



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA DE LA CASIOPEINA III-ia
SOBRE DIFERENTES LINEAS TUMORALES HUMANAS
XENOTRANSPLANTADAS AL RATON DESNUDO.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
HECTOR ARIEL RICO MORALES

TUTOR: M. EN C. MARIA ISABEL GRACIA MORA

COMITE TUTORAL: DRA. LENA RUIZ RAMIREZ

DR. HECTOR SUMANO LOPEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres Salvador Rico y Laura Morales, por todo el apoyo incondicional que me han mostrado siempre.

A Jimena por compartir todos mis sueños, por reconfortarme y apoyarme en las adversidades y por esos "jalones de orejas".

A mis hermanos Paco y Víctor, a mis sobrinos Diego, Bernardo, Aleyda y Ricardo y demás familia.

A mi papá Manuel, mi mamá Lupe, mi tío Agustín, que siguen siendo importantes y me acompañan en espíritu.

A mis amigos de cuatro patas Spike y Salem.

"Las cosas más importantes son las más difíciles de explicar, porque de alguna forma las palabras las minimizan, las degradan. Es muy difícil conseguir que los extraños se interesen por las cosas agradables e importantes de nuestra vida"
Stephen King, El Cuerpo.

AGRADECIMIENTOS

A Isabel Gracia Mora por la confianza, el apoyo y demás enseñanzas académicas y no académicas, así como por ser una de las personas de más influencia en mi vida.

A la Dra. Lena Ruiz Ramírez por el apoyo que desde siempre nos ha demostrado en todos los sentidos.

A mis H. Jurado Drs. Héctor Sumano López, Eugenia Candanosa y Enrique Aburto, por sus valiosas observaciones y comentarios respecto a ésta tesis.

Al Dr. Fernando Constantino Casas por su desinteresada y valiosa ayuda en el área de patología.

A Celedonio Gómez del Instituto Nacional de Cancerología, por la valiosa ayuda y las facilidades otorgadas para realizar las inmunohistoquímicas.

A todos los integrantes de la Unidad de Experimentación Animal.

A todas y cada una de las personas involucradas en el Proyecto Casiopeinas.

RESUMEN

El cáncer es el crecimiento descontrolado de células anormales que han mutado de tejidos normales y puede causar la muerte cuando éstas células impiden el funcionamiento normal de los órganos vitales afectados y/o se diseminan por todo el cuerpo dañando otros sistemas esenciales. Por lo cual resulta de suma importancia la búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos que en un futuro puedan utilizarse en la clínica humana y veterinaria. Para ello se empleó el modelo ratón desnudo-tumor humano nos da la posibilidad de mantener tumores humanos en estos animales, sin que se pierdan las propiedades bioquímicas y morfológicas originales, permitiendo así estudios sobre la biología tumoral y la respuesta a tratamientos antineoplásicos.

En el cáncer la apoptosis es un proceso regulador negativo del crecimiento, que puede variar con el tipo de tumor y que puede ser usado como un predictor de respuesta clínica a la quimioterapia. Así la regulación de este proceso por quimioterapéuticos provee una poderosa herramienta contra el cáncer. El objetivo de este trabajo es determinar si la Casiopeína III-ia® presenta actividad antitumoral y determinar que lesiones puede producir en diferentes órganos. Para ello se realizaron ensayos antitumorales *in vivo* con ratones atímicos utilizándose las líneas celulares carcinoma cérvico-uterino C33 y adenocarcinoma de mama MCF7 y la observación de cambios histológicos de los siguientes tejidos: corazón, pulmón, hígado, encéfalo, riñón, intestino y bazo, así como del propio tumor. Así mismo mediante técnicas inmunohistoquímicas, observar de la expresión de p53 y Bcl2 en los mismos tejidos. No se pudo demostrar actividad antitumoral con el modelo de xenotransplatación con las líneas tumorales empleadas y a la dosis y esquema usado. Así mismo fue posible identificar que los efectos tóxicos son leves y de carácter reversible en hígado únicamente. Por otro lado la Casiopeína III-ia induce la expresión de p53 únicamente en la línea celular de carcinoma cérvico-uterino C33.

Palabras claves: Cáncer, ratón atímico, apoptosis.

SUMMARY

The cancer is the uncontrolled growth of abnormal cells that were transformed from tissue and it can cause the death when these cells avoid the normal function of the affected vital organs and/or they are disseminated by the whole body damaging other essential systems. Reasons why it is of supreme importance the search of new antineoplastic that can be used in the human clinic and veterinary science in a future. For it, the employment of the human tumor-athymic mouse model gives us the possibility to maintain human tumors in these animals, without they get lost the original biochemical and morphological properties, allowing this way studies on the tumoral biology and the answer to antineoplastics treatments. In cancer the apoptosis is a negative process regulator of the growth that can vary with the tumor type and that it can be used as a predictor of clinical answer to the chemotherapy. This way the regulation of this process for chemotherapeutic provides a powerful tool against cancer. The objective of this work is to determine if Casiopeina III-ia® presents antitumoral activity and to determine the damage that it can cause in different organs. For it were carried out several antitumoral assays *in vivo* with athymic mice being used the cervico-uterine carcinoma C33 and the breast adenocarcinoma MCF7 and the observation of histological changes of following organs: heart, lung, liver, brain, kidney, intestine and spleen, as well as of own tumor. Likewise using immunohistochemical techniques we observed the p53 and Bcl-2 expression in the same organs. It could not demonstrate himself antitumoral activity on tumoral lines xenografts and the dose and used outline. However to identify that the toxic effects is slight and reversible and we found it only in liver other hand, Casiopeina III-ia® only induced the p53 expression in cervico-uterine carcinoma C33.

Keywords: Cancer, athymic mouse, apoptosis.

CONTENIDO

	PÁGINA
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.- Aspectos moleculares de la carcinogénesis: oncogenes Y genes supresores de tumor	4
2.- Modelos animales en cáncer	5
CAPÍTULO II	9
1.- Apoptosis como un mecanismo de muerte celular	9
2.- La apoptosis como mecanismo de evaluación de compuestos antitumorales	12
3.- Gen p53	14
4.- Función de p53	15
5.- Gen Bcl-2	17
CAPÍTULO III	20
1.- Compuestos con cobre como fármacos antitumorales	20
OBJETIVOS	23
HIPÓTESIS	23
CAPÍTULO IV	24
MATERIAL Y MÉTODOS	24
1.- Fármaco y cultivos celulares	24
2.- Animales	24
3.- Ensayos antitumorales <i>in vivo</i>	25
3.1 Volumen tumoral	25
3.2 Volumen relativo del tumor	25
3.3 Función antitumoral	26

3.4 Retraso del crecimiento o inhibición del crecimiento	26
4.- Histología	26
5.- Inmunohistoquímica	27
CAPÍTULO V	28
RESULTADOS	28
1.- Resultados de la línea de carcinoma cérvico-uterino C33	28
1.1 Volumen relativo del tumor	28
1.2 Función antitumoral	28
1.3 Promedio de días en que dobla su volumen el tumor	28
1.4 Inhibición del crecimiento	28
2.- Resultados histológicos	29
3.- Resultados inmunohistoquímicos	30
4.- Resultados de la línea de adenocarcinoma de mama MCF7	31
4.1 Volumen relativo del tumor	31
4.2 Función antitumoral	31
4.3 Promedio de días en que dobla su volumen el tumor	31
4.4 Inhibición del crecimiento	31
5.- Resultados histológicos	32
6.- Resultados inmunohistoquímicos	33
CAPÍTULO VI	37
DISCUSIÓN	37
1.- Actividad antitumoral	37
2.- Histología	39
3.- Inmunohistoquímica	40
CAPÍTULO VII	42
CONCLUSIONES	42
COMENTARIOS	43
BIBLIOGRAFÍA	44

LISTA DE CUADROS

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	
CUADRO 1 Características diferenciales de células normales y malignas.	2
CAPITULO II.	
CUADRO 2 Principales cambios morfológicos de la apoptosis y de la necrosis.	9
CUADRO 3 Alteraciones bioquímicas de la apoptosis y de la necrosis.	10
CUADRO 4 Familia de Bcl-2.	18
CAPÍTULO V.	
CUADRO 5 Hallazgos macroscópicos encontrados en los ratones xenotransplantados con el carcinoma cérvico-uterino C33.	29
CUADRO 6 Hallazgos microscópicos encontrados en los ratones xenotransplantados con el carcinoma cérvico-uterino C33.	30
CUADRO 7 Hallazgos macroscópicos encontrados en los ratones xenotransplantados con el adenocarcinoma de mama MCF7.	32
CUADRO 8 Hallazgos microscópicos encontrados en los ratones xenotransplantados con el adenocarcinoma de mama MCF7.	33

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

CAPÍTULO III.

FIGURA 1 Estructura de la Casiopeína III-ia. 21

CAPÍTULO V.

FIGURA 2 Metástasis en hígado con células de carcinoma Cérvico-uterino C33, observadas en el tratamiento con Casiopeína III-ia. Tinción de hematoxilina-eosina. 34

FIGURA 3 Metástasis en pulmón con células de adenocarcinoma de mama, observadas en el tratamiento con Casiopeína III-ia Tinción de hematoxilina-eosina. 34

FIGURA 4 Degeneración hidrópica centrolobulillar en hígado, observada en los grupos de Casiopeína III-ia, con C33 y MCF7. Tinción de hematoxilina-eosina. 35

FIGURA 5 Expresión de p53 en el tumor de carcinoma Cérvico-uterino C33, en los grupos de cisplatino y Casiopeína III-ia. 35

FIGURA 6 Expresión de Bcl-2 en el tumor de carcinoma Cérvico-uterino C33, en los grupos de cisplatino y Casiopeína III-ia. 36

CAPÍTULO I.

1.- Introducción

El cáncer es un conjunto de enfermedades producidas por cambios en la conducta de las células, provocada por modificaciones en su información genética y debido a estas alteraciones, las células cancerosas proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer en forma invasiva, destruyendo tejidos y órganos normales (1, 2).

En las últimas dos décadas, los descubrimientos en la biología celular del cáncer han aportado avances relevantes dentro de los mecanismos moleculares del cáncer, facilitando la investigación para diseñar terapias más eficaces (1). Algunos de los procesos celulares y extracelulares fundamentales que han sido estudiados en las células cancerosas incluyen el control o falta de éste en el ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis y las vías de señalización e interacciones con la matriz extracelular (3). La habilidad de las células cancerosas para producir metástasis constituye la propiedad más dañina para el individuo y la que más frecuentemente lo lleva a la muerte. Las metástasis se generan a través de una compleja serie de acontecimientos que implican interacciones entre las células malignas y las células normales del organismo.

Para que se establezcan las etapas secuenciales para que un tumor colonice a distancia se requiere de:

- Extensión a los tejidos circundantes.
- Penetración en las cavidades y vasos del cuerpo.
- Desprendimiento de las células tumorales para su desplazamiento a otras zonas.
- Reinvasión del tejido en el punto de parada.
- Alteración del nuevo tejido para facilitar la supervivencia, vascularización y desarrollo tumoral de las células tumorales (4).

Por observaciones clínicas se ha concluido que determinados tipos de tumores primarios, encierran una tendencia a producir metástasis de un modo preferente

en algunos órganos. Por ejemplo carcinomas de mama tienden a diseminarse por el cerebro y pulmones; los tumores pulmonares desarrollan frecuentemente metástasis en el cerebro y glándulas suprarrenales y el carcinoma de próstata lo hace en el hueso (5). Actualmente las terapias clínicas más efectivas contra el cáncer han sido combinaciones de cirugía, radiación y quimioterapia. La cirugía y la radioterapia son efectivas para erradicar un tumor primario o localizado, así mismo se emplea la quimioterapia contra las metástasis y con la finalidad de alcanzar la completa eliminación de las células neoplásicas (6). La quimioterapia es la alternativa más eficaz en muchas ocasiones, por su habilidad de alcanzar más sitios ya que es un ataque sistémico a las células tumorales, incluso cuando han iniciado la metástasis, aunado a esto el uso combinado de diferentes agentes quimioterapéuticos, brinda diversos mecanismos de acción en el ataque a las células cancerosas, jugando un papel importante en retardar o evitar la recurrencia del tumor (7). En un organismo pluricelular existe una estructura jerárquica que debe ser mantenida, las células que integran un tejido normal se caracterizan por tener rasgos, que al malignizarse se pierden o modifican (5) (Cuadro 1).

CUADRO 1 CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE CÉLULAS NORMALES Y MALIGNAS

CÉLULAS NORMALES	CÉLULAS MALIGNAS
Realizan las funciones del tejido del cuál forman parte	Realizan las funciones del tejido del cuál forman parte
Tienen un tiempo de vida limitado	No obedecen las señales de muerte
Presentan inhibición por contacto	Pérdida de la inhibición por contacto
Su proliferación es controlada	Proliferación descontrolada
Su citoesqueleto tiene organización determinada	Pérdida de organización
Células diferenciadas	Hay poca diferenciación
Uso de vías convencionales en la generación de energía	Uso de vías anaerobias en la generación de energía
Las células se mantienen fijas en el tejido de origen	Las células se desprenden del tejido original

Es importante señalar que el cáncer constituye hoy en día un problema de salud pública, no únicamente en México sino en todo el mundo. En nuestro país, ocupó en el 2001 el 2º lugar como causa de mortalidad, siendo el responsable del 12.7% del total de muertes ocurridas en ése año (8).

Los tumores malignos exigen cada vez estructuras hospitalarias más complejas, tecnologías avanzadas de diagnóstico y tratamientos con fármacos más eficaces y menos tóxicos, además de económicos (9).

La quimioterapia ha ocupado un lugar preponderante en el tratamiento de la mayoría de los tumores humanos. De modo que usada en combinación con otras terapias como cirugía, radioterapia o más recientemente con inmunoterapia, hormonoterapia, aumenta el éxito en el tratamiento de una extensa variedad de tumores. La quimioterapia provee al oncólogo de un medio de ataque a las metástasis y microfocos de tumores que permanecen después de una terapia local (7).

En el desarrollo de investigaciones y programas clínicos el enfoque usado es la búsqueda de nuevos fármacos altamente selectivos y menos tóxicos (10).

2.- ASPECTOS MOLECULARES DE LA CARCINOGENESIS: ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMOR

Los genes implicados en la carcinogénesis se dividen en dos amplias categorías: genes supresores de tumor y oncogenes. Los genes supresores de tumor codifican proteínas que restringen el crecimiento celular y evitan que las células se malignicen (11).

Pronto se comprobó que las células poseen varios genes, ahora conocidos como protooncogenes, con potencial para alterar las actividades propias de la célula y llevarla hacia el estado maligno. Los protooncogenes codifican proteínas que tienen funciones diversas en las actividades normales de una célula. Los protooncogenes pueden convertirse en oncogenes (activados) de diferentes maneras:

- a) El gen puede sufrir mutaciones de modo que se alteran las propiedades del producto del gen y ya no puede efectuar su actividad normal.
- b) Una mutación en alguna secuencia reguladora cercana puede alterar la expresión del gen, de modo que el producto del gen es demasiado poco o excesivo.
- c) Por una traslocación de ADN desde un sitio distante del genoma hasta un punto muy próximo del gen, lo que puede alterar la expresión del gen o la naturaleza del producto del mismo (2).

Los oncogenes, por otro lado, codifican proteínas que promueven la pérdida de control del crecimiento y la conversión de una célula a un estado maligno.

Puesto que la mayor parte de los tumores contienen alteraciones tanto en los genes supresores de tumor como en los oncogenes, al parecer la pérdida de las funciones de un supresor de tumor dentro de la célula normalmente no es suficiente, por sí mismo, para que la célula sufra un proceso de conversión maligna. En la mayor parte de los casos, la pérdida de las funciones del supresor de tumor debe acompañarse de la conversión de un protooncogen en un oncogen antes que las células se malignicen por completo (12). Aún entonces, la célula no

muestra todas las propiedades requeridas para invadir a los tejidos que la rodean o para formar colonias secundarias por metástasis, si no que puede requerir mutaciones oncogénicas adicionales para configurar el fenotipo completo que ponga en riesgo la existencia del individuo. En general, el número de genes alterados aumenta paralelamente con la evolución de la malignización del tumor. Los estudios de carcinoma colo-rectal indican, por ejemplo que se requieren mutaciones hasta de cuatro a seis genes diferentes para el desarrollo de un tumor completamente maligno (13).

A partir del descubrimiento del gen Rb, son varios ya los genes supresores que se conocen. Desde el punto de vista de sus productos proteicos, hay toda una variedad de funciones a cargo de esta importante categoría de genes. Por ejemplo, los productos de los genes Rb, p53 y wt1 son proteínas nucleares. El producto del gen nf1 es una proteína citoplasmática asociada al complejo GAP/ras, el producto del gen dsc es una proteína de superficie celular (4).

3.- MODELOS ANIMALES EN CANCER

Las ventajas del ratón sobre otros animales experimentales incluyen la capacidad de manipular la información genética, tiene un ciclo reproductivo muy corto y los tamaños de las camadas son muy grandes. Por otro lado, el ratón es un animal pequeño, manejable, bien caracterizado y muy usado en el laboratorio. Es una especie que cuenta con muchas cepas consanguíneas diferentes. Además, el conocimiento de la biología del ratón es grande (14).

Para el ratón existe un abundante número de anticuerpos, además se han construido bibliotecas genómicas de éste. Los ratones son relativamente baratos en comparación con otros animales experimentales y su mantenimiento aún en condiciones de alta seguridad es relativamente sencillo. Así mismo es importante hacer notar que la conservación evolutiva nos ha mostrado que tanto los ratones como otros mamíferos son extremadamente similares a los humanos.

La investigación biomédica ha creado animales transgénicos los cuales portan un fragmento de ADN exógeno en su genoma. Esos animales se fabrican usando una

construcción transgénica (plásmido de ADN con la secuencia del gen que se piensa introducir). Todos los organismos cuyo genoma tiene un gen añadido o alterado en sus células (incluyendo a las células germinales), importan el gen nuevo o alterado, son en el sentido estricto de la palabra organismos transgénicos. Los animales *knock out* contienen una mutación dirigida (mutación en un sitio predeterminado) que con frecuencia producirá una delección funcional del gen y el producto, es un animal mutante que carece de la expresión específica de ese gen. Por otro lado un *knock in* es aquél al que se le ha sustituido un gen normal por otro alterado, con mutaciones específicas. Por otro lado, en la técnica de células tallo embrionarias, necesarias para crear animales *knock out*, las únicas células disponibles, hasta muy recientemente han sido las de ratón (13).

Los animales modificados genéticamente han sido usados para estudiar enfermedades como el cáncer. Es bien sabido que determinados factores ambientales, como ciertos agentes químicos, pueden causar cáncer en el hombre. Sin embargo, también ha llegado a ser claro por estudios en modelos experimentales, que hay un fuerte componente genético en el cáncer. El componente genético involucra algunos genes que influyen en la susceptibilidad y la progresión del tumor. El proceso es complejo, ya que involucra un número grande de eventos, en ellos están involucrados varios genes. Como una alternativa, la metodología de los animales transgénicos ofreció la posibilidad de alterar la expresión y la regulación de genes específicos contra un fondo genético constante, abriendo la posibilidad de responder preguntas sobre el cáncer en el ámbito molecular (15).

Se conocen dos clases de genes que influyen en la formación de un tumor: los genes supresores de tumor que controlan la proliferación celular y los protooncogenes que estimulan la proliferación celular (11). Uno de los genes que mejor ha sido estudiado por técnicas transgénicas, es el gen supresor de tumores p53, cuyo producto parece estar involucrado en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

Los ratones que portan un transgen mutante, defectuoso de p53, son mucho más susceptibles a la formación de tumores, que los animales normales. No obstante,

el trabajo con el modelo *knock out* de p53 presenta resultados sorprendentes y aparentemente contradictorios. En la primera publicación sobre ratones *knock out* de p53 se encontró que aunque estos ratones se desarrollaban normalmente, el 75% de ellos presentaron tumores múltiples a la edad de seis meses.

Por otro lado, también se han hecho estudios con el uso de ratones portadores de algunos oncogenes que llevan secuencias reguladoras, que les permiten expresarse en tejidos específicos. Estos ratones han mostrado ser un modelo valioso, en el cual se pueden estudiar tanto los aspectos genéticos y epigenéticos del desarrollo de neoplasias, así como los tumores malignos (15).

Por otro lado existe también una herramienta valiosa como es el modelo ratón desnudo-tumor humano nos da la posibilidad de mantener tumores humanos en estos animales, sin que por ello se pierdan las propiedades bioquímicas y morfológicas originales, permitiendo así estudios sobre la biología tumoral y la respuesta a tratamientos (16,17).

El valor del modelo de tumor humano xenotransplantable depende de las características del tumor original, mismas que deberán ser conservadas. El grado de diferenciación celular y una buena capacidad para invadir y metastatizar son algunas de las propiedades que podrían verse alteradas al exponerse las células tumorales a un nuevo ambiente (10).

En vista de la relativa resistencia del huésped a la xenotransplatación y la posterior metástasis, los factores como el sitio de trasplatación, el tiempo de exposición del huésped al tumor, el origen y la naturaleza de las células tumorales, así como el estatus microbiológico, inmunológico y genético, son críticos (10).

Los tumores trasplantados subcutáneamente en el ratón desnudo produce metástasis, así como ha sido demostrado que una administración intraperitoneal es seguida por una carcinosis progresiva ascítica, con una invasión regional, además de metástasis pulmonar y mediastinal.

En suma, muchos estudios reportan una ocurrencia relativamente alta de tumores metastáticos derivados de los métodos de mantenimiento en serie de trasplantes sólidos y de las líneas celulares tumorales cultivadas *in vitro*.

Los datos de mayor incidencia de metástasis fueron obtenidos empleando ratones desnudos de 6-8 semanas. La combinación de su baja respuesta inmunológica, aunado con su práctico manejo y mantenimiento, provee claras ventajas para la experimentación de tumores humanos (4). Por lo anterior, esta especie nos sirve como un mejor predictor de la respuesta de un tumor humano que el modelo establecido de trasplante de sistemas tumorales murinos en ratones singénicos, lo que permite evaluar además no sólo la actividad del fármaco propuesto, sino encontrar el mejor esquema de tratamiento para su posible empleo en la clínica humana (18, 19).

Los ratones pueden ser útiles, no sólo para el estudio del desarrollo de tumores, sino también al estudiar el efecto de compuestos químicos y fármacos que tengan, ya sea un potencial promotor de tumores o bien, todo lo contrario.

La aplicación de estos ratones en la investigación biomédica aumenta cada día, con especial énfasis en el cáncer, enfermedades producidas por organismos patógenos y enfermedades degenerativas (13).

CAPÍTULO II.

1.- APOPTOSIS COMO UN MECANISMO DE MUERTE CELULAR

El mecanismo de muerte celular involucra a la apoptosis y a la necrosis. La apoptosis difiere de la necrosis (muerte celular degenerativa) por su morfología bioquímica e incidencia. Todas las células normales o cancerosas están equipadas para morir por apoptosis. El proceso de apoptosis o muerte celular programada se puede describir como una desintegración de la célula en sus varios componentes en una secuencia ordenada de eventos, los cuales permiten que la célula sea removida por fagocitosis y endocitosis por sus células vecinas (20, 21). La necrosis es caracterizada por la pérdida de regulación osmótica e inflamación de organelos llevando a una lisis celular. El englobamiento de células vecinas y un proceso inflamatorio usualmente acompaña a la necrosis.

Algunos de los principales cambios morfológicos y bioquímicos que diferencian la apoptosis de la necrosis se muestran en el cuadro 2 y 3.

CUADRO 2. PRINCIPALES CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LA APOPTOSIS Y DE LA NECROSIS

APOPTOSIS	NECROSIS
Deformación de la superficie de la membrana sin la pérdida de su integridad	Daño a la membrana y pérdida de la integridad, seguido de un flujo iónico incontrolado
Disminución del tamaño y pérdida del anclaje celular.	Inflamación celular
Formación de cuerpos apoptóticos	Lisis celular
Fagocitosis por macrófagos y endocitosis por células normales adyacentes.	Fagocitosis por macrófagos
Reducción del tamaño nuclear con condensación de cromatina y desintegración nuclear	Agregación de la cromatina nuclear y desintegración
No hay respuesta inflamatoria	Reacción inflamatoria aguda
Afecta a células individualmente	Afecta grupos de células

CUADRO 3. ALTERACIONES BIOQUIMICAS DE LA APOPTOSIS Y LA NECROSIS

APOPTOSIS	NECROSIS
Inducidas por estímulos fisiológicos y regulados genéticamente por oncogenes y genes supresores de tumores	Como un resultado del daño celular no hay una perturbación fisiológica del medio ambiente celular
Procesos de regulación que involucran las vías de señalización	No hay evidencia que involucre las vías de señalización
Estimula el calcio y la activación de las caspasas	Entrada incontrolada de calcio con activación de nucleasas y fosfolipasas
Característica fragmentación oligonucleosomal del ADN	Desintegración al azar del ADN
Requiere producción de energía de la célula	No requiere energía, carencia de producción de ATP y generación de radicales libres

En el proceso de apoptosis un número de iniciadores y promotores están involucrados, sus efectos en las células son frecuentemente dependientes del tipo celular. Morfológicamente el proceso de apoptosis está caracterizado por una condensación nuclear, fragmentación nuclear y finalmente endocitosis por las células vecinas. Subsecuentemente para descargar el contenido celular al espacio extracelular y además prevenir una respuesta inflamatoria y lisis para las células vecinas (22).

El proceso de apoptosis puede ser disparado por factores intrínsecos como por ejemplo, una señal que altere la regulación de calcio o mediación de ceramidas y por factores celulares extrínsecos, como el bloqueo de los receptores de la superficie celular o eliminación de los factores de crecimiento.

Un daño reparable al ADN por agentes citotóxicos, radiación ionizante, retiro de factores de crecimiento u oxidantes pueden también disparar la activación del

mismo ejecutor de las caspasas por medio de la regulación mitocondrial. Estos eventos postmitocondriales son regulados por miembros de la familia de las proteínas Bcl-2 y resultan en la liberación de citocromo C, lo que induce ATP o formación de ATP dependiente de caspasa 9 y Apaf-1.

El ejecutor de las caspasas 3, 6 y 7 fragmenta e inactiva proteínas que son requeridas en el mantenimiento de la homeostasis celular así mismo activa endonucleasas que promueven un desensamble de la cromatina y finaliza con una fragmentación del ADN cromosomal.

La muerte celular por apoptosis no siempre involucra la activación de las caspasas, aunque son un factor fundamental en la eliminación de las células apoptóticas.

La disminución del tamaño celular y la deformación de la membrana junto con el progreso de la muerte por apoptosis con la presencia de Z-VAD-FMK (un inhibidor de las caspasas), son ejemplo de una muerte celular por apoptosis independiente de caspasas (23).

Además, se ha demostrado que los protooncogenes como c-Myc y el gen supresor de tumor p53 están involucrados en la regulación apoptótica.

Siguiendo el tratamiento con quimioterapia (cisplatino-etopósido), se ha observado que p53 se incrementa, resultando en un arresto en G1 y una inducción a la apoptosis. Adicionalmente otros factores intracelulares contribuyen en la mediación de la apoptosis en algunas células, como es el caso de la esfingomielina/ceramida las cuales se incrementan durante la apoptosis por agentes quimioterapéuticos (2).

2.- LA APOPTOSIS COMO MECANISMO DE EVALUACIÓN DE COMPUESTOS ANTITUMORALES

La apoptosis es un mecanismo genético mediador de la muerte celular que puede ser provocado por varios factores intra y extracelulares. La pérdida de la regulación de la apoptosis ha sido asociada en condiciones degenerativas como por ejemplo: enfermedades vasculares, sida y desarrollo de neoplasias.

Un número de oncogenes y genes supresores de tumores: c-myc, p53, BAX, Bcl-2 son conocidos por estar involucrados en este proceso de muerte celular.

La quimioterapia inductora de apoptosis involucra varios mecanismos. Es un proceso que regula negativamente el crecimiento, donde el tipo de células cancerígenas tratadas y el compuesto empleado pueden influenciar el proceso.

Así mismo la participación del sistema CD95L, la señalización de p53, las proteínas de la familia Bcl-2 y las vías de la esfingomielinas/ceramidas son usadas por varios agentes quimioterapéuticos para inducir la apoptosis.

Los agentes químicos, radiaciones o cambios en el medio ambiente celular son factores extracelulares que pueden también disparar la muerte celular por apoptosis. Además para interferir con el ciclo celular de la proliferación de las células los agentes quimioterapéuticos pueden provocar la apoptosis e inhibir el desarrollo de cáncer (24).

La liberación de citocromo C por la mitocondria y la cascada de las caspasas involucradas en el proceso de la apoptosis han sido identificados independientemente del agente quimioterapéutico usado.

Aspectos como: a) Si la apoptosis influye en la resistencia del tumor a la quimioterapia o b) La posibilidad de inducir la acción de la apoptosis selectivamente en células tumorales están todavía bajo investigación.

Adicionalmente al tipo celular, se han observado diferencias en las proteasas involucradas en la muerte celular por apoptosis con agentes antitumorales y que proveen una posibilidad para el uso de agentes quimioterapéuticos que induzcan selectivamente la muerte celular por apoptosis (22).

La exposición de las células a agentes quimioterapéuticos resulta en un daño a los componentes celulares, como son el ADN o los microtúbulos. La célula reconoce la severidad del daño, evalúa tener un crecimiento lento y reparar el daño o entrar a apoptosis.

Hay una evidencia cada vez mayor que indica que la forma mitocondrial de la activación de las caspasas juega un papel determinante en la muerte celular inducida por agentes quimioterapéuticos.

La activación del ejecutor de caspasas 3, 7 y 6, así como en las caspasas 2, 9 y en algunos casos la 8 han sido identificadas que en quimioterapia inducen apoptosis.

El cisplatino y sus análogos inducen la muerte por apoptosis, en algunos casos estos agentes pueden interferir en el ciclo celular causando un retraso en el tránsito de la fase S. El tratamiento con cisplatino también ha probado que induce apoptosis a través de la activación de p53 en células de carcinoma de ovario (25).

El tratamiento del cáncer mediante radio y quimioterapia produce daño extenso en el ADN celular, así como las correspondientes señales para la inducción de p53 en esas células. Hoy se tiene bajo investigación si la apoptosis por p53 es la moduladora de gran parte de la respuesta efectiva a estos tratamientos. Se ha observado que los tumores portadores de un gen p53 intacto, al inducir apoptosis en sus células como respuesta a la agresión del tratamiento, responden mejor al mismo que aquellos tumores con p53 mutado, precisamente por que inducen la muerte de sus células malignas. Cuando los tumores son refractarios se hacen resistentes a la terapia contra ellos, este hecho se correlaciona generalmente con la adquisición de mutaciones en p53. Aquellos tumores que responden pobremente a la radio y quimioterapia tienen generalmente mutaciones en p53 (13).

Sin embargo, la realidad clínica es más compleja que estas observaciones y no siempre se da una correlación tan clara entre el estatus del gen p53 y la respuesta a estos tratamientos antineoplásicos, pues como es de esperarse de estas respuestas es difícil excluir el aporte de otros genes involucrados, así como lo que significa el cambio de ambiente celular que también se produce como resultado de

tratamientos tan agresivos como estos, y otros muchos factores aún desconocidos.

En suma, el papel de la p53 en la inducción de apoptosis con agentes quimioterapéuticos está actualmente bajo intensa investigación (4).

Además en vista de que la evidencia confirma que los agentes quimioterapéuticos matan a las células por apoptosis, una posibilidad es investigar si las Casiopeínas podrían específicamente disparar la cascada de la apoptosis (13, 4).

En el cáncer la apoptosis es un proceso regulador negativo del crecimiento que puede variar con el tipo de tumor y puede ser usado como un predictor de radio sensibilidad o respuesta clínica a quimioterapia. Así la regulación de este proceso por quimioterapéuticos provee una poderosa herramienta contra el cáncer (26).

3.- GEN p53

Este gen, que está situado en el cromosoma 17 del genoma humano, codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 Kd que en nuestra especie tiene 393 aminoácidos.

La proteína p53 tiene capacidad de unión específica al ADN, así como también capacidad de activar la transcripción de genes "reporteros" adyacentes a su sitio de unión al ADN, siendo su forma de reconocimiento a esta molécula la de un tetrámero.

Las mutaciones en el gen p53 constituyen la alteración genética más común en el cáncer humano (más del 70% de estos tienen mutaciones en este gen) seguida de la activación de los oncogenes myc y ras.

El gen p53 se caracteriza por presentar diferentes tipos de mutaciones, la gran mayoría de cambio de pares de base, que han causado la pérdida de la capacidad supresora del gen. En contraste con el gen Rb, que en estado mutado no produce proteína, el gen p53 mutado produce una proteína alterada o defectuosa que tiene una mayor estabilidad que la normal. Es por esto que en los tumores, una de las maneras de detectar mutaciones en el gen p53 es midiendo la presencia de

proteína p53 mutada, aquella que es el producto del gen mutado, que se expresa a niveles más elevados y con una vida media mayor que la proteína normal.

Todas las mutaciones en este gen hacen que su producto pierda la capacidad de unión al ADN, y también cambian la conformación global de la proteína p53.

Hasta ahora, la mayor parte de la información que se conoce sobre p53 deriva de estudios *in vitro*, así como de estudios en animales transgénicos. Sin embargo, la existencia de la enfermedad de Li-Fraumeni, que es un síndrome de cáncer familiar en el que los pacientes revelan predisposición al cáncer en distintas localizaciones específicas, parece obedecer a la presencia de mutaciones germinales humanas en p53 (13, 26, 27).

4.- FUNCION DE p53

La proteína p53 es una proteína reguladora del proceso de la proliferación celular. El modelo general que explica la función de p53, postula que esta proteína se une a sitios específicos en el ADN que la reconocen en forma de tetrámero estimulando la transcripción de determinados genes, que se sabe realizan parte de las funciones dependientes de p53 en una célula.

La exposición a rayos gamma o a fármacos citostáticos causa que las células normales aumenten la expresión de p53 y detengan el ciclo celular hasta que el daño se repare.

Normalmente en una célula, la proteína p53 se mantiene a bajas concentraciones, debido a su relativa corta vida media (alrededor de 20 minutos) (28). Las señales que parecen activar el aumento de la expresión de p53 están todas relacionadas con algún tipo de estrés para las células. Frente a estas señales, se incrementa el tiempo de vida media de esta proteína, probablemente a partir de un aumento en su fosforilación, así como en un incremento en la velocidad de iniciación de su traducción (o síntesis proteica a partir de su ARN mensajero específico). Hoy se han identificado algunas de estas señales de peligro, entre las cuales figuran la ocurrencia de diferentes tipos de daños al ADN, la aparición de hipoxia, etc. (27, 28).

En cambio, las células con p53 mutado continúan dividiéndose. Un tumor en pleno desarrollo tiene a sus células en estrés, ya que estas experimentan anoxia y aneuploidía. En cambio, células estresadas con p53 mutado, expresarían la proteína mutada, carente de la acción supresora de la proliferación, lo cual permitiría al tumor su futura expansión. Las células con p53 mutado, aunque estén en estrés "fisiológico" que impone el tumor, actúan como si no lo percibieran y continúan dividiéndose.

Actualmente se conoce que p53 gobierna la ocurrencia de dos vías principales en la célula con estrés: la detención del ciclo celular y la apoptosis. El hecho de que la célula se decida por uno u otro camino depende de diversos factores que recién se empiezan a conocer.

Todos estos controles se pierden obviamente en los tumores en los que el gen p53 se encuentra en estado mutado (29).

El gen p53 ha sido llamado el "guardián del genoma" por lo siguiente:

- a) En células normales, no hace falta p53 para regular la división.
- b) Cuando ocurre daño a nivel del ADN en células normales con p53 intacto, aumentan los niveles de esta proteína y la célula se detiene en G1. En la respuesta de una célula normal al daño en el ADN, se induce la función de "guardián del genoma" de p53. Al detenerse la proliferación hay tiempo para que ocurra la reparación del ADN. De fallar la reparación, entonces p53 desencadena la apoptosis o muerte celular programada, y la célula induce la desintegración de su genoma con su muerte consiguiente.
- c) Cuando ocurre daño al ADN en células tumorales, no se induce p53 normal, por que el gen está inactivado por mutación unido a proteínas virales o celulares, entonces no se produce detención del ciclo en G1, y si ocurre división celular con daño lo cual determina fijación de la mutación, aneuploidía e inestabilidad genómica creciente (13, 4, 28).

5.- Gen Bcl-2

El gen Bcl-2 fue identificado por primera vez en un linfoma de células B-2, motivo al que se debe su nominación.

La proteína Bcl-2 es una molécula integral de membrana de 26 kD que ha sido localizada en la membrana externa de las mitocondrias, en retículo endoplásmico liso y en la envoltura perinuclear (30; 31).

Bcl-2 se caracteriza funcionalmente por inhibir la muerte celular programada y no por estimular la proliferación celular, es capaz de inhibir la apoptosis inducida por glucocorticoides y radiación con rayos X, privación de factores de crecimiento o la muerte asociada a procesos de diferenciación celular (32; 33). Sin embargo no puede afirmarse que este efecto sea generalizado, dado que Bcl-2 no inhibe la muerte de ciertas líneas celulares posterior a la privación de determinados factores de crecimiento o mediante activación a través de ciertos receptores (32; 34, 35). Estudios de mutagenicidad dirigida en el gen Bcl-2 indican que su función inhibitoria de apoptosis, así como su capacidad de interactuar con otras proteínas, se encuentra localizada principalmente en dos dominios conocidos como BH1 y BH2 (33). Además BH1 y BH2 son dos dominios altamente conservados que definen toda una familia de genes relacionados con Bcl-2 (36, 37).

La distribución tisular de Bcl-2 es amplia. Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha detectado su expresión en órganos linfoides, hematopoyéticos, tiroides, próstata, intestino delgado, páncreas, sistema nervioso y riñón (38; 39).

El patrón de expresión tisular de Bcl-2 está restringido principalmente a los tejidos que se caracterizan por requerir una supervivencia a largo plazo. Sin embargo, su expresión en las neuronas del sistema nervioso central es baja y no se observa en células con una supervivencia larga, como las células musculares y los hepatocitos (40).

Posteriormente se ha descubierto la existencia de otros genes capaces de realizar funciones similares en diferentes tejidos. En este sentido se han aislado múltiples genes relacionados estructuralmente y/o funcionalmente con Bcl-2.

Esta familia de genes conocida como familia de Bcl-2 comprende hasta el momento actual: Bcl-X, mcl-1, bax, A1/bfl-1, bak, bad y bik (41; 42). La función de estos genes es contradictoria en ocasiones desde el punto de vista de la protección frente a la apoptosis (Cuadro 4).

CUADRO 4 FAMILIA DE Bcl-2

Gen	Efecto sobre la apoptosis
Bcl-2	Inhibición
Bcl-XL	Inhibición
Bcl-Xs	Inducción
mcl-1	Inhibición
bax	Inducción
A1/bfl-1	Inhibición
bak	Inducción
bad	Inducción
bik	Inducción

La liberación del citocromo C, el cual, es esencial para la activación de enzimas proteolíticas llamadas caspasas, es el primer paso que se requiere para que se lleve a cabo el proceso apoptótico.

El principal mecanismo que estimula la muerte celular es el daño a la mitocondria, donde se libera citocromo C de la mitocondria al citosol. El citocromo C está ligado a Apaf-1, como consecuencia activa la habilidad de ésta para promover el proceso autocatalítico de la pro-Caspasa 9 iniciando con ésto la cascada de las caspasas apoptóticas.

Acorde con esta propuesta, los miembros de la familia pro-apoptótica de Bcl-2 inducen daño mitocondrial, desencadenando la liberación de Citocromo C, ya que Bcl-2 y sus homólogos previenen este proceso (28).

El punto de revisión central en la apoptosis es la activación de la Caspasa 9 por la mitocondria. Recientemente se ha demostrado que las células en apoptosis, incluso antes de que comiencen a aparecer cambios a nivel nuclear, muestran poros en la membrana mitocondrial, responsables de la reducción de su potencial transmembranal (43).

La formación de estos poros en las mitocondrias coincide con la aparición de fenómenos apoptóticos en el núcleo (28).

CAPÍTULO III.

1.- COMPUESTOS CON COBRE COMO FÁRMACOS ANTITUMORALES.

Para la obtención de compuestos con posible actividad antineoplásica, se han considerado complejos que contengan metales esenciales con toxicidad relativamente baja, como los compuestos de cobre que han sido informados como poderosos agentes antitumorales (44, 45, 46).

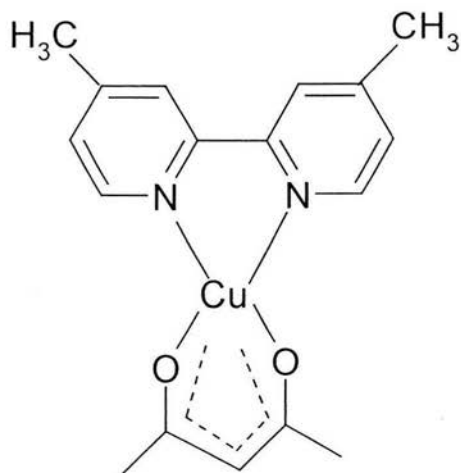
Los compuestos de cobre (Cu) II muestran actividad citostática y citotóxica considerable contra líneas celulares tumorales *in vitro*, estos incluyen el melanoma B16 y leucemia L1210 de células murinas (47).

En 1975, la Dra. Lena Ruiz de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, inició un proyecto encaminado al desarrollo de fármacos antineoplásicos a partir de metales esenciales de transición, con el propósito de disminuir su toxicidad y costo. Posteriormente, se trabajó en la idea de sintetizar compuestos con variantes estructurales tales, que permitieran la selectividad antitumoral (48). Tales compuestos reciben el nombre de Casiopeínas® (49).

A la fecha se han sintetizado y caracterizado más de 100 compuestos con base a los resultados alentadores en los experimentos *in vitro* (50) y se procedió al desarrollo de los ensayos *in vivo* (51) probando algunos de estos compuestos, los cuales se han agrupado en 10 subfamilias. Para la realización de este trabajo se empleó la Casiopeína III-ia cuya fórmula es: [Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetato)] NO₃ Fig. 1 (46).

La dosis letal 50 (DL₅₀) en ratón es de 24.68 mg/Kg. vía intraperitoneal y una vida media de 12.46 h. La Casiopeína III-ia ha demostrado tener propiedades antineoplásicas en modelos tumorales murinos transplantables (45, 52, 53).

Figura 1 Estructura de la Casiopeína III-ia



El desarrollo de fármacos requiere de modelos animales para su evaluación preclínica y a este respecto, a mediados de los 50's el National Cancer Institute, (NCI) instituyó el Cancer Chemotherapy National Center para desarrollar a gran escala un programa de cernimiento, donde se evalúan todos los compuestos que puedan ser candidatos para estudios toxicológicos en animales (roedores, perros, gatos, cerdos, etc.) y posteriormente en intentos clínicos (54). Dicho programa consiste en un panel de cernimiento primario, donde se debe demostrar actividad antineoplásica en al menos un tipo de tumor murino de: colon, mama, pulmón, leucemia o melanoma; y/o paralelamente en tumores humanos de: colón, mama y pulmón.

Desde 1976, este programa ha incluido xenotransplante de tumores humanos en el ratón desnudo en un esfuerzo para determinar la aplicación de éste modelo para la selección de fármacos útiles clínicamente (10, 55).

Por lo que en el presente protocolo se propone ensayar con dicha Casiopeína en los siguientes tumores humanos:

MCF7: Carcinoma de mama.

C33: Carcinoma cérvico-uterino.

Por lo anterior es evidente que la búsqueda de nuevos compuestos con actividad anticancerígena es un esfuerzo justificado dada la importancia de éste grupo de enfermedades en el mundo entero.

En nuestro país, este problema cobra una mayor relevancia ya que la quimioterapia antitumoral es en su mayoría de importación acrecentando aún más los costos, lo cuál los hace inaccesibles a amplios sectores de la población, por lo que el desarrollo de productos antineoplásicos con tecnología mexicana adquiere una gran prioridad. Además de que puede ser un campo de investigación importante en nuestro país.

OBJETIVOS

- Lograr el cultivo de las líneas celulares elegidas en este protocolo.
- Implementar la técnica de xenotransplante de tumores humanos en el ratón desnudo propuesta por el National Cancer Institute, (NCI), U.S.A.
- Evaluar la actividad antitumoral de la Casiopeína III-ia *in vivo*.
- Identificar histológicamente lesiones en órganos después de la administración de la Casiopeína III-ia en base al esquema propuesto.
- Observar a través de técnicas inmunohistoquímicas si la Casiopeína III-ia induce cambios en la expresión de p53 y Bcl-2.

HIPÓTESIS

- Si la Casiopeína III-ia mostró actividad antineoplásica en modelos tumorales murinos, también la mostrará en ratones atímicos con tumores humanos xenotransplantados de carcinoma cérvico-uterino C33 y de adenocarcinoma de mama MCF7.

CAPÍTULO IV.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Fármaco y Cultivos Celulares

Se empleó con un lote de Casiopeína III-ia sintetizado, purificado y caracterizado conforme al proceso descrito en las patentes (49). Las líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino C33 y adenocarcinoma de mama MCF7 fueron adquiridas del American Type Culture Collection (56) y propagadas en el "Laboratorio de Cultivo de Tejidos" de la Unidad de Experimentación Animal, Facultad de Química, UNAM.

Medios de Cultivo: El adenocarcinoma de mama (MCF7) se cultivó en 90% de medio Eagle's modificado por Dulbecco con aminoácidos no esenciales con piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino. El carcinoma de cérvix (C33) se cultivó en 90% de medio Eagle's modificado por Dulbecco con aminoácidos no esenciales y 10% de suero fetal bovino. (56)

2.- Animales

Se emplearon 17 ratones atímicos *nu/nu* desnudos machos de 6 semanas de edad, con un peso mínimo de 15 g adquiridos a Harlan, Inc.

Los animales fueron mantenidos en microaisladores y bajo las siguientes condiciones: la temperatura se mantuvo a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa en 55%. Los ciclos luz-oscuridad fué de 12/12 hrs., se proporcionó alimento fórmula para roedores 2018-S y agua, ambos estériles *ad libitum* (57).

3.- Ensayos Antitumorales *in vivo*

Las líneas celulares humanas xenotransplantables de carcinoma cérvico-uterino C33 y adenocarcinoma de mama MCF7 se inocularon en los ratones atímicos subcutáneamente en la región inguinal. Las células se tripsinizaron y resuspendieron en DMEM sólo antes de la inoculación (10^6 células/0.1 ml).

Se consideró como el día 0, cuando el tumor alcanzó un volumen palpable de 3 mm, los ratones fueron colocados aleatoriamente en los grupos testigo negativo (5 ratones), testigo positivo Cisplatino (6 ratones), y tratados Casiopeína III-ia (6 ratones).

Todos los grupos recibieron un mismo esquema de tratamiento (los días 0, 7, 14, 21) y la dosificación fue de 6 mg/kg de peso corporal/inyección intraperitoneal en los grupos tratados de Casiopeína III-ia, de 3.5 mg/kg de peso corporal/inyección intraperitoneal para el testigo positivo (cisplatino) y el testigo negativo recibió como placebo (Sol. Salina fisiológica). A los animales se les midió el tumor mediante un calibrador Vernier tres veces por semana.

Se midió los siguientes parámetros para evaluar la actividad antitumoral del fármaco (54, 55):

3.1 Volumen Tumoral: $Vol. = a b^2 \pi /6$

Donde a = Largo del tumor b = Ancho del tumor.

3.2 Volumen Relativo del Tumor: Enseguida se calculó el VRT los días 0, 7, 14, 21, 28, mediante la siguiente fórmula:

$$VRT = Vol. \text{ al día } (n) / Vol. \text{ al día } 0 \times 100$$

El valor anterior indico el porcentaje de incremento en los días indicados.

3.3 Función Antitumoral: Así mismo se midió la función antitumoral del fármaco mediante la siguiente fórmula:

$$FA = T \text{ tratados} / C \text{ testigos} \times 100$$

Dónde: T = VRT del grupo tratado

C = VRT del grupo testigo

Para probar que el fármaco funciona, dicho índice debe ser menor a 42%.

3.4 Retraso del Crecimiento o Inhibición del Crecimiento:

Retraso del crecimiento = D tratados – D testigos

D: Tiempo que le toma al tumor doblar su volumen (días)

Retraso del crecimiento específico = D tratados- D testigos / D testigos

El retraso específico del crecimiento es la variable que indico la actividad antitumoral. Para considerar que el fármaco posee potencial antitumoral, el valor de este índice debe ser igual o mayor a 2.

4.- Histología

El día 28 se sacrificaron los 34 ratones y se recolectaron los siguientes órganos: Hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón, intestino delgado, encéfalo y el tumor. Los órganos fueron fijados en formalina al 10% amortiguada por un tiempo no mayor a 72 hrs. Una vez fijados los órganos se procesaron de forma automática en Histoquinett, posteriormente se procedió a la inclusión en parafina, se hicieron los cortes de 2 micras, se colocaron en laminillas y fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. Por último con ayuda de un microscopio de luz se examinaron núcleo celular y citoplasma para evaluar los cambios citológicos con relación a la respuesta al tratamiento en cada uno de los grupos (58, 59).

5.- Inmunohistoquímica

Para la realización de la inmunohistoquímica se empleó el anticuerpo monoclonal para p53 marca DAKO No. Catálogo M7001 y para Bcl-2 el anticuerpo monoclonal marca DAKO No. Catálogo M0887.

A partir de las muestras fijadas en formalina amortiguada e incluidas en parafina, se realizaron cortes de 2 micras y se colocaron en laminillas. Se desparafinaron y rehidrataron con pases de xilol hasta agua destilada en un tren de tinción. Posteriormente se llevó a cabo la recuperación antigénica, en olla de presión con horno de microondas durante 20 min a alto poder. Las laminillas se dejaron enfriar por 20 min, éstas se lavaron con solución amortiguada de fosfatos a un pH 7 durante 5 min. El bloqueo de peroxidasas se realizó con H_2O_2 al 3 % por 5 min. Nuevamente se lavó con solución amortiguada de fosfatos y se adicionaron los anticuerpos primarios por 30 min a temperatura ambiente y se lavaron las laminillas con solución amortiguada de fosfatos durante 5 min. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario biotinilado y se mantuvo por 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron las muestras y se le agregó el complejo estreptovidina conjugada con peroxidasas por 15 min a temperatura ambiente, se lavaron las muestras con solución amortiguada de fosfatos y se les adicionó el cromógeno por 5 min a temperatura ambiente. Se lavaron con solución amortiguada de fosfatos y se tiñeron con hematoxilina por 2 min se lavaron y se deshidrataron desde H_2O hasta xilol en el tren de tinción. Se cubrieron con resina y cubreobjetos para su observación.

CAPÍTULO V.
RESULTADOS

**1.- RESULTADOS DE LA LÍNEA DE CARCINOMA
CÉRVICO-UTERINO C33**

Los resultados para la línea tumoral C33 son los siguientes:

1.1 Volumen Relativo del Tumor

Vol. Relativo del Tumor	Testigo Negativo	Cisplatino	Casiopeína III-ia
Día 7	907.1414	293.5264	456.9551
Día 14	3322.355	815.937	1114.013
Día 21	3040.976	2692.656	3192.204
Día 28	4221.193	3310.979	4697.296

1.2 Función Antitumoral

Función Antitumoral (%)	Cisplatino	Casiopeína III-ia
Día 7	32.36	50.37
Día 14	24.55	33.53
Día 21	88.54	104.97
Día 28	78.43	111.27

1.3 Promedio de Días en que Dobra su Volumen el Tumor

Testigo Negativo	Cisplatino	Casiopeína III-ia
2.00	2.88	2.10

1.4 Inhibición del Crecimiento

I.C. Cisplatino	I.C. Casiopeína III-ia
.3035	.0448

2.0 RESULTADOS HISTOLÓGICOS DE LOS RATONES XENOTRANSPLANTADOS CON CARCINOMA CÉRVICO-UTERINO C33

A los animales se les sacrificó el día 28, esto es 8 días después del último tratamiento, evaluándose los siguientes órganos: encéfalo, corazón, pulmón, hígado, bazo, intestino, riñón y tumor.

A la inspección externa la única signología anormal fue la emaciación a medida que avanzaban los tratamientos, con excepción de la masa tumoral.

Las lesiones macroscópicas halladas se resumen en el Cuadro 5.

**Cuadro 5 Hallazgos Macroscópicos encontrados en los ratones
xenotransplantados con el carcinoma cérvico-uterino C33.**

Lesiones Macroscópicas	Testigos No. de casos	Cisplatino No. de casos	Casiopéina III-ia No. de casos
Hepatomegalia moderada	0/5	1/6	3/6
Esplenomegalia moderada	0/5	1/6	4/6
Congestión general	0/5	2/6	3/6
Adherencias en asas intestinales	0/5	0/5	3/6
Ascitis moderada	0/5	1/6	3/6

Las lesiones microscópicas observadas se presentaron siguiendo una distribución de localizada a multifocal y en grado leve. Cuadro 6

Cuadro 6 Hallazgos Microscópicos encontrados en los ratones xenotransplantados con el carcinoma cérvico-uterino C33.

Lesiones Microscópicas	Testigos No. de casos	Cisplatino No. de casos	Casiopéina III-ia No. de casos
Degeneración hidrópica hepática centrolobulillar leve	---	1/6	4/6
Figuras mitóticas anormales en el tumor	---	---	1/6
Necrosis en el tumor	3/6	2/6	4/6
Metástasis en hígado, pulmón	5/6	3/6	5/6

Los principales hallazgos histopatológicos se observaron en hígado con la degeneración hidrópica centrolobulillar, así mismo se encontraron microfocos de metástasis en pulmón e hígado. Los demás órganos no presentaron cambios morfológicos (Fig. 2, 3, 4 y 5).

3.0 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LOS RATONES XENOTRANSPLANTADOS CON CARCINOMA CÉRVICO-UTERINO C33.

Los resultados inmunohistoquímicos revelaron positividad para p53 y Bcl-2, únicamente en el tumor, en los grupos tratados de Casiopéina III-ia y Cisplatino (Fig. 6 y 7).

4.- RESULTADOS DE LA LÍNEA DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MCF7

Los resultados para la línea tumoral MCF7 son los siguientes:

4.1 Volumen Relativo del Tumor

Vol. Relativo del Tumor	Testigos Negativo	Cisplatino	Casiopéina III-ia
Día 7	121.7688	94.626	134.28
Día 14	148.5645	101.0434	158.6638
Día 21	182.0786	126.3031	208.383
Día 28	234.9457	198.7048	221.1808

4.2 Función Antitumoral

Función Antitumoral (%)	Cisplatino	Casiopéina III-ia
Día 7	77.71	110.27
Día 14	68.01	106.79
Día 21	69.36	114.44
Día 28	84.57	94.14

4.3 Promedio de Días en que Dobra su Volumen el Tumor

Testigos Negativo	Cisplatino	Casiopéina III-ia
14.9	19.56	12.64

4.4 Inhibición del Crecimiento

I.C. Cisplatino	I.C. Casiopéina III-ia
.3127	.1516

**5.- RESULTADOS HISTOLÓGICOS DE LOS RATONES
XENOTRANSPLANTADOS CON ADENOCARCINOMA DE MAMA MCF7.**

A los animales se les sacrificó el día 28, esto es 8 días después del último tratamiento, evaluándose los siguientes órganos: encéfalo, corazón, pulmón, hígado, bazo, intestino, riñón y tumor.

A la inspección externa la única signología anormal fue la emaciación a medida que avanzaban los tratamientos, con excepción de la masa tumoral.

Las lesiones macroscópicas halladas se resumen en el Cuadro 7.

**Cuadro 7 Hallazgos Macroscópicos encontrados en los ratones
xenotransplantados con el adenocarcinoma de mama MCF7.**

Lesiones Macroscópicas	Testigos No. de casos	Cisplatino No. de casos	Casiopéina III-ia No. de casos
Hepatomegalia moderada	0/5	1/6	4/6
Esplenomegalia moderada	0/5	1/6	3/6
Congestión general	0/5	2/6	3/6
Adherencias en asas intestinales	0/5	0/5	2/6
Ascitis moderada	0/5	1/6	3/6

Las lesiones microscópicas observadas se presentaron siguiendo una distribución de localizada a multifocal y en grado leve Cuadro 8.

Cuadro 8 Hallazgos Microscópicos encontrados en los ratones xenotransplantados con el adenocarcinoma de mama MCF7.

Lesiones Microscópicas	Testigos No. de casos	Cisplatino No. de casos	Casiopéina III- ia No. de casos
Degeneración hidrópica hepática centrolobulillar leve	---	1/6	3/6
Figuras mitóticas anormales en el tumor	---	---	1/6
Necrosis en el tumor	3/6	2/6	3/6
Metástasis en pulmón e hígado	5/6	4/6	5/6

Los principales hallazgos histopatológicos se observaron en hígado con la degeneración hidrópica centrolobulillar, así mismo se encontraron microfocos de metástasis en pulmón e hígado. Los demás órganos no presentaron cambios morfológicos (Fig. 2, 3y 4).

6.-RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LOS RATONES XENOTRANSPLANTADOS CON ADENOCARCINOMA DE MAMA MCF7

Los resultados inmunohistoquímicos no revelaron positividad para p53 y Bcl-2 en ninguno de los grupos. (Fig. 5 y 6).

Fig. 2. Sección de hígado de ratón con metástasis de carcinoma cérvico-uterino C33 (flechas), tratado con Casiopeína III-ia. (H.E. 10X)

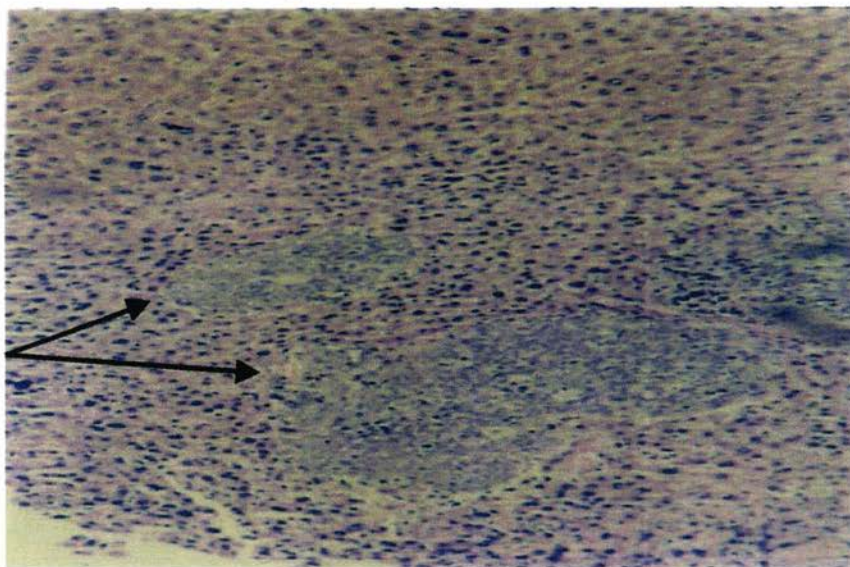


Fig. 3. Sección de pulmón de ratón con metástasis de adenocarcinoma de mama MCF7 (flechas), tratado con Casiopeína III-ia. (H.E. 10X)

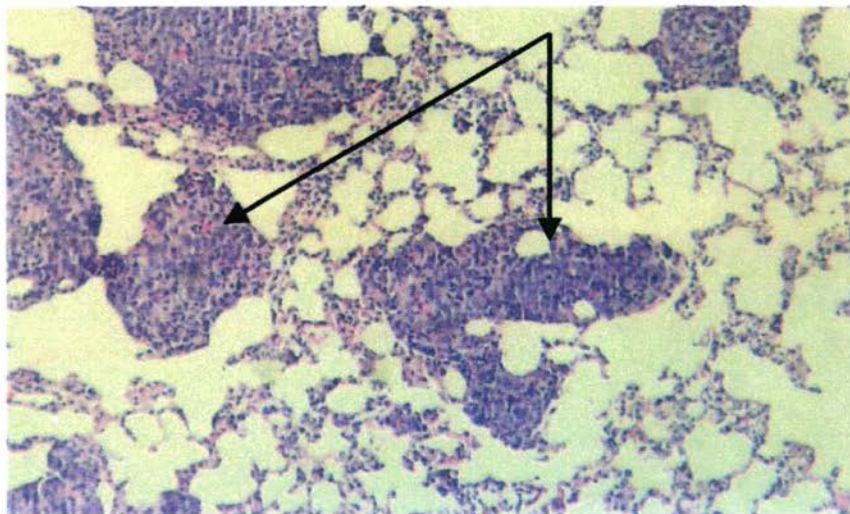


Fig. 4 Sección de hígado de ratón tratado con Casiopeína III-ia, con C33. Las flechas señalan las células parenquimatosas de la región centrolobulillar con degeneración hidrópica. (H.E.10X)

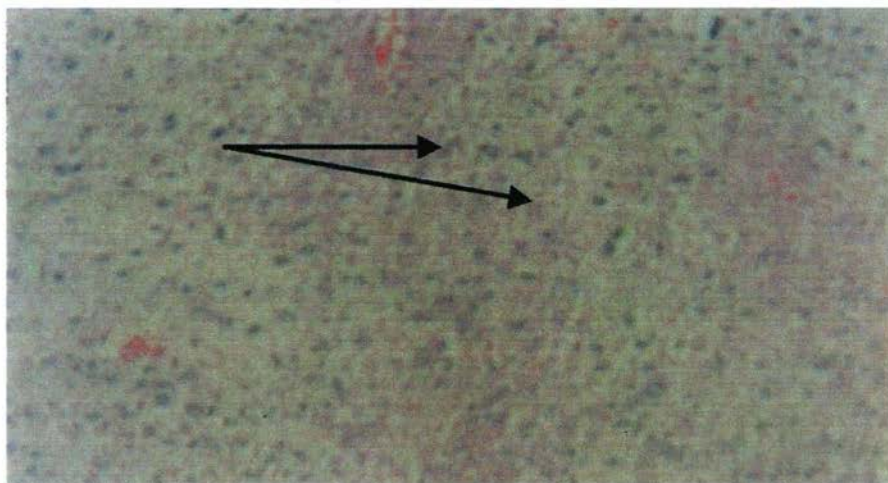


Fig. 6 Sección de carcinoma cérvico-uterino C33 en tejido subcutáneo de ratón tratado con Casiopeína III-ia, donde se aprecia la expresión de p53. (IHQ)

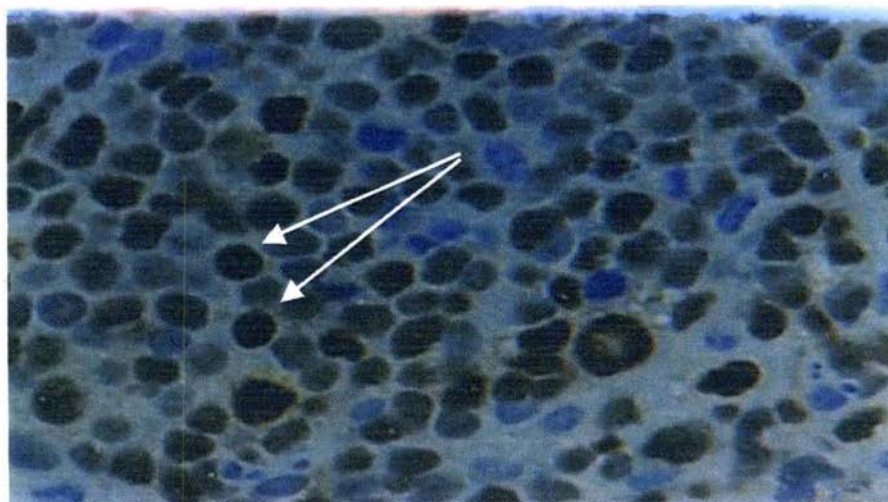
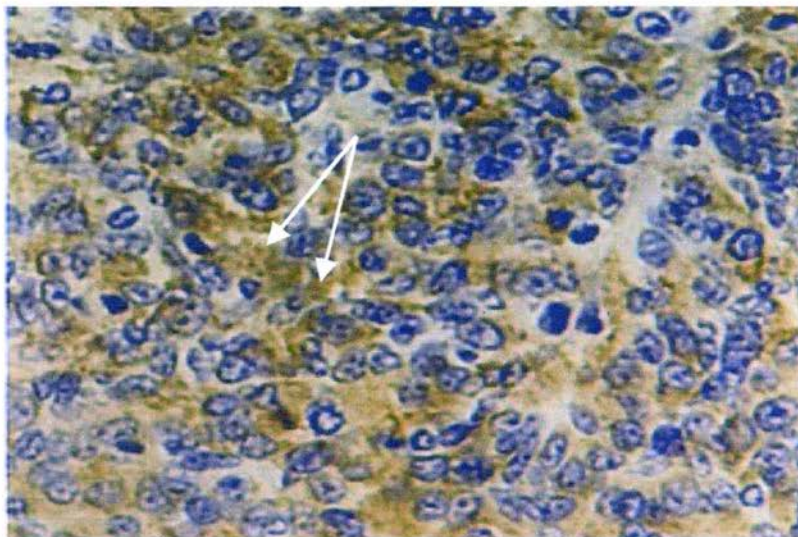


Fig. 7 Sección de adenocarcinoma de mama MCF7 en tejido subcutáneo de ratón tratado con Casiopeína III-ia, en donde se aprecia la expresión de Bcl-2. (IHQ)



CAPÍTULO VI.

DISCUSIÓN

1.- Actividad Antitumoral.

Los resultados indican que la función antitumoral de la Casiopeína III-ia cumple únicamente al día 14. Sin embargo en los días 21 y 28 el índice se incrementa a porcentajes que no muestran actividad. Por lo que se propone disminuir el intervalo de días entre tratamientos e incluso aumentar el número de ellos para intentar que la función antitumoral de la Casiopeína III-ia se mantenga por debajo del 42%. Por otro lado se deberá tomar en cuenta que, a la dosis empleada se observaron ligeros efectos tóxicos, el disminuir los intervalos de tratamiento ya mencionados y desde luego con la consecuente disminución de la dosis, podrán también abatirse los efectos tóxicos observados.

Cabe señalar que el Cisplatino mostró un mejor desempeño en la función antitumoral que la Casiopeína III-ia en las dos primeras semanas, pero creemos que reducir los intervalos de tratamiento redundará en mejorar su actividad.

En cuanto al promedio de días en que el volumen del tumor se duplica, en los tres grupos se obtienen valores muy semejantes de aproximadamente cada dos días, lo que indica un parámetro favorable para la Casiopeína III-ia, ya que por ser el fármaco de prueba no se encuentra lejos de los niveles mostrados por el cisplatino, que es un medicamento muy usado en la clínica oncológica.

Por lo que respecta al retraso específico del crecimiento, ambos fármacos están por debajo del índice requerido (igual o mayor a 2).

Con base en los resultados obtenidos experimentalmente en la línea de carcinoma cérvico-uterino C33, se puede decir que la Casiopeína III-ia se comportó ligeramente menos eficaz que el cisplatino, en cuanto al volumen relativo del tumor, cabe señalar que ésta actividad podría aumentar al reducir los intervalos de tratamiento.

La Casiopeína III-ia ha mostrado ser más efectiva que el cisplatino en la inhibición del crecimiento de diversas líneas de carcinomas cérvico-uterinos cultivadas *in vitro*, por lo que se esperaba observar volúmenes muy cercanos o mejores aún que los del cisplatino ya que éste, es uno de los fármacos de elección para el cáncer metastático de ovario y tumores de células germinales. Vale la pena señalar que las células de la línea celular C33 pertenecen a etapas avanzadas de cáncer, por lo que tal vez la eficacia de los fármacos se vea disminuida sensiblemente (60).

En cuanto a la función antitumoral, donde se busca un índice menor a 42% para mostrar que la Casiopeína III-ia funciona, el cisplatino mostró índices favorables a los días 7 y 14 con 32.36% y 24.55% respectivamente, aunque a días posteriores esto es el 21 y 28 no continuó con esta tendencia. La Casiopeína III-ia en el día 14 mostró un índice favorable de 33.53% sólo en C33. Esto refuerza la hipótesis de que con ambos fármacos subdosificamos y que a un esquema de tratamiento con un intervalo más pequeño e incluso crónico podría mejorar su eficacia.

La vida media de la Casiopeína III-ia es de 12.46 h. por lo que prácticamente a los 2 ó 3 días habrá muy poco fármaco circulante y podrá ser factible administrar la Casiopeína III-ia 2 veces por semana, aún a la dosis empleada o con más frecuencia si se disminuye la dosis. Por lo que, con base a todo lo propuesto creemos que es posible aumentar significativamente la actividad de ésta.

En cuanto a la inhibición del crecimiento que nos indica la actividad antitumoral, ni siquiera el Cisplatino, que es un fármaco empleado en la clínica, ni la Casiopeína III-ia mostraron una suficiente actividad.

En lo que respecta a la línea de adenocarcinoma de mama MCF7 en ninguno de los parámetros evaluados se observan resultados favorables para la Casiopeína III-ia o el Cisplatino. No obstante es importante aclarar que para que un fármaco experimental sea considerado como candidato, se requiere que sea activo sólo en una estirpe tumoral y no en todas (54, 55). Vale la pena señalar que el cisplatino, empleado por nosotros como fármaco testigo, no se usa contra tumores de mama, probablemente se hubieran encontrado respuestas favorables si hubiéramos empleado como testigo positivo la ciclofosfamida, tamoxifén, docetaxel,

doxorubicina y con éstos comparar nuestro fármaco de prueba (60). No obstante, se eligió el cisplatino por ser un fármaco con centro metálico y un buen análogo estructural del que podemos echar mano (60, 61).

2.-Histología

En ambas líneas tumorales C33 y MCF7 macroscópicamente se observa hepatomegalia y esplenomegalia en los grupos de Casiopeína III-ia, donde es probable que, como consecuencia de algún daño a estos órganos, se active la división celular, observándose un aumento importante en su volumen y peso (62, 63, 64).

Así mismo se observaron en algunos casos adherencias y ascitis leve, esto puede corresponder a que la administración del fármaco es por vía intraperitoneal y esto puede ocasionar irritación de las serosas en la cavidad abdominal, provocando cambios vasculares con reacción inflamatoria (65).

En el caso de las lesiones microscópicas, nuevamente se observaron principalmente en el grupo de la Casiopeína III-ia, la lesión principalmente hallada fue la degeneración hidrópica centrolobulillar. Es importante señalar que este tipo de lesión es una forma moderada de daño celular reversible, donde por lo general esta alteración no menoscaba la función de las células y de los órganos. Es una degeneración morfológica más que fisiológica de la célula (66, 67).

En la literatura se menciona que la degeneración hidrópica puede ser un hallazgo ligado para dislocación cervical como método de sacrificio, ya que este método de eutanasia induce choque neurogénico al interrumpirse vías nerviosas de presión vascular e interacción con el sistema yuxtglomerular, senos carotídeos incluyendo centros ganglionares nerviosos para-cardíacos, lo que conduce a una descompensación total de aporte sanguíneo con inmediata desigualdad en el aporte de oxígeno sistémico (68, 69, 70, 71). Los animales se sacrificaron mediante CO₂ lo que refuerza que la degeneración hidrópica es debida al fármaco, aunado a que la lesión únicamente se presentó en los ratones administrados con Casiopeína III-ia.

Es importante señalar que las lesiones observadas son muy leves y no comprometen seriamente la función de los órganos.

Por otro lado, se observaron en algunos casos figuras mitóticas anormales, exclusivamente en tejido tumoral tanto en el tumor primario como en sus metástasis. Esto puede ser debido al aumento de las mitosis que es una particularidad de las células cancerosas (72).

Así mismo, fueron hallados microfocos de metástasis principalmente en hígado y pulmón, lo que confirma la naturaleza altamente infiltrante y altamente metastática de las líneas celulares empleadas (56).

3.-Inmunohistoquímica

Los resultados inmunohistoquímicos obtenidos en la línea tumoral C33 mostraron positividad para p53 y Bcl-2 únicamente en los tumores, en los grupos tratados tanto con Casiopeína III-ia como con cisplatino pero no así en el grupo testigo.

Este hecho es relevante ya que la Casiopeína III-ia mostró una positividad de igual magnitud que el cisplatino, esto significa que es capaz de producir apoptosis en las células por alguna vía, hecho que ha sido comprobado mediante otras técnicas (49).

Así mismo sería importante poder establecer cuanta p53 funcional puede inducir la Casiopeína III-ia, dato importante para saber si la Casiopeína III-ia induce la apoptosis por ésta vía. Para ello podríamos emplear técnicas inmunohistoquímicas, utilizándose dos diferentes anticuerpos uno para detectar p53 funcional y otro para la mutada (27). Nos enfrentamos a la dificultad de que la proteína p53 funcional tiene una vida media de aproximadamente 20 min. por lo que sería indispensable tomar muestras a periodos muy cortos de tiempo (26).

De la misma manera se evidenció positividad para Bcl-2, este hallazgo puede explicarse ya que se han demostrado altos niveles en carcinomas humanos de mama, próstata, ovario, colon y pulmón (13). Aunque también hay reportes que muestran que la deficiencia de p53 funcional es mucho más oncogénica que la sobreexpresión de Bcl-2 (24, 73, 74).

La mutación de p53 es un determinante crítico para la sensibilidad de la terapia antitumoral aunque no en todos los tipos de células malignas (28). Por ejemplo fibroblastos transformados que carecen de p53 funcional con el oncogen *ras* son considerablemente más resistentes a la quimioterapia que sus contrapartes que contienen el tipo funcional (75). Siendo esto más evidente en tumores hematopoyéticos donde mutaciones en p53 y altos niveles de Bcl2 son factores de pobre pronóstico a la terapia pero esto no es el caso en muchos otros tipos de cáncer (76).

Es importante resaltar que la sola mutación de p53 y la sobre expresión de Bcl2 muy probablemente no expliquen los sucesos en todos los tumores y las fallas en los tratamientos. A este respecto la restauración de la funcionalidad específicamente la proteína p53, podría ser una meta terapéuticamente valiosa (28).

Por lo que respecta a los resultados obtenidos para la línea MCF7 donde no se observó positividad en ninguno de los grupos tratados, las posibles explicaciones para tal efecto son que para p53 ya se ha mencionado que la proteína mutada se ha encontrado en alrededor de un 70% en los tumores humanos y que precisamente la línea MCF7 caiga dentro del 30% restante, así como para la proteína Bcl-2. Cabe mencionar que el grupo de los animales testigo tampoco expresó éstas proteínas lo que refuerza lo anterior.

CAPITULO VII.

CONCLUSIONES

1. Se logró implementar la técnica de xenotransplatación de tumores humanos, lo que contribuyó a la implementación del panel de cernimiento lo que nos permitirá la evaluación de diferentes Casiopeínas y/o esquemas de tratamiento, dosificación y vías de administración.
2. No se pudo demostrar actividad antitumoral con el modelo de xenotransplatación, al menos con las líneas tumorales empleadas y a las dosis y esquemas usados.
3. Fue posible identificar efecto tóxico y la magnitud de las lesiones histológicas determinándose la probable reversibilidad del daño que ocasiona la Casiopeína III-ia.
4. La Casiopeína III-ia induce alguna vía apoptótica en al menos la línea celular carcinoma cérvico-uterino C33.
5. De este estudio se deriva la necesidad de replantear los esquemas de tratamiento y dosificación de la Casiopeína III-ia, para obtener mejores resultados.

COMENTARIOS

Se propone evaluar la actividad antineoplásica de las Casiopeínas modificando dosis y esquemas de tratamiento, así como en un panel de cernimiento empleando un mayor número de tumores humanos xenotransplantados incluyendo diversas estirpes celulares, vale la pena resaltar que en estudios paralelos con otras líneas humanas xenotransplantadas ésta misma Casiopeína ha cubierto los requisitos de actividad (83).

Para evitar la resistencia a fármacos y mejorar la actividad de estos, se puede emplear su combinación ya que se ha observado que las tasas de cura a tumores se incrementan significativamente cuando se tratan con quimioterapia combinadas (77, 78). Aunque se debe considerar la toxicidad intrínseca de cada fármaco y la suma de estos efectos tóxicos en el individuo.

Otra consideración importante, es el hecho de que los diferentes fármacos pueden tener diferente mecanismo de acción, lo que puede nulificar los mecanismos de multiresistencia a fármacos de los tumores. Otra estrategia para abatir dicha resistencia es la alta dosis de fármaco o fármacos citotóxicos, que tenderá a incrementar sustancialmente la muerte celular (79). Este hecho de altas dosis trae consigo limitantes en términos de toxicidad con respecto al límite tolerado (80, 81). Por todo lo anterior recomendamos la evaluación de la Casiopeína III-ia en terapias combinadas para determinar sinergismos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Torrell Kourí M., Villa Treviño S., Bases Genéticas del Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología, Fondo de Cultura Económica, México.
- 2.-Karp G, 2001, Biología celular y molecular, ed. Mc Graw-Hill-Interamericana, México.
- 3.-Boral A.L.; Dessain S.; Chabner B.A.; 1998, Clinical evaluation of biologically targeted drugs: obstacles and opportunities. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 42 (Suppl), S3-S21
- 4.-Jiménez L y Merchant H, 2003, Biología celular y molecular, ed. Prentice Hall, México.
- 5.-Santos E; Rodríguez J; 1985. El Cáncer; Libros de Investigación y Ciencia. Scientific American, Ed. Prensa Científica, España
- 6.-Hellman S.; Vokes E.E.; 1996, Advancing current treatments for cancer, improving conventional therapy, *Scientific American (What you need to know about cancer)* 275, 84-89
- 7.-De Vita Jr. V.T.; 1997, *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 5th ed. pp. 333-347. Philadelphia: Lipincott-Raven Publishers.
- 8.-INEGI, Estadísticas Vitales, 1990-2001 Base de Datos, Sistemas Nacionales Estadísticos y de Información Geográfica.
- 9.-De la Fuente A., 1993, Descentralizar la lucha contra el cáncer; *Revista Científica y Tecnológica*, vol. 15, num. 201
- 10.-Fogh J, Giovanella B, 1982, *The nude mouse in the experimental and clinical research*, Academic Press, Inc., USA, NY.
- 11.-Ríos M, Hernández M, 2001, Los genes supresores de tumores y el cáncer, *Rev. Cubana Oncol.* 17 (1): 65-71.
- 12.-Mendoza C, Cerbón M, 2001, El gen supresor de tumores p53:mecanismos de acción en la proliferación y muerte celular, *Revista de Investigación Clínica* vol. 53, Num. 3, 266-273.
- 13.-Zörning M, Hueber A, Baum W, Evan G; 2001, Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1551, F1-F37.

- 14.-Foster H.; Small J.; Fox J.; 1983, *The Mouse in the Biomedical Research*. London, Academic Press Inc.
- 15.-Meraz M, Sánchez C, 2001, *Animales modificados genéticamente. La herramienta del futuro*, ICYT, Vol.1 No. 3
- 16.-Boven E, Winograd B, Berger D, Dumont P, Braakhuis J, 1992, Phase II preclinical drug screening in human tumor xenografts; A first European multicenter collaborative study, *Cancer Research*, Nov. 1, 52, 5940-5947.
- 17.-Giovannella B.C, Stehlin S, Shepard R, Williams L, 1983, Correlation Between response to chemotherapy of human tumors in patients and in nude mice. *Cancer* 52:1146-1150.
- 18.-Giovannella B.C.; Pezzoni G.; Giardini R.; 1986, Growth Characteristics of human colorectal and non-small cell lung tumors xenografted into nude mice: possible correlation with prognosis. *Tumor* 72:351-356.
- 19.-Castillo R.; López A.; 1988, Algunas consideraciones y experiencias sobre el uso del ratón atímico como modelo experimental. *Interferón y Biotecnología* Vol. 5, No. 3. 291-296.
- 20.-Kyriazis A.; DiPersio L.; Michael G.; Pesce A.; Stinnett D.; 1978, Growth patterns and metastatic behavior of human tumors growing in athymic mice. *Cancer Research* 38:3186-3190.
- 21.- Schadendorf D.; Fichtner I.; Makki A.; Alijagic S.; Kupper M.; Mrowietz U.; Henz B.; 1996, Metastatic potential of human melanoma cells in nude mice characterization of phenotype, cytokine secretion and tumour-associated antigens. *British Journal of Cancer* 74: 194-199.
- 22.-Herzig, M, Christofori G, 2002, Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1602, 97-113.
- 23.-Dobrota M, De Vizcaya, Ruiz Ramírez L, 1998, Casiopeína II kills cancer cells by apoptosis, *Memorias de la 3ª Jornada de Casiopeínas*, Mayo 18-19, Facultad de Química, UNAM.
- 24.-Strasser, A, Huang D, Vaux D, 1997, The role of the Bcl2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumouri

genesis and resistance to chemotherapy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1333, F151-F178.

25.-Coulthart L, Strasser A, 2000, The Molecular Control of DNA damage-induced cell death, *Apoptosis* 5: 491-507.

26.-Irwin M, Kaelin W, 2001, Role of the newer p53 family proteins in malignancy, *Apoptosis*, 6: 17-29.

27.-Mehta R, Graves J, Warso M, Das Gupta T, 1995, Overexpression of mutant p53 and c-erbB-2 proteins and breast tumour take in mice, *British J. of Cancer*, 72: 1160-1164.

28.-Fisher D, 2001, The p53 tumour suppressor: Critical Regulator of Live and death in cancer, *Apoptosis*, 6:7-15.

29.-Vaughan A, Betti C, Villalobos M, 2002, Surviving apoptosis, *Apoptosis* 7:173-177.

30.-Jacobson MD, Burne JF, King MP, Migashita T, Reed JC, Raff MC, 1993, Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA, *Nature* 361, 365-368.

31.-Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MM, Fenton W, Reed JC, 1993, Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53: 4, 701-714.

32.-Reed JC, 1994, Hc1-2 and the regulation of programmed cell death, *J. Cell. Biol.* 124:1-6.

33.-Borzillo Gv, Endo K, Tsijimoto Y, 1992, Bcl-2 confers growth and survival advantage to interleukin 7- dependent early pre B cells which become factor independent by a multistep process in culture, *Oncogene* 7:869-876.

34.- Hsu B, Marin MC, Brisbay S, McConnell K, McDonnell TJ, 1994, Expression of Bcl-2 gene confers multidrug resistance to chemotherapy induced cell death, *Cancer Bulletin* 46:125-129.

35.-Korsmeyer SJ, 1992, Bcl-2 a repressor of lymphocyte death, *Immunology Today* 13:285-288.

- 36.-Yin XM, Oltval ZN, Korsmeyer SJ, 1994, BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax, *Nature* 369:321-323.
- 37.-Williams GT, Smith CA, 1993, Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death, *Cell* 74:777-779.
- 38.-Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ, 1991, Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:6, 961-965.
- 39.-Lu CL, Poulsom R, Wong L, Hanby A, 1993, Bcl-2 expression in adult and embryonic non hematopoietic tissues, *Journal Pathol.* 169: 431-437.
- 40.-Merry D, Veis D, Hickey W, Korsmeyer S, 1994, Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS, *Development* 120:301-311.
- 41.-Choi SS, Park IC, Yun JW, Sung YC, Hong SI, Shin HS, 1995, A novel Bcl-2 related gene Bfl-1 is overexpressed in stomach cancer preferentially expressed in bone marrow, *Oncogene* 11: 1, 693-698.
- 42.-Farrow Sn, White JH, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, 1995, Cloning of a Bcl-2 homologue by interaction with Adenovirus E1B19K *Nature* 374: 731-733.
- 43.-Zamzani N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez M, Castedo, 1996, Mitochondrial control of nuclear apoptosis, *J. Exp. Med.* 183: 1, 533-544.
- 44.-Gracia I, Ruiz Ramírez L, 1991, The antitumor activity of several transition metal complex, *J. Inorganic Biochem.* 43:2-3
- 45.- Gracia I., Ruiz-Ramírez L., Romero L., Márquez A., Gómez-Ruiz C. Tinoco M, Bravo M.E. Knigh's Move in the Periodic Table, From Platinum to Copper, New Anticancer compounds, Casiopeinas. In vitro Evaluation. Metal Based Drugs, (2001) 8 No1,19-23. Artículo por invitación
- 46.- A. Tovar-Tovar, L. Ruiz Ramírez, A. Campero, A. Romerosa, R. Moreno-Esparza, M.J. Rosalez-Hoz, Structural and reactivity studies on 4,4-dimethyl-2,2-bipyridine,acetylacetonate copper (II) nitrate (Casiopeina III-I) with

methionine, by UV-vis and EPR Techniques., J. of Inorg Biochem., (2003) enviado.

47.-Ruiz Ramírez L, Gracia I, De la Rosa M, Sumano H, Arenas F, Gómez C, Pimentel E, Cruces M, 1993, Cytostatic, Mutagenic, Antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) New drugs: Casiopeínas I, II and III, J. Inorganic Biochem. 51:406

48.-Ruiz Ramírez L, Bravo M, Tovar A, Moreno R, 2002, Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas®, 1er. Congreso de Casiopeínas y 5ª Jornada de trabajo en Casiopeínas, Taxco, Gro.

49.- Ruiz Azuara Lena, Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo I. Patente de invención en trámite, SECOFI 18801. P. I. (1990).Patente, Enero 26, (1994) no. 172967.

Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II. Patente de invención en trámite, SECOFI 18802. P. I. (1990).Patente, Dic.9 (1993) no. 172248.

Process to obtain new mixed copper aminoacidatecomplexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents.

U.S. Patent application serial No. 07/628,843., Ap 21 (1992)

Number 5, 107, 005. U. S Patent Re35, 458, Feb. 18 (1997).

Process to obtain new mixed copper aminoacidate from methylate phenanthroline complexes to be used as anticancerigenic agents..

U.S. Patent application serial No. 07/628,628., (1992), Pat. No. 5,576,326. Nov. 19 (1996)

50.- Gómez Ruiz C., De la Garza Salazar J., Arenas Huertero F., Ruiz Azuara L., Gracia Mora I.; 1993, Quimiosensibilidad *in vitro* en células de cáncer cérvico-uterino por efecto de Casiopeínas I, II y III. Tumor 6:4, 76

51.-Ruiz Ramírez L., Gracia Mora I., 1992, Design, Synthesis, Characterization *in vivo* antineoplastic test of a new drug: Casiopeína, 4th International Conference of Anticancer Research (memories), Creta, Greece 1992, Olympus Scientist.

- 52.-Huerta C.M., 1992, Evaluación Antineoplásica de Nuevos Complejos de Coordinación Empleando el Modelo Tumoral Murino Sarcoma-180. Tesis de licenciatura Química Fármaco Bióloga, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana.
- 53.-Bravo Gómez M.E., 1998, Evaluación Antineoplásica de Compuestos de Coordinación de Cobre (Casiopeínas) en Modelo Tumoral Murino Melanoma B16. Tesis de licenciatura Química Fármaco Bióloga, Facultad de Química, UNAM.
- 54.-Geran G., MacDonald and Abbott, 1987, Protocols for *in vivo* screening systems. National Cancer Institute.
- 55.-*In vivo* Cancer models 1976-1982, 1984, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute, NIH publication 84-2635 Washington, D.C., United States Government. Printing Office.
- 56.-Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 1992, 7th edition American Type Culture Collection.
- 57.-Gracia I.; Gómez A.; Tinoco M.; 1996, Nuevo Bioterio en el conjunto "E" de la Facultad de Química, UNAM. Animales de Experimentación 2,2:24-25.
- 58.-Blutt S, Polek T, LaMonica V, Stewart M, 2000, A Calcitriol analogue, EB1089, Inhibits the growth of LNCaP tumors in nude mice, Cancer Research, 60, 779-782, Feb. 15.
- 59.-Shalinsky D, Bischoff E, Lamph W, 1997, A novel retinoic acid receptor-selective retinoid, ALRT, has potent antitumor activity against human oral squamous carcinoma xenografts in nude mice, Cancer Research 57, 162-168, January 1.
- 60.-Vademécum farmacéutico IPE software, 2002.
- 61.-Círigo C, Moreno Esparza R, Ruiz Ramírez L., 2002, Interacción entre complejos ternarios del tipo $[Cu(N-N)(N-O)H_2O]^+(CASIOPEINAS II)$ con el ADN y sus constituyentes, Primer Congreso de Casiopeínas, Taxco, Gro.
- 62.-De Vizcaya A, Howarth J, Dobrota M, Ruiz L, 1998, Hematological response after administration of the novel copper based anticancer agent

- Casiopeína II, Memorias de la 3ª. Jornada de Trabajo en Casiopeínas, 18-19 de mayo, Facultad de Química UNAM.
- 63.-Seligman B; Gallin J, 1990, Use of lipophilic probes of membrane potential to assess human neutrophil: Abnormality of cell, *J. Clin. Invest.* , 86:493-503.
- 64.-Marín J, 2001, Caracterización ultraestructural de lesiones en ratones inducidas por la aplicación de Casiopeína III, Tesis de Maestría, Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- 65.-Reynolds E; 1963, Liver parenchymal cell injury. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride, *J. Cell. Biol.* 19: 139-157
- 66.-Junes T, Dunkan R; 1990, *Patología Veterinaria vol 1*, ed. Hemisferio Sur.
- 67.-Robbins S, 1975, *Patología estructural y funcional*, ed. Nueva editorial Interamericana, México.
- 68.-Chaudry I, Baue A. 1982, Overview of hemorrhagic pathophysiology of shock, *N. Engl. J. Med.*, 306:900-905
- 69.-Davies J. 1976, Mechanism of salt and water retention in cardiac failure, *Pathobiol. Annu.* 3: 234-237.
- 70.-Magno G, Jones I., 1996, *Cell, tissues and disease: Principles of general pathology*, Blackwell Science, second edition NY.
- 71.-Renkin E. 1987, Multiple pathways of capillary permeability, *Circulation Res*, 41:735-740.
- 72.-Clinkenbeard K. Cowell R. 1994, Características citológicas de las neoplasias malignas, *Focus* ,vol. 4, No. 3, 2-8.
- 73.-Donehower, L, Harvey, M, Slagle B, 1992, Mice deficient for p53 are developmentally normal but are susceptible to spontaneous tumours, *Nature*, 356: 215-221.
- 74.-Jacks, T, Remington, L, Williams B, 1994, Tumour spectrum analysis in p53-mutant mice, *Curr. Biol.* 4:1-7.
- 75.-Lowe S, Ruley H, Jacks T, Housman D, 1993, p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents, *Cell*, 10:541-550.
- 76.-Brown J, Wouters B, 1999, apoptosis, p53 and tumour cell sensitivity to anticancer agents, *Cancer Research*, 59:1391-1399.