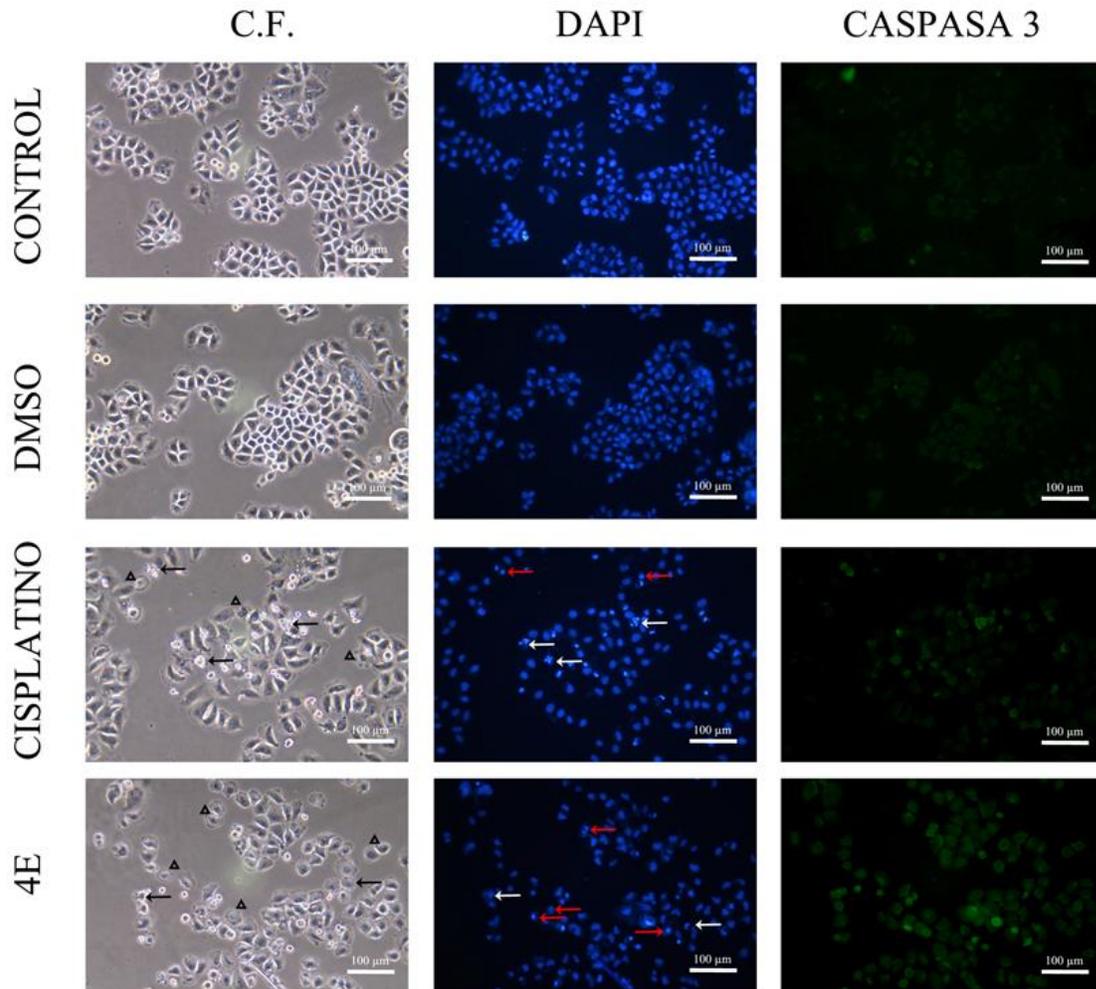


Figura 13. Efecto apoptótico del compuesto 4E. La morfología de las células tumorales CaSki se observa en el contraste de fases (C.F.), donde los triángulos negros indican células redondeadas debido a la pérdida de proyecciones citoplasmáticas y, por ende, pérdida de la morfología poliédrica típica de la línea celular tumoral; las flechas negras señalan cuerpos apoptóticos y posible formación de *blebbing*. El efecto sobre la morfología nuclear se observa en la tinción con DAPI, donde las flechas rojas indican la condensación del núcleo y las flechas blancas la fragmentación de la cromatina. La inmunodetección de caspasa-3 se observa en el cisplatino y en el compuesto 4E que corresponde al marcaje verde.

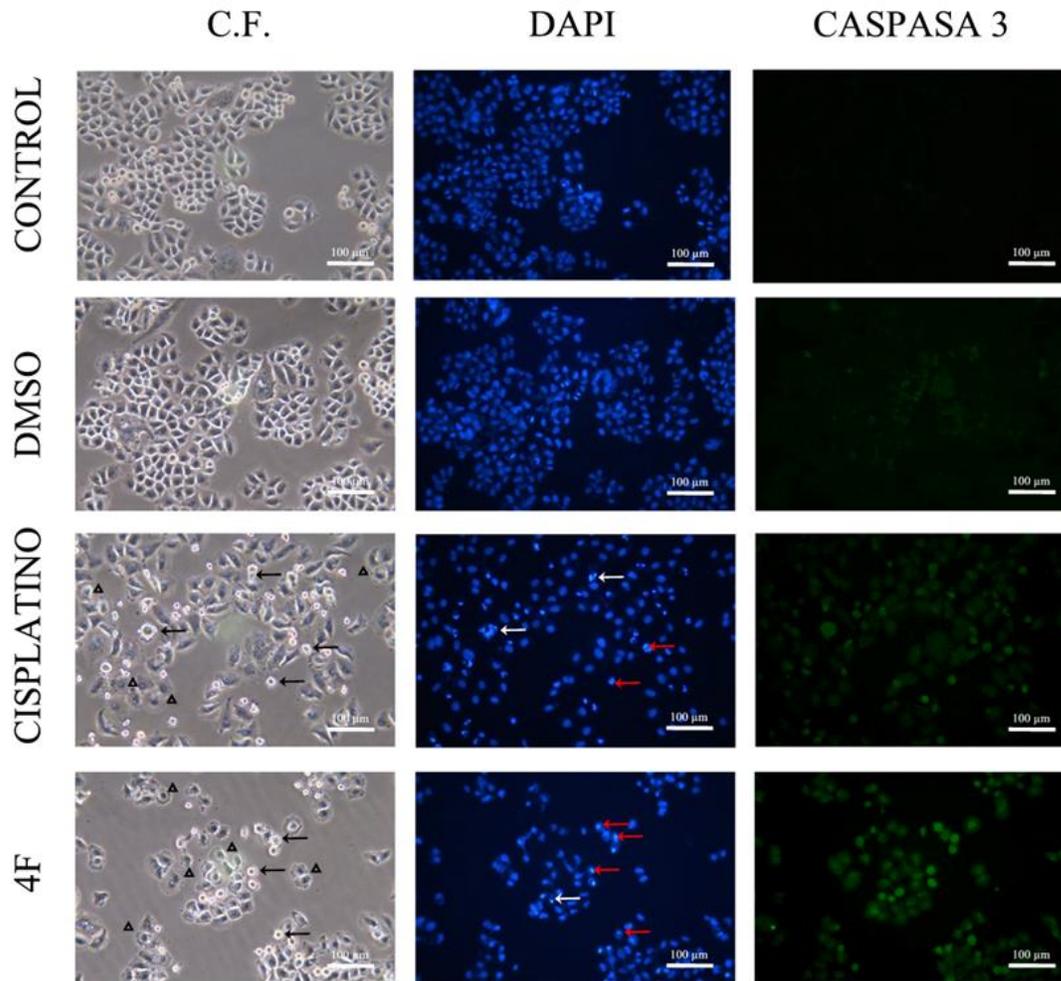


Figura 14. Efecto apoptótico del compuesto 4F. La morfología de las células tumorales CaSki se observa en el contraste de fases (C.F.), donde los triángulos negros indican células redondeadas debido a la pérdida de proyecciones citoplasmáticas y, por ende, pérdida de la morfología poliédrica típica de la línea celular tumoral; las flechas negras señalan cuerpos apoptóticos y posible formación de *blebbing*. El efecto sobre la morfología nuclear se observa en la tinción con DAPI, donde las flechas rojas indican la condensación de la cromatina y las flechas blancas la fragmentación de la cromatina. La inmunodetección de caspasa-3 se observa en el cisplatino y en el compuesto 4F que corresponde al marcaje verde.

Los resultados (**Figuras 12-14**) establecen que las células control y DMSO presentan una morfología poliédrica, citoplasma extendido con proyecciones citoplasmáticas bien definidas, adheridas a la placa de cultivo y núcleos con la cromatina distribuida en el nucleoplasma y sin ningún tipo de fragmentación (ver tinción con DAPI). Sin embargo, las células tratadas con cisplatino o con los compuestos 4C, 4E y 4F presentaron una forma esférica, reducción de tamaño (contracción celular), pérdida de las proyecciones citoplasmáticas que sugieren pérdida de adherencia. Además, en algunas células se observan *blebbing* y formación de cuerpos apoptóticos. En la tinción con DAPI se observan núcleos más pequeños y en algunos casos fragmentados, los núcleos son brillantes, indicando compactación de la cromatina.

Finalmente, tanto las células tratadas con cisplatino, como los compuestos 4C, 4E y 4F, se puede observar la presencia de caspasa-3 activa. Esto, junto con lo observado en la morfología, sugiere que muy probablemente las células tratadas con los compuestos 4C, 4E y 4F experimenten una muerte por apoptosis.

9. Discusión de Resultados

Los tratamientos usados actualmente en la terapia contra el cáncer dependen de la etapa de la enfermedad. En la mayoría de los casos los pacientes ya están en etapas avanzadas y se recurre al uso de quimioterapéuticos. El éxito del cisplatino como agente quimioterapéutico contra el cáncer atrajo interés al estudio de compuestos metálicos con actividad antitumoral. No obstante, los fármacos a base de platino pueden ocasionar resistencia a múltiples fármacos y generar acciones citotóxicas y no selectivas que destruyen las células no tumorales que crecen y se dividen con rapidez. El daño a las células sanas causado por estos tratamientos puede causar efectos secundarios que demeritan la calidad de vida del paciente. Debido a este impacto negativo, se impulsó la síntesis y estudio de compuestos con metales con actividad antitumoral, menos toxicidad y mecanismos antitumorales específicos. Al respecto, actualmente se ha generado un gran interés por los compuestos basados en estaño. Los trabajos publicados por Galván en 2017 y 2020 y Galván y Chans en 2017, donde se evaluaron compuestos de organoestaño con base de Schiff en líneas celulares tumorales, mostraron que el grupo funcional nitro (NO_2) afecta la actividad antiproliferativa incrementándola o disminuyéndola, dependiendo de la posición de éste en la estructura química. No obstante, aunque en estos trabajos independientes existen diferencias entre sus valores de IC50 debido a los sustituyentes y ligandos en las diversas líneas celulares tumorales, las líneas leucémicas mostraron tener los valores de IC50 más bajos a estos compuestos con respecto al resto, mientras que las líneas celulares de cáncer de colon mostraron ser aquellas con valores de IC50 más elevados. Con respecto a los compuestos evaluados en este trabajo, se obtuvieron resultados similares a los de Galván-Chans (2017). En este sentido, en el presente trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de los compuestos pentacoordinados de diciclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal 4C, 4E y 4F, reportando que los compuestos 4C, 4E y 4F afectaron la actividad antiproliferativa de las líneas celulares tumorales, donde los sustituyentes presentes en la estructura química (nitro y metoxilo) no mejoraron la actividad antiproliferativa del compuesto base (4F). De igual manera, Galván-Ramírez (2017) evaluaron compuestos similares a los evaluados en este trabajo, obteniendo resultados similares. Sin embargo, los compuestos evaluados en el trabajo de Galván *et al.* (2020) son aquellos que comparten una mayor similitud estructural con los compuestos evaluados en este trabajo, diferenciándose únicamente por ser compuestos de dibutilestaño. Interesantemente, contrario al comportamiento que hemos observado en los compuestos evaluados en este trabajo y los descritos por Galván-Chans (2017) y Galván-Ramírez (2017), los compuestos de dibutilestaño mostraron que el grupo funcional nitro mejora la actividad antiproliferativa con respecto al compuesto base, indicando que en aquellos compuestos que contienen diciclohexil este es el responsable de afectar negativamente la actividad antiproliferativa de estos compuestos. Por otro lado, comparando los resultados de los trabajos de Galván (2017, 2017 y 2020) con la actividad de los compuestos

evaluados en este trabajo en la línea celular tumoral CaSki, estos compuestos presentan concentraciones altas de IC50, sin embargo, estas siguen siendo menores que aquella para el cisplatino (5.66 μ M en el presente trabajo) reportada para la línea celular tumoral CaSki por Laskar *et al.* (2018), lo que los posiciona como candidatos más eficaces para el tratamiento del cáncer.

Con respecto a la eliminación de células tumorales mediante una muerte celular, distintos autores han descrito el tipo de muerte o mecanismo que explique el decremento de la población celular. Esta información es importante debido a que la mayoría de los efectos secundarios relacionados a quimioterapéuticos son causados por una alta actividad necrótica. En diferentes trabajos donde se evalúa la actividad antiproliferativa de compuestos de organoestaño de bases de Schiff también se reporta que la disminución en el número celular es debido a un proceso de muerte celular apoptótica (Gennari *et al.*, 2000; Attanzio *et al.*, 2020; Girasolo *et al.*, 2017; Hazra *et al.*, 2016). También se ha descrito que los compuestos de organoestaño inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wang *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022) y que son afines para tener interacción con el ADN (Abbas *et al.*, 2022) (Liu *et al.*, 2017) (Hong *et al.*, 2014) (Yang *et al.*, 2016) (Yusof *et al.*, 2020). En congruencia con lo citado anteriormente los compuestos 4C, 4E y 4F inducen a las células tumorales a expresar una morfología con características propias de células apoptóticas, sugiriendo que estos compuestos inducen a las células tumorales a una muerte apoptótica, lo cual fue confirmado al detectar células positivas a la caspasa 3 activa en los cultivos tratados con estos compuestos. De igual manera nuestros resultados mostraron que los compuestos 4C, 4E y 4F no inducen a las células tumorales a liberar la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) al medio extracelular (sobrenadantes), indicando que estos compuestos no inducen a las células a morir por un evento necrótico, lo cual resulta relevante ya que los efectos secundarios descritos para los compuestos quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer están directamente relacionados con la actividad necrótica de éstos, sugiriendo que estos compuestos podrían ser mejor tolerados por los pacientes.

Tomando todos estos resultados, se puede establecer que los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal presentan actividad antiproliferativa en la línea celular de cáncer de cérvix CaSki, con baja actividad necrótica e induciendo a estas células a ser eliminadas por un proceso apoptótico. Las propiedades biológicas descritas anteriormente para estos compuestos permiten que éstos sean considerados excelentes candidatos para ser estudiados como agentes anticancerígenos con potencial terapéutico. De igual manera, su relevancia biológica como un agente antitumoral requiere en el futuro, evaluar su acción selectiva y antimetastásica, que le darán a este compuesto una mayor relevancia quimioterapéutica.

10. Conclusiones

Los compuestos 4C, 4E y 4F generaron una actividad antiproliferativa dosis dependiente en la línea celular tumoral CaSki, con valores de IC50 de 1.82 μM , 1.95 μM y 1.62 μM respectivamente.

Los compuestos 4C, 4E y 4F a las concentraciones de sus respectivas IC50, no inducen a las células tumorales CaSki a una muerte necrótica.

Los compuestos 4C, 4E y 4F inducen muerte apoptótica en las células CaSki con la participación de la caspasa 3-activa.

11. Referencias

- Abbas Z., Tuli H., Varol M., Sharma S., Sharma H., Aggarwal P., Kumar M. (2022). Organotin (IV) complexes derived from Schiff base 1,3-bis[(1E)-1-(2-hydroxyphenyl)ethylidene] thiourea: synthesis, spectral investigation and biological study to molecular docking. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 1923–1935. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s13738-021-02430-6>
- Alama A., Tasso B., Novelli F., Sparatore F. (2009). Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotins as antitumor agents. *Drug Discovery Today*, 500-508. doi:<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.02.002>
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2015). *Molecular Biology of the Cell (Sixth Edition)*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- American Cancer Society. (2019). Efectos Secundarios de la quimioterapia. Recuperado de <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/efectos-secundarios-de-la-quimioterapia.html>
- Asanagi M., Yamada S., Hirata N., Itagaki H., Kotake Y., Sekino Y., Kanda Y. (2016). Tributyltin induces G2/M cell cycle arrest via NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase in human embryonic carcinoma cells. *J Toxicol Sci*, 207-15. doi:doi: 10.2131/jts.41.207
- Attanzio A., D'Agostino S., Busà R., Frazzitta A., Rubino S., Girasolo M., Sabatino P., Tesoriere L. (2020). Cytotoxic Activity of Organotin(IV) Derivatives with Triazolopyrimidine Containing Exocyclic Oxygen Atoms. *Molecules*, 859. doi:10.3390/molecules25040859
- BC Cancer Cervix Screening (Provincial Health Services Authority). (2022). Procedimiento de Escisión Electroquirúrgica con Asa (LEEP). Recuperado de: <http://www.bccancer.bc.ca/screening/Documents/LEEP-Fact-Sheet-Spanish.pdf>
- Bertheloot D., Latz E., Franklin B. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*, 18, 1106-1121. Retrieved from <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/pmc/articles/PMC8008022/>
- Burmeister C., Khan S., Schäfer G., Mbatani N., Adams T., Moodley J., Prince S. (2022). Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives. *Tumour Virus Research*, 200-238. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tvr.2022.200238>

- Chai J., Shi Y. (2014). Apoptosome and inflammasome: Conserved machineries for caspase activation. *National Science Review*, 1, 101-118. doi:<https://doi.org/10.1093/nsr/nwt025>
- Cheung K., Giaever G., Nislow C. (2013). DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. *Chemistry & Biology*, 648-659. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.007>.
- Cohen P., Jhingran A., Oaknin A., Denny L. (2019). Cervical cancer. *The Lancet*, 169-182. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)
- Cooper G., Hausman R. (2019). *The Cell: A Molecular Approach (Eighth Edition)*. New York: Oxford University Press.
- D'Arcy M. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43, 582-592. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/cbin.11137>
- Devi, J., Pachwania S., Kumar D., Kumar D. J., Jan S., Dash A. (2022). Diorganotin(IV) complexes derived from thiazole Schiff bases: synthesis, characterization, antimicrobial and cytotoxic studies. *Res Chem Intermed*, 267–289. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s11164-021-04557-w>
- Dilruba S., Kalayda G. (2016). Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1103–1124. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s00280-016-2976-z>
- Doorbar J., Griffin H. (2019). Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus Research*, 176-179. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.04.005>.
- Egawa N., Egawa K., Griffin H., Doorbar J. (2015). Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*, 3863-3890. doi:<https://doi.org/10.3390/v7072802>
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S., Abrams J., Adam D., Agostinis P., Alnemri E., Altucci L., Amelio I., Andrews D., Annicchiarico M., Antonov A., Arama E., Baehrecke E., Barlev N., Bazan N., Bernassola F., Bertrand M., Bianchi K. (2018). Molecular Mechanisms of cell death: recommendations of Nomenclature Committe on Cell Death. *Cell Death Differ*, 25, 486-541. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5864239/>
- Galván 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*, e3704. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/aoc.3704>

- Galván J., Ramírez T., Nieto A., Hernández S., Gómez E. (2020). Organotin (IV) complexes from Schiff bases ligands based on 2-amino-3-hydroxypyridine: synthesis, characterization, and cytotoxicity. *Med Chem Res*, 29, 2146-2156. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s00044-020-02630-4>
- Galván J., Roldán D., Gonzáles A., Ramírez T., Nieto A., Hernández S., Gómez E. (2017). Schiff base Sn(IV) complexes as cytotoxic agents: Synthesis, structure, isosteric and bioisosteric replacement. *Journal of Organometallic Chemistry*, 332-343. Retrieved from <https://www-sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0022328X17305077?via%3Dihub#bib21>
- Gasser G., Ott I., Metzler N. (2011). Organometallic anticancer compounds. *J Med Chem*, 3-25. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1021%2Fjm100020w>
- Gennari A., Viviani B., Galli C., 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*, 185-190. doi:<https://doi.org/10.1006/taap.2000.9076>.
- Girasolo M., Tesoriere L., Casella G., Attanzio A., Capobianco M., Sabatino P., Barone G., Rubino S., Bonsignore R. (2017). A novel compound of triphenyltin(IV) with N-tert-butoxycarbonyl-L-ornithine causes cancer cell death by inducing a p53-dependent activation of the mitochondrial pathway of apoptosis. *Inorganica Chimica Acta*, 1-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.11.012>
- Hadjikakou S., Hadjiliadis N. (2009). Antiproliferative and anti-tumor activity of organotin compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 235-249. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.026>
- Hadju S. (2002). Introduction of the Cell Theory. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 32(1), 98-100. Retrieved from <http://www.annclinlabsci.org/content/32/1/98.long>
- Hanahan D., Weinberg R. (2000). Hallmarks of Cancer. *Cell Press*, 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan D., Weinberg R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell Press*, 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hazra S., Paul A., Sharma G., Koch B., Guedes da Silva M., Pombeiro A. (2016). Sulfonated Schiff base Sn(IV) complexes as potential anticancer agents. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 83-95. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.06.008>.

- Herrington C. (2019). Uterine Cervix Cancer: Pathology and Genetics. In P. H. Paolo Boffetta, *Encyclopedia of Cancer (Third Edition)* (pp. 535-541). London: Academic Press. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/B978-0-12-801238-3.65081-X>
- Hong M., Geng H., Niu M., Wang F., Li D., Liu J., Yin H. (2014). Organotin(IV) complexes derived from Schiff base N'-[(1E)-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]pyridine-4-carbohydrazone: Synthesis, in vitro cytotoxicities and DNA/BSA interaction. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 550-561. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.070>.
- IMSS. (2022, Agosto 15). *Gobierno de México*. Retrieved from Epidemiología del cáncer cervicouterino: <https://www.gob.mx/imss/articulos/epidemiologia-del-cancer-cervicouterino?idiom=es#:~:text=En%20M%C3%A9xico%2C%20para%202020%20el,y%204%20mil%20335%20muertes>.
- Iwasa J., Marshall W. (2020). *Karp's Cell & Molecular Biology (Ninth Edition)*. Hoboken: Wiley.
- Kapila A., Kaur M., Kaur H., (2021). Organotin(IV) complexes of tridentate (O,N,O) Schiff base ligand: computational, spectroscopic and biological studies. *Materials Today: Proceedings*, S102-S106. doi:<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.04.080>.
- Ketelut N., Fitzgerald K. (2022). Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis-Oh my! The many Ways a Cell Can Die. *Journal of Molecular Biology*, 167378. doi:<https://www-sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S002228362100615X>
- Kroemer G., El W., Golstein P., Peter M., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M., Malorni W., Knight R., Piacentini M., Nagata S., Melino G. (2005). Classification of cell death: recommendations of Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, 12, 1463-1467. doi:<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401724>
- Kumar L., Gupta S (2016). Integrating Chemotherapy in the Management of Cervical Cancer: A Critical Appraisal. *Oncology*, 8-17. doi:10.1159/000447576
- Laskar S., Sánchez L., Flores S., López H., Escobar M., López M., Hernández 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*, 621-635. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.020>.

- Liu K., Yan H., Chang G., Li Z., Niu M., Hong M. (2017). Organotin(IV) complexes derived from hydrazone Schiff base: Synthesis, crystal structure, in vitro cytotoxicity and DNA/BSA interactions. *Inorganica Chimica Acta*, 137-146. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.05.017>.
- Liu X., Hamon J. (2019). Recent developments in penta-, hexa- and heptadentate Schiff base ligands and their metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 94-118. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.03.010>.
- Lodish H., Berk A., Kaiser C., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Martin K. (2016). *Molecular Cell Biology (Eighth Edition)*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Mcllwain D., Berger T., Mak T. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1-28. Retrieved from <https://cshperspectives.cshlp.org/content/5/4/a008656.full>
- Mummery C., Van de Stolpe A., Roelen B., Clevers H. (2021). *Stem Cells (Third Edition)*. Londres: Academic Press.
- NCI. (2022, Octubre 13). *Instituto Nacional del Cáncer*. Retrieved from ¿Qué es el cáncer de cuello uterino?: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino>
- Ndagi U., Mhlongo N., Soliman M. (2017). Metal complexes in cancer therapy—an update from drug design perspective. *Drug Des Dev Ther*, 599–616. doi:<https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>
- Poon R. (2015). Cell Cycle Control. In *Encyclopedia of Cancer* (pp. 393-403). London: Elsevier. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/B978-0-12-801238-3.98748-8>
- Rossi P., Carozzi F. (2019). Cervical Cancer: Screening, Vaccination, and Preventive Strategies. In P. H. Paolo Boffetta, *Encyclopedia of Cancer (Third Edition)* (pp. 326-344). London: Academic Press. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/B978-0-12-801238-3.65138-3>
- Saroya S., Asija S., Kumar N., Deswal Y., Devi J. (2022). Organotin (IV) complexes derived from tridentate Schiff base ligands: Synthesis, spectroscopic analysis, antimicrobial and antioxidant activity. *Journal of the Indian Chemical Society*, 100379. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100379>
- Syed S., Kamaludin N., Awang N., Chan K. (2021). Cellular Basis of Organotin(IV) Derivatives as Anticancer Metallodrugs: A Review. *Front Chem*, 657599. doi:[10.3389/fchem.2021.657599](https://doi.org/10.3389/fchem.2021.657599)
- Tan Y., Zhang Z., Liu Y., Yu J., Zhu X., Kuang D., Jiang W. (2017). Synthesis, crystal structure and biological activity of the Schiff base organotin(IV) complexes

- based on salicylaldehyde-o-aminophenol. *Journal of Molecular Structure*,, 874-881. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.08.058>
- Ventura E., Giordano A. (2019). Cell Cycle. In *Reference Module in Life Sciences*. London: Elsevier. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/B978-0-12-809633-8.90189-4>
- Vordermark D. (2016). Radiotherapy of Cervical Cancer. *Oncol Res Treat*, 516-520. doi:10.1159/000448902
- Wang J. (2019). Cell Responses to DNA Damage. In H. P. Boffetta P., *Encyclopedia of Cancer (Third Edition)* (pp. 315-325). London: Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.98754-3>.
- Wang J., Chen H., Song Q., Liu X., Li C., Wang H., Li C., Hong M. (2022). Synthesis and in vitro cytotoxicity study of three di-organotin(IV) Schiff base diacylhydrazone complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 111983. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111983>.
- Weitzman M., Wang J., Verma V. (2021). Cell Cycle | Cell Cycle: DNA Damage Checkpoints. *Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition)*, 2-9. doi:<https://www-sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/B978012819460700178X>
- Wheate N., Walker S., Craig G., Oun R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans*, 8113-8127. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1039/C0DT90045A>
- WHO. (2022, Febrero 03). *World Health Organization*. Retrieved from Cáncer: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Woods D., Turchi J. (2013). Chemotherapy induced DNA damage response. *Cancer Biology & Therapy*, 379-389. doi:<https://doi.org/10.4161/cbt.23761>
- Yang N., Sheridan A. (2014). Cell Cycle. In Wexler P., *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (pp. 753-758). London: Elsevier. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/B978-0-12-386454-3.00273-6>
- Yang Y., KapiM., Xu L., Cui J., Chang G., Li D., Li C. (2016). Organotin(IV) complexes derived from Schiff base N'-[(1E)-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]pyridine-3-carbohydrazone: Synthesis, in vitro cytotoxicities and DNA/BSA interaction. *Journal of Organometallic Chemistry*,, 48-58. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2015.12.041>.
- Yu S., Li C., Fan S., Wang J., Liang L., Hong M. (2022). Three organotin(IV) Schiff-base carboxylates: Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxicity against cis-platin-resistant cancer cells,. *Journal of Molecular Structure*,, 132585. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132585>.

Yusof E., Ishak N., Latif M., Tahir M., Sakoff J., Page A., Tiekink E., Ravoof T. (2020). Selective cytotoxicity of organotin(IV) compounds with 2,3-dihydroxybenzylidithiocarbamate Schiff bases. *Res Chem Intermed*, 2351–2379. doi:<https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s11164-020-04095-x>

12. Apéndice

Composición del RPMI-1640 (Gibco, E.U.A.)

Sales Inorgánicas		Vitaminas	
	g/L		g/L
Nitrato de calcio tetrahidratado- <u>Ca(NO₃)₂</u>	0.1	D-Biotina	0.0002
Sulfato de Magnesio Anhidrido- SO ₄ Mg	0.4884	Cloruro de Colina	0.003
Cloruro de Potasio-KCl	0.4	Ácido Fólico	0.001
Cloruro de Sodio-NaCl	6	Myo-Inositol	0.035
Fosfato de Sodio Dibásico- Na ₂ HPO ₄	0.8	Niacinamida	0.001
Aminoácidos		Ácido p-Aminobenzoico	0.001
L-Arginina	0.2	Ácido D-Pantetónico (Hemicálcica)	0.00025
L-Asparagina	0.05	Piridoxina*HCl	0.001
L-Ácido Aspártico	0.02	Riboflavina	0.0002
L-Cisteína*2HCL	0.0652	Tiamina*HCl	0.001
L-Ácido Glutámico	0.02	Vitamina B12	0.000005
Glicina	0.01	Otros	
L-Histidina	0.015	D-Glucosa	2
L-Hidroxiprolina	0.02	Glutation (reducido)	0.001
L-Isoleucina	0.05	Rojo de Fenol*Na	0.0053
L-Leucina	0.05	Adición	
L-Lisina*HCL	0.04	L-Glutamina	0.3
L-Metionina	0.015		
L-Fenilalanina	0.015		
L-Prolina	0.02		
L-Serina	0.03		
L-Treonina	0.02		
L-Triptofano	0.005		
L-Tirosina*2Na*2H ₂ O	0.02883		
L-Valina	0.02		

Para 1L de medio de cultivo se agrega 10.34 g de medio RPMI-1640 y 2g de bicarbonato de sodio (NaHCO₃; Sigma-Aldrich, USA) que es disuelto en 1L de agua bidestilada suplementada con 1mg/mL de antibiótico Pengesod: bencilpenicilina con la finalidad de evitar el crecimiento de microorganismos en el medio. El pH fue ajustado a 7.2 con Ácido Clorhídrico (HCl, Sigma-Aldrich, USA) 10N o Hidróxido de Sodio (NaOH, Sigma-Aldrich, USA) al 1%. Finalmente es esterilizado por la técnica de filtrado al vacío a través de una membrana (Millipore) y se almacena a 4°C.

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

Mantiene a la célula en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. Los componentes se diluyen en un volumen final de 2L de agua bidestilada.

16.0 g Cloruro de Sodio (NaCl, Sigma-Aldrich, USA)

0.40 g Cloruro de Sodio (KCl, Sigma-Aldrich, USA)

4.32 g Fosfato mono ácido de Sodio (Na₂HPO₄, Sigma-Aldrich, USA)

0.40 g Fosfato diácido de Potasio (KH₂PO₄, Sigma-Aldrich, USA)

Estos se diluyen en 100 mL de agua bidestilada, se ajusta pH a 7.2-7.4 utilizando HCl 8N y se afora finalmente a un volumen final de 2000 mL. Se filtra con filtros de membrana con diámetro de poro de 22 µm y se almacena a 4°C.

Verseno

Necesario para el desprendimiento de las células tumorales adherentes como las usadas en el presente trabajo. Funciona como agente quelante que secuestra iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Los componentes se diluyen en un volumen final de 2L.

6.08 g Tris Base ([H₂NC(CH₂OH)₃], Sigma-Aldrich, USA)

16.0 g Cloruro de Sodio (NaCl, Sigma-Aldrich, USA)

0.80 g Cloruro de Potasio (KCl, Sigma-Aldrich, USA)

0.80 g EDTA (C₁₀H₁₆N₂O₈, Sigma-Aldrich, USA)

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada, el pH se ajusta a 7.7 con Ácido Clorhídrico 10N y se afora un volumen total de 2000 mL con agua bidestilada. La solución se esteriliza en una autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

Colorante cristal violeta

Se prepara a 0.1% m/v en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM a pH 6.0. Se agrega 3.96 g de Hidróxido de Sodio (NaOH; Sigma-Aldrich, USA) y 4.28 mL de ácido fórmico aforados a 500 mL de agua bidestilada. La solución posteriormente se filtra

Desactivación de suero

Una botella de suero fetal bovino se coloca a baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasa a baño maría 57°C durante 30 minutos. Posteriormente es transvasado a alícuotas de 50 mL para su uso y manipulación

Glutaraldehído (1.1%)

A 1.57 mL de Glutaraldehído (70% v/v) se agrega a 98.43 de agua bidestilada. Finalmente es almacenado a 4°C

Solución de Ácido Acético (10%)

A 10mL de Ácido Acético glacial (J. T. Baker) se le agregaron 90 mL de agua bidestilada.

Paraformaldehído (2%)

Paraformaldehído al 2% de PBS. Se calentó la solución a temperatura no mayor a 60°C