

69



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
ANTINEOPLASICA IN VITRO DE COMPUESTOS
DE COORDINACION DE COBRE MEDIANTE EL
EMPLEO DE LINEAS HUMANAS DE CARCINOMA
CERVICO UTERINO.

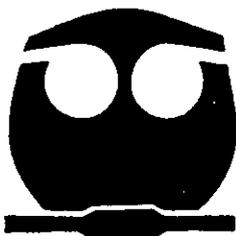
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ADRIANA MARQUEZ QUIÑONES



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2000.

280267



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

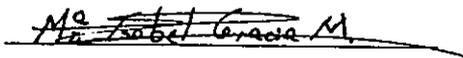
JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dra. Lena Ruiz Azuara
Vocal	M. en C. Inés Fuentes Noriega
Secretario	M. en C. Isabel Gracia Mora
1er. Suplente	M. en C. Francisco Hernández Luis
2º. Suplente	Q.F.B. Celedonio Gómez Ruiz

Sitio donde se desarrollo el tema: Unidad de Experimentación Animal, conjunto "E", Facultad de Química, UNAM.
En conjunción con el Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No. 22, México, D.F.

Nombre completo y firma del asesor del tema:

M. en C. María Isabel Gracia Mora


~~M. en C. María Isabel Gracia Mora~~

Nombre completo y firma del supervisor técnico:

Q.F.B. Celedonio Gómez Ruiz



Nombre completo y firma del sustentante:

Adriana Márquez Quiñones



A MI MADRE:

Por su apoyo y por que gracias a ella he llegado a donde estoy.

A MI ABUELO LUIS:

Por su cariño y amor en todo momento.

A MIS HERMANOS (CECY Y RAFA):

Por compartir conmigo su forma de ser y ver la vida.

A MIS ABUELAS:

Por su gran ejemplo de vida.

EN MEMORIA DE RAFAEL Y JOSE LUIS QUIÑONES:

Por enseñarme que con alegría se puede todo.

A MIS GRANDES AMIGOS VERO Y MARCOS:

Por estar ahí cuando los necesitaba.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES:

A la **Dra. Lena Ruiz**: por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto y apoyarme en la elaboración de esta tesis.

A **Isabel**, por su amistad y apoyo en cada momento de elaboración de mi servicio social y tesis.

A **Celedonio**, por su asesoría y paciencia.

A **Laura Romero**, por su gran ayuda y amistad en cada instante de mi carrera.

A **Lucía, Hector, Mabel, Álvaro, Marisol, Fabiola** y a todo el grupo de trabajo de la UNEXA, por hacer ameno y caluroso mi estancia en la elaboración de este trabajo.

Al **Dr. Guillermo Alfaro** y al grupo de investigación del INCAN, por dejarnos hacer uso de sus instalaciones y por su asesoría en la elaboración de esta tesis.

A mis amigos generación 95, **Luis, Iván, Sylvia, Andrea, Paula, Paulina, David, Julio, Sergio, Bella, Che**, por hacer de la carrera de Q.F.B una carrera muy divertida e interesante.

A mis amiguitos de la generación 97, **Miguel, Victor, Manuel, Arturo, Sergio, Roberto, Idania, Erika**, por enseñarme que no solo el estudio hace a una persona también la amistad y la alegría.

Gracias a todos de corazón

Adriana.

INDICE GENERAL

	PAGINA
CAPÍTULO 1	
RESUMEN	1
CAPÍTULO 2	
INTRODUCCIÓN	4
2.1 Generalidades del Cáncer	5
2.1.1 Clasificación del Cáncer	6
2.1.2 Metástasis	9
2.1.3 Factores que originan el Cáncer	10
2.2 Epidemiología del cáncer en México	12
2.3 Carcinoma Cérvico-Uterino CaCU	13
2.3.1 Generalidades	13
2.3.2 Historia natural y rutas de esparcimiento	14
2.3.3 Características patológicas	15
2.3.4 Estadío clínico	16
2.3.4.1 Estadío I	16
2.3.4.2 Estadío II	17
2.3.4.3 Estadío III	17
2.3.4.4 Estadío IV	18
2.4 Tratamiento del cáncer	18
2.4.1 Quimioterapia del cáncer	19
2.4.2 Mecanismo de acción del cisplatino.	20
2.5 Casiopeínas®	21

CAPÍTULO 3	
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	27
3.1 Hipótesis	28
3.2 Objetivos	29
3.2.1 Objetivos Generales	29
3.2.2 Objetivos Particulares	29
 CAPÍTULO 4	
MATERIAL Y MÉTODOS	30
4.1 Cultivo de líneas celulares tumorales <i>in vitro</i>	31
4.1.1 Generalidades de cada línea celular utilizada	32
4.2 Reactivos y materiales	34
4.2.1 Materiales	34
4.2.2 Equipo	34
4.2.3 Reactivos	35
4.3 Fármacos	37
4.4 Metodología	38
4.4.1 Descongelamiento de células	38
4.4.2 Obtención del cultivo de abastecimiento (stock)	
a confluencia	38
4.4.3 Tripsinización	39
4.4.4 Cuantificación de células	39
4.4.5 Ensayo de inhibición de la proliferación	40
4.4.6 Tinción con sulforrodamina-B y lectura	40
4.4.7 Determinación de la concentración inhibitoria	
media (CI50) inducida por los fármacos	41

CAPÍTULO 5	
RESULTADOS	42
5.1 Efecto de los fármacos sobre las diferentes líneas tumorales de CaCU	43
5.2 Concentraciones inhibitorias media (CI50) calculadas para cada línea tumoral	50
CAPÍTULO 6	
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	52
6.1 Discusión de resultados	53
6.2 Conclusiones	55
CAPÍTULO 7	
ANEXOS	56
A. Preparación de soluciones	57
B. Datos estadísticos obtenidos por PROBIT	60
CAPÍTULO 8	
BIBLIOGRAFÍA	65

RELACIÓN DE TABLAS

		PÁGINA
TABLA 1	Diferencias entre tumor benigno y maligno	7
TABLA 2	Clasificación de los tumores	8
TABLA 3	Nomenclatura de las Casiopeínas®	25
TABLA 4	Línea celular HeLa	32
TABLA 5	Línea celular SiHa	32
TABLA 6	Línea celular Ca Ski	33
TABLA 7	Línea celular C33	34
TABLA 8	Relación de fármacos utilizados	37
TABLA 9	Efecto de los fármacos sobre la línea tumoral HeLa	43
TABLA 10	Efecto de los fármacos sobre la línea tumoral SiHa	43
TABLA 11	Efecto de los fármacos sobre la línea tumoral C33	43
TABLA 12	Efecto de los fármacos sobre la línea tumoral CaLo	44
TABLA 13	Efecto de los fármacos sobre la línea tumora Ca Ski	44
TABLA 14	Concentraciones inhibitorias medias para HeLa	50
TABLA 15	Concentraciones inhibitorias medias para SiHa	50
TABLA 16	Concentraciones inhibitorias medias para C33	50
TABLA 17	Concentraciones inhibitorias medias para CaLo	51
TABLA 18	Concentraciones inhibitorias medias para Ca Ski	51

RELACIÓN DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1 Distribución del cáncer según el sexo	12
FIGURA 2 Distribución del cáncer según la topografía	13
FIGURA 3 Estructura del Cis-dicloro-diaminoplatino (II)	20

RELACIÓN DE CUADROS

	PÁGINA
CUADRO 1 Factores exógenos que originan el cáncer	11
CUADRO 2 Diagrama de Flujo para la evaluación de un compuesto antineoplásico	26

CAPITULO

I

RESUMEN

CAPITULO 1

RESUMEN

El cáncer o neoplasias malignas, constituyen un grupo de enfermedades relacionadas que se caracterizan por una multiplicación desordenada de células anormales y poco diferenciadas que no son susceptibles a las señales de control de las demás células del organismo.

Este crecimiento incontrolado sin restricciones como la diferenciación, limitación del órgano, etc., permite que las células invadan tejidos adyacentes y frecuentemente sean capaces de inducir metástasis, lo cual provoca, en la mayoría de los casos, la muerte del paciente con cáncer.

El cáncer es la segunda causa de muerte en México, después de las enfermedades del corazón, es responsable del 10 por ciento de las defunciones por patologías. Entre 1985 y 1994 se registraron 405 mil 841 muertes por cáncer; un análisis de las tendencias de este mal crónico degenerativo, con frecuencia incurable, reporta que la mayor incidencia afecta a las mujeres siendo las más comunes, cáncer cérvico-uterino y de glándulas mamarias (1).

Dentro de los tratamientos que se utilizan para combatir el cáncer se encuentra la quimioterapia, siendo efectiva sólo en algunos casos, ya que se ha encontrado que muchos de los tumores son o se vuelven refractarios a los fármacos ya existentes, o que éstos son muy tóxicos al organismo. Todo ello hace indispensable la búsqueda de fármacos que actúen de manera selectiva a las células cancerosas, esto es, que no dañen a otras células del organismo, y que además tengan un espectro de actividad más amplio.

En México se justifica aún más esta búsqueda debido a que la mayoría de los fármacos antineoplásicos son de origen extranjero, por lo que sus precios son más elevados y por lo tanto menos accesibles a la población, además de que son muy pocos los

fármacos introducidos para el manejo de tumores sólidos. En el caso del cáncer cérvico-uterino, en sus estadios clínicos más avanzados no existen fármacos que ataquen el crecimiento del tumor en más del 38% en terapia simple, y cuando se utiliza terapia combinada se llega a tener un 77% de respuesta utilizando cuatro fármacos en la terapia (mitomicina, vincristina, bleomicina y cisplatino), lo cual implica mucho mayor toxicidad y por lo tanto menor calidad de vida (2).

En la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz Azuara, se han sintetizado fármacos con potencial antineoplásico a los que se les ha denominado Casiopeínas®. Algunas de ellas han demostrado tener actividad tanto *in vivo* como *in vitro* en algunos ensayos, por lo que se decidió continuar con estas pruebas en el cernimiento de acuerdo a lo recomendado por el "National Cancer Institute" (NCI) para el desarrollo y selección de posibles fármacos antineoplásicos (3).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto antineoplásico de cuatro de estos compuestos (Casiopeínas®), sobre líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino *in vitro*, utilizando el ensayo de inhibición de la proliferación celular inducida por los compuestos a prueba, mediante un ensayo colorimétrico con sulforrodamina-B.

De esta forma se pretende evaluar a cada una de las Casiopeínas® sobre las diferentes líneas celulares para determinar si existe una actividad antitumoral y a la vez evaluar si hay algún tipo de correlación estructura-actividad.

CAPITULO

2

INTRODUCCIÓN

CAPITULO 2. INTRODUCCIÓN.

2.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER

El cáncer o neoplasia maligna, constituyen un grupo de enfermedades relacionadas que se caracterizan por una multiplicación desordenada de células anormales que no son susceptibles a las señales de control de las demás células normales del organismo (4,5).

En cualquier parte del cuerpo pueden originarse grupos de células que proliferen de forma anormal. De ellos, los que no pueden invadir los tejidos vecinos y permanecen estrictamente localizados reciben el nombre de tumores benignos; los que se diseminan desde el lugar de origen y pueden alcanzar el torrente sanguíneo y el sistema linfático (metástasis) reciben el nombre de tumores malignos o cáncer (Tabla 1) (5,6).

Todas las definiciones de cáncer se enfocan en tejidos compuestos por células que se han vuelto independientes en cierto grado de las fuerzas de control del crecimiento normal del huésped. De alguna manera las células cancerígenas se vuelven asociales, esto es que su ambiente incluyendo células vecinas les afectan mínimamente, esto quiere decir que en sí, el cáncer es un problema tanto a nivel de proliferación como a nivel de diferenciación de la célula, ya que las células neoplásicas presentan características de diferenciación errónea o nula, lo que las provee de la capacidad de invadir o metastatizar. (4,7)

El proceso de carcinogénesis es un proceso complejo que transcurre a lo largo del tiempo y a través de por lo menos tres diferentes etapas:

Iniciación: es un daño permanente y transmisible en el DNA de una célula que, si no se repara, se fija como mutación, quedando la célula iniciada. Los agentes iniciadores son por definición compuestos genotóxicos, es decir, compuestos que pueden interactuar con el DNA y dañarlo.

Promoción: en esta etapa ocurre una expansión clonal, que puede ser reversible (hiperplasia) a partir de la célula que se inició. Se requiere de la presencia continua del nivel umbral del agente promotor, que es un compuesto químico, físico o biológico que es necesario para la formación de determinados tumores.

Progresión: es la adquisición por la neoplasia del carácter maligno. Hay aparición secuencial de subpoblaciones cada vez más aberradas genéticamente, lo que les confiere una des-diferenciación o una diferenciación aberrante lo que da la característica de poder escapar, invadir y colonizar o metastatizar a órganos distantes (4,7).

El nivel de acción en el que sucede el fenómeno de la promoción parece ser el de la activación de los mecanismos de transducción de la señal proliferativa, es decir, a nivel de la estimulación de la división celular, y por lo tanto son agentes no mutagénicos ya que no necesariamente tienen un contacto directo con el DNA de la célula afectada (7).

2.1.1 CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER

Los diferentes tipos de cáncer se clasifican principalmente por el órgano en que se han originado y por la clase de células interesadas (Tabla 2). Por ejemplo: los tumores que se originan de tejido mesenquimal son llamados SARCOMAS, las neoplasias originadas de músculo liso se denominan LEIOMIOSARCOMA, tumores malignos de músculo esquelético RABDOMIOSARCOMA (5,6).

Las neoplasias malignas originadas de células epiteliales y derivadas de cualquiera de las tres capas germinales, se llaman CARCINOMAS. Cuando tienen origen de glándulas se denominan ADENOCARCINOMAS. A los carcinomas originados de cualquier epitelio plano estratificado se denomina CARCINOMAS EPIDERMÓIDES (Tabla 2) (6).

De esta forma se cuenta con una gran cantidad de variedades de la enfermedad lo que hace más difícil su control y tratamiento.

TABLA I
DIFERENCIAS ENTRE TUMOR BENIGNO Y MALIGNO

CARACTERÍSTICAS	TUMOR BENIGNO	TUMOR MALIGNO
Estructura y diferenciación	Frecuentemente típica del tejido de origen	Frecuentemente atípica, es decir, poco diferenciado
Modo de Crecimiento	Expansivo, con formación de cápsula	Infiltrativo no encapsulado
Velocidad de crecimiento	Generalmente lento: pocas mitosis normales	Generalmente rápido muchas mitosis anormales
Progresión del crecimiento	Lento y progresivo puede detenerse o regresar	Raramente cesa, casi siempre es rápido y progresivo hasta la muerte
Metástasis	Ausentes	Generalmente presente
Recurrencia después de la extirpación	Rara	Frecuente
Cromatina Nuclear	Normal	Aumentada
Invasión a vasos	No	Frecuente
Divisiones Nucleares	Pocas y la mayoría normales	Muchas divisiones
Cromosomas anormales	Pocos	Muchos

Tabla 1. Diferencias Entre Tumores Benignos y Malignos.

Fuente: (6) JARAMILLO, J. El Cáncer, Fundamentos de Oncología. Vol.1 Ed. de la Universidad de Costa Rica. Costa Rica (1991). pp89

TABLA 2
CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES

TEJIDOS DE ORIGEN	BENIGNO	MALIGNO
1. EPITELIO		
De revestimiento	Papiloma	Carcinoma
Glandular	Adenoma	Adenocarcinoma
Trofoblasto	Mola hidatídica	Coriocarcinoma
2. TEJIDO CONJUNTIVO		
Fibroso	Fibroma	Fibrosarcoma
Adiposo	Lipoma	Liposarcoma
Muscular Liso	Leiomioma	Leiomiomasarcoma
Muscular Estriado	Rabdomioma	Rabdomiosarcoma
Cartilaginoso	Condroma	Condrosarcoma
Óseo	Osteoma	Osteosarcoma
Linfático	Linfangioma	Linfangiosarcoma
Sanguíneo	Hemangioma	Hemangiosarcoma
Linfoideo		Linfoma
Mesotelio (peritoneo, pleura)	Mesotelioma	Mesotelioma maligno
Médula Ósea		Leucemias
Sinovial	Sinoviomias	Sinovioma maligno
3. TEJIDO NERVIOSO		
Nervios	Neuroma	
Vaina Nerviosa	Neurofibromas	
	Neurilemonas	Schawanoma maligno
Células Simpáticas	Ganglioneuromas	Neuroblastomas
Glia	Glioma	Glioma
4. OTROS TEJIDOS		
Células Pigmentadas	Nevo	Melanoma
Médula Suprarrenal	Feocromacitoma	Feocromacitoma
Células Comafines	Carcinoides	Carcinoide maligno
Células APUD	Apudoma	Apudomas malignos
Embriónicos	Quistes dermoides	
	Teratomas	Teratomas malignos
Timo	Timomas	Timoma maligno

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES

Fuente: JARAMILLO, J. El Cáncer, Fundamentos de Oncología. Vol.1 Ed. de la Universidad de Costa Rica. Costa Rica (1991). pp90.

2.1.2 METÁSTASIS

La proliferación incontrolada es un hecho importante en la cascada oncogénica, no sólo aumenta la posibilidad de adquisición de un mayor grado de alteración genética, sino que también es esencial para la expansión de una subclona agresiva de células. Sin embargo el aumento de la proliferación no es suficiente por sí misma para dar origen a la diseminación del tumor a tejidos distantes (metástasis) (6,8).

El comportamiento de las células metastásicas se puede definir como la tendencia a traspasar los límites del comportamiento tisular y a entremezclarse con diferentes tipos celulares (8).

El proceso de metástasis implica una cascada de pasos secuenciales ligados, dentro de los cuales se llevan a cabo múltiples interacciones huésped-tumor. Una célula o grupo de células debe ser capaz de abandonar el tumor primario, invadir el tejido local del huésped, atravesar la membrana basal del tejido al cual pertenecen, entrar en circulación ya sea en los vasos sanguíneos o linfáticos y trasladarse a través de ellos a regiones distantes, atravesar nuevamente los vasos y la nueva membrana basal, extravasarse en el tejido intersticial y parenquimatoso del órgano blanco y proliferar como una clona secundaria en un nuevo órgano, reproduciéndose activamente en él y originando nuevas formaciones tumorales, con células cada vez más autónomas y agresivas (7,8).

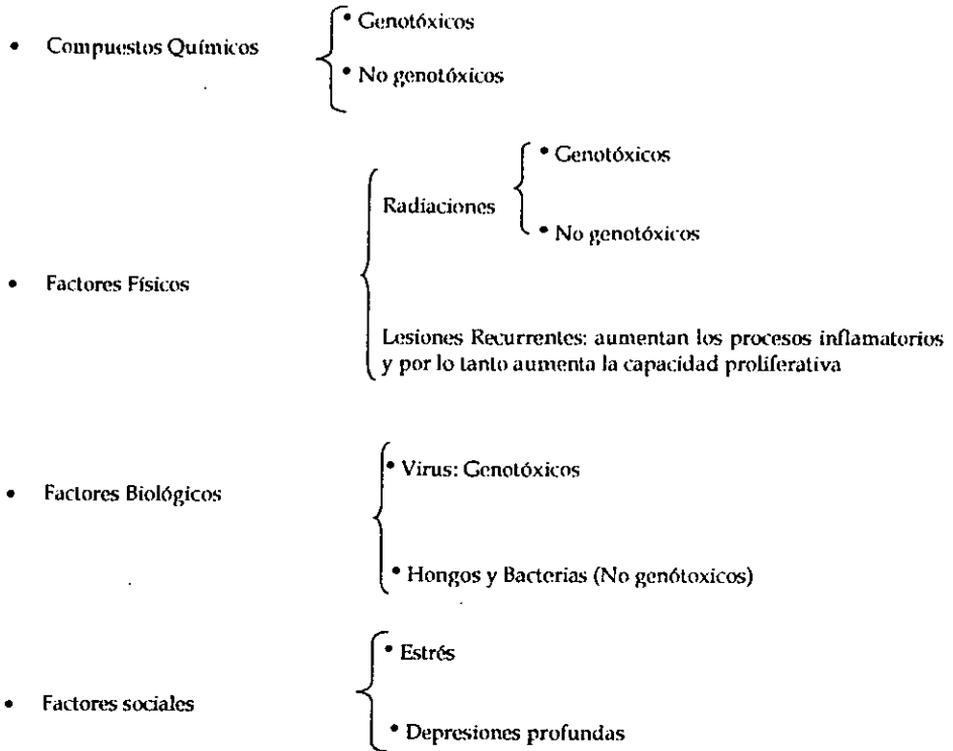
No todos los tumores invasivos tienen rápido crecimiento; algunos tumores crecen lentamente, a pesar de que se sabe que las células malignas suelen tener considerable motilidad. Al parecer, en la invasión de tejido normal por las células malignas hay una activa participación de diversas enzimas hidrolíticas u otras que destruyen el tejido y ayudan a la metástasis (7,8,9).

2.1.3 FACTORES QUE ORIGINAN EL CÁNCER

Los factores que originan el cáncer se dividen en dos grandes grupos, los factores exógenos que constituyen de un 80-90% de los casos y los factores endógenos que forman el 10-20% restante (Cuadro 1).

Los factores exógenos se dividen a su vez en cinco grupos de acuerdo a la naturaleza del compuesto que lo origine y que puede ser genotóxico, es decir que cause un daño al material genético de la célula (DNA) o no genotóxico en el cual su mecanismo de acción es a nivel de factores que estimulan la proliferación celular, y al aumentar la capacidad proliferativa de las células también se aumenta la probabilidad de que ocurran mutaciones en el DNA que deriven en cambios en la proliferación y la diferenciación de la célula.

Cuadro 1. Factores exógenos que originan cáncer.



En el caso de los factores sociales se ha demostrado que causan inmunodepresión lo que deriva en la falta de reconocimiento de las células malignas por el sistema inmunológico y permite su proliferación y propagación.

Los factores endógenos constituyen del 10 al 20% de los casos de cáncer humano y estos pueden ser por mutaciones espontáneas en el DNA generalmente mutaciones puntuales o bien por herencia (7).

En el caso de las mutaciones puntuales estas pueden ser por diferentes causas (7):

- Infidelidad de la DNA polimerasa.
- Depurinación espontánea.
- Daño oxidativo causado por radicales libres generados por diferentes procesos biológicos.
- Elementos móviles (retrovirus endógenos presentes en el 5% de la población).
- Deaminación espontánea de la 5-metil citosina a timina (mutación poco reparable).

2.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN MÉXICO

El cáncer constituye un problema de salud pública. En nuestro país constituyó la segunda causa de muerte en el año de 1995, con 48,222 decesos, el 11.2 % del total de muertes. Durante ese año se reportaron 73,299 casos nuevos de cáncer en México con predominio del sexo femenino (64.7%) (FIGURA 1) (1,9,10).

La distribución por edad de acuerdo al sexo muestra en el sexo masculino el primer lugar en el grupo de 75 años y más con el 20%, seguido por el de 60 a 64 con el 11.8%. En las mujeres también fue el grupo de 75 años y mayores el más elevado con el 11.5% seguido por el grupo de 45 a 49 años con el 11.2% y después el grupo de 40 a 44 años (10.0%) (11).



Figura 1. Distribución del cáncer según el sexo en 1995
Registro Histopatológico de Neoplasias en México (1995)

Los primeros cinco lugares según su topografía fueron: El cuello del útero 21.5%, Glándula Mamaria (fem) 10.6%, Glándula Prostática 5%, Estómago 3.9%, Ganglio Linfático 3.7 %.

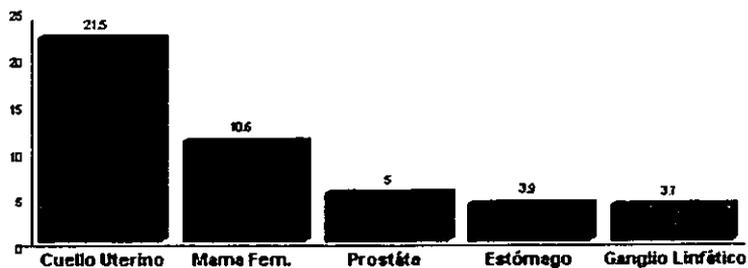


Figura 2. Distribución del cáncer según la topografía en 1995
Registro Histopatológico de Neoplasias en México (1995)

2.3 CARCINOMA CÉRVICO-UTERINO (CaCU).

2.3.1 GENERALIDADES

Los tumores ginecológicos malignos son comunes, de ellos los tumores cérvico-uterinos representan el 6% (11,12). El presente trabajo se enfoca en el efecto de cuatro posibles fármacos antineoplásicos sobre líneas tumorales de carcinoma cérvico-uterino, por lo que es necesario hacer referencia a lo que concierne a este tipo de tumores malignos y a su clasificación.

Como ya se hizo referencia anteriormente el carcinoma es un tipo de cáncer de origen epitelial, capas de células que recubren la superficie del cuerpo y tapizan las diferentes glándulas (Tabla 2), en el caso del CaCU las células malignas se encuentran en el recubrimiento del cuello uterino (14).

El CaCU es una de las principales causas de mortalidad en la mujer. En México es la neoplasia maligna más frecuente causal de 21,554 muertes entre 1990 y 1994. Representa el 22.5% de las neoplasias registradas. La edad más frecuente de presentación es de 35 a 59 años (9, 11).

No se conoce la causa del CaCU pero su desarrollo parece estar relacionado a múltiples agresiones y lesiones sobre el cérvix, estudios han mostrado que esposos de mujeres con CaCU reportan más compañeras sexuales y mayor historia de varias condiciones genitales como condilomas, gonorrea y herpes genital. Además de que hay otros factores que se han relacionado a este padecimiento como son:

- Edad de inicio de actividad sexual.
- Multiparidad.
- Número de parejas sexuales.
- Tabaquismo.
- El Virus del Herpes.
- El Papiloma Virus (HPV), del cual se han asociado 20 serotipos a lesiones anogenitales (15), la gran mayoría de las células infectadas no desarrollan un tumor maligno, lo que indica que por sí sola la infección por HPV no es suficiente para causar cáncer, sino que se requieren además de cofactores como el tabaquismo para que se pueda desarrollar la neoplasia (Am J Med. May 1997).
- El Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV), Maiman reporta que mujeres con HIV y CaCU tienen estadíos más avanzados y grados histológicos más altos. El pronóstico es peor y las muertes se asocian más al cáncer que al SIDA (12,13).

2.3.2 HISTORIA NATURAL Y RUTAS DE ESPARCIMIENTO

En general, el CaCU tiene su origen en la unión escamoso-columnar del canal endocérvico o el portio del cérvix. La lesión está frecuentemente asociada con una historia crónica de cervicitis, displasia severa y carcinoma *in situ* (esta progresión a invasión toma de 10 a 20 años) (14).

El proceso maligno traspasa la membrana basal del epitelio e invade el estroma cervical. Si la lesión es menor a 3 mm sin invasión vascular o proyecciones confluentes, la lesión es clasificada como microinvasiva o superficialmente invasiva, y la probabilidad de metástasis al nodo linfático es aproximadamente del 1%. La invasión puede progresar, pero si el tumor no es gruesamente visible y la profundidad de penetración es menor a 5 mm, el tumor es clasificado como carcinoma invasivo oculto (13).

2.3.3 CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

Más del 90% de los tumores invasivos son del tipo de células escamosas. Aproximadamente el 5% son clasificados como adenocarcinomas y del 1-2% son células claras, tipo mesonéfrico. Mentz y Reagan (12) han dividido al carcinoma de células escamosas en tres tipos:

1. Queratinizante.
2. No queratinizante.
3. Tipo células pequeñas.

El carcinoma epidermoide invasivo está compuesto de núcleos y nidos de células epiteliales, ordenadas al azar y formando arborescencias múltiples de diferentes tamaños y configuraciones. Las células queratinizantes muestran un foco de queratinización con perlas arrinconadas. Las células no queratinizantes tienen tumores estromales con bordes bien demarcados pero sin evidencia de queratinización o perlas arrinconadas. Las células pequeñas tienen un huso o una apariencia redondeada y tumores con bordes poco definidos.

El adenocarcinoma proviene de la mucosa cilíndrica del endocervix o de la secreción mucosa de las glándulas endocervicales (12).

2.3.4 ESTADÍO CLÍNICO

El carcinoma cérvico-uterino tiene sus orígenes en la unión escamoso-columnar ya sea en el canal endocérvico o en el portio del cérvix. La lesión precursora es *displasia* o *carcinoma in situ* la cual subsecuentemente puede convertirse en cáncer invasivo. Este proceso puede ser un poco lento. Al irse haciendo invasivo, el tumor traspasa de la membrana basal e invade el estroma cervical. La extensión de tumor en el cérvix puede manifestarse como ulceración, tumor exofítico, o infiltración extensiva del tejido interior del recto o del ano.

El estadio inicial fue propuesto en 1929 por un subcomité de las Naciones Unidas, la cual fue subsecuentemente revisada en 1937 y 1950. Estas funciones fueron tomadas por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO por sus siglas en inglés), en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional Contra el Cáncer. Los estadios propuestos por esta comisión fueron finalmente revisados en 1971.

Enseguida se describen los criterios utilizados por la FIGO para la clasificación del carcinoma cérvico-uterino. Dicha clasificación debe estar basada en la evaluación clínica (inspección, palpación, colposcopia), examinación del seno, riñones y esqueleto, y biopsias endocervicales. Cuando haya un desacuerdo en el estadio, se debe seleccionar el estadio más cercano para fines estadísticos. Todos los tipos histológicos deben ser incluidos (15).

2.3.4.1 ESTADÍO I

El estadio I es carcinoma estrictamente confinado al cérvix, la extensión al cuerpo uterino debe ser disgregada:

Estadio I-A: Es cáncer invasivo identificado únicamente por microscopía. La invasión está limitada al estroma con un máximo de profundidad de 5 mm y no más ancho de 7 mm (16).

- **Estadio I-A₁:** La invasión del estroma no es mayor de 3 mm de profundidad y no más ancho de 7 mm de diámetro.
- **Estadio I-A₂:** La invasión del estroma es mayor de 3 mm pero no mayor de 5 mm de profundidad y no más ancho de 7 mm de diámetro.

Estadio I-B: Las lesiones clínicas están confinadas en el cérvix o bien las lesiones preclínicas son mayores al estadio I-A

- **Estadio I-B₁:** Las lesiones clínicas no son mayores a 4 cm de tamaño.
- **Estadio I-B₂:** Las lesiones clínicas son mayores a 4 cm de tamaño.

2.3.4.2 ESTADÍO II

El estadio II es carcinoma que se extiende alrededor del cérvix pero no hacia dentro de la pared pélvica. El carcinoma envuelve la vagina, pero no llega al tercio bajo de la misma (16).

Estadio II-A: No hay involucramiento parametrial obvio, el involucramiento es sobre los dos tercios superiores de la vagina.

Estadio II-B: Hay involucramiento parametrial obvio, pero no sobre la pared lateral pélvica.

2.3.4.3 ESTADÍO III

El estadio III es carcinoma que se ha extendido sobre la pared lateral pélvica, en un examen rectal, no hay espacio libre el tumor y la pared pélvica. El tumor envuelve el tercio bajo de la vagina. Todos los casos con hidronefrosis o disfunción renal deben ser incluidos, a menos que se sepa que sean debido a otras causas (16).

Estadio III-A: No hay extensión a la pared pélvica pero hay envolvimiento del tercio bajo de la vagina.

Estadio III-B: Extensión a la pared pélvica, aquí se incluyen los casos en donde exista hidronefrosis o disfunción renal.

2.3.4.4 ESTADÍO IV

El estadio IV es carcinoma que se ha extendido alrededor de la verdadera pelvis o ha envolvido clínicamente la mucosa del recto o del ano.

Estadio IV A: Hay diseminación del tumor a los órganos adyacentes a la pelvis (invasión).

Estadio IV B: Hay diseminación a órganos lejanos a la pelvis (metástasis) (16).

2.4 TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Dentro de los esfuerzos para poder erradicar el cáncer se tiene principalmente a la cirugía, el tratamiento con fármacos (quimioterapia), la radioterapia, y últimamente la inmunoterapia y la genoterapia (aún en estudios) en la mayoría de los casos se utilizan terapias combinadas (17).

No cabe duda de que la quimioterapia es uno de los tratamientos más utilizados ya sea sola o en combinación con otros tratamientos, sobre todo para el caso en que las células malignas hayan alcanzado una metástasis a distancia, en cuyo caso no se puede localizar el tumor por lo que la cirugía y la radioterapia son insuficientes para poder controlar la enfermedad.

2.4.1 QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER

La generación de metástasis en el cáncer hace prácticamente imposible el tratamiento de neoplasias por los métodos locales como son la cirugía y la radioterapia, por lo que son necesarios métodos sistémicos como es el caso de la quimioterapia.

Desde hace 500 años ya existía el concepto del tratamiento del cáncer con fármacos (18), se sabe que con este propósito se empleaban preparaciones de plata, zinc y mercurio, sin embargo, no fue sino hasta 1865 cuando se documentó el uso de fármacos en un tratamiento sistemático en neoplasias malignas cuando Lissauer administraba arseniato de potasio en pacientes con leucemia y observaba efectos positivos. Sin embargo, la quimioterapia del cáncer como tal se sistematizó hasta 80 años después.

El primer fármaco aprobado para ser utilizado contra el cáncer fue la mostaza nitrogenada (1949), a continuación: aminopterina (1952), metotrexano, trietilenemilamina y mercaptopurina (1953), busulfán (1954), clorambucilo (1957), tio-TEPA y ciclofosfamida (1959), vinblastina (1961), fluoroacilo y mostaza uracilo (1962), vincristina (1966), melfalán y actinomicina-D (1964), tioguanina y pipobromano (1966), hidroxiaurea (1967), procarbazona y arabinósido citosina (1969), mitotano, floxuridina y ácido aureólico (1970), bleomicina (1972), mitomicina y doxorubicina (1974), dacarbazina (1975), CCNU (1976), BCNU (1977), L-asparaginasa y cisplatino (1978), daunomicina (1980), Estreptozotocina y oestrámustina (1982), etoposida (1983), interferón alfa-2 y tamoxifen (1987), mitoxantrona, análogo del somatostatino, ifosfamida e inteleucina-2 (1988) (18).

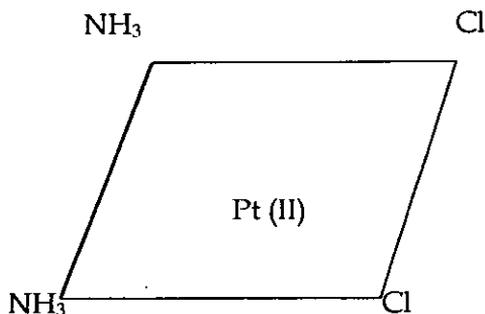
En 1969 Rosenberg (19) reporta la actividad citostática de un compuesto sintético de origen inorgánico que marcó la pauta de una nueva serie de compuestos, este compuesto fue el cis-diamino-dicloro-platino (II), actualmente conocido como Cisplatino.

El cisplatino es uno de los quimioterapéuticos más importantes utilizado en el cáncer de pulmón, de ovario, de células germinales, de cabeza y cuello y de ano. Sin embargo, tiene numerosos efectos secundarios, la mayoría de los cuales se encuentran bien caracterizados. Los efectos secundarios conocidos son principalmente nefrotoxicidad, neurotoxicidad, ototoxicidad, mielosupresión, así como náusea y vómito. Dentro de estos efectos secundarios, la nefrotoxicidad ha recibido mayor atención como el principal factor limitante de dosis (20).

2.4.2 MECANISMO DE ACCIÓN DEL CISPLATINO:

El cisplatino es un complejo inorgánico formado por un átomo de platino (II) rodeado por moléculas de ion cloruro y amonio en la posición *cis* del plano horizontal.

FIGURA 3. Estructura del cis-dicloro-diamino-platino (II)



Tanto la carga neutra como la posición *cis* son necesarias para que el complejo de platino ejerza su efecto antitumoral. En el plasma, donde hay una gran concentración de iones cloruro, se piensa que los iones cloruro del cisplatino se disocian, permitiendo así su entrada al interior de las células. Dentro de la célula, donde la concentración del cloro es baja, el agua desplaza los ligantes cloruro del complejo formando complejos de platino cargados positivamente, los cuales son altamente reactivos y tóxicos (21)

En el caso del carboplatino, que contiene un ligante quelato dicarboxílico en lugar de los cloruros, esta disociación se da en mucho menor grado y su toxicidad disminuye notablemente, con un incremento en el costo.

Los complejos formados actúan inhibiendo la síntesis del DNA, la más importante forma de unión al DNA es con el nitrógeno N7 de los residuos de guanina en el DNA, lo que ocasiona uniones cruzadas (crosslinking) intracadena o intercadena de dos DNA, DNA-proteína, y uniones al RNA mensajero (21).

Además de toda la toxicidad que presenta el cisplatino, existen muchos tumores que son o se vuelven totalmente refractarios a él. En el caso específico del cáncer CaCU estudios con el uso del cisplatino han mostrado que el CaCU de células escamosas es sensible a la quimioterapia, varios regímenes basados en el cisplatino han sido asociados con altas respuestas en pacientes con cáncer avanzado o recurrente. Sin embargo, la quimioterapia en pacientes con CaCU refractario usualmente resulta en una excesiva toxicidad y una corta duración de la respuesta sin esperanza de sobrevida (22).

2.3 CASIOPEÍNAS®

Lo anterior ha llevado al diseño, síntesis y evaluación de nuevos agentes en la búsqueda de compuestos con toxicidad reducida y diferentes propiedades biológicas.

De manera ideal la búsqueda pretende encontrar fármacos que cumplan con las siguientes características:

- a) Ausencia de resistencia-cruzada al cisplatino.
- b) Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el cisplatino no ha demostrado efectos terapéuticos significantes.
- c) Mayor efectividad clínica antitumoral.
- d) Disminución de efectos eméticos y renales.
- e) Sinergismo en terapias combinadas.

En México existe una total dependencia a la industria farmacéutica extranjera, de manera que es necesaria la importación de este tipo de compuestos haciendo que los costos de los mismos sea muy alto, además de la cada vez más creciente necesidad de dichos fármacos, hace indispensable la búsqueda de fármacos que cumplan con las características anteriormente mencionadas para brindar una alternativa de quimioterapia con menor costo, y por lo tanto a mayor alcance de la población.

En 1975, la Dra. Ruiz-Ramírez de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, concibió la idea de diseñar compuestos de coordinación con posible actividad antineoplásica. Dichos compuestos poseen en su esfera de coordinación metales de la primera serie de transición (Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn). A partir de 1980 se inician trabajos de constatación biológica *in vitro* (23, 24), con base en el supuesto de que puedan tener actividad antineoplásica. Esta hipótesis se apoyó en los postulados de Rosenberg (25), que a su vez fueron derivados del conocimiento farmacodinámico del cisplatino en líneas tumorales y que se resumen a los siguientes puntos:

- 1) Estos complejos deben intercambiar rápidamente sólo algunos ligantes en reacciones con moléculas biológicas.
- 2) Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante dentro del organismo.
- 3) Son necesarios dos ligantes *cis* monodentados (o un bidentado) como grupos salientes. Los isómeros *trans* son inactivos.
- 4) Las velocidades de intercambio de estos ligantes se encuentran en un intervalo específico de labilidad.
- 5) Los ligantes no intercambiables en la molécula deben estar fuertemente enlazados.

Los compuestos sintetizados por la Dra. Ruiz-Ramírez se encuentran patentados (26) y reciben el nombre de CASIOPEÍNAS®. Están plenamente caracterizados por análisis elemental, IR, UV-VIS, RPE (en varios casos), conductividad, momento magnético y estructura de rayos X cuando se han obtenido cristales (27).

En la actualidad existen más de 100 compuestos sintetizados (Tabla 3), y dado que algunos han demostrado tener actividad antineoplásica *in vitro* e *in vivo* (28,29) se ha decidido continuar con las pruebas de cernimiento *in vitro* establecidas por el "National Cancer Institute" dentro de su programa "Cancer Chemotherapy National Service Center", en Bethesda, Maryland, EUA, en donde se establece probar los posibles fármacos antineoplásicos frente a líneas tumorales humanas para determinar su eficacia (3, 30).

En el diagrama de flujo se muestra el sistema llevado a cabo por el grupo de investigación para la síntesis y caracterización de las Casiopeínas®, cabe mencionar que el presente trabajo se encuentra ubicado dentro de los trabajos de investigación relacionados con la "Actividad antineoplásica *in vitro- in vivo*" (Cuadro 2).

El mecanismo de acción de las Casiopeínas® todavía no está claro, en estudios recientes se muestra que las Casiopeínas causan un incremento en la frecuencia de reversión, por lo que se concluyó que las casiopeínas actúan sobre el DNA mediante la inducción de recombinación homóloga en células de mamíferos (31).

En el presente trabajo se hacen pruebas de inhibición de la proliferación de líneas tumorales humanas utilizando cuatro Casiopeínas® para determinar la Concentración Inhibitoria cincuenta (CI₅₀), concentración a la cual se obtiene un 50% de sobrevida de la línea tumoral, además de determinar la relación estructura-actividad de las Casiopeínas®, para lo cual se seleccionaron líneas tumorales de carcinoma cérvico-uterino con diferentes estadios de avance (35).

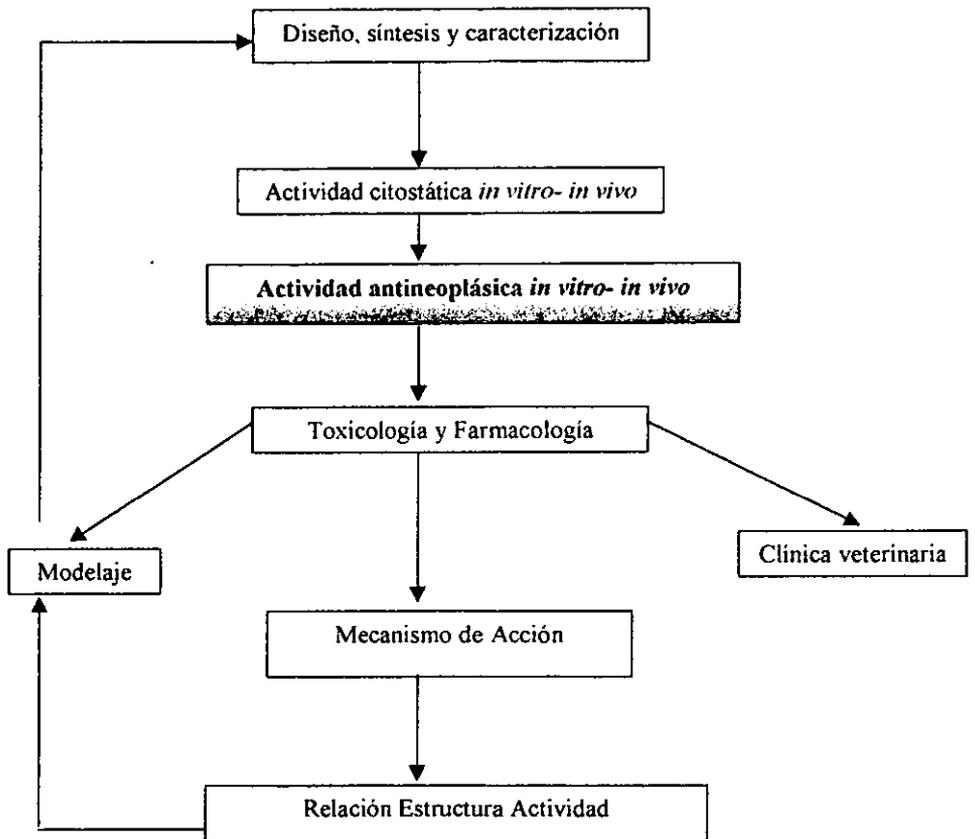
Para llevar a cabo las pruebas de inhibición de la proliferación se utilizan varios métodos para medir, ya sea la densidad celular o bien el por ciento de sobrevivencia con respecto a un control negativo o de 100% de proliferación. Utilizando un ensayo colorimétrico con Surforodamina B (SRB), el cual es un colorante aniónico de tipo aminoxanteno rosa brillante con dos grupos sulfónicos, es un colorante de proteínas el cual bajo condiciones medianamente ácidas se une a los residuos de aminoácidos básicos en las células fijas con ácido tricloroacético (TCA) para proveer un índice sensible de la proteína celular contenida de manera que sea lineal sobre el intervalo de densidad celular al menos de dos órdenes de magnitud (32, 33,34)

TABLA 3

NOMENCLATURA DE LAS CASIOPEINAS.

Cu	N-O	Pept	O-O
4,7-df- fen	CASIOPEINA-I	CASIOPEINA-I	CASIOPEINA-III
4,7 dm- fen/ fen	CASIOPEINA-II	CASIOPEINA-II	CASIOPEINA-III
5R-fen	CASIOPEINA-V	CASIOPEINA-V	CASIOPEINA-III
3,4,7,8-tm-fen,	CASIOPEINA-	CASIOPEINA-VII	CASIOPEINA-III
2,9-dm-4,7-df-fen	VII		
5,6-dm-fen	CASIOPEINA-VI	CASIOPEINA-VI	CASIOPEINA-III
4,4'-dm-bipi/ bipi	CASIOPEINA-IV	CASIOPEINA-IV	CASIOPEINA-III

CUADRO 2. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA EVALUACIÓN DE UN COMPUESTO ANTINEOPLÁSICO.



CAPITULO

3

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPOTESIS.

Las Casiopetinas® serán capaces de inhibir la proliferación celular en al menos una de las líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino a prueba en una magnitud igual o mayor a la del fármaco control utilizado. El método de tinción con SRB será lo suficientemente sensible para detectar diferencias de selectividad y grado de actividad de las Casiopetinas® y del fármaco control para poder determinar una relación estructura-actividad cualitativa.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVOS GENERALES:

- Determinar la actividad antineoplásica de cuatro Casiopeínas® sobre líneas tumorales humanas de carcinoma cérvico-uterino, obteniendo así datos útiles para establecer una relación estructura-actividad cualitativa entre los fármacos a prueba.

3.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Establecer un método sencillo y confiable para la determinación *in vitro* de la citotoxicidad inducida por fármacos.
- Determinar la magnitud de actividad de las Casiopeínas® mediante el cálculo de la Concentración Inhibitoria cincuenta (CI50) para cada fármaco sobre cada línea celular a prueba.
- Determinar la selectividad que presenta cada Casiopeína® sobre las líneas tumorales de carcinoma cérvico-uterino a prueba.
- Aportar datos para el cernimiento de los fármacos denominados Casiopeínas® y continuar así con la investigación preclínica de los mismos.

CAPITULO

4

MATERIAL Y METODOS

CAPITULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 Cultivo de líneas celulares tumorales *in vitro*

Las células que se encuentran dentro de un organismo pueden crecer debido a que reciben todos los nutrientes necesarios para su desarrollo. Las células tumorales pueden crecer *in vitro* empleando un medio de cultivo que contenga todos los elementos necesarios para su crecimiento, como son: fuente de carbono, fuente de nitrógeno y cofactores, aminoácidos esenciales y vitaminas, así como oligoelementos y factores de crecimiento que aporta el suero fetal bovino. Además existen células que requieren de ciertos factores especiales que deben ser adicionados al medio para el crecimiento adecuado.

De acuerdo a su procedencia y al tipo de subcultivo se clasifican en:

Cultivo primario: se obtiene directamente del tejido animal; está constituido por células bien diferenciadas cuya permanencia en cultivo es corta.

Cultivo secundario: se obtiene a partir de un cultivo primario, se comporta de la misma forma que éste.

Cepa celular: es un cultivo celular bien caracterizado. Consta básicamente de tres fases: inicio, reproducción (división celular) y muerte.

Línea celular: se refiere a una estirpe celular, que se divide aceleradamente, y que muestra un tiempo de vida indefinido, es decir, que es inmortal bajo condiciones de cultivo establecidas.

En el presente trabajo se evaluaron cinco líneas tumorales humanas de Carcinoma cérvico-uterino:

- HeLa
- Siha
- Caski
- C33
- CaLo

Con el objetivo poder determinar la actividad antineoplásica de cuatro Casiopéinas.

4.1.1 Generalidades de cada línea celular utilizada (35)

LINEA CELULAR HeLa	
Número de ATCC	CCL-2
Organismo	<i>Homo sapiens</i> (Humano)
Designación	HeLa
Depositario	W.F. Scherer
Tejido	Adenocarcinoma del cérvix, queratinizante
Morfología	Epitelial
Comentarios	Las células son positivas para queratina por tinción de inmunoperoxidasa. Se ha reportado que contienen secuencias de papiloma virus 18 (HPV18).
Edad del paciente	31 años
Etnicidad	Negra
Género	Femenino
Propiedades de crecimiento	Adherente
Estado clínico	IV-A

LINEA CELULAR SiHa	
Número de ATCC	HTB-35
Organismo	<i>Homo sapiens</i> (Humano)
Designación	SiHa
Depositario	Y. Ito
Tejido	Carcinoma de células escamosas, de cérvix
Morfología	Epitelial
Comentarios	Esta línea fue establecida a partir de fragmentos de una muestra de tejido primario obtenida después de cirugía a una paciente japonesa. Se reporta que contiene genoma de papiloma virus tipo 16 (HPV16) en una o dos copias por célula.
Edad del paciente	55 años
Etnicidad	Oriental
Género	Femenino
Propiedades de crecimiento	Adherente
Estado clínico	IIIB

LINEA CELULAR Ca Ski	
Número de ATCC	CRL-1550
Organismo	<i>Homo sapiens</i> (Humano)
Designación	Ca Ski
Depositario	R.A. Pattillo
Tejido	Carcinoma epidermoide, cervix; del sitio metastásico: Cervix
Morfología	Epitelial
Comentarios	Esta línea fue establecida a partir de células de una metástasis en la cavidad pequeña del mesenterio. Se ha reportado que contiene integrado el genoma del papilomavirus tipo 16 (HPV-16), en alrededor de 600 copias por célula, así como secuencias relacionadas al papilomavirus 18 (HPV-18)
Edad del paciente	40 años
Etnicidad	Caucásico
Género	Femenino
Propiedades de crecimiento	Adherente
Estado clínico	IIB

LINEA CELULAR C-33	
Número de ATCC	HTB-31
Organismo	<i>Homo sapiens</i> (Humano)
Designación	C-33
Depositario	N. Auersperg
Tejido	Carcinoma, cervix
Morfología	Epitelial
Comentarios	Esta línea es derivada de biopsias de cáncer cervico-uterino. La línea celular es negativa para papiloma virus DNA y RNA, se ha observado inestabilidad carilógica (cariotipo) con los pases continuos.
Edad del paciente	66 años
Etnicidad	Caucásico
Género	Femenino
Propiedades de crecimiento	Adherente
Estado clínico	IIIA

4.2 REACTIVOS Y MATERIALES:

4.2.1 MATERIALES

- Matraces de cultivo
- Microplacas de 96 pozos
- Pipetas serológicas desechables estériles
- Tubos de centrifuga desechables estériles (15mL)
- Criotubos
- Filtro μ star LB 0.22 μ m, no pirogénico
- Pipetas Pasteur de Vidrio
- Matraces kitasato
- Matraces volumétricos
- Frascos de vidrio (Contenedores para reactivos)
- Hematocitómetro (Cámara de Newbauer)

4.2.2 EQUIPO

- Campana de flujo laminar
- Microscópio invertido
- Microscopio óptico
- Lector de microplacas
- Pipetor automático
- Centrifuga
- Baño a 37°C
- Incubadora a 37 \pm 2°C y 5% de CO₂
- Refrigerador a 4°C
- Termómetro
- Autoclave
- Bomba de vacío
- Tanque de nitrógeno líquido
- Balanza analítica

4.2.3 REACTIVOS

MEDIOS Y REACTIVOS PARA EL CULTIVO DE LAS CÉLULAS

Medio D-MEM

Medio RPMI

Suero fetal bovino

Antibiótico-antimitótico: Penicilina G sódica.

Sulfato de estreptomycinina y anfotericina B

REACTIVOS PARA EL LAVADO DE LAS CÉLULAS EN LA CAJA DE CULTIVO (PBS)

Cloruro de sodio

Fosfato monobásico de potasio

Fosfato dibásico de sodio

Cloruro de potasio

REACTIVOS PARA DESPRENDER LAS CÉLULAS DE LA CAJA DE CULTIVO

PBS-EDTA

Cloruro de sodio

Fosfato monobásico de potasio

Fosfato dibásico de sodio

Cloruro de potasio

EDTA (sal disódica dihidratada)

TRIPSINA

MEDIO PARA EL CONGELAMIENTO DE LAS CÉLULAS

Suero fetal bovino

Dimetilsulfóxido

Nitrógeno líquido

REACTIVOS PARA LA TINCIÓN DE LAS CÉLULAS

Sulforrodamina-B

Tris (hidroximetil)aminometano (Tris-base)

Acido acético

4.3 FÁRMACOS

Se eligieron las siguientes Casiopeínas® con el propósito de observar el efecto estructura actividad de cada una de ellas, además se escogió un fármaco control comúnmente utilizado en la terapia contra el cáncer cérvico-uterino, el cisplatino, para evaluar las diferencias entre la actividad de éste contra la actividad de cada una de las Casiopeínas® en cada línea celular.

Fármaco	Nombre Común
[Cu(4,7-difenil-1,10 fenantrolina)(serina)]NO ₃	Casiopeína I-serina
[Cu(4,7-dimetil-1,10 fenantrolina)(serina)]NO ₃	Casiopeína II-serina
[Cu(5-nitro-1,10-fenantrolina)(glicina)]NO ₃	Casiopeína 5-nitro glicina
[Cu(5-nitro1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO ₃	Casiopeína 5-nitro acac
Cis-diamino-dicloro platino	Cisplatino

4.4 METODOLOGÍA

4.4.1 DESCONGELAMIENTO DE LAS CÉLULAS

Las células se encuentran originalmente en los criotubos, para proceder al descongelamiento de las células, se debe tener la campana de flujo laminar estabilizada, encendida al menos por 30 minutos antes de iniciar la sesión de trabajo y tener un baño de agua a 37°C, se saca el criotubo del tanque con Nitrógeno líquido y se introduce cuidadosamente al baño, en la campana de flujo laminar se prepara un tubo con 10 ml de medio D-MEM (tanto el medio como el tubo deben de estar estériles), en cuanto se observa el descongelamiento, se pasa la suspensión celular al tubo ya preparado y se centrifuga durante 10 minutos a 2000 r.p.m., el sobrenadante se desecha y el paquete celular se vuelve a resuspender en medio para un lavado, se centrifuga nuevamente y se elimina el sobrenadante, el paquete celular se resuspende en una pequeña cantidad de medio de cultivo y se procede a la siembra en las cajas de cultivo.

4.4.2 OBTENCIÓN DEL CULTIVO DE ABASTECIMIENTO (STOCK) A CONFLUENCIA

Las células después de haber sido lavadas se colocan en las cajas de cultivo de 25 cm², con 5 ml de medio de cultivo adicionado en 10% de suero fetal bovino (SFB), (4.5 ml de medio D-MEM y 0.5 ml de SFB), este cultivo se incuba a 37°C +/- 2°C y 5% de CO₂. Se debe revisar diariamente el cultivo para estimar el porcentaje de confluencia, si aún no se ha alcanzado al menos el 70%, se debe cambiar el medio de cultivo cada 48 horas.

Si el medio de cultivo vira a color amarillo significa que se ha acidificado el medio y puede ser indicativo de que el cultivo ha llegado a confluencia, si además se observa turbidez entonces es indicativo de contaminación microbiana.

4.4.3 TRIPSINIZACIÓN

Una vez que se obtiene el cultivo stock a confluencia se aspira el medio de cultivo de la caja, se lava con 5 ml de PBS estéril que después también será aspirado, posteriormente se adicionan 3 ml de PBS-EDTA y 2 ml de la solución de Tripsina (ver anexo A), se agita hasta que, al microscopio se observen las células desprendidas de la superficie y separadas individualmente. Se detiene la reacción de tripsinización adicionando 5 ml de PBS-Albúmina, ésta suspensión se coloca en un tubo de centrifuga estéril y se procede a centrifugar a 1000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se desecha y el paquete celular se resuspende en 1 ml de medio de cultivo.

4.4.4 CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS

El uso de la cámara de Neubauer y la cuantificación de la viabilidad con azul tripano ha sido muy utilizada y recomendada por su sencillez, además de dar muy buenos resultados (36).

Se debe limpiar cuidadosamente la superficie del hematocitómetro con una solución de isopropanol al 70% y se deja secar.

Por separado en un tubo Eppendorf se colocan 20 μ l de la suspensión de células y 80 μ l de solución de azul tripano, se mezcla perfectamente y se transfiere cuidadosamente a las dos secciones de la cámara. Se coloca el Hematocitómetro en el microscopio óptico utilizando el objetivo de 10X, y se procede a contar el número de células, teñidas y teñidas por mm^2 , para que el conteo sea más preciso se recomienda que la cuenta sea entre 100 y 500 células por mm^2 , la cuenta se repite en las otras secciones y después se hacen los cálculos correspondientes a la viabilidad y a el número de células por ml de suspensión.

$$C = \bar{N} \cdot 10^4$$

Donde:

C= Células por mililitro

\bar{N} = Promedio de células contadas

10^4 = Factor de conversión de la cámara.

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{(\text{Tot} - \text{Teñ})}{\text{Tot}} \times 100$$

Donde:

Tot= Total de células contadas

Teñ= Células teñidas

4.4.5 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN (32,33,34)

A partir del cultivo Stock a confluencia obtenido del pase correspondiente para cada línea celular, se prepara una dilución celular de 10^4 células /ml del cual se agregará un volumen de 20 μ l a cada pozo de la microplaca para tener 2×10^4 /pozo. En los pozos donde se colocan las células ya debe haber 100 μ l de medio adicionado con SFB. En seguida se incuban a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas para que se recuperen de la tripsinización. Al término de las 24 horas se aspira el medio y se adicionan 90 μ l de medio con SFB y 10 μ l de cada una de las concentraciones de fármacos (Casiopocinas® y Cisplatino). los fármacos se agregan inmediatamente después de preparadas las disoluciones para evitar la descomposición de los compuestos, y se incuban por 24 horas. Después se aspira el medio y se fijan las células con 200 μ l de ácido tricloroacético al 10% durante una hora a 4°C. Se lavan 5 veces con agua y se dejan secar a temperatura ambiente. De aquí pasan a la tinción.

4.4.6 TINCIÓN CON SULFORRODAMINA-B Y LECTURA (32)

Se adicionan 100 μ l de la solución de sulforrodanina-B al 4% (Ver anexo A) a cada uno de los pozos con células, y se dejan en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavan 4 veces con ácido acético al 1%, cuidando aspirar completamente el ácido en cada lavado. Se dejan secar a temperatura ambiente, el colorante que ha sido incorporado por las células se solubiliza con 100 μ l de tris base 10 mM (pH 10.5) durante 5 minutos y con agitación mecánica suave. Finalmente el colorante celular se lee en un lector de microplacas a 564 nm.

4.4.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA (CI50) INDUCIDA POR LOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

Se determina en cada línea y fármaco la capacidad para inducir el 50% de inhibición de la capacidad proliferativa. Se considerará la proliferación celular máxima (100%) de los cultivos control. Se utiliza el programa Probit (Log Probit Analysis by Maximum Likelihood) donado por los laboratorios Novartis, para la determinación de la Concentración Inhibitoria media (CI50).

CAPITULO

5

RESULTADOS

5.1 EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LAS DIFERENTES LÍNEAS TUMORALES DE CARCINOMA CÉRVICO-UTERINO.

5.1.1 EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA LÍNEA TUMORAL HeLa.

POR CIENTO DE SOBREVIVENCIA					
CONCENTRACION µg/ml	CASIOPEÍNA I-ser	CASIOPEÍNA II-ser	CASIOPEÍNA 5 nitro (acac)	Casiopeína 5 nitro (gli)	CISPLATINO
0.01	97.45	90.46	100	90.39	89.46
0.1	95.31	97.07	100	73.34	83.34
1.0	66.33	71.06	82.82	59.73	80
10.0	8.32	10.66	51.23	25.24	76.16

5.1.2 EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA LÍNEA TUMORAL SiHa

POR CIENTO DE SOBREVIVENCIA					
CONCENTRACION µg/ml	I-ser	CASIOPEÍNA CASIOPEÍNA II-ser	CASIOPEÍNA 5 nitro (acac)	Casiopeína 5 nitro (gli)	CISPLATINO
0.01	100	100	100	97.34	86.96
0.1	69.10	71.36	93.10	96.16	89.02
1.0	20.41	28.93	69.69	82.57	65.45
10.0	18.84	33.10	24.93	38.4	65

5.1.3 EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA LÍNEA TUMORAL C33

POR CIENTO DE SOBREVIVENCIA					
CONCENTRACION µg/ml	CASIOPEÍNA I-ser	CASIOPEÍNA II-ser	CASIOPEÍNA 5 nitro (acac)	Casiopeína 5 nitro (gli)	CISPLATINO
0.01	100	99.28	100	100	96.23
0.1	74.87	86.91	90.85	100	100
1.0	32.55	68.75	80.65	76.33	92.94
10.0	20.28	15.89	20.05	20.66	46.85

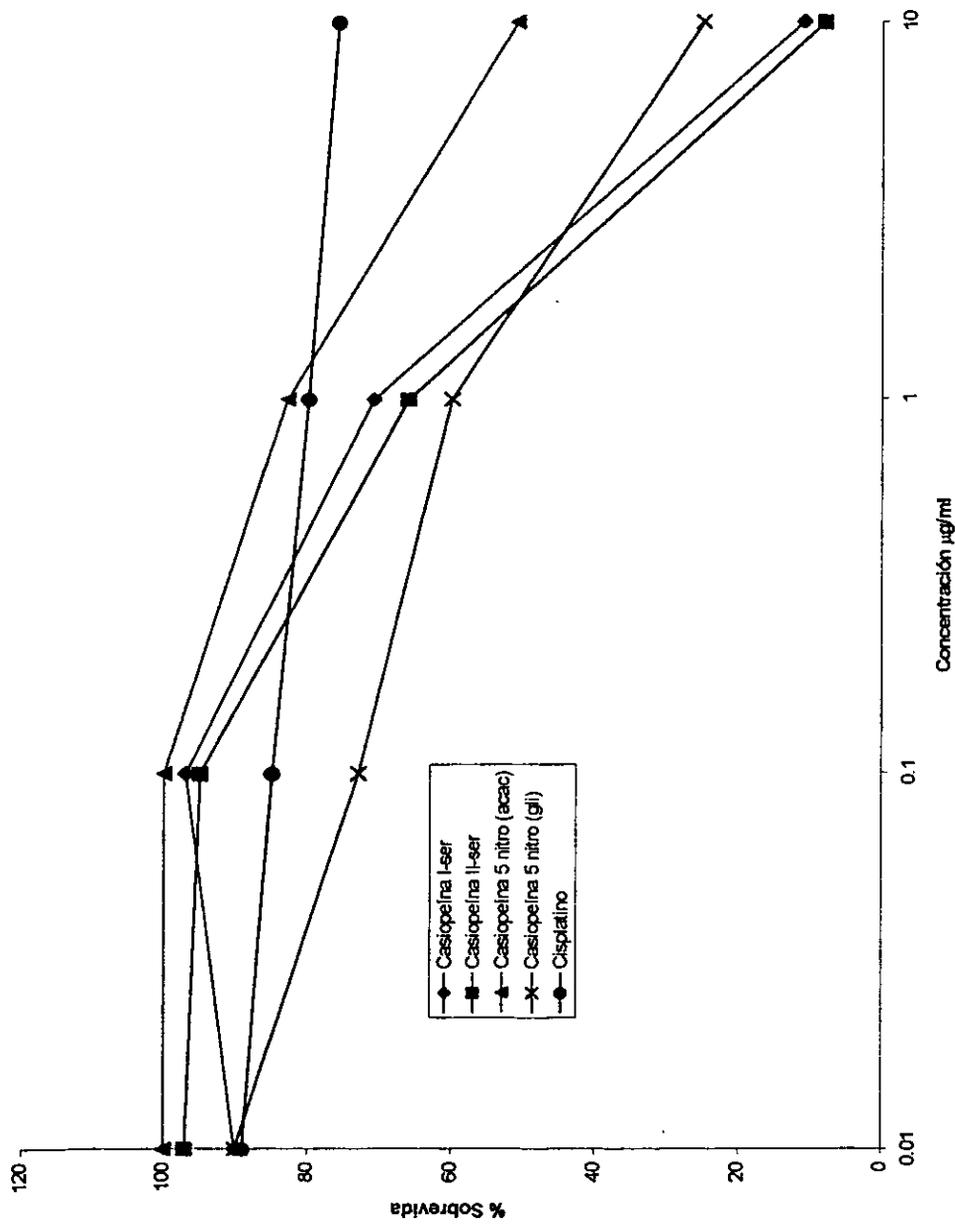
5.1.4 EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA LÍNEA TUMORAL CaLo

POR CIENTO DE SOBREVIDA					
CONCENTRACION µg/ml	CASIOPEÍNA I-ser	CASIOPEÍNA II-ser	CASIOPEÍNA 5 nitro (acac)	Casiopeina 5 nitro (gli)	CISPLATINO
0.01	100	95.33	94.36	82.16	100
0.1	53.93	41.66	100	78.98	100
1.0	19.10	16.66	30.26	38.21	70.24
10.0	11.80	6.77	11.80	12.74	43.45

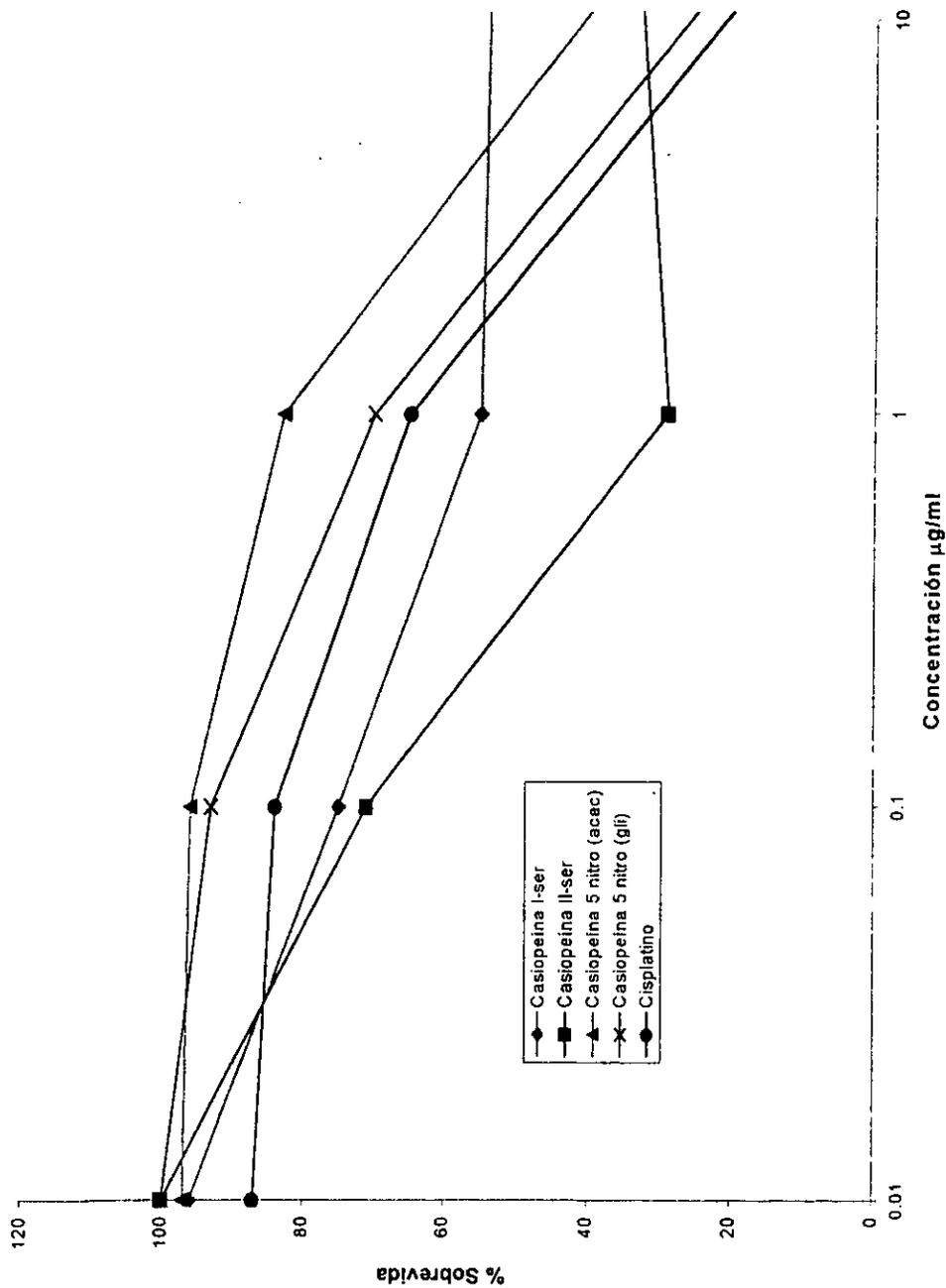
5.1.5 EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA LÍNEA TUMORAL Ca Ski

POR CIENTO DE SOBREVIDA					
CONCENTRACION µg/ml	CASIOPEÍNA I-ser	CASIOPEÍNA II-ser	CASIOPEÍNA 5 nitro (acac)	Casiopeina 5 nitro (gli)	CISPLATINO
0.01	100	100	76.68	100	100
0.1	34.91	84.43	100	91.23	93.72
1.0	9.45	16.49	50.48	75.44	90.62
1	12.36	17.53	14.05	22.46	75.90

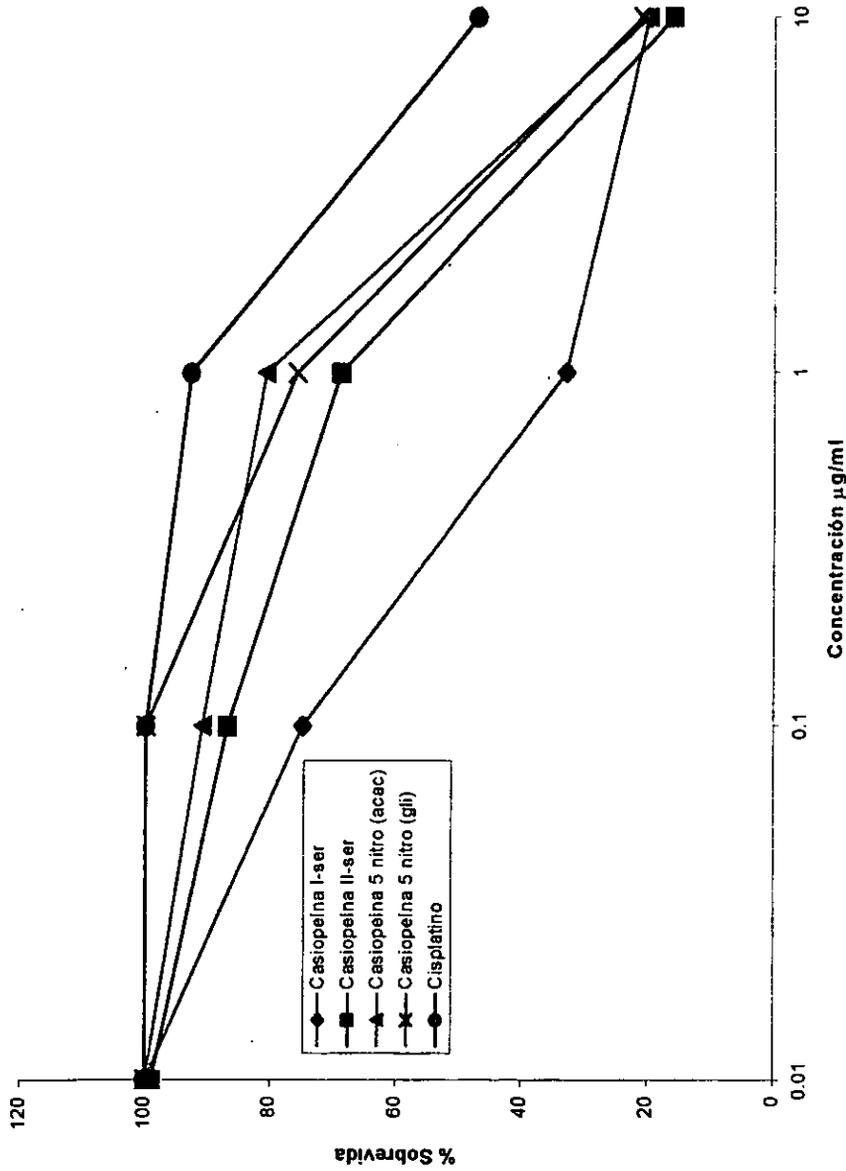
GRAFICA 1. EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA LÍNEA TUMORAL HeLa



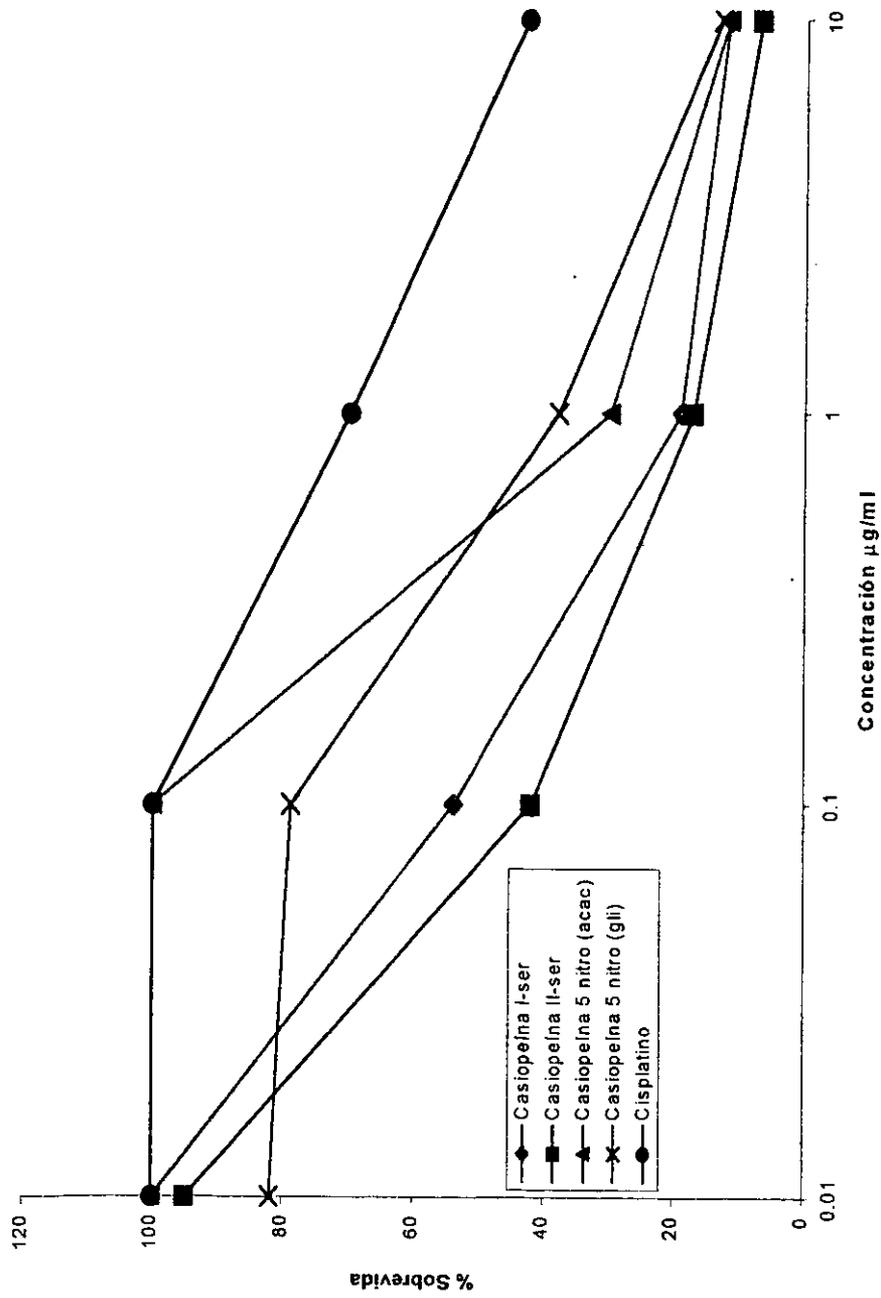
GRAFICA 2. EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA LÍNEA TUMORAL SiHa



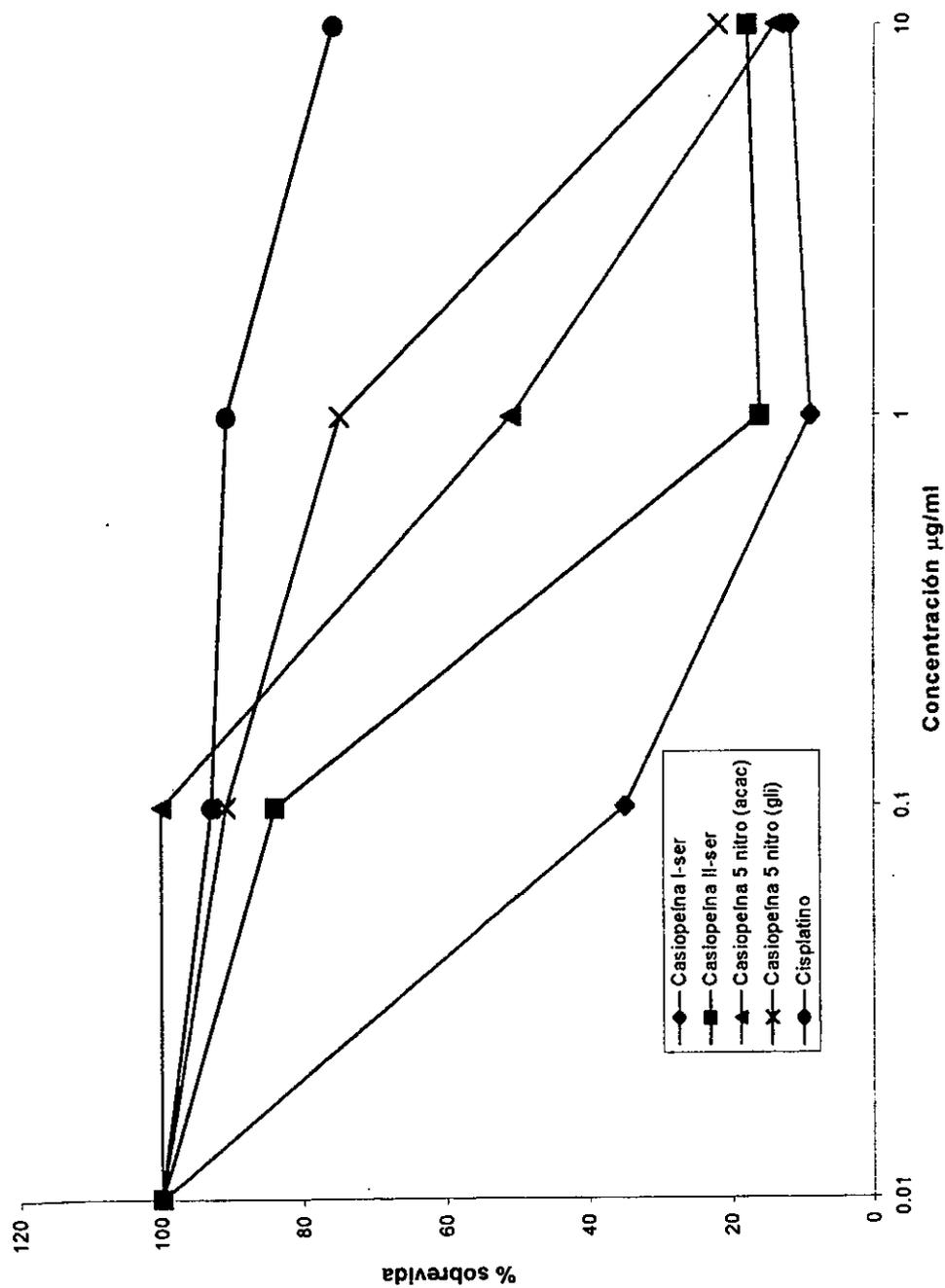
GRAFICA 3. EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA LÍNEA TUMORAL C33



GRAFICA 4. EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA LÍNEA TUMORAL CaLo



GRAFICA 5. EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA LÍNEA TUMORAL Ca Ski



5.2 CONCENTRACIONES INHIBITORIAS MEDIA (CI50) CALCULADAS PARA CADA LÍNEA TUMORAL.

5.2.1 CI50 de los diferentes fármacos para HeLa

FARMACO	CI50 µg/ml	CI50 mmol/L
Casiopéina I-ser	0.83	1.4832E-3
Casiopéina II-ser	1.22	2.8071E-3
Casiopéina 5 nitro (acac)	6.05	1.336E-2
Casiopéina 5 nitro (gli)	1.27	3.2106E-3
Cisplatino	11522.86	35.02921

5.2.2 CI50 de los diferentes fármacos sobre SiHa

FARMACO	CI50 µg/ml	CI50 mmol/L
Casiopéina I-ser	6.023239	1.07634E-2
Casiopéina II-ser	0.814234	1.87352E-3
Casiopéina 5 nitro (acac)	6.553640	1.44799E-2
Casiopéina 5 nitro (gli)	2.452271	6.19886E-3
Cisplatino	1.490006	4.5297E-3

5.2.3 CI50 de los diferentes fármacos sobre la línea tumoral C33

FARMACO	CI50 µg/ml	CI50 mmol/L
Casiopéina I-ser	0.663403	1.18549E-3
Casiopéina II-ser	1.689138	3.88665E-3
Casiopéina 5 nitro (acac)	2.743847	6.06241E-3
Casiopéina 5 nitro (gli)	3.028553	7.6555E-3
Cisplatino	8.85447	2.691E-2

5.2.4 CI50 de los diferentes fármacos sobre la línea tumoral CaLo

FARMACO	CI50 µg/ml	CI50 mmol/L
Casiopéina I-ser	0.242652	4.3361E-4
Casiopéina II-ser	0.133118	3.063E-4
Casiopéina 5 nitro (acac)	0.923185	2.0397E-3
Casiopéina 5 nitro (gli)	0.421008	10.64226E-3
Cisplatino	5.532570	1.6819E-3

5.2.5 CI50 de los diferentes fármacos sobre Ca Ski

FARMACO	CI50 µg/ml	CI50 mmol/L
Casiopéina I-ser	0.124801	2.23018E-4
Casiopéina II-ser	0.533459	1.2227E-3
Casiopéina 5 nitro (acac)	1.497918	3.309581E-3
Casiopéina 5 nitro (gli)	2.564565	6.482722E-3
Cisplatino	202.464462	0.6155057

CAPITULO

6

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

6.1 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la mayoría de las pruebas se puede observar la misma tendencia de disminuir la proliferación celular en función de la concentración del fármaco, siendo que las Casiopeínas I-ser y II-ser son más activas que las Casiopeínas 5 nitro (acac) y 5 nitro (gli) y a su vez todos los compuestos probados fueron más activos que el fármaco control (Cisplatino).

Las Casiopeínas I-ser y II-ser tienen estructuras muy semejantes entre sí ya que ambas tienen fenantrolinas simétricas (4,7-difenil-1,10-fenantrolina y 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina respectivamente) como donador N-N y sustituyentes electrodonadores (metilo y fenilo) y como donador N-O tienen al serinato que proporciona un centro asimétrico a la molécula. En cambio las Casiopeínas 5 nitro (acac) y 5 nitro (gli) que presentan un sustituyente electroatrayente, son aún más asimétricas ya que cuentan en su estructura con una fenantrolina asimétrica como donador N-N (5-nitro-1,10-fenantrolina).

Haciendo una comparación entre las dos Casiopeínas más asimétricas, se observa que una tiene a la glicina como donador cargado (N-O) (Casiopeína 5 nitro (gli)), y la otra tiene acetilacetato como donador cargado (O-O) (Casiopeína 5 nitro (acac)). Observando mayor actividad con la Casiopeína 5 nitro (gli) en todos los casos, por lo que aparentemente la selectividad de las Casiopeínas es impartida por el donador (N-O).

La explicación a lo anterior es que dentro de la molécula la parte responsable de la magnitud de la actividad es el donador (N-N) (en este caso la fenantrolina), mientras que la parte formada por el donador (O-O) u (N-O) es la responsable de la selectividad de los fármacos hacia las líneas celulares (36).

De acuerdo a las Concentraciones Inhibitorias medias (CI50) calculadas para cada línea celular, se observa mayor actividad sobre las líneas celulares provenientes de pacientes con carcinoma cérvico-uterino en un estadio clínico menos avanzado como son CaLo, Ca Ski, y C33, y para las líneas más metastásicas SiHa y HeLa hyan una menor actividad, por lo que sigue siendo la detección temprana la forma más efectiva para el tratamiento del cáncer.

Dentro de los ensayos realizados con las líneas tumorales SiHa y HeLa, hay diferencias en los resultados ya que SiHa es carcinoma cérvico-uterino de tipo escamoso y estadio clínico III-B, mientras que HeLa es estadio IV-A, por lo que se muestra la selectividad de las Casiopeínas.

El Cisplatino presentó menor actividad que las Casiopeínas sobre cualquiera de las cinco líneas tumorales probadas, además de que en estudios recientes se ha encontrado que las Casiopeínas causan menor recombinación genética que el Cisplatino por lo que existe un menor riesgo de causar cáncer secundario por el uso de cualquiera de estos quimioterapéuticos (31). Ambos hechos deben tomarse en cuenta para proponer el uso de las Casiopeínas como agente quimioterapéutico alternativo en el tratamiento del CaCU.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con otro estudio realizado anteriormente donde se utilizó la misma metodología (37), en este estudio también se reportó que las Casiopeínas con mayor grado de simetría son más activas que las más asimétricas, por lo que este sistema de cernimiento de fármacos ha mostrado ser un buen método para seleccionar a los fármacos más activos.

Por último, es importante mencionar que los ensayos fueron realizados sin tomar en cuenta ningún factor metabólico, y que los grados de actividad obtenidos son los de las Casiopeínas utilizadas en su estado original.

6.2 CONCLUSIONES.

Al término de este estudio se concluye lo siguiente:

- Las Casiopeínas más activas fueron las que presentaron en su estructura una fenantrolina simétrica como donador N-N con sustitución 4,7 de carácter electrodonador.
- Dentro de las Casiopeínas menos simétricas, la más activa es la que tiene como donador N-O a la glicina.
- Todas las Casiopeínas son más activas que el fármaco utilizado como quimioterapéutico en la terapia contra el cáncer cérvico-uterino (CaCU), el Cisplatino, por lo que se recomienda seguir con los estudios necesarios para proponer el uso de las Casiopeínas como alternativa de tratamiento.
- La magnitud de actividad de los fármacos probados es mayor sobre líneas tumorales provenientes de pacientes con carcinoma cérvico-uterino con un estado clínico menor, por lo que la terapia es más eficaz si se efectúa una detección temprana de la enfermedad.
- Las Casiopeínas utilizadas no cumplen con los postulados de Rosengerg en cuanto al grado de simetría de la molécula, sin embargo han resultado tener actividad antineoplásica en diversos sistemas de prueba.
- En ninguno de los estudios se tomó en cuenta los efectos metabólicos que pueden aumentar o disminuir la actividad de los compuestos, por lo que se sugiere continuar con los estudios *in vitro* utilizando la fracción microsomal S9, o *in vivo* utilizando ratones.

CAPITULO

7

ANEXOS

ANEXO A
PREPARACION DE SOLUCIONES.

A.1 PREPARACIÓN DE PBS

Para preparar 1 l de PBS:

NaCl	8.015 g
KCl	0.224 g
KH ₂ PO ₄	0.275 g
Na ₂ HPO ₄	1.136 g

- a) Disolver las sales anteriores en 900 ml de agua desionizada.
- b) Ajustuar el pH a 7.4 con HCl 1N o con NaOH 1N.
- c) Adicionar agua desionizada hasta completar un volumen de 1 l.
- d) Repartir la solución en alícuotas y esterilizar por autoclave durante 20 minutos a 15 lib/in² y 121°C.
- e) Guardar la solución a temperatura ambiente o bien, en refrigeración.

A.2 PREPARACIÓN DE PBS-EDTA

Para preparar 1 l de PBS-EDTA:

NaCl	8.000 g
KCl	0.200 g
KH ₂ PO ₄	0.240 g
Na ₂ HPO ₄	1.440 g
EDTA (sal disódica hidratada)	0.372 g
Agua desionizada c.b.p.	1.000 l

- a) Disolver las sales anteriores en 900 ml de agua desionizada.
- b) Ajustuar el pH a 7.4 con HCl 1N o con NaOH 1N.
- c) Adicionar agua desionizada hasta completar un volumen de 1 l.
- d) Repartir la solución en alícuotas y esterilizar por autoclave durante 20 minutos a 15 lib/in² y 121°C.
- e) Guardar la solución a temperatura ambiente o bien, en refrigeración.

A.3 PREPARACIÓN DE PBS-ALBUMINA.

Para preparar 1l de solución:

NaCl	8.000 g
KCl	0.200 g
KH ₂ PO ₄	0.240 g
Na ₂ HPO ₄	1.440 g
Albúmina	2.500 g
Agua desionizada c.b.p.	1.000 l

- Disolver las sales en 400 ml de agua desionizada.
- Adicionar la albúmina a la solución, con agitación moderada disolver la albúmina evitando la formación de espuma.
- Adicionar agua desionizada hasta completar el volumen de 1 l.
- Esterilizar por filtración con membrana.
- Guardar la solución alicuotada en congelación.

A.4 PREPARACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO

Para 1l de la solución

Ácido acético	10.0 ml
Agua desionizada c.b.p	1 l

- A un volumen aproximadamente 400 ml de agua desionizada adicionar el ácido acético, mezclar para homogenizar.
- Adicionar agua desionizada hasta completar el volumen de 1 l.

A.5 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SULFORRODAMINA-B

Para 1 l de la solución:

Sulforrodamina-B	4.00 g
Ácido acético al 1% c.b.p.	1 l

- Disolver la sulforrodamina en un volumen pequeño de ácido acético preparado como se menciona en el punto anterior, agitar hasta disolución, mezclar.
- Adicionar ácido acético al 1% hasta completar el volumen a 1 l.

A.6 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRIS-BASE

Para preparar 1 l de la solución:

Tris (hidroximetil)aminometano	1.2114 g
Agua destilada c.b.p.	1 l

- Colocar el reactivo en un matraz volumétrico de un litro, con un volumen pequeño de agua destilada, agitar hasta disolución.
- Adicionar agua destilada hasta completar el volumen, agitar para homogeneizar la disolución.

A.7 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRIPSINA AL 2.5%

Para preparar 100 ml de la solución:

Tripsina	2.50 g
PBS c.b.p.	100 ml.

- Disolver la Tripsina con un volumen pequeño de PBS, preparado como se menciona en el punto A.1, agitar moderadamente.
- Llevar al volumen con PBS.
- Esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μm . Alicuotar y conservar en congelación.

ANEXO B
DATOS ESTADÍSTICOS OBTENIDOS POR PROBIT

B.1 LINEA TUMORAL HeLa.

FARMACO	DOSES	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopaina I-ser	0.01	3	3	8.876906	4.269391
	0.1	25	25	19.459707	1.958465
	1.0	45	45	35.429173	4.004069
	10.0	46	46	51.520818	2.927972
	C150=5.847530		Chi cuadrada total: 13.159		
	C190=2475.080		Número de ciclos: 5		
M=0.487319±0.00439		Factor de Heterogeneidad: 5.79949			
B=4.626240±0.005149		Grados de libertad: 2			

FARMACO	DOSES	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopaina II-ser	0.01	4	4	0.778574	13.433561
	0.1	13	13	10.402834	0.723692
	1.0	23	23	46.055031	21.394562
	10.0	98	98	85.561661	12.523578
	C150= 1.217292		Chi cuadrada total: 48.07539		
	C190= 15.451052		Número de ciclos: 6		
M=1.159879± 0.009965		Factor de Heterogeneidad: 24.03769			
B=4.900952±0.006853		Grados de libertad: 2			

FARMACO	DOSES	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopaina 5 nitro (aac)	0.01	0	0	0.006607	0
	0.1	3	3	1.958939	0.564317
	1.0	35	35	38.142563	0.418568
	10.0	94	94	92.769455	0.225745
	C150=1.483837		Chi cuadrada total: 1.20863		
	C190=7.914499		Número de ciclos: 4		
M=1.760570±0.026406		Factor de Heterogeneidad: 0.604315			
B=4.698263±0.010504		Grados de libertad: 2			

FARMACO	DOSES	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopaina 5 nitro (gli)	0.01	8	8	2.326006	14.170594
	0.1	12	12	31.016994	16.902149
	1.0	96	96	84.132263	10.550142
	10.0	98	98	99.370552	3.003121
	C150=214432		Chi cuadrada total: 44.62601		
	C190=1.539279		Número de ciclos: 7		
M=1.495277±0.015720		Factor de Heterogeneidad: 22.313004			
B=5.999909±0.015209		Grados de libertad: 2			

FARMACO	DOSES	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Cisplatino	0.01	2	2	4.321113	1.303109
	0.1	15	15	10.290274	2.402840
	1.0	19	19	20.731100	0.182356
	10.0	35	35	35.703701	0.021571
	C150= 65.357018		Chi cuadrada total: 3.909877		
	C146084.578125		Número de ciclos: 2		
M=0.449397±0.005698		Factor de Heterogeneidad: 1.954938			
B=4.184214±0.006087		Grados de libertad: 2			

B.2 LÍNEA TUMORAL SiHa.

FARMACO	DOSES	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA	
Casiopaina	0.01	0	0	5.932432	6.306565	
	0.1	31	31	27.451044	6.632428	
	1.0	80	79.9999	64.133003	10.944926	
	10.0	81	81	90.712547	11.197017	
	CI50= 0.420135				Chi cuadrada total: 103.9911	
	CI90=9.015668				Número de ciclos:0	
M= 961243±0.006330				Factor de Hererogenicidad: 14.540468		
R=5.362015±0.006848				Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSES	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA	
Casiopaina	0.01	0	0	2.290813	7.864210	
	0.1	29	29	24.467200	1.143291	
	1.0	71	71	52.708252	13.422402	
	10.0	67	66.9999	79.648720	9.870125	
	CI50= 0.814234				Chi cuadrada total: 32.30053	
	CI90=39.111187				Número de ciclos:2	
M=0.761202±0.005068				Factor de Hererogenicidad: 16.150265		
R=5.067938±0.005631				Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSES	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA	
Casiopaina	0.01	0	0	0.329301	0.330389	
	0.1	7	7	5.554786	0.398123	
	1.0	20	20	31.935478	0.172339	
	10.0	75	75	74.353394	0.021925	
	CI50=2.616906				Chi cuadrada total: 0.922754	
	CI90=36.041096				Número de ciclos:3	
M=1.123783±0.011605				Factor de Hererogenicidad: 0.461388		
R=4.530497±0.007489				Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSES	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA	
Casiopaina	0.01	3	3	0.720096	7.270792	
	0.1	4	4	5.725565	0.551633	
	1.0	17	17	23.904011	2.620417	
	10.0	62	62	56.334167	1.305010	
	CI50= 6.553640				Chi cuadrada total: 11.74785	
	CI90=194.853790				Número de ciclos:5	
M=0.868842±0.009554				Factor de Hererogenicidad: 5.873926		
R=4.290606±0.007189				Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSES	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA	
Cisplatino	0.01	13	13	5.716598	9.842278	
	0.1	11	11	19.698879	4.783695	
	1.0	35	35	44.993053	4.034906	
	10.0	82	82	72.599792	4.442072	
	CI50= 1.49006				Chi cuadrada total: 23.10295	
	CI90=86.067940				Número de ciclos:5	
M=0.726590±0.005182				Factor de Hererogenicidad: 11.551476		
R=4.87163±0.005449				Grados de libertad: 2		

B.3 LÍNEA TUMORAL C33

FARMACO	DOISIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopcina I-ser	0.01	0	0	15.807623	18.775599
	0.1	25	25	15.807623	6.349161
	1.0	67	66.9999	51.967312	9.053284
	10.0	80	79.9999	86.456512	3.560146
	CI50= 1.997622		CI90=11.79576		Chi cuadrada total: 37.73819
M=1.051729±0.00859		B=5.0122±0.00579		Número de ciclos: 5	
				Factor de Heterogeneidad: 18.869085	
				Grados de libertad: 2	

FARMACO	DOISIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopcina II-ser	0.01	1	1	0.859323	0.023229
	0.1	13	13	9.457437	1.365578
	1.0	31	31	40.380589	3.655105
	10.0	81	81	79.562141	1.211170
	CI50= 1.689138		CI90=26.569479		Chi cuadrada total: 6.355082
M=1.069592±0.009250		B=4.75491±0.006614		Número de ciclos: 3	
				Factor de Heterogeneidad: 3.177541	
				Grados de libertad: 2	

FARMACO	DOISIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopcina 5 nitro (acac)	0.01	0	0	0.192294	0.192664
	0.1	9	9	4.408977	5.001084
	1.0	19	19	30.165470	5.917983
	10.0	80	79.9999	74.722656	1.474507
	CI50= 2.743847		CI90=32.971115		Chi cuadrada total: 12.58624
M=1.185434±0.013155		B=4.48035±0.018081		Número de ciclos: 5	
				Factor de Heterogeneidad: 6.293119	
				Grados de libertad: 2	

FARMACO	DOISIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopcina 5 nitro (gh)	0.01	0	0	0.002429	0.000000
	0.1	0	0	0.763771	0.769649
	1.0	24	24	21.531746	0.360584
	10.0	79	79	80.221725	0.094073
	CI50= 3.028553		CI90= 18.316044		Chi cuadrada total: 1.224307
M=1.224307±0.026776		B=4.211894±0.013932		Número de ciclos: 5	
				Factor de Heterogeneidad: 0.612153	
				Grados de libertad: 2	

FARMACO	DOISIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Cisplatino	0.01	0	0	0.088784	0.000000
	0.1	0	0	0.088784	0.000000
	1.0	7	7	6.421831	0.055626
	10.0	53	53	53.378315	0.005751
	CI50= 8.854774		CI90=55.545063		Chi cuadrada total: 0.0613769
M=1.605080±0.040923		B=3.479704±0.029227		Número de ciclos: 3	
				Factor de Heterogeneidad: 0.030688	
				Grados de libertad: 2	

B.4 LÍNEA TUMORAL CaLo

FARMACO	DOSIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopaina	0.01	0	0	8.140832	8.862297
	0.1	46	46	34.902561	5.420312
	1.0	81	81	73.229118	3.080307
	10.0	88	88	94.818100	9.461211
I-ser	CI50= 0.242652		Chi cuadrada total: 26.82413		
	CI90=4.520554		Número de ciclos: 6		
	M=1.0097709±0.006774		Factor de Hererogenicidad: 0.008208		
	B=5.619758±0.008208		Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopaina	0.01	5	5	13.021794	5.681484
	0.1	58	58	45.051407	6.772987
	1.0	83	83	80.965797	0.268505
	10.0	93	93	96.978439	5.401555
II-ser	CI50= 0.133118		Chi cuadrada total: 18.12453		
	CI90=5.876637		Número de ciclos: 5		
	M=1.000999± 0.007056		Factor de Hererogenicidad: 9.0662265		
	B=5.876637± 0.010056		Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopaina	0.01	0	0	0.107023	0.107138
	0.1	0	0	6.579131	7.042464
	1.0	70	70	52.162094	12.751478
	10.0	88	88	94.698906	8.939172
5 nitro (cac)	CI50= 0.923185		Chi cuadrada total: 28.84025		
	CI90= 6.091055		Número de ciclos: 8		
	M=1.562112±0.018376		Factor de Hererogenicidad: 14.420126		
	B=5.054223±0.008765		Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopaina	0.01	18	18	11.763683	3.746844
	0.1	21	21	32.413246	5.946128
	1.0	62	62	60.816223	0.058805
	10.0	87	87	84.260956	0.565709
5 nitro (gli)	CI50= 0.421008		Chi cuadrada total: 10.31749		
	CI90=23.769299		Número de ciclos: 4		
	M=0.730708±0.004710		Factor de Hererogenicidad: 5.158743		
	B=5.274534±0.005888		Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Cisplatino	0.01	0	0	0.151855	0.152086
	0.1	0	0	2.982563	3.074254
	1.0	30	30	21.104876	4.751942
	10.0	56	56	60.941212	1.025740
	CI50= 5.532570		Chi cuadrada total: 9.004022		
	CI90=84.621567		Número de ciclos: 6		
	M=1.080576±0.014286		Factor de Hererogenicidad: 4.502011		
	B=4.197211±0.009283		Grados de libertad: 2		

B.5 LÍNEA TUMORAL Ca Ski

FARMACO	DOSIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopelna	0.01	0	0	13.834206	16.053334
	0.1	65	65	45.876331	14.728771
	1.0	90	90	81.07958	5.190395
	10.0	88	88	96.890356	26.235769
I-ser	CI50= 0.127411		Chi cuadrada total: 62.21047		
	CI90= 2.545030		Número de ciclos: 6		
	M=0.984249±0.006915		Factor de Hererogenicidad: 31.105236		
	B=5.881090±0.009991		Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casipelna	0.01	0	0	2.444601	2.505859
	0.1	15	15	19.991156	1.557494
	1.0	83	83	61.243080	19.942911
	10.0	82	82	92.121002	14.112942
II-ser	CI50= 0.558040		Chi cuadrada total: 38.11921		
	CI90= 7.617673		Número de ciclos: 5		
	M=1.127597±0.008353		Factor de Hererogenicidad: 19.059603		
	B=5.285660±0.007248		Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopelna	0.01	0	0	0.322109	0.323150
	0.1	9	9	5.532811	2.265836
	1.0	25	25	32.184074	2.364661
	10.0	78	78	74.804474	0.541793
5 nitro (acac)	CI50= 2.564565		Chi cuadrada total: 5.49544		
	CI90= 34.741543		Número de ciclos: 4		
	M=1.130907±0.011674		Factor de Hererogenicidad: 2.747720		
	B=4.537444±0.007500		Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Casiopelna	0.01	0	0	0.034684	0.000000
	0.1	0	0	3.341076	3.456562
	1.0	49	49	39.218540	4.013699
	10.0	86	85.9999	90.071152	1.853319
5 nitro (gli)	CI50= 1.497918		Chi cuadrada total: 9.32358		
	CI90= 9.917409		Número de ciclos: 7		
	M=1.559245±0.019686		Factor de Hererogenicidad: 4.661790		
	B=4.726371±0.009193		Grados de libertad: 2		

FARMACO	DOSIS	RESPUESTA	RESPUESTA NETA	ESPERADO	CHI CUADRADA
Cisplatino	0.01	0	0	0.968179	0.977644
	0.1	6	6	3.629258	1.606961
	1.0	9	9	10.521093	0.245771
	10.0	24	24	23.904446	0.000502
	CI50= 202.464462		Chi cuadrada total: 2.830878		
	CI90= 46080.074219		Número de ciclos: 5		
	M=0.543025±0.010503		Factor de Hererogenicidad: 1.415439		
	B=3.747594±0.009184		Grados de libertad: 2		

CAPITULO

8

BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO 8 BIBLIOGRAFÍA

1. Registro Histopatológico de Neoplasias en México año 1994, México, D.F., S.S.A (1995)
2. OZOLS YOUNG. Patterns of Failure of Chemotherapy in Gynecologic Malignancy. *Cancer Treatment Symposia* 2:233-240 (1983).
3. JOHNSON, R. Screening Methods in Antineoplastic Drug Discovery *Journal of the National Cancer Institute* 82:1082 (1990).
4. DE VITA, V. Cancer. Principles and Practice of Oncology. V.1. 2nd Edition. Chap. 1 J.b. lippincott Company U.S.A. (1985).
5. SANTOS, E. RODRIGUEZ, J. El Cáncer. *Libros de investigación y ciencia. Scientific American. De. Prensa Científica. España* (1995).
6. JARAMILLO, J. El cáncer, Fundamentos de Oncología. Ed. De la Universidad de Costa Rica. Costa Rica (1991).
7. TORRELLA KOURI, M. VILLA TREVIÑO, S. Bases genéticas del Cáncer. *Instituto Nacional de Cacerología, Fondo de Cultura Económica, México* (1998).
8. AZNAVOORIAN, S., LIOTTA, L.A. La evolución en etapas de la neoplasia invasora: desequilibrio de la regulación positiva y negativa. *Triangulo* 31, 1:25-35 (1993).
9. Estadísticas del Cáncer. <http://www.servite.es/infosalud97/59/59.htm>
10. El cáncer en México. *La Jornada* 25 de Noviembre de 1996: <http://www.servite.es/infosalud97/59/59.htm>.
11. Estadísticas de Mortalidad en México 1994. *Dirección de Estadística, Informática y Evaluación*., México, D.F., S.S.A. (1995).

12. DE VITA, V. Cancer. Principles and Practice of Oncology. V.1. 2nd Edition. Chap. 15 /*b. lippincott Company U.S.A.* (1985).
13. Cáncer Cérvico-Uterino. Información de internt.
<http://www.mcb.unibonn.de/cancernet/spanish/1000013.html>
14. HOPKINS, MP, MORLEY, G.W. A Comparision of Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma of the Cervix *Obstetrics & Gynecology* **77**, 6:914-917 (1991)
15. TANNOK, I.F., HILL, R.P., The Basic Science of Oncology *Pergamon Press U.S.A.* (1987).
16. CREASMAN, W.T. New Gynecologic Cancer Strgin *Gynecologic Oncology* **58**(2) 157-158 (1995).
17. Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas. MEMORIAS. Unidad de Seminarios Ignacio Chávez, 1996.
18. RUIZ-RAMÍREZ, L. Naturaleza Química y Clasificación de los Agentes Quimioterapéuticos. *Cáncer y quimioterapia (perspectivas en México)*. MEMORIAS. UNAM. Fac. de Química. México (1992).
19. ROSENBERG, B., VAN CAMP, L. TRUSKA, J.G., ANSOUR, V.H.. Platinum Compounds an ney class of potent antitumor agents. *Nature* **22**, 26:385-386 (1996).
20. LAJER, DAUGAARD. Cisplatin and Hipomagnesemia. *Cancer Tratamete Reviets.* **25**:47-58 (1999).
21. LIPPARD, S.J. New Chemistry of and Old Molecule: cis-[Pt (NH₃)₂ Cl₂] *Science.* **218**:1077-1082 (1982).
22. SUGIVAMA, T. Combination therapy with irontecan and cisplatin as a neoadjuvant chemotherapy in loacly advanced cervical cancer. *British Journal of Cancer* **81**, 1:95-98 (1999)-
23. RUIZ-RAMIREZ, L. DE LA ROSA, M.E., GRACIA MORA, I., MIENDOZA, A., *et al.*

Casiopéinas, Metal based-Drugs, a New class of antineoplastic and Genotoxic Compounds

J. of Inorganic Biochemistry, **59** 2-3:206 (1995).

24. Primera Jornada de trabajo en Casiopéinas, MEMORIAS, Unidad de Seminarios Ignacio Chávez, Gómez, C. Evaluación antineoplásica in vitro (1994).
25. ROSENBERG, G. VAN CAMP, L *et al.* The inhibition of growth or cel division in E.coli by different ionic species of Platinum (IV) complexes. *J.BioChem.* **242**:1347-1352 (1967.)
26. RUIZ AZUARA, L.
- a) *Dirección General de Invenciones, marcas y Desarrollo Tecnológico. SECOFI. REGISTROS*
NUM: 18801-120579, 18802-105800
 - b) US Patent Re 35,458 Feb 18 (1997)
US Patent Number Ap 21 (1992)
No. De Registro 55763260, Nov 19 1996
No. De Registro 35458, Feb 18 1996 EEUU
27. RUIZ-RAMÍREZ, L., MORENO ESPARZA, R. GASQUE, L., MARTÍNEZ, A., FERRE, G., RENDÓN, R., SOLANS, S., Estudio Estructural de las Casiopéinas. *Segunda Jornada de Trabajo en Casiopéinas* MEMORIAS. Unidad de Seminarios Ignacio Chávez, Mex. D.F. (1996).
28. GRACIA MORA, I. Evaluación antineoplásica in vivo. *Cáncer y quimioterapia. Perspectivas en México* Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química UNAM, Memorias Junio 1992.
29. GRACIA MORA, I. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias (Medicina Preventiva). Evaluación Preclínica de la Actividad Antineoplásica de Dos Nuevos Compuestos de Coordinación. UNAM, 1999.

30. RUIZ-RAMÍREZ, L., MORENO ESPARZA, R. GASQUE, L., MARTÍNEZ, A., FERRE, G., RENDÓN, R., SOLANS, S., Estudio Estructural de las Casiopeínas. Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas MEMORIAS. Unidad de Seminarios Ignacio Chávez, Mex. D.F. (1996).
31. TENORIO, E., Comparison of Citostatic Drugs to Induce Intrachromosomal Recombination in Mamalian Cells Department of Genetic an Cellular Toxicology, Stockholm Universiti, Sweden. February-June (1999).
32. SKEENAN, P., New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticance-Drug Screening J. Of the National Cancer Institute 82 13:1107-1112 (1990).
33. RUBINSTAIN, L.V. Comparison of in vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated With a Tetrazolium Assay versus a Protein Assay Against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines. Journal of the National Cancer Institute. 82 13:1113-1118 (1990).
34. CAMPLING, B.G. PYM, J., Chemosensitivity testing of small cel cancer using de MTT assay.
35. American Tipe Culture Collection. Cataloge of Cell Lines and hibridomas. 7th Edition. 1992.
36. Bravo Gómez, M.E., Tesis de Licenciatura. Evaluación antineoplásica de Compuestos de Coordinación de Cobre (Casiopeínas) en modelo tumoral murino. UNAM 1997
37. Romero de Lira Laura C., Tesis de Licenciatura. Evaluación antineoplásica in vitro de Cuatro Casiopeínas empleando líneas tumorales muninas y humanas. UNAM 2000.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA