



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA

“ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA, NECRÓTICA Y APOPTÓTICA DE COMPUESTOS
DE ORGANOESTAÑO *IN VITRO*”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUNA CABAÑAS MONICA ISABEL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ
FACULTAD DE CIENCIAS
DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CDMX, MÉXICO, OCTUBRE 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

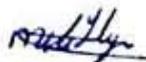
De acuerdo a lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

"Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de compuestos de organoestaño *in vitro*"

Que presenté para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, es original, de mi autoría y lo realicé con rigor metodológico exigido por el Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, aceptó que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referenciadas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de obtención de mi grado académico.

Atentamente



Monica Isabel Luna Cabañas
No de cta 415017848

(Nombre, firma y número de cuenta del estudiante)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA

“ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA, NECRÓTICA Y APOPTÓTICA DE COMPUESTOS
DE ORGANOESTAÑO *IN VITRO*”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUNA CABAÑAS MONICA ISABEL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ
FACULTAD DE CIENCIAS
DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CDMX, MÉXICO, OCUBRE 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
OFICIO: CGEP/CPCB/ FESZ /0224/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **16 de octubre de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **(Biología Experimental)** de la estudiante **LUNA CABAÑAS MÓNICA ISABEL** con número de cuenta **415017848** con la tesis titulada **“Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de compuestos de organoestaño *in vitro*”**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Vocal: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
Vocal: DRA. ELIZABETH GÓMEZ PÉREZ
Vocal: M EN C. ROSALVA RANGEL CORONA
Secretario: DRA. MARÍA LUISA SÁNCHEZ ESCOBAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 06 de marzo de 2024

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

c. c. p. Expediente del alumno

ACBB/CEC/EARR/cec



AGRADECIMIENTOS

Al POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM, por abrir sus puertas y permitirme continuar con mi formación académica y personal.

Al programa de becas para estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo con número de CVU: 1147989.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez por dirigir este proyecto, por su trato tan amable y por su dedicación en mi formación académica. Muchas gracias.

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez por brindarme su asesoría en todo momento, por ser tan cálida y amable. Muchas gracias.

A la Dra. Ana María Salazar Martínez por brindarme su asesoría de manera oportuna y por su trato afectuoso. Muchas gracias.

Al Dr. Hugo López Muñoz por continuar asesorándome en todo momento, por brindarme su apoyo y su tiempo, sin el cual no hubiera sido posible la realización del presente trabajo. Muchas Gracias.

A la Dra. María Isabel Soto Cruz por apoyarme con sus aportaciones y observaciones que contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo, permitiéndome concluirlo satisfactoriamente.

A la Dra. Elizabeth Gómez Pérez por su colaboración en el desarrollo del presente trabajo, por su trato tan amable y por ampliar mi conocimiento en otras áreas del conocimiento.

A la M. en C. Rosalva Rangel Corona por apoyarme con sus amables observaciones que contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo.

Al Dr. Israel Muñoz Velasco por la ayuda técnica.

Este proyecto fue realizado con el apoyo de los proyectos
PAPIIT: IN215922, IN219221, IN218624 y IN217424.

Para mi familia.
Este logro es nuestro, gracias por estar a mi lado.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Célula	3
Proliferación	4
Muerte celular	5
Apoptosis	5
Necrosis	7
Cáncer	8
Diseño racional de fármacos organometálicos	10
Agentes quimioterapéuticos de estaño (IV)	11
Compuestos de organoestaño (IV) derivados de ligantes fisiológicamente activos	12
Complejos de organoestaño derivados de vitaminas del complejo B	13
Bases de schiff	15
Compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal	16
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
METODOLOGÍA	20
Cultivo de líneas celulares	20
Preparación del compuesto	20
Evaluación de la actividad antiproliferativa a través de la técnica de cristal violeta	20
Evaluación de la actividad necrótica mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivos celulares	20
Morfología apoptótica en células tumorales por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia	21
Detección de células positivas a caspasa 3 activa por inmunofluorescencia	21
Determinación de la proliferación de linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CSFE)	22
RESULTADOS	23
Evaluación de la actividad antiproliferativa en células tumorales	23
Evaluación de la actividad necrótica	26
Evaluación de la actividad apoptótica	28
Evaluación del efecto de los compuestos 2a, 2b, 2c y 2f sobre la proliferación de linfocitos humanos	36
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	40
REFERENCIAS	41

RESUMEN

El cáncer es una de las causas principales de muerte en el mundo. En México es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Sin embargo, la gama de tratamientos existente no ha logrado subsanar este panorama. Esto se debe principalmente a que el mecanismo de acción que siguen los tratamientos está basado en la actividad necrótica y baja selectividad de los compuestos aplicados que afecta a las células normales. Por este motivo, continúa la búsqueda de tratamientos alternativos, que sean selectivos y que tengan un mecanismo de acción menos agresivo, como la inducción de apoptosis.

A este respecto, resulta interesante como algunos compuestos organometálicos de estaño presentan actividad anticancerígena en células tumorales, sin inducir necrosis. La función citotóxica del estaño depende principalmente del tipo de ligandos a los que se encuentra unido. Un ligando frecuentemente utilizado son las bases de Schiff, ya que genera complejos muy estables con iones metálicos que desencadenan la apoptosis. El piridoxal es una molécula que se une al átomo de estaño mediante la formación de bases de Schiff. Los sistemas no enzimáticos que se forman por la unión de iones metálicos y piridoxal, a través de la formación de complejos de base de Schiff pueden catalizar reacciones enzimáticas que involucran a la vitamina B6 como cofactor. Debido al efecto de la coordinación estaño-base de Schiff-piridoxal sobre la actividad citotóxica se decidió evaluar la eficacia *in vitro* de una serie novedosa de 4 compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal (2A, 2B, 2C y 2F). En el presente trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo, necrótico, apoptótico y selectivo de los 4 compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal (2A, 2B, 2C y 2F) en cultivos de líneas tumorales MDA-MB-231, MCF-7, 4T1 y JC, así como en cultivos de células no tumorales (células linfocíticas humanas).

Los resultados establecen que el potencial proliferativo de las líneas celulares tumorales es afectado de manera dependiente de la concentración. Asimismo, la nula o baja actividad registrada de la enzima lactato deshidrogenasa en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares tratados con los compuestos, indican que el efecto antiproliferativo no es debido a una muerte necrótica. La observación de características morfológicas propias de células apoptóticas determinadas por microscopía de campo claro y la inmunodetección de la caspasa 3 activa por fluorescencia, revelaron que estos compuestos promueven un efecto apoptótico sobre la población de las células tumorales. Además, los cuatro compuestos no afectaron el potencial proliferativo de las células no tumorales, sugiriendo que estos compuestos podrían ejercer una acción selectiva.

En conclusión, los resultados obtenidos demostraron que los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F presentan actividad antiproliferativa e inductora de muerte celular apoptótica en cultivos de las líneas celulares tumorales MDA-MB-231, MCF-7, 4T1 y JC, sin presentar una actividad necrótica significativa y sin afectar el potencial proliferativo de células linfocíticas no tumorales.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death in the world. In Mexico it is the third leading cause of death, after cardiovascular diseases and diabetes. However, the existing range of treatments has not been able to remedy this situation. This is mainly due to the fact that the mechanism of action followed by the treatments is based on necrotic activity and low selectivity of the applied compounds that affect normal cells. For this reason, the search continues for alternative treatments that are selective and have a less aggressive mechanism of action, such as the induction of apoptosis.

In this regard, it is interesting to note that some organometallic tin compounds show anticancer activity in tumor cells, without inducing necrosis. The cytotoxic function of tin depends mainly on the type of ligands to which it is bound. A frequently used ligand is Schiff bases, as it generates very stable complexes with metal ions that trigger apoptosis. Pyridoxal is a molecule that binds to the tin atom through the formation of Schiff bases. Non-enzymatic systems formed by the binding of metal ions and pyridoxal through the formation of Schiff base complexes can catalyze enzymatic reactions involving vitamin B6 as a cofactor. Due to the effect of Schiff-pyridoxal tin-base coordination on cytotoxic activity, it was decided to evaluate the *in vitro* efficacy of a novel series of 4 pentacoordinate dicyclohexyl tin (IV) compounds derived from tridentate pyridoxal-containing ligands (2A, 2B, 2C and 2F). In the present work, the antiproliferative, necrotic, apoptotic and selective effect of the 4 pentacoordinate dicyclohexyl tin (IV) compounds derived from tridentate pyridoxal-containing ligands (2A, 2B, 2C and 2F) was evaluated in cultures of MDA-MB-231, MCF-7, 4T1 and JC tumor lines, as well as in cultures of non-tumor cells (human lymphocytic cells).

The results establish that the proliferative potential of tumor cell lines is affected in a concentration-dependent manner. Likewise, the null or low activity of the enzyme lactate dehydrogenase in the supernatants from the cell cultures treated with the compounds indicates that the antiproliferative effect is not due to necrotic death. The observation of morphological characteristics of apoptotic cells determined by brightfield microscopy and the immunodetection of active caspase 3 by fluorescence revealed that these compounds promote an apoptotic effect on the tumor cell population. Furthermore, the four compounds did not affect the proliferative potential of non-tumor cells, suggesting that these compounds might exert a selective action.

In conclusion, the results obtained showed that compounds 2A, 2B, 2C and 2F present antiproliferative and apoptotic cell death-inducing activity in cultures of the tumor cell lines MDA-MB-231, MCF-7, 4T1 and JC, without presenting significant necrotic activity and without affecting the proliferative potential of non-tumor lymphocytic cells.

INTRODUCCIÓN

Célula

El término célula define la unidad morfológica y funcional de todo ser vivo. Morfológicamente podemos distinguir dos tipos de células: eucariotas y procariotas. Las células eucariotas poseen orgánulos cubiertos por al menos una membrana como el núcleo, mientras que las células procariotas no. Todos los organismos están formados por una o varias células. Los organismos formados por una única célula se denominan unicelulares, por ejemplo: las bacterias. Los organismos formados por dos o más células se llaman multicelulares, por ejemplo: un humano (formado por hasta 100 billones de células) (Alberts, 2011).

La invención del microscopio en 1590 hizo posible la observación de una célula por primera vez en 1665 por Robert Hooke, quien realizó una descripción en su libro “*Micrographia*”. Posteriormente, en 1838 Theodor Schwann y Matthias Jakob Schleiden propusieron por primera vez la teoría celular, teoría según la cual las células se consideran las unidades básicas de todos los tejidos vivos. Schleiden sugirió que cada parte estructural de una planta estaba formada por células o el resultado de células. También sugirió que las células se fabricaban mediante un proceso de cristalización dentro de otras células o desde el exterior. Theodor Schwann afirma que, junto con las plantas, los animales están compuestos por células o el producto de células en sus estructuras. Este fue un gran avance en el campo de la biología, ya que hasta este momento se sabía poco sobre la estructura animal en comparación con las plantas. A partir de estas conclusiones sobre plantas y animales, se postularon dos de los tres principios de la teoría celular.

1. Todos los organismos vivos están compuestos por una o más células.

2. La célula es la unidad básica de la vida.

Finalmente en 1855, Rudolf Virchow añadió el tercer principio a la teoría celular.

3. “*Omnis cellula e cellula*”, todas las células surgen sólo de células preexistentes.

Ahora sabemos que tanto los paramecios como los organismos superiores están formados por una o más células, almacenan y transportan la energía, duplican su material genético y utilizan la información que ese material contiene para sintetizar proteínas siempre de la misma forma. Todos estos procesos, que están presentes en todas las células, son los que forman la maquinaria de la vida.

El número de células en los diferentes tejidos está determinado por un balance homeostático entre la proliferación de células nuevas y la muerte de células agotadas, dañadas o seniles (Elena, 2002).

Proliferación

La teoría celular establece que las células sólo pueden surgir de la división de una célula preexistente, por lo tanto, la vida de una célula comienza cuando la división de una célula madre le da origen y concluye con la formación de sus células hijas o con su muerte. El intervalo entre cada división celular es definido como ciclo celular (Karp, 2004).

Cada ciclo celular consiste en cuatro fases ordenadas y estrictamente reguladas, denominadas G1 (brecha o gap 1), S (síntesis de ADN), G2 (brecha o gap 2) y M (mitosis/meiosis). Dado su papel central en el mantenimiento de la homeostasis tisular y la regulación de los procesos de crecimiento fisiológico, como la regeneración y la reparación, el ciclo celular está estrechamente regulado por estimuladores e inhibidores (Kumar, 2013).

A nivel intracelular el control está a cargo de proteínas denominadas ciclinas, llamadas así por su naturaleza cíclica de producción y degradación, y por enzimas asociadas, las cinasas dependientes de ciclina (CDK). Estas últimas adquieren actividad catalítica al unirse a las ciclinas formando complejos. Los complejos CDK-ciclina producen la fosforilación de proteínas diana que son fundamentales para dirigir el tránsito de la célula a través del ciclo celular. Al terminar esta tarea, las concentraciones de ciclina disminuyen con rapidez. Además de la síntesis y degradación de las ciclinas, en la regulación de los complejos ciclina-CDK también interviene su unión a los inhibidores de CDK, los cuales se activan en presencia de agentes que dañan el ADN, o en ausencia de factores que inducen el crecimiento, las tres principales son p21, p27 y p16 (Meza-Junco, 2006).

A nivel extracelular, una célula puede entrar al ciclo celular cuando recibe señales adecuadas (mitógenos) ya sea del medio extracelular o de otras células. Los mitógenos son proteínas que estimulan la división celular, contrarrestando los mecanismos intracelulares de freno (Rb) que bloquean la progresión del ciclo. Estas proteínas, actúan en la fase G1 para permitir la entrada de la célula a la fase S, por ejemplo, los factores de crecimiento que actúan durante el desarrollo embrionario y la curación de heridas (Angulo, 2012).

Según la capacidad proliferativa de sus células, los tejidos se dividen en lábiles, estables y permanentes. Las células que forman tejidos lábiles se pierden continuamente y son sustituidas por maduración de las células madre y proliferación de células maduras, entre las células lábiles destacan las hematopoyéticas medulares y la mayor parte de los epitelios de superficie. Las células pertenecientes a tejidos estables están en reposo y, en estado normal, su actividad de replicación es mínima, algunos ejemplos son, las células endoteliales, los fibroblastos, las células musculares lisas y las células que constituyen el parénquima de la mayor parte de los tejidos sólidos, como el hígado, los riñones o el páncreas, con la excepción del hígado, los tejidos estables tienen una capacidad limitada de regeneración tras una lesión. Las células de los tejidos permanentes se consideran diferenciadas de forma terminal y no proliferativas en la vida posnatal. La mayor parte de las neuronas y de los miocardiocitos pertenecen a esta categoría. Salvo los tejidos constituidos principalmente por células permanentes sin capacidad de dividirse (p. ej., músculo cardíaco,

nervios), la mayor parte de los tejidos maduros contienen porcentajes variables de los tres tipos celulares: células en división continúa, células quiescentes que pueden volver a entrar en el ciclo celular y células que han perdido su capacidad de replicación. Por lo tanto, el tamaño normal de las poblaciones celulares viene determinado por el equilibrio entre la proliferación celular, la muerte celular por apoptosis y la aparición de células recién diferenciadas a partir de las células madre (Kumar, 2013).

Muerte celular

De acuerdo con el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular el término “muerte celular” se define como la degeneración irreversible de las funciones celulares vitales que culmina en la pérdida de la integridad celular. Este proceso altamente diverso puede activarse a través de distintas cascadas bioquímicas y puede manifestarse con diferentes características morfológicas (Galluzzi, 2018).

Existen diversos tipos de muerte celular y diversos criterios para clasificarlos. Para definir con precisión alguna modalidad de muerte celular se utilizan actualmente bases genéticas, bioquímicas, farmacológicas, morfológicas y funcionales.

Aplicando esta última, podemos distinguir claramente dos categorías, la primera se conoce como muerte celular accidental (ACD), debido a que es un proceso prácticamente instantáneo e incontrolable causado por exposición a agresiones físicas, químicas o mecánicas. Por otro lado, se encuentra la muerte celular programada, que contrario a la ACD, depende de señales o actividades codificadas genéticamente que inician uno o más de los múltiples módulos de transducción de señales altamente interconectados que precipitan la muerte celular regulada (Galluzzi, 2018).

Generalmente se alude a tres formas principales de muerte celular, apoptosis, muerte celular autofágica y necrosis, y se enumeran muchas formas menores basadas en la morfología y lo que se conoce del mecanismo (Galluzzi, 2018).

Apoptosis

De todas las modalidades de muerte descritas, la apoptosis es la mejor comprendida y la más estudiada. La palabra "apoptosis" deriva del griego y significa "desprenderse" o "caer", como las hojas de un árbol en otoño. La apoptosis forma parte integral del desarrollo normal tisular y el mantenimiento de la homeostasis, eliminando las células redundantes durante la embriogénesis y en los adultos se utiliza para deshacerse de las células que han sido dañadas irreversiblemente. Entre los estímulos que activan este tipo de muerte están: el estrés oxidativo, la radiación, la ausencia de factores de crecimiento y la exposición al factor transformador del crecimiento β , el sistema Fas/Ligando Fas o el factor de necrosis tumoral (Kroemer, 2005).

La apoptosis resulta de la activación de una o más vías de transducción de señales y se caracteriza morfológicamente por un aumento brusco de la densidad intracelular, debido a que el retículo endoplásmico se dilata; el incremento moderado, pero sostenido, de la concentración de calcio libre citoplasmática; cambios en la composición de la membrana celular, como la translocación de grupos glicanos a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos; una alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto, produciendo una deformación, resultado de la actividad de las proteasas, modificándose el transporte intracelular retrógrado de factores de crecimiento y de proteínas; el aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular y finalmente, la condensación y fragmentación de la cromatina, por acción de endonucleasas endógenas, en fragmentos regulares denominados oligonucleosomas (Jordán, 2003).

La forma en que una célula moribunda alcanza este punto de ejecución en la apoptosis puede lograrse a través de dos mecanismos interconectados: la vía intrínseca (mitocondrial) y extrínseca. Ambas vías convergen en la activación de una familia de enzimas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, llamadas caspasas. Las caspasas que desencadenan la muerte celular apoptótica se pueden dividir en dos grupos según su estructura y los aspectos temporales de su activación. Las caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10) son las principales responsables de iniciar la cascada de activación, poseen largos dominios, circulan inactivas en forma de monómeros y para su activación es necesaria su dimerización. Los dímeros se forman debido a su reclutamiento a través de la unión de sus prodominios al adaptador FADD. En contraste, las caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7) son responsables del desmantelamiento real de la célula mediante la división de sustratos celulares, contienen solo un pequeño prodominio, circulan inactivas en forma de dímeros y tan solo es necesaria la escisión por parte de una caspasa iniciadora para su activación. Tras la activación, las caspasas iniciadoras propagan las señales de muerte al activar las caspasas efectoras corriente abajo en forma de cascada. Las caspasas efectoras activadas escinden selectivamente un conjunto restringido de proteínas diana (proteínas del citoesqueleto, proteínas estructurales, nucleares y enzimas, y algunos controladores de activación de caspasa) para producir las características morfológicas y bioquímicas asociadas con la apoptosis. Sin embargo, la apoptosis puede ser letal sin activación de caspasas, y la activación de caspasas no necesariamente causa la muerte celular (Fink, 2005; Galluzzi, 2007).

Muchas proteínas antiapoptóticas, como BCL-2, BCL-XL, MCL1 o las proteínas IAP, se sobre expresan en tumores humanos. Además, estudios preclínicos en células de cáncer de colon humano cultivadas mostraron que la caspasa 8 también se puede degradar activamente en las células tumorales. Los niveles bajos de expresión de caspasa 8 en células no malignas dan como resultado una toxicidad reducida de ligandos y receptores de muerte. Otros componentes de la apoptosis también se encuentran desregulados en tumores humanos, como la pérdida de la función supresora de tumores TP53, el aumento de expresión de señales de supervivencia (Igf1/2) y la regulación a la baja de los factores proapoptóticos (Bax, Bim, Puma). Una poderosa estrategia contra el cáncer

ha sido el desarrollo de terapias que promuevan la eliminación eficaz de las células cancerosas por apoptosis, porque las células tumorales muertas pueden contribuir a las respuestas clínicas, pero no a la recidiva tumoral (Carneiro, 2020).

Necrosis

El término necrosis proviene del vocablo griego *nekrós*, y significa muerte o cadáver. Se define como un mecanismo que comprende una serie de eventos que conducen a la ruptura de la membrana citoplasmática y la consecuente liberación del contenido intracelular lo que desencadena una reacción inflamatoria (McCall, 2010).

La necrosis es estimulada por una serie de factores externos, como toxinas, hipoxia severa, agresión masiva y cualquier otra condición que genere caída de ATP, ya que se considera la supresión o el agotamiento súbito de esta molécula, el fenómeno crítico inicial.

Se ha considerado una división en las rutinas de muerte celular entre aquellas que acontecen a través de una secuencia controlada, y las que no lo hacen. Dentro de los tipos de muerte celular accidental o no controlada se incluye la necrosis. Sin embargo, estudios recientes en diversos organismos muestran que la necrosis sigue una serie constante de eventos celulares y moleculares, que incluyen: hinchazón de orgánulos, aumento de especies reactivas de oxígeno y calcio citoplásmico, disminución de ATP, activación de proteasas de calpaína y catepsina, y finalmente la ruptura de orgánulos y de la membrana citoplasmática (McCall, 2010).

Independientemente de si el proceso es o no regulado, la necrosis culmina con la pérdida de integridad de la membrana celular, y la subsecuente liberación del contenido del citoplasma al espacio extracelular, lo que produce la atracción de células inmunes en el área, y activa el proceso de inflamación en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitosis. Específicamente las células necróticas liberan ácido úrico que induce IL-1 β y proteínas de choque térmico como Hsp70 y Hsp90. Hay señales por receptores de tipo Toll que reconocen lípidos y ácidos nucleicos modificados. Las células necróticas también pueden activar el factor nuclear kB (NF-kB) en fagocitos mononucleares, neutrófilos y células dendríticas y estimular la producción de IL-6, IL8 y TNF- α . Las proteínas de choque térmico pueden inducir tanto la expresión de genes involucrados en la inflamación como la de genes reparadores de tejido como el factor de crecimiento endotelial vascular (Ramírez, 2010).

En las regiones internas de los tumores encontramos que el suministro de nutrientes y oxígeno es limitado, como las células cancerosas son resistentes a la apoptosis, la necrosis se va a convertir en la principal vía de muerte celular en estas regiones (Karsch-Bluman, 2020).

También sabemos que algunos tipos de tratamiento como la quimioterapia o terapia antiangiogénica promueven la muerte tumoral por necrosis. La necrosis desencadena una respuesta inflamatoria. La inflamación puede contribuir a múltiples capacidades distintivas mediante el

suministro de moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluidos los factores de crecimiento que sustentan la señalización proliferativa, los factores de supervivencia que limitan la muerte celular, los factores proangiogénicos, las enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis, y la inducción de señales que conducen a la activación de EMT (transición epitelio-mesénquima) y otros programas facilitadores distintivos (Hanahan, 2000). Además, las células inflamatorias como neutrófilos o macrófagos pueden liberar sustancias químicas, en particular especies reactivas de oxígeno, que son activamente mutagénicas para las células cancerosas cercanas, lo que acelera su evolución genética hacia estados de mayor malignidad (Grivennikov, 2010). Por lo tanto, la necrosis no es el tipo de muerte ideal para la eliminación de células tumorales en estos tratamientos. Sin embargo, la muerte celular necrótica ha presentado gran relevancia en la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral y de igual manera ha generado la necesidad de crear técnicas o herramientas que permitan evaluar este tipo de muerte. Actualmente, basado en que una célula necrótica pierde la integridad de su membrana plasmática provocando la liberación del contenido citoplasmático, en el cual se encuentran una gran cantidad de enzimas citoplasmáticas, hoy es bien aceptada evaluar la actividad necrótica mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivos celulares o en la sangre de organismos (Karsch-Bluman, 2020).

Cáncer

El término “cáncer” es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades en las que ocurre una proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos (Gandur, 2004). El crecimiento tumoral no solo depende del aumento en la proliferación celular sino también de la tasa de muerte celular. Las células tumorales desarrollan mecanismos que les permiten evadir uno de los principales mecanismos de muerte celular programada, la apoptosis (Hanahan, 2000; Sanchez, 2013).

La sensibilización de una célula a ser transformada puede ser causada por agentes exógenos o endógenos. Los agentes exógenos se clasifican en biológicos, físicos y químicos. Los biológicos hacen referencia a organismos tales como los virus, que a través de proteínas víricas inducen la transformación oncogénica, o a mecanismos como la herencia, específicamente la transferencia de mutaciones en ciertos genes (Gandur, 2004). Algunos agentes físicos son la luz ultravioleta que induce dímeros de pirimidina y la radiación ionizante que produce una gran variedad de daños sobre las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos. Finalmente, dentro de los agentes químicos mutagénicos encontramos algunos agentes alquilantes del DNA como las Nitrosaminas provenientes del humo del tabaco (Kindt, 2007; Tsao, 2021).

Existen diferentes tipos de cáncer, estos se clasifican dependiendo del tejido donde se origine. Según el último informe publicado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer en 2020, el cáncer de mama es la neoplasia más incidente en la población femenina con 2,26 millones de nuevos casos. El cáncer de mama es una enfermedad en la que se desarrollan células

malignas en los tejidos de la mama. La glándula mamaria se compone de lóbulos y lobulillos conectados mediante conductos, y esta enfermedad afecta a una, o ambas, de las estructuras mencionadas. Aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales, y el resto, lobulillares. Entre las mujeres, el cáncer de mama es la causa más común de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo, y las tasas de letalidad son más altas en los países de bajos recursos. Esta gran diferencia entre países con más y menos recursos económicos refleja, por un lado, la influencia que el estilo de vida y, posiblemente también, el sesgo que los diferentes métodos de detección y registro pueden inducir en datos de incidencia. Además, de acuerdo con las últimas estimaciones estadísticas de GLOBOCAN 2018 el cáncer de mama es la neoplasia más probable para la población femenina mundial actual, registrándose más de 2 088 849 nuevos casos cada año.

En México, el número de fallecimientos por esta causa se ha duplicado en los últimos 18 años, en el año 2000 eran 3026 las muertes anuales por cáncer de mama, y en 2018 fueron 6869, un aumento del 100% en poco más de una década (Brandan, 2006).

Como ocurre en otros tipos de cáncer, en el de mama existen factores que pueden favorecer el desarrollo de esta neoplasia (Aguilar, 2012). Algunos de los más importantes están relacionados con el estado hormonal, y la evidencia disponible indica que el periodo de exposición a estrógenos es un factor crítico de la carcinogénesis en mama. Por lo tanto, la ingesta de hormonas, el uso de anticonceptivos, el tiempo de uso, la edad a la que se inició la ingesta, la dosis y el tipo de hormonas empleadas afectan su efecto como factores de riesgo. Además, una menarca temprana y menopausia tardía se asocian a periodos prolongados de exposición a estrógenos, por lo tanto, cuantos más ciclos menstruales tiene la mujer en su vida, mayor es el riesgo. También, la nuliparidad y los embarazos en edad avanzada aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Además de la exposición prolongada a diferentes hormonas, existen algunos factores de riesgo genéticos, entre ellos se encuentran las mutaciones genéticas BRCA1 y BRCA2, se trata de polimorfismos genéticos asociados a la síntesis de estrógenos y su metabolismo (Narod, 2011). Además, las mujeres con antecedentes de hiperplasia epitelial atípica, patología benigna proliferativa, tienen 4-5 veces más riesgo de desarrollar cáncer mamario que las mujeres que no muestran cambios proliferativos en su mama. Si la mujer tiene antecedentes familiares de cáncer de mama en primera línea, asociados a cambios proliferativos en ella misma, su riesgo se incrementa nueve veces. Sin embargo, el riesgo más importante para sufrir cáncer de mama es ser mujer, la relación de cáncer de mama entre mujeres y hombres es aproximadamente de 100 a 1. A esto hay que añadir, que la incidencia de cáncer de mama se incrementa con la edad, replicándose aproximadamente cada 10 años hasta la menopausia, etapa en que el ritmo de crecimiento disminuye. En el 46% de las mujeres mexicanas afectadas por el cáncer de mama este se presenta antes de los 50 años y el grupo de edad más afectado es el de 40-49 años. Por otro lado, existen comportamientos de salud que pueden reducir el riesgo de presentar cáncer de mama, estos incluyen la lactancia prolongada, actividad física regular, control de peso, evitar el consumo excesivo de alcohol, evitar el uso prolongado de la terapia hormonal exógena y evitar la exposición

excesiva a la radiación. Es probable que estos comportamientos, aunque no hayan sido probados en ensayos clínicos para reducir el riesgo, sean beneficiosos (Brandan, 2006).

El tratamiento es multimodal (cirugía, quimioterapia, hormonoterapia, terapia biológica y radioterapia), el uso de cada una depende de la etapa clínica en la que se encuentre la paciente. La cirugía es la principal modalidad de tratamiento local del cáncer mamario, existen diversos procedimientos quirúrgicos, considerándose la mastectomía radical modificada (MRM) el tratamiento estándar, sin embargo, si el cáncer de mama se detecta en una etapa clínica temprana, se puede ofrecer un tratamiento conservador (Tumorectomía), en el que la paciente puede incluso conservar su seno sin comprometer el tratamiento oncológico radical. Dependiendo del tamaño tumoral, el número de ganglios linfáticos con metástasis y de otros factores clínicos y patológicos se ofrecerá tratamiento con radioterapia, hormonoterapia y/o quimioterapia adyuvante (Martínez, 2007).

Diseño racional de fármacos organometálicos

El cáncer sigue siendo una patología problemática difícil de tratar debido a sus características de agresión y capacidad de metástasis, al mismo tiempo que los fármacos disponibles presentan desventajas como aparición de resistencia y efectos secundarios severos. Por todo esto es imperante continuar con la búsqueda de un tratamiento con una excelente actividad antitumoral y que no presente estas desventajas (Giorgi, 2022).

Entre los posibles candidatos se encuentran los metalofármacos. Estos medicamentos tienen un complejo metálico como ingrediente activo, o bien, operan con biometales nativos o biomoléculas que cambian las rutas de tráfico de metales de una manera que afecta procesos celulares como la replicación y el metabolismo del Fe. Estos complejos de metales se han estudiado profundamente para diferentes aplicaciones, como catálisis, antimicrobianos y antitumorales. Cabe resaltar que el mecanismo de muerte celular más típico de los metalofármacos antitumorales es la apoptosis (Gómez-Ruiz, 2010; Kumar, 2023).

Entre las muchas funciones que realizan los metales en el cuerpo se encuentran las de transportadores de oxígeno, reguladores metabólicos, metaloenzimas y soporte estructural para numerosas proteínas. De hecho, los complejos que contienen metales están dotados de una impresionante diversidad química y versatilidad, según el metal elegido, su estado de oxidación, el número y tipo de ligandos de coordinación y propiedades magnéticas y/u ópticas específicas. En comparación con un sustrato orgánico, los variados modos de coordinación de los compuestos metálicos proporcionan un entorno rico para construir varias estructuras moleculares únicas (Kumar, 2023).

La propensión de los metales a perder fácilmente electrones y producir iones cargados positivamente que interactúan con moléculas biológicas es una característica crucial. Además, los ligandos que llevan en un andamio centrado en metal juegan un papel importante en el ajuste de

las propiedades de eficacia y toxicidad correspondientes de la terapia contra el cáncer. La modificación de los ligandos beneficia la regulación de la hidrofiliidad/hidrofobicidad sustitucional asociada, la inercia/reactividad de oxidación y la biocompatibilidad sistemática/objetivo de acuerdo con los requisitos de tratamiento específicos y las condiciones de aplicación. Por ejemplo, la modificación adicional de los ligandos auxiliares ajusta la hidrofobicidad y la estabilidad de los fármacos conjugados con platino (IV) para mantener las estructuras intactas antes de llegar a las células cancerosas, con solo una reacción redox selectiva en los sitios objetivo, lo que reduce la toxicidad indeseable para las células/tejidos sanos cercanos (Ma, 2019).

Al desarrollar nuevos compuestos farmacéuticos, estas características se convierten en una prueba atractiva sobre los compuestos orgánicos tradicionales, lo que permite la bioactividad a través de modos de acción alternativos (Kumar, 2023).

Inspirándose en las prometedoras propiedades anticancerígenas de algunos complejos metálicos conocidos, como la auranofina, el cisplatino y el NAMI, se han desarrollado nuevas estrategias para mejorar las características de los complejos existentes y superar los problemas que conllevan. Además, la sustitución de centros metálicos alternativos, como rutenio (II), oro (III), paladio (II), iridio (III), rodio (III), hierro (III), osmio (IV), cobalto (II) , y estaño (II), ofrece opciones prometedoras para aliviar la resistencia al cisplatino y lograr diversas actividades anticancerígenas con efectos secundarios reducidos (Giorgi, 2022; Ma, 2019).

Agentes quimioterapéuticos de estaño (IV)

El estaño es actualmente considerado como un oligoelemento con funciones esenciales sospechadas, debido a que los estudios sobre sus efectos en humanos son escasos y con resultados contrapuestos (Ramírez-Hernández, 2015). Sin embargo, se ha demostrado que los compuestos de organoestaño (IV) pueden tener aplicaciones como agentes antitumorales, antiinflamatorios, antifúngicos o antimicrobianos. El término organometálico hace referencia a una molécula que contiene un átomo metálico enlazado a uno de carbono, por lo tanto, los derivados de organoestaño (IV) se forman mediante la unión de estaño y carbono. Respecto a la actividad antitumoral los compuestos organoestánicos pueden ser los metalofármacos más prometedores, ya que, se ha demostrado que tienen efectos anticancerígenos sustanciales y en algunos casos, muestran mejores efectos que el cisplatino tales como efectos tóxicos bajos, mayor actividad antiproliferativa, mejores propiedades de excreción y menos efectos secundarios, incluso cuando se usan en concentraciones bajas (Syed, 2021). La característica más importante de los compuestos organoestánicos es que las células no desarrollan resistencia contra ellos y pueden mostrar una menor toxicidad en comparación con los análogos de cisplatino. Además de las ventajas de la alta actividad, en comparación con el compuesto de platino, los complejos de estaño son mucho más baratos (Sirajuddin, 2016).

Dado que los compuestos organoestánicos exhiben una actividad antiproliferativa *in vitro* significativa, y sus pruebas *in vivo* son alentadoras, se ha trabajado en dilucidar la relación estructura-actividad y se ha demostrado que todos los compuestos activos se caracterizan por:

- I. disponibilidad de posiciones de coordinación en Sn
- II. enlaces ligando-Sn relativamente estables
- III. lenta descomposición hidrolítica.

Otros estudios muestran que los compuestos organoestánicos inhiben las macromoléculas celulares (ADN o proteínas) y el metabolismo energético en las mitocondrias, mientras interactúan con las membranas celulares aumentando la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma y finalmente causan la muerte celular por apoptosis (Banti, 2019). Específicamente estos organoestaño (IV) interfieren en las vías de señalización redox de las células o en la disfunción de la permeabilidad de la membrana de las mitocondrias por acumulación de ROS, la activación de la vía de apoptosis de la caspasa y la interacción con el ADN. Algunos investigadores también han propuesto que los compuestos de organoestaño inducen la muerte celular apoptótica al unirse posteriormente al ADN en los grupos fosfato externos (Syed, 2021).

Debido a lo anterior, el Instituto Nacional del Cáncer ha probado más de 2000 candidatos farmacológicos basados en estaño. Incluso algunos de ellos han logrado avanzar a la etapa clínica como la rostoporfina, una purpurina sintética con actividad fotosensibilizante. La rostoporfina se acumula preferentemente en las células tumorales debido a una mayor tasa de metabolismo. Tras la exposición a una fuente de luz, este agente absorbe la luz, formando un estado conformacional extendido de alta energía que produce altos rendimientos cuánticos de oxígeno singlete con efectos citotóxicos locales. Los ensayos clínicos de fase I/II para el tratamiento del cáncer de mama metastásico y el sarcoma de Kaposi mostraron un fuerte efecto terapéutico (Karges, 2022).

El uso del estaño como núcleo promete una nueva generación de medicamentos con mayor selectividad, menores efectos secundarios, mayor potencia y la superación del mecanismo de resistencia (Giorgi, 2022).

Compuestos de organoestaño (IV) derivados de ligantes fisiológicamente activos

Los ligandos unidos al organoestaño (IV) no solo desempeñan un papel crucial en la inducción de la citotoxicidad, sino que también participan en el transporte y la dirección de la molécula hacia el objetivo, al tiempo que evitan cambios no deseados dentro de las biomoléculas (Syed, 2021). Debido a esto, una estrategia que se utiliza al diseñar un nuevo fármaco es la combinación de diferentes actividades en un solo compuesto, ya que esto debería reducir la concentración necesaria para el enfoque terapéutico, y a su vez debería disminuir los efectos secundarios producidos por una gran cantidad de compuesto necesario para tener una respuesta positiva a la terapia (Jaaks, 2022).

Otro enfoque atractivo consiste en estrategias de orientación, que ha demostrado tener muchas ventajas y posibles aplicaciones interesantes. Los agentes anticancerígenos dirigidos se diseñan de acuerdo con una estrategia que pretende dirigirlos hacia biomarcadores específicos del cáncer o dianas biológicas que se sobreexpresan en las células cancerosas. Así, el reclutamiento preferencial del fármaco en las células tumorales da como resultado una acción citotóxica selectiva que daña más a las células tumorales que a las sanas (Giorgi, 2022).

Finalmente, se suelen utilizar también andamios de productos naturales. La conjugación de andamios de productos naturales con complejos metálicos sirve como una estrategia atractiva para reducir los efectos secundarios graves de los medicamentos que contienen metales. Los productos naturales poseen beneficios inherentes como andamios medicinales, incluida una abundante diversidad estructural, bioactividad intrínseca y excelente biocompatibilidad. La unión de fracciones de productos naturales a complejos centrados en metales puede conferir selectividad para los sitios diana intercelulares/intracelulares y también superar los mecanismos típicos de resistencia a los medicamentos exhibidos por las células cancerosas contra los medicamentos a base de platino. Además, el ajuste fino de los centros metálicos o de los productos naturales conjugados permite la optimización de las características farmacológicas, incluida la potencia biológica mejorada y la reducción de los efectos secundarios, según el mecanismo de acción del complejo de metal conjugado del producto natural (Ma, 2019).

Complejos de organoestaño derivados de vitaminas del complejo B

La vitamina B6 es una coenzima involucrada en más de 150 reacciones bioquímicas. Comprende un grupo de seis compuestos químicos solubles en agua; la piridoxina (PN), la piridoxamina (PM), el piridoxal (PL), y sus derivados fosforilados (piridoxina 5'-fosfato (PNP), piridoxamina 5'-fosfato (PMP) y piridoxal 5'-fosfato (PLP)) (Figura 1) (Ueland, 2015).

Estudios recientes revelaron que la vitamina B6 afecta las respuestas inmunitarias y disminuye el crecimiento tumoral *in vivo*. Además, estudios *in vitro* han aportado pruebas sobre el efecto antiangiogénico de la vitamina B6 y como el aumento de la vitamina B6 en la dieta mejora la función inmunitaria. Sin embargo, niveles inadecuados de vitamina B6 pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama, de útero, de próstata y de colon. La inhibición de la proliferación celular por parte de la vitamina B6 se puede explicar a través de dos mecanismos. Por una parte, la reacción PLP-dependiente de la serina hidroximetiltransferasa es la mayor fuente de grupos metilo para la metilación del ADN y las histonas. Por otro lado, el PLP inhibe muchas enzimas que unen sustratos fosforilados, incluyendo las polimerasas de ADN y ARN (Bender, 2011).

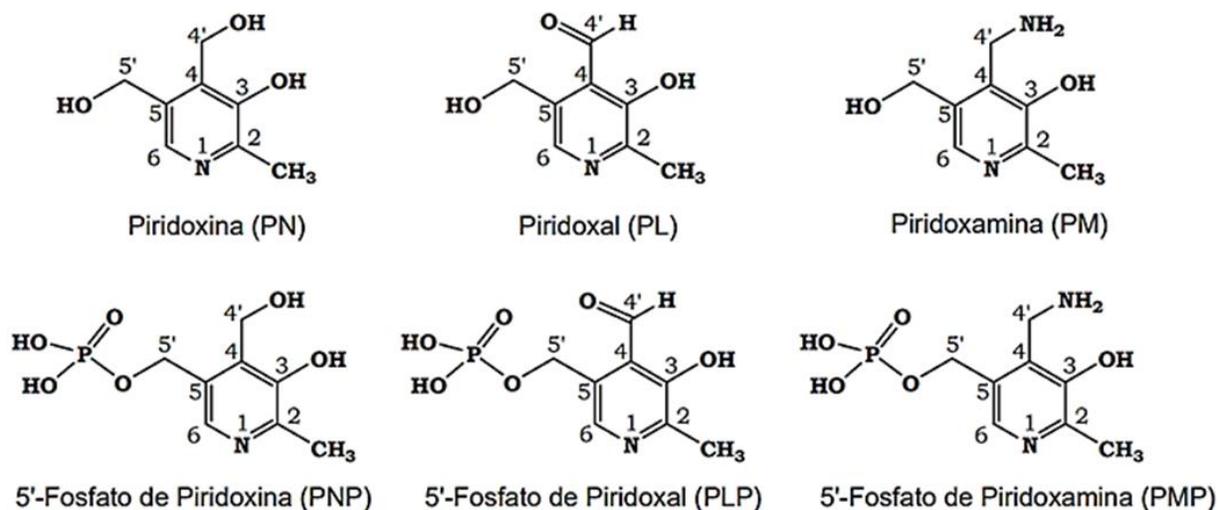


Figura 1. Formas activas de la vitamina B6.

El piridoxal, una de las 6 formas activas de la vitamina B6, realiza una plétora de reacciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos, el azúcar y los ácidos grasos. En presencia de iones metálicos, el piridoxal puede catalizar reacciones metabólicas importantes, como la transaminación, la descarboxilación y la racemización de aminoácidos (Wroblewski, 1977).

El piridoxal ha demostrado inhibir el crecimiento celular de células de melanoma murino B16 y B16F10, células de melanoma humano M21-HPB, células HepG2, células de cáncer de mama humano MCF-7, células de cáncer de mama felino FRM y células de cáncer de páncreas humano PANC-1. La fuerte actividad del piridoxal se ha atribuido en parte al aumento de PLP (piridoxal 5'-fosfato) intracelular (Matsuo, 2019).

También el tratamiento de células de cáncer de colon humano HT29, células de adenocarcinoma de colon humano LoVo y células HepG2 con 500 μ M de piridoxal dio como resultado una mayor expresión del gen inhibidor de la ciclina quinasa p21 a través del gen supresor de tumores p53, en comparación con otros compuestos de vitamina B6 (PN, PM, y PLP).

Otro estudio reveló que el piridoxal suprime la proliferación celular e induce IGFBP-3 dependiente de p53 en células MCF-7. En general, se considera que IGFBP-3 desempeña un papel supresor de tumores en el cáncer. Sin embargo, la relación entre la regulación positiva de genes y la inhibición del crecimiento celular por el piridoxal no es clara; por lo tanto, se necesitan más estudios para identificar los mecanismos subyacentes (Minamino, 2015).

Cabe mencionar que, la vitamina B6 participa como cofactor de un gran número de enzimas incluida la SHMT (serina hidroximetiltransferasa) implicada en la biosíntesis de ADN. Como las células tumorales están en constante proliferación, absorben vitamina B6 de los tejidos vecinos.

Por lo que, la presencia del piridoxal en un compuesto antitumoral, como forma activa de la vitamina B6, podría permitir un reclutamiento preferencial, que dé como resultado una acción citotóxica selectiva (Contestabile, 2020).

Además, la vitamina B6 entra a las células por difusión facilitada a través de transportadores de membrana específicos. Por lo tanto, su entrada mediada por un receptor específico puede utilizarse como un mecanismo biológico para el suministro de compuestos farmacológicos a las células (Pandey, 2013).

Finalmente, el piridoxal presenta diversos sitios de coordinación lo que le permite la formación de complejos metálicos. Asimismo, el aldehído en su estructura le permite realizar una condensación con aminas primarias, dando lugar a una imina o base de schiff, de esta manera puede tener mayor versatilidad de coordinación con centros metálicos (Gupta, 2022)

Bases de schiff

Las formas activas de la vitamina B6 son intercambiables y la mayoría de las reacciones catalíticas que implican su conversión pasan por la formación de una Base de schiff. Las Bases de schiff de los diferentes vitámeros estabilizan muy bien la generación de carbaniones, los cuales evolucionan posteriormente por diferentes caminos, dependiendo del sitio activo enzimático y del pH (Melis, 2012).

Las bases de Schiff son los productos de condensación de aminas primarias y compuestos de aldehído o carbonilo con grupos funcionales imina o azometina (-C=N-) (Figura 2).

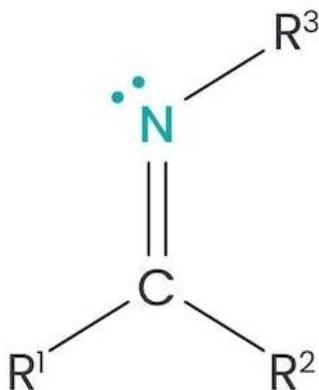


Figura 2. Base de schiff, donde R3 es un grupo arilo o alquilo.

Las bases de Schiff se denominan "ligandos privilegiados", ya que pueden unir muchos metales diferentes y estabilizarlos en varios estados de oxidación, y se han utilizado como unidades estructurales en la preparación de una gran cantidad de compuestos biológicamente activos (Arjmand, 2023).

Recientemente, los fármacos que incluyen en su estructura bases de Schiff han atraído una atención considerable en el diseño de quimioterapéuticos contra el cáncer; la potencia y la selectividad de estos derivados de bases de Schiff han producido una clase prometedora de candidatos a fármacos quimioterapéuticos. Dichos complejos se han probado en diferentes líneas celulares de cáncer humano *in vitro* e *in vivo* (Arjmand, 2023).

Además, las bases de Schiff exhiben diversas actividades biológicas, que se mejoran mediante la coordinación de las bases de Schiff con los iones metálicos (Zohreh, 2020).

Compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal

En el presente trabajo se utilizaron 4 compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal, denominados 2A, 2B, 2C y 2F. El compuesto 2A es el precursor del resto de los compuestos. El compuesto 2A es un complejo obtenido por la interacción del resto organoestaño con piridoxal como ligando donador de nitrógeno / oxígeno. Los compuestos 2B, 2C y 2F comparten con el compuesto 2A el resto común de piridoxal y aminofenol; la principal diferencia estructural entre ellos es la sustitución del anillo aromático en la posición 8 del resto aminofenol por un grupo nitro o un halógeno (F, Cl) (Figura 3).

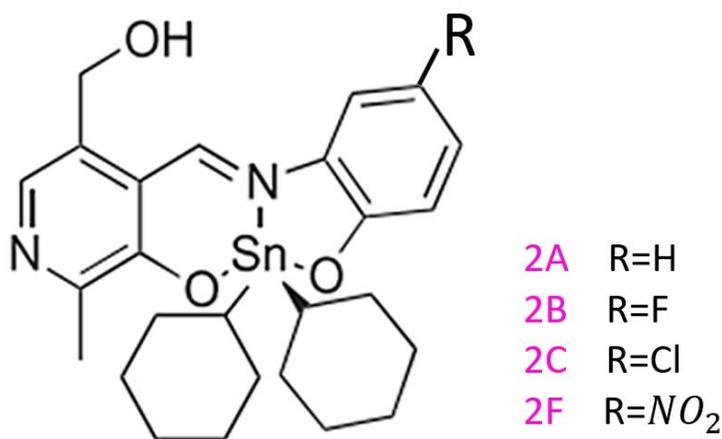


Figura 3. Compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal.

Algunas propiedades de las moléculas que componen los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal son las siguientes:

- 1) Organoestaño, con actividad antiproliferativa y apoptótica.
- 2) Piridoxal, con actividad antitumoral y antiantigénica, permite un reclutamiento preferencial, versatilidad de coordinación, bioactividad intrínseca y entra a la célula por un receptor específico.
- 3) Base de schiff, con actividad antitumoral, además, se pueden unir a muchos metales y estabilizar los átomos, además de mejorar su actividad biológica.
- 4) Anillo de 5 lados, favorece la solubilidad, en comparación a uno de seis.
- 5) Ligandos tridentados (O y N): Los compuestos con ligandos donantes de oxígeno revelan valores de IC_{50} bajos, además, cuando los grupos atractores de electrones que se unen al átomo de estaño, tienden a reducir la densidad de electrones en el compuesto.
- 6) Dicitclohexano: El cierre de anillos restringe la libertad de movimiento y otorga mayor rigidez de conformación, en comparación, a la ramificación de la cadena, aumentando la potencia en comparación con dibutilestaño.
- 7) Sustituyente (F, Cl o NO_2): Un átomo con alta electronegatividad influye en la reactividad química de los compuestos por su tamaño, lipofilidad e interacciones electrostáticas, además, podría producir toxicidad selectiva por activación mediante reducción.
- 8) Aminofenol: Si una droga posee un anillo aromático, la posición de los sustituyentes que este posea puede variar y el resultado puede ser un aumento de la actividad biológica.

En la siguiente tabla se muestran algunas de las características fisicoquímicas de los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal:

<i>Compuesto</i>	<i>Nombre IUPAC</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Punto de fusión</i>	<i>Solubilidad</i>
2A	12,12-Diciclohexyl-4-hydroxymethyl-1-methylbenzo[d]-pyrido[4,3-h]-11,13,2,6-dioxazastannonine	C ₂₆ H ₃₄ N ₂ O ₃ Sn	541.2698	168-170°C	Cloroformo, metanol, DMSO
2B	12,12-Diciclohexyl-8-fluoro-4-hydroxymethyl-1-methylbenzo[d]-pyrido[4,3-h]-11,13,2,6-dioxazaestanonine	C ₂₆ H ₃₃ N ₂ O ₃ SnF	559.2602	162-164°C	Cloroformo, metanol, DMSO
2C	12,12-Diciclohexyl-8-chloro-4-hydroxymethyl-1-methylbenzo[d]-pyrido[4,3-h]-11,13,2,6-dioxazastannonine	C ₂₆ H ₃₃ N ₂ O ₃ SnCl	575.7148	175-177°C	Cloroformo, metanol, DMSO
2F	12,12-Diciclohexyl-4-hydroxymethyl-1-methyl-8-nitrobenzo[d]-pyrido[4,3-h]-11,13,2,6-dioxazastannonine	C ₂₆ H ₃₃ N ₃ O ₅ Sn	586.2673	240-242°C	Cloroformo, metanol, DMSO

Tabla 1. Propiedades de los compuestos coordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico de compuestos pentacoordinados de diciclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal en las líneas tumorales de mama MDA-MB-231, JC, MCF-7 y 4T1, así como en cultivos de células no tumorales (células linfocíticas humanas).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la actividad antiproliferativa de compuestos pentacoordinados de diciclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal en cultivos de las líneas tumorales de mama MDA-MB-231, MCF-7, JC y 4T1 mediante la técnica de incorporación de cristal violeta.

Determinar la actividad necrótica de compuestos pentacoordinados de diciclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal en cultivos de las líneas tumorales de mama MDA-MB-231, MCF-7, JC y 4T1 a través de la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

Evaluar el efecto apoptótico de compuestos pentacoordinados de diciclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal en cultivos de las líneas tumorales de mama MDA-MB-231, MCF-7, JC y 4T1 mediante el análisis morfológico (y condensación de la cromatina), así como la detección de la caspasa 3 activa por microscopía de fluorescencia.

Evaluar la actividad antiproliferativa de compuestos pentacoordinados de diciclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal en linfocitos de sangre periférica humana, mediante el marcaje con carboxifluoresceína (CFSE) cuantificada por citometría de flujo.

METODOLOGÍA

Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC) y fueron sembradas en cajas Petri de vidrio de 100 mm en medio RPMI-1640 (*Gibco, USA*) suplementado con L-glutamina, rojo fenol, bencilpenicilina, y 5% de suero de neonato de bovino (SNB) previamente desactivado a 56 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (*Nauaire, USA*) a una temperatura de 37 °C con 5 % de CO₂, y una atmósfera húmeda saturante. Para los ensayos experimentales se usaron cultivos con una densidad celular ≤ 60 % de saturación (cultivos proliferantes).

Preparación del compuesto

Se empleó el mismo procedimiento con todos los compuestos (2A, 2B, 2C y 2F). En una balanza analítica se pesó 1 mg de compuesto, el cual fue solubilizado en 100 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO). Posteriormente, se preparó una segunda dilución disolviendo 1 µL de la primera dilución con 999 µL de RPMI (0.1µg/µL). De esta manera, la concentración de DMSO empleada en los ensayos biológicos fue menor de 0.5%.

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

Las células tumorales se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 7,000 células por pozo con 100 µL de RPMI con 5% SNB (suero de neonato bovino), las cuales se incubaron a 37 °C, al 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío por 24 horas. Transcurridas las 24 horas de adhesión, se retiró el medio y las células se trataron con las siguientes condiciones: un control testigo al cual sólo se le adicionó medio de cultivo, un control con el vehículo empleado en la solubilización del compuesto (DMSO 0.5%), y diferentes concentraciones del compuesto (0.1 a 10 µg/mL) disuelto en medio de cultivo. Después de 24 horas, se evaluó la actividad antiproliferativa a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta (Kuang, 1989). Al finalizar la tinción, la absorbancia (590 nm) fue determinada por espectrofotometría en un lector de placas (*Epoch Biotek*). Los datos obtenidos se analizaron en *Microsoft Office Excel 2019* graficando una curva dosis-respuesta y calculando la cantidad requerida del compuesto para inducir un decremento del 50% en la densidad celular (*IC*₅₀).

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

Las células tumorales fueron cultivadas en placas de 96 pozos a una densidad de 7,000 células por pozo con 100 µL de RPMI con 5% SNB, por 24 horas. Transcurridas las 24 horas de adhesión, se retiró el medio y se trataron con las siguientes condiciones: un control testigo al cual sólo se le adicionó medio de cultivo, un control del vehículo empleado en la solubilización del compuesto

(DMSO 0.5%), un control positivo (Tritón X-100) al 1.5% y la IC_{50} respectiva para cada compuesto. Transcurridas 24 horas, se recuperaron los sobrenadantes y se colocaron en placas de fondo cónico. Los sobrenadantes se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se transfirieron 40 μ L/pozo del sobrenadante centrifugado a una placa de 96 pozos de fondo plano a los cuales se adicionaron 40 μ L del reactivo de LDH (LDH-Citotoxicity Assay kit Biovision: No. CatK311-400) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (Epoch Biotek). El porcentaje de muerte necrótica se calculó en *Microsoft Office Excel 2019*, el control positivo tratado con tritón X-100 fue considerado como el 100 % de actividad.

Morfología apoptótica en células tumorales por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia

Se cultivaron las células tumorales en placas de 96 pozos a una densidad de 7,000 células por pozo con 100 μ L de RPMI con 5 % SNB, las cuales se incubaron a 37 °C, al 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío por 24 horas. Posteriormente, se trataron las células con la concentración de las IC_{50} respectiva durante 24 horas, considerando un control testigo, un control del vehículo (DMSO 0.5%) y un control positivo (15 μ g/mL de Camptotecina). Pasadas las 24 horas, las células se fijaron con 50 μ L de una mezcla de paraformaldehído al 4% durante una hora y media; al término del tiempo se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS (pH 7.3). Posteriormente, las células se permeabilizaron con 30 μ L de una solución de tritón X-100 al 0.05 % en PBS durante 20 minutos y se lavaron nuevamente 3 veces con PBS. Después del último lavado, se agregaron 3 μ L del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; *Sigma-Aldrich*, USA) en PBS y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente e inmediatamente se lavó tres veces con PBS. Finalmente, se observaron las células en un microscopio invertido de epifluorescencia (*Nikon Eclipse TS2R-FL*, Japón).

Detección de células positivas a caspasa 3 activa por inmunofluorescencia

Para la evaluación por microscopía de epifluorescencia, se cultivaron las células y se trataron con la concentración correspondiente a la IC_{50} , así como un control testigo, un control del vehículo (DMSO 0.5%) y un control positivo (15 μ g/mL de Camptotecina). Después de 24 horas se retiró el medio y las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 2 horas. Al término del tiempo, se lavaron 3 veces con PBS e inmediatamente se colocó el anticuerpo primario anti-Caspasa 3 activa hecho en conejo 1:1000 en PBS (*Sigma*, USA) y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a FITC contra conejo hecho en cabra 1:1000 en PBS (*Sigma*, USA) durante 2 horas protegidas de la luz. Transcurrido el tiempo, se lavaron 3 veces más con PBS, se agregaron 50 μ L de PBS y se observaron en un microscopio de contraste de fases y epifluorescencia (*Nikon Eclipse TS2R-FL*, Japón).

Determinación de la proliferación de linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (csfe)

Se realizaron cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica humana. Los linfocitos obtenidos se resuspendieron en 4 ml de PBS y se marcaron con una solución de 2 μ M de carboxifluoresceína (*Sigma*, USA) y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron 2 veces con PBS al 5% SFB, y se centrifugaron (*Dinac*, USA) a 1500 rpm por 5 minutos; el botón obtenido se resuspendió en 4 ml de medio de cultivo. Después del tratamiento los linfocitos se sembraron en una placa de 96 pozos (200,000 células por pozo en 200 μ l de medio de cultivo) por 24 horas. Posteriormente, fueron activados con 25 μ l/ml fitohemaglutinina (*Microlab*, USA); el volumen final de cada pozo fue de 200 μ l. Para el tratamiento con los compuestos (2A, 2B, 2C y 2F) las células se trataron con la IC_{50} de cada línea celular. Después, la muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 ml de verseno frío. Después de 5 minutos se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos y se retiró el verseno. Por último, se resuspendió el botón celular en 500 μ l de PBS y 500 μ l de paraformaldehído al 2% y la proliferación celular fue cuantificada por citometría de flujo (*FACS Aria III*). Los datos fueron analizados en el programa *FlowJo Becton Dickinson*, (*BD*) *Biosciences*.

RESULTADOS

Evaluación de la actividad antiproliferativa en células tumorales

Con el propósito de evaluar si los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F afectan el potencial proliferativo de las líneas celulares tumorales de mama MDA-MB-231, JC, MCF-7 y 4T1, éstas fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos (0.05 a 2 $\mu\text{g/ml}$) y la concentración requerida del compuesto para inducir un decremento del 50% en la densidad celular fue calculada (IC_{50}) (Figura 4 a 7, tabla 2).

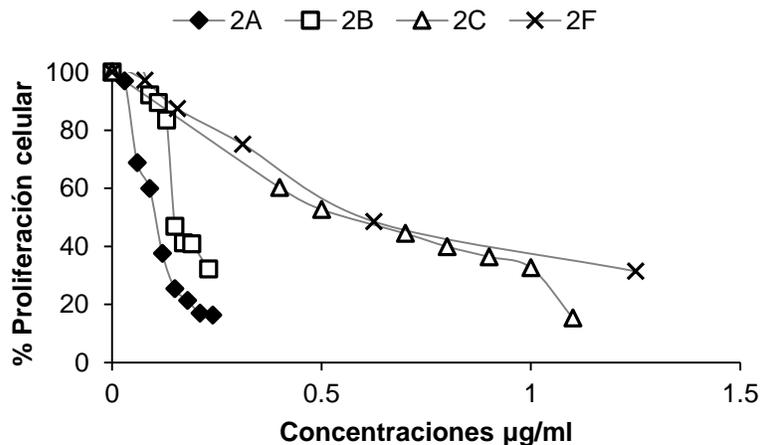


Figura 4. Efecto de los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F sobre el potencial proliferativo de la línea celular tumoral MDA-MB-231. Los valores son la media \pm SD de tres ensayos independientes.

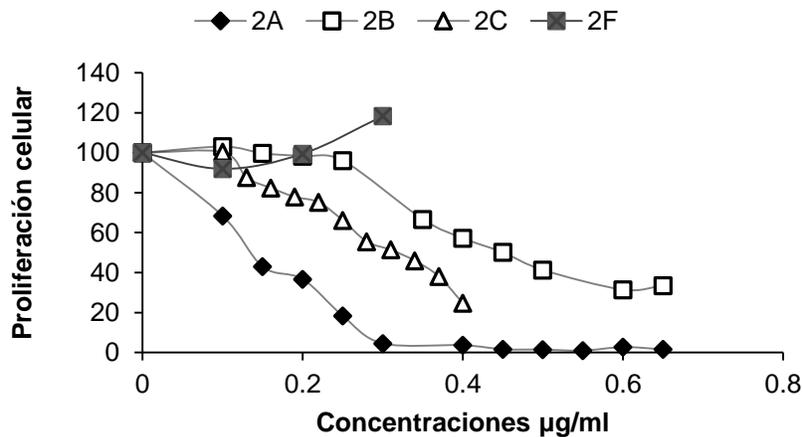


Figura 5. Efecto de los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F sobre el potencial proliferativo de la línea celular tumoral MCF-7. Los valores son la media \pm SD de tres ensayos independientes.

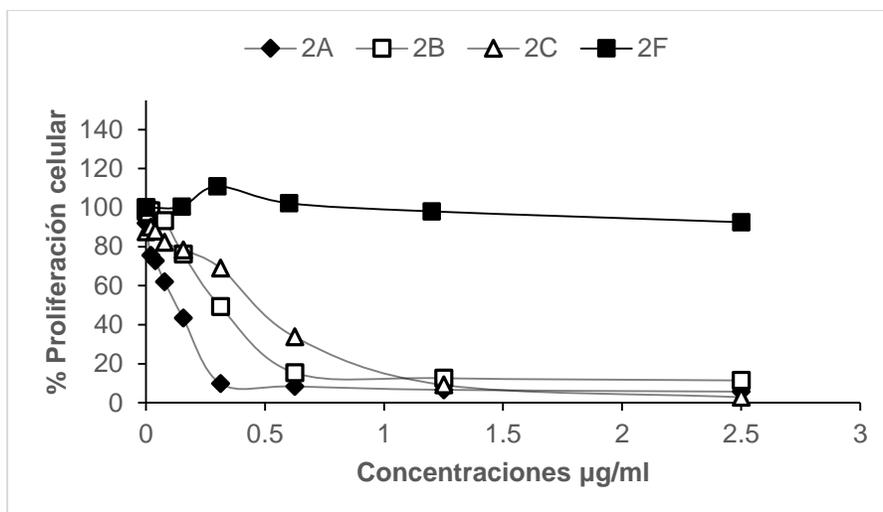


Figura 6. Efecto de los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F sobre el potencial proliferativo de la línea celular tumoral 4T1. Los valores son la media \pm SD de tres ensayos independientes.

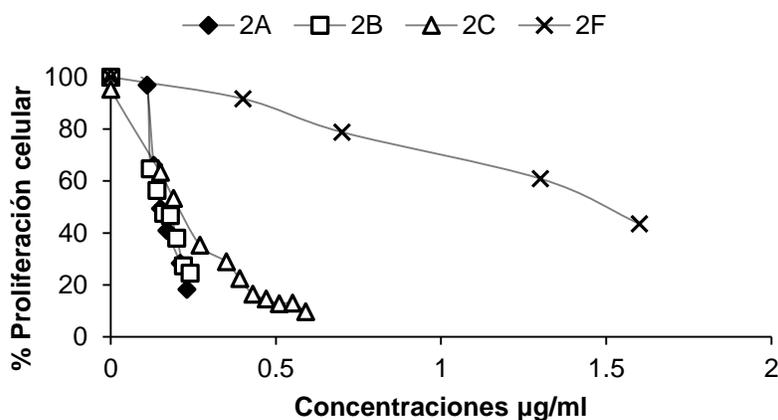


Figura 7. Efecto de los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F sobre el potencial proliferativo de la línea celular tumoral JC. Los valores son la media \pm SD de tres ensayos independientes.

Los cuatro compuestos demostraron una excelente actividad antiproliferativa frente a las células de cáncer de mama, excepto el compuesto 2F, que no inhibió la proliferación celular en las líneas tumorales MCF-7 y 4T1 en una concentración de hasta 10 $\mu\text{g/ml}$. En la tabla 2 se muestran los valores de IC_{50} obtenidas para cada compuesto en cada una de las líneas celulares:

	MDA-MB-231	MCF-7	JC	4T1
2a	0.11 $\mu\text{g/ml}$ (0.2 μM)	0.13 (0.24)	0.16 (0.3)	0.12 (0.22)
2b		0.18 (0.32)	0.50 (0.89)	0.17 (0.3)
2c		0.64 (1.11)	0.31 (0.54)	0.21 (0.36)
2f		0.64 (1.09)	>10	1.66 (2.83)
				>10

Tabla 2. Valores de IC_{50} obtenidos para los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F por línea celular.

Evaluación de la actividad necrótica

Debido a que la disminución de la proliferación observada en el ensayo anterior pudo ser causada por un efecto necrótico, las células tumorales fueron tratadas durante 24 horas con las IC_{50} obtenidas y la actividad de la enzima citoplasmática LDH fue cuantificada en los sobrenadantes de los cultivos celulares y considerada como un marcador de pérdida de la integridad de la membrana plasmática y en consecuencia como un marcador de muerte necrótica (Figura 8-11).

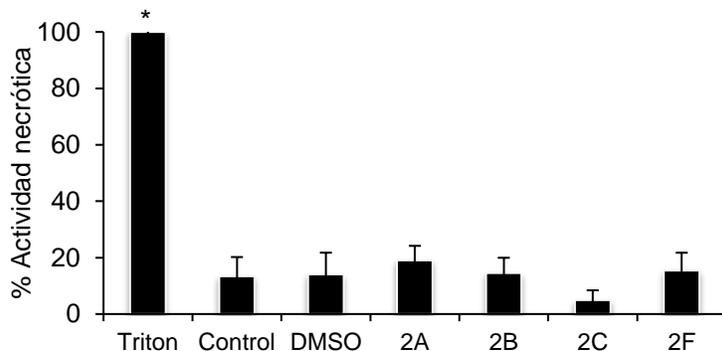


Figura 8. Determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en sobrenadantes de células tumorales MDA-MB-231 tratadas 24 horas con la IC_{50} correspondiente para cada compuesto. Tritón X-100 al 1% en medio de cultivo como control positivo. El gráfico es representativo de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs control, ANDEVA seguida de una prueba Tukey).

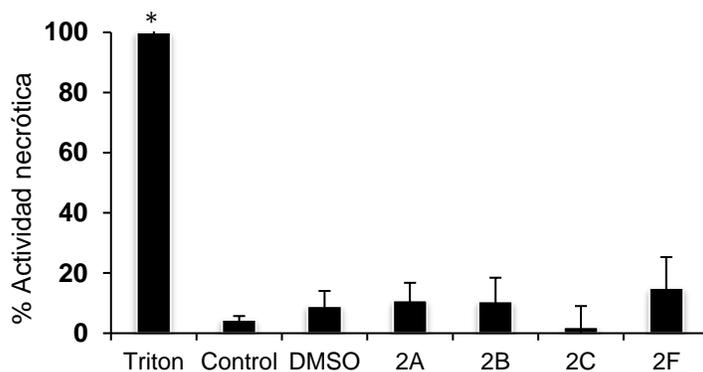


Figura 9. Determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en sobrenadantes de células tumorales MCF-7 tratadas 24 horas con la IC_{50} correspondiente para compuesto. Tritón X-100 al 1% en medio de cultivo como control positivo. El gráfico es representativo de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs control, ANDEVA seguida de una prueba Tukey).

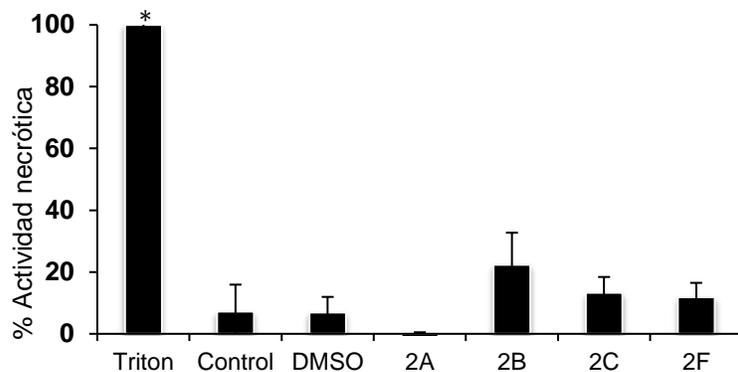


Figura 10. Determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en sobrenadantes de células tumorales JC tratadas 24 horas con la IC_{50} correspondiente para compuesto. Tritón X-100 al 1% en medio de cultivo como control positivo. El gráfico es representativo de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs control, ANDEVA seguida de una prueba Tukey).

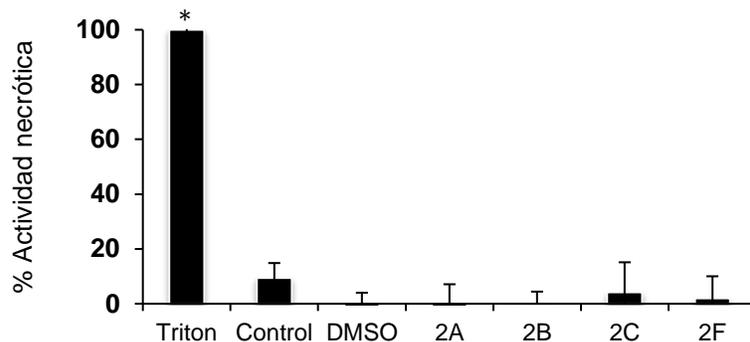
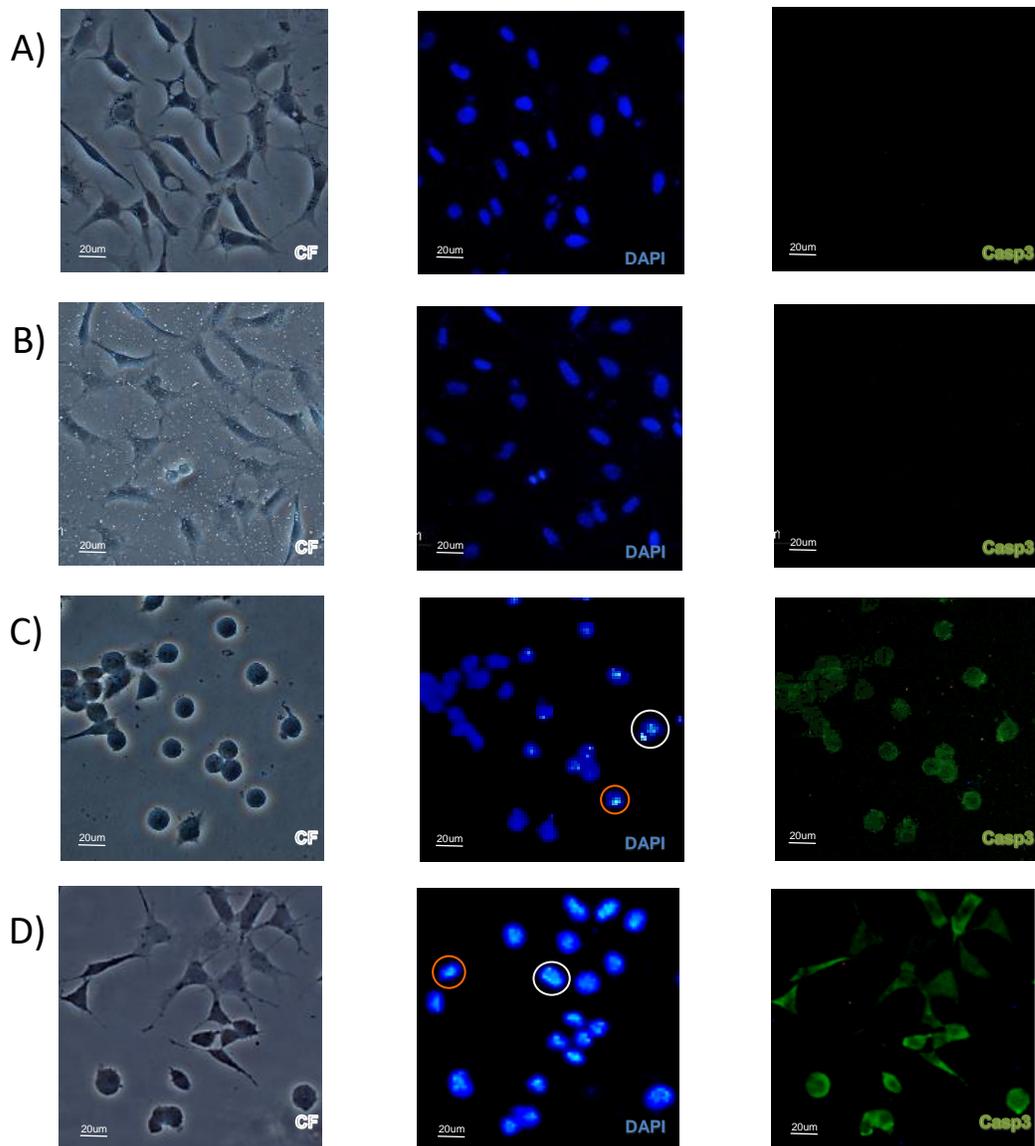


Figura 11. Determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en sobrenadantes de células tumorales 4T1 tratadas 24 horas con la IC_{50} correspondiente para compuesto. Tritón X-100 al 1% en medio de cultivo como control positivo. El gráfico es representativo de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$ vs control, ANDEVA seguida de una prueba Tukey).

Los resultados muestran que las células tumorales tratadas con los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F en sus respectivas IC_{50} , no liberan la enzima LDH en el medio de cultivo de manera significativa, por lo que la disminución en el número de células se debe a un proceso de muerte celular diferente a la necrosis.

Evaluación de la actividad apoptótica

Una vez que se determinó que el tratamiento con los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F no inducen muerte por necrosis, el siguiente paso fue establecer si estos compuestos inducen muerte por apoptosis. Para esto, en primer lugar, se examinaron cambios en la morfología celular y en la estructura nuclear, acompañados de la inmunodetección de caspasa 3 activa (figura 12-15). Los resultados mostraron que el tratamiento con los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F causó la muerte celular por apoptosis, debido a que se observaron rasgos morfológicos característicos de este proceso como: condensación de la cromatina, fragmentación intranuclear del ADN, disminución del tamaño nuclear, además hay compactación del citoplasma y encogimiento celular acompañado de la activación de la enzima caspasa 3.



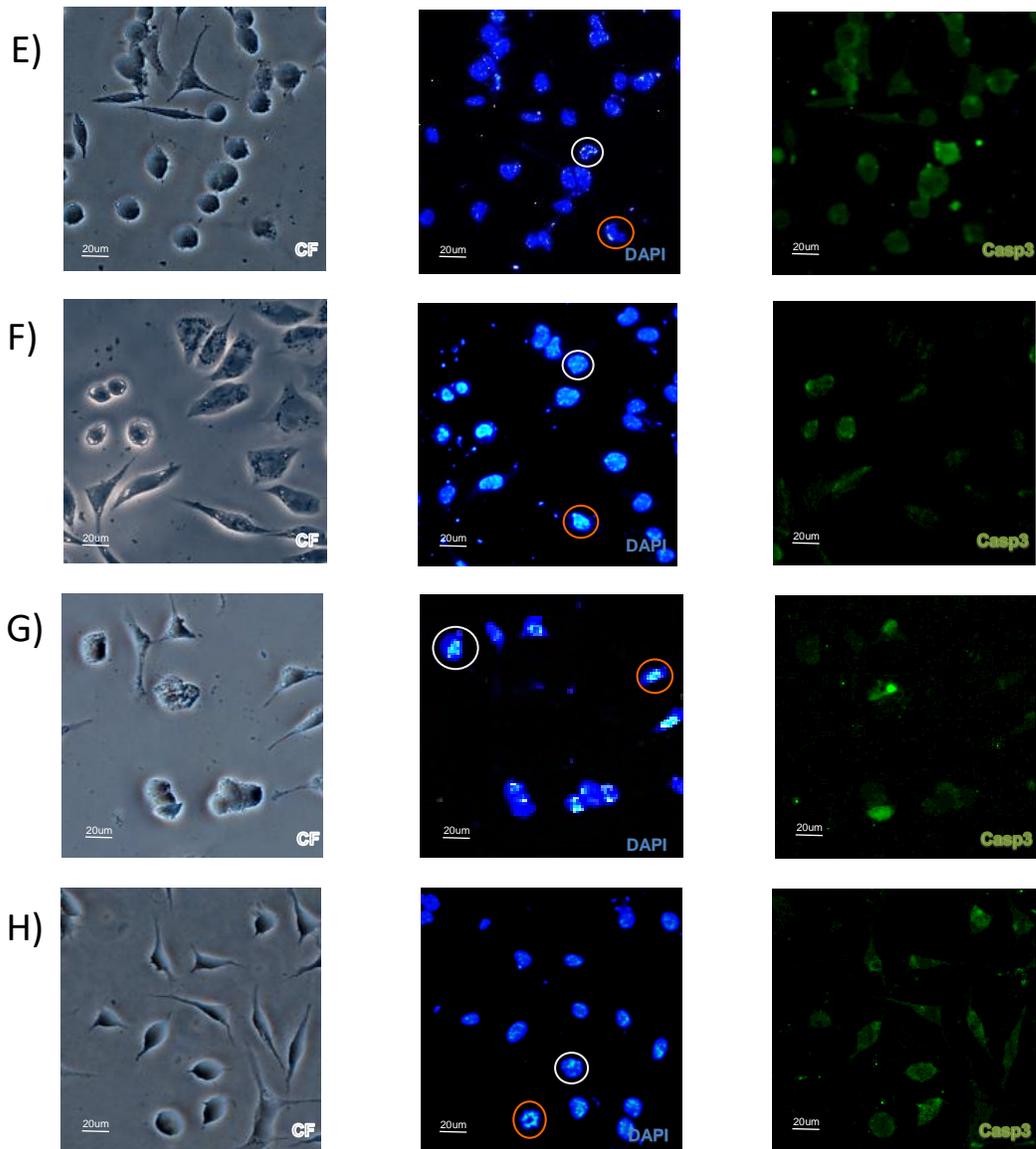
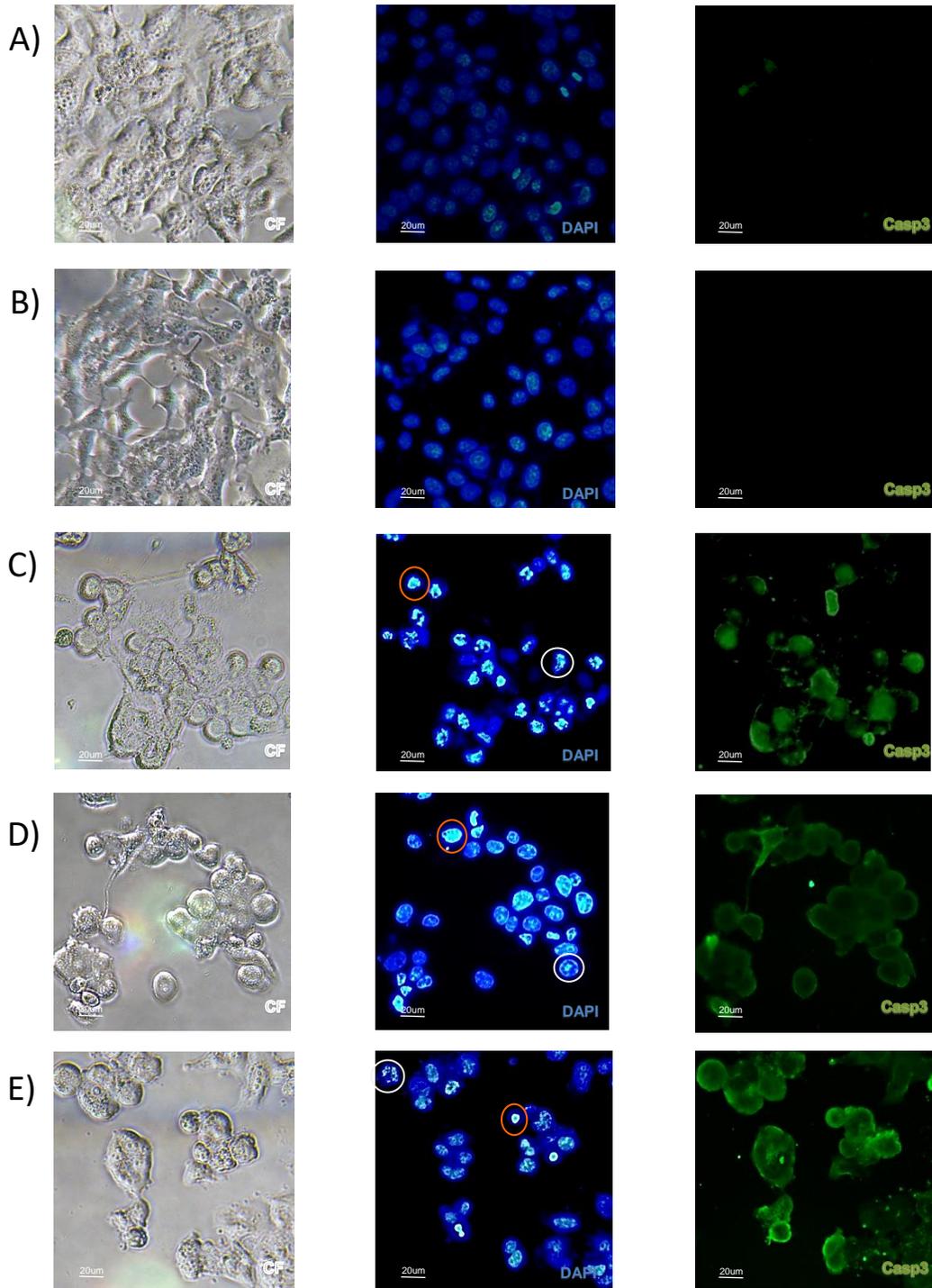


Figura 12. Observación de características morfológicas propias de la muerte celular apoptótica inducidas por los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F sobre la línea celular MDA-MB-231 tratada con las IC_{50} correspondientes. En el contraste de fases (CF) se observan cambios en la morfología celular, acompañados de cambios en la estructura nuclear (DAPI), además, se observa presencia de caspasa 3 activa (Casp3). A) CONTROL, células sin tratamiento. B) DMSO, células tratadas con $1 \mu\text{l/ml}$ del disolvente utilizado para solubilizar los compuestos. C) COLCHICINA, células tratadas con $10 \mu\text{g/ml}$ de colchicina. D) CISPLATINO, células tratadas con $5 \mu\text{l/ml}$ de cisplatino. E) 2A, células tratadas con la IC_{50} ($0.11 \mu\text{l/ml}$). F) 2B, células tratadas con la IC_{50} ($0.18 \mu\text{l/ml}$). G) 2C, células tratadas con la IC_{50} ($0.64 \mu\text{l/ml}$). H) 2F, células tratadas con la IC_{50} ($0.64 \mu\text{l/ml}$). En los círculos blancos se observa fragmentación nuclear y en los círculos naranjas se observa condensación de la cromatina.



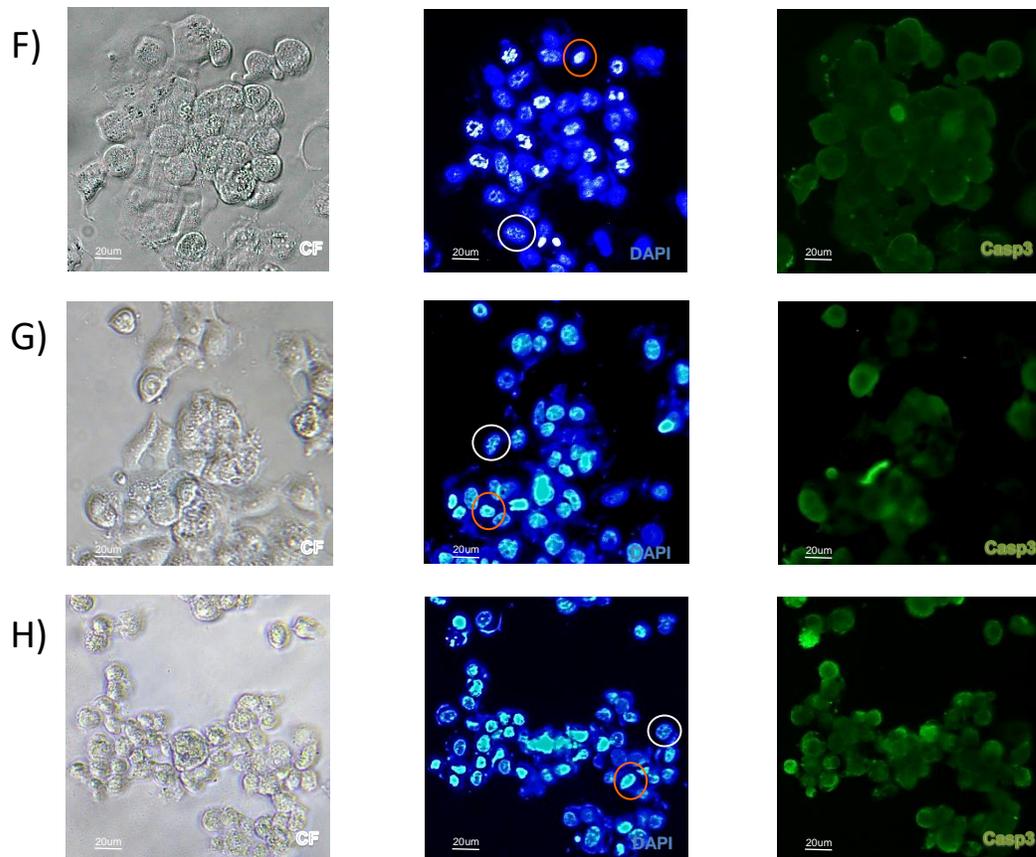
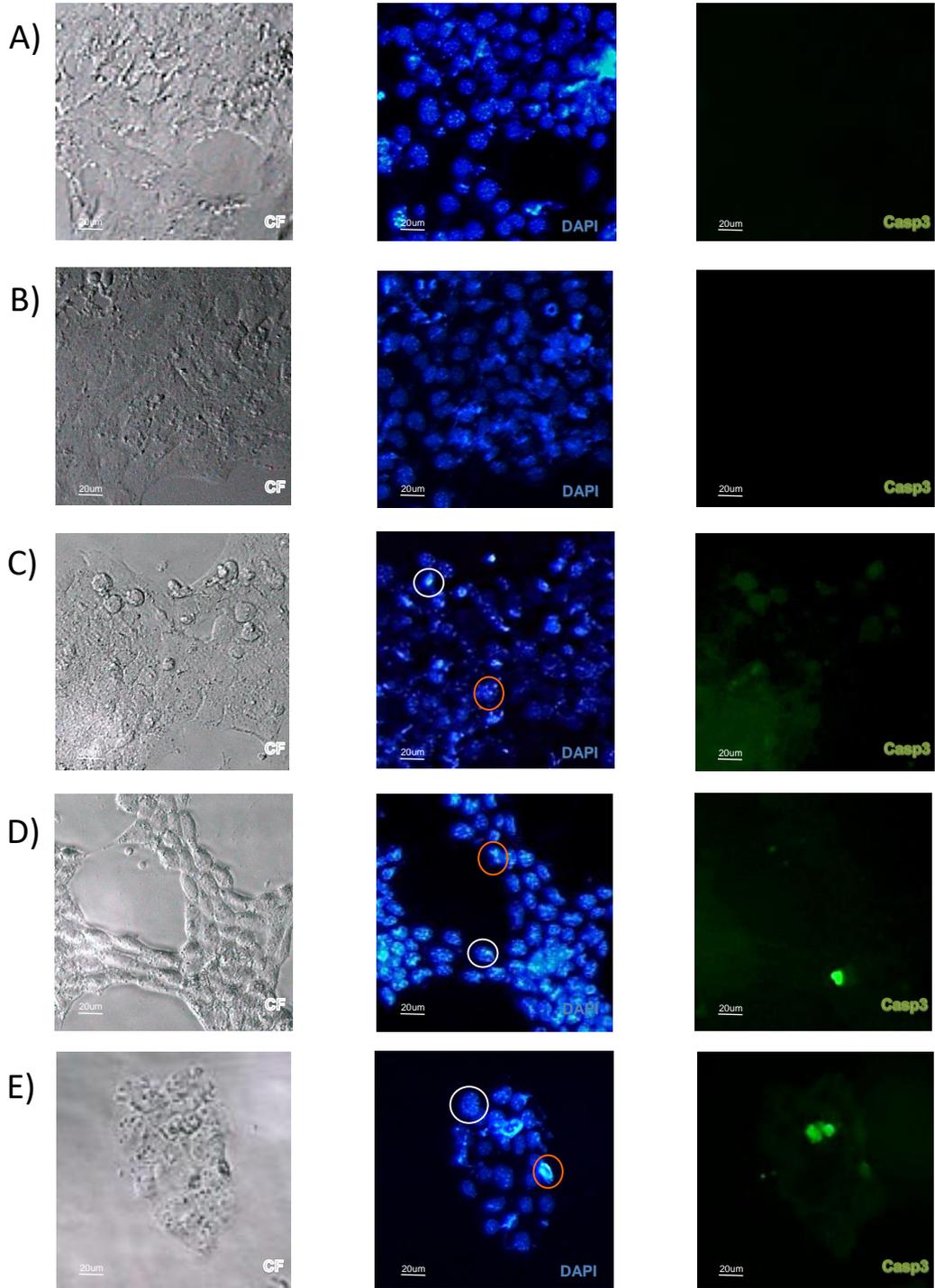


Figura 13. Observación de características propias de la muerte celular apoptótica de los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F sobre la línea celular MCF-7 tratada con las IC_{50} correspondientes. En el contraste de fases (CF) se observan cambios en la morfología celular, acompañados de cambios en la estructura nuclear (DAPI), además, se observa presencia de caspasa 3 activa (Casp3). A) CONTROL, células sin tratamiento. B) DMSO, células tratadas con 1 μ l/ml del disolvente utilizado para solubilizar los compuestos. C) COLCHICINA, células tratadas con 10 μ g/ml de colchicina. D) CISPLATINO, células tratadas con 7 μ l/ml de cisplatino. E) 2A, células tratadas con la IC_{50} (0.13 μ l/ml). F) 2B, células tratadas con la IC_{50} (0.50 μ l/ml). G) 2C, células tratadas con la IC_{50} (0.31 μ l/ml). H) 2F, células tratadas con la IC_{50} (2 μ l/ml). En los círculos blancos se observa fragmentación nuclear y en los círculos naranjas se observa condensación de la cromatina.



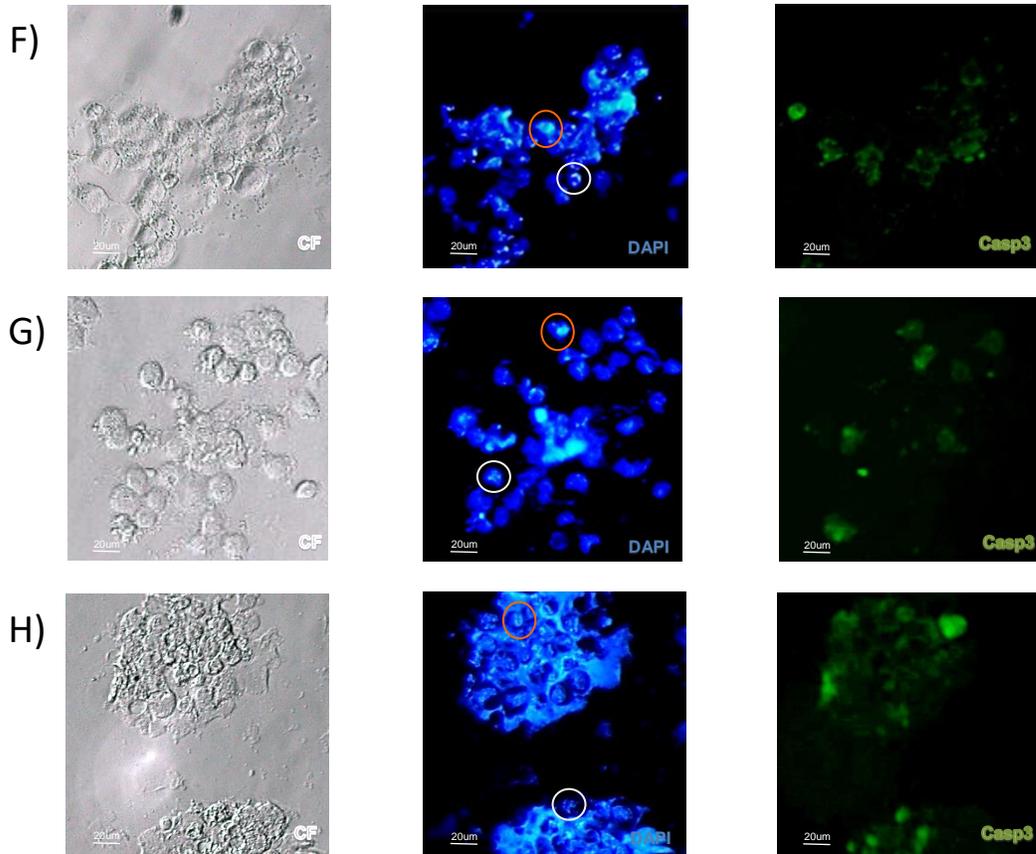
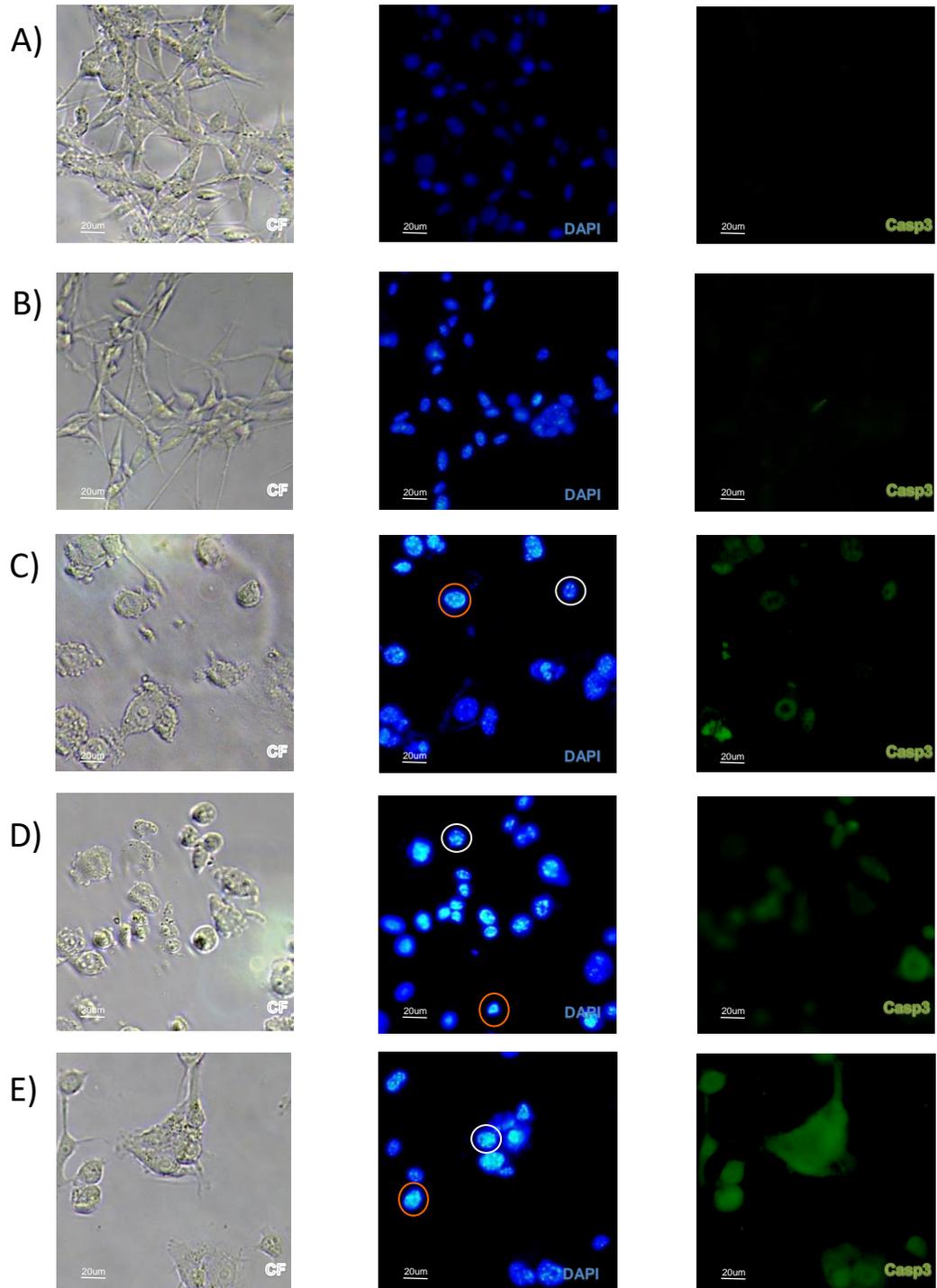


Figura 14. Observación de características propias de la muerte celular apoptótica de los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F sobre la línea celular 4T1 tratada con las IC_{50} correspondientes. En el contraste de fases (CF) se observan cambios en la morfología celular, acompañados de cambios en la estructura nuclear (DAPI), además, se observa presencia de caspasa 3 activa (Casp3). A) CONTROL, células sin tratamiento. B) DMSO, células tratadas con 1 μ l/ml del disolvente utilizado para solubilizar los compuestos. C) COLCHICINA, células tratadas con 10 μ g/ml de colchicina. D) CISPLATINO, células tratadas con 7 μ l/ml de cisplatino. E) 2A, células tratadas con la IC_{50} (0.12 μ l/ml). F) 2B, células tratadas con la IC_{50} (0.35 μ l/ml). G) 2C, células tratadas con la IC_{50} (0.57 μ l/ml). H) 2F, células tratadas con la IC_{50} (2 μ l/ml). En los círculos blancos se observa fragmentación nuclear y en los círculos naranjas se observa condensación de la cromatina.



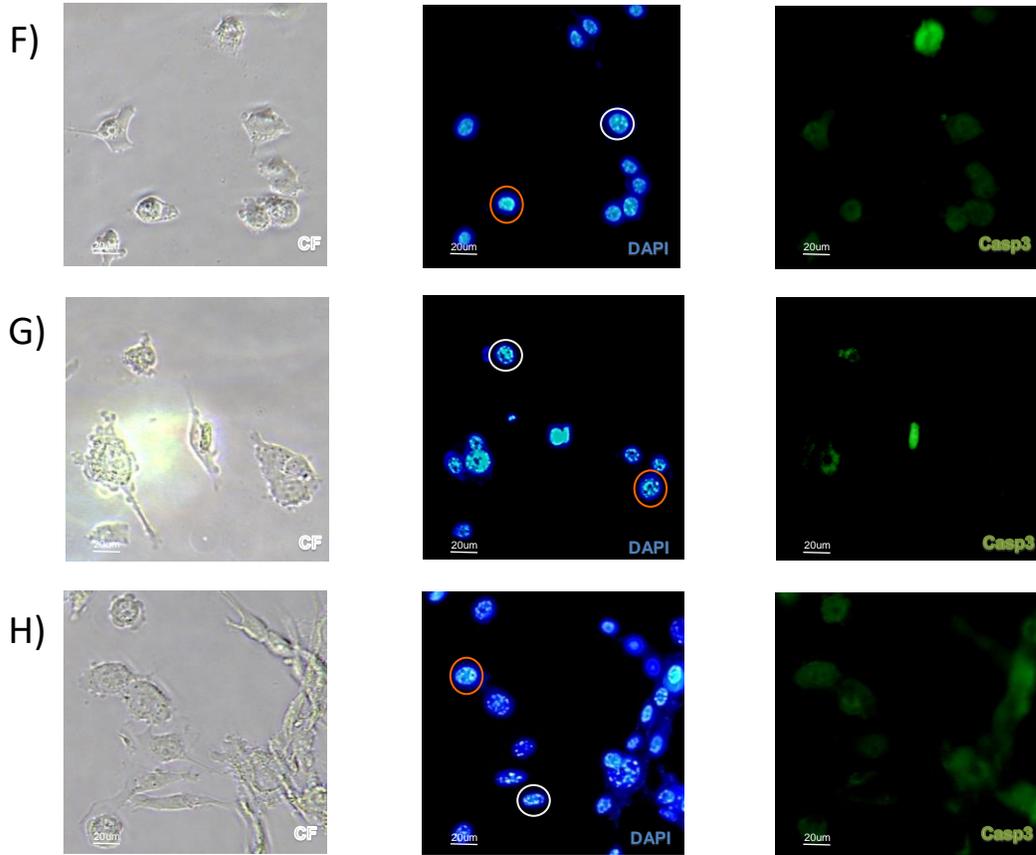


Figura 15. Observación de características propias de la muerte celular apoptótica de los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F sobre la línea celular JC tratada con las IC_{50} correspondientes. En el contraste de fases (CF) se observan cambios en la morfología celular, acompañados de cambios en la estructura nuclear (DAPI), además, se observa presencia de caspasa 3 activa (Casp3). A) CONTROL, células sin tratamiento. B) DMSO, células tratadas con $1 \mu\text{l/ml}$ del disolvente utilizado para solubilizar los compuestos. C) COLCHICINA, células tratadas con $10 \mu\text{g/ml}$ de colchicina. D) CISPLATINO, células tratadas con $7 \mu\text{l/ml}$ de cisplatino. E) 2A, células tratadas con la IC_{50} ($0.16 \mu\text{l/ml}$). F) 2B, células tratadas con la IC_{50} ($0.17 \mu\text{l/ml}$). G) 2C, células tratadas con la IC_{50} ($0.21 \mu\text{l/ml}$). H) 2F, células tratadas con la IC_{50} ($1.66 \mu\text{l/ml}$). En los círculos blancos se observa fragmentación nuclear y en los círculos naranjas se observa condensación de la cromatina.

Evaluación del efecto de los compuestos 2a, 2b, 2c y 2f sobre la proliferación de linfocitos humanos

Además de la inhibición de la proliferación y la inducción de apoptosis, otra cualidad buscada en los compuestos antineoplásicos es la selectividad, por esa razón, se evaluó si los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F afectan el potencial proliferativo de células no tumorales. Para ello, cultivos de células linfocíticas fueron tratados con los compuestos a las concentraciones obtenidas para las células tumorales y su efecto en el potencial proliferativo fue evaluado mediante citometría de flujo (figura 16). Los resultados muestran como el tratamiento con los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F no afecta la proliferación de células no tumorales en su concentración IC_{50} , lo que es evidencia de su acción selectiva.

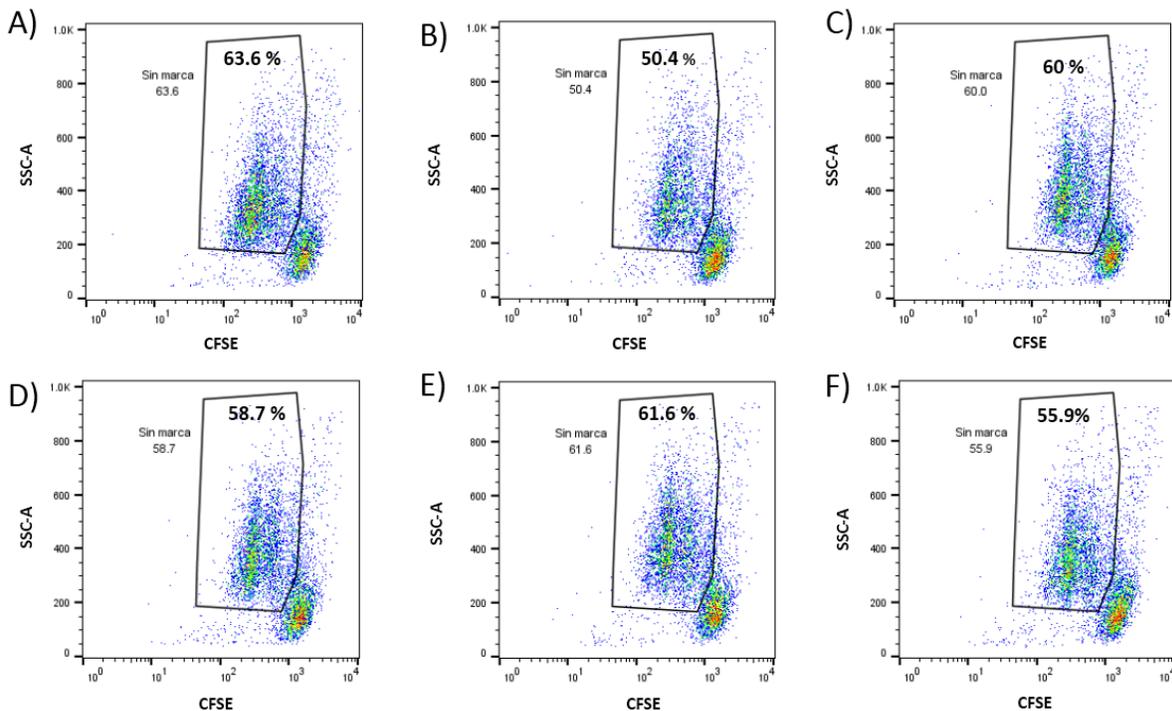


Figura 16. Efecto de los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F sobre el potencial proliferativo de linfocitos humanos. La proliferación fue evaluada a través del marcaje con carboxifluoresceína (CFSE). A) CONTROL, linfocitos activados con fitohemaglutinina. B) DMSO, linfocitos tratados con 1 μ l/ml del disolvente utilizado para solubilizar los compuestos. C) linfocitos tratados con la IC_{50} obtenida con 2A. D) linfocitos tratados con la IC_{50} obtenida con 2B. E) linfocitos tratados con la IC_{50} obtenida con 2C. F) linfocitos tratados con la IC_{50} obtenida con 2F. El polígono indica la región de células en proliferación.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Anteriormente los logros clínicos del cisplatino impulsaron la investigación de los quimioterapéuticos que contienen metales de transición, con el propósito de mejorar la eficacia terapéutica y prevenir los efectos secundarios graves relacionados con los fármacos basados en platino. Entre todos los fármacos no basados en platino notificados, los compuestos de organoestaño (IV) pueden ser los metalofármacos más prometedores, ya que, en algunos casos, presentan mejores efectos que el cisplatino, como, efectos tóxicos bajos, mayor actividad antiproliferativa, mejores propiedades de excreción y menores efectos secundarios, incluso cuando se utilizan en concentraciones micromolares (Niu, 2014; Syed, 2021).

Como punto de partida, cualquier agente antineoplásico debe lograr disminuir la proliferación celular del tumor, además de detener su crecimiento y prevenir la propagación del cáncer a otras partes del cuerpo. Diversos estudios han demostrado que los compuestos de organoestaño poseen una actividad antiproliferativa *in vitro* significativa, en algunos casos mayor que la del cisplatino u otros fármacos utilizados en la quimioterapia clínica contra el cáncer, dicha actividad antiproliferativa está influenciada principalmente por la estructura del compuesto (Syed, 2021). En el presente trabajo evaluamos un grupo innovador de cuatro compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal denominados 2A, 2B, 2C y 2F. Los compuestos presentan una estructura química base (compuesto 2A), los compuestos 2B, 2C y 2F presentan una variación al tener un sustituyente diferente al hidrógeno en la posición 8 del resto aminofenol, el compuesto 2B tiene un Flúor, el compuesto 2C presenta un Cloro, mientras que el compuesto 2F presenta un NO₂. Estos sustituyentes permiten realizar un estudio comparativo entre el compuesto base (2A) con los demás compuestos, dejando ver cuál de ellos induce una mejora o cuál demerita la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del compuesto base. Al respecto, los resultados del presente estudio establecen que los cuatro compuestos (2A, 2B, 2C y 2F) afectan el potencial proliferativo de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, MCF7, JC y 4T1 de manera dependiente de la dosis, obteniendo valores de IC₅₀ en el rango submicromolar (menos de 1 μM). Sin embargo, el compuesto base (2A) presentó los valores de IC₅₀ más bajos para cada una de las líneas celulares, estableciendo que ninguno de los sustituyentes presentes en estos compuestos (F, Cl, y NO₂) mejoran la actividad antiproliferativa *in vitro* del compuesto base (2A). No obstante, aunque la presencia de los sustituyentes (F, Cl, y NO₂) no mejora la actividad antiproliferativa del compuesto base, resultaría interesante explorar su actividad *in vivo*, debido a que el ambiente hipóxico característico de los tumores (Arvelo, 2009) permitiría la reducción de estos sustituyentes electronegativos, esta reducción podría modificar a su vez la actividad del compuesto. En algunos fármacos esto se conoce como activación por reducción. Esta activación ocurre cuando el fármaco está biológicamente inactivo, y luego se biorreduce mediante la adición gradual de hasta seis electrones, proceso catalizado por varias reductasas endógenas. Esto lo transforma en un fármaco citotóxico que se activa selectivamente en un ambiente de hipoxia (Nepali, 2019). La activación por reducción de estos compuestos podría eliminar a las células tumorales mediante la inducción de muerte celular necrótica u apoptótica (Banti, 2019).

Además, es relevante mencionar que las concentraciones de IC₅₀ obtenidas para cada compuesto en cada línea celular son menores que las reportadas para el cisplatino en las líneas celulares tumorales utilizadas (MDA-MB-231 IC₅₀ de 33.03 μM, MCF7 IC₅₀ de 18.7 μM y 4T1 IC₅₀ de 24 μM (Banti, 2019)). Por lo tanto, la presencia del átomo de estaño en los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F mostró mayor actividad que el cisplatino.

La desregulación de los procesos de muerte celular resulta relevante para la tumorigénesis (Koren, 2021). La asociación entre muerte celular y cáncer es compleja debido a que hay más de un tipo de muerte celular

involucrada endógenamente en el cáncer y algunos tipos de muerte celular tienen efectos duales e incluso opuestos sobre la tumorigénesis (Galluzzi, 2018). En el caso de la necrosis, ésta se observa comúnmente en tumores debido a microambientes hipóxicos (Yan, 2020). Además, es común encontrar este tipo de muerte como el principal mecanismo de acción de los fármacos quimioterapéuticos convencionales, y aunque efectivos, desafortunadamente se asocian a una fuerte toxicidad reflejada en la generación de efectos colaterales. Como es el caso del cisplatino, cuya toxicidad es dosis-dependiente causando apoptosis y necrosis celular en los compartimentos renales (De Francisco, 2021). En lo correspondiente a los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F, nuestros resultados establecen que estos compuestos no liberan la enzima LDH en el medio de cultivo, indicando que los compuestos no inducen muerte celular por necrosis en estas líneas celulares tumorales y que el decremento en el número celular observado es debido a una causa diferente a la muerte necrótica. Por lo tanto, al no liberarse el contenido citoplasmático de la célula en los tejidos circundantes, se esperaría que el uso de estos compuestos presente un menor efecto citotóxico (efectos secundarios que tienen relación con la muerte necrótica), y evite o disminuya significativamente la respuesta inflamatoria, consiguiendo que estos compuestos resulten más tolerantes en su aplicación terapéutica.

Además de la muerte necrótica, otro de los principales mecanismos de muerte celular es la apoptosis. La apoptosis presenta características morfológicas definidas que nos permiten distinguirla de otros tipos de muerte celular, estas incluyen contracción celular, fragmentación del ADN (*cariorrhexis*), condensación de cromatina que produce núcleos más pequeños y compactos que los presentes en las células no apoptóticas y formación de fragmentos celulares en cuerpos apoptóticos, un sello distintivo del proceso apoptótico (Hu, 2021). Estos cambios morfológicos son causados por la activación de las caspasas efectoras (principalmente caspasa 3) (Galluzzi, 2018). Es importante resaltar que durante la apoptosis no se produce daño en la membrana plasmática, lo que evita la liberación de enzimas en el entorno extracelular, previene el daño a las células vecinas y evita la estimulación de la respuesta inmune (Julian, 2015). Con respecto a los compuestos de organoestaño (IV), se ha demostrado que la mayoría inducen la muerte celular apoptótica, específicamente a través de la vía intrínseca, (Syed, 2021). En los cultivos celulares tratados con los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F se observaron cambios en la morfología celular y en el núcleo, propios de las células apoptóticas. Se observó cómo algunas células comenzaron a perder adherencia, disminuyeron de tamaño y tomaron una forma esférica al perder sus proyecciones citoplasmáticas y en el núcleo se observó el ADN condensado, en comparación con las células tumorales sin tratamiento que presentan citoplasma extendido, adheridas a la superficie, con una forma poliédrica, núcleos de tamaño regular con la cromatina distribuida en todo el nucleoplasma. Como se mencionó anteriormente, los cambios morfológicos propios de células apoptóticas son causados por la acción de caspasas ejecutoras. Al respecto, en todos los cultivos de las células tumorales tratadas con los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F, se observaron células positivas a la caspasa 3 activa, confirmando el proceso apoptótico e indicando que estos compuestos de organoestaño eliminan a las células tumorales a través de una muerte apoptótica. Sin embargo, en un futuro inmediato, sería recomendable realizar ensayos cuantitativos adicionales, como citometría de flujo para establecer el porcentaje de células que son positivas a la caspasa 3 activa, con la intención de determinar la magnitud de células tumorales que son eliminadas por el proceso apoptótico.

Los medicamentos antineoplásicos como el cisplatino presentan una acción selectiva muy baja debido a su alta reactividad, por lo que actúan indistintamente sobre las células malignas y sobre las células sanas con velocidad de división alta (Sun, 2021). Esto genera en los pacientes efectos secundarios graves. Para disminuir los efectos colaterales, se busca que los compuestos antineoplásicos tengan acción selectiva eliminando únicamente a las células tumorales y de esta manera no afectar aún más la salud del paciente. Por lo tanto, es imprescindible evaluar el efecto de estos compuestos en células no tumorales. Por lo cual,

en este trabajo se determinó mediante citometría de flujo el efecto de los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F en el potencial proliferativo de células no tumorales. Para ello se realizaron cultivos de linfocitos humanos y se encontró que los compuestos en su concentración de IC50 no afectaron el potencial proliferativo, sugiriendo que estos compuestos presentan acción selectiva. Estos resultados sugieren que estos compuestos podrían ser tolerados de una mejor manera que los fármacos antineoplásicos convencionales, incidiendo en una mejor calidad de vida para el paciente.

Todos estos resultados dejan ver la relevancia de estos compuestos como agentes antineoplásicos y permite que sean considerados como buenos candidatos para ser evaluados en modelos *in vivo* con el propósito de establecer su potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer.

En conclusión, los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados (2A, 2B, 2C y 2F) que contienen piridoxal presentan actividad antiproliferativa, con nula actividad necrótica, e inducen muerte celular apoptótica en las líneas celulares tumorales de mama MDA-MB-231, MCF-7, 4T1 y JC, con acción selectiva.

Conclusiones

Los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal (2A, 2B, 2C y 2F) afectan el potencial proliferativo de manera dosis-dependiente de células tumorales MDA-MB-231, MCF7, 4T1 y JC.

El tratamiento con la IC_{50} de los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F no causa un efecto necrótico en las líneas tumorales MDA MB 231, MCF7, JC Y 4T1.

El tratamiento con la IC_{50} de los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F induce muerte por apoptosis en las líneas celulares tumorales MDA-MB-231, MCF7, JC y 4T1.

Los compuestos 2A, 2B, 2C y 2F no afectan la proliferación de células linfocíticas humanas no tumorales en su concentración IC_{50} .

Perspectivas

La actividad biológica de los compuestos de organoestaño (IV) está relacionada con la naturaleza y el número de sustituyentes unidos directamente al átomo de estaño. En este trabajo, ninguno de los sustituyentes presentes en los compuestos 2B, 2C y 2F (F, Cl, y NO_2 respectivamente) mejoraron la actividad antiproliferativa *in vitro* del compuesto base (2A) *in vitro*, sin embargo resulta interesante evaluar este efecto *in vivo*, donde un ambiente de hipoxia podría modificar su actividad posteriormente de su reducción.

Se ha informado que los compuestos de organoestaño inducen muerte celular apoptótica, algunos investigadores sugieren que esto ocurre cuando estos se unen al ADN, sin embargo, el estudio del mecanismo de acción de estos compuestos sobre las células cancerosas a nivel molecular es un campo aún incipiente, por lo que es fundamental comprender el efecto de la química de coordinación sobre la actividad citotóxica y las rutas de muerte celular específicas que activan los compuestos pentacoordinados de dicitclohexil estaño (IV) derivados de ligantes tridentados que contienen piridoxal (2A, 2B, 2C y 2F).

REFERENCIAS

- Aguilar, M., Neri, M., Padilla, C., Pimentel, M., García, A., Sánchez, A. (2012). Factores de riesgo como pronóstico de padecer cáncer de mama en un estado de México. *Nutrición Hospitalaria*, 27(5), 1631-6. DOI: 10.3305/nh.2012.27.5.5997.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K. (2011). *Introducción a la biología celular* 3° edición. México: Editorial Médica Panamericana. ISBN: 9786077743187
- Angulo-Rodríguez, AA., Galindo-Uriarte, AR., Pérez-Angulo, C. (2012). *Biología celular* 1° edición. México: UAS-DGEP. ISBN 978-607-9128-45-6
- Arvelo, F., & Cotte, C. (2009). Hipoxia en la malignidad del cáncer, Revisión. *Investigación Clínica*, 50(4), 529-546. ISSN 2477-9393
- Arjmand, F., Yasir, H., Tabassum, S. (2023). Progress of Metal-Based Anticancer Chemotherapeutic Agents in Last two Decades and their Comprehensive Biological (DNA/RNA Binding, Cleavage and Cytotoxicity Activity) Studies. *The chemical record*, 23(3), e202200247. DOI: 10.1002/tcr.202200247
- Banti, C., Hadjikakou, S., Sismanoglu, T., Hadjiliadis, N. (2019). Anti-proliferative and antitumor activity of organotin (IV) compounds. An overview of the last decade and future perspectives. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 194, 114-152. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2019.02.003.
- Bender, D. (2011). Vitamin B6: beyond adequacy. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16(1), 29-39. DOI: 10.1177/1533210110392946
- Brandan, M., Villaseñor-Navarro, Y. (2006). Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. *Cancerología*, 1(3), 147-162. www.incan.edu.mx
- Bray, F. (2018). Estimación de la incidencia mundial de cáncer y mortalidad en 2018. Obtenido de GLOBOCAN: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492>
- Carneiro, B., El-Deiry, W. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews clinical oncology*, 17, 395-417. DOI: 10.1038/s41571-020-0341-y
- Chen, J., Lu, L., Feng, Y., Wang, H., Dai, L., Li, Y., Zhang, P. (2011). PKD2 mediates multi-drug resistance in breast cancer cells through modulation of P-glycoprotein expression. *Cancer Letters*, 300(1), 48-56. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.09.005.
- Contestabile, R., di Salvo, M., Bunik, V., Tramonti, A., Verní, F. (2020) The multifaceted role of vitamin B₆ in cancer: *Drosophila* as a model system to investigate DNA damage. *Open Biology*, 10(3): 200034. DOI: 10.1098/rsob.200034.
- De Francisco, A., Maciáb, M., Alonso, F., García, P., Gutiérrez, E., Quintanae, L., Quirogaf, B., Torregrosag, I. (2021). Efectos renales adversos del tratamiento del cáncer. *NefroPlus*, 11(01), 1-111. ISSN: 2659

Elena, G. (2002). Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Revista Argentina de Anestesiología*, 60(6), 391-401.

Fink, S., Cookson, B. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73(4), 1907-16. DOI: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005.

Galluzzi, L., Maiuri, M., Vitale, I. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation*, 14, 1237-1266. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402148

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 25, 486–541. DOI: 10.1038/s41418-017-00124

Gandur, N. (2004). Introducción a la oncología. Breve historia del cáncer. Definiciones. En S. Aibar, *Manual de enfermería oncológica* (pág. 7). Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer.

Giorgi, E., Binacchi, F., Marotta, C., Cirri, D., Gabbiani, C., Pratesi, A. (2022). Highlights of New Strategies to Increase the Efficacy of Transition Metal Complexes for Cancer Treatments. *Molecules*, 28(1), 273. DOI: 10.3390/molecules28010273.

Gómez-Ruiz S., (2010). Evolución y desarrollo de complejos metálicos con aplicación potencial. *Real Sociedad Española de Química*, 106(1), 13–21. ISSN 1575-3417.

Grivennikov, S., Greten, F., Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 19;140(6), 883-99. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.025.

Gupta, S. (2022). Recent reports on Pyridoxal derived Schiff base complexes. *Inorganic Chemistry*, 42(2), 161-177. <https://doi.org/10.1515/revic-2020-0026>

Han, J., Lim, W., You, D., Jeong, Y., Kim, S., Lee, J., Shin, T., Lee, G., Park, S. (2019). Chemoresistance in the Human Triple-Negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231 Induced by Doxorubicin Gradient Is Associated with Epigenetic Alterations in Histone Deacetylase. *Journal of Oncology*, 2. DOI: 10.1155/2019/1345026

Hanahan, D., Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

Hu, X., Li, Z., Lin, R., Shan, J., Yu, Q., Wang, R., Liao, L., Yan, W., Wang, Z., Shang, L., Huang, Y., Zhang, Q., Xiong, K. (2021). Guidelines for regulated cell death assays: a systematic summary, a categorical comparison, a prospective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1-28. DOI 10.3389/fcell.2021.634690

Jaaks, P., Coker, E., Vis, D. (2022). Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells. *Nature*, 603, 166–173. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04437-2>

James, T., Gary, J. (1977). Transition-metal complexes of vitamin B6 related compounds. 1. Synthesis and electronic and structural properties of several divalent first-row transition-metal complexes of pyridoxylideneamino acids. *Inorganic Chemistry*, 16 (11), 2752–2762. <https://doi.org/10.1021/ic50177a017>

Jiménez, L. (2003). *Biología celular y molecular* 1° edición. México: PEARSON EDUCACIÓN. ISBN: 970-26-0387-0

Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *BIOQUÍMICA*. 22(6), 100-106. ISSN 0212-047X

Julian, L., Olson, M. (2015) Apoptotic membrane dynamics in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*, 7, 133-142. <https://doi.org/10.2147/CHC.S57893>

Karges, J. (2022). Clinical Development of Metal Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer. *Angewandte Chemie International Edition English*, 61(5), e202112236. DOI: 10.1002/anie.202112236.

Karp, G. (2004). *Biología Celular y molecular: conceptos y experimentos*. Mc Graw Hill. ISBN: 978-607-15-1137-9

Karsch-Bluman, A., Benny, O. (2020) Necrosis in the Tumor Microenvironment and Its Role in Cancer Recurrence. *Advances in experimental medicine and Biology*, 1225, 89-98. DOI: 10.1007/978-3-030-35727-6_6.

Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. (2007). *INMUNOLOGÍA de Kuby* 6° edición. México, D.F.: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES. ISBN 13: 978-1-4292-0211-4

Komatsu, S., Yanaka, N., Matsubara, K., Kato, N. (2003). Antitumor effect of vitamin B6 and its mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1647(1-2), 127-30. DOI: 10.1016/s1570-9639(03)00076-1.

Koren, E., Fuchs, Y. (2021). Modes of Regulated Cell Death in Cancer. *Cancer Discovery*, 11 (2), 245–265. doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0789

Kroemer, G., El-Deiry, W., Golstein, P., Peter, M., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M., Malorni, W., Knight, R., Piacentini, M., Nagata, S., Melino, G. (2005). Nomenclature committee on cell death. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell death and differentiation*, Suppl 2, 1463-7. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401724

Kumar, V. (2013). *Robbins. Patología humana*. Barcelona, España: Elsevier Inc. ISBN: 9788480869942

Kumar, A., Kumar, A., Singh, H., Sonawane, P., Pathak, P., Grishina, M., Pal Yadav, J., Verma, A., Kumar, P. (2023). Metal Complexes in Cancer Treatment: Journey So Far. *Chemistry & Biodiversity*, 20(4), e202300061. DOI: 10.1002/cbdv.202300061.

López, J. (2013). Estudio teórico de la reactividad química y biológica de cisplatino y algunos derivados con actividad anticancerosa. *Información tecnológica*, 24(3), 3-14. DOI: 10.4067/S0718-07642013000300002-2606.

Ma, D., Wu, C., Cheng, S., Lee, F., Han, Q., Leung, C. (2019). Development of natural product-conjugated metal complexes as cancer therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 341. DOI: 10.3390/ijms20020341.

Martínez-Torres, A., Uscanga-Palomeque, A., Rodríguez-Padilla, C. (2016). Actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J (Eds.).

Monica Isabel Luna Cabañas, 2023, *Biología*, UNAM

Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España: OmniaScience. 269-312. ISBN: 978-84-944673-7-0

Martínez-Tlahuel, J. (2007). Cáncer de mama. Cuernavaca, México: NLS. Boletín informativo editado por el Instituto Nacional de Salud Pública y la Secretaría de Salud.

Matsuo, T., Sadzuka, Y. (2019). *In Vitro* Anticancer Activities of B6 Vitamers: A Mini-review. *Anticancer Research*, 39(7), 3429-3432. DOI: 10.21873/anticancer.13488.

Minamino, M., Oka, T., Kanouchi, H. (2015). Growth suppression and cell death by pyridoxal is dependent on p53 in the human breast cancer cell line MCF-7. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 79(1), 124-9. DOI: 10.1080/09168451.2014.952618.

McCall, K. (2010). Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(6), 882-8. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.09.002.

Melis, C. (2012). Formación de bases de schiff de análogos de aminofosfolípidos con compuestos glicantes y efecto competitivo de vitámeros B6. Palma de Mallorca: Universitat de les Illes Balears.

Meza-Junco, J., Montano-Loza, A., Aguayo-Gonzalez, A. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de investigación clínica* 58(1), 56-70. ISSN 2564-8896.

Narod, S., Rodríguez, A. (2011). Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2. *Salud Pública de México*, 53(5), 420-429. ISSN 0036-3634

Nepali, K., Lee, H., Liou, J. (2019). Nitro-Group-Containing Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(6), 2851-2893. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00147

Niu, L., Li, Y., Li, Q. (2014). Medicinal properties of organotin compounds and their limitations caused by toxicity. *Inorganica Chimica Acta*, 423, 2-31. DOI:10.1016/j.ica.2014.05.007

Pandey, S., Garg, P., Lim, K., Kim, J., Choung, Y., Choi, Y., Choung, P., Cho, C., Chung, J. (2013). The efficiency of membrane transport of vitamin B6 coupled to poly (ester amine) gene transporter and transfection in cancer cells, *Biomaterials*, 34 (14), 3716-3728, ISSN 0142-9612

Piccolo, M. (2023). Metal-Based Complexes in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7289. DOI: 10.3390/ijms24087289.

Ramírez-Agudelo, M., Rojas-López, M. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*, 23(2), 166-177. ISSN 0121-0793.

Ramírez-Hernández, J., Bonete, M., Martínez-Espinosa, R. (2015). Proposal of new trace elements classification to be used in nutrition, oligotherapy and other therapeutics strategies. *Nutrición Hospitalaria*, 31(3), 1020-1033. DOI: 10.3305/nh.2015.31.3.8325

Sánchez, C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica las Condes*, 24(4), 553-562. DOI: 10.1016/S0716-8640(13)70659-X

Sirajuddin, M., Ali, S. (2016). Organotin (IV) Carboxylates as Promising Potential Drug Candidates in the

Field of Cancer Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design*, 22(44), 6665-6681. DOI: 10.2174/1381612822666160906143249.

Stach, K., Stach, W., Augoff, K. (2021), Vitamin B6 in Health and Disease. *Nutrients*, 13(9), 3229. DOI: 10.3390/nu13093229.

Sun, Y., Liu, Y., Ma, X., Hu, H. (2021). The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* 28, 22(13), 6923. DOI: 10.3390/ijms22136923.

Syed-Annuar, S., Kamaludin, N., Awang, N., Chan, K. (2021). Cellular Basis of Organotin (IV) Derivatives as Anticancer Metallo drugs: A Review. *Frontiers in Chemistry*, 9:657599. DOI: 10.3389/fchem.2021.657599.

Tabatabayi, Z., Homayouni-Tabrizi, M., Neamati, A., Beyramabadi, S. (2020). Mn (II) complex of a vitamin B6 Schiff base as an exclusive apoptosis inducer in human MCF7 and HepG2 cancer cells: Synthesis, characterization, and biological studies. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(3), 2677-2689. DOI: 10.1002/jcb.29488.

Tsao, N, Schärer, O, Mosammaparast, N. (2021). The complexity and regulation of repair of alkylation damage to nucleic acids. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 56(2), 125-136. DOI: 10.1080/10409238.2020.1869173.

Ueland, P., Ulvik, A., Rios-Avila, L., Midttun, Ø., Gregory, J. (2015). Direct and Functional Biomarkers of Vitamin B6 Status. *Annual Review of Nutrition*, 35, 33-70. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071714-034330.

Yan, G. (2020). Múltiples modalidades de muerte celular y sus características clave. *Revista de la Academia Mundial de Ciencias*, 2, 39-48. DOI: 10.3892/wasj.2020.40.

Zohreh, S. Tabatabayi, M. (2020). Mn (II) complex of a vitamin B6 Schiff base as an exclusive apoptosis inducer in human MCF7 and HepG2 cancer cells: Synthesis, characterization, and biological studies. *Journal of Cellular Biochemistry*, (3)121, 2677-2689. DOI: 10.1002/jcb.29488