



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER
LABORATORIO NO.6, 2DO PISO UMIEZ

**Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de
compuestos organometálicos de estaño (5A, 5C Y 5F) en
cultivos *in vitro* de cáncer de mama murino de la línea
celular JC**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

FLORES HERNÁNDEZ ALAN GABRIEL

JURADO DEL EXAMEN

DIRECTORA: DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SANCHEZ

ASESOR: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

ASESOR: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

SINODAL: M. EN C. GERARDO DÍAZ VAZQUEZ

SINODAL: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA



CIUDAD DE MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
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.

**El trabajo experimental fue financiado por PAPIIT IN215922,
PAPIIT IN218624 y PAPIIT IN217424**

Agradecimientos

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por ser una excelente tutora y un gran ser humano, por resolver mis dudas, apoyarme y brindarme las herramientas necesarias para mi formación a lo largo de este proceso. Su influencia ha sido una gran fuente de inspiración para seguir avanzando en el camino de la ciencia.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez por su comprensión, su apoyo y conocimientos y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Su guía ha sido fundamental en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Hugo López Muñoz, por inspirarme a elegir este proyecto y por ser una constante fuente de motivación en el estudio de la biología molecular. Agradezco profundamente su apoyo y su orientación en cada duda que surgió durante este proceso.

Al Dr. Israel Muñoz Velasco por su asistencia técnica durante los experimentos realizados en el laboratorio.

Agradecimientos

A mis queridos padres, Angélica y Mateo: por estar siempre presentes en cada paso de mi trayectoria académica, por brindarme las herramientas, el conocimiento y el apoyo necesario para alcanzar mis metas. Este logro es para ustedes, con todo mi agradecimiento y amor.

A mis hermanos, Marisol y Mateo, por estar siempre a mi lado, por preocuparse por mi bienestar, escucharme en los momentos difíciles y brindarme sus valiosos consejos.

A mi queridísima Zule, por el apoyo incondicional que me brindaste en los momentos difíciles, por los consejos y la paciencia con la que me acompañaste en este camino. Tu amor y comprensión fueron indispensables para obtener este logro.

A mi pana David, por todas las anécdotas que hemos forjado a través de los años, por animarme en los momentos difíciles y por ser un compañero inigualable en esta aventura.

A mis amigos Rubén, Anette, Cheel, Esmeralda, Max, David Sandoval, Fernanda, Sebastián, Karla, Miguel, Daniel y Aron, aunque nuestras vidas han seguido caminos diferentes y no nos veamos tan a menudo, su amistad sigue siendo invaluable para mí. Esta dedicatoria es un pequeño gesto de agradecimiento por todo lo que significan en mi vida.

A Fer, Obed, Luis, Tania, Ricardo, Natalia, Jorge y Vic, por su amistad y apoyo, y por hacer del laboratorio un lugar lleno de buenos momentos.

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	1
2	MARCO TEÓRICO.....	2
2.1	LA CÉLULA.....	2
2.2	EL CICLO CELULAR.....	2
2.3	MUERTE CELULAR.....	3
2.3.1	APOPTOSIS.....	4
2.3.2	NECROSIS.....	8
2.4	CÁNCER.....	9
2.5	CÁNCER DE MAMA.....	11
2.6	FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA.....	12
2.7	TIPOS DE CÁNCER DE MAMA.....	14
2.8	TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER.....	14
2.9	METALODROGAS (TIPOS Y PROPIEDADES).....	16
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	21
4	HIPÓTESIS.....	22
5	OBJETIVOS.....	22
5.1	GENERAL.....	22
5.2	PARTICULARES.....	22
6	MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
6.1	Cultivo de células tumorales.....	23
6.2	Preparación de los compuestos.....	23
6.3	Determinación de la concentración inhibitoria del 50% del número celular de cultivos de células tumorales (IC50).....	23
6.4	Determinación de necrosis a partir de la liberación de la enzima LDH.....	24
6.5	Inmunodetección de caspasa 3 y 8 por microscopía de fluorescencia.....	25
6.6	Análisis Estadístico.....	25
7	RESULTADOS.....	26
7.1	Actividad antiproliferativa de los compuesto 5A, 5C y 5F en cultivos de la línea celular JC.....	26
7.2	Actividad necrótica de los compuestos 5A, 5C Y 5F en la línea celular JC.....	29
7.3	Morfología apoptótica de los compuestos organometálicos 5A, 5C Y 5F.....	30
7.4	Inmunodetección de caspasa 3 activa.....	32
8	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	39
9	CONCLUSIONES.....	41
10	BIBLIOGRAFÍA.....	42

1 RESUMEN

El cáncer es uno de los mayores desafíos mundiales en salud pública, siendo el cáncer de mama el tipo de cáncer más común en mujeres a nivel mundial y en México. Los tratamientos actuales contra el cáncer incluyen entre otros, quimioterapia y radiación, sin embargo, no siempre son eficientes y ocasionan efectos secundarios que afectan a los pacientes y a su calidad de vida. Por lo anterior, existe un constante interés por la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que brinden resultados más eficientes y con la menor cantidad de secuelas posibles. En este sentido, los compuestos que incluyen átomos metálicos, como el cisplatino, han mostrado tener un potencial terapéutico importante contra el cáncer, sin embargo, su alta toxicidad ha sido ampliamente documentada, por lo que actualmente se busca evaluar nuevos compuestos organometálicos que sean más eficientes en el tratamiento de esta patología, pero con menores efectos secundarios. Al respecto, los compuestos organometálicos de estaño (COE) son conocidos por su efecto antiproliferativo en varias líneas celulares tumorales, por lo que se han propuesto como agentes antineoplásicos. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de los compuestos organometálicos de estaño 5A, 5C y 5F, en cultivos celulares de cáncer de mama murino de la línea celular JC. Los resultados obtenidos señalan que los compuestos 5A, 5C y 5F tienen una actividad antiproliferativa en la línea tumoral JC de manera dosis-dependiente, obteniendo valores de IC_{50} de 0.78, 0.68 y 0.86 μM , respectivamente. En cuanto a la actividad necrótica los compuestos mostraron valores $<11\%$ de actividad de LDH, evidenciando una baja actividad necrótica. Adicionalmente, se identificó que en los tratamientos con los compuestos los cultivos celulares mostraron cambios morfológicos como contracción celular y compactación nuclear, así como marca positiva a la inmunodetección de las proteasas caspasa-3 activa y caspasa-8, lo que indica que los compuestos inducen una muerte celular de tipo apoptótica. En conclusión, los compuestos organometálicos 5A, 5C y 5F, disminuyen la población celular en la línea JC mediante la vía apoptótica, con una baja actividad necrótica.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 LA CÉLULA

La célula constituye la unidad estructural y funcional esencial de todos los seres vivos. Tiene la capacidad de obtener y utilizar energía, comunicarse con otras células, reaccionar ante estímulos, crecer, reproducirse, morir y autorregularse. Lleva a cabo funciones específicas que se identifican con componentes estructurales y dominios determinados en ella. Las células que son similares entre sí o que se relacionan desde el punto de vista funcional o estructural se agrupan para formar tejidos (Fortoul, 2016).

2.2 EL CICLO CELULAR

Una característica definitoria de la vida es la capacidad de una célula para replicarse, lo que hace a través de un complejo programa regulatorio comúnmente conocido como el ciclo celular. El ciclo celular coordina la replicación del genoma y la posterior segregación de cada réplica genómica en una nueva célula hija, proceso cuya reiteración conduce a la proliferación exponencial de células (figura 1) (Coffman, 2004).

El ciclo celular eucariótico comprende las acciones secuenciales, durante la proliferación, de la síntesis de ADN (fase S) y la división celular (fase M) con fases intermedias para permitir el crecimiento celular (fase G1, después de M - pero antes de la fase S) y para comprobar la integridad del material genómico (fase G2, después de la fase S pero antes de la fase M). (Hindley y Philpott, 2013). El progreso científico en las últimas décadas ha revelado que el ciclo celular eucariótico está impulsado por un motor conservado evolutivamente compuesto por una familia de proteínas cinasas llamadas quinasas dependientes de ciclina (CDK). Aunque la progresión ordenada del ciclo celular depende de varios factores, la activación y desactivación secuencial de diferentes CDK para promover diferentes etapas del ciclo celular sigue siendo una buena aproximación. En consecuencia, las

actividades de las CDK están estrictamente reguladas por mecanismos que incluyen la interacción proteína-proteína, la fosforilación y la proteólisis mediada por ubiquitinas (Poon, 2016).

En resumen, el ciclo celular es un mecanismo por el cual las células se replican a través de una secuencia ordenada de eventos en los cuales una célula duplica sus contenidos y da lugar a otra célula. Por lo tanto, el tamaño de un órgano u organismo depende de su masa celular total, que depende tanto en el número total de células como en su tamaño. El número de células, a su vez, depende de la cantidad de división y muerte celular. Por lo tanto, el tamaño de los órganos y del cuerpo son determinado por tres procesos fundamentales: crecimiento, división y muerte celular (Alberts *et al*, 2016).

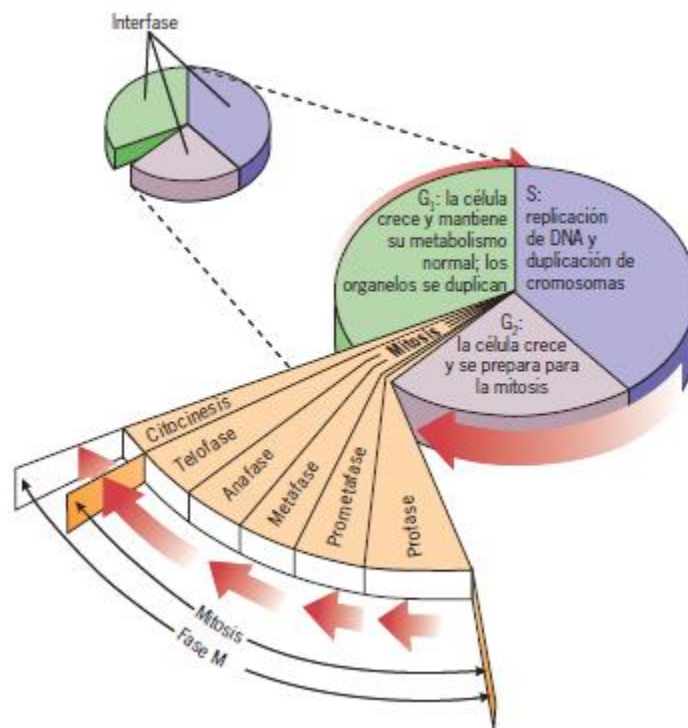


Figura 1. Esquema del ciclo celular. Modificado y obtenido de Karp, (2011).

2.3 MUERTE CELULAR

La muerte celular es un proceso natural que se da en tejidos humanos y en organismos multicelulares, este evento no altera las funciones normales de estos.

De hecho, el número de células en los diversos tejidos se mantiene mediante un equilibrio entre la proliferación de nuevas células y la eliminación de células agotadas o seniles. Este equilibrio de proliferación y muerte celular varía según el tejido (Elena, 2002). Un desbalance en este equilibrio puede provocar enfermedades como el cáncer, cuando la proliferación se encuentra aumentada, o a las enfermedades degenerativas cuando los procesos de muerte están incrementados (Jordán, 2003). En la actualidad existen 12 tipos de muerte celular registrados, sin embargo, los tipos de muerte celular más estudiados son la apoptosis o muerte celular programada y la necrosis o muerte celular no programada (Hajibabaie, 2023).

2.3.1 APOPTOSIS.

Este tipo de muerte se caracteriza porque las células se destruyen a sí mismas sin causar inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. Por lo tanto, la apoptosis es considerada una muerte natural fisiológica, actuando como un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y desempeñando un papel protector frente a posibles enfermedades (Jordán, 2003).

Entre las características morfológicas provocadas por una muerte apoptótica encontramos la contracción atípica del volumen celular, la formación de ampollas en la membrana celular (bebbings), la compactación del citoplasma y organelos, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de membranas que encierran el contenido celular conocidos como cuerpos apoptóticos (figura 2). Por último, los cuerpos apoptóticos son fagocitados y degradados por células vecinas (generalmente macrófagos) por acción de marcadores de superficie celular (Obeng, 2020).

Un evento clave en la apoptosis es la activación de una familia de proteasas intracelulares especializadas llamadas caspasas que escinden secuencias específicas en numerosas proteínas dentro de la célula, provocando así los cambios que conducen a la muerte celular. Las caspasas reciben su nombre debido a que contienen una cisteína en su sitio activo, e hidrolizan proteínas en sitios que

contienen residuos de ácido aspártico, estas proteasas se sintetizan en la célula como precursores inactivos y se activan sólo durante la apoptosis (Alberts *et al*, 2016). Las caspasas se pueden dividir en caspasas iniciadoras (caspasa -8,-9 y -10) que como su nombre lo indica inician el proceso de muerte apoptótica y su función principal es la de activar a las caspasas efectoras (caspasas-3,-6 y -7) las cuales una vez activadas catalizan los eventos generalizados de escisión de proteínas que matan la célula. (Obeng, 2020). Existen dos vías principales que contribuyen a la cascada de activación de las caspasas y a una muerte apoptótica: la vía intrínseca y la vía extrínseca.

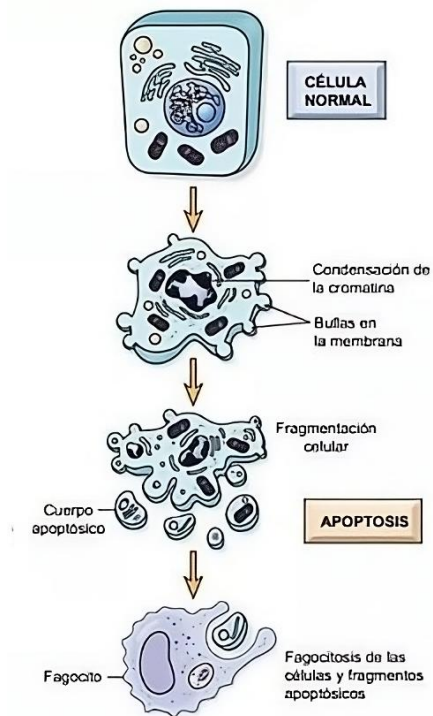


Figura 2. Proceso de muerte apoptótica. Modificado y obtenido de Kumar, (2017).

La vía intrínseca de la apoptosis, también conocida como la vía mitocondrial, es una vía que se activa por varios factores internos, como daño al ADN, estrés oxidativo, hipoxia, ausencia de factores de crecimiento, radiación, entre otros (Elmore, 2007).

En esta vía las proteínas de la familia de Bcl-2 toman un papel importante en la regulación de la apoptosis actuando sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 como BAX y BAK favorecen la formación de un

poro en la membrana externa de las mitocondrias, esto provoca la liberación de varias proteínas del espacio intermembrana, siendo el citocromo C una de las principales para esta vía (Fernández-Lazaro 2024). La permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo C desencadenan la formación de apoptosomas y, por último, la activación de la caspasa-3, esto generalmente se considera el punto de no retorno en la muerte celular apoptótica (Bertheloot *et al.*, 2021).

El apoptosoma es un complejo masivo que comprende citocromo c, factor activador de proteasa de apoptosis 1 (Apaf-1), dATP y pro-caspasa-9 (Bertheloot *et al.*, 2021), la activación de esta estructura está regulada de manera precisa por proteínas de la familia Bcl-2 que están asociadas con la mitocondria, algunas de estas proteínas promueven la apoptosis, mientras que otras la inhiben. Los factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2 protegen a las células al no permitir la formación del apoptosoma. Además de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 existen otras proteínas que impiden el progreso de la apoptosis, como la proteína Hsp70 y las IAP. La proteína Hsp70 tiene como función el secuestrar a Apaf-1 para impedir la formación del apoptosoma, mientras que las IAP bloquean la actividad de las propias caspasas (Angosto, 2003).

La permeabilización de la membrana externa mitocondrial induce la formación del apoptosoma, el cual una vez ensamblado, activa al iniciador de la apoptosis caspasa-9, esta caspasa a su vez escinde las proformas de las proteasas caspasa -3 y caspasa -7 y desencadena su función de caspasa efectora y estos dos últimos también escinden varias otras pro-caspasas (como la caspasa -2, -6, -8 y -10) en sus formas activas, creando una cascada amplificadora de la apoptosis (Fig. 3) (Bertheloot *et al.*, 2021).

La vía extrínseca de la apoptosis se efectúa como resultado de la interacción entre un receptor de muerte a nivel de la membrana plasmática y su ligando de muerte (D'Arcy, 2019). Esta vía inicia mediante la activación de los receptores de muerte de la superficie celular. Los receptores de muerte proapoptóticos incluyen TNFR1/2, Fas y los receptores DR4 y DR5 del ligando inductor de apoptosis relacionado con

TNF (TRAIL). Tras la activación por sus ligandos, los receptores de muerte se oligomerizan para formar plataformas en la superficie celular. Este evento conduce al reclutamiento de proteínas adaptadoras (TRADD y FADD) y la activación de las caspasas iniciadoras de apoptosis caspasa-8 y -10, formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). Posteriormente, las caspasas iniciadoras activan a las caspasas efectoras (es decir, caspasa -3, -6 y -7) a través de una escisión proteolítica (Bertheloot *et al.*, 2021). De igual manera, las caspasas ejecutoras pueden activarse indirectamente a través de la activación de una proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 conocida como Bid, la cual normalmente se encuentra inactiva en el citosol, sin embargo, La ruptura por la caspasa-8 permite que Bid se traslade a la mitocondria, donde modifica la permeabilidad de la membrana mitocondrial lo cual resulta en la liberación del citocromo C. Esto da lugar a la a activación de la caspasa 9, lo cual amplifica la caspasa de caspasas iniciada por la activación directa de la caspasa-8 a través de receptores asociados con la muerte celular (figura 3) (García, 2003).

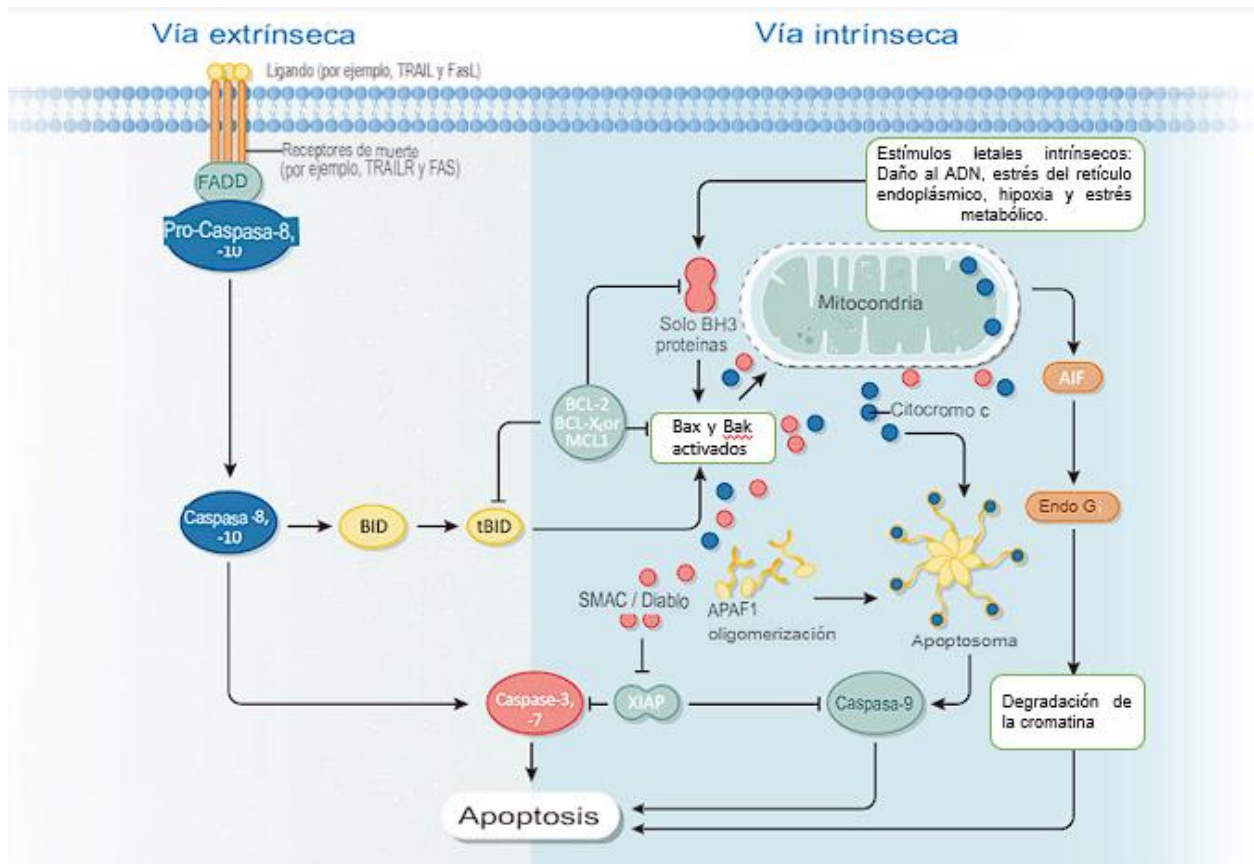


Figura 3. Esquema de las vías de la apoptosis. Modificado y tomado de https://www.genetex.com/Research/Overview/cell_biology/apoptosis

2.3.2 NECROSIS

La necrosis es una forma de muerte celular no programada que ocurre cuando factores externos superan las condiciones fisiológicas del tejido y someten a la célula a un estrés excesivo e incontrolable (Carranza-Aguilar et al., 2020). En la necrosis, se produce un aumento en el volumen celular, seguido de la ruptura de la membrana plasmática y la liberación del contenido celular al medio extracelular (Ramírez y Rojas, 2009). Este proceso implica la regulación positiva de varias proteínas y compuestos proinflamatorios y tras el derrame del contenido celular en las áreas circundantes provoca una cascada de inflamación y daño tisular (D'Arcy, 2019).

Por microscopía electrónica se observa una discontinuidad en la membrana plasmática y los organelos, así como una marcada dilatación mitocondrial con

aparición de grandes densidades amorfas (Ramírez y Rojas, 2009). Cabe destacar, que se puede observar una morfología necrótica (es decir, rotura de la membrana plasmática) en las últimas etapas de un programa de muerte celular apoptótica o autofágica, cuando las células muertas no se eliminan del sistema mediante fagocitosis (Green, 2015).

La muerte celular necrótica es un proceso que ocurre de manera pasiva y sin necesidad de sintetizar nuevas proteínas, por lo que requiere un bajo consumo de energía. Se caracteriza por un aumento en los niveles de calcio intracelular (Ca^{2+}), alteraciones en la función mitocondrial y un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) (figura 4) (Carranza-Aguilar *et al.*, 2020).

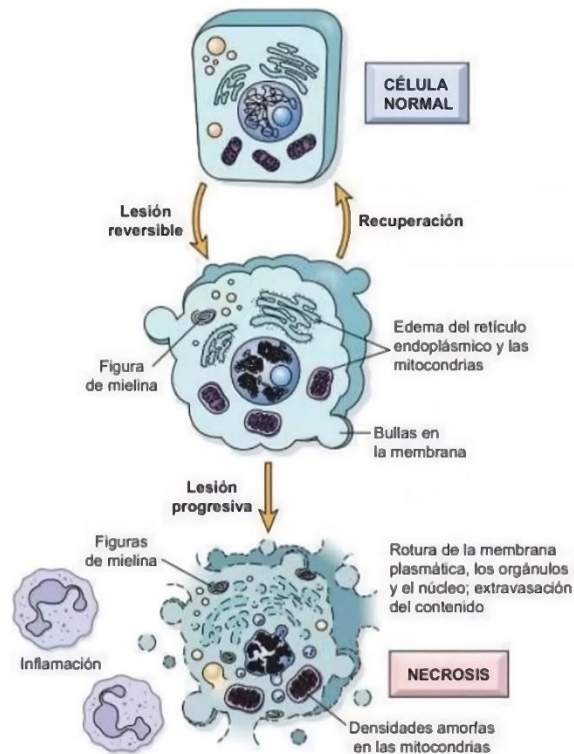


Figura 4. Proceso de muerte necrótica. Modificado y obtenido de Kumar, (2017).

2.4 CÁNCER

El cáncer es una enfermedad genética, resultado del cúmulo de alteraciones en un conjunto de genes que pertenecen a dos grandes grupos, los oncogenes y los genes

supresores de tumores, cuyos productos ejercen funciones básicas para el buen funcionamiento, crecimiento y muerte de todas nuestras células (Jiménez y Merchant, 2003).

Los *hallmarks* del cáncer o características del cáncer (capacidades distintivas y complementarias que permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica) nos proporcionan un panorama para entender las múltiples formas en que las células cancerosas difieren de las células normales y son las siguientes: mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de supresores del crecimiento, inducción de angiogénesis, activación de invasión y metástasis y permitir la inmortalidad replicativa, entre otros (Hanahan y Winberg 2011).

El cáncer, por ende, es un tipo de crecimiento tisular anormal en donde las células se dividen de manera relativamente autónoma e incontrolada conduciendo a un aumento progresivo del número de células en división. La masa resultante de tejido en crecimiento se denomina tumor (o neoplasma) (Becker *et al.*, 2006) Basándose en diferencias en sus patrones de crecimiento, los tumores se clasifican como benignos o malignos. Un tumor benigno crece en un área delimitada y localizada y raramente es peligroso (Becker *et al.*, 2006). Los tumores malignos por su parte se reproducen de manera descontrolada, y son capaces de invadir y colonizar tejidos y órganos distantes (metástasis), en lugares donde normalmente no pueden crecer (Jiménez y Merchant, 2003).

El término metástasis se define como el “proceso de diseminación de las células cancerosas desde su lugar de origen hasta un órgano distante” , siendo un proceso, que comprende varias etapas: a) la activación de la transición epitelio/mesénquima, durante el cual las células cancerosas pierden tanto el contacto célula-célula como la adhesión al sustrato, adquiriendo la propiedad de movimiento; b) la invasión local, para lo cual las células malignas degradan la lámina basa; c) la intravasación, durante la cual las células tumorales atraviesan la pared de los vasos sanguíneos y entran en la circulación; d) la capacidad de sobrevivir en el torrente circulatorio; d) la extravasación, propiedad de las células tumorales de salir del torrente circulatorio; e) establecimiento de las células tumorales en los tejidos del órgano donde se va a

formar la metástasis, es decir de un nicho premetastásico para crear un ambiente favorable para el crecimiento de las células cancerosas (Arvelo *et al.*, 2016).

El cáncer se puede originar en casi cualquier órgano; dependiendo del tipo celular implicado, se agrupan en varias categorías diferentes. Carcinomas, entre los que se encuentran cerca del 90% de todos los cánceres, surgen a partir de células epiteliales que cubren las superficies corporales externas e internas, un ejemplo de esto es el cáncer de mama. Sarcomas, se desarrollan a partir de tejidos de soporte tales como el hueso, el cartílago, la grasa, el tejido conjuntivo y el músculo. Finalmente, los linfomas y leucemias que surgen a partir de las células de origen sanguíneo y linfático (Becker *et al.*, 2006).

Según el Fondo mundial para la Investigación del Cáncer (WCRF) en el año 2020 hubo un estimado de 18.1 millones de casos de cáncer alrededor del mundo, de estos, 9.3 millones de casos se dieron en hombres y 8.8 en mujeres. De acuerdo a los datos estadísticos recabados por esta organización, el cáncer de mama y el de pulmón son los más comunes a nivel mundial, contribuyendo con un 12.5% y 12.2% de los casos totales diagnosticados en el 2020, aunado a esto la Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en este mismo año hubo un total de 10 millones de defunciones por cáncer y que alrededor de un tercio de estas muertes se deben al consumo de tabaco, alto índice de masa corporal, consumo de alcohol y falta de actividad física.

2.5 CÁNCER DE MAMA

La función principal de la glándula mamaria es la producción de leche durante el periodo de lactancia. Por fuera la mama está compuesta por piel, pezón y areola. Al interior de la mama, encontramos tejido glandular compuesto por lóbulos y lobulillos que terminan en unidades más pequeñas que pueden producir leche. Estos lóbulos y lobulillos están unidos por una serie de tubos llamados conductos que conducen la leche hacia el pezón. Además, cada mama tiene también vasos linfáticos, tubos delgados que transportan glóbulos blancos y líquido linfático, que a su vez conducen a órganos pequeños llamados ganglios linfáticos. Los ganglios linfáticos se

encuentran cerca de las mamas, bajo el brazo, arriba de la clavícula, en el pecho y en otras partes del cuerpo y son los encargados de filtrar sustancias presentes en el líquido linfático para ayudar a combatir infecciones y enfermedades. Ellos almacenan también glóbulos blancos, llamados linfocitos, los cuales combaten enfermedades (Rivas, 2015).

Los cánceres de seno pueden originarse en diferentes partes del seno. La mayoría de estos cánceres comienzan en los conductos que llevan la leche hacia el pezón (cánceres ductales). Algunos cánceres se originan en las glándulas que producen leche (cánceres lobulillares). También hay otros tipos de cáncer de seno que son menos comunes como el tumor filodes y el angiosarcoma y también existen un pequeño número de cánceres que comienzan en otros tejidos del seno, a estos cánceres se les llama sarcomas y linfomas, y en realidad no se consideran cánceres de seno (American Cancer Society, 2019).

El cáncer de mama es un importante problema de salud pública en todo el mundo. Según estimaciones en 2002, hubo 1 151 298 nuevos casos de cáncer de mama diagnosticados, 410 712 muertes causadas por cáncer de mama y más de 4,4 millones de mujeres viviendo con cáncer de mama en todo el mundo (Veronesi *et al.*, 2005).

2.6 FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que surge de la acumulación progresiva de mutaciones genéticas (American Cancer Society, 2019). Los principales factores de riesgo del cáncer de mama son:

- Factores genéticos: Aproximadamente, del 5% al 10% de los cánceres de mama son atribuibles a factores genéticos. Los genes de predisposición al cáncer de mama más frecuentes son BRCA1 y BRCA2. En condiciones normales estos genes se encargan de producir proteínas que reparan daños en el ADN, sin embargo, heredar variantes dañadas de estos genes aumentan el riesgo de desarrollar varios cánceres, especialmente cáncer de mama y ovario. Se estima que el 13% de las mujeres en la población general

padecerán cáncer de mama en algún momento de sus vidas. Por otra parte, se calcula que del 54 % al 73 % de las mujeres con daños en el gen BRCA1 y del 45 % al 69 % de las que tienen daños en el gen BRCA2, desarrollaran cáncer de seno entre los 70 y 80 años (NHI, 2020).

- Antecedentes personales: Las mujeres que han sido diagnosticadas con cáncer de mama tienen un riesgo elevado de sufrir la enfermedad nuevamente. Además, ciertas afecciones mamarias no cancerosas, como la hiperplasia ductal atípica o el carcinoma lobulillar in situ, están vinculadas a un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama (CDC, 2020).
- Exposición a la radiación ionizante terapéutica: Las mujeres que han recibido radiación terapéutica en la zona del tórax durante la adolescencia y la niñez tienen un riesgo más alto de padecer cáncer de mama (Astorga *et al.*, 2022).
- Hormonas terapéuticas o exógenas de estrógenos: El uso prolongado de anticonceptivos orales puede suponer un aumento en el riesgo de padecer cáncer de mama del 20% para todas las usuarias por cualquier tiempo de uso, y puede aumentar hasta un 38% si se usan por más de 10 años. Esto debido a que tanto el estrógeno como la progesterona tienen un efecto estimulante en las células mamarias proliferativas. Por otra parte, el uso de estrógenos exógenos como tratamiento para los síntomas ocurridos por la menopausia, ha mostrado un aumento en el riesgo de cáncer de mama del 60% (Astorga *et al.*, 2022).
- Edad: El riesgo de desarrollar cáncer aumenta con la edad, esto se debe probablemente a la acumulación de factores de riesgo. Además, el envejecimiento provoca una disminución en la efectividad de los mecanismos de reparación celular, lo cual contribuye a este incremento (OMS, 2022).
- Peso (obesidad): La obesidad suele provocar inflamación sistémica y local en la mama, esto debido a que los estados de obesidad provocan un aumento en los niveles de estrógenos circulantes en el tejido mamario, por lo cual, la obesidad es considerada una condición fisiopatológica que promueve la aparición del cáncer (Juárez-Cruz *et al.*, 2018).

- Consumo de alcohol: El consumo de bebidas alcohólicas juega un papel importante en el riesgo del cáncer de mama, consumir una sola bebida alcohólica al día puede aumentar el riesgo en un 4%; sin embargo, un consumo de tres o más bebidas alcohólicas al día (>35 g/día) puede representar un incremento del riesgo de hasta el 32% y del 46% si el consumo es mayor a los 45 g por día (Astorga, 2022).

2.7 TIPOS DE CÁNCER DE MAMA

Los cánceres se dividen en no invasivos e invasivos dependiendo de si afectan o no la membrana basal. Entre los no invasivos se encuentran: 1) carcinoma intraductal: generalmente se presenta como una masa palpable 2) carcinoma lobulillar in situ: generalmente se detecta por casualidad en una biopsia y tiende a ser bilateral y multicéntricos. Por otra parte, tenemos a los carcinomas invasivos estos son aquellos que invaden más allá de la membrana basal y se introducen en el estroma mamario, desde donde puede llegar a invadir los vasos sanguíneos, ganglios linfáticos regionales y a distancia. Los tipos histológicos predominantes de carcinoma de mama son: ductal (79%), lobulillar (10%), tubular (6%), mucinoso (2%), medular (2%), papilar (1%) y metaplásico (1%). También se puede clasificar el carcinoma de mama mediante inmunohistoquímica, que detecta proteínas celulares y categoriza los tumores según la expresión de receptores de estrógenos, progesterona y HER2 (factor de crecimiento epidérmico). Entre el 75% y el 80% de los cánceres son positivos para receptores hormonales de estrógenos o progesterona, mientras que entre el 15% y el 20% muestran positividad para HER2 (Espinoza-Ramirez, 2018).

2.8 TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER

En el momento del diagnóstico, la decisión acerca de qué tratamientos y en qué orden debe recibir un paciente con cáncer, asienta en tres pilares básicos: el tipo histológico del tumor, la extensión de la enfermedad y la condición del paciente. Un primer paso para la asignación de un tratamiento contra el cáncer es la obtención de una muestra tisular para el estudio anatomopatológico, esto es imperativo para

descartar procesos de naturaleza benigna que pueden simular una neoplasia y permite informar del subtipo histológico del tumor. Por otro lado, la obtención de un material adecuado para el estudio inmunohistoquímico permite el estudio de determinados marcadores moleculares con importancia pronóstica que, en algunos casos, como el grado de diferenciación celular y la expresión de receptores hormonales en el cáncer de mama, son determinantes en la indicación de tratamientos complementarios (Muñoz *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta lo anterior y dependiendo del tipo de cáncer, su extensión, etapa y salud general del paciente, se pueden emplear las siguientes terapias/tratamientos:

Cirugía: la cirugía hace uso de procedimientos quirúrgicos para extirpar el tumor del cuerpo (NCIS, 2020). En casos idóneos, la cirugía es el tratamiento primario para el cáncer de mama, esófago, tiroides, estómago, hígado, páncreas, colon, recto, piel, melanoma y sarcomas, entre otros. La cirugía oncológica ha sido cuestionada por producir alteraciones funcionales y estéticas de consideración, pero hoy permite practicar resecciones menos extensas, más precisas, con la conservación de órganos, extremidades y funciones, con menor morbilidad, conserva su capacidad curativa y deteriora en menor medida la calidad de vida (García *et al.*, 2011). Los tipos de cirugía más usados como tratamientos contra el cáncer son:

- **Criocirugía/Crioterapia:** Es un tratamiento que emplea frío extremo mediante el uso de nitrógeno líquido para la destrucción de tejido anormal.
- **Láseres:** Este tratamiento utiliza rayos de luz altamente concentrados para realizar cortes precisos en los tejidos, permitiendo operaciones precisas en áreas muy pequeñas.
- **Hipertermia:** Este tratamiento expone tejidos a temperaturas elevadas para dañar y destruir células cancerosas, o para hacer que estas células sean más sensibles a la radiación y a ciertos agentes quimioterapéuticos.
- **Terapia fotodinámica:** Este tratamiento utiliza medicamentos que responden a un tipo específico de luz. Al exponer el tumor a esta luz, los medicamentos se activan y eliminan a las células cancerosas cercanas. (NCI, 2015).

Radioterapia: La radioterapia usa radiación de alta energía, se emplean rayos X, gamma, neutrones, protones, entre otros, con el fin de destruir células cancerosas y disminuir el tamaño de tumores (Poitevin-Chacón, 2021).

Quimioterapia: esta terapia hace uso de agentes farmacológicos cuya finalidad es atacar a las células neoplásicas e inducir la muerte celular. El principal obstáculo en este tipo de tratamiento es la toxicidad que se puede presentar en el paciente, así como el desarrollo de resistencia a los fármacos (Martínez, 2018).

Terapia hormonal: Algunos cánceres necesitan hormonas para proliferar. Por esta razón, los tratamientos que modifican o bloquean las hormonas pueden ser efectivos para ralentizar o detener el avance de estos cánceres. Este tipo de tratamiento que emplea hormonas se utiliza para el tratamiento de algunos tipos de cáncer de mama y cáncer de próstata (NCIS, 2020).

Terapia biológica: Este tipo de terapia emplea el uso de productos biológicos para estimular el funcionamiento natural del cuerpo defensas o dañar directamente las células cancerosas y apuntar a receptores específicos (NCIS, 2020).

Trasplante de células madre: infusión de células madre sanas ya sea de un donante o del paciente para permitir que se administren dosis más altas de quimioterapia y/o utilizar el sistema inmunitario para combatir el cáncer (sólo se aplica a trasplante alogénico) (NCIS, 2020).

2.9 METALODROGAS (TIPOS Y PROPIEDADES)

El cáncer es una de las enfermedades que más afecta a la población mundial, según datos estadísticos una de cada seis defunciones es causada por esta enfermedad, por este motivo, se ha solicitado a la comunidad internacional tomar medidas específicas para combatirla (Contreras *et al.*, 2018). Los tipos de cáncer más agresivos se caracterizan por una alta tendencia a hacer metástasis desde el sitio primario e invadir otros órganos vitales, extendiéndose a través del sistema circulatorio y sistemas linfático, además de tener la capacidad de desarrollar resistencia a los tratamientos. Debido al aumento en el número de casos de

cáncer, ha surgido la necesidad de encontrar estrategias eficaces para frenar esta enfermedad letal (Simpson *et al.*, 2019).

Los compuestos a base de metales estaban presentes en gran medida en las antiguas farmacopeas, al lado de medicamentos crudos de origen natural (vegetal y animal) (Alama *et al.*, 2009). Sin embargo, debido a su selectividad limitada y su toxicidad los derivados metálicos fueron progresivamente desplazados en favor de compuestos orgánicos más fiables, ya sean sintéticos o aislados en forma pura a partir de fuentes naturales. No fue hasta 1965 en que surgió un interés renovado en los fármacos a base de metales gracias a el descubrimiento de Barnett Rosenberg, este químico descubrió la actividad antiproliferativa de un complejo de platino, reconocido como cis-diaminodicloroplatino (cisplatino) el cual después sería introducido exitosamente en la terapia del cáncer testicular (1978), esto dio pauta para dar inicio al estudio de complejos organometálicos, como agentes antitumorales (Alama *et al.*, 2009).

En la actualidad el cisplatino y sus derivados, como el carboplatino y el oxilplatino son los principales fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer y se emplean en más del 50% de las terapias oncológicas (Simpson *et al.*, 2019). El cisplatino produce daños en el ADN similares a los agentes alquilantes. Su mecanismo de acción citotóxico consiste en la activación mediante una reacción que implica el intercambio de los dos grupos salientes de cloruro con agua o ligandos hidroxilo. Luego, las moléculas de agua se intercambian con nitrógenos y azufres de proteínas y ácidos nucleicos con preferencia por las posiciones N-7 de adenina y guanina del ADN. Luego se forman lesiones de los enlaces de coordinación intracadena, así como otras lesiones bifuncionales en el ADN. Si las lesiones ocurren en la misma cadena de ADN y las bases son adyacentes, se denominan aductos de ADN. Si los sitios están en diferentes hebras, las lesiones se conocen como entrecruzamientos entre hebras. Todas estas lesiones conducen a la inhibición de las enzimas implicadas en la transcripción

del ARN, la replicación del ADN y el alargamiento de la cadena de polimerización del ADN (Alama *et al.*, 2009).

El cisplatino y sus derivados han jugado un papel fundamental en las terapias contra el cáncer, sin embargo, su uso generalizado ha sido limitado por los efectos secundarios que generan, resultado de su baja especificidad por células, ya que estos fármacos suelen atacar a las células sanas que algunas proliferan rápidamente, un ejemplo, son las del tracto gastrointestinal, la médula ósea o los folículos pilosos ocasionando diversas reacciones adversas (Lorenzo, 2019). El tratamiento con cisplatino se ha asociado con varios efectos secundarios tóxicos que incluyen nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y cardiotoxicidad. Se han informado muchos eventos cardíacos en informes de casos de pacientes bajo este tratamiento, en los que se incluyen arritmias, miocarditis, miocardiopatía e insuficiencia cardíaca congestiva (Dasari, 2014). Uno de los desafíos principales que se asocian a la terapia con estos complejos es la aparición de fenómenos de resistencia durante el tratamiento. Esta resistencia puede ser provocada por varios mecanismos, tales como la disminución en la absorción del fármaco o el incremento en su salida, entre otros procesos (Lorenzo, 2019).

Las limitaciones que se han correlacionado con el uso clínico de terapias basadas en platino han impulsado al mundo científico a investigar otros posibles candidatos anticancerígenos basados en metales que mostraran diferentes mecanismos de acción (Simpson *et al.*, 2019). En el campo del desarrollo de nuevos compuestos químicos, el estaño ha generado gran interés debido a que su concentración en tejidos neoplásicos es un tercio del que se encuentra en tejidos normales (Galván, 2016). El estaño y sus sales inorgánicas son esencialmente no tóxicos, sin embargo, las especies alquílicas presentan toxicidad. Los mecanismos de toxicidad de estos compuestos aún no están bien entendidos. La citotoxicidad inducida por los compuestos organometálicos de estaño se ha asociado a varios mecanismos: inhibición de la síntesis de macromoléculas, alteración del metabolismo energético de la mitocondria, reducción de la síntesis de ADN e interacción directa con la

membrana celular provocando un incremento de la concentración de calcio (Martínez, 2012). La interacción de los compuestos orgánicos de estaño con el ADN es principalmente de dos tipos:

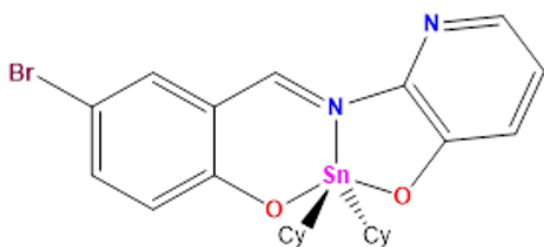
- Interacción electrostática, en la que los compuestos orgánicos de estaño interactúan con los fosfatos aniónicos del ADN.
- La intercalación, en la que los compuestos orgánicos de estaño se insertan en los pares de bases apiladas de ADN (Martínez, 2012).

Por lo anterior, se ha impulsado la síntesis de compuestos a partir de ligantes de diversa naturaleza como alcoholes, tioles, aminoalcoholes, ácidos carboxílicos, bases de Schiff, compuestos orgánicos heterocíclicos, observando en todos los casos una alta citotoxicidad (Galván, 2016). En particular, las bases de Schiff son de suma importancia en la química de coordinación debido a su simplicidad y versatilidad como ligandos, además forman complejos estables con la mayoría de los iones metálicos que pueden servir como modelos para estudiar una amplia gama de reacciones biológicas catalizadas por enzimas (Galván-Hidalgo *et al.*, 2017). Un ejemplo de compuestos con bases de Schiff son los compuestos de organoestaño 3a-3h que han mostrado tener efecto antiproliferativo en distintas líneas celulares de cáncer como U-251 (glioblastoma), K-562 (leucemia mielógena), HCT-15 (colorrectal), MCF-7 (mama), MDA-MB-231 (mama) y SKLU-1 (adenocarcinoma de pulmón), demostrando poseer actividad antiproliferativa y apoptótica (Galván-Hidalgo, 2020) (Tabla 1).

Compound	U-251	K-562	HCT-15	MCF-7	MDA-MB231	SKLU-1
3a	0.51 ± 0.03	0.33 ± 0.03	1.36 ± 0.02	1.28 ± 0.1	0.49 ± 0.03	0.48 ± 0.03
3b	0.49 ± 0.06	0.36 ± 0.02	0.92 ± 0.02	0.56 ± 0.04	0.34 ± 0.02	0.44 ± 0.03
3c	0.29 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.98 ± 0.1	0.62 ± 0.04	0.42 ± 0.03	0.33 ± 0.03
3d	0.49 ± 0.06	0.42 ± 0.03	1.18 ± 0.06	1.31 ± 0.1	0.46 ± 0.04	0.58 ± 0.02
3e	0.31 ± 0.05	0.26 ± 0.02	1.15 ± 0.1	0.33 ± 0.04	0.49 ± 0.04	0.39 ± 0.02
3f	0.43 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.85 ± 0.02	0.67 ± 0.03	0.50 ± 0.08	0.41 ± 0.05
3g	0.33 ± 0.07	0.37 ± 0.05	1.04 ± 0.1	0.23 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.53 ± 0.08
3h	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.83 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.35 ± 0.02
<i>Cis-platin</i>	39.09 ± 3.10	19.90 ± 1.8	7.6 ± 3.1	28.4 ± 1.1	12.7 ± 1.2	27.9 ± 1.9

Tabla 1. Concentraciones inhibitorias (IC₅₀ [μM]) para los complejos 3a-3h (Gálvan-Hidalgo y colaboradores, 2020).

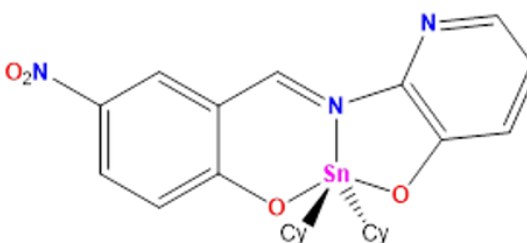
Entre las bases de Schiff aromáticas, las basadas en piridoxal y en especial sus complejos metálicos han despertado especial interés en las últimas décadas debido a su potente actividad antitumoral (Galván-Hidalgo *et al.*, 2017). En particular, el piridoxal es una de las vitaminas más importantes del organismo. Interviene como cofactor en varios sistemas enzimáticos y es imprescindible para el normal funcionamiento del metabolismo proteico (Hernández, 2017). Los complejos metálicos derivados del piridoxal son relevantes para una comprensión global del mecanismo de acción del piridoxal *in vivo* y para el desarrollo de nuevos compuestos bioactivos para uso terapéutico, como agentes anticancerígenos (figura 5). En presencia de iones metálicos, el piridoxal puede catalizar importantes reacciones metabólicas, como la transaminación, descarboxilación y racemización de aminoácidos (Galván-Hidalgo *et al.*, 2017). Además, se ha descrito que las células tumorales presentan una mayor tasa de toma de vitamina B6 en comparación con las células normales. Puesto que los complejos de estaño tienen actividad propia, a este respecto resulta especialmente interesante un compuesto de estaño con una base de piridoxal de Schiff (Galván-Hidalgo *et al.*, 2017).



10,10-Dicyclohexyl-5-bromo-1,6-diaza-10-stanna-9,11-dioxatetracyclo[8.7.0.0^{1,8,0,12,17}]heptadeca-1,3,5,7,13,15-hexaene (**1d**) (**5a**).

Formula molecular: C₂₄H₂₉BrN₂O₂Sn

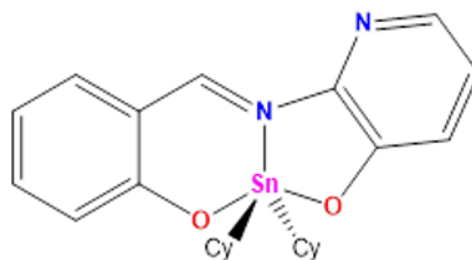
Peso molecular: 576.11



10,10-Dicyclohexyl-5-nitro-10-stanna-1,6-diaza-9,11-dioxatetracyclo[8.7.0.0^{1,8,0,12,17}]heptadeca-1,3,5,7,13,15-hexaene (**1h**) (**5c**).

Formula molecular: C₂₄H₂₉N₃O₄Sn

Peso molecular: 542.21



10,10-Dicyclohexyl-1,6-diaza-10-stanna-9,11-dioxatetracycle[8.7.0.0^{1,8}0.^{12,17}]heptadeca-1,3,5,7,13,15-heptaene (**1a**) (**5f**).

Formula molecular: C₂₄H₃₀N₂O₂Sn

Peso molecular: 497.22

Figura 5. Estructura química de los compuestos de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal 5A, 5C y 5F, así como su fórmula y peso molecular.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

Las personas diagnosticadas con cáncer tienen varios tratamientos opcionales que dependen tanto del tipo de cáncer implicado y de lo lejos que se haya diseminado. El abordaje más habitual implica cirugía para eliminar el tumor primario seguido (si es necesario) de una terapia de radiación y/o quimioterapia para destruir cualquier célula cancerosa remanente (Becker *et al.*, 2007).

Las terapias convencionales contra el cáncer son efectivas en etapas iniciales de la enfermedad, pero en etapas avanzadas son poco eficientes. Uno de los grandes problemas de estos tratamientos es su baja selectividad, ya que dañan tanto a células normales como a las células del cáncer, lo que reduce el margen de seguridad, de igual manera, las dosis de radiación o de drogas quimioterapéuticas no se puede aumentar lo suficiente para matar células cancerígenas porque esto podría suponer grandes efectos secundarios en el organismo (Alberts *et al*, 2016). En un esfuerzo por disminuir los efectos secundarios de los tratamientos convencionales se han implementado estrategias basadas en compuestos organometálicos de estaño que presentan una actividad antitumoral y no necrótica, así como una mayor selectividad.

4 HIPÓTESIS

Se ha reportado que los compuestos organometálicos de estaño presentan una actividad antiproliferativa y apoptótica contra varias líneas celulares tumorales, por lo que se espera que los compuestos organometálicos de estaño 5A, 5C y 5F presenten una actividad antiproliferativa y apoptótica, así como una baja actividad necrótica en la línea celular JC.

5 OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de los compuestos organometálicos de estaño 5A, 5C y 5F sobre la línea celular JC.

5.2 PARTICULARES

- Determinar si los compuestos organometálicos de estaño 5A, 5C y 5F presentan actividad antiproliferativa en la línea celular JC y definir la concentración inhibitoria del 50% de la densidad celular (IC_{50}) a través de la técnica de incorporación de cristal violeta.
- Valorar la actividad necrótica de los compuestos 5A, 5C y 5F en células tumorales JC al cuantificar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares.
- Evaluar el efecto apoptótico de los compuestos 5A, 5C Y 5F en la línea celular JC a través de la observación de las características morfológicas propias de las células apoptóticas por microscopia de contraste de fases y tinción con DAPI, así como la inmunodetección de la caspasa-3 activa y la pro-caspasa-8 por microscopía de fluorescencia.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de células tumorales.

Las células de la línea celular JC provenientes de un modelo murino de cáncer de mama fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD) y se sembraron en cajas Petri de vidrio de 100 mm de diámetro (Pírex, USA) con 10 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con suero de neonato de ternera (NCS, Gibco, USA) al 3% y suero fetal bovino al 2%. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂.

6.2 Preparación de los compuestos.

Para la preparación del compuesto 5A se utilizó una balanza analítica para pesar 1mg del compuesto y fue solubilizado en 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO), se partió de un stock inicial con una concentración de 10µg/µL y se realizaron curvas dosis-respuesta. Lo anterior se repitió con los compuestos 5C y 5F.

6.3 Determinación de la concentración inhibitoria del 50% del número celular de cultivos de células tumorales (IC₅₀).

Se cultivaron células de la línea tumoral JC en cajas de plástico de 96 pozos (Corning, USA), con una densidad de 7000 células por pozo en 100 µl de RPMI-1640 al 3% de suero de neonato de ternera (NCS) y 2% de suero fetal bovino (SFB) por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionaron las concentraciones del compuesto en 100 µl RPMI-1640 suplementado con suero durante 24 horas. Para el control se realizó un cambio de medio por medio de cultivo fresco y en el vehículo se agregó 0.1 µl de DMSO por pozo. Transcurridas 24 horas del estímulo, se procedió a evaluar el número celular por medio de la técnica de incorporación de cristal violeta (Kueng *et al.*, 1989). Para esto se retiró el medio de cultivo contenido en la caja de 96 pozos y se añadieron 40 µl de glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Chemical, USA), y se dejó en una placa de agitación durante 20 minutos, al término se retiró el glutaraldehído, se lavó perfectamente con

agua del grifo y posteriormente con agua destilada. Después, se colocaron 40 µl de colorante cristal violeta al 0.1 % (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos. Se eliminó el exceso de colorante a través de múltiples lavados con agua, se retiró el agua de los pozos y se dejó secar. Posteriormente se añadieron 100 µl de ácido acético al 10% y se colocó en una placa de agitación durante 20 minutos. Por último, se midió la absorbancia en un lector de placas a 590 nm. Los resultados se analizaron por regresión lineal para la obtención de la concentración inhibitoria del 50% de la densidad celular (IC₅₀).

6.4 Determinación de necrosis a partir de la liberación de la enzima LDH.

En placas de 96 pozos (Corning, USA) se sembraron 7,000 células/pozo de la línea celular JC con 100µL de medio RPMI al 5% de suero de neonato de ternera (NCS) y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas. Una vez transcurridas el tiempo de incubación, se sustituyó el medio de cultivo en las placas por medio de cultivo fresco con los compuestos 5A, 5C y 5F a sus respectivas IC₅₀; se consideró un control basal (células sin tratamiento) y un control positivo (cisplatino), así como las demás condiciones (DMSO y concentraciones). La concentración de cisplatino fue de 10 µg/mL (32 µM) (Pérez, 2017; Galván-Hidalgo, 2020).

Una hora antes de cumplir las 24 horas del tratamiento se sustituyó el medio del control positivo con medio fresco con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al 1%, una vez transcurridas las 24 horas se retiraron los 100µL de medio de cada condición para colocarlos en una placa de 96 pozos de fondo cónico, estos fueron centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos. Para la valoración 50µL de RPMI de cada condición fueron transferidos a una placa de 96 pozo nueva, a esta placa nueva se le adicionó 50µL de la mezcla de reacción del *Kit Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega, USA) y se dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Por último, se midió la absorbancia mediante un lector de placas EPOCH a una longitud de onda de 490nm.

6.5 Inmunodetección de caspasa 3 y 8 por microscopía de fluorescencia.

Se sembraron 7000 células por pozo de la línea tumoral JC en una placa de 96 pozos (Corning, USA), en cada pozo se pusieron 100µL de RPMI-1640 (Gibco, USA) al 5% de NCS; estas células se mantuvieron en una incubadora (Nauaire, USA) al 5% de CO₂ a 37° C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, las células se estimularon con las siguientes condiciones: a) control (medio de cultivo fresco), b) vehículo (concentración máxima de DMSO correspondiente a la IC50 de la línea celular JC), c) control positivo de muerte apoptótica con Cisplatino en una concentración de 10µg/mL y d) concentraciones de IC50 para los compuesto 5A, 5C Y 5F. La placa se mantuvo en incubación por 24 horas.

Pasadas las 24 horas del estímulo se retiró el medio de cultivo y se fijaron con 50 µL/pozo de paraformaldehído (Sigma-Aldrich, USA) al 2% por 20 minutos. Se hicieron 3 lavados con 100 µL/pozo de PBS y se procedió a permear las células con Tritón X-100 al 0.5% en PBS a una temperatura de 4°C durante 5 minutos. Después se realizaron 3 lavados más con 100µL de PBS. Una vez realizados los lavados se adicionaron 30 µL/pozo de anticuerpo 1° anti-caspasa-3 activa (Abcam) (proporción 1 a 200 µL de PBS) y anti-caspasa-8 (Abcam) (proporción 1 a 500 µL de PBS), durante 24 con una temperatura de 4°C. Una vez transcurridas las 24 horas se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS y se añadió 30 µL/pozo de anticuerpo 2° (Alexa 488 invitrogen) (proporción 1 a 200 µL de PBS), este anticuerpo se adicionó a temperatura ambiente, posteriormente, se colocó la placa en un lugar protegido de la luz durante 2 horas. Se realizaron 3 lavados más con 100 µL de PBS y se añadió 30µL de colorante fluorescente DAPI (Sigma-Aldrich, USA) protegido de la luz durante 1 minuto, pasado el minuto se realizaron los últimos 3 lavados con 100 µL de PBS y se observaron las células en un microscopio (Nikon Eclipse TS2R-FL, JAP), a estas células se les tomaron fotos en campo claro con iluminación de contraste de fases y por microscopía de epifluorescencia.

6.6 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos se analizaron utilizando Microsoft Excel 365 para calcular la media y la desviación estándar. Por otra parte, a los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para la comparación entre medias, posteriormente, se le aplicó una prueba de Tukey para obtener la diferencia entre los pares de medias de estos datos, lo anterior se realizó con un nivel de significancia de 0.05.

7 RESULTADOS

7.1 Actividad antiproliferativa de los compuesto 5A, 5C y 5F en cultivos de la línea celular JC.

Con el fin de determinar si los compuestos organometálicos de estaño 5A, 5C y 5F presentan actividad antiproliferativa sobre las células tumorales, cultivos de células JC fueron tratados con diferentes concentraciones de los compuestos organometálicos mencionados y el número celular fue determinado mediante la técnica de tinción con cristal violeta.

Los datos mostraron que los compuestos provocan una disminución del número celular de manera dosis-dependiente (Figuras 6, 7 y 8); en donde se apreció que las cantidades requeridas para disminuir el número celular en un 50% fue menor de 1 µg/mL.

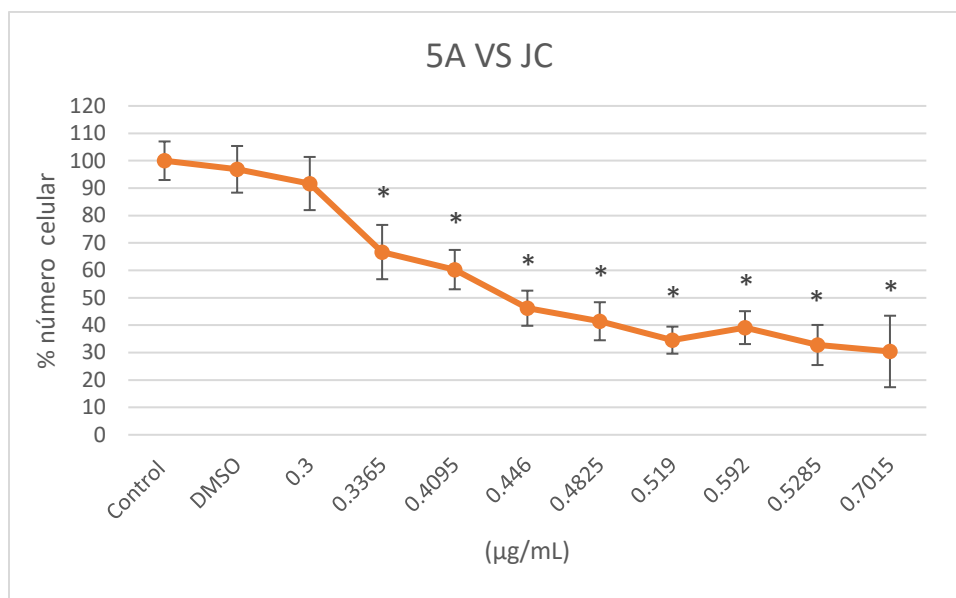


Figura 6. Efecto del compuesto organometálico 5A en la proliferación de células JC. El número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta. Los datos obtenidos son representativos de 3 ensayos independientes, a los datos obtenidos se les realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba de Tukey, donde * indica una diferencia significativa $p < 0.05$ vs. Control.

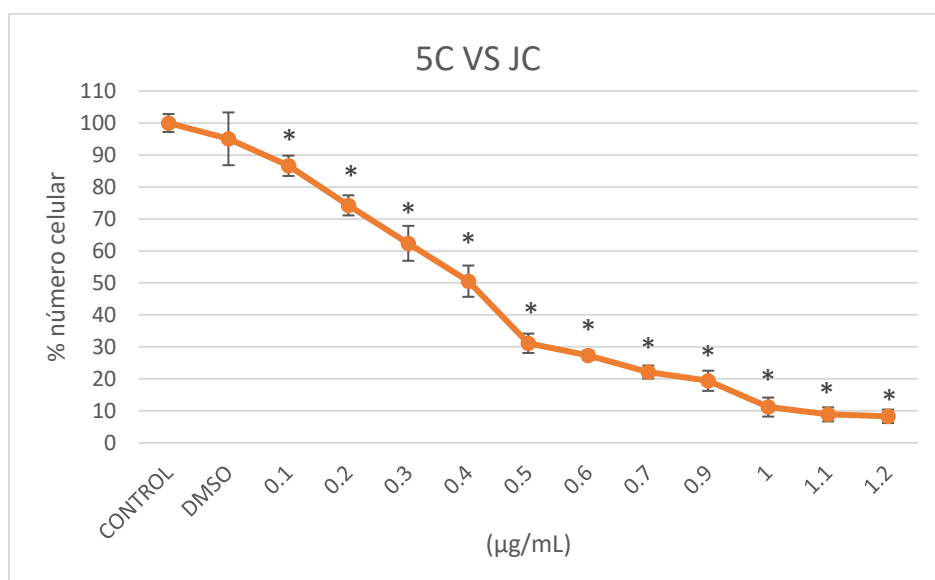


Figura 7. Efecto del compuesto organometálico 5C en la proliferación de células JC. Se empleó la técnica de cristal violeta para evaluar el número de celular. Los datos obtenidos son representativos de 3 ensayos independientes, a los datos obtenidos se les realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba de Tukey, donde * indica una diferencia significativa $p < 0.05$ vs. Control.

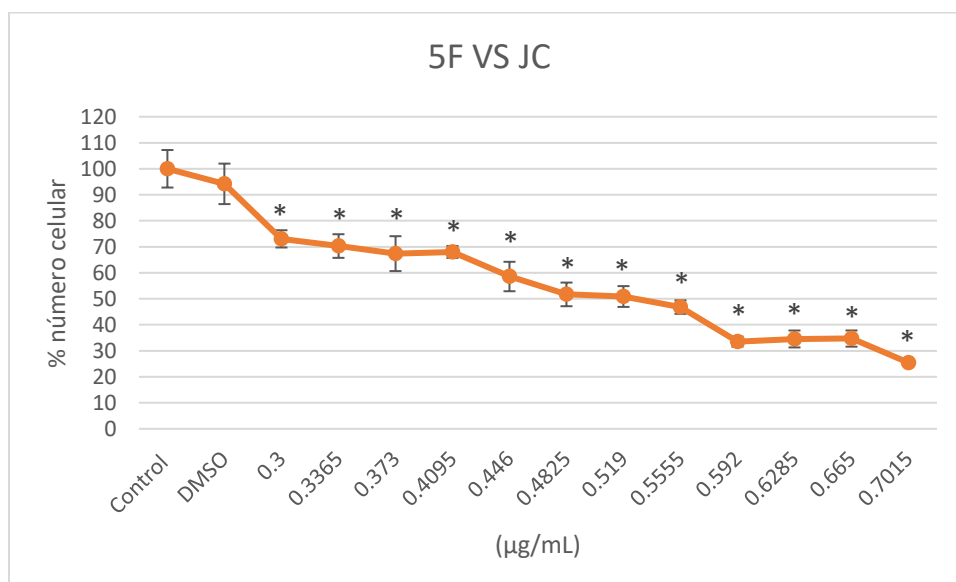


Figura 8. Efecto del compuesto organometálico 5F en la proliferación de células JC. Se empleó la técnica de cristal violeta para evaluar el número de celular. Los datos obtenidos son representativos de 3 ensayos independientes, a los datos obtenidos se les realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba de Tukey, donde * indica una diferencia significativa $p < 0.05$ vs. Control.

Por otro lado, se obtuvieron los valores de las IC50 mediante la técnica de la ecuación de la línea recta, mostradas en la tabla 2, lo que evidencia que la cantidad requerida del compuesto 5F para lograr disminuir en un 50% a la población de la línea celular tumoral JC es mayor que las de los compuestos 5A y 5C (Tabla 2).

Compuesto	IC50 µg/mL	IC50 µM
5A	0.45	0.78
5C	0.395	0.68
5F	0.501	0.86

Tabla 2. Valores de la concentración de los compuestos 5A, 5C y 5F que inhiben en un 50% el número celular (IC_{50}), para la línea de cáncer de mama murino JC expresada en $\mu\text{g/mL}$ y en μM .

Los resultados obtenidos establecen que los compuestos organometálicos 5A, 5C y 5F afectan el potencial proliferativo en la línea celular JC de una manera dosis dependiente.

7.2 Actividad necrótica de los compuestos 5A, 5C Y 5F en la línea celular JC.

En ciertos casos, la disminución en el número celular causada por un compuesto podría deberse a una acción necrótica, cuya característica principal es la pérdida de la integridad de la membrana celular y la liberación descontrolada del contenido citoplasmático hacia el espacio extracelular. Con la intención de determinar si los compuestos organometálicos 5A, 5C y 5F presentan actividad necrótica sobre la línea celular JC, cultivos de esta línea celular fueron tratados con las concentraciones de IC_{50} obtenidas previamente de cada compuesto y se determinó la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes obtenidos de los cultivos celulares (figura 9).

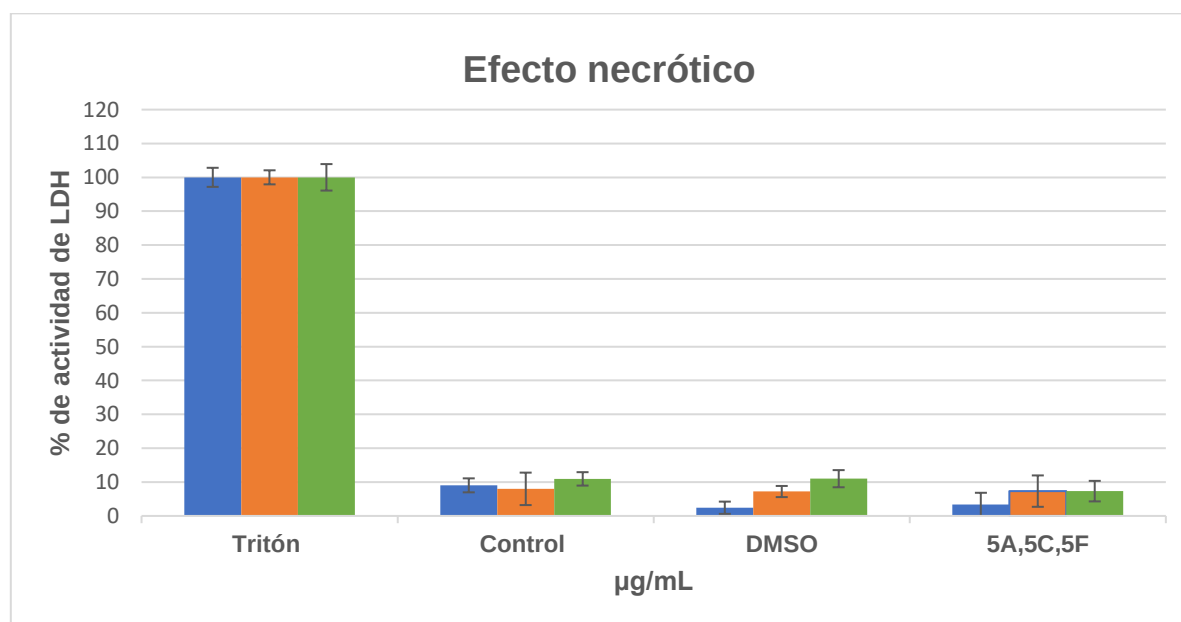


Figura 9. Actividad de la enzima LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de células JC tratadas con los compuestos 5A, 5C y 5F. El control positivo consistió en células permeadas con Tritón x-100 (0.5%) y tomadas como el 100% de actividad necrótica; mientras que el DMSO, son células con la concentración requerida de DMSO utilizada para el tratamiento con los compuestos 5A, 5C y 5F en la línea celular JC. Los datos obtenidos son representativos de 3 ensayos independientes, a los datos obtenidos se les realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba de Tukey con $p < 0.05$ vs. Control.

Los resultados mostrados en la figura 9, indican que los compuestos 5A, 5C Y 5F no provocan la liberación de la enzima LDH al medio extracelular en la línea celular JC, esto sugiere que los compuestos no inducen una muerte necrótica y que la disminución en el número celular se debe a otros factores distintos a una muerte necrótica.

7.3 Morfología apoptótica de los compuestos organometálicos 5A, 5C Y 5F.

Una vez que se obtuvieron las IC₅₀ de los compuestos 5A, 5C Y 5F y que se determinó que la actividad necrótica de los compuestos no era significativa, se procedió a evaluar la actividad inductora de apoptosis de los compuestos en cultivos de células tumorales JC. Para ello, cultivos celulares de la línea tumoral JC fueron tratados con sus respectivas IC₅₀ y las características morfológicas propias de células apoptóticas fueron observadas a través de microscopia por contraste de fases. Los resultados mostraron que las células del control y el vehículo (DMSO) mostraron una morfología típica de la línea celular en la que las células se ven alargadas y adheridas al plato de cultivo, mientras que los compuestos 5A, 5C y 5F provocaron en las células una contracción celular y en la tinción DAPI se puede apreciar una compactación y fragmentación de la cromatina (Figuras 10 a 12). Los cambios que mostraron las células tratadas con los compuestos corresponden a un proceso de muerte apoptótico.

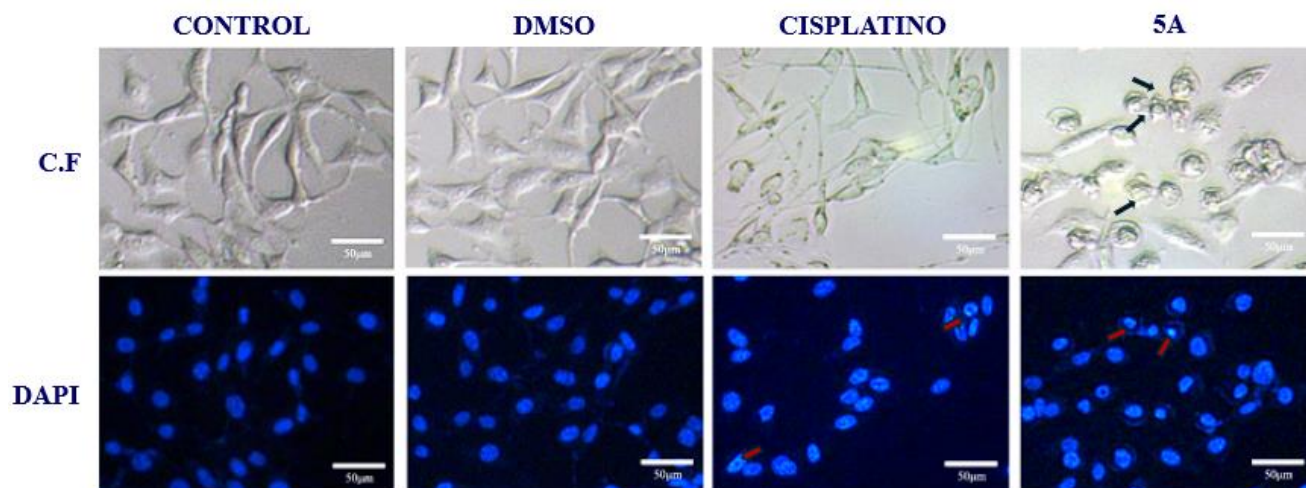


Figura 10. Micrografías de células de la línea tumoral JC. La morfología celular de la línea JC se puede observar en el contraste de fases (C.F), en donde podemos observar en el control y el DMSO la morfología alargada típica de las células, mientras que en el control positivo (cisplatino) y en el compuesto 5A podemos observar una contracción celular, de igual manera, las células tratadas con el compuesto evidencian en gran medida una pérdida de proyecciones citoplasmáticas (flechas negras). Por otra parte, en la tinción con DAPI observamos núcleos homogéneos para el control y el DMSO, mientras que el control positivo y las células tratadas con el compuesto muestran una compactación de la cromatina (flechas rojas). Las imágenes son representativas de 3 ensayos realizados de manera independiente.

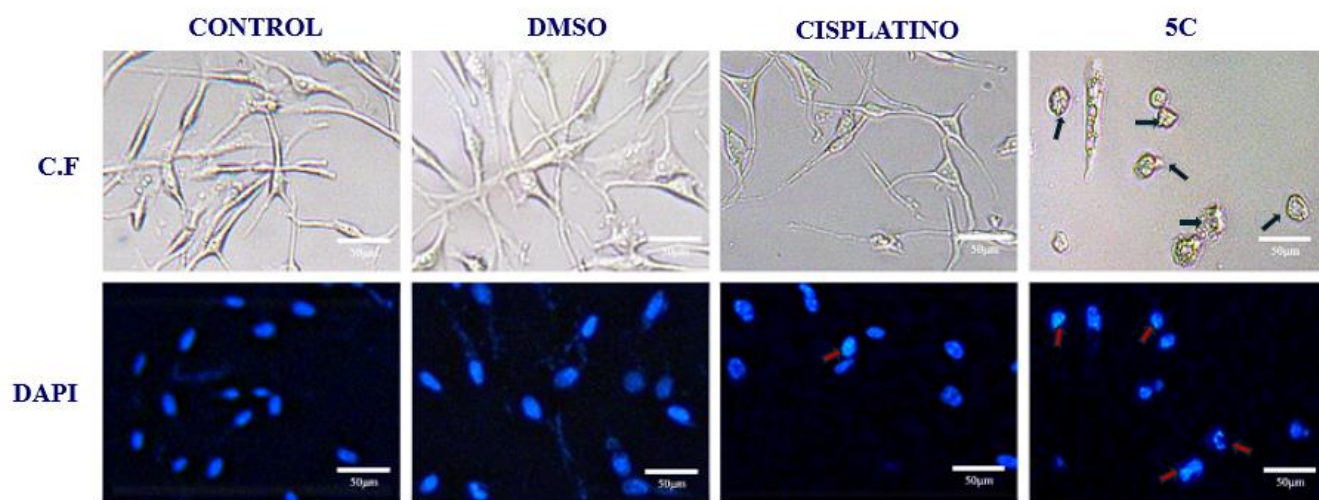


Figura 11. Micrografías de células de la línea tumoral JC. La morfología celular de la línea JC se puede observar en el contraste de fases (C.F), en donde podemos observar en el

control y el DMSO la morfología alargada típica de la línea celular, mientras que en el control positivo (cisplatino) y en el compuesto 5C podemos observar una contracción celular, de igual manera, las células tratadas con el compuesto muestran en gran medida una pérdida de proyecciones citoplasmáticas (flechas negras). Por otra parte, en la tinción con DAPI observamos núcleos homogéneos para el control y el DMSO, mientras que el control positivo y las células tratadas con el compuesto muestran una compactación de la cromatina (flechas rojas). Las imágenes son representativas de 3 ensayos realizados de manera independiente.

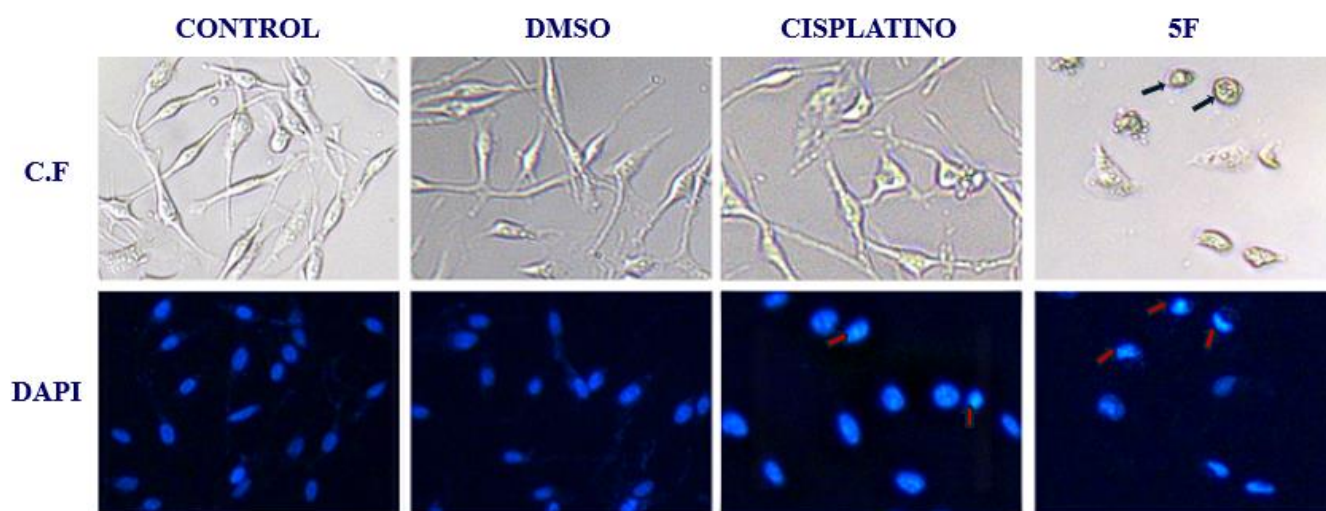


Figura 12. Micrografías de células de la línea tumoral JC. La morfología celular de la línea JC se puede observar en el contraste de fases (C.F), en donde podemos observar en el control y el DMSO la morfología alargada típica de la línea celular, mientras que en el control positivo (cisplatino) y en el compuesto 5F podemos observar una contracción celular, de igual manera, las células tratadas con el compuesto muestran en gran medida una pérdida de proyecciones citoplasmáticas (flechas negras). Por otra parte, en la tinción con DAPI observamos núcleos homogéneos para el control y el DMSO, mientras que el control positivo y las células tratadas con el compuesto muestran una compactación de la cromatina (flechas rojas). Las imágenes son representativas de 3 ensayos realizados de manera independiente.

7.4 Inmunodetección de caspasa 3 activa

Para poder definir si los cambios morfológicos provocados por los compuestos 5A, 5C y 5F corresponden a una muerte por apoptosis se determinó la presencia de la caspasa-3 activa y pro-caspasa-8 (figuras 13-18). Para ello, se cultivaron células de la línea JC y fueron tratadas con las IC_{50} correspondientes de cada compuesto, las células fueron teñidas con DAPI y se llevó a cabo una inmunodetección de la caspasa-3 activa y pro-caspasa-8 observadas por microscopia de epifluorescencia.

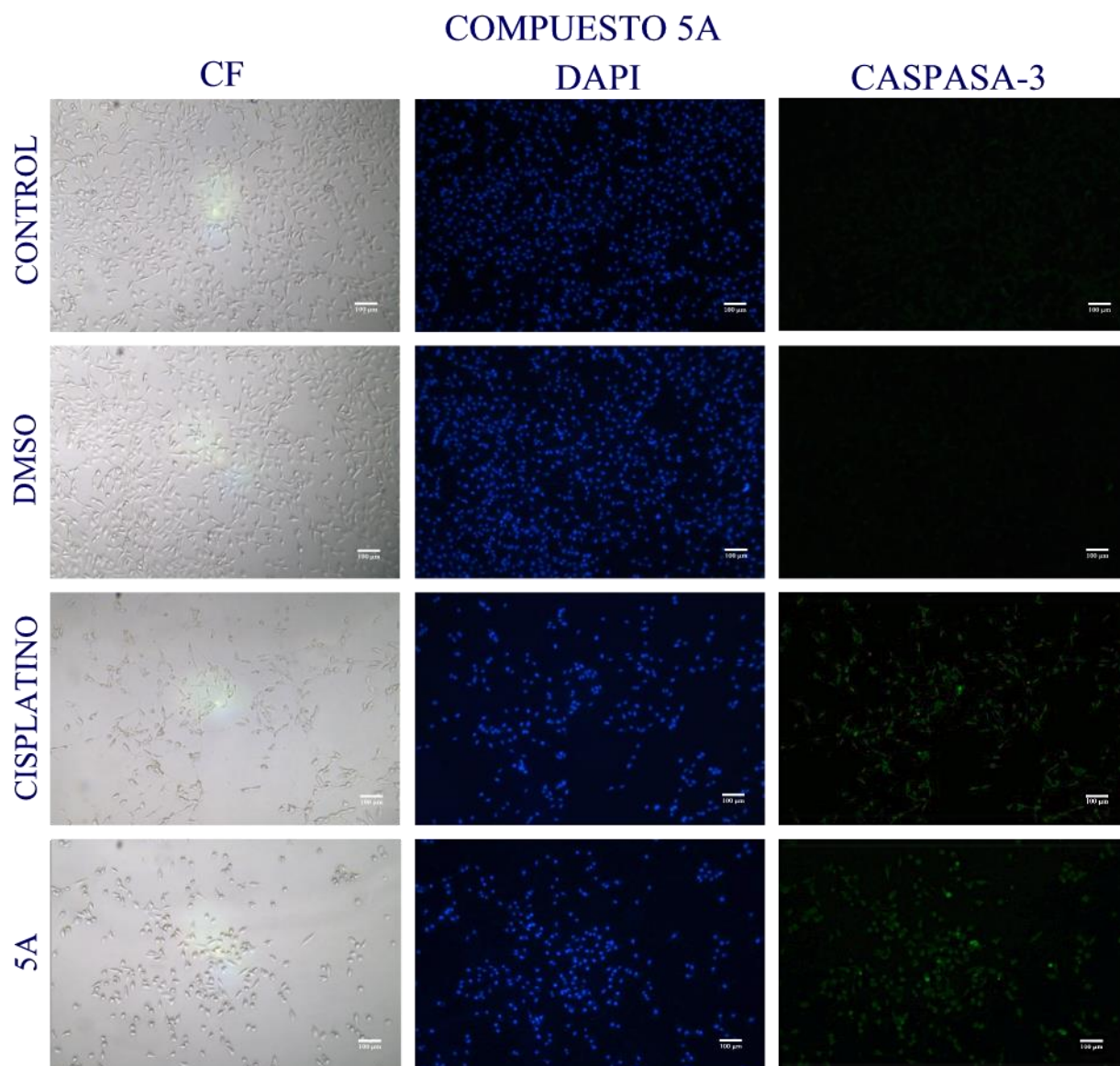


Figura 13. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células de la línea JC tratadas con el compuesto 5A. Las células tratadas con el compuesto muestran características propias de una muerte apoptótica y marca positiva a la inmunodetección de la proteasa.

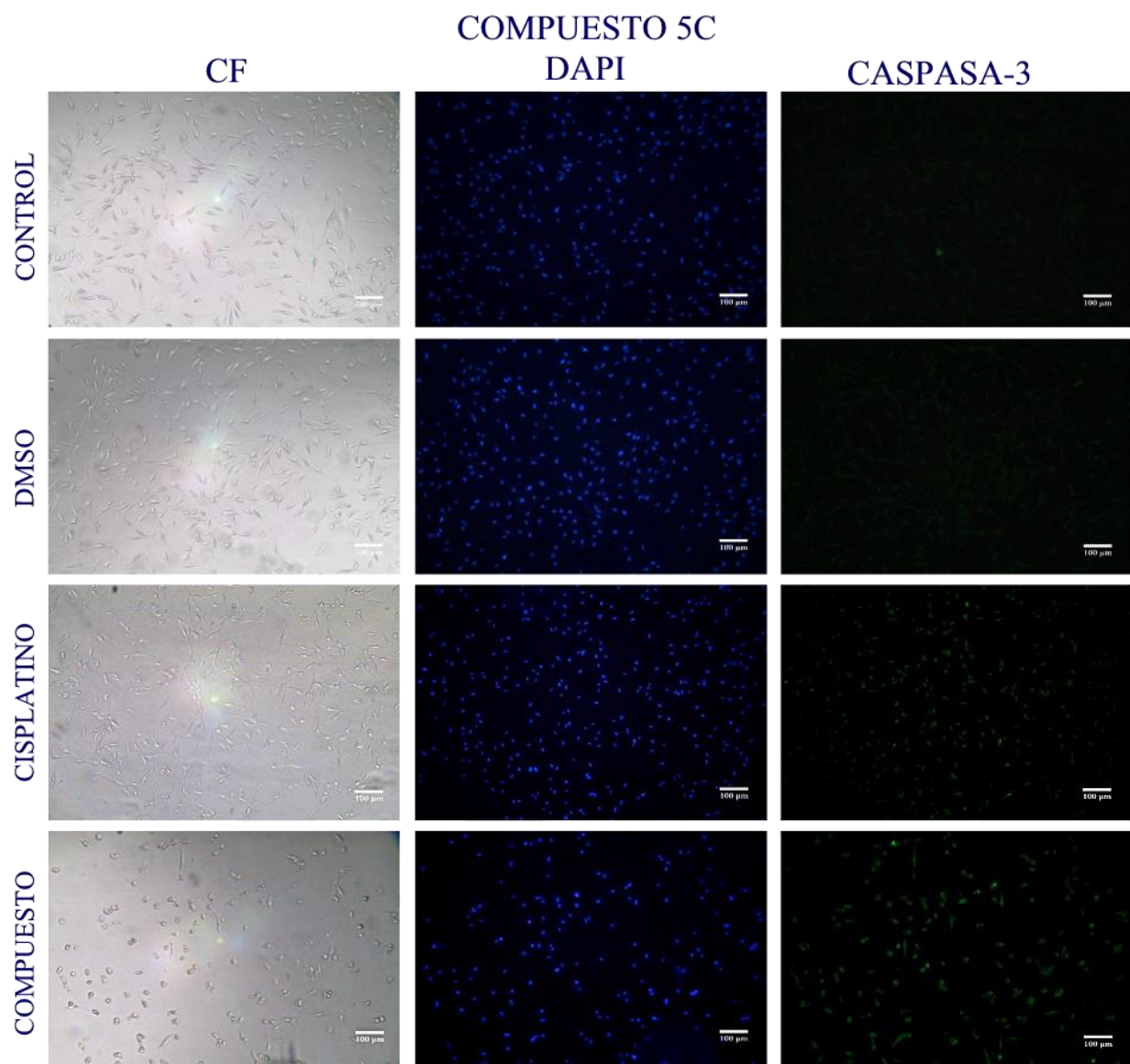


Figura 14. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células de la línea JC tratadas con el compuesto 5C. Las células tratadas con el compuesto muestran inmunofluorescencia positiva a la detección de la enzima apoptótica.

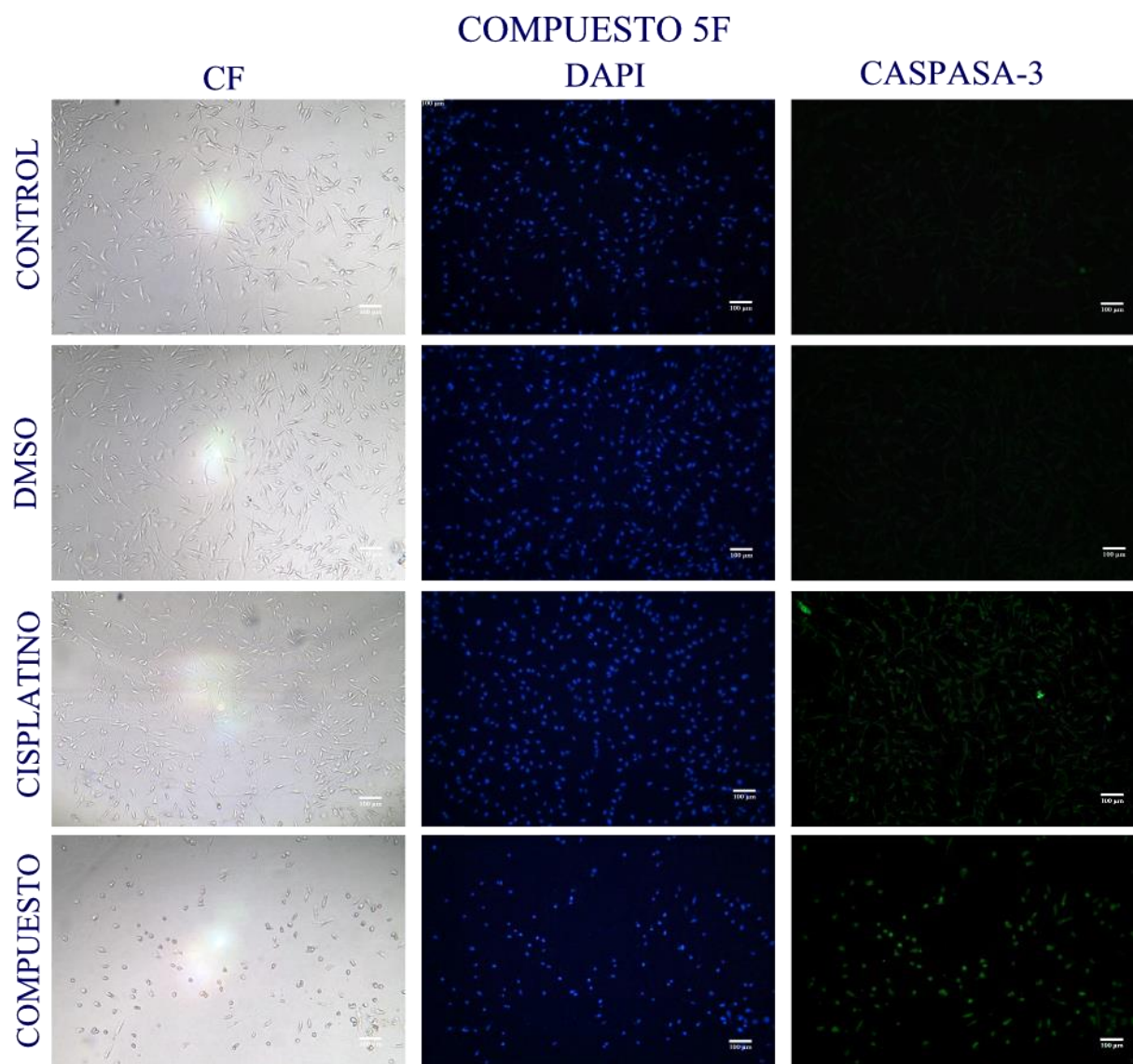


Figura 15. Inmunodetección de la caspasa-3 activa en células de la línea JC tratadas con el compuesto 5F. Se observa que las células tratadas con el compuesto son positivas a la detección de la proteína caspasa-3 activa.

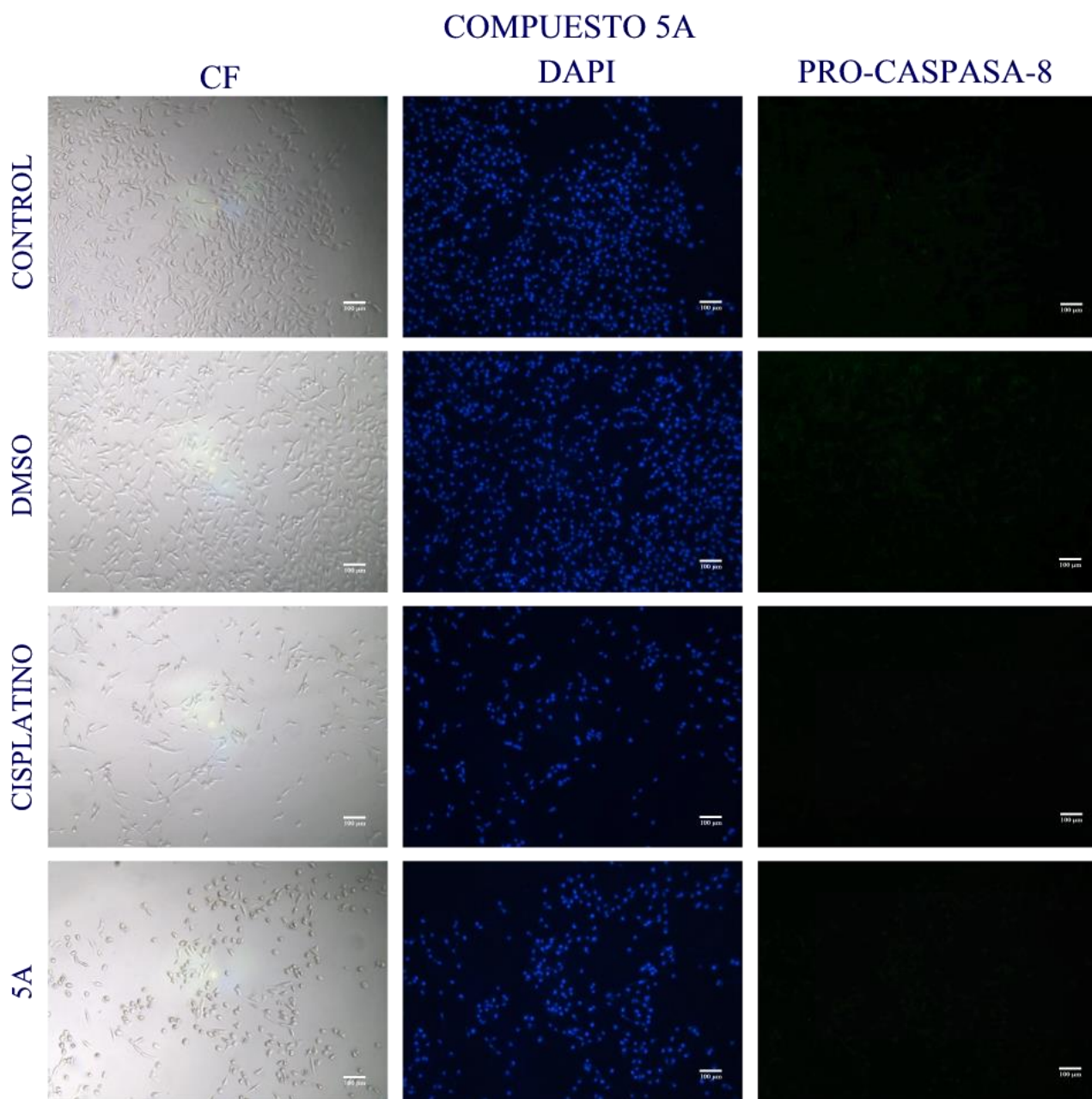


Figura 16. Inmunodetección de pro-caspasa-8 en células de la línea JC tratadas con el compuesto 5A. Se observa que a pesar de que existe una disminución de la cantidad de células en 5A con respecto al control como se observa en el contraste de fases (CF), no hay un incremento en la marca positiva para pro-caspasa-8 en las células tratadas con el compuesto.

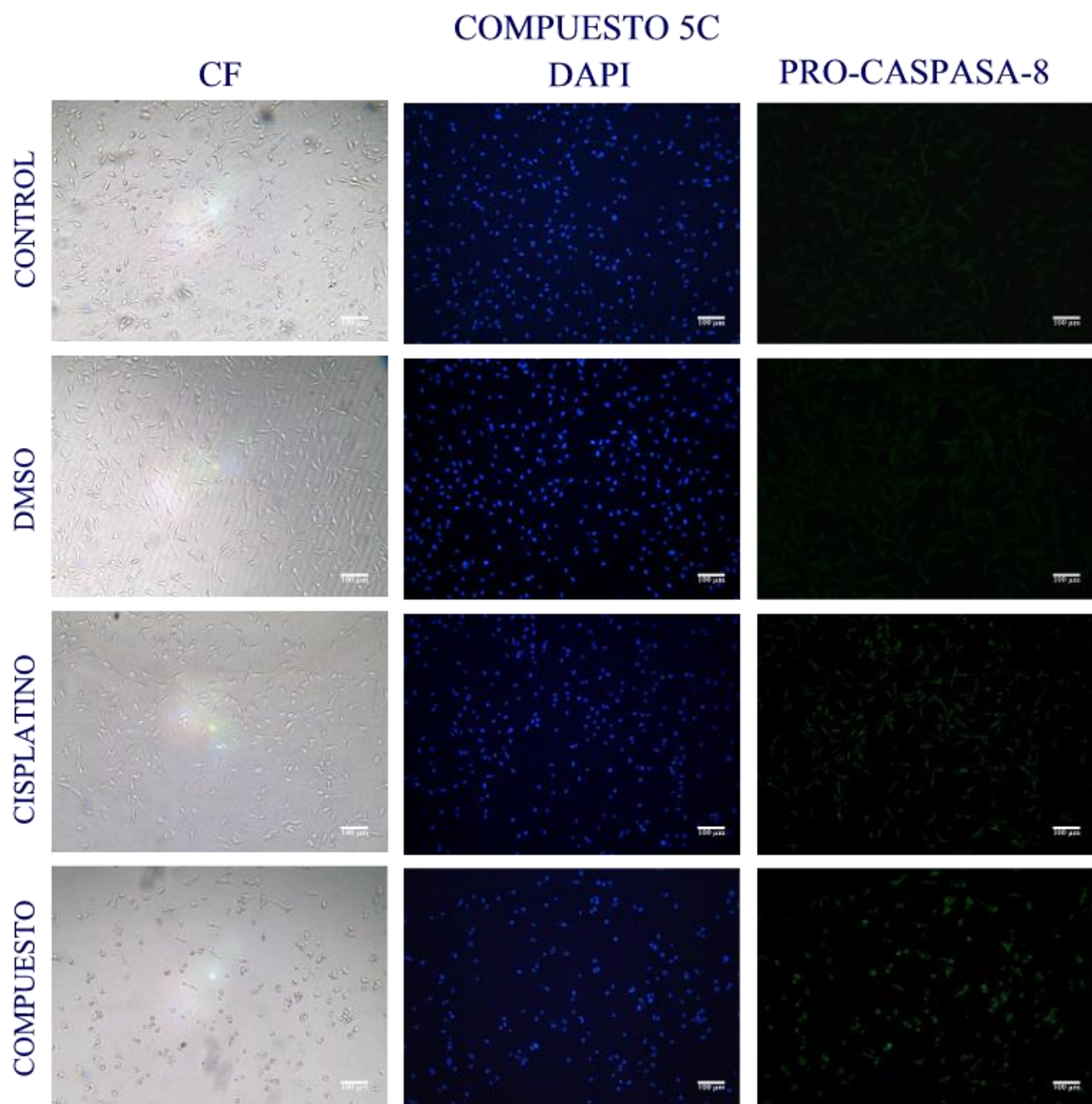


Figura 17. Inmunodetección de pro-caspasa-8 en células de la línea JC tratadas con el compuesto 5C. Las células tratadas con el compuesto muestran una marca positiva incrementada del inmunomarcado para la proteína pro-caspasa-8.

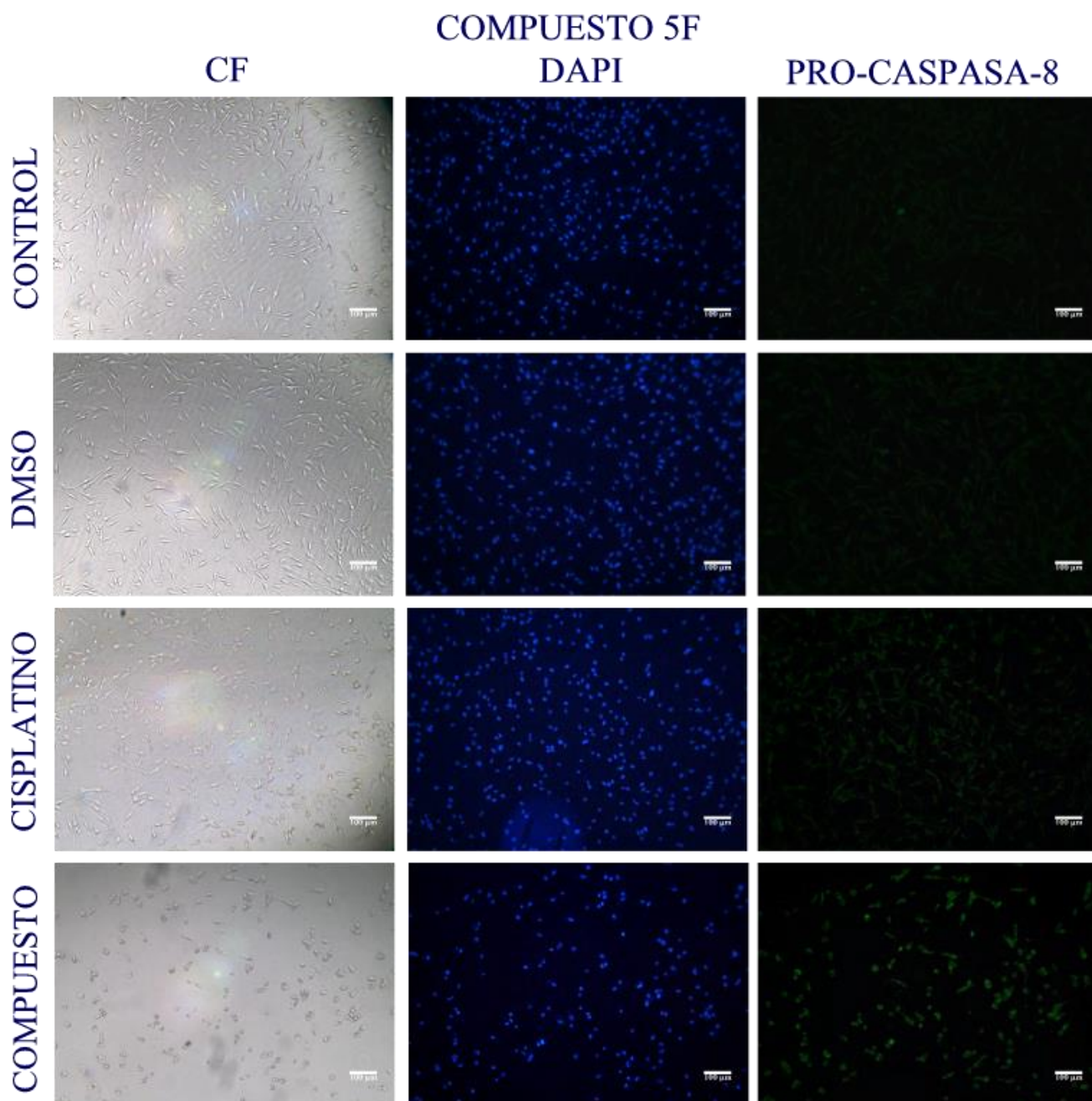


Figura 18. Inmunodetección de pro-caspasa-8 en células de la línea JC tratadas con el compuesto 5F. Las células tratadas con el compuesto muestran una presencia incrementada de pro-caspasa-8.

Los resultados obtenidos en las figuras 13-18 establecen que los compuestos de organoestaño 5A, 5C y 5F inducen a las células tumorales de cáncer de mama JC a expresar una morfología típica de células apoptóticas, mostrando células

contraídas, con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas y con forma esférica, mientras que los núcleos se muestran compactados con la cromatina condensada y en algunos núcleos la cromatina se encuentra fragmentada. Además, se observan células positivas a la caspasa-3 activa y la pro-caspasa-8 que en conjunto con la morfología apoptótica indican que estos compuestos inducen a las células tumorales JC a ser eliminadas por un proceso apoptótico.

8 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El cáncer es la segunda causa de muerte y mata a casi 10 millones de personas cada año en todo el mundo. Los tumores malignos pueden surgir de diferentes tejidos y órganos, por lo que existen muchos tipos diferentes de cáncer. En todos ellos se pierde el control normal de la división y diferenciación celular, de modo que una célula individual se multiplica de forma inadecuada formando un tumor maligno primario. Las células cancerosas pueden eventualmente diseminarse por el cuerpo y formar metástasis potencialmente mortales (Carlberg, 2021).

Los compuestos a base de platino siguen siendo los agentes quimioterapéuticos más eficaces, sin embargo, estos medicamentos con platino son propensos a sufrir efectos secundarios como nefrotoxicidad, ototoxicidad, neurotoxicidad y también enfrentan una resistencia cada vez mayor de las líneas celulares cancerosas (DeVita *et al.* 2017). Por lo anterior se ha impulsado la búsqueda de compuestos no basados en platino para la creación de fármacos quimioterapéuticos con el fin de desarrollar terapias más eficientes que no perjudiquen la calidad de vida del paciente.

Los compuestos de estaño (IV) muestran una amplia gama de aplicaciones, desde usos biológicos hasta industriales y en los últimos años ha aumentado considerablemente el interés por estos compuestos en la química medicinal, especialmente en relación con el desarrollo de fármacos contra el cáncer, ya que han demostrado su eficacia contra varios tumores (Yusof, 2021). En este sentido, este trabajo evaluó el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de los compuestos organometálicos de estaño 5A, 5C y 5F, en cultivos de cáncer de mama

murino de la línea celular JC. Con base a los resultados obtenidos experimentalmente, se demostró que estos compuestos tienen un efecto antiproliferativo en esta línea celular. Los compuestos 5A, 5C y 5F presentan una IC_{50} con concentraciones de 0.78, 0.68 y 0.86 μM respectivamente, donde los grupos sustituyentes en las estructuras químicas de los compuestos 5A (bromo) y 5C (nitro) mejoraron la actividad antiproliferativa del compuesto base 5F, siendo el compuesto 5C el que mostró una mayor disminución en el número celular con una menor cantidad de compuesto.

Los resultados de este ensayo nos permiten establecer una comparación entre el efecto antiproliferativo del cisplatino y los organometálicos de estaño (5A, 5C y 5F) tomando en consideración las IC_{50} reportadas en distintas líneas tumorales, un ejemplo son los resultados obtenidos por Pérez en 2017, en el que se reportaron valores de IC_{50} para el cisplatino, las cuales fueron: 9.5 μM para la línea HT-29 (adenocarcinoma colorrectal), 15 μM para la línea A2780cis (cáncer de ovario), 38 μM en células T47D (cáncer de mama), así mismo, Del Castillo y colaboradores en 2018 reportaron una IC_{50} de cisplatino de 13 μM para las líneas cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231. Lo anterior sugiere que los compuestos 5A, 5C y 5F poseen una mejor actividad antiproliferativa que el cisplatino al requerir una menor concentración de estos compuestos para la obtención de una IC_{50} .

Una vez evaluada la actividad antiproliferativa de los compuestos, se determinó si inducen una muerte necrótica, para esto se llevó a cabo la evaluación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los medios de cultivos de las células tratadas con los tres compuestos. Se encontró que la concentración porcentual de la enzima LDH en los medios de cultivo es baja (menor al 11%), lo cual indica que estos compuestos no conducen a las células a morir por un evento necrótico.

Si bien no se conoce el mecanismo de acción de los compuestos organometálicos evaluados en este trabajo, se puede observar que provocan un cambio en la morfología de las células JC, ya que sufren una compactación celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y presentan marca para la proteasa caspasa-3 activa, así como pro-caspasa-8. La capacidad de estos compuestos de

provocar características propias de la apoptosis, así como de presentar marca positiva para la caspasa-3 activa y la pro-caspasa-8, permite confirmar la capacidad de estos compuestos organometálicos de inducir una muerte apoptótica. Los resultados obtenidos son consistentes con los reportados por Rivera en el año 2023, en el que observó que las células MDA-MB-231 responden de manera similar.

Un resultado interesante obtenido en el presente trabajo es que en las células tratadas con el compuesto 5A no se ve incrementada la marca positiva para la pro-caspasa-8; sin embargo, presentaron características morfológicas propias de la apoptosis, que pueden ser explicadas debido a la presencia de la caspasa-3 activa, que al ser una ejecutora, es responsable de muchos de los cambios morfológicos observables durante el proceso de apoptosis.

Tomando en cuenta todos los resultados, se puede establecer que los compuestos 5A, 5C y 5F, presentan una actividad antiproliferativa en la línea celular de cáncer de mama murino JC, una baja actividad necrótica y una capacidad de inducir una muerte por apoptosis. Las propiedades biológicas reportadas para estos compuestos los posicionan como posibles candidatos en la elaboración de nuevos fármacos para combatir el cáncer, sin embargo, es necesaria la elaboración de más pruebas para valorar la actividad selectiva y anti metastásica de los compuestos.

9 CONCLUSIONES

Los compuestos 5A, 5C y 5F, mostraron una actividad antiproliferativa dosis dependiente en la línea celular JC, con valores de IC_{50} de 0.78, 0.68 y 0.86 μM respectivamente.

Los compuestos 5A, 5C y 5F en sus concentraciones de IC_{50} , no inducen a las células de la línea JC a una muerte necrótica.

Los compuestos organometálicos 5A, 5C Y 5F inducen una muerte apoptótica mediada por caspasa-3-activa y caspasa-8 en la línea celular JC.

10 BIBLIOGRAFÍA.

- Alama, A., Tasso, B., Novelli, F., & Sparatore, F. (2009). Organometallic Compounds in Oncology: Implications of novel organotins as antitumor agents. *Drug Discovery Today*, 14(9-10), 500-508. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.02.002>
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y P. Walter. (2006). *Biología molecular de la célula*. Ed. Garland Science.
- American Cancer Society. (2015). Cirugías para tratar el cáncer. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/cirugia>
- American Cancer Society. (2019). Acerca del cáncer de seno. Recuperado de: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/9017.00.pdf>
- Angosto (2003). <https://core.ac.uk/download/pdf/230312047.pdf>
- Arvelo, F., Sojo, F. y Cotte, C. (2016). Progresión tumoral y metástasis. Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela.
- Astorga-Ramírez, A., Sánchez-Portuguez, J. y Solís-Barquero, S.M. (2022). Revisión de los factores de riesgo y factores protectores para el cáncer de mama. *Acta Médica Costarricense*, 64(4), 6-16. Recuperado de: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000160022022000400006&lng=en&tlng=es.
- Becker W.M., Kleinsmith L.J. y Hardin J. (2006). *El mundo de la célula*. Sexta edición. Pearson Educación.
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). *Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death*. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5), 1106–1121. doi:10.1038/s41423-020-00630-3
- Brau-Figueroa, H., Palafox-Parrilla, E.A, y Mohar-Betancourt, A. (2020). El Registro Nacional de Cáncer en México, una realidad. *Gaceta mexicana de oncología*, 19(3), 107-111. Epub 23 de abril de 2021. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.20000030>
- Carlberg C. y Velleuer E. (2021) *Cancer biology: how science works*. Springer, Berlin, DOI: 10.1007/978-3-030-75699-4_1.
- Carranza-Aguilar C.J, Ruiz-Quíñonez A.K, González-Espinosa C, Cruz-Martín-del-Campo S.L. Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente*. 2020; 15 (3): 97-112. <https://dx.doi.org/10.35366/95960>
- Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). (2020). ¿Cuáles son los factores de riesgo del cáncer de mama? Recuperado de: https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm
- Coffman, J. A. (2004). *Cell Cycle Development*. *Developmental Cell*, 6(3), 321–327. doi:10.1016/s1534-5807(04)00067-x
- Contreras, R. R., Urbina-Gutiérrez, J., & Aranguren, J. N. (2018). Compuestos organometálicos y su potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer. Una breve revisión. *NOVASINERGIA*, 1(1), 14-22. <https://doi.org/10.37135/unach.ns.001.01.02>
- D'Arcy, M. (2019). Cell Death. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International*. doi:10.1002/cbin.11137

- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
- Del Castillo, E., Gómez-García, O., Andrade-Pavón, D., Villa-Tanaca, L., Ramírez-Apan, T., Nieto-Camacho, A., & Gómez, E. (2018). Dibutyltin(IV) Complexes Derived from L-DOPA: Synthesis, Molecular Docking, Cytotoxic and Antifungal Activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 66(12), 1104–1113. doi:10.1248/cpb.c18-00441
- DeVita, V., Hellman S. y Rosenberg S. (2017). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- Elena, G.A. (2002). Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Revista Argentina de Anestesiología*. Recuperado de: https://www.anestesia.org.ar/search/articulos_completos/1/1/284/c.pdf
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Espinoza-Ramírez. (2018). Cáncer de mama. *Revista Médica Sinergia*. Vol.2 Núm:1; pp:8 - 12. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/sinergia/rms-2017/rms171b.pdf>
- Fernández-Lázaro, D., Sanz, B., & Seco-Calvo, J. (2024). Mechanisms of programmed cell death: structural and functional pathways. A narrative review. *Investigación Clínica*, 65(2), 230–252. <https://doi.org/10.54817/ic.v65n2a09>
- Fortoul van der Goes, T. I. (2013). *Histología y biología celular* (3. ed.). México: Mc Graw Hill.
- Galván-Hidalgo, J. M., Chans, G. M., Ramírez-Apan, T., Nieto-Camacho, A., Hernández-Ortega, S., & Gómez, E. (2017). *Tin(IV) Schiff base complexes derived from pyridoxal: Synthesis, spectroscopic properties and cytotoxicity. Applied Organometallic Chemistry*, 31(9), e3704. doi:10.1002/aoc.3704
- Galván-Hidalgo, J. M., Roldán-Marchán, D. M., González-Hernández, A., Ramírez-Apan, T., Nieto-Camacho, A., Hernández-Ortega, S., & Gómez, E. (2020). Organotin (IV) complexes from Schiff bases ligands based on 2-amino-3-hydroxypyridine: synthesis, characterization, and cytotoxicity. *Medicinal Chemistry Research*, 29(12), 2146–2156. doi:10.1007/s00044-020-02630-4
- Galván-Hidalgo, J.M. (2016). Síntesis, caracterización y actividad citotóxica de complejos organometálicos de estaño (IV) y rutenio (II) derivados de ligantes fisiológicamente activos. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: http://rdu.iquimica.unam.mx/bitstream/20.500.12214/638/1/Galvan_Hidalgo_tesisD_2016.pdf
- Galván-Hidalgo, J.M., Ramírez-Apan, T., Nieto-Camacho, A., Hernández-Ortega, S. y Gómez E. (2017). Schiff base Sn(IV) complexes as cytotoxic agents: Synthesis, structure, isosteric and bioisosteric replacement, *Journal of Organometallic Chemistry*, doi: 10.1016/j.jorganchem.2017.08.017.
- GeneTex. (2020). Apoptosis. Recuperado de: https://www.genetex.com/Research/Overview/cell_biology/apoptosis

- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7(12), a006080. doi:10.1101/cshperspect.a006080
- Hajibabaei, F., Abedpoor, N., & Mohamadynejad, P. (2023). Types of Cell Death from a Molecular Perspective. Biology, 12(11), 1426. <https://doi.org/10.3390/biology12111426>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hernández-Luengo, R. (2017). Fosfato de piridoxal síntesis mecanismo de inhibición y sistemas enzimáticos con los que interactúa. Obtenido de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ROBERTO%20HERNANDEZ%20LUENGO.pdf>
- Hindley, C., & Philpott, A. (2013). *The cell cycle and pluripotency*. Biochemical Journal, 451(2), 135–143. doi:10.1042/bj20121627 <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2306§ionid=180361772>
- Jiménez L.F. y Merchant H. (2003). Biología celular y molecular. Pearson Education. México.
- Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. Centro Regional de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Castilla. Elsevier Inc. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-apoptosis-muerte-celular-programada-13049112>
- Juárez-Cruz, J.C., Soto-Guzmán, A., Martínez-López, A. y Navarro Tito, N. (2018). Obesidad y cáncer de mama: una relación entre epidemias modernas. Universidad de Sonora. Biotecnología, 21(1), 60-67.
- Karp G. (2011). Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos. Séptima Edición. McGraw Hill-education. Interamericana.
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2017). Robbins Basic Pathology (10th ed.). Elsevier - Health Sciences Division.
- López-Torres, M., y Vázquez-García. (2020). Síntesis de compuestos organometálicos con potencial actividad antitumoral. Universidad de Coruña. Recuperado el 1 de diciembre del 2022 de: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/26294/NogueiraPrieto_NataliaMaria_TFG_2020.pdf
- Lorenzo, A. H. (2019). Evolución y desarrollo de los complejos de rutenio como agentes antitumorales. Universidad de Sevilla. Recuperado de: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/92441/HERRERO%20LORENZO%20C%20ALEJANDRO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Martínez M. y Ponce J. (2018). Principios de quimioterapia. Manual de Oncología, 6e. McGraw Hill.
- Martínez, M.O. (2012). Síntesis y caracterización de complejos organometálicos del tipo carboxilatos de estaño (IV). evaluación de su efecto bystander in vitro. Universidad Autónoma de Nuevo León. Recuperado de: <http://eprints.uanl.mx/3117/1/1080224610.pdf>
- National Cancer Institute (NCI). (2020). Mutaciones en el gen BRCA: el riesgo de cáncer y las pruebas genéticas. Recuperado de: https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm

- National Cancer Institute. (2020). Terapia hormonal. Recuperado de: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/9526.00.pdf>
- National Cancer Institute. (2020). Terapias contra el cáncer. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
- Obeng, E. (2021). Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. Brazilian Journal of Biology, 81(4), 1133–1143. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2022). Cáncer. Recuperado de: <https://www.who.int/es/newsroom/factsheets/detail/cancer#:~:text=La%20incidencia%20del%20cáncer%20aumenta,suele%20ocurrir%20con%20la%20edad>.
- Ortiz-Martinez, M. (2012). Síntesis y caracterización de complejos organometálicos del tipo carboxilatos de estaño (iv). evaluación de su efecto bystander in vitro. universidad autónoma de nuevo león. Recuperado el 1 de diciembre del 2022 de: <http://eprints.uanl.mx/3117/1/1080224610.pdf>
- Pérez-Enarejos, S.A. (2017) Estudios de citotoxicidad, localización celular e interacción con biomacromoléculas de metalofármacos anticancerígenos. Universidad de Murcia.
- Poitevin-Chacón, A. (2022). La radioterapia, el arma invisible contra el cáncer. Gaceta Mexicana de Oncología, 20(3). <https://doi.org/10.24875/j.gamo.m21000212>
- Poon RY. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. Methods Mol Biol. 2016 ;1342:3-19. doi: 10.1007/978-1-4939-2957-3_1. PMID: 26254915.
- Ramírez-Agudelo, M.E., Rojas-López, M. La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular latreia, vol. 23, núm. 2, junio, 2010, pp. 166-177 Universidad de Antioquia Medellín, Colombia. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1805/180519015008.pdf>
- Rivas, L. (2015). Guía para entender el cáncer de mama. Instituto Nacional del Cáncer: Argentina. Recuperado de: https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2018-10/0000000692cnt-33-guia-para-entender_cm.pdf
- Rodríguez-Rivera, V.J. (2023). Análisis del efecto antiproliferativo, citotóxico y pro-apoptótico de los compuestos organometálicos 5a, 5c y 5f en células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Simpson, P. V., Desai, N. M., Casari, I., Massi, M., & Falasca, M. (2019). Metal-based antitumor compounds: beyond cisplatin. Future Medicinal Chemistry, 11(2), 119-135. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0248>
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2010). Principios de anatomía y fisiología (11a. ed.). Buenos Aires. Médica Panamericana
- Veronesi, U., Boyle, P., Goldhirsch, A., Orecchia, R., & Viale, G. (2005). Breast cancer. The Lancet, 365(9472), 1727–1741. doi:10.1016/s0140-6736(05)66546-4
- Yusof E., Ravoof T. & Page, A. J. (2021). Cytotoxicity of Tin(IV)-based compounds: A review. Polyhedron, 198, 115069. doi:10.1016/j.poly.2021.115069