



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“COMPILACIÓN DE LOS ESTUDIOS QUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS DE LAS
CASIOPEÍNAS® III-ia Y IIgly”**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

KAREN ALICIA MARTÍNEZ CHAPA



México D. F.

2008



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: Profesor: Lena Ruiz Azuara

VOCAL: Profesor: María del Carmen Parra González

SECRETARIO: Profesor: María Isabel Gracia Mora

1er SUPLENTE: Profesor: Jorge Morgado Moreno

2º SUPLENTE: Profesor: Luis Tonatihut Sánchez Linares

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Conjunto "E", Unidad de Experimentación Animal UNEXA

ASESOR DEL TEMA: María Isabel Gracia Mora
(Nombre y firma)

SUSTENTANTE: Karen Alicia Martínez Chapa
(Nombre y firma)

A mi madre,

Agradecimientos

Tal vez para algunos una tesis de Licenciatura no sea la gran cosa, para otros tal vez sea TODO, pero para mí... para mí es TODO y NADA. Lo es TODO porque es un capítulo más en mi vida estudiantil, es TODO porque representa el gran esfuerzo de mis padres; ellos me han dado TODO lo que tienen y TODO lo que son, su educación, esfuerzo y cariño también están entre las páginas de esta tesis. Es TODO porque con ella compartí muchas cosas con mi hermana, que aunque su ciencia y mi ciencia no son la misma, su química y mi química si lo son y esa es la que más importa. Esta tesis es TODO para mí porque en ella veo las horas de angustia, desvelo, necesidad, perseverancia, disciplina, compañerismo, entusiasmo, tristeza, sueños y realidades a lo largo de varios años. Es TODO porque en ella no sólo veo números y letras, veo amigos... verdaderos amigos. Es TODO porque en ella esta marcada una etapa de mi juventud, es TODO porque con ella finalizo una de mis múltiples metas.

Pero también es NADA, es NADA al lado de TODO el cariño que ustedes me brindaron para hacerla posible, es NADA al lado de las mentes brillantes que hicieron posible toda esta compilación, es NADA al lado de la enorme fe que muchos tienen para combatir el cáncer. Es NADA al lado de los que a causa de este mal han partido a un mejor lugar. Es NADA si las Casiopeínas® no siguen su camino. Para mí esta tesis es TODO y NADA.

Agradezco a Dios por la vida y por los retos que me pone día a día.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi "nicho" desde la preparatoria, por darme la oportunidad de desarrollarme deportiva, cultural y científicamente.

Agradezco a mi madre por ser la persona que nunca me ha fallado en la vida, gracias por todo tu cariño y por todo tu esfuerzo. Sin ti, el deseo de aprender acerca de las ciencias naturales no hubiera crecido en mí. Eres lo más hermoso que mis ojos jamás hayan visto. Gracias por enseñarme a luchar y a pensar con la cabezota.

Agradezco a mi padre por su paciencia, esfuerzo, cariño y por todos sus conocimientos de la vida, gracias por mantenerme con un pie fuera de las ciencias naturales y recordarme que la ciencia está conectada con lo espiritual y lo humano. Gracias por ayudarme a pensar con el corazón.

Agradezco a mi hermana Adelaida, hermana: eres la mujer más inteligente que ha tocado este lugar, gracias por compartir conmigo esa gran mente y ese gran corazón. Eres mi mejor amiga idiot, gracias por darme siempre ánimos para seguir, por ser mi fuerza en los momentos de desesperación.

A Uriel, gracias por estar conmigo a cada momento, gracias por ser un compañero único, tu corazón no es de este mundo. Tu cariño me ha dado las fuerzas para seguir soñando y seguir luchando por alcanzar lo que a veces parece estar muy lejos, gracias por ayudarme a alcanzarlo.

A Hernán y toda su familia, Ing. Vera, Nils, Adriana, Bertha y Chava. Menso: gracias por tu amistad incondicional.

A súper Eli, por ser una verdadera amiga, de ti nunca recibí nada malo, gracias.

A Christian “el Veracruz”, gracias por tu paciencia, tus clases y tu amistad, te quiero. A Adriana Licon, Lumivi, Quique Herbert, Arielillo, Rodrigo Güémez, Urielillo, Elisa, Moisés, Otto, Rudy, Paola, Javier, Esteban, Ajax, Carmela, la Súper, Betty, Francisco Reynoso y su familia, Alejandro, Areli, César “Japo”, Quique “Jimmy”, Gabo, George, La güera, Karlita, Leo, Basauri, Ponchito, Rafita, Rodrigo, Alvin, Nacho, Rafael, a Christian Garrido alias el Ing. Castro, Franco, Bruno, Víctor Omar, Víctor alias “Vicky”, Víctor el Q.A., Betty, al mismísimo Beto, Sr. Noé, el Sr. Raúl, ¡Stivalet!, Jesús Pérez, Rosa Isela, Juve, a Mario Maldonado (q.e.p.d.) (seguí tu consejo, gracias) a Jansel y a todos los que fueron parte de esta meta. GRACIAS por haber tocado mi vida y haber hecho de esta carrera una escuela de vida.

A todos los de la prepa 6, al horrible Alex, a mi pulga, Peter, Emilio, Tania, Ethiel, Pollo, Abraham, Carolina, Paulina, César y Ale Suárez.

A Tania Saldívar, Daniela Zertuche, Carlitos Sánchez, Jorge Almazán y Vania Carmona.

A todos los de la aldea feliz en especial a ¡Solecito!

A todos los ¡wawaras y preteens! En especial a Naim y a mi querido extraño Abraham alias “Chamin”.

A mi tía María del Socorro Martínez (q.e.p.d.) por regalar siempre cariño y amor. Por haber luchado hasta el último minuto.

A mi tía María de los Ángeles Chapa por ayudarnos siempre en los momentos más difíciles.

¡A todos en el bioterio! Adriana, Arlen, Carlitos, Leonel, Sr. Manuel, Héctor, Lucía, Mabel, Marisol, Rebeca, Erika, Paco, gracias por todo su apoyo.

A Isabel y Lena, por compartir conmigo su grandeza académica, pero sobre todo su GRANDEZA HUMANA.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado al proyecto CONACYT-Salud-7677.

A la COFEPRIS, en especial al Lic. Miguel Ángel De la Rosa Hernández, QFB. Sonia Zamudio Alonso y a la M.C. Adelaida Martínez Chapa.

A la Casa de la Farmacopea.

ÍNDICE

Introducción.....	1
A. El cáncer.....	1
B. Situación del cáncer en el mundo.....	2
C. El cáncer en México.....	5
D. Tratamientos contra el cáncer.....	6
E. Industria Farmacéutica.....	9
i. Industria Farmacéutica en el Mundo.....	11
ii. Industria Farmacéutica en México.....	13
iii. Desarrollo de Fármacos.....	14
F. Registro Sanitario y Autorización de Protocolos de Investigación.....	16
G. Requisitos de un Medicamento Nuevo para su Registro Sanitario.....	18
Justificación.....	20
Objetivo.....	23
Capítulo I. Casiopeínas® Ilgly y III-ia.....	24
1.1 Antecedentes.....	24
1.2 Proceso de síntesis.....	26
1.3 Caracterización Físico-Química de la Casiopeína® Ilgly.....	26
1.4 Caracterización Físico-Química de la Casiopeína® III-ia.....	27
1.5 Análisis de las Casiopeínas® Ilgly y III-ia con diferentes técnicas de instrumentación.....	28
1.5.1 UV-visible.....	28
1.5.2 Espectroscopia de Infrarrojo.....	29
1.5.3 Análisis Térmico Diferencial (DTA).....	30
1.5.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	31
1.5.5 Rayos X.....	32
1.5.6 Espectroscopía de Resonancia Paramagnética del Electrón (EPR).....	34
1.5.7 Estabilidad de las Casiopeínas® Ilgly y III-ia en soluciones fisiológicamente compatibles.....	34
Capítulo II. Actividad biológica.....	35
2.1 Actividad antineoplásica <i>In Vitro</i>	36
2.1.1 Actividad antineoplásica <i>In Vitro</i> de la Casiopeína® Ilgly sobre las células de carcinoma de colon HCT-15.....	36
2.1.2 Actividad antineoplásica <i>In Vitro</i> de la Casiopeína® III-ia sobre las células de carcinoma de colon HCT-15.....	38

2.1.3 Actividad antineoplásica <i>In Vitro</i> de la Casiopeína® Ilgly en dos líneas celulares (L1210 y CH1).....	40
2.1.4 Efecto <i>In Vitro</i> de las Casiopeínas® Ilgly y III-ia en el meduloblastoma humano.....	41
2.1.5 Evaluación <i>In Vitro</i> de la sinergia de las Casiopeínas® Ilgly y III-ia y otros fármacos comerciales en líneas tumorales humanas.....	43
2.2 Actividad Antineoplásica <i>In Vivo</i>.....	54
2.2.1 Actividad Antineoplásica <i>In Vivo</i> en tumores murinos isotransplantados.....	55
2.2.2 Actividad antineoplásica <i>In Vivo</i> de la Casiopeína® Ilgly en ratones xenotransplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon humano HCT-15.....	57
2.2.3 Actividad antineoplásica <i>In Vivo</i> de la Casiopeína® III-ia en ratones xenotransplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon humano HCT-15.....	59
2.2.4 Actividad antineoplásica <i>In Vivo</i> de las Casiopeínas® III-ia, Ilgly y III-La contra las líneas tumorales humanas de próstata PC-3 y cérvico uterino HeLa transplantadas al ratón desnudo.....	61
 2.3 Efecto antineoplásico y mecanismos de acción de la Casiopeína® Ilgly sobre el glioma C6 <i>In Vitro</i> e <i>In Vivo</i>	 65
2.4 Tumores espontáneos. Evaluación clínica de la Casiopeína® III-ia de un tumor mamario en rata Wistar con la ayuda de la técnica PET.....	67
 Capítulo III. Mecanismos de Acción.....	68
3.1 Modelos.....	68
3.2 Evaluación de los rompimientos en el ADN inducidos por la Casiopeína® Ilgly en leucocitos humanos de sangre periférica.....	68
3.3 Mecanismo de citotoxicidad de la Casiopeína® Ilgly.....	71
3.4 Mecanismo de toxicidad de las Casiopeínas® en las funciones mitocondriales.....	72
3.5 Influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa y apoptótica del quelato mixto de cobre Casiopeína® III-ia en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos.....	74
 Capítulo IV. Toxicidad.....	76
4.1 Toxicidad aguda en rata y ratón de la Casiopeína® Ilgly y III-ia.....	76
4.2 Hematotoxicidad en ratas por la Casiopeína® Ilgly.....	79
4.3 Estudios de los efectos tóxicos de las Casiopeínas® Ilgly y III-ia en perros.....	80
4.4 Cardiotoxicidad de las Casiopeínas®.....	85

4.5 Reprotoxicidad y teratogenicidad.....	86
4.5.1 Toxicidad reproductiva masculina de la Casiopeína® Ilgly.....	86
4.5.2 Efecto teratogénico causado por la Casiopeína® III-ia en embriones y fetos de ratón de la cepa CD-1.....	88
4.5.3 Toxicología reproductiva inducida por Casiopeína® III-ia en ratones macho de la cepa CD-1.....	91
4.6 Genotoxicidad.....	95
4.6.1 Estudio comparativo del daño genotóxico inducido por el cisplatino y por la Casiopeína® III-ia en ratones machos, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1.....	95
4.6.2 Estudio de los efectos genotóxicos, citostáticos y citotóxicos de la Casiopeína® III-ia, Ilgly y Igly en médula ósea y sangre periférica de ratón.....	97
Capítulo V. Farmacocinética.....	102
Capítulo VI. Estabilidad.....	103
Capítulo VII. Correlaciones Estructura-Actividad.....	106
7.1 Estudio QSAR de complejos de coordinación de cobre (Casiopeínas®) empleando varias líneas tumorales humanas.....	106
Conclusiones Finales.....	111
Bibliografía.....	112
Documentos electrónicos.....	118
Apéndice.....	119

Tabla de abreviaturas

ABC - Área bajo la curva	INCAN - Instituto Nacional de Cancerología
ADN - Ácido desoxirribonucleico	INEGI - Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.
ADME - Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción	Ke - Constante de equilibrio
ARN - Ácido ribonucleico	L1210 - Leucemia murina
AS-30D - Hepatoma murino	LC - Límite de cuantificación
ATCC - American Tissue Culture Collection	LD - Límite de detección
A549 - Adenocarcinoma pulmón humano	MB - Momento magnético efectivo
CaLo - Carcinoma cérvico-uterino humano	MCF-7 - Carcinoma de mama humano
CDDP - cis- diamino dicloro platino (II)	MN - Micronúcleos
CH1 - Carcinoma ovárico humano	NAC - N-acetil- cisteína
CI50 - Concentración inhibitoria media	NIF - Frecuencia de la inducción neta
CI - Depuración	NOM - Norma Oficial Mexicana
CIS - Centro Integral de Servicios	OMS - Organización Mundial de la Salud
COFEPRIS - Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios	PET - Tomografía por Emisión de Positrones o <i>Positron Emission Tomography</i>
CV - Coeficiente de variación	pH - potencial de Hidrógeno
CI - Concentración inhibitoria	PM - peso molecular
DCI - Denominación común Internacional	QSAR - Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad o <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
DIF - Diferencia de la inducción de la frecuencia	REC - Retraso específico del crecimiento
DL - Dosis Letal	SiHa - Carcinoma cérvico-uterino humano
DTA - Análisis Térmico Diferencial	SITER - Sistema de Tramitación Electrónica de Registro Sanitario de Productos
E_{1/2} - Potencial de media onda	SK-LU-1 - Carcinoma de pulmón humano
ERO - Especies reactivas de oxígeno	SNC - Sistema nervioso central
EPR - Espectroscopía de Resonancia Paramagnética del Electrón	SPH - Sangre periférica humana
FA - Función antitumoral	SS - Secretaría de Salud
FDA - viabilidad celular	TGP - Tiempos generacionales promedio
FEUM - Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos	TMR - Tiempo medio de residencia
HeLa - Carcinoma cérvico-uterino humano	TR - Tiempo de Retención
HCT-15 - Línea celular de carcinoma de colon	U-373 - Línea celular de glioma
HPLC/CLAR - Cromatografía líquida de alta eficacia o <i>High performance liquid chromatography</i>	UICC - Unión Internacional contra el Cáncer o <i>International Union Against Cancer</i>
IC - Concentración inhibitoria	Vss - Volumen de distribución
ILS - Índice de sobrevida	VRT - Volumen relativo tumoral
IMSS - Instituto Mexicano del Seguro Social	WHO - <i>World Health Organization</i>
INB1 - Carcinoma cérvico-uterino humano	

Índice de Tablas

Tabla 1. Participación regional en el mercado farmacéutico mundial y tasas de crecimiento en 2002.	12
Tabla 2. Fórmula general de cada familia de Casiopeínas®.	25
Tabla 3. Distancia y ángulos de enlace de los átomos donadores al centro metálico en los complejos mixtos de coordinación.	32
Tabla 4. Distancia y ángulos de enlace de los átomos donadores al centro metálico en los complejos mixtos de coordinación.	33
Tabla 5. Parámetros EPR de las Casiopeínas® Ilgly en solución (MeOH 1x10 ⁻³ M/ 77K)	34
Tabla 6. Parámetros EPR de las Casiopeínas® III-ia en solución (MeOH/H ₂ O 50/50 v/v 77K)	34
Tabla 7. Descripción de varias líneas tumorales humanas.	35
Tabla 8. Descripción de varias líneas tumorales murinas.	35
Tabla 9. Actividad antineoplásica <i>In Vitro</i> en diferentes líneas tumorales humanas con las Casiopeínas® Ilgly y III-ia y el Cisplatino.	36
Tabla 10. Porcentaje de viabilidad de la línea HeLa para la mezcla (carboplatino/Casiopeína® Ilgly).	44
Tabla 11. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $\alpha=0.05$ en HeLa.	45
Tabla 12. Porcentaje de viabilidad de la línea CaLo para la mezcla busulfán/Casiopeína® Ilgly.	45
Tabla 13. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $\alpha=0.05$ en CaLo.	46
Tabla 14. Porcentaje de viabilidad de la línea HCT-15 para la mezcla busulfán/Casiopeína® Ilgly.	46
Tabla 15. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $\alpha=0.05$ en HCT-15.	47
Tabla 16. Porcentaje de viabilidad de la línea MCF-7 para la mezcla busulfán/Casiopeína® Ilgly.	48
Tabla 17. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $\alpha=0.05$ en MCF-7.	49
Tabla 18. Porcentaje de viabilidad de U-373 para la mezcla carboplatino/Casiopeína® Ilgly.	49

Tabla 19. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $\alpha=0.05$ en U-373.	50
Tabla 20. Porcentaje de viabilidad de SiHa para la mezcla oxaliplatino/Casiopéina® III-ia.	50
Tabla 21. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $\alpha=0.05$ en SiHa.	51
Tabla 22. Porcentaje de viabilidad de InBl para la mezcla busulfán/Casiopéina® Ilgly.	51
Tabla 23. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $\alpha=0.05$ en InBl.	52
Tabla 24. Porcentaje de viabilidad de SK-LU-1.	52
Tabla 25. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $\alpha=0.05$ en SK-LU-1.	53
Tabla 26. Panel de cernimiento <i>In Vivo</i> de acuerdo al NCI	54
Tabla 27. Criterios de actividad para compuestos sintéticos.	54
Tabla 28. Índices de sobrevida de la Casiopéina® Ilgly en diferentes líneas tumorales murinas.	55
Tabla 29. Índices de sobrevida de la Casiopéina® III-ia en diferentes líneas tumorales murinas.	56
Tabla 30. Efectos antitumorales <i>in vivo</i> de Cas Ilgly. Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 21 de experimentación.	59
Tabla 31. Efectos antitumorales <i>In Vivo</i> de Cas III-ia. Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 21 de experimentación.	61
Tabla 32. Efectos antitumorales <i>in vivo</i> de Cisplatino (CDDP), Casiopéinas® III-ia, Ilgly y III-La. Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 24 de experimentación.	63
Tabla 33. Efectos antitumorales <i>in vivo</i> de Cisplatino (CDDP), Casiopéinas® III-ia, Ilgly y III-La. Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 24 de experimentación.	65

Tabla 34. Propuestas de modelos para los mecanismo de acción de dos Casiopeínas®.	68
Tabla 35. Viabilidad celular (%) de leucocitos tratados 3 horas con Casiopeína®.	69
Tabla 36. Determinación de la dosis letal (DL ₅₀ y DL ₉₀) de la Casiopeína® III-ia en ratón.	77
Tabla 37. Determinación de la dosis letal (DL ₅₀ y DL ₉₀) de la Casiopeína® III-ia en rata.	77
Tabla 38. Determinación de la dosis letal (DL ₅₀ y DL ₉₀) de la Casiopeína® Igly en rata.	78
Tabla 39. Determinación de la dosis letal (DL ₅₀ y DL ₉₀) de la Casiopeína® Igly en ratón.	78
Tabla 40. Efecto de la Casiopeína® Igly sobre el peso de órganos después de 60 días de tratamiento (media ± E.E).	86
Tabla 41. Efecto de la Casiopeína® Igly sobre las concentraciones de Testosterona y Progesterona en ratones tratados durante 60 días (los datos representan la media ± el error estándar). Las concentraciones de testosterona y progesterona no presentaron diferencias significativas.	87
Tabla 42. Datos de la reproducción materna y fetal para ratones hembra CD-1 tratadas con diferentes dosis de Casiopeína® III-ia durante los días 6 a 15 de gestación.	89
Tabla 43. Malformaciones esqueléticas en fetos de ratones hembra CD-1 tratadas con diferentes concentraciones de Casiopeína® III-ia durante los días 6 a 15 de gestación.	90
Tabla 44. Ratones machos tratados con Casiopeína® III-ia durante 60 días según dosis aplicada y peso corporal.	91
Tabla 45. Cantidad y concentración de espermatozoides según dosis y movilidad. *P<0.05 vs testigo; **P<0.01 vs testigo, con prueba de t de Student.	92
Tabla 46. Porcentaje de espermatozoides según dosis y presencia e incidencia de anomalías. *P<0.05 vs testigo; **P<0.01 vs testigo, con prueba de t de Student.	92

Tabla 47. Efectos materno fetales en las ratonas hembra preñadas por machos tratados con Casiopeína® IIIia durante 60 días (cada tercer día). *P<0.05 vs testigo; **P<0.01 vs testigo, con prueba de t de Student.	93
Tabla 48. Malformaciones esqueléticas en fetos de ratón aplicando Casiopeína® III-ia durante 60 días (cada tercer día) a ratones macho. (el porcentaje se muestra entre paréntesis)	94
Tabla 49. Tratamientos utilizados en los experimentos <i>In Vivo</i> .	96
Tabla 50. Tratamientos utilizados en los experimentos <i>In Vitro</i> .	96
Tabla 51. Parámetros farmacocinéticos en Rata para la Casiopeína® IIgly.	102
Tabla 52. Parámetros farmacocinéticos en tres especies para la Casiopeína® III-ia.	102
Tabla 53. Diseño experimental para toma de muestras.	104
Tabla 54. Calendario de trabajo.	104
Tabla 55. Datos de la curva de calibración.	105
Tabla 56. Caracterización química.	107
Tabla 57. Evaluaciones biológicas y datos fisicoquímicos.	108

Índice de Figuras

Figura 1. Los tres principales tipos de cáncer por sexo y región actualmente.	4
Figura 2. Número estimado de nuevos casos en 2020 por sexo y región.	5
Figura 3. Distribución porcentual de las principales causas de muerte por tumores malignos según sexo, 2005.	6
Figura 4. Procesos que competen a la política farmacéutica.	11
Figura 5. Fases de la vida de un medicamento.	16
Figura 6. Estructura cristalina de la Casiopeína® Ilgly.	32
Figura 7. Estructura cristalina de la Casiopeína® III-ia.	33
Figura 8. Caja de valores extremos que representa la viabilidad de HCT-15 con y sin tratamiento previo con N-Acetil cisteína después de 24 horas de exposición a Cas Ilgly en las distintas dosis. (*P<0.05)	36
Figura 9. A. Células HCT-15 sin tratamiento. B. Células con alteraciones compatibles con oncosis. La flecha muestra vacuola electrolúcida en citoplasma. C. Células con alteraciones compatibles con apoptosis. La flecha rellena muestra condensación de la cromatina con “forma de medialuna” en la cara interna de la membrana nuclear. La flecha abierta exhibe bleb (burbuja) de membrana. D. Cuerpo electrodenso, compatible con cuerpo apoptótico, rodeado por una doble membrana.	37
Figura 10. El gráfico muestra células HCT-15 vivas, en apoptosis temprana o en apoptosis tardía/necrosis después de 24 horas de tratamiento con Cas Ilgly, medidas por citometría de flujo. Los datos están representados como porcentaje, graficándose la media ± error estándar de 10,000 células por tratamiento. (*P <0.05)	38
Figura 11. Cajas de valores extremos que representan la viabilidad de HCT-15 después de 24 horas de exposición a Cas III-ia en las distintas dosis. (*P<0.05)	39
Figura 12. (A) Célula HCT-15 sin tratamiento (B) Mitocondria tumefacta de célula tratada con 2.5 µg/mL de Cas III-ia, con moderada pérdida de arquitectura de las crestas. (C) Célula tumefacta con pérdida de estructura de organelos, característico de una célula necrótica. (D) Condensación de la cromatina en la membrana nuclear, con ligeros cambios en el citoplasma, característico de apoptosis.	39

Figura 13. Células vivas, en apoptosis temprana o en apoptosis tardía/necrosis después de 24 horas de tratamiento con Cas III-ia, medidas por citometría de flujo. El gráfico de barras muestra los datos obtenidos desde el diagrama de puntos, representados como porcentaje, graficándose la media \pm error estándar de 10,000 células por tratamiento. (*P<0.05).	40
Figura 14. Imagen de microscopía por contraste de fases, de células de meduloblastoma sin tratamiento (control) y con 24 horas de tratamiento: cisplatino (25 μ g/ml), Casiopeína® Ilgly (16 μ g/ml) y 10 μ g/ml.	41
Figura 15. Supervivencia y necrosis en las células HTB-186. Las células tratadas con Casiopeína® Ilgly (16 μ g/ml), mostraron reducción en el número de células (al 50%), en tanto que las células tratadas con Casiopeína® III-ia (10 μ g/ml), no mostraron disminución en el número celular (las determinaciones se hicieron por triplicado).	42
Figura 16. Se observa la condensación de núcleos principalmente en células tratadas con Casiopeína® Ilgly.	42
Figura 17. Imágenes de microscopía confocal para actina (verde) y β -tubulina (rojo) en células de meduloblastoma. Células sin tratamiento (A); células con cisplatino (25 μ g/ml) a diferentes tiempos (B) y células tratadas con Casiopeína® Ilgly (16 μ g/ml) también a diferentes tiempos (C).	43
Figura 18. Ensayo de proliferación celular en HeLa (carboplatino/Casiopeína® Ilgly).	44
Figura 19. Ensayo de proliferación celular en CaLo (busulfán/Casiopeína® Ilgly).	46
Figura 20. Ensayo de proliferación celular en HCT-15 (busulfán/Casiopeína® Ilgly).	47
Figura 21. Ensayo de proliferación celular en MCF-7 (busulfán/Casiopeína® Ilgly).	48
Figura 22. Ensayo de proliferación celular en U-373 (carboplatino/Casiopeína® Ilgly).	50
Figura 23. Ensayo de proliferación celular en SiHa (oxaliplatino/Casiopeína® III-ia).	51
Figura 24. Ensayo de proliferación celular en INB1 (busulfán/Casiopeína® Ilgly).	52
Figura 25. Ensayo de proliferación celular para la línea SK-LU-1.	53

Figura 26. Gráfica del Índice de sobrevida de Casiopeína® Igly en diferentes líneas tumorales.	55
Figura 27. Gráfica del Índice de sobrevida de Casiopeína® III-ia en diferentes líneas tumorales.	57
Figura 28. Cajas de valores extremos que representan el Volumen Relativo Tumoral (VRT) de los tumores originados del trasplante de HCT-15 en los días 7, 14 y 21 de experimentación y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas Igly 0.5 mg/kg (n=5) y Cas Igly 1 mg/kg (n=5). *Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.	58
Figura 29. Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del trasplante de HCT-15 y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas Igly 0.5 mg/kg (n=5) y Cas Igly 1 mg/kg (n=5).	58
Figura 30. Cajas de valores extremos que representan el Volumen Relativo Tumoral (VRT) de los tumores originados del trasplante de HCT-15 en los días 7, 14 y 21 de experimentación y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas III-ia 3 (n=5) y Cas III-ia 6 mg/kg (n=5). *Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.	60
Figura 31. Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del trasplante de HCT-15 y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas III-ia 3 (n=5) y Cas III-ia 6 mg/kg (n=5).	60
Figura 32. Cajas de valores extremos que representan el Volumen Relativo Tumoral (VRT) de los tumores originados del trasplante de HeLa en los días 8, 16 y 24 de experimentación y tratados cada cuarto día con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Igly 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). *Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media. *Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.	62
Figura 33. Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del trasplante de HeLa y tratados cada cuarto día con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Igly 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). *Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media.	62

Figura 34. Cajas de valores extremos que representan el Volumen Relativo Tumoral (VRT) de los tumores originados del transplante de PC-3 en los días 8, 16 y 24 de experimentación y tratados cada cuarto día con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgly 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5).	64
Figura 35. Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del transplante de PC-3 y tratados cada cuarto día con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgly 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). *Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.	64
Figura 36. Volumen del Tumor C6 SC (Día 21 de tratamiento).	66
Figura 37. Efecto antitumoral de Cas Ilgly In Vivo.	66
Figura 38. Estudios PET-[¹⁸ F]-FDG realizados a la rata. a) lesión tumoral, b) estudio Post-tratamiento y c) Imagen de control.	67
Figura 39. Distribución de la longitud de los cometas de los 4 donadores tratados con diferentes concentraciones de Casiopeína® Ilgly durante 3 horas. (a) P<0.05, (b) P<0.01, (c) P<0.001.	70
Figura 40. Distribución de la longitud de los cometas de 2 donadores tratados con 8.35 µg/ml de Casiopeína® Ilgly con respecto al tiempo. (a)P<0.001.	70
Figura 41. Distribución de la longitud de los cometas de leucocitos humanos tratados con 8.35 µg/ml durante 1 hora a diferentes tiempos de reparación. (a) P<0.001.	71
Figura 42. Microscopía electrónica. (A) Eritrocitos (E) y células de endotelio (EC) normales, con diferentes formas (B) Doce horas después de la administración, se observa el daño en EC y E (C) Cinco días después de la administración, daño en E y linfocitos (L) pueden observarse (D) Quince días después de la administración las células dañadas de E y EC se pueden observar muy densas.	79
Figura 43. Gráfica Disminución de la frecuencia cardiaca.	81
Figura 44. Gráfica Disminución de la presión arterial.	82
Figura 45. Gráfica Disminución de la frecuencia respiratoria.	82
Figura 46. Gráfica Oximetría. Disminución en la saturación de oxígeno.	83
Figura 47. Gráfica Capnografía. Disminución en la PCO ₂ expiatoria.	83

Figura 48. Gráfica Hemograma. Disminución en la cantidad de leucocitos.	84
Figura 49. Gráfica Gasometría. Disminución del pH, acidemia.	84
Figura 50. Aumento de la PCO ₂ arterial. Acidosis respiratoria.	85
Figura 51. Gráfica del porcentaje de espermatozoides viables y móviles de ratones tratados con diferentes concentraciones de Cas IIgly durante 60 días.	87
Figura 52. Gráfica de conteo de espermatozoides en ratones tratados con diferentes concentraciones de Cas IIgly durante 60 días.	87
Figura 53. Resultados de la frecuencia de la inducción neta (NIF) de MN en (A) hembras, (B) machos y (C) hembras preñadas con el tratamiento subcrónico.	98
Figura 54. Resultados de la diferencia de la inducción de la frecuencia (DIF) de MN en fetos con tratamiento agudo.	99
Figura 55. Resultados de la frecuencia de la inducción neta (NIF) de MN en (A) hembras, (B) machos y (C) hembras preñadas con tratamiento agudo.	100
Figura 56. Estructuras de los complejos estudiados: 1A) [Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetato)] ⁺ 1B) [Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetato)] ⁺ 1C) [Cu(1,10-fenantrolina)(glicinato)].	108

Introducción

A. El cáncer

Actualmente se ha vuelto muy común escuchar que alguien sufre de cáncer, sin embargo el cáncer es una enfermedad muy antigua. El caso más antiguo que se ha registrado es el cáncer óseo de un antropoide descubierto en la isla de Java, que tiene una antigüedad superior al millón de años. En los papiros egipcios encontrados por Edwin Smith, escritos entre los años 3000 y 2500 a. C. y traducidos por George Ebers, se describen ocho casos de tumores o úlceras de la mama. Autopsias realizadas en momias del antiguo Egipto mostraron la presencia de tumores en sus huesos y sugirieron también la posibilidad de la existencia de otros procesos neoplásicos. Escritos médicos chinos y árabes describieron síntomas de lo que puede suponerse eran enfermedades malignas. El cáncer data de millones de años atrás, pero hoy en día algunos lo han calificado como la enfermedad de la civilización por su creciente presencia en el último siglo **(1)**.

El primero en nombrarlo fue Hipócrates en el siglo IV a. C., para designarlo utilizó el término 'carcinoma' (en griego *karkinoma*). Este término proviene de *karkinos* (cangrejo en griego); lo bautizó así en alusión al aspecto en cómo se propagaba, semejando las patas de un cangrejo. Fue Hipócrates también quien introdujo el término metástasis **(2)**. Henri Francois Le Drann (1685-1770) fue un auténtico hito histórico en el conocimiento del cáncer. Reconoció que el cáncer podía diseminarse a los nódulos linfáticos locales y de ahí pasar a la circulación general **(1)**. En 1911, Peyton Rous logró aislar un virus del sarcoma producido en pollos y lo transmitió a otros animales de la misma especie mostrando que un virus era capaz de producir tumores en animales, lo que dio origen a los estudios modernos de las causas del cáncer **(2)**.

Durante muchos años los involucrados contra la lucha del cáncer han sido bastantes y a pesar de los esfuerzos en la investigación, el cáncer sigue latente. Pero, ¿qué es el cáncer?, para entenderlo es necesario conocer cómo funciona una célula sana. El cuerpo humano está compuesto por muchas células, estas células crecen y se dividen para generar nuevas células de acuerdo a las necesidades del cuerpo humano. Cuando las células envejecen y mueren, éstas son reemplazadas por nuevas. En el caso del cáncer, la división celular es descontrolada. Células nuevas se siguen formando y las células viejas no mueren cuando deberían morir. Las células que no son necesarias, forman una masa de tejido llamada tumor. Existen dos tipos de tumores: benignos (no cancerosos) y

malignos (cancerosos). La diferencia entre éstos es que pueden diseminarse o no, es decir que los tumores malignos pueden invadir el tejido a su alrededor e irse a otros órganos. Cuando el cáncer se disemina de una parte del cuerpo a otra, se le llama metástasis (*meta*: más allá; *stasis*: alojamiento).

El cáncer no es sólo una enfermedad sino el conjunto de muchas (3). El cáncer o neoplasia se clasifica de cuatro maneras principales, de acuerdo al tipo celular y tejido a partir del cual se desarrollan. El primer tipo son los carcinomas, aquellos que se desarrollan a partir del epitelio; el segundo tipo son los sarcomas, el que se desarrolla a partir del tejido conectivo o células musculares; el tercer tipo es el derivado del sistema nervioso; y por último se encuentran las leucemias, las cuales son tipos de cáncer que se derivan de células hematopoyéticas. Cada una de estas categorías tiene múltiples subdivisiones de acuerdo al tipo celular específico, la ubicación del cáncer en el cuerpo, así como la estructura del tumor (4). Es por lo anterior que cada tipo de cáncer tiene características que reflejan su origen, por lo cual dos tipos de cáncer distintos son dos enfermedades completamente diferentes.

B. Situación del cáncer en el mundo.

Hoy en día, todos somos blanco fácil para el cáncer; nadie está exento de sufrir este mal. El cáncer no toma en cuenta sexo, edad, raza, situación económica ni condición física. A pesar de que el cáncer es una enfermedad muy antigua, nunca había llegado a generar las morbilidades y mortalidades tan elevadas que existen actualmente.

Aún con el notable progreso en el conocimiento de las bases biológicas y bioquímicas del cáncer, así como de su diagnóstico y tratamiento, éste sigue siendo un problema de salud pública mundial no sólo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta mortalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo (individuales y ambientales) con los que se asocia.

Desde hace varias décadas se han venido efectuando un gran número de estudios epidemiológicos debido al aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad por cáncer y a fin de determinar su distribución geográfica. No obstante, ha sido muy difícil establecer una tendencia única y una regionalización completa del cáncer en el mundo, principalmente porque cada tipo de cáncer tiene un comportamiento especial que varía con las condiciones de vida, los hábitos y las costumbres de

la gente en cada país o continente. El mejoramiento de los procesos de elaboración, procesamiento y análisis de los registros de casos de cáncer en México y en el mundo, así como la creciente habilidad para eliminar variaciones causadas por los diversos tipos de atención médica, han hecho posible que el conocimiento de los patrones de incidencia de esta enfermedad sea cada día más completo. No obstante, aún es factible perfeccionar los sistemas de registro, lo cual permitirá conocer de manera más clara la situación epidemiológica de este padecimiento y con esto se proporcionarán mejores instrumentos para la planeación de los sistemas de salud y para la investigación avanzada **(5)**.

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. Actualmente, existen 24,6 millones de personas con cáncer. Cada año más de 11 millones de nuevos casos de cáncer son diagnosticados y más de 7 millones de personas mueren al año a causa de él. Se ha proyectado que para el año 2020 el número de casos nuevos aumentará a 16 millones por año y más de 10 millones morirán **(6)**.

En los países desarrollados, el cáncer es la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares. Esta tendencia empieza a observarse también en el mundo menos desarrollado, particularmente en los países de medianos ingresos de Sudamérica y Asia. Más de la mitad de los casos de cáncer ya se generan en los países en desarrollo.

Los principales tipos de cáncer a nivel mundial que presentan el mayor índice de muertes son:

- ❖ Pulmón (1.3 millones de muertes al año);
- ❖ Estómago (casi un millón de muertes al año);
- ❖ Hígado (662,000 muertes al año);
- ❖ Colon (655,000 muertes al año) y
- ❖ Seno (502,000 muertes al año)

Algunos tipos de cáncer son más comunes en los países desarrollados, como los de próstata, mama y colon. Los tipos de cáncer como los de hígado, estómago y cuello uterino son más frecuentes en los países en desarrollo.

Los tipos de cáncer más frecuentes por género en el mundo, de acuerdo al número de muertes son:

- ❖ Entre la población masculina: pulmón, estómago, hígado, colorrectal, esófago y próstata.
- ❖ Entre la población femenina: seno, pulmón, estómago, colorrectal y cuello cérvico-uterino (7).

Figura 1. Los tres principales tipos de cáncer por sexo y región actualmente (8).

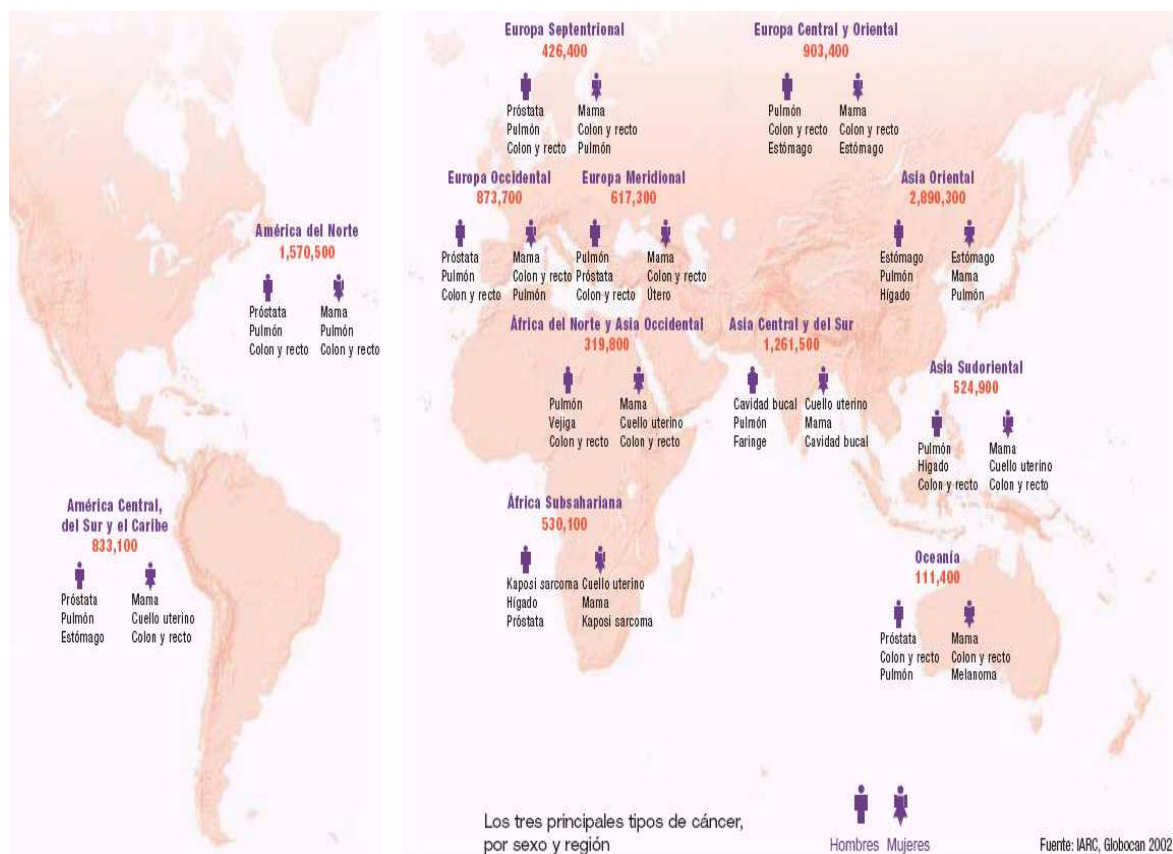
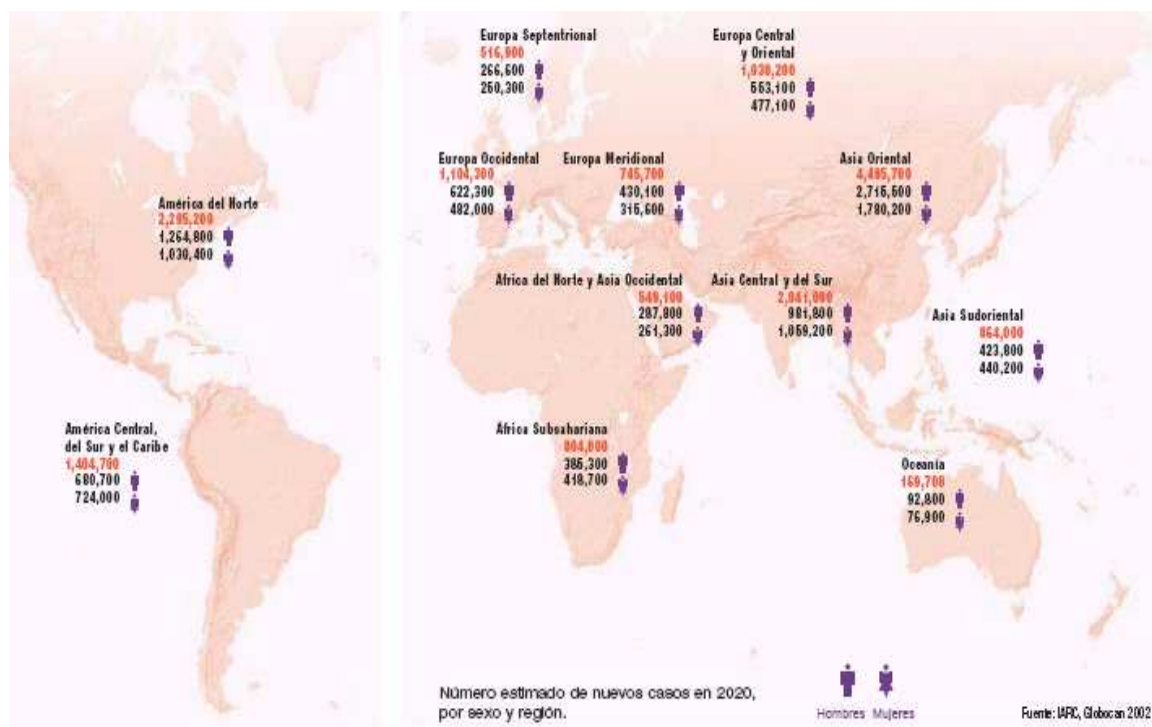


Figura 2. Número estimado de nuevos casos en 2020 por sexo y región (8).



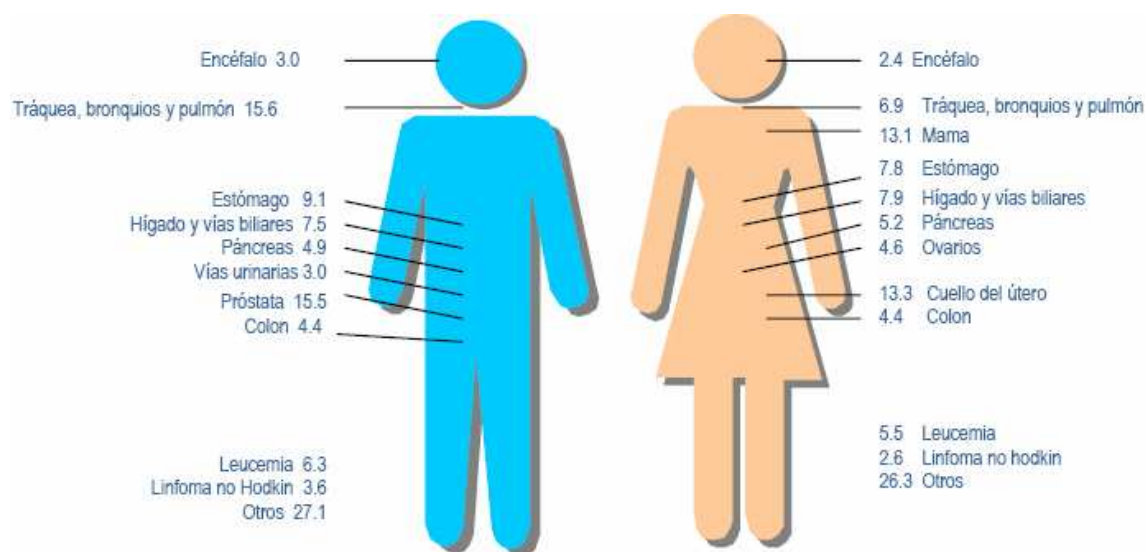
Se han vinculado varios factores causales a la aparición del cáncer: un estilo de vida poco saludable (consumo de tabaco y alcohol, alimentación incorrecta, inactividad física) y la exposición a carcinógenos ambientales y agentes infecciosos (por ejemplo, el virus de la hepatitis B o el virus del papiloma humano). El consumo de tabaco provoca el 30% de los tumores malignos en los países desarrollados; la alimentación, el 30% en esos países y el 20% en los países en desarrollo. La exposición a carcinógenos en los países desarrollados es responsable del 4% de los casos de cáncer; la exposición a los agentes infecciosos provoca el 18% de los casos en el mundo, la mayoría en los países en desarrollo (9).

C. El cáncer en México.

En México, como en otros países, la urbanización y los cambios en el estilo de vida de los últimos años han provocado transformaciones en los patrones de morbilidad y mortalidad; así, mientras la frecuencia de las enfermedades infecciosas se ha reducido, las de los padecimientos cardiovasculares, los accidentes y el cáncer han aumentado. La información disponible confirma que el número de neoplasias malignas se está incrementando significativamente. En México, el cáncer es la tercera causa de muerte. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2005, 64,000

personas murieron a causa del cáncer, de éstas 37,000 eran menores a los 70 años. Las defunciones por tumores malignos representaron 11.3% del total de fallecimientos en los varones y 14.5%, en las mujeres. En los varones, las tres principales causas de muerte por tumores malignos en el año corresponden a los de tráquea, bronquios y pulmón (15.6%), próstata (15.5%) y estómago (9.1%). En las mujeres, 13.3% de las defunciones por cáncer maligno corresponden al del cuello del útero (cérvico-uterino) y 13.1% más al de seno; el cáncer de hígado y vías biliares intrahepáticas ocasionó 7.9% de las muertes. En la **Figura 3**, se muestra la distribución porcentual, según el tipo de tumor maligno, por sexo (**10**). Según datos de la Secretaría de Salud, en México, las cifras ya alcanzan las 2,359 muertes al año. La OMS ha proyectado que para el 2030 existirá un aumento de 4500 casos más en México.

Figura 3. Distribución porcentual de las principales causas de muerte por tumores malignos según sexo, 2005.



La distribución es para cada sexo
Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, Base de datos 2005

D. Tratamientos contra el cáncer

El cáncer puede tratarse con cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal o con terapia biológica. El médico puede usar un método o una combinación de métodos, dependiendo del tipo y ubicación del cáncer, de si la enfermedad se ha extendido, de la edad y salud general del paciente, entre otros factores.

La **cirugía** es un procedimiento para extirpar el cáncer. Los efectos secundarios de la cirugía dependen de muchos factores, inclusive del tamaño y lugar del tumor, el tipo de operación y el estado general de salud del paciente **(3)**.

La **radioterapia** usa rayos de alta energía para destruir las células cancerosas en un área determinada. La radiación puede administrarse en forma externa por medio de una máquina que apunta la radiación al área del tumor. También se puede administrar internamente (también llamada radiación de implante) por medio de agujas, semillas, alambres o catéteres que contienen una sustancia radioactiva que se implantan cerca del cáncer. La radioterapia puede causar también la disminución del número de glóbulos blancos en la sangre, los cuales ayudan a proteger el cuerpo contra la infección. Con radiación externa, es también común perder el pelo temporalmente en el área tratada y que la piel se ponga roja, reseca, sensible y con comezón **(3)**.

La **quimioterapia**, además de ser uno de los tratamientos más utilizados, es en el que se insertan las Casiopeínas® y por esto hablaré más de este proceso en el presente trabajo. Este tipo de tratamiento consiste en el uso de fármacos de tipo orgánico e inorgánico para destruir células cancerosas en todo el cuerpo. Las células sanas también pueden ser dañadas, especialmente las que se dividen rápidamente. La quimioterapia puede ser administrada por diferentes medios. Los más frecuentes son la vía oral y la intravenosa, pero también es posible administrar los fármacos de manera intramuscular o a través de catéteres **(3)**.

Los fármacos de base metálica más utilizados son los derivados del platino (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, entre otros) estos se utilizan ampliamente en el tratamiento de tumores malignos. El médico puede usar un fármaco o una combinación de fármacos.

Dependiendo del medicamento elegido, la quimioterapia afecta a las células malignas en una de tres formas:

-Dañando el ADN de las células cancerosas de tal modo que éstas ya no puedan reproducirse. Esto sucede por la alteración de la estructura del ADN en el núcleo de la célula, evitando así la replicación.

-Durante la fase S del ciclo celular, inhibiendo la síntesis de cordones de ADN nuevo de tal manera que no sea posible replicación celular alguna. Esto ocurre cuando los fármacos bloquean la formación de los nucleótidos necesarios para la creación de ADN nuevo.

-Deteniendo el proceso mitótico de tal modo que la célula cancerosa no pueda dividirse en dos células **(11)**.

Los medicamentos se ubican en una categoría específica según el mecanismo de acción que utilizan. Las categorías son:

1. Agentes alquilantes, son fármacos que funcionan atacando directamente el ADN de una célula. Estos medicamentos pueden operar en cualquier momento del ciclo celular.
2. Las nitrosoureas, son fármacos similares a los agentes alquilantes, y trabajan inhibiendo los cambios necesarios para la reparación de ADN.
3. Los antimetabolitos, bloquean el crecimiento celular al interferir con la síntesis de ADN.
4. Los antimetabolitos antitumorales, o citostáticos, funcionan al unirse con el ADN para evitar la síntesis de ARN.
5. Los alcaloides de la vinca, impiden la división celular **(11)**.

Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen principalmente de los fármacos y de la dosis que recibe el paciente. La pérdida de pelo es un efecto secundario común de la quimioterapia; sin embargo, no todos los fármacos contra el cáncer causan pérdida de pelo. Los fármacos antineoplásicos pueden también causar fatiga temporal, pérdida del apetito, náuseas y vómitos, diarrea, o llagas en la boca y labios. Las células normales generalmente se recuperan cuando ha terminado la quimioterapia, por lo que la mayoría de los efectos secundarios desaparecen gradualmente después de que termina el tratamiento **(3)**.

La **terapia hormonal** se usa para tratar ciertos tipos de cáncer que dependen de hormonas para su crecimiento. La terapia hormonal impide que las células cancerosas utilicen las hormonas que necesitan para crecer. Este tratamiento puede incluir el uso de fármacos que detienen la producción de ciertas hormonas o que cambian la forma cómo funcionan las hormonas. Otro tipo de terapia hormonal es la cirugía para extirpar los órganos que producen hormonas. Los pacientes pueden

sentirse cansados o retener líquidos, subir de peso, tener bochornos, náuseas y vómitos, cambios de apetito y en algunos casos, coágulos de sangre. La terapia hormonal puede causar también osteoporosis en mujeres premenopáusicas. Dependiendo del tipo de terapia hormonal que se use, estos efectos secundarios pueden ser temporales, durar mucho tiempo o ser permanentes (3).

La **terapia biológica** utiliza directa o indirectamente el sistema inmune del cuerpo para combatir la enfermedad, se utilizan anticuerpos monoclonales, el interferón, la interleucina-2 y los factores estimulantes de colonias. Los efectos secundarios causados por la terapia biológica varían con el tratamiento específico. En general, estos tratamientos tienden a causar síntomas parecidos a los de la gripe, como escalofríos, fiebre, dolor de músculos, debilidad, pérdida de apetito, náuseas, vómitos y diarrea. Los pacientes pueden también sangrar o magullarse con facilidad, tener erupciones de la piel o inflamación. Estos problemas pueden ser graves, pero desaparecen cuando termina el tratamiento (3).

Además de causar efectos secundarios considerables, los tratamientos contra el cáncer son de muy alto costo, por lo que la mayoría de los enfermos no pueden disponer de éstos. Algunos pacientes se pueden preocupar de que los efectos secundarios sean peores que la enfermedad.

E. Industria Farmacéutica.

La OMS define la salud como: *el estado completo de bienestar físico, psíquico y social, y no sólo la ausencia de afecciones y enfermedades (12)*. La salud es resultado de la prestación de un vasto conjunto de bienes y servicios que pueden ir dirigidos a la colectividad o a individuos particulares pero que finalmente convergen en mejorar el bienestar de la sociedad. Por lo tanto, la salud depende de la existencia y la calidad de:

- ❖ Infraestructura sanitaria: aire limpio; agua potable; alimentos inocuos; nutrición saludable; disposición de desechos; promoción del uso adecuado de los recursos; y otros bienes públicos globales similares.
- ❖ Medidas preventivas de salud pública: inmunizaciones y terapias profilácticas dirigidas a las comunidades; educación en el estilo de vida, para prevenir focos de infección, adicciones y transmisión de enfermedades.

- ❖ Atención médica: servicios profesionales de atención desde la prevención, diagnóstico y terapéutica hasta la rehabilitación y reintegración a la vida productiva.

El sector farmacéutico es prioritario para preservar la salud de la población así como también generar bienes de primera necesidad. Este sector está sujeto a cambios en los avances tecnológicos, a los movimientos sociales, políticos y económicos generados por la globalización, reformas en la configuración del sistema de salud y variaciones en la demanda derivadas de las transiciones epidemiológica y demográfica.

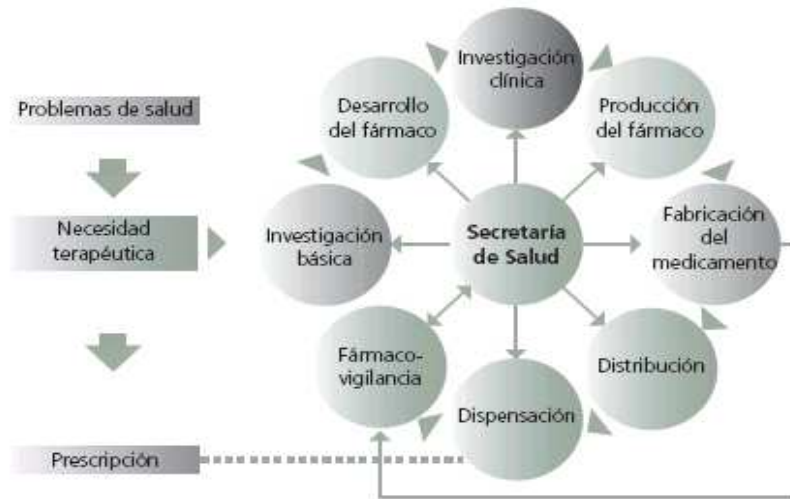
Los medicamentos son una herramienta esencial en la lucha contra las enfermedades y sus consecuencias, han sido uno de los principales elementos que han permitido importantes mejoras en la salud y en la calidad de vida de la sociedad actual. Sin embargo, existe heterogeneidad en la eficacia y seguridad de los medicamentos e inequidad en su acceso.

Factores demográficos y epidemiológicos que condicionan altos requerimientos de medicamentos:

- ❖ Aumento en el número de habitantes.
- ❖ Sobrevida prolongada.
- ❖ Envejecimiento de la población.
- ❖ Alto número de enfermos.
- ❖ Individuos con varias enfermedades concomitantes.
- ❖ Cronicidad de las enfermedades.
- ❖ Frecuentes complicaciones de enfermedades crónicas.
- ❖ Resistencia a los agentes terapéuticos.
- ❖ Asociación de medicamentos para lograr el efecto terapéutico **(13)**.

Para contar con medicamentos seguros y eficaces existe un proceso básico que inicia con la investigación impulsada por las necesidades terapéuticas, continúa con la producción del principio activo o fármaco, la fabricación de los medicamentos, posteriormente se comercializa, se distribuye, y se prescribe; este proceso concluye con la dispensación y publicidad de los medicamentos y finalmente con la vigilancia de sus efectos, una vez que son utilizados por el consumidor, esta etapa es conocida como farmacovigilancia. El proceso anteriormente descrito se ilustra en la **Figura 4**.

Figura 4. Procesos que competen a la política farmacéutica (13).



i. Industria Farmacéutica en el Mundo.

En el mundo la industria farmacéutica es uno de los sectores de mayor crecimiento, y que tiene mayor proyección sobre la sociedad, tanto en el sentido económico, como en la contribución social y en impacto en salud pública. Es un sector altamente dependiente de la investigación y el desarrollo tecnológico. La derrama de valor derivada del aparato de investigación para desarrollo de fármacos de patente es sustancial. Ese valor a su vez, garantiza la continuidad en la investigación para el combate de enfermedades crónico-degenerativas tales como el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (14).

La industria farmacéutica transnacional ha tenido resultados excepcionales en términos de investigación y desarrollo en los últimos años y se ha destacado por ser el sector líder en la transformación de la ciencia básica a los bienes de consumo disponibles y a la venta en todo el mundo. La industria enfrenta una creciente competencia por lo que requiere la renovación constante de sus productos, así como una estrategia de comercialización y posicionamiento cada vez mayores.

En el 2003 el valor del mercado mundial alcanzó 440 mil millones de dólares. Estados Unidos es el principal mercado. Norteamérica, la Unión Europea y Japón representan en conjunto el 88% del total

mundial. En Latinoamérica existen cuatro países líderes en este sector: México, Brasil, Argentina y Venezuela. Estos comprenden el 81.8% de las ventas totales en valor de la región **(13)**.

Tabla 1. Participación regional en el mercado farmacéutico mundial y tasas de crecimiento en 2002 **(15)**.

Mercado mundial auditado	Ventas globales (%)	Crecimiento (%)
Norteamérica	51	+ 12
Unión Europea	22	+ 8
Resto de Europa	3	+ 9
Japón	12	+1
Asia, África y Australia	8	+ 11
Latinoamérica	4	- 10
Total	100%	+ 8%

Fuente: IMS World Review 2003

La lista de innovaciones de la industria farmacéutica de países en desarrollo es pobre en comparación con la de los Estados Unidos o los países europeos, debido a que en general, se hace relativamente poca investigación farmacológica y farmacéutica básica. Ver **Tabla 1**.

Como sucede con la mayoría de las industrias pertenecientes a capital extranjero, la industria farmacéutica ejecuta únicamente un número limitado de actividades en los países en desarrollo. Las actividades más importantes en estos países están representadas por la manufactura de productos terminados, tales como tabletas, cápsulas, líquidos, ungüentos, polvos e inyecciones. La síntesis de productos nuevos, la investigación y desarrollo de estos productos se efectúa raramente o de manera muy limitada. Todas las medicinas introducidas en el mercado son resultado de un proceso de investigación y desarrollo largo, costoso y de alto riesgo. El cálculo de la investigación de un medicamento innovador desde los primeros estudios hasta su puesta en el mercado tiene un costo cercano a los 800 millones de dólares **(16)**.

En la época actual el crecimiento a largo plazo de los países depende en gran proporción de las innovaciones industriales que pueden darse si existen las suficientes capacidades humanas.

ii. Industria Farmacéutica en México.

La actividad de la industria farmacéutica se inicia en México a finales del siglo XIX. En 1881 se fundó por primera vez un negocio de droguería que se dedicaba a la importación en gran escala de drogas medicinales de origen alemán. En 1920, funcionaban ya en México alrededor de 20 laboratorios que se dedicaban en gran parte a la obtención de agua destilada y al acondicionamiento de productos importados que provenían de los Estados Unidos, Alemania, Suiza, Francia e Inglaterra. Actualmente, los principales participantes en el sector farmacéutico son empresas internacionales mayoritariamente de capital estadounidense y europeo, aunque también existe una importante industria de capital nacional (17).

Hoy existen en México 224 fábricas o laboratorios de medicamentos o productos biológicos pertenecientes a 200 empresas; 46 fábricas forman parte de corporativos de capital mayoritariamente extranjero. Los laboratorios extranjeros son productores de medicamentos de patente y realizan importantes contribuciones a la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos. Existen varios laboratorios extranjeros que participan tanto en el segmento de medicamentos de patente como en el de medicamentos genéricos intercambiables. Por otro lado, las empresas de capital nacional tienen como actividad principal la fabricación de productos una vez que se ha vencido la patente (genéricos), aunque también algunos hacen investigación básica (13).

Las ventas de la industria farmacéutica mexicana ocupan el tercer lugar en la región de las Américas, sólo después de los Estados Unidos y Canadá. El valor del mercado farmacéutico mexicano ha tenido un aumento considerable. Considerando el total de actividades comerciales, el mercado farmacéutico mexicano alcanzó la cifra de 2,270 millones de unidades en 2002 y 9,542 millones de dólares. En cambio, la venta en unidades se ha modificado en menor medida. Esto, al menos en el caso del mercado privado, podría relacionarse directamente con el precio promedio de los medicamentos en donde éste aumentó. El mercado farmacéutico mexicano está conformado fundamentalmente por dos segmentos bien definidos que operan de forma independiente. El institucional (sector público), cuya demanda comprende principalmente productos genéricos y de tecnología sólida; y el privado, caracterizado por el uso de marcas comerciales y productos innovadores.

La competitividad y el enorme potencial de desarrollo de este sector se ve limitado por carencias en el suministro de productos de investigación (nuevos fármacos, nuevos dispositivos farmacéuticos) y por insuficiencia en la infraestructura (recurso humano entrenado, equipamiento, instalaciones) para estudiar y optimizar procesos farmacéuticos.

Ciertos medicamentos no pueden ser comprados debido a la capacidad de pago limitada de algunos sectores de la población, particularmente de aquellos que carecen de aseguramiento en salud, o de las propias instituciones públicas de salud; el costo de adquirirlos puede constituir un factor de empobrecimiento para los hogares o impedir por falta de acceso, la curación o mejoría de los padecimientos. Por lo anterior, es importante comprender el entorno actual a fin de prever las futuras necesidades en salud y promover, desde hoy, el desarrollo de productos e instrumentos que ayuden a hacer frente a estos retos futuros.

La industria farmacéutica instalada en México es económicamente fuerte, aunque su crecimiento se ha desacelerado en los últimos años y cubre el 86% de las necesidades de medicamentos del país, principalmente a partir de principios activos provenientes del extranjero. Se obtienen esteroides, antibióticos de fermentación y semisintéticos, otros antimicrobianos, antiinflamatorios no esteroideos, antitumorales, antiulcerosos, vitamínicos, biofármacos y otros, pero varios no están cubiertos por la producción nacional, la cual ha disminuido en los últimos años (13).

iii. Desarrollo de Fármacos

El proceso de desarrollo de un nuevo fármaco consiste en analizar un padecimiento y comprender todo lo que este involucra, sus causas, mecanismos de daño, población a la que afecta, identificar sustancias activas potencialmente útiles, sintetizar o extraer los compuestos químicos, en las investigaciones *In Vitro* y en animales de experimentación, en pruebas de seguridad y eficacia en humanos y en la comercialización del producto. Este proceso puede ser:

- ❖ Lento: la sustancia activa de los medicamentos tarda, en promedio, entre 8 y 12 años en pasar del laboratorio de investigación a la comercialización.

- ❖ Riesgoso: sólo una de cada 5,000 a 10,000 sustancias sobrevive a las pruebas posteriores a su descubrimiento, para así convertirse en medicinas con la calidad y seguridad necesarias para su lanzamiento al mercado.
- ❖ Progresivamente más caro: el costo total de introducir una nueva sustancia biológica o química al mercado es actualmente cuatro veces más alto de lo que era hace 10 años.

El proceso de desarrollo de un nuevo fármaco, inicia con la investigación total de este fármaco. Esta investigación se divide en dos grandes áreas: la preclínica y la clínica. Ver **Figura 5**.

La **investigación preclínica** incluye la básica, de laboratorio y la que se realiza en animales de experimentación. Se lleva a cabo en algunos segmentos de la industria farmacéutica productiva, en universidades y en centros de investigación. Representa las primeras fases del desarrollo y genera una derrama de beneficios que van más allá del sector salud. Es por esto que es importante impulsar esta fase como estrategia para el desarrollo de una base tecnológica fuerte en nuestro país.

La **investigación clínica** pretende observar en los seres humanos el comportamiento de un medicamento y demostrar su eficacia y seguridad. Este tipo de investigación se lleva a cabo inicialmente en unidades de farmacología clínica (fase I) y posteriormente en áreas de atención médica, hospitales o consulta externa (fase II, III y IV). Generalmente la investigación clínica farmacéutica está financiada por la industria y coordinada por ella misma o por organizaciones de investigación por contrato **(13)**.

Figura 5. Fases de la vida de un medicamento.

Fase de la vida del medicamento	Años	Procesos farmacéuticos
Investigación	1	Solicitud de patente
	2	Farmacología
	3	
	4	Toxicidad aguda
	5	Toxicidad crónica
	6	
	7	Estudios clínicos Fase I
	8	
	9	Estudios clínicos Fase II
	10	Estudios clínicos Fase III
Procesos administrativos	11	Registro y autorización de comercialización
	12	Precios
	13	Inicio de la recuperación de la inversión
Explotación de la patente	14	
	15	
	16	
	17	
	18	
	19	Estudios clínicos Fase IV
	20	Farmacovigilancia
Competencia comercial (Genéricos)	21	
	22	
	23	
	24	
	25	

Fuente: Modificado de la Federación Europea de Asociaciones de la Industria Farmacéutica, 2003

F. Registro Sanitario y Autorización de Protocolos de Investigación.

La regulación sanitaria de los medicamentos, entre ellos el registro sanitario, es un instrumento necesario e indispensable para lograr su seguridad, eficacia y calidad, con objeto de cumplir con la responsabilidad del Estado de proteger la salud de los mexicanos. La legislación sanitaria mexicana determina que ciertos productos, por el riesgo sanitario que representan, requieren obtener una autorización antes de su comercialización de conformidad con los artículos 194 fracción II y III, 194 Bis, 195, 197, 198, 204, 376 y 376 Bis de la Ley General de Salud, los productos que requieren de un Registro Sanitario son:

“Los medicamentos, estupefacientes, sustancias psicotrópicas y productos que los contengan; equipos médicos, prótesis, órtesis, ayudas funcionales, agentes de diagnóstico, insumos de uso odontológico, materiales quirúrgicos y de curación, y productos higiénicos; así como los plaguicidas, nutrientes vegetales y sustancias tóxicas o peligrosas” (18).

Anteriormente, los registros sanitarios de productos eran emitidos por la Dirección General de Medicamentos y Tecnologías para la Salud. Actualmente, corresponde a la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), órgano desconcentrado de la Secretaría de Salud, a través de la Comisión de Autorización Sanitaria. El trámite de registro sanitario de productos se ha venido realizando de manera personalizada ante la COFEPRIS, a través del Centro Integral de Servicios (CIS). La cifra aproximada de solicitudes de registro sanitario que se atienden anualmente es de 18,000, lo que representa un promedio mensual de 1,500. Para cada solicitud de registro sanitario se recibe documentación que consta en promedio de 900 hojas, lo que multiplicado por el número de solicitudes mensuales, nos da un total de 16'200,000 hojas que tienen que ser revisadas para evaluar la procedencia de la solicitud, emitir la resolución correspondiente, relacionarlas, archivarlas y resguardarlas.

Los primeros pasos en el proceso de descubrimiento de un nuevo fármaco inician cuando se tiene un compuesto químico interesante y útil para propósitos médicos, sin embargo, se necesitan datos fisicoquímicos disponibles que sugieran que el compuesto promete tener suficiente garantía para seguirlo como un proceso de fármaco nuevo. En el proceso de desarrollo de un fármaco en su fase preclínica se busca conducir los ensayos toxicológicos y farmacológicos más relevantes en animales. Basados en estos resultados, con una adecuada interpretación y con la ayuda de farmacocinética de manera integral, se hace una proyección razonable a humanos. Para llevar a cabo investigación en humanos es necesario solicitar ante la Secretaría de Salud, mediante la COFEPRIS, el trámite de Autorización de Protocolos de Investigación de Medicamento con fines de Registro Sanitario. Además es básico contar con una institución que tenga vigente su licencia sanitaria.

El trámite consiste en realizar un pago bancario, de \$3,585, llamado "Declaración única de pago de derechos", describiendo el tipo de trámite a realizar; en este caso: Solicitud de autorización de protocolos de investigación de cada medicamento con fines de registro sanitario. Posteriormente, se requisita adecuadamente el formato de solicitudes, con los campos siguientes:

- a. Solicitud de trámite
- b. Datos del establecimiento

c. Datos del producto:

1. Nombre de la clasificación del producto o servicio
2. Especificar
3. Nombre (marca comercial) o denominación distintiva
4. Denominación común internacional (DCI) o denominación genérica o nombre científico
5. Forma farmacéutica o física
6. Tipo de producto
7. Concentración

d. Protocolos de investigación:

1. Título del protocolo
2. Vía de administración (medicamentos o dispositivos médicos)
3. Nombre del investigador principal
4. Nombre(s) de la(s) institución(es) donde se realizará la investigación

Finalmente, se tiene la autorización y se desarrolla el protocolo. En su evolución (años, generalmente) si se presentan reacciones adversas deben informar al Centro Nacional de Farmacovigilancia. Se publican en revistas los resultados y al concluir se tiene un medicamento definido. De esta manera se determinaron calidad, eficacia y seguridad misma que se confirma a través de la farmacovigilancia una vez que está en el mercado.

G. Requisitos para un medicamento nuevo

La Ley General de Salud establece en su artículo 195 que los medicamentos estarán normados por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. El artículo 204 menciona que los medicamentos deberán contar con autorización sanitaria para su venta o suministro. Y finalmente, el artículo 376 describe que los medicamentos requieren un registro sanitario. En cumplimiento con los artículos mencionados anteriormente la FEUM establece las siguientes características que deben cumplir los medicamentos para obtener el registro sanitario:

1. Indicaciones terapéuticas.
2. Condiciones de uso.

3. Información para prescribir.

4. Estudios preclínicos.

4.1 Farmacodinamia.

4.2 Farmacocinética.

4.3 Toxicología y seguridad.

5. Estudios Clínicos.

6. Fórmula.

7. Materias primas.

8. Desarrollo farmacéutico.

Debe proporcionarse la información correspondiente de los estudios realizados para establecer y justificar lo siguiente:

8.1 Forma farmacéutica del medicamento.

8.2 Formulación del medicamento.

8.3 Proceso de manufactura.

8.4 Controles de proceso.

8.5 Sistema contenedor-cierre.

9. Instalaciones del fabricante.

10. Información de fabricación y proceso.

11. Aseguramiento del proceso de esterilización. Para el manejo de productos estériles o elementos que se utilicen en productos estériles, el fabricante debe proporcionar la siguiente información:

12. Control de materiales de envase.

13. Control del producto terminado.

14. Estudios de estabilidad **(19)**.

Justificación

En la República Mexicana, existe una evidente transición epidemiológica asociada al envejecimiento de la población y estilos de vida poco saludables. La Dirección General de Información en Salud reporta en el Programa Nacional de Salud 2007-2012 que, menos del 15% de la mortalidad en nuestro país se debe a infecciones comunes, problemas reproductivos y padecimientos relacionados con la desnutrición, el 11% de la mortalidad reportada se debe a lesiones accidentales e intencionales y el 73% se asocia a padecimientos no transmisibles, como la diabetes, los problemas cardiovasculares y el cáncer. Predominan ahora padecimientos difíciles de tratar y más costosos, los cuales están relacionados mayormente con enfermedades no transmisibles y lesiones, y no con enfermedades derivadas de la desnutrición como lo fue en el siglo XX.

En el caso particular del cáncer, existe un factor extra que es determinante, los monopolios en la industria farmacéutica. El mercado de los fármacos antineoplásicos, se encuentra dominado por grandes empresas que elevan el costo y hacen inaccesible el uso de estos para países en vías de desarrollo. En nuestro país existe una dependencia virtualmente absoluta de la industria farmacéutica extranjera. Esta situación es probable que obedezca a la falta de investigación en ciencias básicas, así como a la cuestionable credibilidad que se les da a los desarrollos de investigadores nacionales. Es preocupante el lento crecimiento en la producción de fármacos nacionales y la dependencia creciente de proveedores extranjeros.

En México existe la necesidad de dar servicio a la demanda de salud en pacientes con problemas de cáncer. El costo de la quimioterapia como tratamiento primario o adyuvante hace, en ocasiones, inaccesible la opción a un gran número de pacientes con las consecuencias éticas que esto significa. La alternativa que podría solucionar la problemática de los medicamentos antineoplásicos a costos inalcanzables podría ser el autoabastecimiento de estos a partir de una producción nacional a partir de la materia prima importada, una labor de investigación y desarrollo para obtener el fármaco y obtener la patente correspondiente. Con la producción interna de estos medicamentos, mediante esta forma de producción, se abaratarán los costos de adquisición de estos fármacos y se reducirá significativamente la dependencia del dominio del mercado por parte de empresas extranjeras.

El cáncer es sin duda un mal que aqueja al mundo. Actualmente, existen 24,6 millones de personas con cáncer. Cada año más de 11 millones de nuevos casos de cáncer son diagnosticados y más de 7 millones de personas mueren al año a causa de él. Se ha proyectado que para el año 2020 el número de casos nuevos aumentará a 16 millones por año y más de 10 millones morirán (6).

La quimioterapia es uno de los tratamientos más comunes para combatir el cáncer. Los fármacos más utilizados a nivel mundial son los derivados del platino (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, entre otros). La introducción de nuevos fármacos para mejorar la eficacia y especificidad en el tratamiento del cáncer se hace necesaria. En nuestro país existe una producción nacional de fármacos antineoplásicos limitada, por lo que la necesidad de importación de estos productos, o la materia prima para su fabricación, hace su costo elevado y de difícil acceso para ciertos sectores de la población, además la producción nacional no es de innovación mexicana, generalmente se centra en patentes de tecnología internacional. Es por esto que el desarrollo de compuestos contra el cáncer con tecnología mexicana debe ser de alta prioridad.

En la UNAM, un grupo multidisciplinario de investigadores, guiados por la Dra. Lena Ruiz Azuara, ha realizado a lo largo de casi 20 años estudios importantes con una familia de compuestos llamada Casiopeínas[®] cuyo centro metálico es el cobre. Este grupo de compuestos fue creado por la Dra. Ruiz aproximadamente en los años ochentas y cuenta con patentes nacionales. De acuerdo a protocolos internacionales establecidos, estos compuestos han demostrado tener actividad antineoplásica, citotóxica, citostática, evaluada en sistemas tanto *In Vivo* como *In Vitro*. Los compuestos más estudiados por el momento son Casiopeína[®] IIgly y Casiopeína[®] III-ia, los cuales se encuentran en etapa preclínica y en vías de registro sanitario de protocolo para Fase I y con esto su iniciación en la etapa clínica.

El desarrollo a estos nuevos fármacos, su registro sanitario, su autorización a protocolos de investigación, su distribución y comercialización afirmarán que en nuestro país sí existe el potencial humano para crear compuestos novedosos abriendo así una gamma de posibilidades en innovación y generación de tecnologías propias.

Esto justifica la creación de una compilación de estudios químicos y farmacológicos de las Casiopeínas® IIgly y III-ia, para su futuro registro sanitario correspondiente, así como para la autorización de protocolos de investigación, es decir para su investigación clínica. Además para que la información sobre estos dos compuestos, generada a lo largo de varios años, sea de fácil acceso para quienes requieran consultarla para estudios posteriores.

Objetivo

El principal objetivo de este trabajo monográfico es seleccionar, organizar y compilar toda información relacionada a la Casiopeína® IIgly y la Casiopeína® III-ia para su Registro Sanitario y Autorización de Protocolos de Investigación ante la Secretaría de Salud y con esto la oportunidad de iniciar estudios clínicos con dichos compuestos, que sin duda son la mejor innovación mexicana en cuanto a fármacos antineoplásicos se refiere.

Capítulo I. Casiopeínas® IIgly y III-ia

1.1 Antecedentes

Actualmente, existe un número considerable de fármacos contra el cáncer, tanto de origen orgánico como inorgánico, sin embargo, la existencia de tumores refractarios a estos tratamientos, la elevada toxicidad de los existentes y su costo elevado impulsan la búsqueda de nuevas moléculas que mejoren dichas características.

A finales de la década de los 70's, en la Facultad de Química de la UNAM, el grupo de trabajo de la Dra. Lena Ruiz inició un proyecto encaminado al desarrollo de antineoplásicos a partir de metales de transición, de preferencia esenciales biológicamente, con el propósito de disminuir toxicidad y costo. Se sintetizó una familia de compuestos de coordinación con Cu(II) como centro metálico, los cuales en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diiminas (N-N) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o donador por oxígeno (O-O); a esta familia de compuestos se les ha registrado con el nombre de Casiopeínas®. Estos compuestos han demostrado tener actividad citostática, citotóxica y antineoplásica en modelos tanto *In Vitro* como *In Vivo*. Debido al centro metálico, un probable mecanismo de acción de estas sustancias es la generación de radicales libres que causarían daño oxidativo.

El cobre es uno de los metales más abundantes en el planeta Tierra con una abundancia relativa de 68 ppm. Es un metal de transición con la configuración electrónica ([Ar] 4s¹3d¹⁰), un número atómico 29 y con un peso atómico de 63.543 (+/- 0.003). Los estados de oxidación de este metal pueden ser 0, I, II, III y IV. Los más comunes son I y II, siendo este último el más estable. Los números de coordinación más comunes para el Cu (II) son 4, 5 y 6. El cobre, como centro metálico, en estas moléculas presenta un estado de oxidación (II) y puede coordinar ligantes siguiendo una geometría cuadrada plana o pirámide de base cuadrada. Es un metal esencial en los sistemas biológicos. En el ser humano se encuentra distribuido principalmente en el cerebro, riñón, hígado y corazón (20-21). Sus propiedades químicas le permiten la participación en procesos fundamentales que involucran la transferencia de electrones asociada a enzimas oxidativas. Sin embargo, la concentración de éste no excede de 10⁻¹⁵ M dentro de las células. Al ser un metal esencial se espera que su toxicidad sea menor que la de los complejos de platino, que son los más utilizados para combatir el cáncer. El

centro metálico por su parte puede participar en ciclos redox para liberar especies reactivas de oxígeno que oxiden al ADN dando como resultado daños irreparables en su estructura, adicionalmente el cobre puede o no intercambiar alguno de sus ligantes presumiblemente el donador O-O para coordinarse directamente con los donadores por nitrógeno de las bases (22).

Existen más de 100 Casiopeínas® que han sido sintetizadas y caracterizadas. Debido a esto, se ha reorganizado en familias para simplificar mediante claves la comunicación entre los investigadores de este proyecto. A continuación se presenta la fórmula general de cada subfamilia en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Fórmula general de cada familia de Casiopeínas® (22).

Sub familia	Fórmula general
Casiopeína® I	[Cu(4,7- difenil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® II	[Cu(4,7- dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® III	[Cu (N-N(O-O))]NO ₃
Casiopeína® IV	[Cu(4,4'- dimetil-bipiridina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® V	[Cu(5R- fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® VI	[Cu(5,6- dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® VII	[Cu(fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® IX	[Cu(bipiridina)(O-N)]NO ₃

Hasta el momento dos de las Casiopeínas® más prometedoras y estudiadas son la Casiopeína® IIgly y la Casiopeína® III-ia, por lo que la presente compilación se hace exclusivamente para ellas.

1.2 Proceso de síntesis.

El proceso de síntesis de las Casiopeínas® ha sido reportado detalladamente en sus patentes (23-27).

1.3 Caracterización Físico-Química para la Casiopeína® Igly (28-31).

Fórmula condensada general de la familia: $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{O-N})]\text{NO}_3$

Casiopeína® Igly: $[\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$

Fórmula: $\text{Cu} \text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

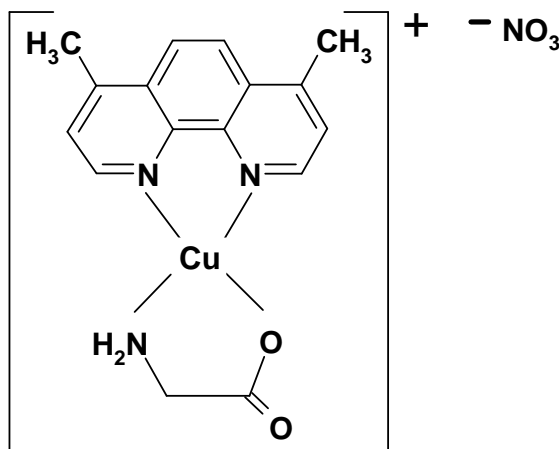
Peso molecular: 443.90 g/mol (con dos moléculas de agua)

Análisis de elementos (%):

Teórico: 12.6 %N, 43.3 %C, 4.5%H

Experimental: 12.9 %N, 43.0 %C, 4.4 %H

Estructura:



Las pruebas físicas realizadas como descripción, densidad aparente, densidad real, velocidad de flujo y tamaño de partícula, son parámetros importantes para ser evaluados en el Control de Calidad de una materia prima; nos proporciona información acerca de las diferencias que existe entre un lote y otro para una misma materia prima, los resultados obtenidos muestran que los lotes analizados son homogéneos entre ellos, además podemos predecir su comportamiento en el producto final desde el punto de vista de formulación del medicamento.

Descripción del compuesto: Polvo fino, libre de partículas extrañas, homogéneo, color azul (intenso).

Densidad Aparente: 0.425g/mL

Velocidad de flujo: 1.0 g/seg

Tamaño de Partícula: se encontró entre >40 <50 micras, que representa un 70% a 80% de un total de 100 partículas medidas, estos resultados nos indican que no existe diferencia significativa del compuesto en cuanto a diseño y síntesis se refiere.

Solubilidad: muy soluble en metanol, etanol y mezcla de agua-alcohol (50:50), soluble en agua. Soluciones amortiguadoras recomendables MOPS y TRIS. Estable en solución acuosa por 7 días.

1.4 Caracterización Físico-Química de la Casiopeína® III-ia (28-31).

Fórmula condensada general de la familia: [Cu (N-N)(O-O)]NO₃

Casiopeína® III-ia: [Cu(4, 4'-dimetil- 2,2'- bipyridina)(acetilacetonato)]NO₃

Formula: CuC₁₇N₃O₅H₁₉*2H₂O

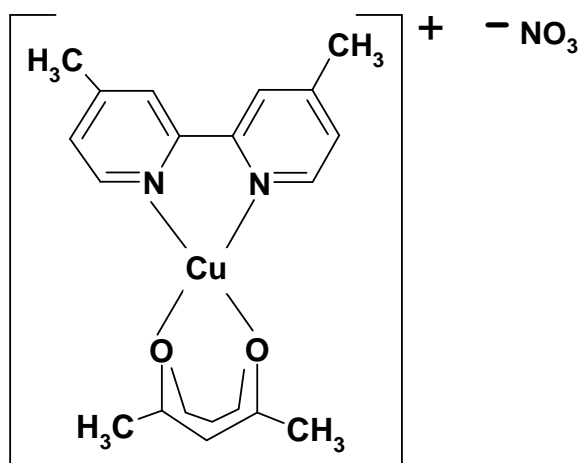
Peso molecular: 444.93 g/mol (con dos moléculas de agua)

Análisis de elementos (%):

Teórico: 9.4% N, 45.9% C, 5.2 %H

Experimental: 9.4 % N, 46.1 % C, 4.9 % H

Estructura:



Descripción del compuesto: Polvo fino, libre de partículas extrañas, homogéneo, color azul (claro).

Densidad aparente: 0.44 g/mL

Velocidad de flujo: 0.8 g/seg

Tamaño de Partícula: Las partículas se encontraron en el intervalo comprendido entre >50 <60, lo que representa aproximadamente un 40% de un total de 100 partículas analizadas.

Solubilidad: A temperatura ambiente es soluble en agua, metanol, etanol y soluciones fisiológicas (MOPS y TRIS) a pH 7.4. Estable en solución acuosa por 7 días.

1.5 Análisis de las Casiopeínas® Ilgly y III-ia con diferentes técnicas de instrumentación.

Se han reportado estudios para obtener un control de calidad del principio activo como materia prima, para que cumpla los estándares que marca la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), como principio activo de una forma farmacéutica, estos estándares se refieren a identidad, pureza y concentración del compuesto a estudiar, en este caso, las Casiopeína® Ilgly y la Casiopeína® III-ia.

Con este propósito se realizó la evaluación fisicoquímica de estos compuestos con actividad antineoplásica, el control realizado a estas sustancias implicó un análisis con las siguientes técnicas de instrumentación: Espectroscopia UV-VIS, Espectroscopia de Infrarrojo, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, Análisis Térmico Diferencial (DTA).

1.5.1 UV-visible.

En la determinación de espectroscopia por UV-visible se obtuvieron los máximos de detección específicos para las Casiopeína® Ilgly y Casiopeína® III-ia, los cuales se pueden tomar como un parámetro de referencia (especificidad) para la caracterización de los compuestos. Se lograron detectar las transiciones electrónicas que se dan en estos compuestos, manifestadas por los máximos de absorción a diferentes longitudes de onda.

Casiopeína® Igly

Concentración de 10 µg/ml: se detectan dos picos máximos de absorción en una longitud de onda de 274 nm y 209 nm, con una absorbancia de 0.957 y 1.227 respectivamente.

Concentración de 7µg/ml: se presentan máximos de absorción con una longitud de onda de 274 nm y 208.5 nm, con una absorbancia de 0.629 y 0.882 respectivamente **(30)**.

Casiopeína® III-ia

Concentración de 5 µg/ml: se presentan picos de absorción en una longitud de onda de 295.5 y 208.0 con una absorción de 229.0 y 0.563 respectivamente.

Concentración de 7 µg/ml: se presentan máximos de absorción a una longitud de onda de 295.5 nm y 208.0 nm con una absorbancia de 0.296 nm y 0.817 respectivamente **(30)**.

1.5.2 Espectroscopia de Infrarrojo.

Al obtener los espectrogramas en la región de infrarrojo para las Casiopeínas® Igly y III-ia, se obtienen las señales características que nos proporcionan información acerca de los grupos funcionales que forman la molécula, por medio de estas señales podemos identificar y caracterizar la familia de las Casiopeínas®.

Principales grupos funcionales observados en la Casiopeína® Igly:

Amina: 3255.1 cm⁻¹, NO₃ ~1380 cm⁻¹, C=O: 1601 cm⁻¹, Fenantrolina: 1429, 871, 726 cm⁻¹, -C=N Señal en 1524 cm⁻¹ **(32)**.

Principales grupos funcionales observados en la Casiopeína® III-ia:

Amina: 3464, 3031 cm⁻¹, NO₃~1380 cm⁻¹, Aromático: 1587 cm⁻¹, Bipyridina: 161, 1491, 777, 730 cm⁻¹, -C=N: 1525 cm⁻¹ **(30)**.

1.5.3 Análisis Térmico Diferencial (DTA)

Casiopeína® Ilgly

Pérdida de materia del 0.63% con respecto al 100%, a una temperatura de 60 °C, pérdida de materia del 17.11% con respecto al 100%, a una temperatura de 260 °C, pérdida de materia del 31.42% con respecto al 100%, a una temperatura de 355°C **(30)**.

Casiopeína® III-ia

Pérdida de materia del 1.18% con respecto al 100%, a una temperatura de 60 °C, pérdida de materia del 3.09% con respecto al 100%, a una temperatura de 220°C, pérdida de materia del 36.64% con respecto al 100%, a una temperatura de 440 °C **(30)**.

1.5.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Casiopeína® Ilgly (30)

El método analítico para determinar Casiopeína® Ilgly en solución por HPLC, es selectivo, lineal, exacto, preciso y repetible en el intervalo de concentraciones 10, 30, 50, 70 y 100 µg/mL

*Condiciones cromatográficas de trabajo:

$\lambda=274\text{nm}$

Fase móvil Metanol/H₂O/Acetonitrilo (72.5:24:3.5) v/v

pH= 3.0 con ácido fosfórico.

*Selectividad:

Tiempo de retención (T.R.) de la Casiopeína® Ilgly = 2.7 minutos

Tiempo de retención de la Ketorolaco (estándar interno) = 7.1 minutos

Linealidad del sistema: $Y= 0.0237X - 0.0869$, $r^2=0.9986$

*Repetibilidad: Se realizó el análisis por cuadruplicado de los puntos controles (2 días), concentraciones de Casiopeína® Ilgly baja: 40 µg/mL, media: 60 µg/mL y alta: 90 µg/mL)

Coefficiente de variación (C.V.) < al 2%

*Reproducibilidad: Con los datos de repetibilidad se evaluó la reproducibilidad del sistema entre el día 1 y día 2, CV < 2%

Exactitud: El valor obtenido se interpola en la curva de calibración.

El C.V <2%.

Límite de detección: LD = 3.3

Límite de cuantificación: LC =11.0 µg/mL

Casiopeína® III-ia (30).

El método analítico para determinar Casiopeína® III-ia en solución por HPLC, es selectivo, lineal, exacto y preciso en el intervalo de concentraciones 20, 25, 30, 35 y 40 µg/mL.

*Condiciones cromatográficas de trabajo:

$\lambda=274\text{nm}$

Fase móvil: Metanol/Fosfatos/Hexansulfonato de Sodio v/v

pH = 6.9

*Selectividad:

Tiempo de retención (T.R.) de la Casiopeína® III-ia = 5.7 minutos

Tiempo de retención de la furosemida (estándar interno) = 8.6 minutos

Linealidad: $Y= 0.0212X -0.0061, r^2=0.9877$

*Repetibilidad: Se realizó con el análisis por cuadruplicado de los puntos controles (2 días), concentraciones de Casiopeína® III-ia, baja: 22 µg/mL, media: 28 µg/mL y alta: 38 µg/mL, CV < 2%

*Reproducibilidad: Con los datos de repetibilidad se evalúa la reproducibilidad del sistema entre el día 1 y día 2, CV <2%

*Exactitud del sistema: El valor obtenido se interpola en la curva de calibración (que se corre el mismo día del análisis) CV<2%

Límite de detección: LD=0.3

Límite de cuantificación, LC=1 µg/mL

1.5.5 Rayos X

A continuación se presentan las estructuras cristalinas obtenidas de las Casiopeínas® Ilgly y III-ia y sus correspondientes datos.

Figura 6. Estructura cristalina de la Casiopeína® Ilgly (32).

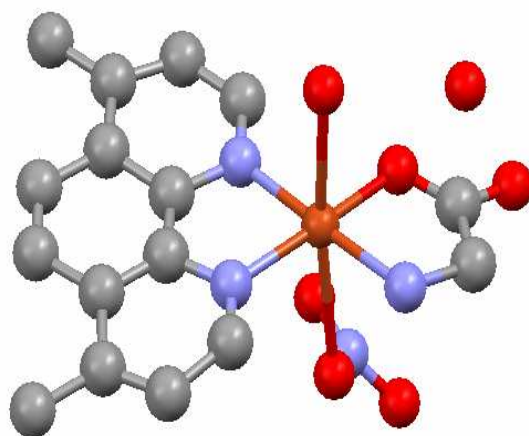


Tabla 3. Distancia y ángulos de enlace de los átomos donadores al centro metálico en los complejos mixtos de coordinación (32).

Compuesto	Casiopeína® Ilgly
Cu-N1 (Å)	2.004(8)
Cu-N2 (Å)	2.014(7)
Cu-N3 (Å)	1.963(8)
Cu-O1 (Å)	2.065(9)
∠N1-Cu-N2 (°)	80.2(3)
∠N3-Cu-O1 (°)	86.1(4)
pKa _{fen libre}	6.39

Figura 7. Estructura cristalina de la Casiopeína® III-ia (**33**).

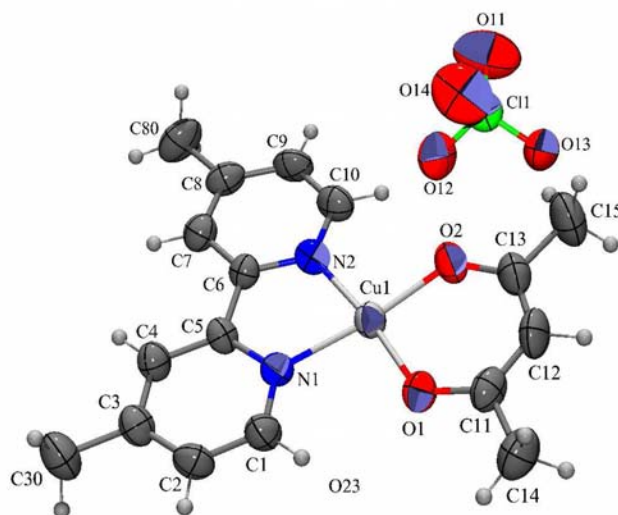


Tabla 4. Distancia y ángulos de enlace de los átomos donadores al centro metálico en los complejos mixtos de coordinación (**33**).

Compuesto	Casiopeína® III-ia
Cu-O2 (Å)	1.885(4)
Cu-O1 (Å)	1.896(4)
Cu-N1 (Å)	1.973(4)
Cu-N2 (Å)	1.983(4)
O2-Cu-O1(Å)	94.68(17)
O2-Cu-N1(Å)	172.59(17)
O1-Cu-N1(Å)	92.39(17)
O2-Cu-N2(Å)	91.57(18)
O1-Cu-N2(Å)	173.56(17)
N1-Cu-N2(Å)	81.43(17)

1.5.6 Espectroscopía de Resonancia Paramagnética del Electrón (EPR)

El objetivo fue caracterizar los complejos mediante espectroscopía EPR con el fin de obtener información sobre las propiedades magnéticas y estructurales de los complejos metálicos de cobre, es decir el carácter electrónico de los enlaces (iónico y covalente), todo esto para tener información sobre la reactividad de los complejos.

Tabla 5. Parámetros EPR de las Casiopeínas® IIgly en solución (MeOH $1 \times 10^{-3} \text{M}$ / 77K) (34).

Casiopeína®	g_{\parallel}	g_{\perp}	A_{\parallel} (G)	A_{\perp} (G)
IIgly	2.319	2.130	171.42	-

Tabla 6. Parámetros EPR de las Casiopeínas® III-ia en solución (MeOH/H₂O 50/50 v/v 77K) (33).

Casiopeína®	g_{\parallel}	g_{\perp}	A_{\parallel} (G)	A_{\perp} (G)
III-ia	2.25	2.03	185	8

1.5.7 Estabilidad de las Casiopeínas® IIgly y III-ia en soluciones fisiológicamente compatibles.

Casiopeína® IIgly (35).

Fue disuelta en soluciones compatibles fisiológicamente, las cuales fueron:

- Cloruro de sodio al 0.9%, no fue estable.
- Ringer con lactato de sodio (solución Hartmann), fue estable durante una semana.
- Dextrosa 5%, fue estable por tres semanas.

Casiopeína® III-ia (35).

Fue disuelta en soluciones compatibles fisiológicamente, las cuales fueron:

- Cloruro de sodio al 0.9%, fue estable por nueve días.
- Ringer con lactato de sodio (solución Hartmann), fue estable por tres semanas.
- Dextrosa 5%, fue estable por cuatro días.

Capítulo II. Actividad biológica

La actividad biológica es importante para el desarrollo de un nuevo fármaco. Si ésta es demostrada será posible continuar con otras investigaciones para su conocimiento y posterior desarrollo. En el caso particular de las Casiopeínas[®], la actividad biológica demostrada ha sido la antineoplásica en sus dos posibles vertientes: *In Vitro* (que ocurre dentro de un ambiente artificial, como tubo de ensayo, cajas Petri, etc.) e *In Vivo* (que ocurre dentro de un ambiente natural, como un animal o el cuerpo humano).

A continuación se describen algunas de las líneas tumorales que se han utilizado para comprobar la actividad antineoplásica de las Casiopeínas[®].

Tabla 7. Descripción de varias líneas tumorales humanas (36).

Código	Descripción del Tumor
HL60	Leucemia promielocítica
SiHa	Carcinoma cérvico-uterino
HeLa	Carcinoma cérvico-uterino
CaLo	Carcinoma cérvico-uterino
InBI	Carcinoma cérvico-uterino
CH1	Carcinoma ovárico
CaSki	Carcinoma epidermoide de cérvix
C33	Carcinoma epidermoide de cérvix
PC-3	Carcinoma de prostate
HCT-15	Carcinoma de colon
MCF-7	Carcinoma mamario
U-373	Glioma maligno (SNC)
SK-LU-1	Adenocarcinoma de pulmón
A 549	Adenocarcinoma de pulmón
HTB-186	Meduloblastoma

Tabla 8. Descripción de varias líneas tumorales murinas (36).

Código	Descripción del Tumor
AS-30D	Hepatoma
S180	Sarcoma
B16	Melanoma
L1210	Leucemia linfocítica

2.1 Actividad antineoplásica *In Vitro*

Tabla 9. Actividad antineoplásica *In Vitro* en diferentes líneas tumorales humanas con las Casiopeínas® Ilgly y III-ia y el Cisplatino (37).

	Líneas tumorales humanas											
	Carcinoma cérvico-uterino						Próstata		Colon		Mama	
	HeLa		SiHa		InBI		PC-3		HCT-15		MCF-7	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
Ilgly	0.33	0.74	0.46	1.03	0.95	2.14	1.62	3.46	1.10	2.53	2.03	4.58
III-ia	0.77	18.2	6.19	14.5	12.98	30.4	1.62	3.79	20.40	47.78	6.78	15.88
cisPt	1.56	5.2	1.49	4.9	5.62	18.6	>15	>50	1.38	4.6	1.68	5.6

2.1.1 Actividad antineoplásica *In Vitro* de la Casiopeína® Ilgly sobre las células de carcinoma de colon HCT-15.

La Cas Ilgly demostró alterar estadísticamente la viabilidad a partir de la primera dosis utilizada ($P=0.008$) en las células no tratadas con N-acetil cisteína, comportamiento que se repitió con todas las otras dosis con respecto al testigo (**Figura 8**). Aunado a lo anterior, al aumentar la concentración de Cas Ilgly, no se observan diferencias entre los tratamientos ($P>0.05$) con el cálculo de intervalos de confianza (31).

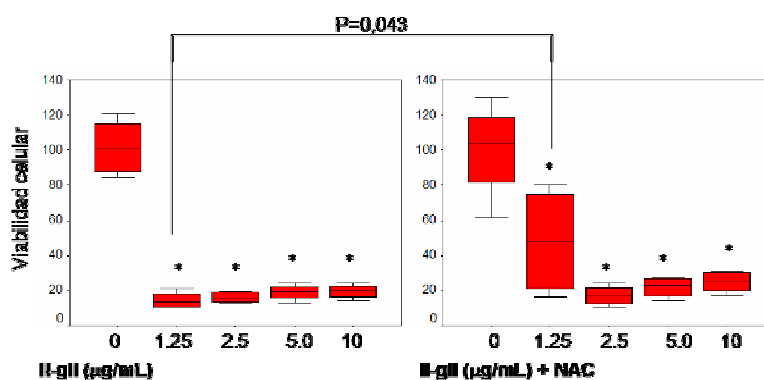


Figura 8. Caja de valores extremos que representa la viabilidad de HCT-15 con y sin tratamiento previo con N-Acetil cisteína después de 24 horas de exposición a Cas Ilgly en las distintas dosis. (* $P<0.05$)

No obstante, al incubar las células dos horas antes de la aplicación del fármaco con 10 mM de N-acetil cisteína (NAC), éste demostró proteger a las células de la muerte hasta en un 50% en la dosis de 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, no ejerció efecto alguno sobre las otras concentraciones (**Figura 8**). Aunado a lo anterior, existe una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.043$) entre la dosis de 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sin y con NAC (**Figura 8**).

Alteraciones ultraestructurales observadas tras el tratamiento con Cas IIgly en concentraciones ascendentes:

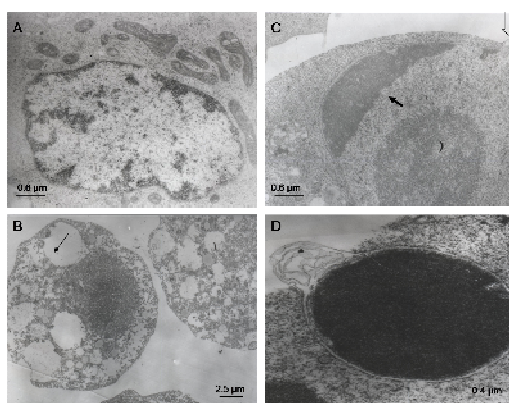


Figura 9. A. Células HCT-15 sin tratamiento. B. Células con alteraciones compatibles con oncosis. La flecha muestra vacuola electrolúcida en citoplasma. C. Células con alteraciones compatibles con apoptosis. La flecha rellena muestra condensación de la cromatina con “forma de medialuna” en la cara interna de la membrana nuclear. La flecha abierta exhibe bleb (burbuja) de membrana. D. Cuerpo electrodens, compatible con cuerpo apoptótico, rodeado por una doble membrana.

Apoptosis

La apoptosis consiste en una serie de acontecimientos que conducen a la muerte celular ordenadamente. Existen para las células dos formas de morir: por accidentes (daños mecánicos, exposición a agentes tóxicos, etc) que producen necrosis, y por apoptosis, la célula inicia una serie de acontecimientos ordenados (por lo que también se denomina muerte celular programada) que están controlados por un mecanismo intrínseco en la célula. La apoptosis, a diferencia de la necrosis, consume ATP, cuya energía es utilizada para la activación de unos enzimas llamados caspasas, cuya activación en cascada producen los efectos que podemos ver en la célula. El concepto es simple: las células del organismo mueren para que sobreviva el resto (**38**).

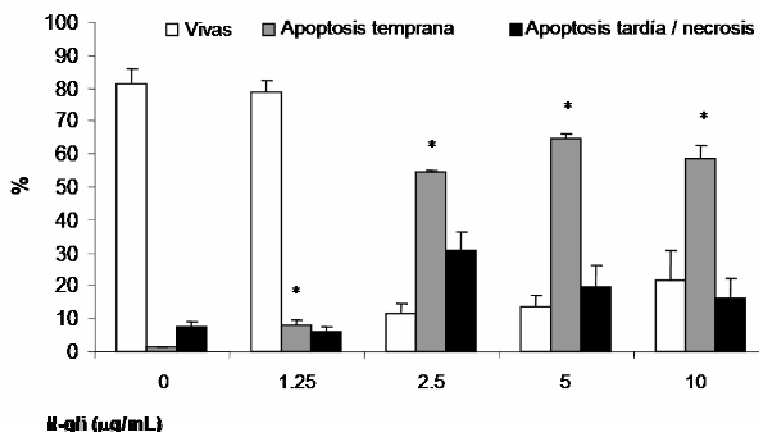


Figura 10. El gráfico muestra células HCT-15 vivas, en apoptosis temprana o en apoptosis tardía/necrosis después de 24 horas de tratamiento con Cas IIgly, medidas por citometría de flujo. Los datos están representados como porcentaje, graficándose la media \pm error estándar de 10,000 células por tratamiento. (*P < 0.05)

Con estos datos se puede concluir que en dosis bajas, Cas IIgly induce muerte a través de la generación de especies reactivas de oxígeno. Además, induce apoptosis, la que está relacionada con la activación de caspasas (enzimas inductoras de apoptosis) (32).

2.1.2 Actividad antineoplásica *In Vitro* de la Casiopeína® III-ia sobre las células de carcinoma de colon HCT-15.

Para caracterizar los efectos de este fármaco en la viabilidad celular, las células fueron tratadas con concentraciones de 0, 2.5, 5, 10, 15 y 20 µg/mL por un período de 24 horas. Cas III-ia disminuyó la viabilidad de manera proporcional a la dosis, siendo esta disminución estadísticamente significativa (P < 0.0001). Al realizar la determinación de los intervalos de confianza, Cas III-ia no mostró diferencias entre los grupos tratados con 0, 2.5 y 5 µg/mL. Sin embargo, a partir de la dosis de 10 µg/mL, la viabilidad se hace estadísticamente menor, con respecto a los grupos antes mencionados. Asimismo, la viabilidad con 20 µg/mL es diferente a aquella con 10 µg/mL, pero no con la dosis de 15 µg/mL (Figura 11) Aunado a lo anterior, la aplicación de 10 mM de N-acetil cisteína (molécula que atrapa especies reactivas de oxígeno) 2 horas previas al tratamiento con las distintas concentraciones de Cas III-ia no demostró alterar la viabilidad, descartándose así que en este modelo, la muerte sea inducida a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (32,39).

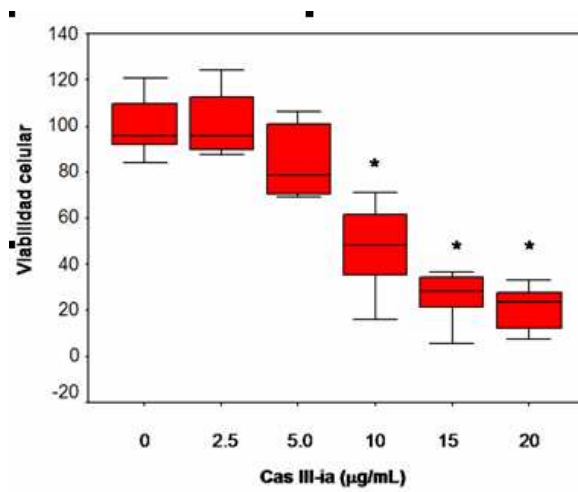


Figura 11. Cajas de valores extremos que representan la viabilidad de HCT-15 después de 24 horas de exposición a Cas III-ia en las distintas dosis. (* $P < 0.05$)

Hallazgos ultraestructurales:

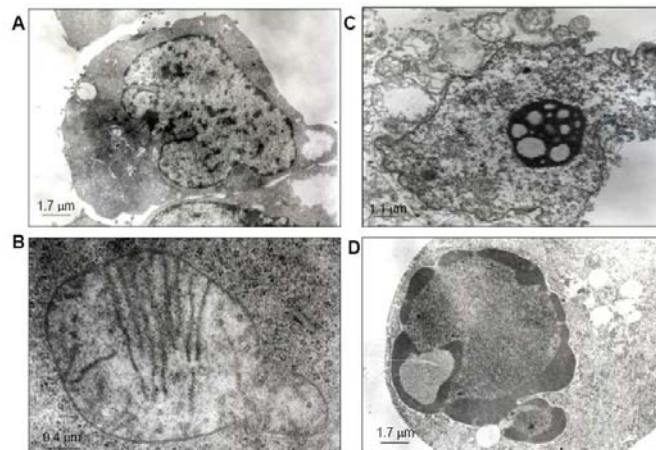


Figura 12. (A) Célula HCT-15 sin tratamiento (B) Mitocondria tumefacta de célula tratada con 2.5 µg/mL de Cas III-ia, con moderada pérdida de arquitectura de las crestas. (C) Célula tumefacta con pérdida de estructura de organelos, característico de una célula necrótica. (D) Condensación de la cromatina en la membrana nuclear, con ligeros cambios en el citoplasma, característico de apoptosis.

Apoptosis

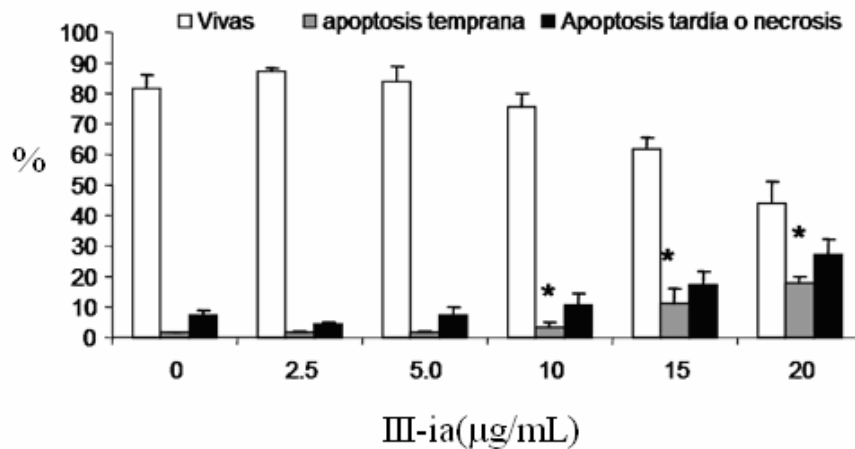


Figura 13. Células vivas, en apoptosis temprana o en apoptosis tardía/necrosis después de 24 horas de tratamiento con Cas III-ia, medidas por citometría de flujo. El gráfico de barras muestra los datos obtenidos desde el diagrama de puntos, representados como porcentaje, graficándose la media \pm error estándar de 10,000 células por tratamiento. (*P < 0.05)

La Casiopeína III-ia disminuye la viabilidad e induce apoptosis de manera dosis dependiente, lo que se relaciona al aumento de los niveles de Bax y la activación de caspasas. No obstante, no influye en la duración de las distintas etapas del ciclo celular. (32,39).

2.1.3 Actividad antineoplásica *In Vitro* de la Casiopeína® Igly en dos líneas celulares (L1210 y CH1).

La actividad de la Casiopeína® Igly fue probada en dos líneas celulares, resistentes y sensibles al cisplatino, L1210 y en CH1. La exposición de estas células a diferentes concentraciones de Casiopeína® Igly indicó que este complejo de cobre provoca la muerte celular a través de apoptosis y necrosis. Se observó en las células el núcleo fragmentado y la cromatina condensada después de la exposición a este compuesto. La fragmentación del ADN se observó en la línea celular L1210 pero no en CH1. En este caso las caspasas son las que activan la vía apoptótica.

La Casiopeína® Igly es altamente activa contra las líneas celulares L1210 y CH1, incluyendo a las resistentes al cisplatino (42).

2.1.4 Efecto *In Vitro* de las Casiopeínas® IIgly y III-ia en el meduloblastoma humano.

En estos estudios se investigó el efecto apoptótico en el meduloblastoma y el neuroblastoma humanos por efecto de las Casiopeínas® IIgly y III-ia. También se determinó la vía apoptótica dada por estas dos Casiopeínas® en las líneas celulares mencionadas. Estas determinaciones también contemplaron al cisplatino para compararlo con las Casiopeínas®.

Se determinó que las CI_{50} fueron: 25 μ g/ml para el cisplatino y 16 y 10 μ g/ml para las Casiopeínas® IIgly y III-ia respectivamente (40).

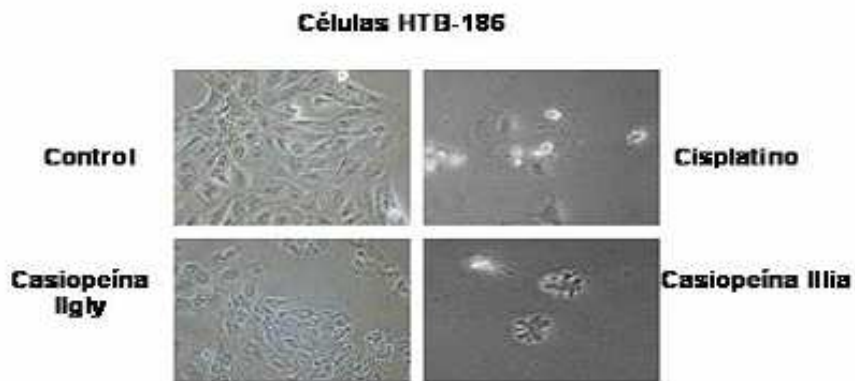


Figura 14. Imagen de microscopía por contraste de fases, de células de meduloblastoma sin tratamiento (control) y con 24 horas de tratamiento: cisplatino (25 μ g/ml), Casiopeína® IIgly (16 μ g/ml) y 10 μ g/ml.

Se observó que la viabilidad celular (FDA), disminuyó en el caso de las células tratadas con cisplatino; en tanto que para las células tratadas con Casiopeínas®, este decremento fue mayor, principalmente en las que recibieron la Casiopeína® IIgly comparada contra la Casiopeína® III-ia (40).

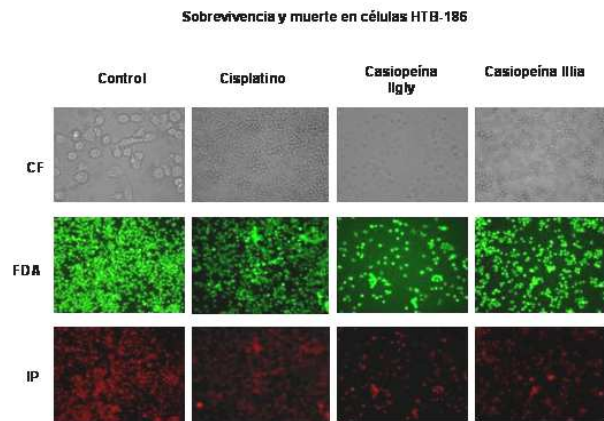


Figura 15. Sobrevivencia y necrosis en las células HTB-186. Las células tratadas con Casiopéina® Igly (16 µg/ml), mostraron reducción en el número de células (al 50%), en tanto que las células tratadas con Casiopéina® III-ia (10µg/ml), no mostraron disminución en el número celular (las determinaciones se hicieron por triplicado).

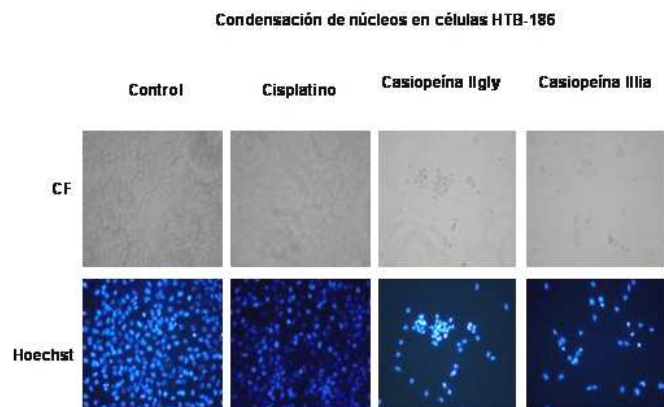


Figura 16. Se observa la condensación de núcleos principalmente en células tratadas con Casiopéina® Igly.

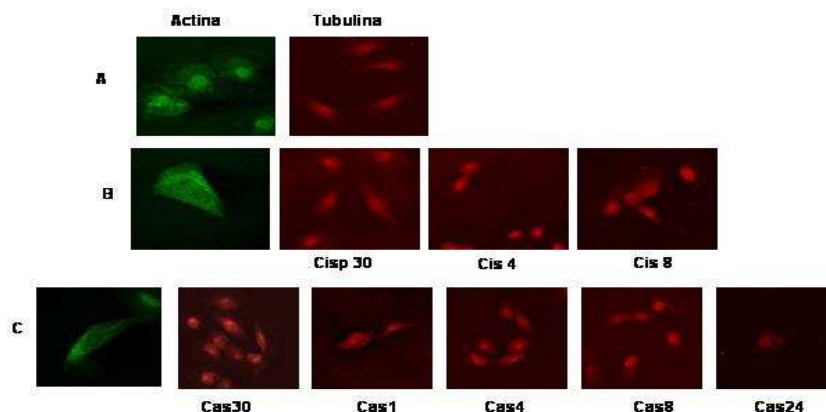


Figura 17. Imágenes de microscopía confocal para actina (verde) y β -tubulina (rojo) en células de meduloblastoma. Células sin tratamiento (A); células con cisplatino (25 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos (B) y células tratadas con Casiopeína® Ilgly (16 $\mu\text{g/ml}$) también a diferentes tiempos (C).

Con los resultados obtenidos hasta el momento, podemos concluir que las Casiopeínas® Ilgly y III-ia, son más efectivas que el cisplatino para alcanzar la muerte celular, ya que se utilizaron concentraciones menores de estos compuestos. Así mismo, en ésta célula podemos decir que logramos el establecimiento de un modelo de apoptosis en el meduloblastoma humano, por efecto de las Casiopeínas® Ilgly (16 $\mu\text{g/ml}$) y III-ia (10 $\mu\text{g/ml}$) (40).

2.1.5 Evaluación *In Vitro* de la sinergia de las Casiopeínas® Ilgly y III-ia y otros fármacos comerciales en líneas tumorales humanas.

Se realizó un ensayo *In Vitro*, para determinar la inhibición de la proliferación celular de ocho líneas tumorales humanas (CaLo, InBI, HeLa, HCT-15, SiHa, MCF-7, U-373 y SK-LU-1), evaluando si las Casiopeínas® III-ia y Ilgly combinadas con cuatro fármacos comerciales (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y busulfán) muestran una actividad sinérgica.

La actividad con respecto al % de viabilidad es:

HeLa > CaLo > HCT-15 > MCF-7 > U-373 > SiHa > InBI > SK-LU-1

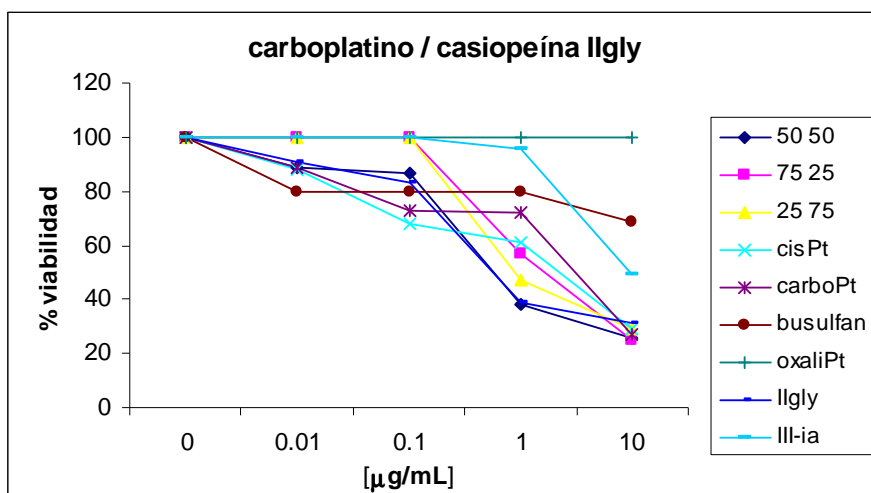
Se observa que en HeLa el % de viabilidad baja hasta 25 con la mezcla de carboPt / Ilgly (50:50, 75:25, 25:75); mientras que U-373 presenta buena actividad con todas las mezclas. Y por el contrario, SK-LU-1 no muestra actividad con ninguna mezcla (41).

A continuación se presentan los resultados de las combinaciones más activas (41):

Tabla 10. Porcentaje de viabilidad de la línea HeLa para la mezcla (carboplatino/Casiopeína® Ilgly).

[$\mu\text{g/mL}$]	50 50	75 25	25 75	cisPt	carboPt	bus	oxaliPt	Ilgly	III-ia
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.01	89	100	100	88	89	80	100	91	100
0.1	87	100	100	68	73	80	100	83	100
1	38	57	47	61	72	80	100	39	96
10	26	25	29	29	27	69	100	31	49

Figura 18. Ensayo de proliferación celular en HeLa (carboplatino/Casiopeína® Ilgly).



La concentración inhibitoria media (CI_{50}) menor se observó para la mezcla en la proporción (1:1), con un valor de 0.93 $\mu\text{g/mL}$, mientras en la proporción (3:1), es de 2.26 $\mu\text{g/mL}$ y carboplatino 2.11, cisplatino 1.39, Casiopeína® Ilgly 3.22 $\mu\text{g/mL}$ (41).

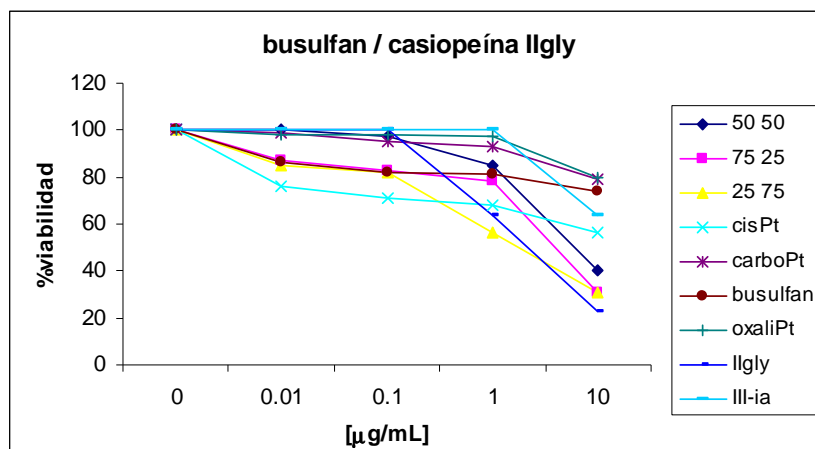
Tabla 11. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza]_{α=0.05} en HeLa.

Compuestos	Proporciones	HeLa (µg/ml)
	50:50	2.97 [2.07-4.43]
Cas III-ia/Cas IIgly	75:25	3.34 [1.79-7.28]
	25:75	3.08 [2.21-4.42]
cisPt/Cas III-ia	75 25	4.45 [1.61-20.36]
	50:50	7.74 [5.15-12.9]
cisPt/Cas IIgly	75:25	6.86 [4.33-12.17]
	25:75	2.20 [1.54-3.24]
bus/Cas IIgly	50:50	2.01 [1.44-2.86]
	25:75	1.13 [0.77-1.70]
oxaliPt/Cas III-ia	50:50	7.56 [3.37-23.11]
oxaliPt/Cas III-ia	75:25	16.14 [9.02-36.53]
	50:50	0.93 [0.59-1.51]
carboPt/Cas IIgly	75:25	2.26 [1.66-3.12]
	25:75	2.04 [1.47-2.88]
Cisplatino		1.39 [0.76-2.83]
Carboplatino		2.11 [1.16-4.34]
Cas IIgly		3.22 [1.59-8.16]
Cas III-ia		13.17 [8.22-16.74]

Tabla 12. Porcentaje de viabilidad de la línea CaLo para la mezcla busulfán/Casiopéina® IIgly.

[µg/mL]	50 50	75 25	25 75	cisPt	carboPt	bus	oxaliPt	IIgly	III-ia
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.01	100	87	85	76	99	86	98	100	100
0.1	97	83	82	71	95	82	98	100	100
1	85	78	56	68	93	81	97	64	100
10	40	31	31	56	79	74	80	23	64

Figura 19. Ensayo de proliferación celular en CaLo (busulfán/Casiopeína® Ilgly).



La (CI₅₀) mezcla en la proporción (1:3) 1.74 µg/mL, la (CI₅₀) Casiopeína® Ilgly 2.48 µg/mL.

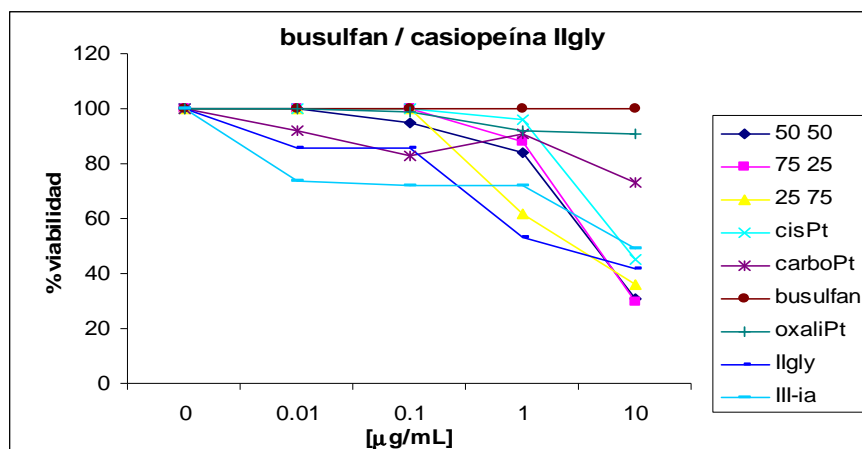
Tabla 13. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $\alpha=0.05$ en CaLo.

Compuestos	proporciones	CaLo (µg/ml)
	50:50	3.75 [2.36-6.49]
Cas III-ia/Cas Ilgly	75:25	7.77 [4.39-16.22]
	25:75	2.92 [2.11-4.17]
cisPt/Cas III-ia	50:50	4.16 [2.30-8.74]
	75:25	13.65 [7.65-30.08]
bus/Cas III-ia	25:75	3.58 [2.49-5.40]
	50:50	6.46 [4.39-10.31]
bus/Cas Ilgly	75:25	4.14 [2.09-10]
	25:75	1.74 [0.96-3.54]
oxaliPt/Cas III-ia	75:25	7.73 [3.67-21.16]
	50:50	4.80 [3.44-7.03]
oxaliPt/Cas Ilgly	75:25	7.69 [4.77-14.05]
	25:75	8.84 [4.56-21.26]
carboPt/Cas Ilgly	50:50	7.79 [5.61-11.63]
	75:25	6.08 [3.89-10.49]
Cas Ilgly	25:75	5.52 [3.77-8.70]
		2.48 [1.82-3.37]

Tabla 14. Porcentaje de viabilidad de la línea HCT-15 para la mezcla busulfán/Casiopeína® Ilgly.

[µg/mL]	50 50	75 25	25 75	cisPt	carboPt	bus	oxaliPt	Ilgly	III-ia
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.01	100	100	100	100	92	100	100	86	74
0.1	95	100	100	100	83	100	99	86	72
1	84	88	62	96	91	100	92	53	72
10	31	30	36	45	73	100	91	42	49

Figura 20. Ensayo de proliferación celular en HCT-15 (busulfán/Casiopeína® Ilgly).



La CI_{50} de mezcla en proporción (3:1) 4.92 µg/mL, mientras que para la proporción (1:3) es de 3.49 µg/mL y para la Casiopeína® Ilgly es de 3.24 y del cisplatino es 8.56 µg/mL.

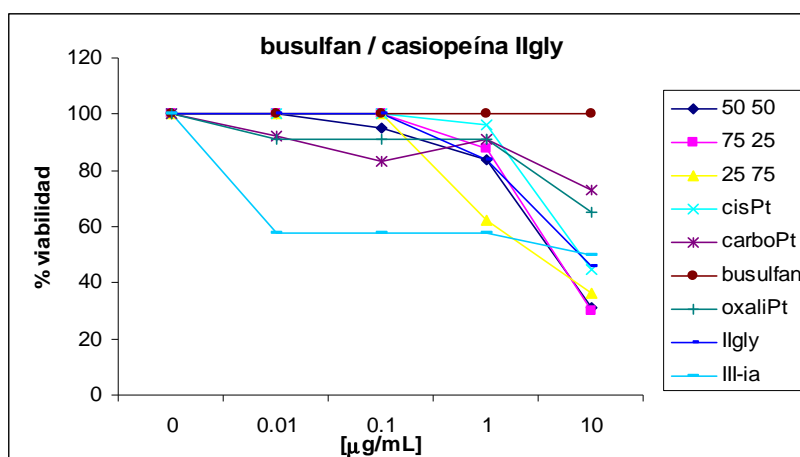
Tabla 15. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $_{\alpha=0.05}$ en HCT-15.

Compuestos	Proporciones	HCT-15 (µg/ml)
	50:50	4.59 [2.76-8.54]
Cas III-ia/Cas Ilgly	75:25	2.23 [0.95-7.03]
	25:75	2.66 [1.77-4.22]
	50:50	9.56 [2.88-66.92]
cisPt/Cas III-ia	75:25	9.99 [7.72-13.72]
	25:75	6.59 [2.28-332]
	75:25	9.93 [7.18-15.03]
cisPt/Cas Ilgly	25:75	1.62 [0.94-3.09]
	50:50	4.49 [3.15-6.75]
	75:25	4.92 [3.77-6.57]
bus/Cas Ilgly	25:75	3.49 [2.46-5.18]
	50:50	5.66 [3.13-11.98]
	75:25	14.50 [7.84-33.76]
oxaliPt/Cas Ilgly	25:75	4 [2.63-6.56]
	carboPt/Cas III-ia	11.79 [5.94-29.79]
	50:50	6.21 [4.79-8.23]
carboPt/Cas Ilgly	75:25	6.04 [4.68-7.98]
	25:75	6.31 [4.44-9.62]
	Cisplatino	8.56 [6.54-11.76]
Cas Ilgly	3.24 [1.59-8.16]	

Tabla 16. Porcentaje de viabilidad de la línea MCF-7 para la mezcla busulfán/Casiopéina® Ilgly.

[$\mu\text{g/mL}$]	50 50	75 25	25 75	cisPt	carboPt	bus	oxaliPt	Ilgly	III-ia
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.01	100	100	100	100	92	100	91	100	58
0.1	95	100	100	100	83	100	91	100	58
1	84	88	62	96	91	100	91	84	58
10	31	30	36	45	73	100	65	46	50

Figura 21. Ensayo de proliferación celular en MCF-7 (busulfán/Casiopéina® Ilgly).



La CI_{50} de mezcla en proporción (3:1) es de 4.92 $\mu\text{g/mL}$, en tanto que para la proporción (1:3) es de 3.49 $\mu\text{g/mL}$, igual que en HCT-15. Mientras para la Casiopéina® Ilgly es de 7.72 $\mu\text{g/mL}$ y para el cisplatino es de 8.56 $\mu\text{g/mL}$.

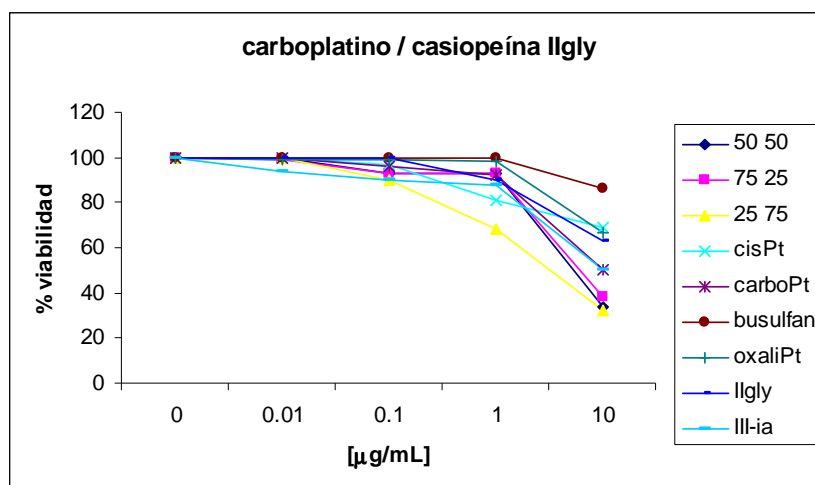
Tabla 17. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza]_{α=0.05} en MCF-7.

Compuestos	Proporciones	MCF-7 (µg/ml)
	50:50	4.59 [2.7-8.5]
Cas III-ia/Cas IIgly	75:25	2.2 [0.95-7.03]
	25:75	2.6 [1.7-4.2]
cisPt/Cas III-ia	50:50	9.56 [2.88-66.92]
	75:25	9.99 [7.72-13.72]
cisPt/Cas IIgly	25:75	6.5 [2.2-33.2]
	75:25	9.93 [7.18-15.03]
bus/Cas IIgly	25:75	1.6 [0.94-3.09]
	50:50	4.49 [3.15-6.79]
oxaliPt/Cas IIgly	75:25	4.92 [3.77-6.57]
	25:75	3.49 [2.46-5.18]
carboPt/Cas III-ia	50:50	4.39 [2.9-7.14]
	75:25	13.65 [7.65-30.08]
carboPt/Cas IIgly	25:75	2.28 [1.4-4.04]
	25:75	11.79 [5.94-29.79]
Cisplatino	50:50	6.21 [4.79-8.23]
	25:75	6.31 [4.44-9.62]
Cas IIgly		8.56 [6.54-11.76]
		7.72 [5.32-12.21]

Tabla 18. Porcentaje de viabilidad de U-373 para la mezcla carboplatino/Casiopeína® IIgly.

[µg/mL]	50 50	75 25	25 75	cisPt	carboPt	bus	oxaliPt	IIgly	III-ia
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.01	100	99	100	100	100	100	99	100	94
0.1	93	93	90	97	96	100	99	100	90
1	93	93	68	81	92	100	98	90	88
10	34	38	32	69	50	86	67	63	50

Figura 22. Ensayo de proliferación celular en U-373 (carboplatino/Casiopeína® Ilgly).



La CI_{50} de la mezcla es de 3.06 µg/mL (41).

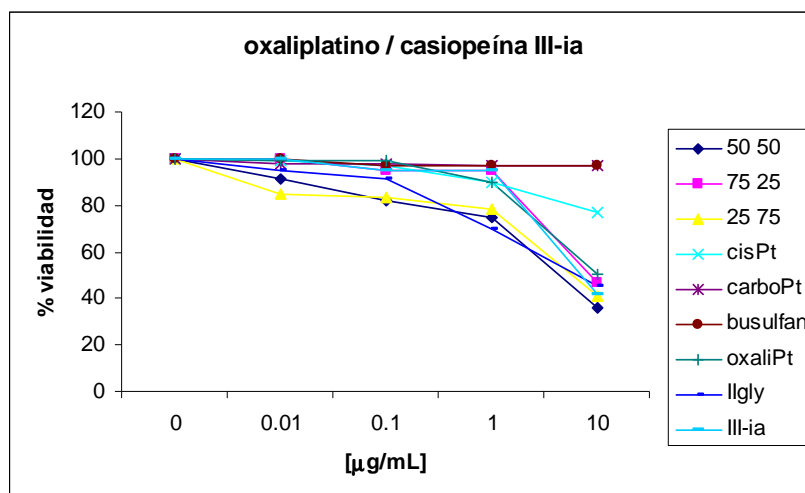
Tabla 19. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $_{\alpha=0.05}$ en U-373.

Compuestos	Proporciones	U-373 (µg/ml)
	50:50	2.78 [1.42-6.53]
Cas III-ia/Cas Ilgly	75:25	8.74 [3.75-28.72]
	25:75	2.92 [1.64-5.94]
	50:50	6.28 [1.98-39.66]
cisPt/Cas III-ia	75:25	20.05 [9.97-54.36]
	50:50	8.91 [3.55-33.52]
	75:25	2.20 [1.47-3.47]
cisPt/Cas Ilgly	75:25	2.20 [1.47-3.4]
	25:75	2.20 [1.47-3.4]
	50:50	2.20 [1.47-3.4]
bus/Cas Ilgly	25:75	5.33 [3.25-9.78]
carboPt/Cas Ilgly	25:75	3.06 [2.05-4.85]
carboPt/Cas III-ia	25:75	12.69 [7.50-25.87]
Cas III-ia		22.81 [8.88-91.29]

Tabla 20. Porcentaje de viabilidad de SiHa para la mezcla oxaliplatino/Casiopeína® III-ia.

[µg/mL]	50 50	75 25	25 75	cisPt	carboPt	bus	oxaliPt	Ilgly	III-ia
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.01	91	100	85	99	98	100	99	95	100
0.1	82	95	83	97	98	97	99	91	95
1	75	95	78	90	97	97	90	70	95
10	36	47	41	77	97	97	50	45	42

Figura 23. Ensayo de proliferación celular en SiHa (oxaliplatino/Casiopeína® III-ia).



La CI_{50} de la mezcla en la proporción (1:1), tiene un valor de 4.71 mg/mL, mientras que le siguen la Casiopeína® III-ia con 8.76, Casiopeína® Ilgly con 6.89 y el oxaliplatino con un valor de 11.82 mg/mL (41).

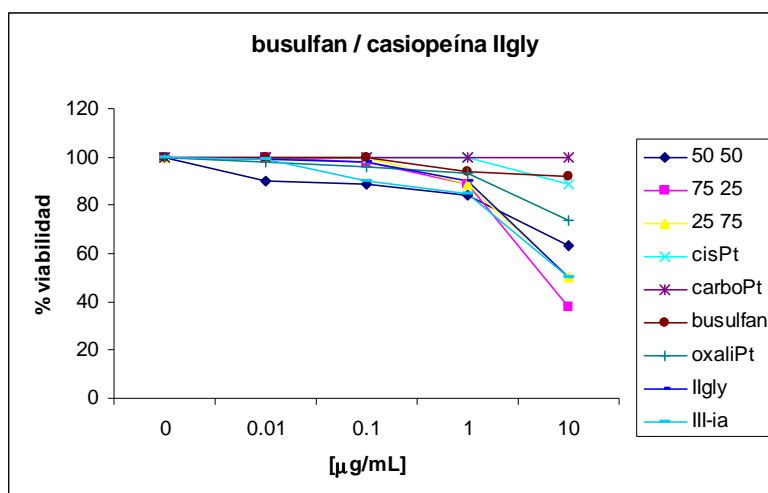
Tabla 21. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $_{\alpha=0.05}$ en SiHa.

Compuestos	Proporciones	SiHa (µg/ml)
	50:50	7.24 [2.26-46.52]
cisPt/Cas Ilgly	75:25	12.23 [5.88-33.4]
bus/Cas Ilgly	75:25	7.60 [5.98-9.89]
	50:50	4.71 [2.40-11.29]
oxaliPt/Cas III-ia	75:25	11.17 [6.92-21.11]
	50:50	16.14 [7.75-44.82]
oxaliPt/Cas Ilgly	75:25	13.23 [7.75-27.43]
	25:75	30.12 [8.70-279.77]
carboPt/Cas Ilgly	50:50	17.72 [8.20-52.50]
Oxaliplatino		11.82 [7.23-22.83]
Cas Ilgly		6.89 [3.62-15.96]
Cas III-ia		8.76 [5.74-15]

Tabla 22. Porcentaje de viabilidad de InBI para la mezcla busulfán/Casiopeína® Ilgly.

[µg/mL]	50 50	75 25	25 75	cis Pt	carboPt	bus	oxaliPt	Ilgly	III-ia
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.01	90	100	100	100	100	100	98	99	99
0.1	89	98	100	100	100	100	96	98	90
1	84	89	89	100	100	94	93	90	85
10	63	38	50	89	100	92	74	50	50

Figura 24. Ensayo de proliferación celular en InBI (busulfán/Casiopeína® Igly).



La CI_{50} de la mezcla en la proporción (3:1) tiene el valor de 1.13 $\mu\text{g/mL}$, mientras que las Casiopeínas® Igly y III-ia presentan los valores de 12.27 y 12.98 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (41).

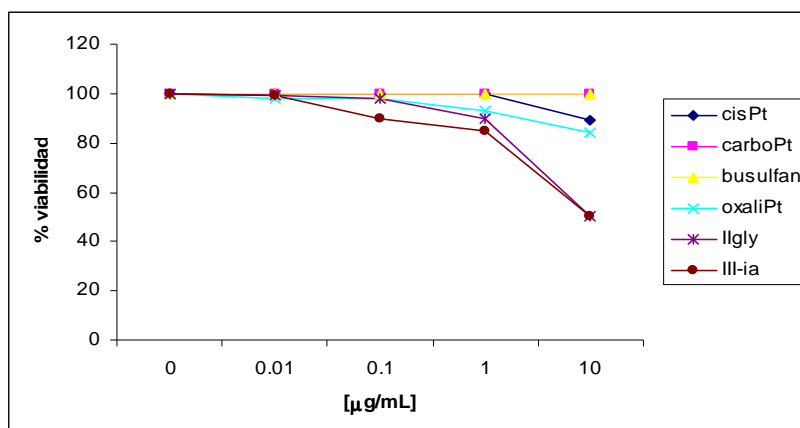
Tabla 23. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $\alpha=0.05$ en InBI.

Compuestos	Proporciones	InBI ($\mu\text{g/ml}$)
Cas III-ia/Cas Igly	50:50	19.76 [8.37-67.89]
	75:25	19.76 [8.37-67.89]
cisPt/Cas Igly	25:75	14.86 [8.27-33.36]
	50:50	6.40 [4.55-9.60]
bus/Cas Igly	75:25	1.13 [0.77-1.70]
	25:75	9.64 [6.62-15.64]
carboPt/Cas Igly	50:50	12.26 [5.95-32.89]
	25:75	19.05 [9.42-51.64]
Cas Igly		12.27 [7.30-24.69]
Cas III-ia		12.98 [6.60-32.58]

Tabla 24. Porcentaje de viabilidad de SK-LU-1.

[$\mu\text{g/mL}$]	cisPt	carboPt	bus	oxaliPt	Igly	III-ia
0	100	100	100	100	100	100
0.01	100	100	100	98	99	99
0.1	100	100	100	98	98	90
1	100	100	100	93	90	85
10	89	100	100	84	50	50

Figura 25. Ensayo de proliferación celular para la línea SK-LU-1.



La CI_{50} para las Casiopeínas® Ilgly y III-ia es de 14.62 y 15.03 µg/mL respectivamente (41).

Tabla 25. Concentraciones Inhibitorias 50 [intervalo de confianza] $\alpha=0.05$ en SK-LU-1.

Compuestos	µg/mL
Ilgly	14.62[8.29-31.96]
III-ia	15.03[7.33-40.61]

Las Casiopeínas® Ilgly y III-ia, resultaron ser los compuestos con actividad en todas las líneas actuando con eficacia aún sin combinar.

Sin embargo podemos decir que existe sinergia en todas las combinaciones de las Casiopeínas®, entre sí y con los fármacos comerciales utilizados.

Los cuatro fármacos comerciales utilizados tienen mecanismo de acción ligados a daño al material genético y todos éstos, son ciclo específico (actúan en la fase G1) sin embargo presentan resultados distintos en sus diferentes combinaciones (41).

2.2 Actividad Antineoplásica *In Vivo*.

Conforme a los protocolos del *Nacional Cancer Institute* (NCI), Bethesda, Maryland, E.U.A. el cernimiento de actividad *In Vivo* debe llevarse a cabo de acuerdo a la **Tabla 26** y siguiendo los criterios de evaluación señalados en la **Tabla 27**, vale la pena señalar que se considera a un nuevo fármaco como candidato para pasar a los ensayos toxicológicos y clínicos cuando muestra actividad en al menos uno de los tumores del panel de cernimiento:

Tabla 26. Panel de cernimiento *In Vivo* de acuerdo al NCI

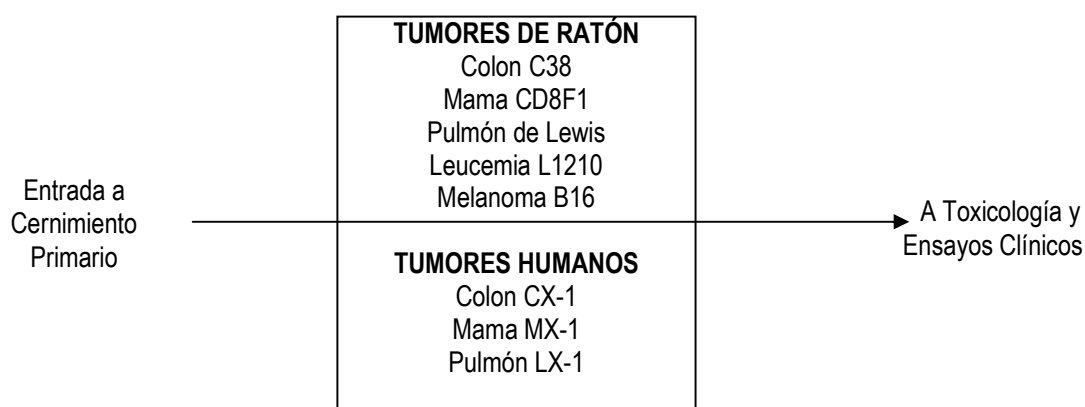


Tabla 27. Criterios de actividad para compuestos sintéticos.

Criterio de actividad	Enfermedad	% ILS	% ILS confirmado
Fase I	Leucemia L1210	20	
Fases II y III	Leucemia L1210 Leucemia P388 Melanoma B16 Carcinoma de pulmón de Lewis	25 (promedio) 25 (promedio) 40 (promedio) 40 (promedio)	
Requerido para candidato para DN (decision network)-II (uno)	Leucemia L1210 Leucemia P388 Melanoma B16 Carcinoma de pulmón de Lewis		50 75 50 50

2.2.1 Actividad Antineoplásica *In Vivo* en tumores murinos isotransplantados.

Tabla 28. Índices de sobrevida de la Casiopeína® Igly en diferentes líneas tumorales murinas (44).

FÁRMACO	TUMOR	ESQUEMA/DOSIS	ILS
Igly	L1210	C = 1-5 y 11-15/4 mg/kg	16.0
Igly	L1210	I = 1,5,9,13/6 mg/kg	36.0
Igly	L1210	I = 1,5,9/6 mg/kg	17.0
Igly	B16	I = 1,5,9/6 mg/kg	15
Igly	B16	C = 1-9/2 mg/kg	4
Igly	B16	I = 1,5,9/6 mg/kg	30
Igly	B16	I = 1,4,7,10/4 mg/kg	25
Igly	B16	C = 1-9/2 mg/kg	26
Igly	S180	C = 1-9/2 mg/kg	180.0
Igly	S180	I = 1,5,9/6 mg/kg	131.0
Igly	S180	I = 1,4,7,10/4 mg/kg	96.0

Figura 26. Gráfica del Índice de sobrevida de Casiopeína® Igly en diferentes líneas tumorales (44).

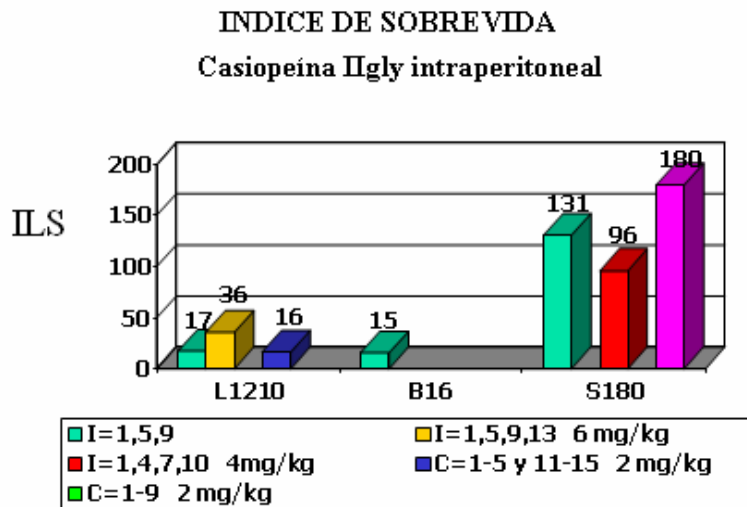
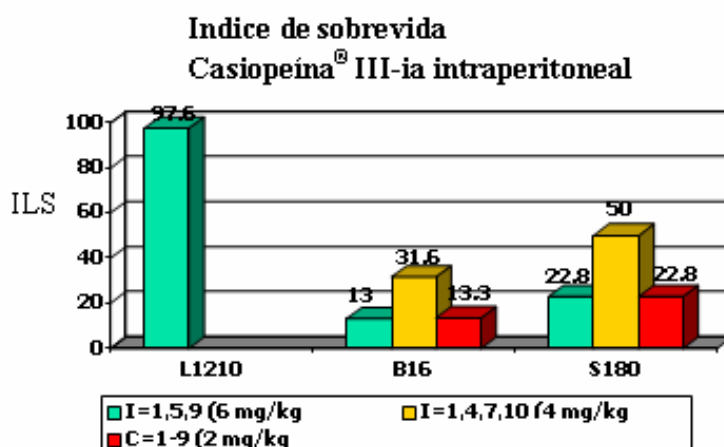


Tabla 29. Índices de sobrevida de la Casiopeína® III-ia en diferentes líneas tumorales murinas (44).

FÁRMACO	TUMOR	ESQUEMA/DOSIS	ILS
III-ia	LL	I = 1,5,9/6 mg/kg	-3.0
III-ia	LL	C = 1-11/3 mg/kg	19.9
III-ia	B16	I = 1,5,9/6 mg/kg	-21.0
III-ia	B16	C = 1-11/3 mg/kg	48.2
III-ia	B16	C = 1-9/1.37 mg/kg	13.3
III-ia	B16	I = 1,4,7,10/3.08 mg/kg	31.6
III-ia	B16	I = 1,5,9/4.11 mg/kg	13.0
III-ia	S180	C = 1-9/2 mg/kg	8.0
III-ia	S180	I = 1,4,7,10/4 mg/kg	43.4
III-ia	S180	I = 1,5,9/6 mg/kg	17.7
III-ia	S180	I = 1,5,9/6 mg/kg	22.8
III-ia	S180	I = 1,4,7,10/4 mg/kg	50
III-ia	S180	C = 1-9/2 mg/kg	11.6
III-ia	S180	I = 1,4,7,10/4 mg/kg	50
III-ia	L1210	I = 1,5,9/4 mg/kg	7.0
III-ia	L1210	I = 1,5,9/6 mg/kg	95.0
III-ia	L1210	I = 1,5,9/8 mg/kg	49.0
III-ia	L1210	I = 1,5,9/10 mg/kg	9.4
III-ia	L1210	I = 1,5,9/12 mg/kg	4.7
III-ia	L1210	I = 1,5,9/4 mg/kg	11.86
III-ia	L1210	I = 1,5,9/10 mg/kg	9.33
III-ia	L1210	I = 1,5,9/4 mg/kg	12.5

III-ia	L1210	I = 1,5,9/6 mg/kg	97.6
III-ia	L1210	I = 1,5,9/8 mg/kg	15.0

Figura 27. Gráfica del Índice de sobrevida de Casiopeína® III-ia en diferentes líneas tumorales (44).



Tanto la Casiopeína IIgly como la III-ia cumplen con los requisitos de actividad exigidos por el panel de cernimiento establecido por el *National Cancer Institute*.

2.2.2 Actividad antineoplásica *In Vivo* de la Casiopeína® IIgly en ratones xenotransplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon humano HCT-15.

Para determinar si la Cas IIgly ejercía acción antitumoral, se procedió a analizar los volúmenes relativos tumorales (VRT) en los días 7, 14 y 21, además de los días en doblar el tamaño (D) de HCT-15 transplantado en 25 ratones desnudos y tratados intraperitonealmente con los esquemas y dosis mencionadas en material y métodos. Sólo la dosis de 1 mg/kg mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al VRT en los días 7 ($P=0.027$), 14 ($P=0.019$) y 21 ($P=0.039$) al ser comparado con el testigo (**Figura 28**), alcanzando al final de la experimentación, un tamaño promedio correspondiente al 10.58% del tamaño observado en el grupo testigo (**31,39**).

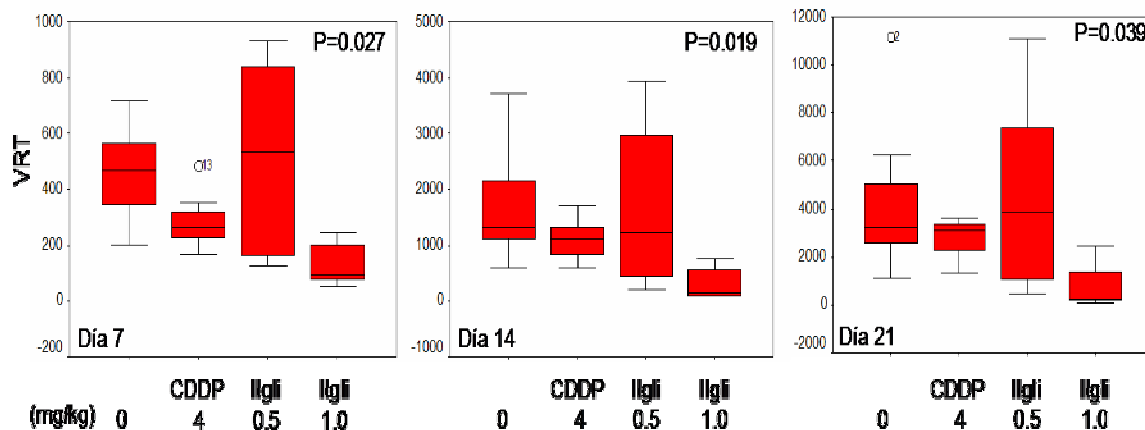


Figura 28. Cajas de valores extremos que representan el Volumen Relativo Tumoral (VRT) de los tumores originados del trasplante de HCT-15 en los días 7, 14 y 21 de experimentación y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas Ilgly 0.5 mg/kg (n=5) y Cas Ilgly 1 mg/kg (n=5). *Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.

Además, fue este mismo esquema de tratamiento (1 mg/kg) el que demostró retardar significativamente ($P=0.01$) los días en doblar el tamaño tumoral. Dicho efecto fue proporcional a la dosis (**Figura 29**) (31,39).

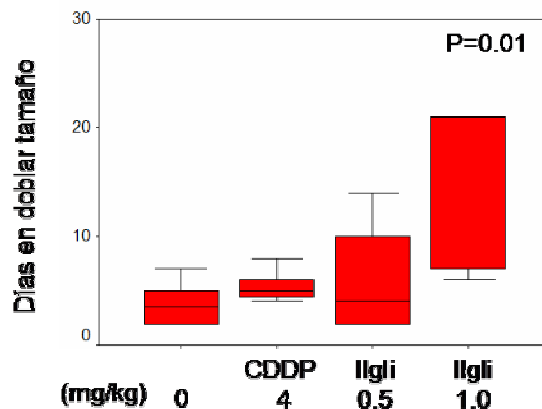


Figura 29. Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del trasplante de HCT-15 y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas Ilgly 0.5 mg/kg (n=5) y Cas Ilgly 1 mg/kg (n=5).

Al analizar los índices de Función antitumoral y Retraso del crecimiento, Se apreció que sólo la dosis de 1 mg/kg alcanzó ambos requerimientos, comprobándose así su acción antitumoral (**Tabla 30**).

Tabla 30. Efectos antitumorales *In Vivo* de Cas IIgly. Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 21 de experimentación (31,39).

Tratamientos	n	FA	REC
Testigo (Agua destilada)	10	–	–
CDDP 4 mg/kg	5	84.3	0.1
Casiopéina II-gli 0.5 mg/kg	5	145.9	0.3
Casiopéina II-gli 1 mg/kg	5	26.5	2

Cas IIgly inhibe la proliferación y alcanza todos los requerimientos de actividad antitumoral evaluados. Sin embargo se observó que es irritante en la administración intraperitoneal (31,39).

2.2.3 Actividad antineoplásica *In Vivo* de la Casiopéina® III-ia en ratones xenotransplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon humano HCT-15.

Para determinar si la Cas III-ia aplicada intraperitonealmente ejercía una actividad antitumoral, se calculó el volumen relativo tumoral (VRT), la función antitumoral, los días en doblar el tamaño, el retraso específico del crecimiento y el índice mitótico de los tumores y apoptótico de los tumores.

Con respecto al VRT, este índice demostró ser menor de una manera estadísticamente significativa en los animales tratados con Cas III-ia 6 mg/kg con relación al testigo, a partir del día 7 de tratamiento ($p=0.039$), manteniéndose esta diferencia constante al día 14 ($p=0.016$) y 21 ($p=0.037$) de tratamiento. No hubo diferencias entre los otros grupos de tratamiento y el grupo testigo (Figura 30) (31,39).

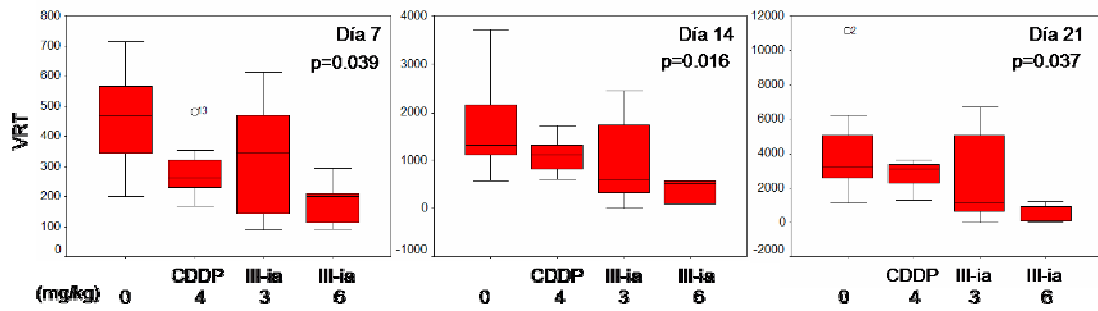


Figura 30. Cajas de valores extremos que representan el Volumen Relativo Tumoral (VRT) de los tumores originados del trasplante de HCT-15 en los días 7, 14 y 21 de experimentación y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas III-ia 3 (n=5) y Cas III-ia 6 mg/kg (n=5). *Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.

Sumado a lo anterior, al analizar los días que demora el tumor en doblar su tamaño con respecto al testigo en los distintos grupos, el tratamiento con Cas III-ia 6.0 mg/kg aumentó estadísticamente este índice ($p=0.023$). Por otra parte, ni CDDP ni Cas III-ia 3.0 mg/kg mostraron retardar estadísticamente el crecimiento tumoral (**Figura 31**) (31,39).

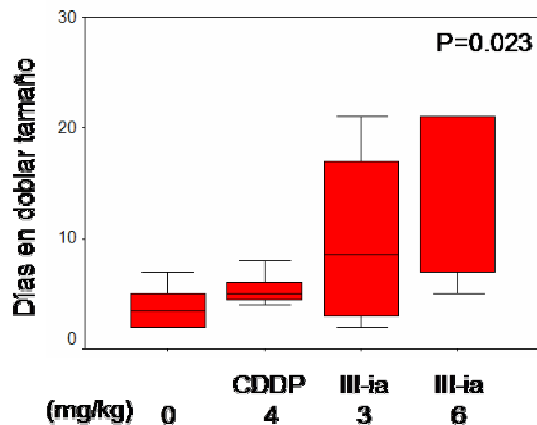


Figura 31. Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del trasplante de HCT-15 y tratados con 0 mg/kg (n=10), CDDP (n=5), Cas III-ia 3 (n=5) y Cas III-ia 6 mg/kg (n=5).

Con respecto a la función antitumoral, que debe ser menor a 42%, el único tratamiento que alcanza el requerimiento para este índice es Cas III-ia 6.0 mg/kg, cuyo valor fue de 20.3. No obstante lo anterior, ni uno de los grupos tratados alcanzó los requerimientos de retraso específico de crecimiento, que debía ser mayor o igual a 2 (**Tabla 31**) (31,39).

Tabla 31. Efectos antitumorales *In Vivo* de Cas III-ia. Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 21 de experimentación (31,39).

Tratamientos	n	FA	REC
Testigo (Agua destilada)	10	—	—
CDDP 4.0 mg/kg	5	84.3	0.1
Casiopéina III-ia 3 mg/kg	5	82.9	0.89
Casiopéina III-ia 6 mg/kg	5	20.3	1.45

Cas III-ia inhibe la proliferación y dispara apoptosis en células HCT-15 transplantadas al ratón desnudo. No obstante, demostró inducir peritonitis de manera dosis dependiente en la serosa parietal y visceral (31,39).

2.2.4 Actividad antineoplásica *In Vivo* de las Casiopéinas® III-ia, IIgly y III-La contra las líneas tumorales humanas de próstata PC-3 y cérvico uterino HeLa transplantadas al ratón desnudo.

HeLa

Para determinar si la Cas III-ia, IIgly y III-La aplicadas intraperitonealmente ejercían una actividad antitumoral sobre HeLa transplantada al ratón desnudo, se calculó el volumen relativo tumoral (VRT), la función antitumoral, los días en doblar el tamaño y el retraso específico del crecimiento (31).

Con respecto al VRT en los días 8, 16 y 24 (**Figura 32**), sólo se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en el día 16 ($P=0.028$). Además, al realizar el cálculo de intervalo de confianza, se observó que esta diferencia sólo se manifestaba entre los distintos grupos de tratamiento con el testigo, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre CDDP, IIgly, III-ia y III-La.

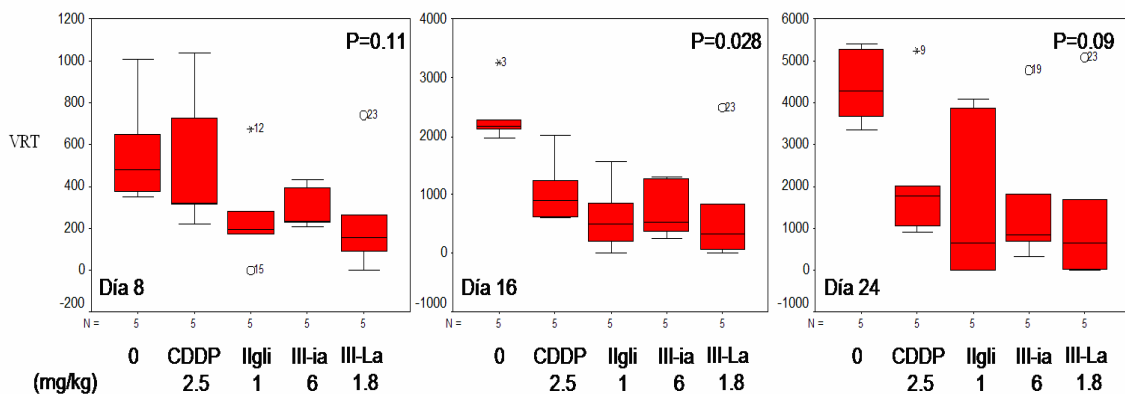


Figura 32. Cajas de valores extremos que representan el Volumen Relativo Tumoral (VRT) de los tumores originados del transplante de HeLa en los días 8, 16 y 24 de experimentación y tratados cada cuarto día con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgly 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). *Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media. *Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.

Sumado a lo anterior, al analizar los días que demora el tumor en doblar su tamaño en los distintos grupos (**Figura 33**), ningún tratamiento demostró aumentar este indicador de manera significativa (P=0.11).

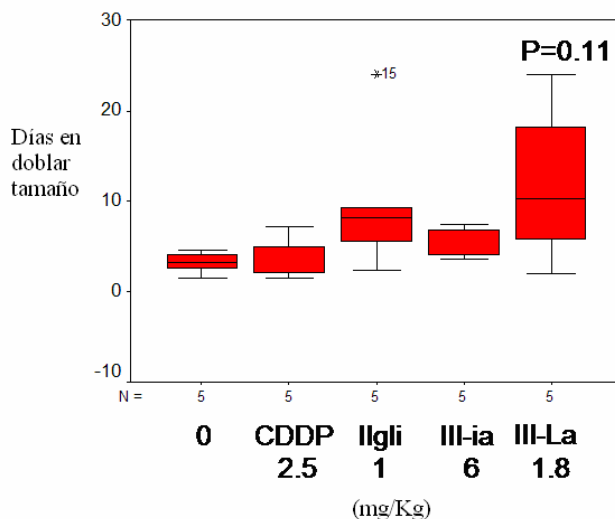


Figura 33. Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del transplante de HeLa y tratados cada cuarto día con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgly 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). *Valor alejado entre 1.5 y 3 desviaciones estándar respecto a la media.

Sin embargo y a pesar de los resultados estadísticos obtenidos con el volumen relativo tumoral y los días en doblar el tamaño, al calcular los índices de función antitumoral y retraso específico de crecimiento, se observó actividad antitumoral. El requerimiento de función antitumoral, que debe ser

menor a 42%, fue cubierto por las Cas III-ia y la Cas III-La. Por otra parte, el requerimiento de retraso específico de crecimiento, que debe ser mayor o igual a 2, fue alcanzado por la Cas IIgly y la Cas III-La (**Tabla 32**). Estos datos postulan a la Cas III-La como la más activa sobre HeLa, en este modelo y esquema de tratamiento (**31**).

Tabla 32. Efectos antitumorales *In Vivo* de Cisplatino (CDDP), Casiopeínas® III-ia, IIgly y III-La. Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 24 de experimentación (**31**).

Tratamientos	n	FA	REC
Testigo (Agua destilada)	5	–	–
CDDP 2.5 mg/kg	5	50.1	0.28
Casiopeína II-gli 1 mg/kg	5	48.9	2.03
Casiopeína III-ia 6 mg/kg	5	38.8	0.77
Casiopeína III-La 1.8 mg/kg	5	33.8	2.7

Las Cas IIgly, III-ia y III-La tiene actividad antitumoral parcial sobre HeLa transplantado al ratón desnudo en las dosis utilizadas, siendo la Cas III-La la droga que demuestra la mayor actividad, hecho que se ve opacado por una ligera toxicidad (**31**).

PC-3

Para determinar si la Cas III-ia, IIgly y III-La aplicadas intraperitonealmente ejercían una actividad antitumoral sobre PC-3 transplantada al ratón desnudo, se calculó el volumen relativo tumoral (VRT), la función antitumoral, los días en doblar el tamaño y el retraso específico del crecimiento.

Con respecto al VRT en los días 8, 16 y 24 (**Figura 34**), y a los días en doblar el tamaño (**Figura 35**) no hay diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos ($P > 0.05$) (**31**).

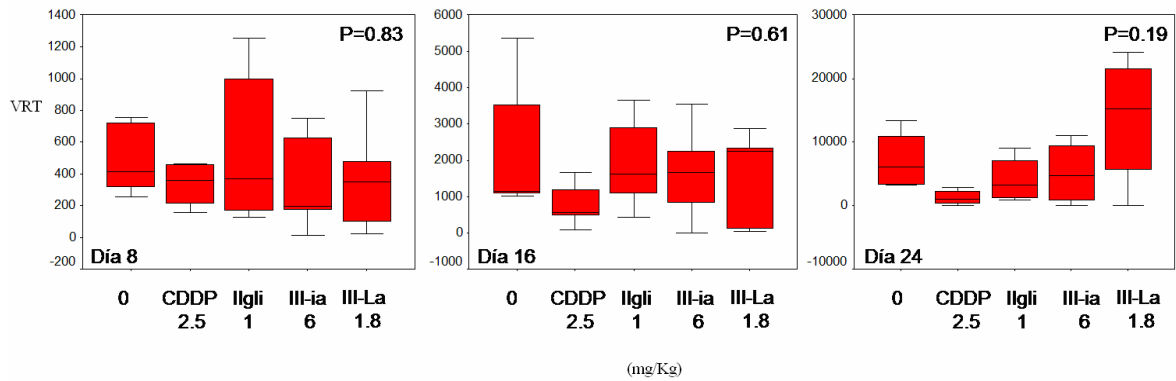


Figura 34. Cajas de valores extremos que representan el Volumen Relativo Tumoral (VRT) de los tumores originados del trasplante de PC-3 en los días 8, 16 y 24 de experimentación y tratados cada cuarto día con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgly 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5).

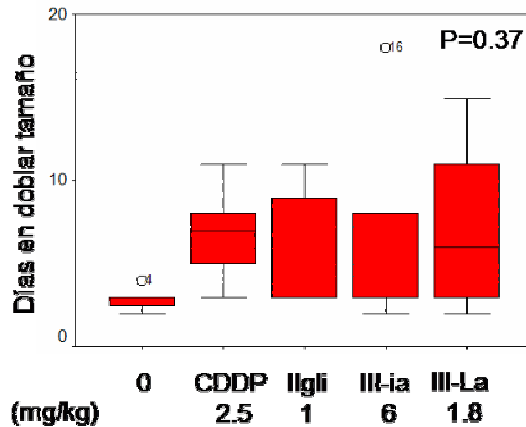


Figura 35. Cajas de valores extremos que representan los días en doblar el tamaño de los tumores originados del trasplante de PC-3 y tratados cada cuarto día con agua destilada (n=5), CDDP 2.5 mg/kg (n=5), Cas III-ia 6 mg/kg (n=5), Cas Ilgly 1 mg/kg (n=5), Cas III-La 1.8 mg/kg (n=5). *Valor alejado más de 3 desviaciones estándar respecto a la media.

Sin embargo y a pesar de los resultados estadísticos obtenidos con el volumen relativo tumoral y los días en doblar el tamaño, al calcular el índice de Función antitumoral se observó que CDDP tenía actividad antitumoral. El requerimiento de función antitumoral, que debe ser menor a 42%, fue cubierto por la CDDP. Sin embargo, el requerimiento de retraso específico de crecimiento, que debe ser mayor o igual a 2, no fue alcanzado por ninguno de los tratamientos (Tabla 33) (31).

Tabla 33. Efectos antitumorales *In Vivo* de Cisplatino (CDDP), Casiopeínas® III-ia, Ilgly y III-La. Función antitumoral (FA) y retraso específico del crecimiento (REC) determinado para los tumores de los distintos tratamientos al día 24 de experimentación (31).

Tratamientos	n	FA	REC
Testigo (Agua destilada)	5	–	–
CDDP 2.5 mg/kg	5	17.9	1.1
Casiopeína II-gli 1 mg/kg	5	58.1	0.6
Casiopeína III-ia 6 mg/kg	5	71.7	1.4
Casiopeína III-La 1.8 mg/kg	5	190.7	1.2

Las Casiopeínas® no son activas sobre PC-3 transplantado al ratón desnudo (31).

2.3 Efecto antineoplásico y mecanismos de acción de la Casiopeína® Ilgly sobre el glioma C6 *In Vitro* e *In Vivo*.

El propósito de este estudio fue identificar agentes terapéuticos potenciales contra el glioma maligno. Se investigó el efecto antineoplásico de la Casiopeína® Ilgly sobre el crecimiento del glioma C6 *In Vitro* e *In Vivo*. La Casiopeína® Ilgly a bajas dosis inhibió la proliferación celular del glioma C6, induciendo muerte celular y la formación de vacuolas autofágicas, también como la sobreexpresión de las proteínas LC3, Beclin 1, Bax y Bid. Además de aumentar la actividad de caspasa 3 y la translocación nuclear de AIF y Endo G, sin afectar la fragmentación endonucleosomal del ADN. *In Vivo* la Casiopeína® III-ia reduce el volumen tumoral también como los índices proliferativos y mitóticos, aumentando el índice apoptótico. La toxicidad del fármaco sobre el hígado, riñón y corazón no fue evidente a las dosis ensayadas. Estos resultados soportan la hipótesis que la Casiopeína® Ilgly puede ser un fuerte candidato para el tratamiento de glioma malignos en humanos (45).

Figura 36. Volumen del Glioma C6 Subcutáneo (Día 21 de tratamiento) (45).

JULIO-AGOSTO 2002

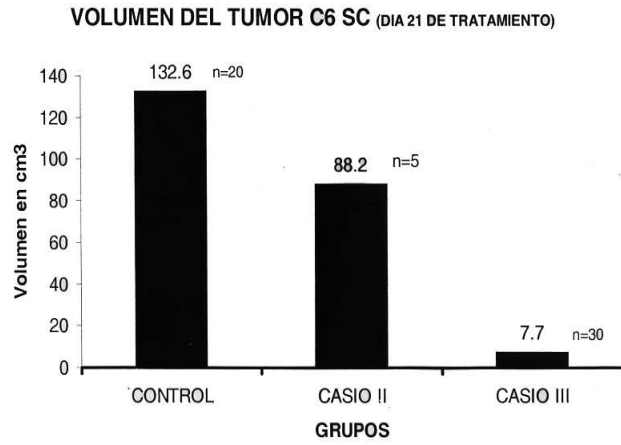
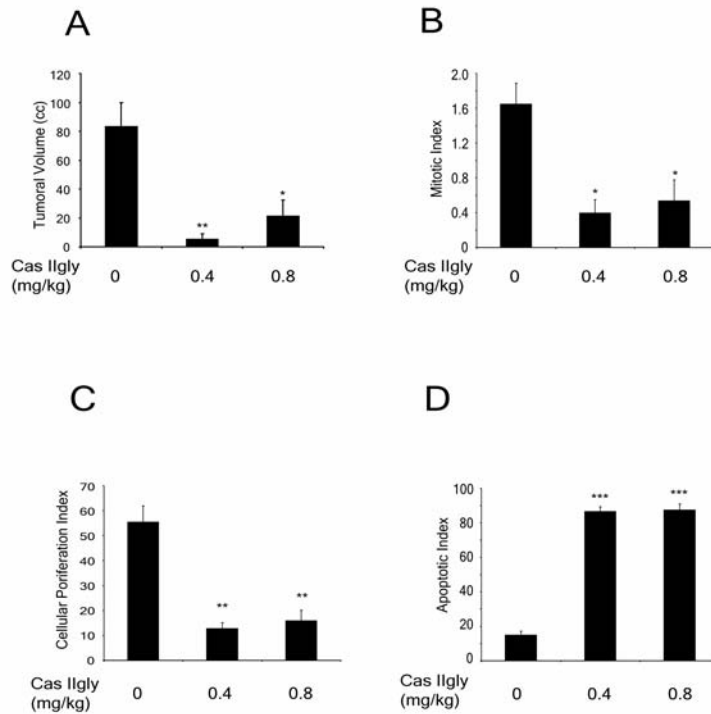


Figura 37. Efecto antitumoral de Cas IIgly *In Vivo* (45).



2.4 Tumores espontáneos. Evaluación clínica de la Casiopeína® III-ia de un tumor mamario en rata Wistar con la ayuda de la técnica PET.

El principal objetivo de este estudio fue la determinación del efecto antitumoral de la Casiopeína® III-ia en un tumor espontáneo en una rata, con la ayuda de la técnica PET-[¹⁸F]-FDG. La diferencia en la biodistribución del trazador posterior al tratamiento intermitente con la Casiopeína® III-ia es evaluada al día 20 y después de tres días de tratamiento los días 1, 5, 9 del experimento considerando el día "0" al día de la primera tomografía (46).

En la **Figura 38** se encuentran los tres estudios PET-[¹⁸F]-FDG realizados a la rata. En el primer estudio (**Figura 38a**) se observa una zona hipermetabólica localizada en la región axilar en su porción posterior que abarca tejidos blandos. Posterior al esquema de tratamiento (quimioterapia) se observa una remisión total de la lesión tumoral (**Figura 38b**). En la imagen de control (7 días después a la quimioterapia) existe un ligero incremento de la actividad metabólica en el sitio de la lesión tumoral (**Figura 38c**). Los resultados obtenidos demuestran que el esquema de tratamiento empleado (qd4 x 3) fue el adecuado, observándose una completa remisión del tumor (46).

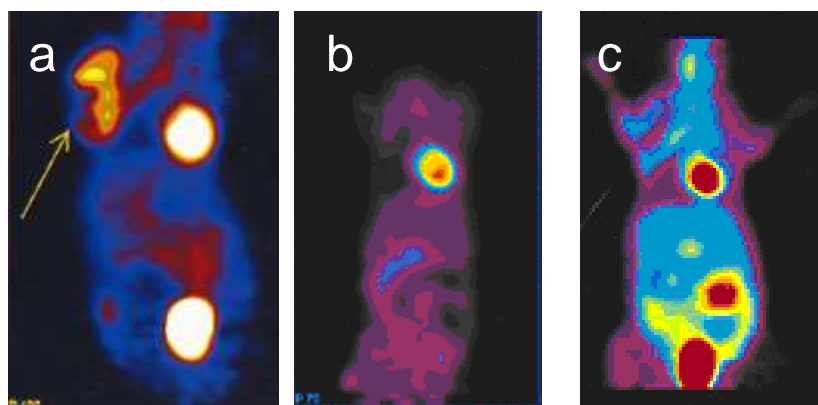


Figura 38. Estudios PET-[¹⁸F]-FDG realizados a la rata. a) lesión tumoral, b) estudio Post-tratamiento y c) Imagen de control.

Los logros alcanzados hasta este instante son muy alentadores ya que demuestran la gran efectividad que posee la Casiopeína® III-ia frente a tumores mamarios espontáneos en ratas. Aunado a esto se logró con éxito la adecuación de la cámara PET para su uso en animales de laboratorio mediante un protocolo de cerebro humano para adquisición de datos (46).

Capítulo III. Mecanismos de Acción

3.1 Modelos

Las Casiopeínas® Ilgly y III-ia han mostrado actividad antiproliferativa *In Vivo* e *In Vitro*. Muchos de estos efectos están relacionados con alteraciones en el ADN. A continuación se presentan dos modelos para el mecanismo de acción de las Casiopeínas®:

Tabla 34. Propuestas de modelos para los mecanismo de acción de dos Casiopeínas®.

Modelo	Casiopeínas	
	III-ia	
Interacción con adenina y DNA	1. Interaccionar con dos moléculas de adenina, a través de apilamiento π entre los sustituyentes bipyridina y/o fenantrolina del complejo metálico. Mediante la formación de complejos por apilamiento.	
Modelo	II-gly	III-ia
Producción de radicales libres	Estos fármacos, pueden intervenir en reacciones de óxido-reducción de tipo Fenton y Haber-Weiss en las que el cobre puede participar por lo que muy probablemente provocan daño por radicales libres. La Casiopeína® Ilgly posee actividad nucleasa relacionada con la generación de especies reactivas de oxígeno (OH)	

3.2 Evaluación de los rompimientos en el ADN inducidos por la Casiopeína® Ilgly en leucocitos humanos de sangre periférica.

En el siguiente trabajo se evaluó el efecto de la Casiopeína® Ilgly sobre la viabilidad celular, daño y reparación al ADN, en leucocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de este compuesto.

Los resultados en los cuatro donadores muestran un comportamiento similar. A las tres horas después de haber dado el tratamiento, hay una disminución gradual en la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración (**Tabla 35**) (47). Un efecto parecido se ha reportado en células de carcinoma ovárico CH1 y células de leucemia murina L1210 y concuerda también con estudios realizados con otros compuestos químicos que inducen muerte celular (42).

La electroforesis unicelular en gel muestra que la exposición a la Casiopeína® induce daño al ADN, que se refleja en el incremento de la longitud de los cometas, así como en la aparición de células con daño total, ambos con un comportamiento dependiente de la concentración (**Figura 39**). Lo anterior indica que este compuesto ejerce un efecto citotóxico y puede inducir rompimientos de cadena sencilla producidas por lesiones que bajo condiciones alcalinas son transformados a rompimientos o bien, sitios donde una lesión se repara. Al comparar el grupo testigo (sin Casiopeína®) con el tratado (prueba de U de Mann-Whitney) se observa un incremento en la magnitud del daño cuando las concentraciones también se incrementan. Se ha reportado que comportamientos de este tipo pueden estar relacionados con un efecto directo del compuesto con el ADN para inducir rompimientos (**47**).

Tabla 35. Viabilidad celular (%) de leucocitos tratados 3 horas con Casiopeína®.

D1 = Hombre 24 años, D2 = Mujer 23 años, D3 = Hombre 58 años, D4 = Mujer 50 años.				
Casiopeína®/Igly	D 1	D 2	D 3	D 4
Testigo	100	100	100	100
1.43 µg/ml	95	98	99	98
2.75 µg/ml	94	93	98	98
4.17 µg/ml	86	93	93	96
8.35 µg/ml	45	85	91	89
16.00 µg/ml	44	75	88	86

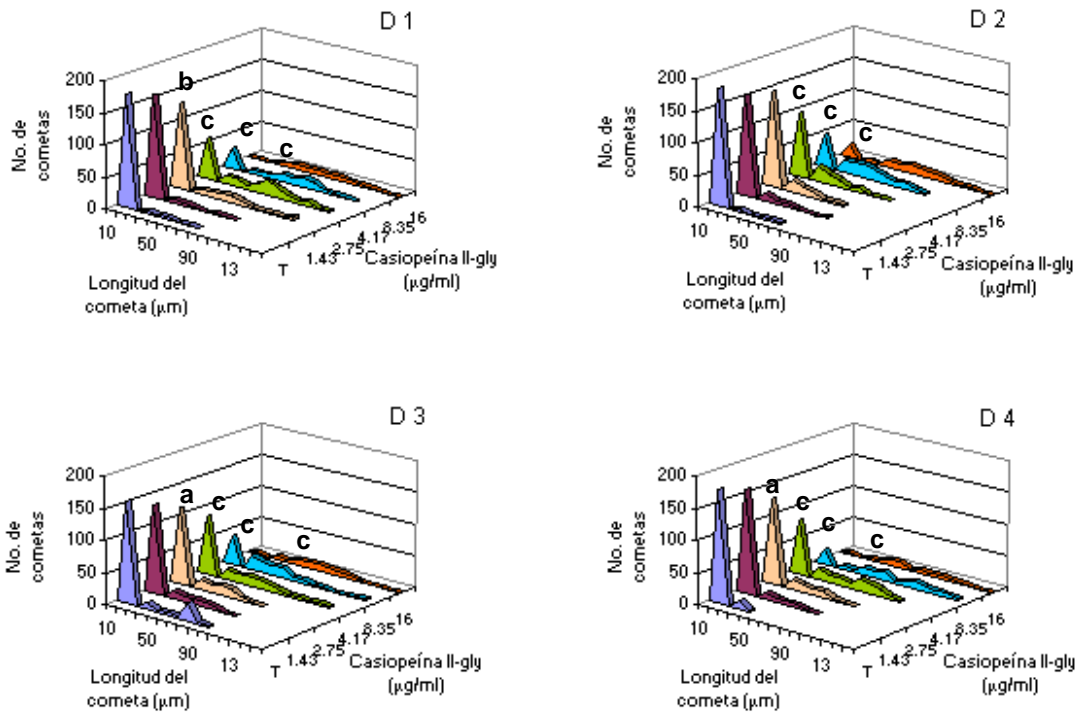


Figura 39. Distribución de la longitud de los cometas de los 4 donadores tratados con diferentes concentraciones de Casiopeína® IIgly durante 3 horas. (a) $P<0.05$, (b) $P<0.01$, (c) $P<0.001$

Cuando las células fueron expuestas de 10 a 60 minutos, se observa que hay diferencias estadísticas a partir de 20 minutos de exposición (**Figura 40**), con comportamiento dependiente del tiempo. Con respecto a la cinética de reparación los resultados no muestran disminución en la longitud de los cometas (**Figura 41**).

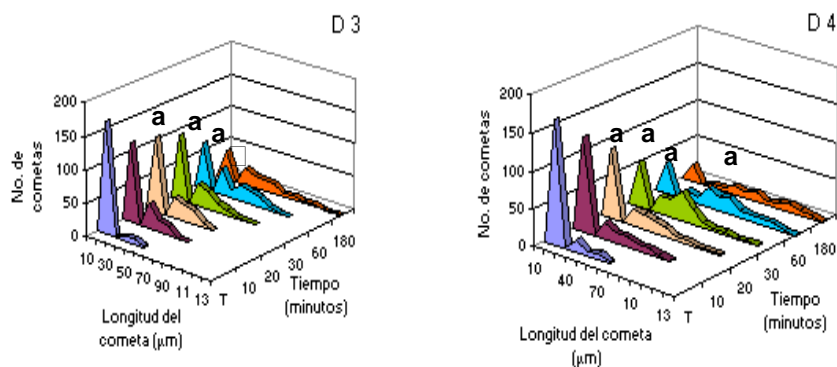


Figura 40. Distribución de la longitud de los cometas de 2 donadores tratados con 8.35 $\mu\text{g/ml}$ de Casiopeína® IIgly con respecto al tiempo. (a) $P<0.001$

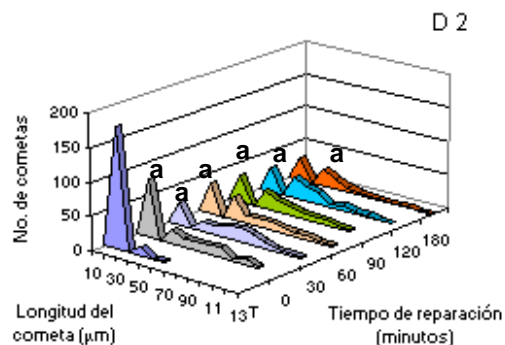


Figura 41. Distribución de la longitud de los cometas de leucocitos humanos tratados con 8.35 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora a diferentes tiempos de reparación. (a) $P < 0.001$

Los resultados de viabilidad indican que la Casiopeína® Igly ejerce un efecto citotóxico. Por otro lado, el incremento en la longitud de los cometas muestra un efecto dependiente de la concentración y del tiempo donde, el daño en el ADN no es reparado por completo cuando se dan 180 minutos de recuperación después del tratamiento (47).

3.3 Mecanismo de citotoxicidad de la Casiopeína® Igly.

En esta investigación se observó que las Casiopeínas® se unen al ADN, con una alta afinidad, para degradar a los ácidos nucleicos ADN y ARN, en presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico. Aun en condiciones severas de lavado la unión permanece. La Casiopeína® Igly en presencia de ascorbato fue capaz de degradar al ARN, al ADN genómico y plásmico y al material genético de tipo cromático e intranuclear.

También fue posible observar la formación de la proteína 8-oxodG en células que estuvieron expuestas a la Casiopeína® Igly, esto sugiere que la generación de especies reactivas de oxígeno son la causa mayor de la citotoxicidad de estos compuestos. También fue posible reafirmar su alta toxicidad y su actividad antineoplásica (48).

En otro trabajo, se demostró que la Casiopeína® Igly es capaz de provocar daño oxidativo citosólico. El daño oxidativo fue evaluado en células HeLa de acuerdo al protocolo desarrollado por Goossens y sus colaboradores en 1995. Se monitorearon las células con el colorante dihidrorodamina 123 en sus formas oxidada y reducida, así como la disminución de defensas antioxidantes endógenas

reducidas como el glutatión (encargado de proteger a la célula de cualquier daño oxidativo) y el rol protector del antioxidante exógeno, dimetil sulfóxido DMSO. Para evaluar la capacidad de éste fármaco a inducir daño oxidativo, la Casiopeína® Ilgly se administró a las células en sus dos posibles formas, oxidada (Cu(II)) y reducida (Cu(I)) estas últimas en presencia de ácido ascórbico. Se observó una reacción redox similar a la de Fenton y Haber-Weiss. La Casiopeína® fue capaz de provocar un agotamiento de glutatión endógeno reducido lo que provocó un daño oxidativo (49).

La información acerca de la química redox de las Casiopeínas® aun no es del todo clara, por lo que no ha sido posible saber si estos compuestos son realmente capaces de generar radicales hidroxilo *In Vivo*, sin embargo, los ensayos realizados en este trabajo sugieren que el mecanismo de citotoxicidad de la Casiopeína® Ilgly, está relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno. Uno de estos ensayos demuestra que éste fármaco inhibe fuertemente la proliferación de las células HeLa.; este efecto se observó a través de la reducción del cobre, átomo central de la Casiopeína®, mediado por el ácido ascórbico. Por otro lado la presencia del DMSO, contribuye a la prevención de la citotoxicidad por parte de la Casiopeína®, por ello se propuso que este fármaco provoca la muerte celular a través de un mecanismo que involucra la producción de radicales hidroxilo (49).

3.4 Mecanismo de toxicidad de las Casiopeínas® en las funciones mitocondriales.

Para elucidar los mecanismos de toxicidad subcelular y bioquímico de las Casiopeínas®, se expusieron mitocondrias aisladas de varias células de rata (Wistar) de hígado, riñón, corazón y hepatoma AS-30D a estos fármacos para medir los índices de respiración, gradiente de H⁺ y las actividades del succinato, la 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la ATP-asa. Los resultados mostraron que las mitocondrias del hígado, riñón y hepatoma fueron sensibles a la Cas Ilgly; en cambio las de corazón fueron más resistentes. También fue posible observar que las Casiopeínas® pueden interactuar directamente con la mitocondria aislada o intacta en las células provocando efectos como inhibición de la fosforilación oxidativa y eventualmente una disminución en ATP. El problema que surge a partir de estos estudios es que se observó que las Casiopeínas® no fueron sólo específicas para las mitocondrias tumorales sino que también afectaron a las mitocondrias sanas.

La administración intraperitoneal o intravenosa de las Casiopeínas® en ratas provocó una acumulación de estos fármacos en diversos órganos, principalmente en hígado, riñón y corazón. La microscopía electrónica de estos órganos demostró alteraciones morfológicas severas a la mitocondria (50).

En otro trabajo se evaluó la relación entre la proliferación celular, las tasas de glicólisis y la fosforilación oxidativa en células tumorales humanas, HeLa y de ratón, AS-30D. Se observó en un medio con glutamina más glucosa, que ambas líneas celulares crecieron óptimamente. La mitocondria fue la fuente predominante del ATP en ambos tipos de células (66-75%) a pesar de la glicólisis activa. En un medio de glutamina libre de glucosa la proliferación de ambas líneas celulares disminuyó un 30% pero la fosforilación oxidativa y el nivel de ATP citosólico aumentaron un 50%. En un medio de glucosa libre de glutamina, la proliferación celular, la fosforilación oxidativa y la concentración de ATP disminuyeron drásticamente, aunque las células eran viables. La oligomicina en un medio con glutamina más glucosa, abolió el crecimiento de ambas líneas celulares, indicando así un rol esencial del ATP mitocondrial para un avance tumoral. Los supuestos inhibidores mitocondriales: rodaminas 123 y 6G, así como Casiopeína® Ilgly inhibieron la proliferación celular del tumor, la fosforilación oxidativa y la glicólisis. El crecimiento de ambas líneas tumorales fue altamente sensible a las rodaminas y a la Cas Ilgly con valores de CI_{50} para células HeLa menores a $0.5 \mu M$, lo que nos dice que estos fármacos no afectan la viabilidad y la proliferación de los linfocitos humanos ($CI_{50} > 30 \mu M$). Además las rodaminas 6G y la Cas Ilgly a dosis micromolares prolongaron la sobrevivencia de animales inyectados peritonealmente con AS-30D. Concluimos que el rápido crecimiento de las células tumorales tiene un metabolismo predominantemente de tipo oxidativo, el cual puede ser un blanco terapéutico muy eficaz (51).

En otras investigaciones se estudió el daño mitocondrial sobre la línea celular humana A549 (adenocarcinoma de pulmón) después de un tratamiento de 6 horas con $5 \mu M$ de Casiopeína® Ilgly. Los resultados obtenidos sugieren que el principal mecanismo de acción contra A549 es el daño al ADN mitocondrial, seguido de un desbalance en la expresión de apoproteínas de la cadena respiratoria y la sobreproducción mitocondrial de O_2^- .

El cisplatino induce un pequeño decremento en los niveles de glutatión intracelular reducido (GSH) contra A549, mientras que la Cas IIgly consume drásticamente el glutatión reducido (GSH) a su forma oxidada (GSSG) en muy pocas horas de tratamiento.

La eficacia de la Cas IIgly fue notablemente potenciada cuando esta se combinó con inductores de la disminución de GSH, como BSO (L-butionina sulfoximina) y 2',5'-DHC (2',5'-dihidroxicalcona) (43).

3.5 Influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa y apoptótica del quelato mixto de cobre Casiopeína® III-ia en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos.

A fin de evaluar la influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa se empleó la adición de factor microsomal y se lograron los siguientes objetivos:

- ❖ Evaluar la influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa de la Casiopeína® III-ia utilizando la técnica de Sulforrodamina B en las tres líneas tumorales SK-LU-1, HeLa, MCF7 y linfocitos humanos aislados.
- ❖ Evaluar la influencia del metabolismo en la capacidad apoptótica de la Casiopeína® III-ia comparando por medio de dos técnicas Inmunohistoquímicas (proteínas anti/pro-apoptóticas y TUNEL) en tres líneas tumorales SK-LU-1, HeLa, MCF7 y linfocitos humanos aislados.
- ❖ Evaluar si la Casiopeína® III-ia produce efectos diferentes sobre la actividad antiproliferativa de líneas de células tumorales y células sanas (linfocitos) (68).

Se concluyó lo siguiente:

- ❖ La viabilidad celular determinada por Ki67 y por Sulforrodamina B, muestra que la Casiopeína® III-ia es más activa que el Cisplatino en las tres líneas evaluadas ($p < 0.01$).
- ❖ La adición de la fracción microsomal influye en la actividad de los dos fármacos, en el caso de la Casiopeína® III-ia, disminuye la viabilidad de forma significativa ($p < 0.01$) a las concentraciones más altas (1.0 y 10 mg/mL) de estas mismas concentraciones sin activación metabólica.

- ❖ En la evaluación inmunohistoquímica, tanto el cisplatino como la Casiopeína® III-ia produjeron la expresión de Bcl2 y Bax sólo en las primeras dosis (0.01 y 0.1 mg/mL), lo cual probablemente implique una respuesta de defensa en la células desencadenando la vía apoptótica mitocondrial.
- ❖ La presencia de activación metabólica hace que esta expresión se produzca desde la dosis más baja en concordancia con los ensayos de viabilidad.
- ❖ La activación de Caspasa 3 se produce a partir de las dosis 1 y 10 mg/mL, lo que sugiere la ejecución de la apoptosis.
- ❖ Debido a que esta Caspasa puede ser activada por diversas vías no se descartan la participación de vías alternas, por lo que se sugiere medir citocromo C y otros marcadores para dilucidar las vías involucradas.
- ❖ Con éstas técnicas y usando la CI_{50} se confirma de modo contundente la apoptosis inducida por la Casiopeína® III-ia.
- ❖ La mayor actividad apoptótica y antiprolifarativa en orden decreciente fue: HeLa>SK-LU-1>MCF-7 >Linfocitos **(68)**.

Capítulo IV. Toxicidad

Actualmente los estudios de toxicidad constituyen una parte muy importante dentro del desarrollo de un nuevo fármaco. El objetivo de éstos es evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas. Los estudios preclínicos de toxicidad, son necesarios y tienen gran importancia en los programas de identificación y elección de los fármacos a desarrollar, por tal razón, deben ser aplicados a todos los compuestos químicos que presenten algún interés de tipo biológico.

Los estudios de **toxicidad aguda** se pueden definir como el análisis de los efectos adversos ocurridos después de la administración o exposición de una sola dosis de alguna sustancia.

Los ensayos agudos implican la administración de la sustancia a evaluar en una sola ocasión para la determinación de la DL₅₀ (ensayo de 24 hrs. y control de sobrevivientes durante 7–15 días), dos especies (normalmente ratas y ratones), dos vías de administración (una es la vía de uso prevista).

Estos estudios, se realizan con el fin de caracterizar los efectos biológicos agudos de un compuesto químico; no sólo su letalidad, sino también los órganos principalmente afectados y los signos clínicos, de tal manera que los pacientes intoxicados puedan ser diagnosticados y tratados de manera adecuada, además, proporcionan información de utilidad para el diseño y selección de las dosis en estudios más prolongados. Los estudios preclínicos de toxicidad, son necesarios y tienen gran importancia en los programas de identificación y elección de los fármacos a desarrollar, por tal razón, deben ser aplicados a todos los compuestos químicos que presenten algún interés de tipo biológico.

4.1 Toxicidad aguda en rata y ratón de la Casiopeína® Ilgly y III-ia.

Los animales inyectados se mantuvieron durante 15 días en observación para evaluar su signología, la determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀) se llevó a cabo considerando sólo a aquellos animales que murieron durante las 24 hrs. postadministración de la Casiopeína® III-ia los resultados fueron evaluados mediante el programa Log Probit Analysis (52).

Tabla 36. Determinación de la dosis letal (DL₅₀ y DL₉₀) de la Casiopeína® III-ia en ratón (52).

Ratón	ICR ♂		ICR ♀	
	IP	IV	IP	IV
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
DL₅₀	24.68	12.78	32.33	12.82
Límite superior	27.14	13.83	33.81	14.21
Límite inferior	17.63	11.83	30.74	11.45
DL₉₀	27.68	14.87	34.61	15.84
Límite superior	53.42	18.76	41.64	20.47
Límite inferior	25.01	13.61	33.02	14.12

Tabla 37. Determinación de la dosis letal (DL₅₀ y DL₉₀) de la Casiopeína® III-ia en rata (52).

Rata	Wistar ♂		Wistar ♀	
	IP	IV	IP	IV
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
DL₅₀	14.36	5.51	19.93	5.96
Límite superior	14.94	6.85	21.25	7.31
Límite inferior	13.41	4.02	18.43	4.7
DL₉₀	15.44	7.73	22.53	8.07
Límite superior	18.36	13.34	27.11	15.27
Límite inferior	14.76	6.21	20.99	6.57

Tabla 38. Determinación de la dosis letal (DL₅₀ y DL₉₀) de la Casiopeína® Ilgly en rata (52).

Rata	Wistar ♂		Wistar ♀	
	IP	IV	IP	IV
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
DL₅₀	8.46	7.83	8.83	8.89
Límite superior	9.95	8.69	9.8	7.47
Límite inferior	7.16	6.91	7.94	10.41
DL₉₀	11.61	8.88	10.69	12.1
Límite superior	17.64	13.28	14.13	18.78
Límite inferior	9.71	8.05	9.55	10.15

Tabla 39. Determinación de la dosis letal (DL₅₀ y DL₉₀) de la Casiopeína® Ilgly en ratón (52).

Ratón	ICR ♂		ICR ♀	
	IP	IV	IP	IV
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
DL₅₀	15.59	15.5	15.67	15.3
Límite superior	17.43	16.82	17.29	16.01
Límite inferior	13.53	13.51	14.13	14.59
DL₉₀	19.79	17.95	17.71	16.18
Límite superior	26.64	22.61	24.07	18.37
Límite inferior	17.44	16.46	16.16	15.51

4.2 Hematotoxicidad en ratas por la Casiopeína® Ilgly.

Este trabajo consistió en observar los efectos hematotóxicos de la Casiopeína® Ilgly en ratas. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, utilizando esquemas de aplicación de dosis de 1,3 y 5 mg/Kg a 12 horas para evaluar la respuesta hematológica posterior a la administración de la Casiopeína® Ilgly. El mayor efecto tóxico observado, atribuido a la administración de una dosis simple intravenosa de éste fármaco (5mg/Kg) en la rata Wistar, fue una anemia hemolítica debida a un daño directo de eritrocitos. Probablemente esta anemia se deba al estrés oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas a partir de la reducción del cobre de la Casiopeína®. Se observó que una de las estructuras más sensibles a las ERO es la membrana celular de los eritrocitos (53).

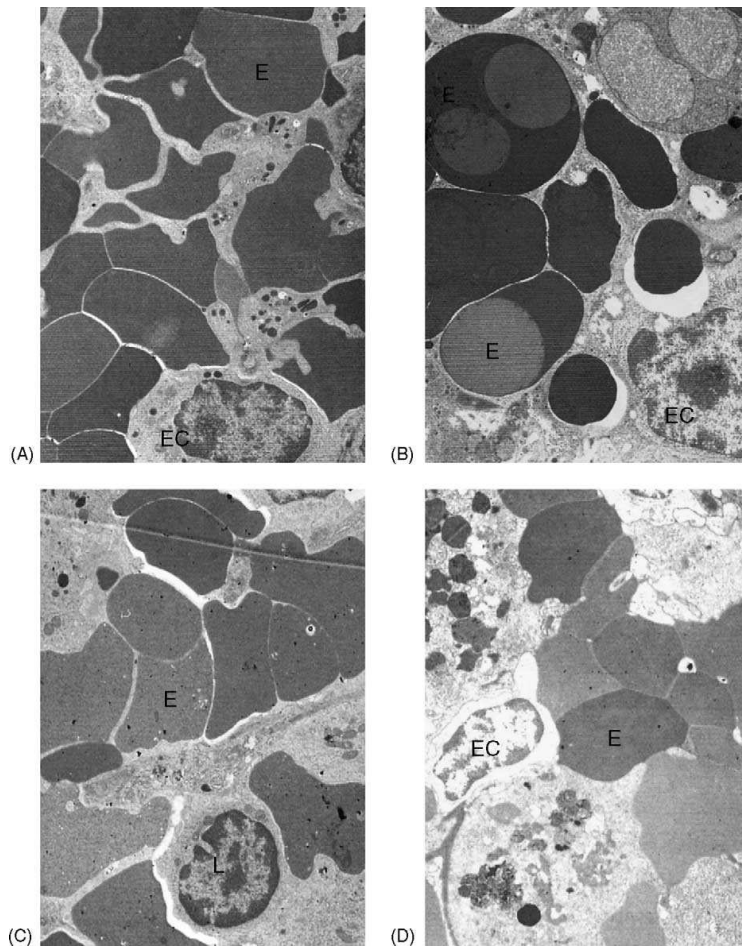


Figura 42. Microscopía electrónica. (A) Eritrocitos (E) y células de endotelio (EC) normales, con diferentes formas (B) Doce horas después de la administración, se observa el daño en EC y E (C) Cinco días después de la administración, daño en E y linfocitos (L) pueden observarse (D) Quince días después de la administración las células dañadas de E y EC se pueden observar muy densas.

4.3 Estudios de los efectos tóxicos de las Casiopeínas® IIgly y III-ia en perros.

Se realizaron estudios preclínicos para evaluar los efectos tóxicos agudos en perros de las Casiopeínas® IIgly y III-ia. Se estudiaron los efectos tóxicos agudos que pueden ser producidos por diferentes dosis de Casiopeínas® IIgly y III-ia administradas en perros clínicamente sanos, los cuales se evaluaron a través de un monitor fisiológico, hemograma, bioquímica sanguínea, urianálisis, equilibrio ácido-base, necropsia, histopatología y microscopía electrónica

Después de la administración de dosis altas de Casiopeínas®, la muerte del perro sucede en un lapso de 20 a 40 min. Los resultados observados en el fisiógrafo con respecto a la función cardiovascular, indican disminución repentina de la frecuencia cardíaca (**figura 43**), presión arterial (**figura 44**), y en el electrocardiograma se observa inversión de la onda T, lo cual nos está indicando hipoxia al miocardio. Con respecto a la función respiratoria se aprecia disminución del CO₂ expirado (**figura 47**), aumento en la frecuencia respiratoria inicial seguida de la disminución abrupta (**figura 45**) y disminución de la saturación de oxígeno (**figura 46**), lo cual nos indica insuficiencia respiratoria. Los signos clínicos que muestra el perro minutos antes de morir corresponden a disnea, cianosis y edema pulmonar marcado con expulsión de líquido por la sonda endotraqueal. En el hemograma, el hallazgo más frecuente es una disminución en los leucocitos (**figura 48**) circulantes en comparación con la muestra control, esta leucopenia puede estar asociada a la marginación de los neutrófilos secundaria a la activación del endotelio capilar o a la liberación de factores endoteliales quimiotácticos. En la bioquímica sanguínea y el urianálisis no se encontraron diferencias. Los gases sanguíneos nos indican una ligera acidosis respiratoria determinada por la disminución del pH (**figura 49**) y aumento de la PCO₂ (**figura 50**). (53-55).

Los hallazgos más importantes en la necropsia se localizan en aparato respiratorio, observándose en tráquea, bronquios primarios y secundarios abundante espuma blanquecina. Los lóbulos pulmonares no colapsan y tienen aspecto edematoso, a la superficie de corte se aprecia material transparente gelatinoso alrededor de los vasos sanguíneos. Histopatológicamente los hallazgos más relevantes se aprecian en aparato respiratorio, encontrándose en todos los lóbulos pulmonares a nivel de las arteriolas separación marcada de la túnica adventicia y de la capa media, así como desarreglo de las fibras de colágeno. En algunas áreas los espacios alveolares tienen en su interior

material ligeramente eosinofílico dichos hallazgos pueden indicarnos que el edema pulmonar es provocado por incremento en la presión hidrostática secundario a insuficiencia cardiaca.

Ultraestructuralmente se aprecia marcado desarreglo de las miofibrillas, las mitocondrias están aumentadas de tamaño y hay pérdida de las crestas mitocondriales. Esto nos indica probablemente que las Casiopeínas® están afectando directamente a las mitocondrias de las células musculares, desencadenando así insuficiencia cardiaca aguda (53-55). El mecanismo por el cual las Casiopeínas® pueden dañar las mitocondrias del corazón no se conoce con precisión, sin embargo, estudios publicados sugieren que la producción de radicales libres puede jugar un papel importante (50).

Figura 43. Gráfica Disminución de la frecuencia cardiaca.

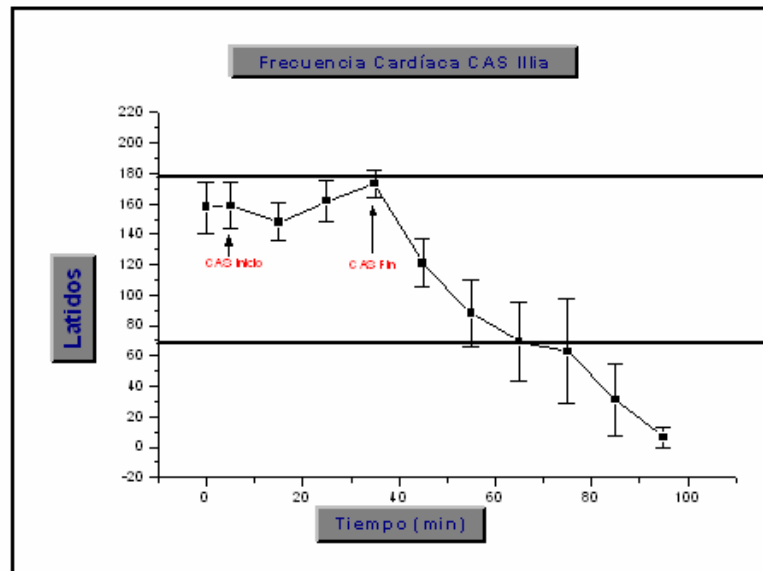


Figura 44. Gráfica Disminución de la presión arterial.

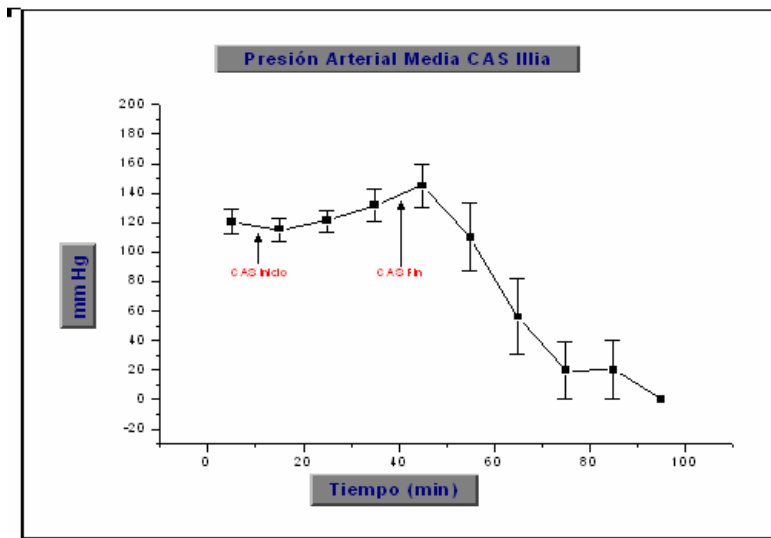


Figura 45. Gráfica Disminución de la frecuencia respiratoria.

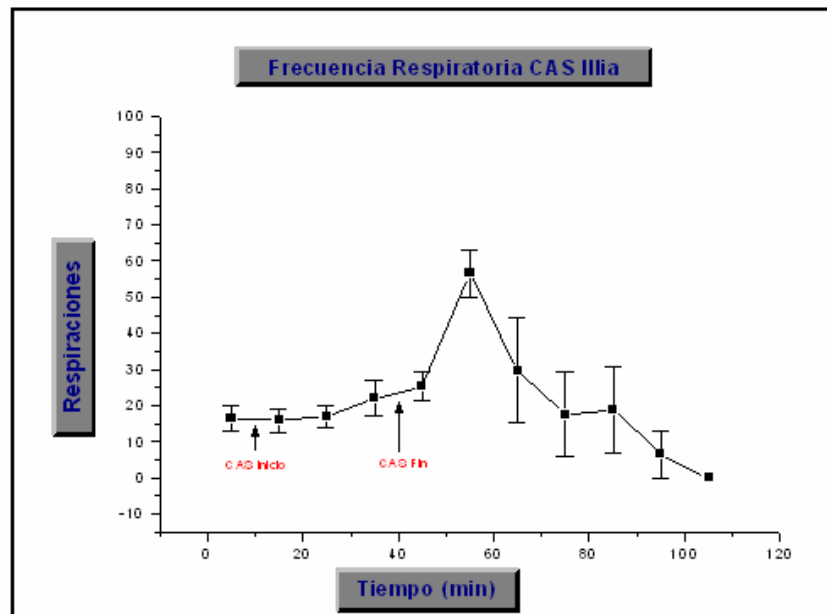


Figura 46. Gráfica Oximetría. Disminución en la saturación de oxígeno.

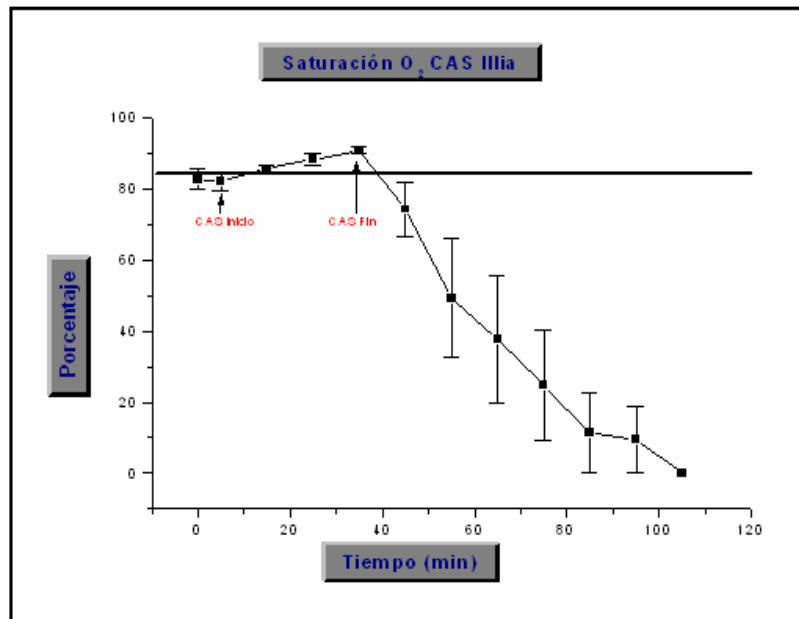


Figura 47. Gráfica Capnografía. Disminución en la PCO₂ expiatoria.

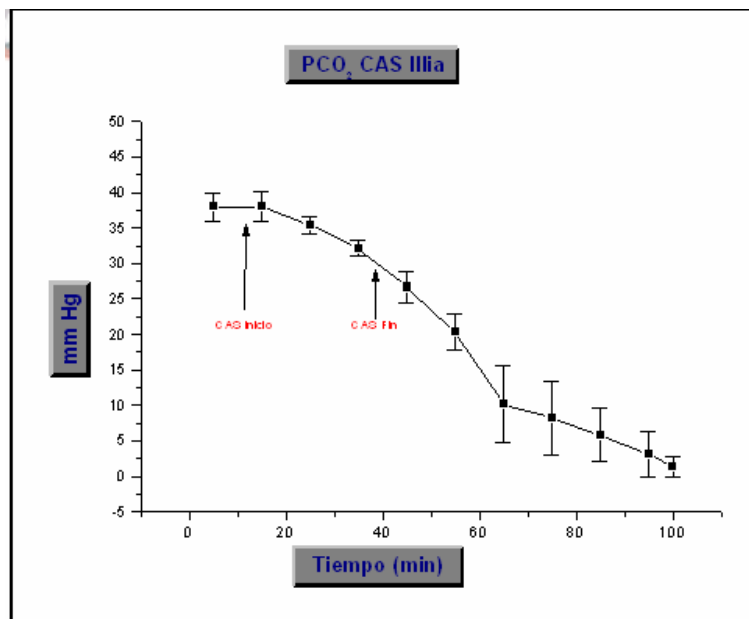


Figura 48. Gráfica Hemograma. Disminución en la cantidad de leucocitos.

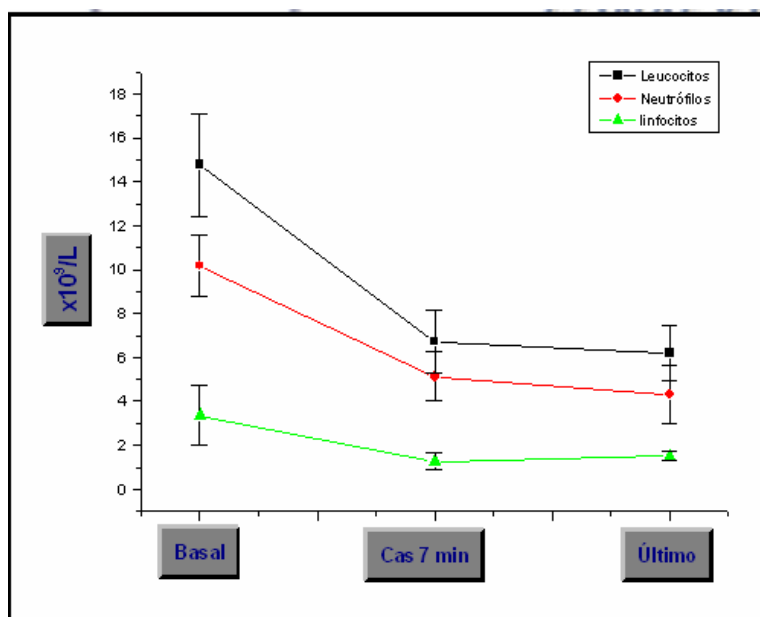


Figura 49. Gráfica Gasometría. Disminución del pH, acidemia.

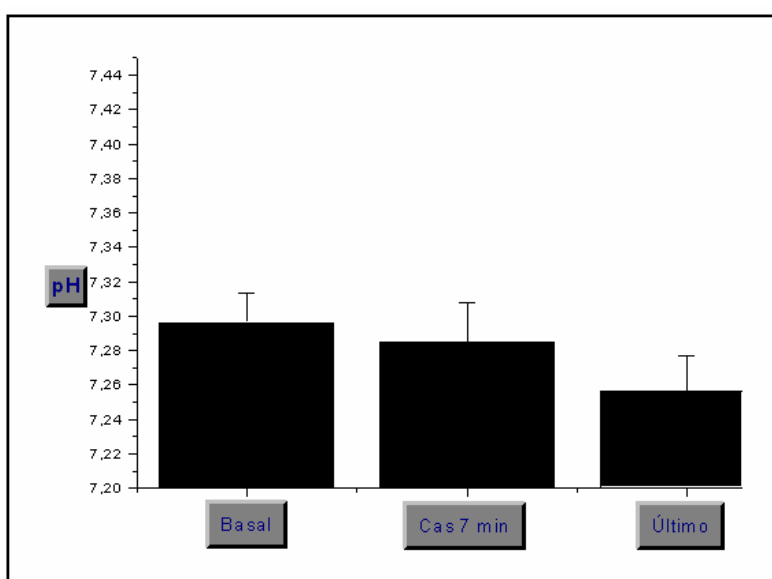
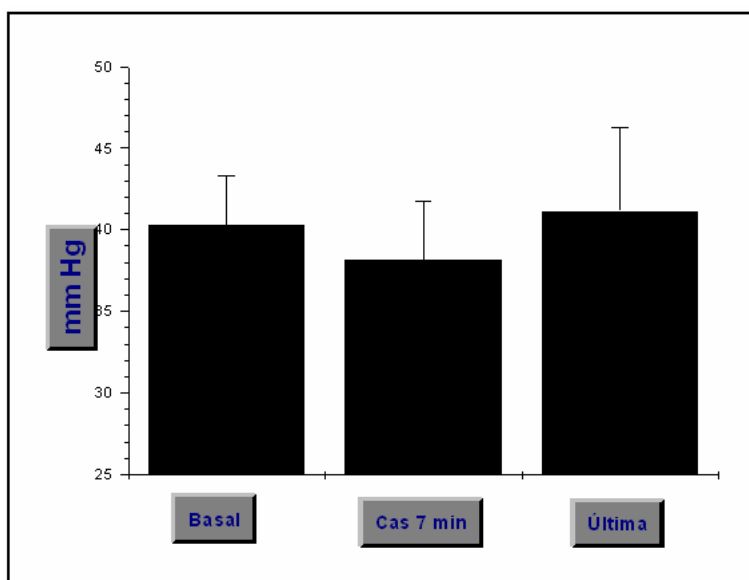


Figura 50. Aumento de la PCO₂ arterial. Acidosis respiratoria.



Los resultados sugieren que las Casiopeínas® afectan directamente a mitocondrias del músculo cardiaco, lo cual disminuye el aporte energético produciendo así insuficiencia cardiaca aguda. El edema pulmonar se presenta de manera secundaria por incremento en la presión hidrostática en el lecho capilar pulmonar. Finalmente la muerte ocurre por insuficiencia cardio-respiratoria (53-55). También se pudo observar que el carvedilol puede ser utilizado para evitar los severos efectos adversos a altas dosis de Casiopeínas®.

La dosis letal 99 calculada fue de 200 mg/m² y 160 mg/m² para las Casiopeínas® III-ia y IIgly respectivamente (53-55).

4.4 Cardiotoxicidad de las Casiopeínas®.

En este trabajo se estudio el daño al corazón que pueden provocar las dos Casiopeínas® más importantes hasta ahora (IIgly y III-ia). Se utilizaron corazones de ratas, los cuales fueron perfundidos con glucosa, octanoato o glucosa más octanoato a diferentes concentraciones de ambas Casiopeínas®. En los corazones perfundidos con glucosa más octanoato, sendas Casiopeínas® disminuyen el trabajo cardiaco y el consumo de oxígeno con concentraciones inhibitorias (CI₅₀) de 4 para la IIgly y 4.6 µM para la III-ia, después de una hora de perfusión. Las Casiopeínas® fueron considerablemente menos tóxicas que el adriamycin (CI₅₀=2.6 M) (un

cardiotóxico y antineoplásico muy conocido, con uso clínico. En un pecho abierto de un animal, el cual es un mejor modelo fisiológico que un corazón aislado, se administró 1 μ M de Casiopeína® Ilgly y se observó que es inocuo en comparación al adriamicin que induce un efecto cardiotóxico fuerte (56).

4.5 Reprotoxicidad y teratogenicidad.

4.5.1 Toxicidad reproductiva masculina de la Casiopeína® Ilgly.

El objetivo en el presente trabajo fue determinar el efecto tóxico reproductivo de la administración intraperitoneal (i.p.) de la Casiopeína® Ilgly en el ratón.

El peso testicular mostró una disminución significativa en la dosis de 0.55 mg/kg; el peso de la vesícula seminal y epidídimo aumentaron en la dosis 1.1 mg/kg; el peso de glándulas adrenales disminuyeron significativamente en las dosis de 0.55 y 1.1 mg/kg; el peso de la glándula coagulante disminuyó significativamente en la dosis de 2.2 mg/kg; finalmente con respecto al peso de la próstata en la dosis de 0.55 mg/kg disminuyó y en la de 1.1 mg/kg aumenta significativamente. Para la dosis de 2.2 mg/kg, no se obtuvieron próstata, vesícula seminal ni tampoco glándulas coagulantes como adrenales, debido a que todos los órganos se encontraban pegados lo cual imposibilitó su disección (57).

Tabla 40. Efecto de la Casiopeína® Ilgly sobre el peso de órganos después de 60 días de tratamiento (media \pm E.E) (57).

Dosis (mg/kg)	0.0	0.55	1.1	2.2
N	8	9	9	4
Peso Testículo promedio (g)	134.3 \pm 4.7	109.4 \pm 9.1*	130.0 \pm 9.6	114.4 \pm 20.0
Peso Epidídimo promedio (g)	57.4 \pm 2.4	61.7 \pm 1.7	68.6 \pm 3.5*	56.2 \pm 9.6
Peso Vesícula seminal (g)	123.6 \pm 10.81	152.6 \pm 16.2	163.1 \pm 15.6*	-
Peso Próstata (g)	61.4 \pm 7.1	45.6 \pm 5.0*	83.8 \pm 12.1*	-
Peso glándula adrenal promedio (g)	6.3 \pm 0.5	4.2 \pm 0.1*	4.7 \pm 0.2*	-
Peso Glándula coagulante (g)	83.4 \pm 3.5	60.9 \pm 7.6	81.4 \pm 11.3	32.9 \pm 4.7*

*P<0.05 Vs. testigo con "t" de Student

La viabilidad espermática disminuyó significativamente en las dosis 1.1 y 2.2 mg/kg de Casiopeína® Ilgly. La movilidad disminuyó en las dosis 0.55, 1.1 y 2.2 mg/kg sin ser significativas, mientras que la concentración espermática aumentó en la dosis 0.55 mg/kg pero no es significativa, disminuyendo en las dosis de 1.1 y 2.2 mg/kg sin ser significativa (57).

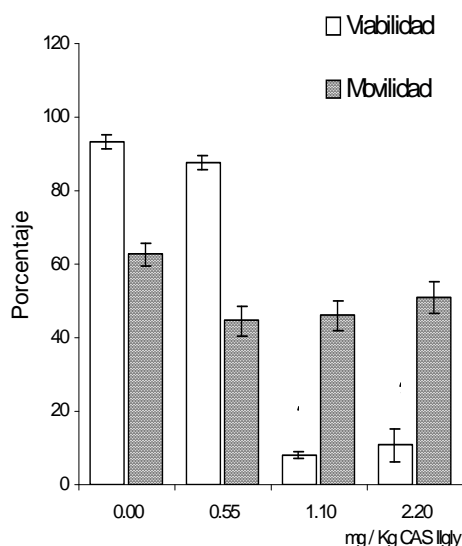


Figura 51. Gráfica del porcentaje de espermatozoides viables y móviles de ratones tratados con diferentes concentraciones de Cas Ilgly durante 60 días.

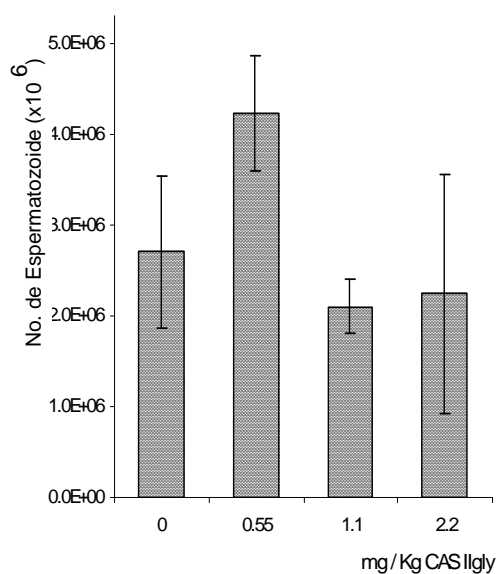


Figura 52. Gráfica de conteo de espermatozoides en ratones tratados con diferentes concentraciones de Cas Ilgly durante 60 días

Tabla 41. Efecto de la Casiopeína® Ilgly sobre las concentraciones de Testosterona y Progesterona en ratones tratados durante 60 días (los datos representan la media \pm el error estándar). Las concentraciones de testosterona y progesterona no presentaron diferencias significativas (57).

Hormona esteroide	Dosis (mg/Kg) Casiopeína® Ilgly			
	0.0	0.55	1.1	2.2
Progesterona (ng/ml)	2.168 \pm 1.046	0.712 \pm 0.355	0.326 \pm 0.072	1.01 \pm 0.608
Testosterona (ng/ml)	0.885 \pm 0.38	0.889 \pm 0.181	0.554 \pm 0.123	0.379 \pm 0.085

La producción de espermatozoides en los ratones no se vio afectada por el tratamiento con Casiopeína® Ilgly, sin embargo si se vio afectada la calidad (viabilidad y movilidad). La disminución en la movilidad espermática puede deberse a daño en las mitocondrias que se encuentran en la parte media del espermatozoide y que son las responsables producir la energía para el movimiento del flagelo. Se sabe que la Casiopeína® Ilgly puede inducir daño mitocondrial (50). De igual manera el daño a las mitocondrias pudo ser lo suficientemente grande como para matar al espermatozoide. Con relación a las variaciones hormonales observadas se puede sospechar que la Casiopeína® Ilgly puede estar actuando como un disruptor endocrino, sin embargo habría que realizar más estudios para comprobarlo (57).

4.5.2 Efecto teratogénico causado por la Casiopeína® III-ia en embriones y fetos de ratón de la cepa CD-1

La **Tabla 42** muestra los resultados de las alteraciones en el desarrollo de las camadas de las hembras tratadas con la Casiopeína® III-ia. En ésta, es notorio que en el grupo al cual se le aplicó la dosis de 7 mg/kg, el parto en las gestantes se anticipó y además el número de implantaciones disminuyó considerablemente. Por otro lado se observó que a proporción de fetos hembra respecto a los machos fue mayor en todos los grupos. Al analizar el número de reabsorciones se encontró que estas aumentaron conforme se incrementó la dosis de Casiopeína® III-ia, mientras que el peso por camada y feto disminuyó, teniendo que una camada se reabsorbió en su totalidad (58).

Tabla 42. Datos de la reproducción materna y fetal para ratones hembra CD-1 tratadas con diferentes dosis de Casiopeína® III-ia durante los días 6 a 15 de gestación (58).

	Dosis en los días 6-15 de gestación (mg/kg)			
	Testigo (-)	1.75	3.5	7.0
Hembras preñadas	6	10	8	10
Hembras con parto adelantado	0 / 6	0 / 10	0 / 8	5 / 10*
No. Hembras con fetos vivos	6 / 6	10 / 10	8 / 8	5 / 10
No. de implantaciones	83	139	110	74
Implantes / camada (media± d.e.)	13.83 ± 2.67	13.9 ± 1.81	13.75 ± 1.4	12.3 ± 1.9
Total de fetos vivos (hembra/macho)	44 / 38 (1.15/1)	76 / 59 (1.3/1)	67 / 39 (1.7/1)	44 / 15 (2.9/1)*
Fetos vivos/camada (%)	98.80	97.12	96.36	79.72
No. de reabsorciones	1	4	4	15
Camada con reabsorciones (%)	1 / 6 (16.6)	3 / 10 (33.3)	3 / 8 (37.3)	4 / 10 (40.0)*
Camadas totalmente reabsorbidas	0	0	0	1 / 10
Reabsorciones tempranas/camada	1 / 6	4 / 10	4 / 8	5 / 10*
Reabsorciones tardías / camada	0	0	0	10 / 4*
Peso/camada (g)	17.94 ± 3.09	18.05 ± 2.9	16.9 ± 3.19	11.11 ± 4.8*
Peso/feto (g)	1.42 ± 0.35	1.33 ± 0.18	1.27 ± 0.25	0.87 ± 0.21*

*P<0.05 Vs. el testigo.

En la **Tabla 43** se muestran las malformaciones esqueléticas detectadas. Estas muestran un efecto dosis-respuesta. La osificación tardía en cráneo es muy alta en la dosis de 7 mg/kg, además de ser el único grupo que la presentó. En extremidades delanteras (falanges proximales) se encontraron 11 de 110 fetos con osificación tardía en el grupo tratado con 3.5 mg/kg al igual que en extremidades traseras (falanges proximales) con 6 de 110. La ausencia de puntos de osificación en las extremidades delanteras y traseras (falanges distales y proximales) fue vista únicamente en el grupo de 7 mg/kg.

Los fetos con esternibras asimétricas fueron encontrados en todos los grupos aumentando al igual que la dosis, las esternibras en forma de pesa fueron mayores en la dosis de 3.5 mg/kg, las asimétricas/forma de pesa sólo se vieron en la dosis más alta, las esternibras desplazadas fue un solo caso en las dosis de 1.75 y 3.5 mg/kg, las esternibras rudimentarias se encontraron en los 3 grupos tratados aumentando conforme a la dosis aplicada, las esternibras bifurcadas sólo se encontraron en la dosis de 3.5 y 7 mg/kg, las esternibras con grieta/doble-apariencia se vieron en la dosis de 7 mg/kg el porcentaje fue elevado (36.4%), mientras que el segmento extra fue visto en las dosis de 3.5 y 7 mg/kg, en 2 casos, y la ausencia de esternibras fue mayor en la dosis de 3.5 mg/kg. El cráneo aplastado sólo fue anormal en fetos del grupo tratado con la dosis más alta. Hubo vértebras desplazadas sólo en la dosis de 3.5 mg/kg, las costillas cortas fueron vistas en las dosis de

3.5 mg/kg y con mayor frecuencia en la dosis de 7 mg/kg, las costillas extra se encontraron en la dosis de 3.5 mg/kg, costillas corta/extra fueron más frecuentes en la dosis de 7 mg/kg y costillas ausentes sólo en las dosis de 3.5 mg/kg (58).

Tabla 43. Malformaciones esqueléticas en fetos de ratones hembra CD-1 tratadas con diferentes concentraciones de Casiopeína® III-ia durante los días 6 a 15 de gestación (58).

Observación	Dosis diarias (mg/kg)			
	Testigo (-)	1.75	3.5	7.0
No. de fetos examinados por camada	82/6	135/10	110/8	74/10
No. fetos con osificación tardía				
Cráneo	-	-	-	41/74
Extremidades delanteras				
Falanges proximales	-	-	11/110	-
Extremidades traseras				
Falanges proximales	-	-	6/110	-
No. fetos con ausencia				
Extremidades delanteras				
Falanges distales	-	-	-	30/74
Falanges proximales	-	-	-	30/74
Extremidades traseras				
Falanges distales	-	-	-	41/76
Falanges proximales	-	-	-	41/76
Anormalidades esqueléticas				
No. fetos con anormalidades (%)				
Esternebras				
Asimétricas	18.3	38.5	39	39.2
Forma de pesa	-	-	31	23
Asimétricas/forma de pesa	-	-	-	8.1
Desplazadas	-	0.74	0.9	-
Rudimentarias	-	1.5	5.5	16.2
Bifurcada	-	-	8.2	10.8
Grieta/doble apariencia	-	-	-	36.4
Segmento extra	-	-	2	2.7
Ausencia	-	-	21	13.5
Cráneo				
Aplastado	-	-	-	2.7
Vértebras				
Desplazadas	-	-	3.6	-
Costillas				
Corta	-	-	3.6	9.5
Extra	-	-	2.7	-
Corta/extra	-	-	2.7	9.5
Ausencia	-	-	9	-

Como resultado de la investigación podemos decir que la Casiopeína® III-ia mostró inducir toxicidad materna, debido a que en las hembras preñadas tratadas con la dosis de 7mg/kg durante los días 6

a 15 de gestación hubo una pérdida de peso en la hembra y se adelantó el parto en el 50% de ellas. La administración de Casiopeína® III-ia fue tanto embriotóxica como fetotóxica dado que hubo tanto reabsorciones tempranas como tardías y hubo una disminución del peso en los fetos. Finalmente se puede decir que la Casiopeína® mostró alterar el desarrollo esquelético normal de los fetos. La relación dosis-respuesta es totalmente evidente, conforme se aumentó la dosis de Casiopeína® III-ia se incrementaron los efectos tanto en la madre, embriones así como en los fetos (58).

4.5.3 Toxicología reproductiva inducida por Casiopeína® III-ia en ratones macho de la cepa CD-1.

La aplicación de Casiopeína® III-ia a ratones macho de la cepa CD-1 durante 60 días, tuvo efecto en el peso corporal al finalizar el tratamiento. En todos los grupos tratados el incremento de peso fue menor que en el grupo testigo negativo. Por otro lado, en la dosis mayor de Casiopeína® III-ia hubo pérdida de ratones al finalizar el tratamiento (Tabla 44).

Tabla 44. Ratones machos tratados con Casiopeína® III-ia durante 60 días según dosis aplicada y peso corporal.

Ratones y peso	Dosis aplicadas (mg/kg)			
	0	1.75	3.5	4.8
Número de machos al inicio	10	10	9	10
Número de machos al final	10	10	9	5
Peso inicial (g)	35	41	41	35
Peso final (g)	44	46	43	39
Ganancia de peso (g)	9	5	2	4

Se evaluó la movilidad y cantidad de los espermatozoides, revisando una laminilla por cada animal de cada dosis y encontramos que conforme aumenta la dosis disminuyen ambas características considerablemente. Los resultados se muestran en la **Tabla 45**.

Tabla 45. Cantidad y concentración de espermatozoides según dosis y movilidad. *P< 0.05 Vs. Testigo; **P<0.01 Vs. testigo, con prueba de t de Student.

Dosis mg/kg	Movilidad	Concentración espermática
0	480 ± 208	348 ± 56.8
1.75	270.3 ± 295.5	256.5 ± 139.3
3.5	64 ± 68.8*	198.8 ± 66.9*
4.8	0	113 ± 49.8**

La incidencia y tipo de anomalías espermáticas en ratones macho después del tratamiento se muestra en la **Tabla 46**. Se evaluaron cuatro ratones macho por grupo y se examinaron mil espermatozoides por ratón. En los tres grupos tratados se encontró un incremento en el número de espermatozoides anormales. Se observó una diferencia significativa en la concentración de 3.5mg/kg y 4.8 mg/kg. Los espermatozoides sin gancho y doblados en sí mismo mantuvieron el mismo comportamiento, con cabeza de banana, amorfos y dos cabezas fueron más frecuentes en la dosis más alta.

Tabla 46. Porcentaje de espermatozoides según dosis y presencia e incidencia de anomalías. *P< 0.05 Vs. testigo; **P<0.01 Vs. testigo, con prueba de t de Student.

Parámetros evaluados	Dosis (mg/kg)			
	0	1.75	3.5	4.8
n (tamaño de la muestra)	4	4	4	4
Normal (%)	89.77	90.83	88.85	82.98
Tipo de anomalías (%)				
Espermas anormales(x ± d.e.)	12.8 ± 6.88	15.15 ± 8.77	14.36 ± 18.7*	18.29 ± 17.18**
Sin gancho	1.9	3.05	0.43	2.72
Cabeza de banana	3.5	0.36	1.43	4.28
Amorfo	3.7	2.4	8.20	8.37
Doblado en sí mismo	0.88	3.2	1.08	1.53
Dos cabezas	-	-	-	0.046

En la **Tabla 47** podemos observar que el comportamiento de la Casiopeína® III-ia no tuvo efecto en la reproducción materna y fetal, para las ratonas hembra preñadas por estos machos. En algunos aspectos evaluados existen diferencias marcadas en cuanto a la dosis testigo (-), en la dosis de 1.75 mg/kg el número de reabsorciones fue mayor donde las camadas con este factor representan el

50%, para la dosis de 3.5 mg/kg, el porcentaje de fetos vivos fue de 85% las camadas con reabsorciones fueron 3 de 4 y el peso de los fetos disminuyó siendo éste el más bajo con respecto a las otras dosis. En el grupo de 4.8 mg/kg observamos que la proporción de fetos hembra fue totalmente mayor respecto a los machos. En tres de los cuatro grupos (Testigo (-), 1.75 mg/kg y 4.8 mg/kg) hubo un parto adelantado.

En la **Tabla 48** se muestran las malformaciones esqueléticas examinadas de los fetos de ratonas preñadas por machos tratados con Casiopeína® III-ia, éstas corresponden a un efecto dosis-respuesta. La osificación tardía en la dosis de 4.8 mg/kg afectó al 100% de los fetos. En la dosis de 1.75 mg/kg hubo un 94% de fetos afectados, sin embargo presentan un mayor tipo y número de malformaciones esqueléticas. En el caso de falanges distales y proximales (extremidades delanteras) y falanges distales, medias y proximales (extremidades traseras) son mayores las osificaciones tardías. De igual manera la presencia de esternones en forma de pesa, asimétricas/forma de pesa y desplazadas; así como la ausencia de vértebras y costillas fue mayor en la dosis de 1.75 mg/kg con respecto a los otros tratamientos.

Tabla 47. Efectos materno fetales en las ratonas hembra preñadas por machos tratados con Casiopeína® III-ia durante 60 días (cada tercer día). *P<0.05 Vs. testigo; **P<0.01 Vs. testigo, con prueba de t de Student.

Dosis en los días 6-15 de gestación (mg/kg)				
	0	1.75	3.5	4.8
Total de hembras	20	20	20	10
Hembras preñadas	11	10	4	2
No. Hembras con fetos vivos	11	10	4	2
No. de implantaciones	146	138	66	28
Implantes / camada	13.3±1.9	13.8±3.9	16.5±2.6	14±1.41
Total de fetos vivos (♀ / ♂)	77 / 51	56 / 70	31 / 25	14 / 1
Fetos vivos / camada (%)	97	91	85	100
No. de reabsorciones	5	12	9	-
Camada con reabsorciones (%)	4/11 (36)	5/10 (50)	3 / 4 (75)	-
Reabsorciones tempranas / camada	4	12	9	-
Reabsorciones tardías / camada	1	-	-	-
Parto adelantado	1	1	-	1
Peso / camada (g)	15.3±4.8	12.8±4.4	14.7±3.8	17
Peso / feto (g)	1.43±0.4	1.07±0.3	1.02±0.1*	1.13

Tabla 48. Malformaciones esqueléticas en fetos de ratón aplicando Casiopeína® III-ia durante 60 días (cada tercer día) a ratones macho. (El porcentaje se muestra entre paréntesis).

Observación	Dosis diarias (mg / kg)			
	Testigo (-)	1.75	3.5	4.8
No. de fetos examinados por camada	92 / 11 30/92	85/10 80/85	37/4 37/37	10/1 10/10
No. fetos con osificación tardía	11 / 92 (12)	47/85 (52)	31/37 (84)	10/10 (100)
Cráneo				
Extremidades delanteras	26/92 (28)	66/85 (78)	20/37 (54)	-
Falanges distales	44/92 (48)	79/85 (93)	35/37 (95)	10/10 (100)
Falanges medias	29/92 (32)	39/85 (46)	8/37 (22)	6/10 (60)
Falanges proximales	18/92 (20)	13/85 (15)	24/37 (65)	3/10 (30)
Metacarpos				
Extremidades traseras	16/92 (17)	53/85 (62)	12/37 (32)	-
Falanges distales	46/92 (50)	80/85 (94)	34/37 (92)	9/10 (90)
Falanges medias	26/92 (28)	50/85 (59)	14/37 (38)	4/10 (40)
Falanges proximales	11/92 (12)	10/85 (12)	14/37 (38)	2/10 (20)
Metatarsos				
Anormalidades esqueléticas				
No. fetos con anomalías (%)				
Esternobras				
Asimétricas	24/92 (26)	40/85 (47)	21/37 (57)	8/10 (80)
Forma de pesa	19/92 (21)	57/85 (67)	15/37 (41)	5/10 (50)
Asimétricas / forma de pesa	-	26/85 (31)	1/37 (3)	2/10 (20)
Desplazadas	-	1/85 (1)	-	-
Rudimentarias	18/92 (20)	44/85 (52)	23/37 (62)	7/10 (70)
Bifurcada	20/92 (22)	53/85 (62)	33/37 (89)	8/10 (80)
Grieta / doble apariencia	7/92 (8)	12/85 (14)	3/37 (8)	2/10 (20)
Ausencia	15/92 (16)	11/85 (13)	1/37 (3)	-
Cráneo				
Aplastado	35/92 (38)	27/85 (32)	25/37 (68)	-
Vértebras				
Ausentes	-	9/85 (11)	-	-
Costillas				
Corta	11/92 (12)	12/85 (14)	4/37 (11)	2/10 (20)
Extra	11/92 (12)	7/85 (8)	1/37 (3)	2/10 (20)
Ausencia	-	5/85 (6)	-	-

A partir de los resultados obtenidos concluimos que: la Casiopeína® III-ia mostró ser reprotóxica ya que indujo una disminución tanto en la cantidad como en la motilidad de los espermatozoides después del tratamiento, ocasionado por un posible daño en las mitocondrias espermáticas, las cuales desempeñan una función importante encargándose del control de los movimientos en la cola. Alteró el desarrollo normal de la espermatogénesis por lo que hubo anomalías espermáticas. El hecho de que en los grupos de machos tratados durante 60 días el número de hembras preñadas disminuyera, indica que esta Casiopeína® induce infertilidad. El proceso de implantación no se vio afectado dado que no hubo diferencia alguna entre el grupo de hembras preñadas con machos testigo y los grupos de hembras cruzadas con machos tratados. Además mostró inducir

malformaciones esqueléticas en la descendencia de los machos tratados, lo que probablemente nos indica que hubo un desequilibrio en el sistema endocrino a nivel de la glándula tiroidea y las glándulas paratiroides las cuales se encargan del desarrollo de los huesos. El hecho de observar un incremento en la frecuencia de reabsorciones tempranas y tardías en mayor número en la dosis más baja permite concluir que la Casiopeína® III-ia está induciendo mutaciones dominantes. Los efectos de la Casiopeína III-ia mostraron una relación dosis-respuesta en los parámetros evaluados **(59)**.

4.6 Genotoxicidad

Dentro de las pruebas preclínicas que son solicitadas para probar la actividad antitumoral de un nuevo compuesto se encuentran las de genotoxicidad.

A las sustancias que pueden provocar algún tipo de modificación en la información genética se las denomina genotóxicas. Las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN o actuar indirectamente mediante la afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN y causando, en consecuencia, mutaciones que pueden o no desembocar en un cáncer. Las sustancias genotóxicas no son necesariamente cancerígenas, pero la mayor parte de los cancerígenos son genotóxicos **(60)**.

La genotoxicidad puede ocurrir por interacción directa Casiopeína®/ADN, mediante intercalación y daño oxidativo ulterior.

4.6.1 Estudio de los efectos genotóxicos, citostáticos y citotóxicos de la Casiopeína® III-ia, Ilgly y Igly en médula ósea y sangre periférica de ratón.

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad citostática, citotóxica y genotóxica de las Casiopeínas® Igly, Ilgly y III-ia empleando linfocitos humanos en cultivo, médula ósea y sangre periférica de ratón, a fin de determinar si el sistema ADME produce diferencias en dichas capacidades **(60)**.

Tratamientos

❖ *In Vivo*

Tabla 49. Tratamientos utilizados en los experimentos *In Vivo*.

		Testigo Negativo	Testigo Positivo (Cisplatino)	Casiopeína® I gly	Casiopeína® II gly	Casiopeína® III-ia
Dosis	mg/kg	-----	1.78	7.5 3.5 1.875 0.93 0.46 0.2 0.05	4.42 2.21 1.05	12.34 6.17 3.085
	mmol/kg	-----	5.97*10-3	1.30 x 10-5 6.60 x 10-6 3.30 x 10-6 1.65 x 10-6 8.25 x 10-7 4.12 x 10-7 1.03 x 10-7	9.95 x 10-6 4.90 x 10-6 2.48 x 10-6	2.77 x 10-5 1.38 x 10-5 6.93 x 10-6
Tejido utilizado		M.O. y S	M.O. y S	M.O. y S	M.O. y S	M.O. y S

M.O. = médula ósea

S= Sangre

❖ *In Vitro*

Tabla 50. Tratamientos utilizados en los experimentos *In Vitro*.

		Testigo Negativo	Testigo Positivo (Cisplatino)	Casiopeína® I gly	Casiopeína® II gly	Casiopeína® III-ia
Dosis	µg/ml	-----	0.1	0.47	0.33	16.84
	mmol/ml	-----	3.4x10-7	8.27x10-7	7.43x10-7	3.78x10-5
Tejido utilizado		SPH	SPH	SPH	SPH	SPH

SPH = Sangre Periférica Humana

Posterior al análisis estadístico de los parámetros leídos al microscopio, se observa que los Tiempos Generacionales Promedio (TGP) de los tratamientos no presenta diferencia significativa comparados con el testigo negativo, observándose un tiempo de proliferación de 13.8 h (Testigo negativo), 14.78 h (Testigo positivo), 12.44 h ($\frac{1}{4}$ DL₅₀) y 12.94 h ($\frac{1}{8}$ DL₅₀).

En resumen se puede decir que los resultados obtenidos en los experimentos *In Vitro* demuestran que ninguna de las tres Casiopeínas® probadas causa una disminución estadísticamente significativa en el índice mitótico en comparación con el testigo negativo, por lo que se puede decir que los linfocitos humanos en cultivo no son sensibles a la Casiopeína® expuestos a una concentración igual a la DL₅₀ de la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa), observando este dato y el hecho de que las Casiopeínas® a esa misma concentración no son citotóxicas es un dato de la baja toxicidad del compuesto para las células sanas, lo cual es una de las características importantes para el registro y desarrollo de un nuevo fármaco anticancerígeno, ya que será más seguro en su manejo y administración que el cisplatino, tanto para los pacientes como para las personas que lo manejarán (60).

En resumen las Casiopeínas® en un sistema *In Vitro* como lo son los linfocitos humanos de sangre periférica, tienen una actividad citostática, siendo en orden decreciente la Casiopeína® Ilgly >Casiopeína® Igly = Casiopeína® III-ia. Sin embargo la capacidad citotóxica no fue significativa. Siendo la Casiopeína® Ilgly la única en la que se pudo evaluar la actividad genotóxica, ya que las dosis empleadas de las otras dos Casiopeínas® fueron demasiado citotóxicas o citostáticas (60).

4.6.2 Estudio comparativo del daño genotóxico inducido por el cisplatino y por la Casiopeína® III-ia en ratones machos, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1.

Se emplearon ratones hembras y machos adultos de la cepa CD-1 de 2 a 3 meses de edad, con un peso corporal ente 25-32 g. Se analizó la frecuencia de EPC, mediante la identificación de 2000 eritrocitos, distinguiendo los normocromáticos (ENC), de los EPC, con la intención de darnos una idea de la citotoxicidad. El daño genotóxico se estableció mediante la evaluación de 2000 EPC, de los cuales se identificó la presencia o ausencia de MN, esto por laminilla, se calculó la inducción de la frecuencia neta (NIF) y la diferencia de la inducción de la frecuencia (DIF). Los resultados fueron analizados estadísticamente con una ANOVA, mientras que el NIF y el DIF con la prueba F exacta de Fisher, para lo cual se empleó el paquete estadístico SPSS/PC (versión 10). El nivel de significancia usado en todos los casos fue de $p < 0.05$ (61,62).

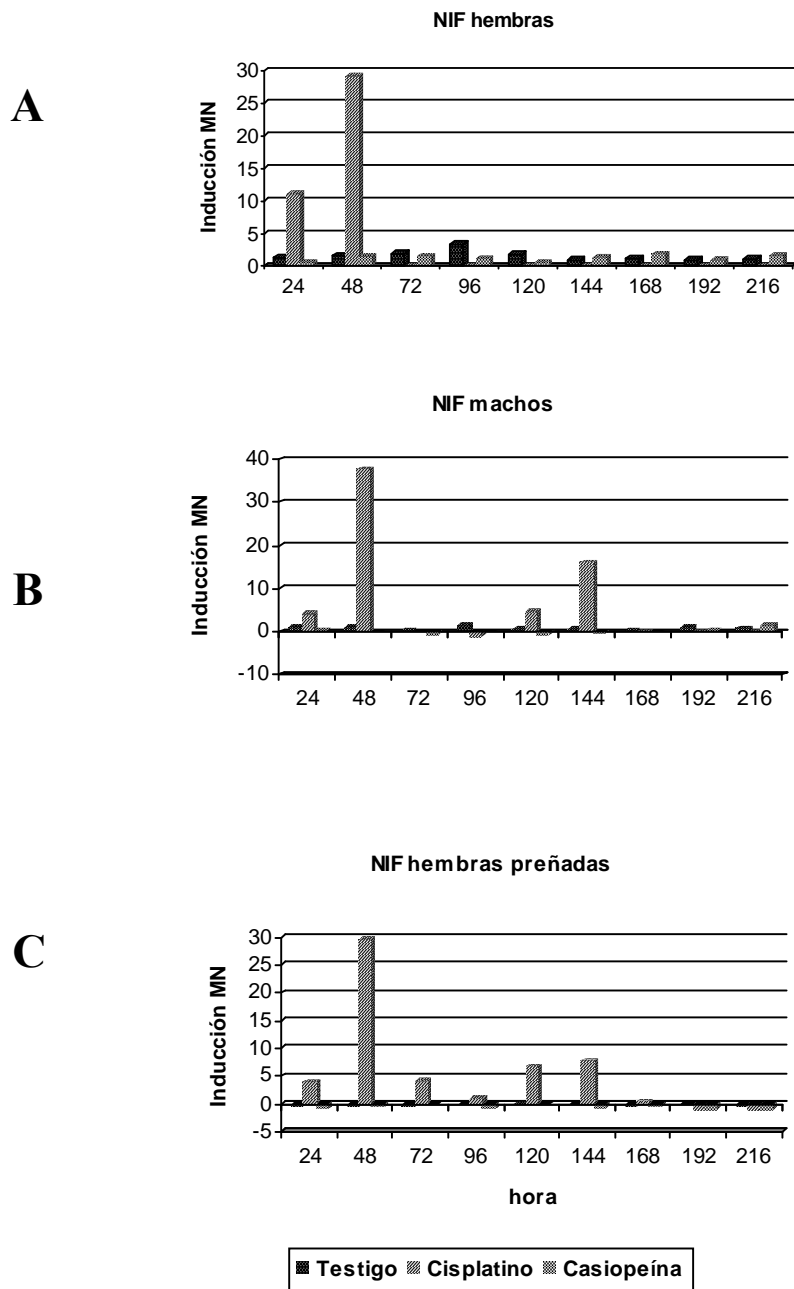


Figura 53. Resultados de la frecuencia de la inducción neta (NIF) de MN en (A) hembras, (B) machos y (C) hembras preñadas con el tratamiento subcrónico (61,62).

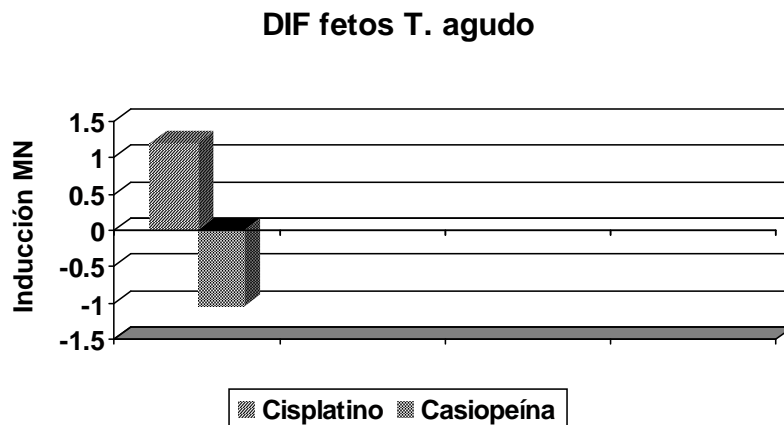


Figura 54. Resultados de la diferencia de la inducción de la frecuencia (DIF) de MN en fetos con tratamiento agudo (61,62).

En los tratamientos agudo y subcrónico con cisplatino se observa la mayor inducción de MN a las 48 horas, así como un descenso estadísticamente significativo en la frecuencia de EPC tanto en machos, hembras y hembras preñadas en los dos tratamientos (figura 53 y 55). También se observa que el cisplatino tiene un efecto genotóxico en los fetos del tratamiento agudo (figura 54). Tanto el cisplatino como la Casiopeína® poseen un efecto fetoletal en el tratamiento subcrónico, así mismo en el grupo de Casiopeína® se observó que el parto se adelanta (61,62).

Por otro lado en los tratamientos agudo y subcrónico con Casiopeína® no se observa ningún cambio en la inducción de MN, tanto en machos, hembras, hembras preñadas (figura 53 y 55) y fetos (figura 54). En la frecuencia de EPC se observó un aumento significativo desde la hora 120 hasta el final del tratamiento subcrónico en machos (61,62).

Es probable que no se registre daño genotóxico en los ratones tratados con Casiopeína® debido a que la dosis es muy baja, esto basado en que se ha modificado la DL₅₀ de la Casiopeína® III-ia. Por lo que es necesario realizar nuevas pruebas con las nuevas dosis (61,62).

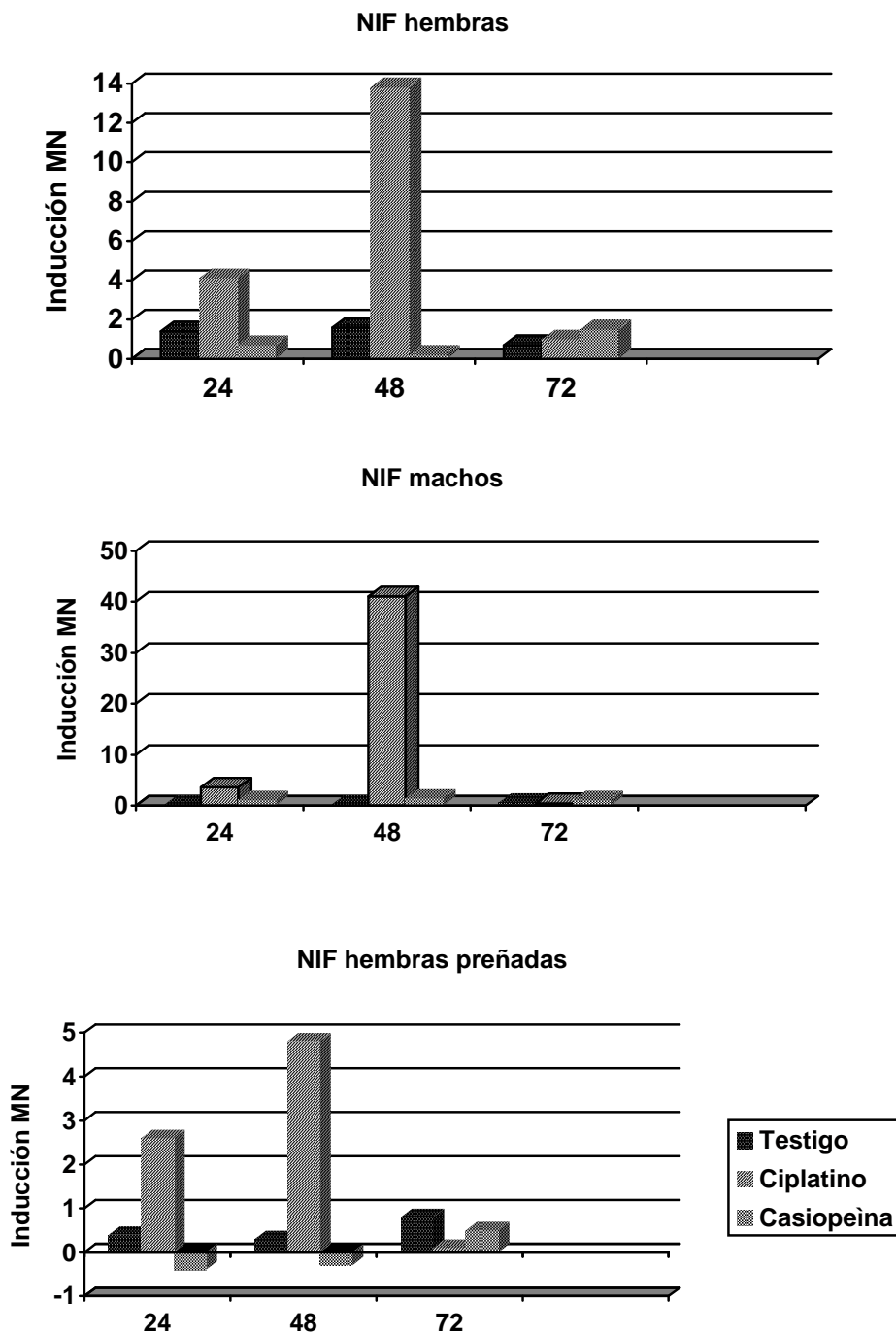


Figura 55. Resultados de la frecuencia de la inducción neta (NIF) de MN en (A) hembras, (B) machos y (C) hembras preñadas con tratamiento agudo (61,62).

La Casiopeína® III-ia no presenta inducción de MN en dosis de 7 mg/kg en ratones machos, hembras preñadas y sin preñar y fetos en ninguno de los tratamientos, a diferencia de el cisplatino que en dosis de 8 mg/kg en ratones machos y hembras, y en dosis de 4 mg/kg en hembras preñadas y

fetos, ya que tanto en el tratamiento agudo como subcrónico presenta una inducción de MN estadísticamente significativa con respecto a la Casiopeína®. La Casiopeína® y el cisplatino poseen un efecto feto letal en el tratamiento subcrónico, en el caso del grupo de Casiopeína® se observó que se adelanta el parto, por lo que no se pudo evaluar el daño genotóxico en los fetos **(61,62)**.

Capítulo V. Farmacocinética

La farmacocinética nos da un enfoque cuantitativo del comportamiento de los fármacos en el organismo, abarcando los mecanismos por los cuales éste último influye en la concentración de éstos, sea introduciéndolos y distribuyéndolos por el sistema (absorción y distribución), modificándolos (metabolismo, biotransformación) o desechándolos (excreción). Incluye lo que el organismo le hace a la droga. En general, los fármacos no son capaces de crear funciones en el organismo, sino que modulan las ya existentes.

Tabla 51. Parámetros farmacocinéticos en Rata para la Casiopeína® Igly (63).

Parámetro farmacocinético	Igly (8 mg/kg, i.v.)
Área bajo la curva (ABC)	1988.093 $\mu\text{g mL}^{-1}\text{min}^{-1}$
Vida media beta	228.148 min (3.80 h)
Cl (depuración)	1.114 mL/min
Volumen de distribución (Vss)	0.065 L
Ke	0.003 min^{-1}

Tabla 52. Parámetros farmacocinéticos en tres especies para la Casiopeína® III-ia (63).

Parámetro farmacocinética	Rata	Perro	Conejo
Dosis	9.0 mg/Kg	3.0 mg/ Kg	9.0 mg/ Kg
Depuración Cl	0.45 mL/min	-	1.46 mL/min
Volumen de distribución	0.462 L	-	0.0167 L
Tiempo medio de residencia TMR	17.14 h	2 semanas	86 min
Vida media de eliminación	12.46 h	-	57 min

Capítulo VI. Estabilidad.

La propiedad de un medicamento contenido en un envase de determinado material, para mantener durante el tiempo de almacenamiento y uso las características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas entre los límites especificados. *NOM-073-SSA1-1993*.

La calidad de los medicamentos es determinada por el contenido de las sustancias activas, su pureza (limitación o ausencia de productos de descomposición) y sus propiedades organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas.

El estudio de la estabilidad nos ayuda a determinar como la calidad de los medicamentos varía en función del tiempo bajo la influencia de una variedad de factores ambientales.

El propósito de estos estudios es establecer recomendaciones, las cuales garanticen el mantener la calidad de los medicamentos en relación a su seguridad, eficacia, y aceptabilidad durante la vida útil propuesta (durante su almacenaje, distribución, dispensación y uso).

Objetivos

- 1) Evaluar la estabilidad de los nuevos fármacos antineoplásicos (Casiopeína[®] Ilgly y Casiopeína[®] III-ia), como lo indica la NOM-073-SSA1-1993, para la Estabilidad de Medicamentos.
- 2) Validación del método analítico utilizado como indicativo de estabilidad y encontrar la metodología más eficaz con la cual podamos cuantificar la estabilidad de las Casiopeínas[®] en caso específico por la metodología de UV-Vis.
- 3) Teniendo los resultados de estabilidad para las Casiopeínas[®] de los lotes del 2006 a 40°C y 75% de HR, podremos predecir caducidad y tiempo de vida en el anaquel.
- 4) Con los datos aportados por lotes se podrá realizar las estadísticas para predecir su cinética química para las Casiopeínas[®] y predecir o establecer un periodo de caducidad apropiado.

Fármacos Nuevos

Tiempo de estudio: 180 días

Condiciones de almacenamiento: 40°C y 75% HR para formas farmacéuticas sólidas.

Tamaño de muestra: 0.4439mg de Casiopeína® Ilgly y 0.4449mg Casiopeína® III-ia.

Nota: las muestras se trabajaran por duplicado de acuerdo con lo establecido en la NOM-073-SSA1-1993.

Para los lotes de Casiopeína® Ilgly y Casiopeína® III-ia. La cantidad de muestra será de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 53. Diseño experimental para toma de muestras.

CASIOPEÍNA® Ilgly	CASIOPEÍNA® III-ia
A 0.4439 mg y *A 0.4439 mg	A 0.4449 mg y *A 0.4449 mg
B 0.4439 mg y *B 0.4439 mg	B 0.4449 mg y *B 0.4449 mg
C 0.4439 mg y *C 0.4439 mg	C 0.4449 mg y *C 0.4449 mg
D 0.4439 mg y *D 0.4439 mg	D 0.4449 mg y *D 0.4449 mg
T cero 0.4439 mg y *Tcero	T cero 0.4449 mg y *Tcero

Nota: *es la muestra por duplicado.

Tabla 54. Calendario de trabajo.

ESTUDIO A:	FECHA DE SALIDA DE LA CÁMARA CLIMÁTICA
Tiempo cero o de inicio	02 de junio del 2006
A 30 días	03 de julio del 2006
B 60 días	01 de agosto del 2006
C 90 días	30 de agosto del 2006
D 180 días	28 de noviembre del 2006

Estudio de Estabilidad Acelerada

1. Se colocó de 15 a 20 mg de muestra en viales con tapa de rosca y se colocan en la cámara climática a 40°C ± 2°C/ 75% RH ± 6% con un total de 8 muestras.
2. Se analizaron 2 muestras por cada tiempo indicado en la norma (NOM-073-SSA1-1993).
3. Se preparó una curva de calibración de acuerdo a lo reportado en el control farmacéutico, el día de análisis de la muestra de estabilidad por HPLC.

4. Se aplicó el método descrito en la tesis de licenciatura de Fernando Rosas Martínez. (Título: Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica Casiopeína® III-ia y Casiopeína® Igly. Año 2004).

La curva de calibración cumple con la linealidad para Casiopeína® III-ia con un $R^2= 0.9994$ y para la Casiopeína® Igly con un $R^2 = 0.9977$ (Tabla 55).

Tabla 55. Datos de la curva de calibración.

DÍA	% DE PUREZA	
	III-ia	Igly
0	100	100
30	74.84	90.00
60	70.38	68.37

Como se observó la pureza de los compuestos va disminuyendo a los 30 días. Estos datos servirán para estudios de formulación (64-65).

Capítulo VII. Correlaciones Estructura-Actividad

7.1 Actividad antiproliferativa y estudio QSAR de complejos de coordinación de cobre (Casiopéinas®) empleando varias líneas tumorales humanas.

Esta familia abarca un grupo muy amplio de compuestos de coordinación con variantes estructurales que les proporcionan diferentes características fisicoquímicas y por tanto diferentes grados de actividad biológica. Los estudios QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) permiten predecir que moléculas serán las más prometedoras a través de la evaluación biológica de un número estadísticamente representativo de compuestos seleccionados adecuadamente y de la determinación de algunos parámetros que permitan definir sus propiedades fisicoquímicas. Por otra parte, con base en la descripción de la actividad biológica en términos fisicoquímicos es posible rediseñar racionalmente análogos de estas moléculas optimizando así sus propiedades biológicas **(67)**.

En el presente trabajo se sintetizaron complejos de cobre del tipo $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$ con diferentes sustituyentes en el ligante diimina con el objetivo de evaluar la actividad antineoplásica *In Vitro* en diferentes líneas tumorales humanas y la DL_{50} *In Vivo* para correlacionarlas con propiedades fisicoquímicas experimentales y teóricas que permitan encontrar relaciones estructura-actividad **(67)**.

Se encontró que la actividad biológica varía de forma similar en todas las líneas tumorales siguiendo la misma tendencia, siendo los parámetros electrónicos y estéricos los más importantes en la modulación de la actividad. A continuación se muestran los compuestos hasta la fecha sintetizados, su caracterización química (**Tabla 56**) y las evaluaciones biológicas (**Tabla 57**) **(67)**.

Tabla 56. Caracterización química (67).

No	X	Secondary ligand	Color	UV absorptions ^a λ_{max} (nm); ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	E. A. ^b (%N; %C; %H)	Formula ^c	FW (g/mol)	μ_{eff} (BM) ^d	Cond. (μ S) ^e
<i>Bipyridine group (Fig. 1A)</i>									
1	H	Acac	Blue	Aq. 197; 48267.8 297; 29823.6 Oct. 205; 34063.7 300; 24661.6	10.32; 43.13; 4.42 (10.08; 43.22; 4.59)	CuC ₁₅ N ₃ O ₅ H ₁₅ ·2H ₂ O	416.54	1.74	46.90
2	4,4' diMe	Acac	Blue	Aq. 206; 54778.7 295; 28098.5 Oct. 210; 57396.4 298; 31608.3	9.97; 47.48; 5.07 (9.84; 47.83; 4.96)	CuC ₁₇ N ₃ O ₅ H ₁₉ ·H ₂ O	426.92	1.80	40.23
<i>Phenanthroline group (Fig. 1B)</i>									
3	H	Acac	Blue	Aq. 206; 43809.8 272; 32160.6 Oct. 212; 40813.5 274; 31289.8	9.23; 45.93; 4.17 (9.53; 46.31; 4.34)	CuC ₁₇ N ₃ O ₅ H ₁₅ ·2H ₂ O	440.90	1.88	38.57
4	4 Me	Acac	Indigo	Aq. 205; 56843.5 272; 40498.6 Oct. 207; 50981.0 274; 39929.2	10.24; 51.16; 4.16 (10.03; 51.61; 4.09)	CuC ₁₈ N ₃ O ₅ H ₁₇	418.90	1.94	39.51
5	5 Me	Acac	Blue	Aq. 206; 56384.8 277; 45652.8 Oct. 209; 58384.8 279; 45458.4	9.15; 47.66; 4.92 (9.24; 47.52; 4.65)	CuC ₁₈ N ₃ O ₅ H ₁₇ ·2H ₂ O	454.91	1.89	40.10
6	4,7 diMe	Acac	Blue	Aq. 208; 50526.4 273; 44271.3 Oct. 209; 60257.6 274; 47796.5	9.30; 50.23; 4.55 (9.32; 50.61; 4.69)	CuC ₁₉ N ₃ O ₅ H ₁₉ ·H ₂ O	450.94	1.80	38.48
7	5,6 diMe	Acac	Indigo	Aq. 207; 41402.0 282; 36119.5 Oct. 210; 35629.8 283; 30968.9	9.03; 48.82; 4.93 (8.96; 48.66; 4.94)	CuC ₁₉ N ₃ O ₅ H ₁₉ ·2H ₂ O	468.95	1.82	38.90
8	3,4,7,8 tetraMe	Acac	Indigo	Aq. 211; 59953.9 278; 41915.3 Oct. 213; 55153.2 280; 47719.2	8.95; 52.79; 5.41 (8.77; 52.66; 5.26)	CuC ₂₁ N ₃ O ₅ H ₂₃ ·H ₂ O	478.99	1.78	37.32
9	5 phenyl	Acac	Blue	Aq. 204; 63658.9 281; 42576.6 Oct. 208; 58558.2 285; 41604.0	8.46; 57.47; 4.00 (8.74; 57.44; 3.98)	CuC ₂₃ N ₃ O ₅ H ₁₉	480.97	1.81	36.77
10	4,7 diphenyl	Acac	Blue	Aq. 205; 55653.2 286; 57409.8 Oct. 205; 61186.7 289; 55730.1	7.22; 60.43; 4.22 (7.31; 60.57; 4.38)	CuC ₂₉ N ₃ O ₅ H ₂₃ ·H ₂ O	575.06	1.87	36.00
11	5 Cl	Acac	Indigo	Aq. 207; 54385.8 276; 42513.3 Oct. 210; 53849.5 278; 44643.3	9.41; 44.46; 3.49 (9.19; 44.65; 3.53)	CuC ₁₇ N ₃ O ₅ H ₁₄ Cl·H ₂ O	457.31	1.83	39.74
12	5 NO ₂	Acac	Dark green	Aq. 201; 57918.9 280; 33187.6 Oct. 206; 49124.1 279; 32221.5	12.62; 44.95; 3.25 (12.45; 45.39; 3.14)	CuC ₁₇ N ₃ O ₇ H ₁₄	449.87	1.82	34.80
13	H	Gly	Blue		14.52; 44.11; 3.12 (14.75; 44.27; 3.18)	CuC ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₅ ·H ₂ O	406.4	1.8	34.1
14	4 Me	Gly	Blue		13.53; 43.37; 3.68 (13.60; 43.74; 3.88)	CuC ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₅ ·H ₂ O	411.5	1.8	40.5
15	5 Me	Gly	Blue		13.57; 43.47; 3.75 (13.60; 43.74; 3.88)	CuC ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₅ ·H ₂ O	411.5	1.85	35.9
16	4,7 diMe	Gly	Blue		12.61; 43.53; 4.70 (12.62; 43.29; 4.54)	CuC ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₅ ·2H ₂ O	443.9	1.76	38.8
17	5,6 diMe	Gly	Blue		13.78; 47.37; 4.15 (13.73; 47.11; 3.95)	CuC ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₅ ·H ₂ O	425.9	1.71	35.3
18	3,4,7,8 tetraMe	Gly	Blue		12.76; 47.27; 4.95 (12.34; 47.63; 4.88)	CuC ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₅	435.9	1.78	35.0
19	4,7 diphenyl	Gly	Blue		10.01; 55.81; 4.11 (10.01; 55.81; 4.11)	CuC ₂₆ H ₂₀ N ₄ O ₅ ·1.5H ₂ O	559.0	1.85	37.6
20	5 Cl	Gly	Blue		13.05; 38.63; 3.05 (12.96; 38.88; 3.00)	CuC ₁₄ H ₁₁ N ₄ O ₅ Cl·H ₂ O	432.0	1.76	41.0
21	5 NO ₂	Gly	Blue		15.54; 37.48; 3.01 (15.81; 37.96; 2.93)	CuC ₁₄ H ₁₁ N ₅ O ₇ ·H ₂ O	442.5	1.71	36.6

- Absorciones UV en solución acuosa a pH 7.40 ± 0.02, 298 K (Aq.) y octanol (Oct.) a 298 K
- E. A. Análisis Elemental experimental (datos calculados).
- Fórmula por ion metálico.
- Momento magnético efectivo.
- Conductividad 1mM en solución etanólica a 298 K.

Tabla 57. Evaluaciones biológicas y datos fisicoquímicos (67).

No	Log D ^a	E _{1/2} ^b	pKa ^c (ref.)	LD50 ^d	IC50 ^e			
					HeLa	SiHa	MCF 7	HCT 15
1	-1.38 ± 0.03	-318 ± 4	4.42 (1)	71.73 ± 6.53	42 ± 3.1	40.5 ± 2.0	103.7 ± 9.6	67.3 ± 1.6
2	-0.95 ± -0.95	-338 ± 3	5.34 (2)	51.43 ± 2.39	18.2 ± 2.7	14.5 ± 1.5	15.9 ± 1.8	40.5 ± 4.6
3	-1.18 ± 0.00	-271 ± 1	4.93 (1)	29.18 ± 1.63	10.7 ± 0.9	6.8 ± 0.9	8.1 ± 0.5	7.3 ± 0.7
4	-1.18 ± 0.06	-290 ± 4		28.21 ± 1.38	1.6 ± 0.1	3.4 ± 0.5	5.6 ± 0.7	6.0 ± 0.9
5	-1.06 ± 0.07	-282 ± 2	5.27 (3)	25.76 ± 1.74	6.2 ± 0.7	3.2 ± 0.2	4.4 ± 0.5	2.6 ± 0.4
6	-0.81 ± 0.06	-318 ± 2	5.95 (4)	22.92 ± 1.82	1.4 ± 0.1	0.96 ± 0.09	4.9 ± 0.6	2.1 ± 0.1
7	-0.81 ± 0.02	-298 ± 3	5.60 (4)	26.38 ± 1.39	3.4 ± 0.5	1.7 ± 0.2	3.9 ± 0.4	1.9 ± 0.3
8	-0.49 ± 0.01	-307 ± 1	6.48 (5)	16.23 ± 2.63	1.9 ± 0.2	1.2 ± 0.1	2.2 ± 0.3	1.4 ± 0.2
9	0.06 ± 0.01	-248 ± 4	4.90 (6)	28.38 ± 3.33	3.9 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.9 ± 0.4	2.5 ± 0.3
10	1.06 ± 0.08	-222 ± 1	4.84 (7)	24.93 ± 1.79	4.2 ± 0.6	3.2 ± 0.5	2.2 ± 0.3	3.2 ± 0.4
11	-0.74 ± 0.06	-236 ± 3	4.07 (8)	33.60 ± 1.84	4.5 ± 0.5	8.8 ± 0.6	9.8 ± 0.5	12.9 ± 0.5
12	-0.84 ± 0.04		3.22 (9)	51.65 ± 0.78	21.3 ± 2.6	10.2 ± 1.1	14.7 ± 1.4	35.0 ± 2.4
13		-259 ± 3	4.93 (1)		13.9 ± 1.3	27.3 ± 2.2	9.6 ± 1.1	21.2 ± 2.5
14		-281 ± 7			8.7 ± 0.7	10.2 ± 1.0	7.7 ± 0.6	5.1 ± 0.5
15		-273 ± 7	5.27 (3)		6.2 ± 0.6	5.7 ± 0.6	4.7 ± 0.2	3.7 ± 0.4
16		-310 ± 4	5.95 (4)		5.5 ± 0.7	5.5 ± 0.8	4.6 ± 0.4	2.0 ± 0.2
17		-292 ± 3	5.60 (4)		5.3 ± 0.1	3.1 ± 0.3	4.4 ± 0.3	2.1 ± 0.1
18		-302 ± 5	6.48 (5)		1.8 ± 0.0	1.4 ± 0.2	2.6 ± 0.2	1.8 ± 0.4
19		-214 ± 4	4.84 (7)		5.1 ± 0.2	6.6 ± 0.9	4.1 ± 0.4	7.6 ± 0.7
20		-221 ± 4	4.07 (8)		14.3 ± 0.5	13.9 ± 1.3	23.2 ± 2.3	22.3 ± 1.6
21			3.22 (9)		44.8 ± 1.5	17.9 ± 2.2	28.64 ± 3.4	47.3 ± 6.5
Cispt					5.1 ± 0.4	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.8	21.8 ± 2.4

^aLog D coeficiente de reparto octanol/agua determinado a pH = 7.4 y 25°C,

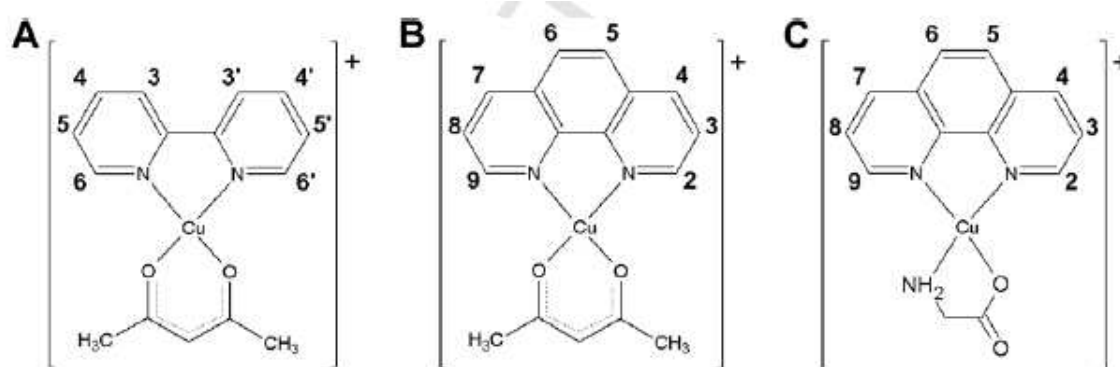
^bPotencial de media onda E_{1/2} a pH 7 en 2/5 (v/v) de etanol/agua, 6.25x10⁻³M búffer BTP, 0.05M KNO₃. E_{1/2} está dado en mV.

^cpKa del ligante N-N (HL/H +L)

^dDL₅₀ (µmol/Kg) en ratones machos ICR,

^eCl₅₀ (µM) HeLa, SiHa, MCF-7, HCT-15

Figura 56. Estructuras de los complejos estudiados. 1A) [Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]⁺ 1B) [Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]⁺ 1C) [Cu(1,10-fenantrolina)(glicinato)]⁺(67).



Una de las variables más importantes que rige el comportamiento biológico de estos compuestos es el parámetro electrónico, para evaluar esto se seleccionó el potencial de media onda (E_{1/2}) como descriptor de esta propiedad. El potencial de media onda (E_{1/2}) fue calculado como la semisuma de los potenciales de pico anódico y pico catódico; los sustituyentes en el ligante diimina afectan los valores de E_{1/2} y la reversibilidad del proceso de transferencia de electrones, sin embargo estos valores no se ven significativamente afectados debido al cambio de ligante secundario

(aminoácidos o donadores O-O). El comportamiento electroquímico del centro metálico de cobre está influenciado predominantemente por el ligante diimina en este tipo de complejos **(67)**.

Debido a que existe la hipótesis de que el mecanismo de acción de este tipo de compuestos en sistemas biológicos está relacionado con la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) a través de la participación del centro metálico en la reacción de Fenton, el $E_{1/2}$ fue empleado como parámetro electrónico para analizar la influencia del ambiente electrónico alrededor del centro metálico en la actividad biológica evaluada como concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) (datos de actividad biológica reportados previamente) **(67)**.

En estudios previos se construyeron ecuaciones QSAR para compuestos del tipo $[Cu(N-N)(acac)]NO_3$ donde N-N representa a 2,2'-bipiridinas o 1,10-fenantrolinas con diferentes sustituyentes para diferentes líneas celulares. En este estudio se concluyó que la presencia del tercer anillo aromático es necesaria para incrementar la actividad biológica en los ensayos de inhibición de la proliferación. Por otra parte, se encontró una tendencia importante a incrementar la actividad biológica mientras el potencial de media onda ($E_{1/2}$) se desplaza hacia valores más negativos, siendo esto una característica asociada a los sustituyentes electro-donadores en el ligante diimina. Debido a esto en este segundo estudio se seleccionaron complejos del tipo $[Cu(N-N)(glicinato)]NO_3$ Y $[Cu(N-N)(acac)]NO_3$ donde N-N es una fenantrolina sustituida con el objetivo de confirmar las tendencias de comportamiento previamente encontradas y estudiar la influencia en el cambio de ligante secundario de donador O-O a donador N-O **(67)**.

Nuevamente la contribución más importante es el valor de $E_{1/2}$, lo cual sugiere la participación del centro metálico en el mecanismo de acción. La actividad biológica se incrementa para aquellos complejos que son oxidantes más débiles, tendencia que coincide con lo encontrado en estudios previos. Por otra parte el cambio en hidrofobicidad en el complejo debido al cambio de ligante secundario influye positivamente la actividad, los complejos que contienen al ligante más hidrofóbico (acetilacetato) en su estructura son ligeramente más activos que los de glicinato. Este comportamiento podría estar relacionado con el transporte de cobre no regulado a través de las membranas el cual se ve facilitado con el cambio de hidrofobicidad. Sin embargo, es necesaria la realización de un estudio más completo con variaciones estructurales mayores en el ligante

secundario para confirmar esta hipótesis. Por otra parte, debido a que la actividad biológica está fuertemente influenciada por las propiedades electrónicas del cobre ($E_{1/2}$) y este valor es muy cercano entre compuestos que comparten el mismo donador N-N, es congruente esperar que no existan fuertes diferencias en la actividad biológica al cambiar el ligante secundario.

Se obtuvieron ecuaciones QSAR que describen adecuadamente la actividad biológica *In Vitro* de un grupo de complejos de coordinación. Estas ecuaciones revelan la participación del centro metálico directamente en el mecanismo de acción. Por otra parte los sustituyentes en el ligante diimina modifican fuertemente las propiedades electrónicas del cobre y de esta forma la actividad biológica. La participación del segundo ligante en la actividad biológica podría estar relacionada con la modificación de las propiedades de transporte a través de membrana (67).

Conclusiones Finales

De acuerdo con el objetivo principal del presente trabajo, se logró seleccionar, organizar y compilar la información necesaria sobre las Casiopeínas® Igly y III-ia para su Registro Sanitario y Autorización de Protocolos de Investigación. Se realizó un Anexo con las principales características físico-químicas, cinéticas, tóxicas, etc. de ambas Casiopeínas® con el fin de brindar un acceso fácil a dicha información para posteriores investigaciones.

Con ésta recopilación obtenida a partir de tesis de licenciatura, maestría y doctorado, publicaciones en revistas y libros, congresos, jornadas de trabajo, informes, concursos premiados, etc. podemos decir que las Casiopeínas® a lo largo de 20 años de investigación han logrado ubicarse como fármacos antineoplásicos muy prometedores. En algunos casos se reportan como mejores antineoplásicos que el cisplatino (actualmente es el fármaco más utilizado contra la mayoría de los casos de cáncer) debido a su efecto citotóxico, así como a sus pequeñas dosis de administración.

Las Casiopeínas® ya cuentan con una labor de investigación y desarrollo que las respaldan, así como sus patentes correspondientes. Éstas son un claro ejemplo de que en México sí existe el recurso humano para llevar a cabo investigación de alta calidad y poder combatir el fuerte problema de salud pública que es el cáncer.

Bibliografía

1. Senra Varela, A. El cáncer. Epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención. Ed. Harcourt. Madrid. 2002. 1-6, 14-25 y 27-73 pp.
2. Jaramillo Antillón, Juan. El cáncer. Fundamentos de oncología: Análisis del problema en Costa Rica. Ed. Universidad de Costa Rica. 1ª edición. Costa Rica. 1991. 25-30 pp.
3. Instituto Nacional de Cáncer www.cancer.gov/espanol/cancer/hojas-informativas/cancer-respuestas
4. Alberts, B. Johnson, A. et al. Molecular Biology of the Cell. Ed. Garland Science. 4a edición. EUA. 2002. Capítulo 23
5. Olaiz, Gustavo. Mauricio Hernández, et al. Cuaderno de Salud: Cáncer. Un encuentro con el futuro epidemiológico. México. 1ª edición. SS. 1994. 12-15 pp.
6. UICC (International Union Against Cancer). www.uicc.org
7. World Health Organization. Fac Sheet No. 297. February, 2006.
8. International Agency for Research on Cancer. Base de Datos: Globocan 2002: Cancer Incidence and Mortality Worldwide (IARC Cancer Bases No. 5), Lyon, IARC Press. www.iarc.fr
9. World Health Organization. <http://www.who.int/features/qa/15/es/index.html>
10. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07
11. The Oral Cancer Foundation. www.oralcancerfoundation.org/facts/quimioterapia.html
12. World Health Organization Constitution. www.who.int/governance/eb/who_constitution_sp.pdf
13. Hacia una política farmacéutica integral para México. Secretaría de Salud. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. 1ª edición. México. 2005
14. Informe proporcionado por la COFEPRIS: Plataforma Integral de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Industria Farmacéutica Mexicana (utilizando herramientas biotecnológicas, nanotecnológicas y de ingeniería farmacéutica)
15. IMS. Intelligence Applied. www.imshealth.com/web/content/0,3148,64576068_63872702_70260998_70514186,00.html
16. Tufts Center for the Study of Drug Development, Nov-2001
17. De Lamadrid, María Cristina. Productos y Materias primas de la industria farmacéutica. Ed. Banco de México. 1959. 27-57 pp.
18. SITER. Sistema de Tramitación Electrónica de Registro Sanitario de Productos. www.cofepris.gob.mx/RevistaRED/portada2006mJulio/num6_art_2.htm

19. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Suplemento para establecimientos dedicados a la venta y suministro de medicamentos y otros insumos para la salud. 3ª edición. México. 2005. 496 pp.
20. Greenwood, N.N. Earnshaw, A. Chemistry of the Elements. Ed. Pergamon Press. Hong Kong. 1989. Capítulo 28.
21. Wilkinson, G. Gillard, R. MacCleverty, J. A. Copper. Comprehensive Coordination Chemistry; The synthesis, reactions, properties and applications of coordination compounds. Vol. 5. Late Transition Elements. Ed. Pergamon Press. EUA. Capítulo 53.
22. Bravo, M.E. Tovar, A. et al. Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas®. Historia Química de un proyecto éxitos. Primer Congreso en Casiopeínas®. Unidad de Seminarios Ex Hacienda *El Chorrillo*, Taxco, Guerrero. 2 y 3 de diciembre de 2002.
23. Lena Ruiz-Azuara. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo I. Patente de invención. SECOFI. Enero 26 (1994) no. 172967
24. Lena Ruiz-Azuara. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II. Patente de invención. SECOFI. Diciembre 9 (1993) no. 172248
25. Lena Ruiz-Azuara. Process to obtain new mixed copper aminoacidote complexes from phenylatephenantroline to be used as anticancerigenic agents U.S. Patent, April 21 (1992) Number 5,107,005. U.S. patent Re 35458 Feb 18 (1997).
26. Lena Ruiz-Azuara. Process to obtain new mixed copper aminoacidote complexes from phenylatephenantroline to be used as anticancerigenic agents U.S. Patent Number 5,576,326. Nov (1996).
27. Título de Marca: Casiopeína. Reg. 407543 SECOFI (1992)
28. Flood Garibay, J. A. Síntesis y Evaluación biológica *In Vitro* de compuestos de coordinación [Cu(4,7-dimetil-1, 10-fenantrolina)(N-O)] NO₃ (Casiopeínas®) en diferentes líneas tumorales humanas. Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Química. Mayo 2006.
29. 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas®. UNAM, SS, CONACYT. México. 2002. 153 pp.
30. Primer Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la Investigación de Cáncer. Productos Naturales, Sintéticos, Orgánicos e Inorgánicos. Fuentes-Noriega, Inés, Rodríguez-R, F. Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica (Casiopeínas® IIgly y III-ia). Oaxaca, México. Noviembre. 2004. 150-153 pp.
31. Carvallo Chaigneau, Francisco Rubén. Efectos antiproliferativos y apoptóticos de las Casiopeínas® IIgly y III-ia en líneas tumorales humanas. Tesis de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. UNAM-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2007. 179 pp.
32. García Ramos, Juan Carlos. Estudio QSAR de compuestos de coordinación de cobre del tipo [Cu(N-N)(glicinato)NO₃]. Tesis de Licenciatura Químico. Universidad Nacional Autónoma de México. 2007

33. Tovar Tovar, A. L. Ruiz Ramírez. et al. Structural and reactivity studies on 4,4-dimethyl-2,2-bipyridine,acetylacetonate copper (II) nitrate (Casiopeína® III-I) with methionine, by UV-vis and EPR Techniques. Journal of Inorganic Biochemistry 98 (2004) 6,1045-1053 pp.
34. Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas®. Unidad de Seminarios Ignacio Chávez. Vivero Alto. UNAM. Tovar-Tovar, A. L. Ruiz-Ramírez. et al. Interacción Casiopeínas®-Constituyentes del DNA. Espectroscopia Electrónica y RPE (en solución). México. 1998. 69-71 pp.
35. Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas®. Unidad de Seminarios Ignacio Chávez. Vivero Alto. UNAM. Romero de L, Laura C. A Márquez-Q. Estabilidad de las Casiopeínas® II y III en soluciones fisiológicamente compatibles. México. 1998. 4-7 pp.
36. ATCC. The Global Bioresource Center. www.atcc.org
37. Gracia-Mora, Isabel. Ruiz-Ramírez, L. et al. Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeinas, evaluated by an *In Vitro* Human and murine cancer cell line panel. Metal Based Drugs. Vol. 8. No. 1. 2001. 19-28 pp.
38. Kerr, J.F.R, Wyllie, A. H, Currie, A. R. Apoptosis. British Journal Cancer 26. 239-257 (1972).
39. Carvallo Chaigneau, Francisco Rubén. C. Trejo-Solís. et al. Casiopeína® III-ia induce apoptosis in HCT-15 cells *In Vitro* through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect *In Vivo*. Biometals. Springer Netherlands. Volume 21. Num 1. February 2008.
40. Primer Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la Investigación de Cáncer. Productos Naturales, Sintéticos, Orgánicos e Inorgánicos. Mejía-Vázquez, Ma. Del Carmen. L. Ruiz-Ramírez. Efecto *In Vitro* de las Casiopeínas® IIgly y III-ia en el meduloblastoma humano. Oaxaca, México. Noviembre. 2004. 122-125 pp.
41. Chiapa Zavala, Nallely. Evaluación *In Vitro* de la Sinergia de 2 Casiopeínas® (III-ia y IIgly) y otros fármacos comerciales en líneas tumorales humanas. Tesis de Licenciatura en Química. UNAM. 2007. 50 pp.
42. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, A. Induction of Apoptosis by a novel Copper-based Anticancer Compound, Casiopeína II, in L1210 Murine Leukaemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells. Toxicology *In Vitro*. 14. 2000. 1-5 pp.
43. Kacahdourian, R. Brechbuhl, H. Glutathione Depletion Potentiates the Efficacy of the Copper Complex Casiopeína IIgly against Human Lung Adenocarcinoma cells. Artículo enviado a *Cancer Research*, sección *Experimental Therapeutics, Molecular Targets, and Chemical Biology*.
44. Ruiz-Ramírez L., Gracia-Mora I., et al., The antitumor activity of several transition metal complexes. Journal of Bioinorganic Chemistry, 43, 2-3 (1991) 615

45. Trejo-Solís, Cristina. Guadalupe Palencia. Cas Igly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells *In Vitro* and *In Vivo* through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. Neoplasia. Vol. 7, No. 6, June 2005, 563-574 pp.
46. Primer Congreso de Química Médica. Dedicado a la Investigación en Cáncer. Productos Naturales, Sintéticos, Orgánicos e Inorgánicos. Rivera Huerta, Marisol, Durán López D. et al. Evaluación clínica de la Casiopeína® III-ia de un tumor mamario en rata Wistar con la ayuda de la técnica PET. Oaxaca, México. Noviembre. 2004.
47. Primer Congreso de Química Médica. Dedicado a la Investigación en Cáncer. Productos Naturales, Sintéticos, Orgánicos e Inorgánicos. Florín-Ramírez, D. Rodríguez-Mercado, J. et al. Evaluación de los rompimientos en el DNA inducidos por la Casiopeína Igly y en leucocitos humanos de sangre periférica. Oaxaca, México. Noviembre. 2004. 41-43 pp.
48. Rivero-Müller, A. De Vizcaya-Ruiz, A. et al. Mixed chelate copper complex, Casiopeina Igly, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. Chemico-Biological Interactions. 165. 2007. 189-199pp.
49. Alemón-Medina, Radamés. Muñoz-Sánchez, J.L. et al. Casiopeina Igly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. Toxicology *In Vitro*. 22. 2008. 710-715 pp.
50. Marín-Hernández, A. Gracia-Mora, I. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. Biochemical Pharmacology. 65. 2003. 1979-1989 pp.
51. Rodríguez-Enríquez, S. Vital-González, P. Control of celular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. Toxicology and Applied Pharmacology. 2006. En línea en www.elsevier.com
52. VI Congreso Nacional AMCAL. Macías-R, L. Rivera-H, M. et al. Toxicidad aguda en rata y ratón de las Casiopeínas® III-ia y Igly. Manzanillo, Colima. México. Diciembre. 2007.
53. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, A. et al. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeina® II. Toxicology. 194. 2003. 103-113 pp.
54. Segundo Congreso Nacional de Química Médica. García-Otuño, L. E. Leal-García, M. Estudio de los efectos tóxicos agudos de las Casiopeínas® en perros. Querétaro, México. Septiembre. 2006.
55. Leal-García, M. García-Ortuño, L. et al. Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of Casiopeinas® in anaesthetized dogs. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology. 101. 3. 151-158 pp.
56. Hernández-Esquivel, L. Marín-Hernández, A. et al. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. Toxicology and Applied Pharmacology. 212. 2006. 79-88 pp.

57. Primer Congreso de Química Médica. Dedicado a la Investigación en Cáncer. Productos Naturales, Sintéticos, Orgánicos e Inorgánicos. Castañeda-Peralta, A. Aragón-Martínez, A. et al. Toxicidad reproductiva masculina de la Casiopeína® IIgly. Oaxaca, México. Noviembre. 2004. 135-138 pp.
58. Primer Congreso de Química Médica. Dedicado a la Investigación en Cáncer. Productos Naturales, Sintéticos, Orgánicos e Inorgánicos. Bocanegra-Astivia, D. Altamirano-Lozano, MA. Efecto teratogénico causado por la Casiopeína® III-ia en embriones y fetos de ratón de la cepa CD-1. Oaxaca, México. Noviembre. 2004. 28-31 pp.
59. Segundo Congreso Nacional de Química Médica. Bocanegra-Astivia, D. Altamirano-Lozano, MA. Toxicología reproductiva inducida por Casiopeína® III-ia en ratones macho de la cepa CD-1. Querétaro, México. Septiembre. 2006. Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No. 7 2007. Enlace electrónico: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-07-2007/index.html>
60. Primer Congreso de Química Médica. Dedicado a la Investigación en Cáncer. Productos Naturales, Sintéticos, Orgánicos e Inorgánicos. Sánchez-Bartéz, F. Gracia-Mora, I. et al. Estudio de los efectos genotóxicos, citostáticos y citotóxicos de la Casiopeína® III-ia en médula ósea y sangre periférica de ratón. Oaxaca, México. Noviembre. 2004. 120-123 pp.
61. Primer Congreso de Química Médica. Dedicado a la Investigación en Cáncer. Productos Naturales, Sintéticos, Orgánicos e Inorgánicos. Pérez-Flores, G. García-Ramírez, MC. et al. Estudio comparativo del daño genotóxico inducido por el cisplatino y por la Casiopeína® III-ia en ratones machos, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1. Oaxaca, México. Noviembre. 2004. 49-52 pp.
62. Pérez, Flores, G. Daño Genotóxico inducido por el Cisplatino y por la Casiopeína III-ia. Estudio comparativo en ratones machos, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1. Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Biólogo. FES-Zaragoza.
63. Fuentes Noriega, Inés. Farmacocinética Preclínica de Casiopeína® III-ia y su Unión a Proteínas Plasmáticas. Tesis de Doctorado. UNAM. 2005.
64. Uribe Gutiérrez, Talina. Estudios de estabilidad de Casiopeínas® como materia prima. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. En proceso.
65. Informe Técnico de Avance CONACYT 2008. Ruiz-Azuara, L. Desarrollo de Antineoplásicos Sintéticos De NOVO y su evaluación preclínica. UNAM.
66. Bravo, M.E., L. Ruiz Ramírez, Isabel Gracia, Mabel Tinoco. QSAR Study of Copper complexes (Casiopeínas®) as cytostatic drugs in several human tumoral lines. J. of Inorganic Biochemistry Let. 86(2001) 157
67. Bravo-Gómez, M. E. et. al. Antiproliferative activity and QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonate)]NO₃ and [Cu (N-N)(glycinate)]NO₃ complexes, (Casiopeínas). Journal of

Inorganic Biochemistry. Nov. 2008. M.E. Bravo-Gómez et al., J. Inorg. Biochem. (2008), doi:10.1016/j.jinorgbio.2008.10.006

68. Barrón-Sosa, L. Influencia del Metabolismo en la Actividad Antiproliferativa y Apoptótica del Quelato Mixto de Cobre Casiopeína® III-ia en Tres Líneas Tumorales y en Linfocitos Humanos. Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 2006.
69. Fuentes Noriega, L. Ruiz Ramírez, A. Tovar Tovar, H. Rico Morales, I. Gracia Mora. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína® III-ia in rat plasma. J. Of Chromatography B. 772 (2002) 115-121.
70. Fuentes Noriega, L. Ruiz Ramírez, E. Gómez Ramos, L. Macías-Rosales, María Elena Bravo-Gómez. Optimization and validation of a liquid Chromatographic Method for Casiopeína® III-ia in rat urine, J. of Chromatography B.
71. Haskell, C. M. Cancer treatment. 4ª edición. W. S. Saunders Company. Estados Unidos de Norteamérica. 1995. 3, 78-165 pp.
72. Kimura, K. Kazuo, O. et. al. Cancer Chemotherapy: Challenges for the future. Vol. 10. Excerpta Medica. Amsterdam. 1995. 263-278 pp.
73. Mathers C., Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLOS Medicine. 2006. 3:442
74. Reyes, L., Noriega, I. F., Ruiz Ramírez, L., Macías, L. Development and validation of liquid chromatographic method for Casiopeína® IIgly in rat plasma. J. of Chromatography B. 791 (2003) 111-116.
75. Reyes Sánchez, Gladys J. Validación de un método analítico para la cuantificación de Casiopeína®IIgly en orina por CLAR, para su aplicación en un estudio preclínico en ratas. Tesis de Licenciatura. UNAM. 2007.
76. Rico Morales, Héctor A. Actividad antineoplásica de la Casiopeína® III-ia sobre diferentes líneas tumorales humanas xenotransplantadas al ratón desnudo. Tesis de Maestría. UNAM. 2004.
77. Santiago Moreno, Yolanda. “Efecto genotóxico de los tratamientos agudo y sub-crónico de la Casiopeína II-gly en Machos, Hembras, Hembras preñadas y fetos de ratón CD-1”. Tesis de Licenciatura. Biología. FES-ZARAGOZA, UNAM. 2004

Documentos Electrónicos consultados

Cámara Nacional de la Industria de Transformación.

www.canacindra.org.mx

Centers for Diseases Control and Prevention

www.cdc.gov/nchs

Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios

www.cofepris.gob.mx

National Cancer Institute

www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es/explicacion-basica

Instituto Nacional de Cancerología.

www.incan.edu.mx

International Agency for Research on Cancer

www.iarc.fr

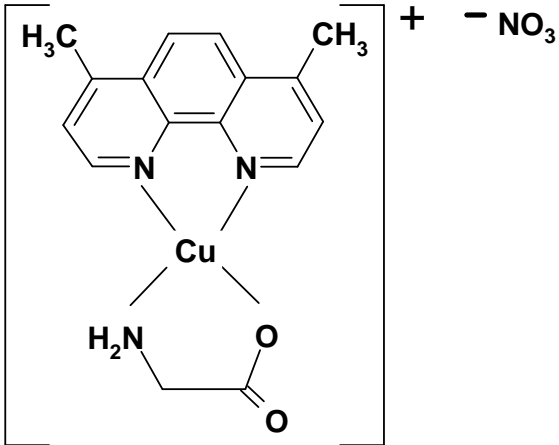
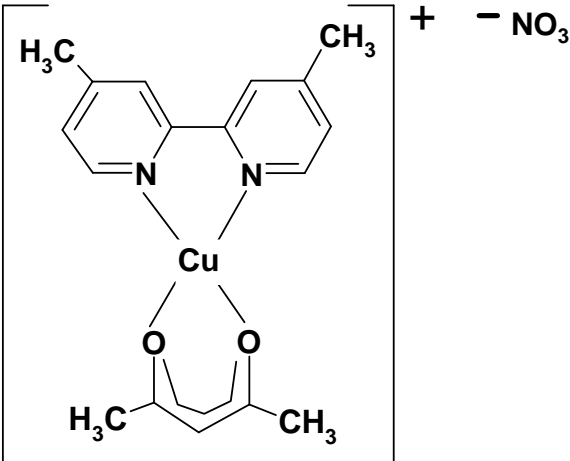
Panamerican Health Organization

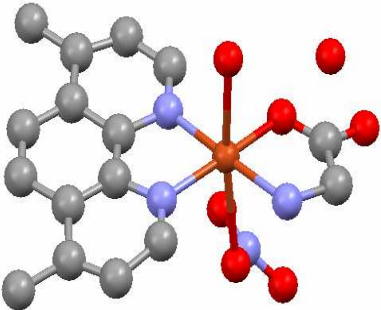
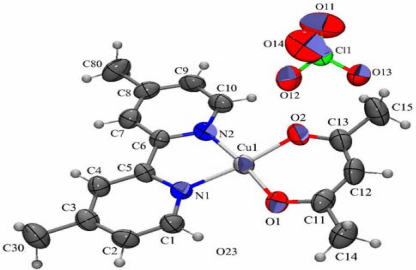
www.paho.com

UICC (International Union Against Cancer).

www.uicc.org

APÉNDICE

Compuesto	Casiopeína® IIgly	Casiopeína® III-ia
Fórmula condensada general de la familia	[Cu(4,7- dimetil-fen)(O-N)]NO ₃	[Cu (N-N)(O-O)]NO ₃
Nombre químico	[Cu*H ₂ O(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO ₃	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetionato)] NO ₃
Fórmula	Cu C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₅ * 2H ₂ O	CuC ₁₇ N ₃ O ₅ H ₁₉ *2H ₂ O
Análisis de elementos (%)	Teórico: 12.6 %N, 43.3 %C, 4.5%H Experimental: 12.9 %N, 43.0 %C, 4.4 %H	Teórico: 9.4% N, 45.9% C, 5.2 %H Experimental: 9.4 % N, 46.1 % C, 4.9 % H
Peso molecular	443.90 g/mol (con dos moléculas de agua)	444.93 g/mol (con dos moléculas de agua)
Estructura		
Descripción del compuesto	Polvo fino, libre de partículas extrañas, homogéneo, color azul (intenso).	Polvo fino, libre de partículas extrañas, homogéneo, color azul (claro).

Compuesto	Casiopeína® IIgly				Casiopeína® III-ia			
Rayos X								
EPR (MeOH 1x10 ⁻³ M a 77K)	g 2.319	g _⊥ 2.130	A (G) 171.42	A _⊥ (G) -	g 2.3278	g _⊥ 2.1351	A (G) 185.41	A _⊥ (G) 8.163
UV-visible	<p>Concentración de 10 µg/ml: se detectan dos picos máximos de absorción en una longitud de onda de 274.0 nm y 209.0 nm, con una absorbancia de 0.957 y 1.227 respectivamente.</p> <p>En la concentración de 7 µg/ml se presentan máximos de absorción con una longitud de onda de 274.0 nm y 208.5 nm, con una absorbancia de 0.629 y 0.882 respectivamente.</p>				<p>Concentración de 5 µg/ml: se detectan picos de absorción en una longitud de onda de 295.5 y 208.0 con una absorción de 229.0 y 0.563 respectivamente.</p> <p>En la concentración de 7 µg/ml se presentan máximos de absorción a una longitud de onda de 295.5 nm y 208.0 nm con una absorbancia de 0.296 nm y 0.817 respectivamente.</p>			

Compuesto	Casiopeína® Ilgly	Casiopeína® III-ia
Espectroscopia de IR	Amina secundaria: 3000 - 2850 cm ⁻¹ , NO ₃ ~1380 cm ⁻¹ , C=O : 1601 cm ⁻¹ , Fenantrolina: 1429, 871, 726 cm ⁻¹ , C=N : 1524 cm ⁻¹	Amina secundaria: 3464 - 3031 cm ⁻¹ , NO ₃ ~1380 cm ⁻¹ , Aromático: 1587 cm ⁻¹ , Bipiridina: 161, 1491, 777, 730 cm ⁻¹ , C=N: 1525 cm ⁻¹
Análisis Térmico	Señal en 70°C y 261.5°C	Transiciones en 40 y 220°C, señal en 128°C y en 250°C
Análisis Térmico Diferencial (DTA)	Pérdida de materia del 0.63% con respecto al 100%, a una temperatura de 60°C, pérdida de materia del 17.11% con respecto al 100%, a una temperatura de 260°C, pérdida de materia del 31.42% con respecto al 100%, a una temperatura de 355°C.	Pérdida de materia del 1.18% con respecto al 100%, a una temperatura de 60°C, pérdida de materia del 3.09% con respecto al 100%, a una temperatura de 220°C, pérdida de materia del 36.64% con respecto al 100%, a una temperatura de 440°C.

Compuesto	Casiopeína® IIgly	Casiopeína® III-ia
Solubilidad	*Muy soluble en metanol, etanol y mezcla de agua-alcohol (50:50), soluble en agua, poco soluble en solución amortiguadora.	*Es soluble en agua, metanol y soluciones fisiológicas a pH 7.4
Estabilidad	*Estable en agua a fuerza iónica y a temperatura constante, a pH cercano a 7 aproximadamente 7 días. *Estable por una semana en solución dextrosada. *En solución salina (NaCl) precipita.	*En solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 y 64mM a 37°C no se observó inestabilidad por 12 horas. *En solución acuosa con refrigeración por 16 días sólo tuvo un 3.8% de degradación.
Densidad Aparente	0.425g/mL	0.44 g/mL
Velocidad de flujo	1.0 g/seg	0.8 g/seg
Coeficiente de partición	-	0.358
pka	5.4	8.25
Unión a proteínas	> 90%	*En plasma de rata 48.3±7.6% - 57.7±9.6% *En plasma de humano 76.3±0.17% - 89.1±1.9%
Posibles vías de administración	*Vía oral, no es posible debido al pH del estómago cercano a 1, lo que degradaría al compuesto. *Vía intravenosa, ya que es inerte frente al agua inclusive hasta pH 8	*Vía intravenosa

Compuesto	Casiopeína® IIgly	Casiopeína® III-ia
Actividad biológica	<p><i>*In Vitro:</i> activo en las líneas tumorales humanas HeLa, SiHa, InB1, CaLo, PC-3, HCT-15, MCF-7, U-373, SKLU-1 y meduloblastomas.</p> <p><i>*In Vivo:</i> activo en líneas murinas de leucemia L1210, contra los tipos de cáncer S180, B16 y LW1; HCT-15, PC-3 y HeLa. Induce citotoxicidad y apoptosis.</p>	<p><i>*In Vitro:</i> activo en las líneas tumorales humanas HeLa, SiHa, InB1, CaLo, PC-3, HCT-15, MCF-7, U-373, SKLU-1 y meduloblastomas.</p> <p><i>*In Vivo:</i> activo en líneas murinas de leucemia L1210, contra los tipos de cáncer S180, B16 y LW1; PC-3, HeLa, HCT-15 y glioma C6. Induce citotoxicidad y apoptosis.</p>
Enfermedades que podrán ser atacadas	<p>*Cáncer Cérvico-uterino, de mama, de colon y carcinomas.</p> <p>*Prometedora para casos de leucemia y de neuroblastos y tumores del sistema nervioso central.</p>	<p>*Fuerte candidato para el tratamiento de glioma malignos y leucemias en humanos.</p>
Actividad sinérgica en diferentes líneas tumorales (% de viabilidad)	<p>La actividad con respecto al % de viabilidad es:</p> <p>HeLa > CaLo > HCT-15 > MCF-7 > U-373 > SiHa > InBI > SK-LU-1</p> <p>Se observa que en HeLa el % de viabilidad baja hasta 25 con la mezcla de carboPt / IIgly (50:50, 75:25, 25:75); mientras que U-373 presenta buena actividad con todas las mezclas. Y por el contrario, SK-LU-1 no muestra actividad con ninguna mezcla.</p>	

Parámetros Farmacocinéticos en rata para la Casiopeína® Ilgly

Parámetro farmacocinético	Ilgly (8 mg/kg, iv)
Área bajo la curva (ABC)	1988.093 mcg/ml.min
Vida media beta	228.148 min (3.80 horas)
Cl (depuración)	1.114 ml/min
Volumen de distribución (Vss)	0.065 litros
Ke	0.003 min ⁻¹

Parámetros Farmacocinéticas de Casiopeína® III-ia

Parámetro farmacocinético	Rata	Perro	Conejo
Dosis	9.0 mg/Kg	3.0 mg/ Kg	9.0 mg/ Kg
Depuración Cl	0.45 mL/min	-	1.46 mL/min
Volumen de distribución	0.462 L	-	0.0167 L
Tiempo medio de residencia TMR	17.14 h	2 semanas	86 min
Vida media de eliminación	12.46 h		57 min

Posibles Mecanismos de acción

<u>Modelo</u>	<u>Casiopeínas®</u>	
Interacción con adenina y DNA	III-ia	
	1. Interaccionar con dos moléculas de adenina, a través de apilamiento π entre los sustituyentes bipyridina y/o fenantrolina del complejo metálico. Mediante la formación de complejos por apilamiento.	
<u>Modelo</u>	II-gly	III-ia
Producción de radicales libres	<p>Estos fármacos, pueden intervenir en reacciones de óxido-reducción de tipo Fenton y Haber-Weiss en las que el cobre puede participar por lo que muy probablemente provocan daño por radicales libres.</p> <p>La Casiopeína® IIgly posee actividad nucleasa relacionada con la generación de especies reactivas de oxígeno (OH[•])</p>	

Toxicidad Aguda DL₅₀ y DL₉₀ en rata y ratón de la Casiopeína® III-ia

Ratón	ICR ♂		ICR ♀	
Vía de administración	IP	IV	IP	IV
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
DL₅₀	24.68	12.78	32.33	12.82
Límite superior	27.14	13.83	33.81	14.21
Límite inferior	17.63	11.83	30.74	11.45
DL₉₀	27.68	14.87	34.61	15.84
Límite superior	53.42	18.76	41.64	20.47
Límite inferior	25.01	13.61	33.02	14.12
Rata	Wistar ♂		Wistar ♀	
Vía de administración	IP	IV	IP	IV
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
DL₅₀	14.36	5.51	19.93	5.96
Límite superior	14.94	6.85	21.25	7.31
Límite inferior	13.41	4.02	18.43	4.7
DL₉₀	15.44	7.73	22.53	8.07
Límite superior	18.36	13.34	27.11	15.27
Límite inferior	14.76	6.21	20.99	6.57

Toxicidad Aguda DL₅₀ y DL₉₀ en rata y ratón de la Casiopeína® Ilgly

Ratón	ICR ♂		ICR ♀	
Vía de administración	IP	IV	IP	IV
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
DL₅₀	15.59	15.5	15.67	15.3
Límite superior	17.43	16.82	17.29	16.01
Límite inferior	13.53	13.51	14.13	14.59
DL₉₀	19.79	17.95	17.71	16.18
Límite superior	26.64	22.61	24.07	18.37
Límite inferior	17.44	16.46	16.16	15.51
Rata	Wistar ♂		Wistar ♀	
Vía de administración	IP	IV	IP	IV
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
DL₅₀	8.46	7.83	8.83	8.89
Límite superior	9.95	8.69	9.8	7.47
Límite inferior	7.16	6.91	7.94	10.41
DL₉₀	11.61	8.88	10.69	12.1
Límite superior	17.64	13.28	14.13	18.78
Límite inferior	9.71	8.05	9.55	10.15