



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“INFLUENCIA DE LOS SUSTITUYENTES PERIFÉRICOS DE
FENANTROLINA DE LAS CASIOPEÍNAS® Y LAS
MODIFICACIONES QUE PRODUCEN EN LOS EFECTOS
APOPTÓTICOS Y CITOTÓXICOS EN 3 LÍNEAS CELULARES”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

REBECA PÉREZ CABEZA DE VACA



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: LENA RUÍZ AZUARA

VOCAL: MARIA ISABEL GRACIA MORA

SECRETARIO: MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA

1ER. SUPLENTE: JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ

2DO. SUPLENTE: ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA, CONJUNTO "E", UNIDAD DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL UNEXA. LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS.

ASESOR DEL TEMA:

MARIA ISABEL GRACIA MORA

SUSTENTANTE:

REBECA PÉREZ CABEZA DE VACA

Agradecimientos

A CONACyT por el apoyo económico brindado a través del proyecto 60085.

A la UNAM y su Ciudad Universitaria, por su extraordinario capital humano y todos sus espacios.

Gracias a Dios

Proverbios 4:1-9

I always knew...

*"I can do everything because Christ gives me strength."
~ Phil. 4:13*

*"You don't choose your family. They are God's gift to you."
~ Desmond Tutu*

***You 3 are and will be always the most important.
(Turbina, you'll be the best pet forever)***

*"Humour makes all things
tolerable."
~ Henry Ward
Beecher*

I learned ...

*"I never think of the future. It comes soon enough."
~ Albert Einstein*

*"Research is to see what everybody else has seen,
and to think what nobody else has thought."
~ Albert Szent-Gyorgyi*

*"The most tragic thing in the world is a man of genius
who is not a man of honor."
~ George Bernard Shaw*

***"The only source of knowledge is experience."
~ Albert Einstein***

I will not forget...

*"Many of life's failures are people who did not realize how close they were to success
when they gave
up."
~ Thomas Alva Edison*

***"A friend is one who believes in you when you have ceased to believe in
yourself."***

*"Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow."
~ Albert Einstein*

No quiero convencer a nadie de nada.

Tratar de convencer a otra persona es indecoroso, es atentar contra su libertad de pensar o creer o de hacer lo que le dé la gana. Yo quiero sólo enseñar, dar a conocer, mostrar, no demostrar. Que cada uno llegue a la verdad por sus propios pasos, y que nadie le llame equivocado o limitado. (¡Quién es quién para decir “esto es así”, si la historia de la humanidad no es más que una historia de contradicciones y de tanteos y de búsquedas?)

Si a alguien he de convencer algún día, ese alguien ha de ser yo mismo. Convencerme de que no vale la pena llorar, ni afligirse, ni pensar en la muerte. “La vejez, la enfermedad y la muerte”, de Buda, no son más que la muerte, y la muerte es inevitable. Tan inevitable como el nacimiento.

Lo bueno es vivir del mejor modo posible. Peleando, lastimando, acariciando, soñando. (¡Pero siempre se vive del mejor modo posible!)

Mientras yo no pueda respirar bajo el agua, o volar (pero de verdad volar, yo solo, con mis brazos), tendrá que gustarme caminar sobre la tierra, y ser hombre, no pez ni ave.

No tengo ningún deseo que me digan que la luna es diferente a mis sueños.

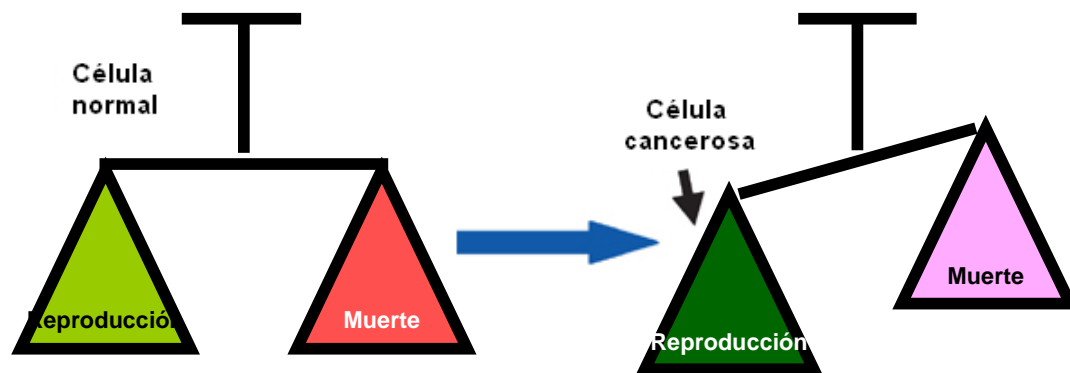
- Jaime Sabines

Índice

	Página
1. Introducción	1
1.1. Panorama mundial	3
1.2. Quimioterapia	5
1.3. Apoptosis	5
1.3.1. Fragmentación internucleosomal de DNA	9
1.3.2. TUNEL	10
1.4. In Vitro	12
1.5. Antineoplásicos	13
1.6. Cobre y Casiopeínas®	17
2. Hipótesis	22
3. Objetivos y justificación	23
4. Metodología	24
4.1. Material biológico	24
4.2. Fármacos	26
4.3. Material de laboratorio	29
4.4. Equipo	30
4.5. Reactivos	31
4.6. Metodología experimental	32
5. Resultados	41
Sección 1. Porcentajes de inhibición celular	41
Sección 2. Datos de Concentración Inhibitoria media (CI ₅₀)	45
Sección 3. Inmunohistoquímica. Detección de apoptosis por TUNEL	47
Sección 3.1. Porcentajes de apoptosis	49
6. Análisis de resultados	50
Sección 1. Porcentajes de inhibición celular	51
Sección 2. Datos de Concentración Inhibitoria media (CI ₅₀)	53
Sección 3. Inmunohistoquímica.	58
7. Conclusiones	60
Referencias	62

1. Introducción

Los organismos multicelulares, y el ser humano no es excepción, se encuentran bajo una relación constante entre reproducción y muerte celular. Lo que permite su desarrollo y mantenimiento es la regulación del balance entre ambos sucesos mediante la homeostasis. Cuando algún estímulo altera a nivel celular dicho equilibrio, se originan múltiples patologías, dentro de las que se encuentra el cáncer.¹



Los tipos de estímulos que dan origen a este desequilibrio son muy diversos, sin embargo en un 60% a un 90% de los casos son responsables los factores ambientales como contaminantes de aire (tabaco) agua o la exposición a radiaciones, o de estilo de vida como la dieta, ingesta de fármacos, infección por algunos virus y muchos otros aún desconocidos. Esto implica que una buena parte de los trastornos cancerosos, podrían ser prevenidos al evitar exponerse a agentes que presenten la potencialidad de producirlos (carcinógenos).

El cáncer, producto de una serie de alteraciones genéticas y recodificación del DNA nuclear, se traduce en una proliferación descontrolada de células anormales o neoplasia, la cual puede o no ser maligna.

En el caso de que estas células se conserven en su sitio encapsuladas; limitando así su capacidad de invasión; formarán un tumor llamado benigno. Los tumores

benignos generalmente pueden retirarse o extirparse y en la mayoría de los casos no reaparecen. Lo importante es que las células de tejidos benignos no se extienden a otras partes del cuerpo, éstas permanecen juntas y a menudo son rodeadas por una membrana de contención o cápsula; su tasa de crecimiento es lenta, e incluso puede interrumpirse o retroceder.

Sin embargo, cuando se trata de un tumor maligno, este invade y reemplaza al tejido sano, su tasa de crecimiento es rápida y autónoma, perdiendo la inhibición por contacto.² Sí las células neoplásicas migran por medio del torrente sanguíneo o sistema linfático a otros órganos (metástasis), el grado de malignidad de dicho tumor se manifiesta.

Es debido a esto que el cáncer se ha definido como un conjunto de enfermedades, ya que existen más de 100 tipos distintos (por el tipo de órgano o tejido en el que surgen) en el que una célula anormal se divide sin control y es capaz de invadir otros tejidos.³

El proceso de transformación de una célula normal a cancerosa se conoce como carcinogénesis⁴ y está dividida en 3 fases principales:

- *Iniciación*. La exposición a un carcinógeno produce una alteración estructural en el DNA que conlleva la activación de un *oncogen* o la inactivación de un *gen supresor de tumor*. Es un proceso irreversible, donde la célula iniciada crece a una velocidad ligeramente mayor a las normales y no puede ser identificada morfológicamente.

- *Promoción*. Esta fase no requiere necesariamente de la exposición al carcinógeno pero sí de un segundo agente denominado *promotor*, que estimula el crecimiento, favoreciendo la acumulación y adquisición de nuevas mutaciones. Se caracteriza por una rápida expansión de la población celular iniciada. A diferencia de la fase de iniciación, es un proceso reversible, que se desencadena en ocasiones por un estímulo a nivel de receptores de membrana.

- *Progresión tumoral.* En esta etapa se acumulan las alteraciones genéticas que provocan malignidad, como la capacidad de metástasis o la resistencia a fármacos. Es un proceso irreversible, discernible morfológicamente en la estructura genómica celular, originada por inestabilidad del cariotipo.

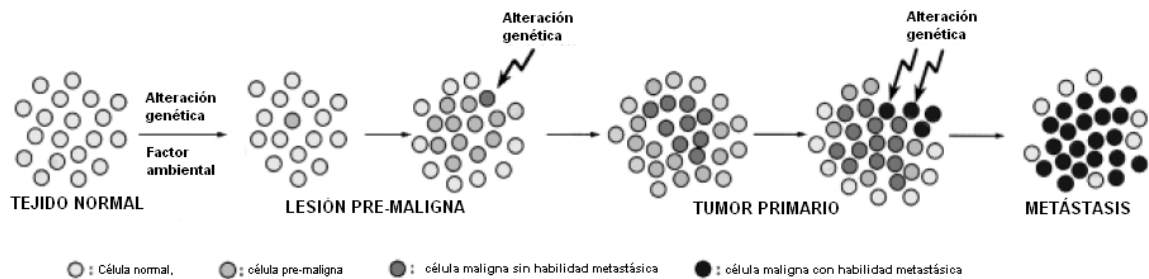


Fig. 1. Progresión del cáncer humano paso por paso en asociación con la acumulación de alteraciones genéticas en las células.⁵

La investigación científica ha profundizado en los mecanismos celulares específicos, caracterizando moléculas y genes asociados a este padecimiento a la par del desarrollo de nuevos fármacos contra la enfermedad, estrategias de combinación de las distintas modalidades terapéuticas (cirugía, radioterapia y quimioterapia) así como prevención y diagnóstico precoz, donde la mayor parte de esta información procede de investigación preclínica realizada con células en cultivo o con modelos animales, destinando millones de recursos para entender y frenar esta enfermedad. Sin embargo las estadísticas no son alentadoras.

1.1. Panorama mundial

La Agencia Internacional de Investigación para Cáncer (**IARC** por sus siglas en inglés) que pertenece a la Organización Mundial de la Salud declara que el 13% del total de muertes a nivel mundial son causadas por el cáncer, es decir 7.9 millones registradas en el 2007.⁶

Los tipos más frecuentes de cáncer en orden del número de muertes globales son:

- Hombres: pulmón, estómago, hígado, colorrectal, esófago y próstata.
- Mujeres: pecho, pulmón, estómago, colorrectal y cervical.

El 72% de los casos de muerte por cáncer ocurren en países desarrollados. Se pronostica que si estas cifras siguen en aumento para el año 2015 el número será de 9 millones y para el 2030 se alcanzará un aproximado de 12 millones de muertes, tal y como se muestra en el gráfico siguiente:

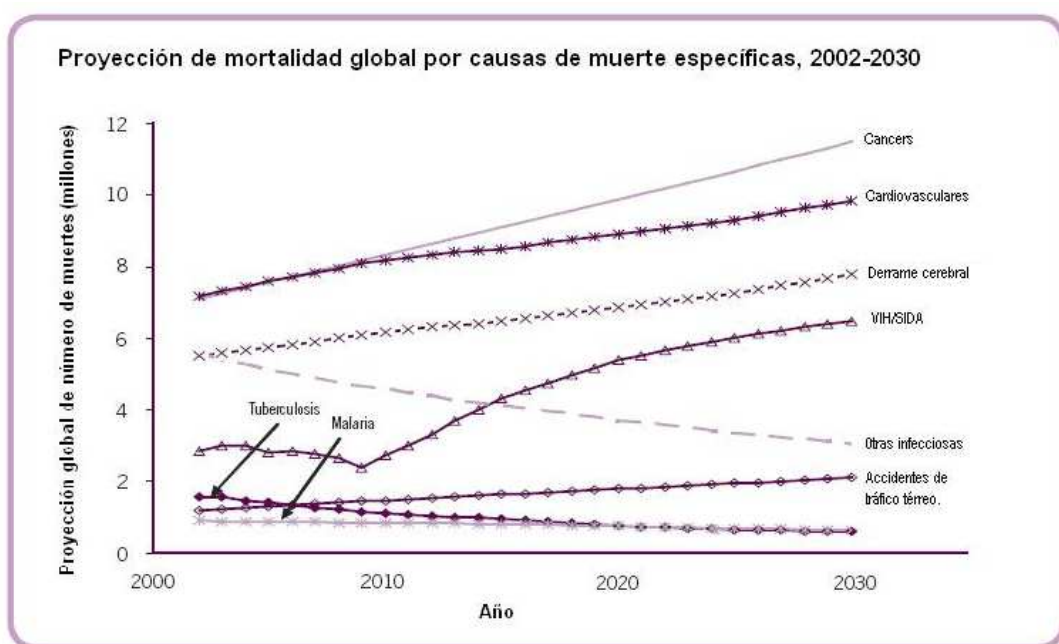


Fig. 2. Proyección estadística de casos de cáncer a nivel mundial.⁷

Esto es lo que la industria farmacéutica llama a menudo una “necesidad no satisfecha”: una demanda de la sociedad en general a la sociedad científica.⁸ Por tanto dicha labor debe continuar.

Hoy día una de las principales herramientas con las que la medicina oncológica cuenta es la quimioterapia.

1.2. Quimioterapia

La Asociación Mexicana de Lucha Contra el Cáncer indica que la quimioterapia consiste en la administración de fármacos citotóxicos (inductores de muerte celular), normalmente por vía I.V. (intravenosa), capaces de impedir la proliferación y crecimiento de células malignas, destruyendo el tumor o reduciendo la masa tumoral. Tienen acción directa sobre diversas partes vitales de la célula, paralizando la división celular.⁹

Los medicamentos contra esta enfermedad son conocidos como *antineoplásicos*, se sabe que también afectan algunos tejidos sanos (por que no son altamente específicos) especialmente a los encargados de generar continuamente nuevas células como es la médula ósea (neutropenia), y producen incluso nefro y cardiotoxicidad.

Se ha demostrado que uno de los mecanismos de los fármacos citotóxicos es que inducen vías de señalización para apoptosis tanto en células malignas como en células normales.¹⁰

1.3. Apoptosis

La apoptosis tiene como función primordial programar la muerte de las células, incluso en procesos biológicos normales del desarrollo. Existe evidencia de que una deficiencia en la regulación de los genes que controlan este fenómeno juega un papel importante en la etiología del SIDA, enfermedades autoinmunes y degenerativas¹¹ y se le ha relacionado particularmente con el cáncer.¹²

Para entender mejor las bases moleculares de la apoptosis y el mecanismo de acción de ciertos agentes quimioterapéuticos es necesario conocer el ciclo celular.

En células normales se distinguen varias fases: en la fase **G₀** o de reposo las células permanecen sin dividirse, pero conservan la capacidad de reiniciar el ciclo para repoblar un tejido; en la fase **G₁** (*Gap 1* o de presíntesis) las células producen RNA y proteínas; en la fase **S** (síntesis) se replica el DNA; en la fase **G₂** (*Gap 2* o de postsíntesis) el núcleo se organiza para la división celular, que se produce en la fase **M** o de mitosis.¹³ Mientras esto ocurre, existen puntos de chequeo (*checkpoints*) en los que se lleva a cabo una vigilancia del proceso. Se han descritos tres de estos puntos durante el ciclo celular; el primero es el punto **Start** (conocido como *checkpoint* de **G₁/S**), que se encuentra a finales del periodo **G₁**, cuando la célula va a comenzar la síntesis de DNA. En este punto la célula verifica si las condiciones ambientales son apropiadas y si ha alcanzado el tamaño adecuado para entrar en división; si esto no ha sucedido, entonces el ciclo se detiene en este punto. El segundo *checkpoint* se encuentra a la entrada de la mitosis (se conoce como *checkpoint* de **G₂/M**), la célula detiene la progresión en el ciclo si la replicación está incompleta o si el DNA está dañado. El tercer punto de este tipo se encuentra en la transición metafase - anafase y es el que regula la salida de la mitosis (*checkpoint* de **M/ G₁**), donde el paso a **G₁** se detiene si los cromosomas no se han "enganchado" correctamente al huso mitótico.¹⁴

Cuando se localiza cierto daño, el *checkpoint* envía una señal que detiene el ciclo celular hasta que se realiza la reparación. Cuando no es posible reparar el daño, se marca la célula para su destrucción por apoptosis, las células normales están programadas para morir si se ven sujetas a distintos estímulos que produzcan estrés no fisiológico; si se aíslan de su medio, las células son incapaces de recibir señales de supervivencia específicas del tejido, produciendo expresión de *oncogenes* (genes que codifican proteínas del ciclo celular que favorecen la proliferación celular) o a la inactivación de *genes supresores* (genes que codifican proteínas que frenan el ciclo celular) de manera espontánea.

Se ha propuesto que la habilidad de supervivencia inherente a las células cancerosas transformadas se debe a su alta resistencia a la apoptosis, mientras que la capacidad invasora local y a distancia, se debe a mutaciones adicionales.

En condiciones normales no se permite la progresión del ciclo hasta que el error no se haya corregido; sin embargo, las células tumorales tienen mutaciones con las que son capaces de repetir el ciclo indefinidamente aún sin integridad del DNA.

En cualquier tejido y también en los tumores existe un equilibrio entre las células que se encuentran en fase **G₁** con las que están en reposo en **G₀**. Las células en **G₀** son relativamente inactivas con respecto a la síntesis de macromoléculas y, en consecuencia, insensibles a muchos de los antineoplásicos, particularmente a los que afectan a esta síntesis. Los agentes quimioterapéuticos que actúan sobre las células en división más que sobre las células en **G₀** se denominan *específicos del ciclo celular*, mientras que aquellos que actúan también sobre las células en **G₀** reciben el nombre de *no específicos del ciclo celular*. A su vez, los específicos del ciclo celular pueden ser “fase específicos” si actúan sólo sobre alguna de las fases, o “no fase específicos”¹⁵

Sí el fármaco es *específico del ciclo celular* uno de sus mecanismos de acción será la activación de la apoptosis.

En el proceso de apoptosis se distinguen varias fases: en la fase **D₁** se producen los mecanismos moleculares que inician el fenómeno; en la fase **F** se fragmenta el DNA; en la fase **D₂** se produce la destrucción nuclear y citoplásmica, y los restos son fagocitados por macrófagos¹⁶. Los procesos morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis están mediados por *efectores de muerte celular* como las **caspasas**, pero existe evidencia de otros mecanismos apoptóticos que son independientes de éstas.¹⁷ Las caspasas son una subfamilia de cistein-proteasas constitutivas que se unen específicamente a residuos de aspartato las cuales son sintetizadas como polipéptidos de una sola cadena de manera inactiva (zimógenos) y son activadas por corte proteolítico¹⁸. Para que estos efectores actúen es necesario que el balance vida/muerte se rompa por la interacción de los *activadores de muerte celular*, extracelulares o intracelulares (por ejemplo: citocinas, algunos miembros de la familia de proteínas Bcl-2, entre otros).

Todo esto lleva a una serie de cambios morfológicos (los cuales fueron descritos en un principio por Kerr y col. mediante microscopía electrónica en el año de 1972) que incluyen la disminución del volumen celular asociado con la condensación del citoplasma y vacuolización, pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de membrana, ondulamiento en la membrana plasmática, condensación de cromatina, la fragmentación del DNA (tema que ampliaré más adelante), originadas por la activación de proteasas y endonucleasas, hasta la fragmentación y pérdida de la adhesión de la célula, formando pequeñas vesículas llamadas cuerpos apoptóticos aún rodeados de membrana donde se cambia de composición dándose una translocación de la fosfatidilserina a su superficie, la cual sirve de señal de reconocimiento para ser fagocitados por macrófagos.¹⁹ La formación de estos cuerpos apoptóticos son consecuencias directas de la actividad caspasa. Las caspasas en la apoptosis se pueden clasificar en dos grupos: las iniciadoras (de señalización o que activan a otras caspasa) como las 2, 8, 9 y 10; y las efectoras o ejecutoras como las 3, 6 y 7 que hidrolizan sustratos selectivos.²⁰

La activación de las caspasas es mediante dos rutas de señalización alternativas que se ilustran más adelante.

Una de las vías, es la **extrínseca**, la cual es iniciada por la unión de ligandos específicos a ciertos receptores de la superficie celular llamados *receptores de muerte*. Esta interacción lleva a la activación de la caspasa 8 quien comienza una cascada de señalización de otras moléculas llevando a la muerte celular.

La otra vía corresponde a la **intrínseca**, la cual es iniciada a nivel mitocondrial; es la que comúnmente inducen los agentes quimioterapéuticos, la radiación ultravioleta o las moléculas de estrés (ERO: especies reactivas del oxígeno); y que lleva a la conformación del apoptosoma, un complejo de proteínas que genera la activación de la caspasa 9 quien activa la cascada que llevará a la muerte por apoptosis.²¹

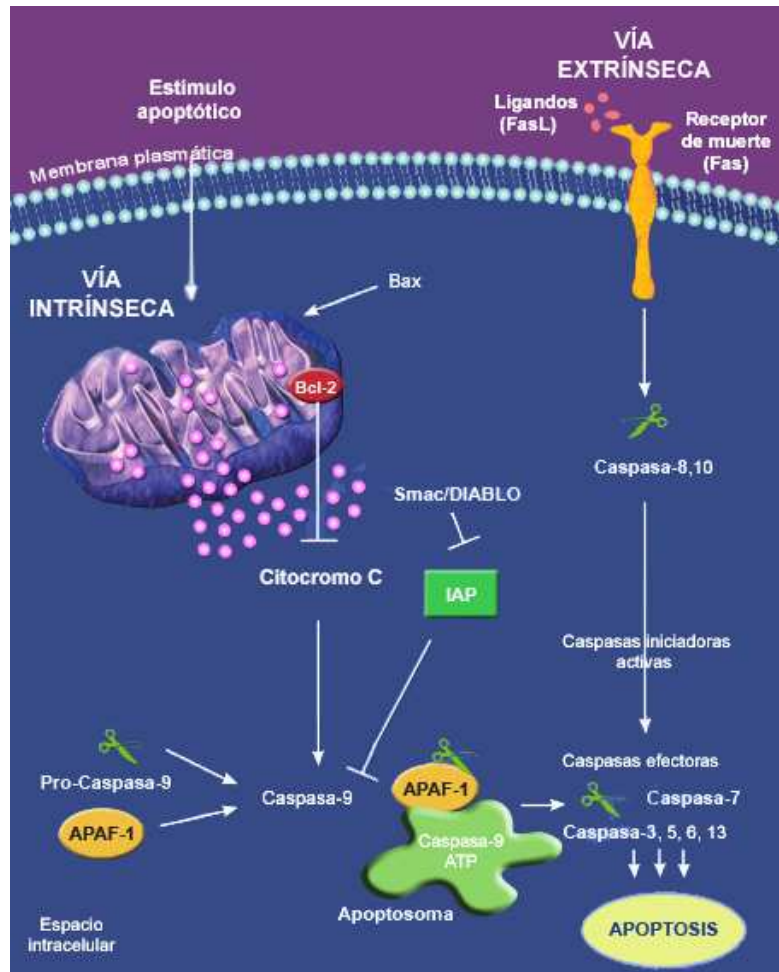


Fig. 3. Las dos principales vías de inducción de la apoptosis. Vía extrínseca o del receptor de muerte (TNF o ligando Fas/FADD/caspasa 8) y vía intrínseca o mitocondrial (familia Bcl-2/citocromo C/Apaf-1/caspasa 9).

1.3.1. Fragmentación internucleosomal de DNA.

Una de las distinciones bioquímicas de la apoptosis es la degradación de DNA endógeno, por acción de DNAsas endógenas, las cuales cortan regiones internucleosomales en fragmentos de doble cadena de DNA con 180 a 200 (bp) pares de bases. Los fragmentos resultantes presentan extremos romos así como extensiones de una sola base en extremo 3'.

Una amplia variedad de sustratos de caspasas están involucrados con la regulación de la estructura del DNA. Las enzimas responsables de la fragmentación durante la apoptosis incluyen el factor de fragmentación de DNA (DDF40) y la DNAsa activada por caspasas (CAD). DDF40 y CAD se encuentran inicialmente de manera inactiva y se activan selectivamente por unión con la caspasa 3 ó por otros miembros de la familia de las caspasas. La exposición del núcleo a CAD ó DDF40 es suficiente para inducir los cambios morfológicos típicos en la apoptosis.²²

Para demostrar la fragmentación internucleosomal de DNA se han empleado técnicas de identificación como la de *Patrón de escalera* en gel de electroforesis o mediante técnicas inmunocitoquímicas como TUNEL.

1.3.2. TUNEL²³

(TdT-mediated dUTP Nick End Labeling)

Este ensayo inmunocitoquímico permite observar en muestras de tejido o de cultivos celulares selectivamente aquellas células que contengan hebras de DNA fragmentadas.

El principio de esta técnica es la adición de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) la cual es altamente específica y adhiere a los extremos 3' –OH de las hebras fragmentadas de DNA algunos desoxirribonucleótidos que han sido previamente marcados (por ejemplo: con fluoresceína dUTP). Las muestras pueden observarse de manera directa por microscopía de fluorescencia y en caso alterno realizar una conversión de la señal para que sea detectada por microscopía óptica. Dicha conversión es mediante la adición de un anticuerpo específico que se adhiere a la molécula de marcaje del desoxirribonucleótido (anti-fluoresceína para el caso de fluoresceína) en combinación con una enzima

(por ejemplo peroxidasa: POD) la cual permitirá mediante la adición de un segundo sustrato específico para la enzima (en el caso de la POD, DAB diamino bencidina u otros) mostrar la reacción enzima-sustrato como una señal visible en microscopia óptica.

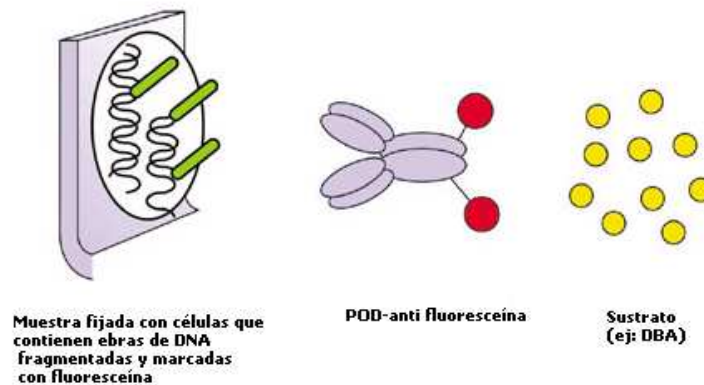


Fig.4. Principio de TUNEL.

Con la profundización acelerada en el conocimiento de esta vía de muerte celular, en menos de 15 años, una multiplicidad de fármacos ya se ha desarrollado incluso hasta nivel terapéutico teniendo como objetivo la modulación de la apoptosis.²⁴

Para alcanzar un nivel terapéutico en el camino del desarrollo de nuevas moléculas, se deben llevar a cabo en primera instancia las pruebas *preclínicas* pertinentes que demuestren su actividad, las cuales se dividen en 2 grupos principales:

🚩 **In Vitro.** Aquellas que se conservan en un ambiente artificial creado fuera de un organismo viviente, aislando un órgano o tejido.

🚩 **In Vivo.** Estudios conducidos dentro de un organismo completo (ej. ratón o rata) a cierto esquema de tratamiento mediante las cuales se obtiene información de toxicología y farmacocinética.

1.4. *In Vitro*

Ya que el empleo de modelos *In Vitro* permite determinar alteraciones microscópicas sin la necesidad de invertir en un modelo *In Vivo*, en junio de 1984, se presentó al **NCI** la propuesta de un protocolo de cernimiento de fármacos anticancerosos *In Vitro* con la finalidad de reemplazar los modelos murinos *In Vivo* de cernimiento primario de leucemia linfocítica P388 u otros modelos de transplatación de tumores.²⁵ Es hasta enero de 1985 que se aprueba el establecimiento de pruebas *In Vitro* mediante el empleo de líneas celulares.²⁶ Una vez aprobado el protocolo se afinó el método para estandarizarlo finalmente en el año de 1990,²⁷ donde los parámetros generales eran:

Panel de líneas celulares
60 líneas en total
7 subpáneos inicialmente
(Pulmón, colon, riñón, ovario, cerebro, melanoma y leucemia)
Líneas con 20 pases máximos partiendo del Stock (o cultivo madre)
Medio de Cultivo
RPMI 1640
5% suero
Densidad de la inoculación de células: 5000-40,000 células/pozo
(en placas de 96 pozos)
Preincubación: 24 h (sin fármaco)
Diluciones de rutina 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M
Duplicado de todas la concentraciones
 T_0 o "sin tratamiento" como control.
Tiempo de incubación con fármaco: 48 h.
Ensayo de punto final: tinción de proteína con Sulforrodamina B

Con esta herramienta, 5 años más tarde se había logrado probar más de 100,000 sustancias incluyendo compuestos puros, así como extractos naturales en el panel de 60 líneas y/o en los 7 subpáneos.

Todas los fármacos anticancerígenos surgen de una diversidad multiforme de fuentes que van desde los colorantes hasta agentes empleados durante la guerra, así como productos naturales de plantas, microorganismos y hongos.²⁸

1.5. Antineoplásicos

Históricamente, el descubrimiento de antineoplásicos tuvo su origen en el Siglo I, D.C. con Dioscorides y la colchicina, sustancia que en 1953 Amoroso demostró tener actividad antitumoral en animales de experimentación.²⁹

La importancia del empleo de compuestos metálicos en la medicina data del siglo XVI,³⁰ donde surgen los primeros reportes terapéuticos del empleo de metales o compuestos conteniendo metales en el tratamiento de cáncer.

En el transcurso del tiempo destaca la etapa de la química médica inorgánica estimulada desde hace más de 30 años por el descubrimiento del *cis*-diamino dicloro-platino(II), *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], CDDP o cisplatino que es introducido a la práctica clínica en 1971 (sólo cinco años después de haber determinado sus propiedades antineoplásicas) dando comienzo a la era de los compuestos de coordinación neutros con geometría cuadrar plana e inspirando más compuestos de naturaleza inorgánica como el carboplatino y oxaliplatino que también se emplean en la actualidad como tratamiento.

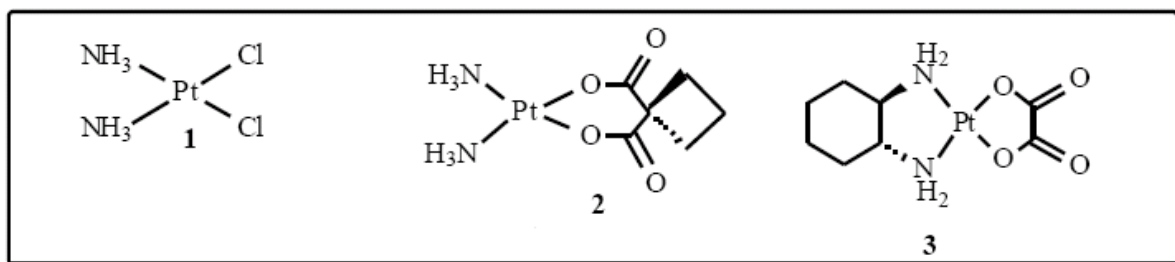


Fig. 5. Compuestos con centro de platino (1) cisplatino, (2) carboplatino, (3) oxaliplatino

El cisplatino ha sido útil en el combate de cáncer testicular, ovárico, cervical, de cabeza y cuello, de hígado y de pulmón. Sus propiedades se han adjudicado al centro metálico, quién al estar cargado positivamente favorece la unión a las biomoléculas cargadas negativamente como los aminoácidos constituyentes de las proteínas y los ácidos nucleicos.

El mecanismo de acción para el CDDP ya es conocido. Los datos recabados indican que el cisplatino entra a la célula a través de canales transmembranales. Una vez que el CDDP está dentro de la célula, la concentración de cloro cambia y el fármaco se hidrata intercambiando sus grupos Cl^- por OH^- para formar especies activas cargadas positivamente para una interacción subsecuente con nucleófilos nucleares.

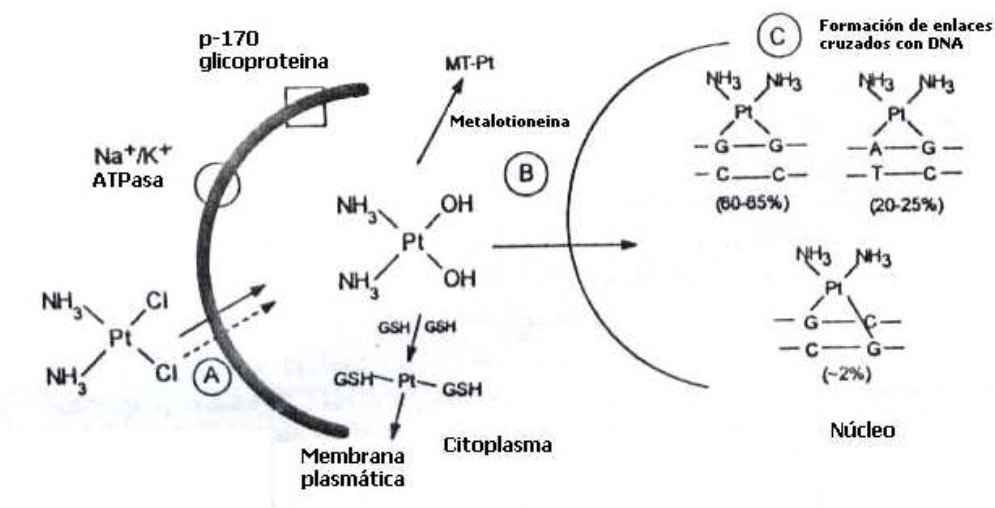


Fig.6. Mecanismo de acción del cisplatino. A) el cisplatino entra a la célula. B) Intercambio de iones cloro por hidroxilo. C) el cisplatino transformado en especie di-aqua reactiva entra al núcleo para formar entrecruzamientos con hebras de DNA³¹

Gran parte de los componentes celulares con sitios nucleofílicos como el DNA, RNA, proteínas, fosfolípidos de membrana, microfilamentos del citoesqueleto y moléculas con el grupo tiol reaccionan con el CDDP, y aproximadamente el 1% reacciona con DNA nuclear formando aductos de 3 tipos, como lo muestra la ilustración:

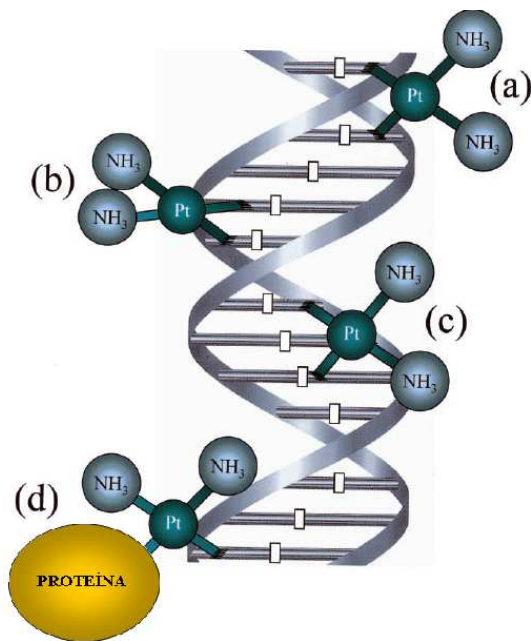


Fig. 7. interacción de cisplatino con DNA.³²

El entrecruzamiento de mayor proporción encontrado en un 60-65% (b) es la unión entre el Pt y el nitrógeno en posición 7 del anillo de imidazol adyacente de la deoxiguanosina a lo largo de la misma hebra. (GpG)

En un 20-25% (a) 1,3 unión cruzada intrahebra. (ApG)

Y en menor proporción de 2-3%, la unión cruzada intrahebra (c) G-G y la unión cruzada proteína-DNA (d).

De manera general se acepta que el DNA genómico es el sitio diana de la acción farmacológica citotóxica del CDDP. El CDDP que se une a DNA mitocondrial, interactúa con los fosfolípidos y la fosfatidilserina membranales, desarmando el citoesqueleto y afectando la polimerización de actina.³³ Todo este daño es suficiente para emitir las señales de reparación o la inducción de la vía de muerte celular apoptótica.

A pesar de su eficacia, este medicamento también tiene sus debilidades, y es ahí donde la terapia combinada abre nuevas opciones.³⁴ El CDDP carece de selectividad para el tejido tumoral, provocando neurotoxicidad, fallo renal y ototoxicidad, las cuales sólo son parcialmente reversibles cuando se ha detenido el tratamiento. En usos prolongados, se puede desarrollar anemia severa. Incluso se tiene registro del desarrollo de tolerancia celular adquirida a este fármaco y otros miembros que contienen platino u otros metales; estas células presentan acumulación del fármaco lo que afecta directamente el flujo en transportadores esenciales, como el de cobre.^{35, 36.}

Muy por encima de esto, el desarrollo del cisplatino se ve comúnmente como una historia prototipo de éxito, y el uso farmacéutico de complejos metálicos en la actualidad tiene gran potencial.

En los últimos años una amplia variedad de fármacos con base metálica han sido aprobados por la FDA para su uso clínico o para las pruebas de evaluación preclínica. Existe una base de datos compilada por Leadscope (Leadscope[®] Known Drugs database) que contiene 13,000 compuestos reportados en el periodo de enero de 1982 a diciembre de 2002, los cuales contienen iones metálicos o metaloides; entre los 44 elementos reportados se localizan varios metales de transición que incluyen al cobre (Cu). De una serie de 141 compuestos, sólo 12 pertenecen a la categoría de “antineoplásicos e inmunosupresores.”³⁷

Es así como el desarrollo de complejos metálicos no es una tarea sencilla. La acumulación de los iones metálicos en el cuerpo tiene efectos colaterales severos. La biodistribución y el aclaramiento de los complejos y su especificidad farmacológica deben tenerse en consideración. Por lo tanto la clave principal en la quimioterapia es eliminar las células cancerosas sin provocar daño significativo en el tejido sano.

Uno de los caminos para lograrlo es la posibilidad de emplear un metal esencial, como el cobre, en el centro metálico del fármaco.

1.6. Cobre y Casiopeínas^{®38}

El cobre (Cu) es un metal de transición considerado como esencial, en su estado de oxidación (2^+), la cantidad que se encuentra en el cuerpo humano es de 50 a 120 miligramos, que se concentra en órganos con alta actividad metabólica incluyendo el hígado, cerebro, riñones y corazón. Entre las muchas tareas del cobre está la producción de energía, la prevención de la anemia -ya que es necesario para el procesamiento del hierro- y enfermedades óseas, la detención del daño celular y la promoción de un apropiado desarrollo fetal.

En sistemas biológicos, sus propiedades químicas le permiten participar en procesos fundamentales que involucran la transferencia de electrones asociada a enzimas oxidativas, por ejemplo: hemocianina, citocromo oxidasa y superóxido dismutasa. El cuadro a continuación resume funciones de ciertas enzimas y proteínas de cobre:

Función	Proteína de cobre (enzima)	Número EN	Número de átomos de cobre (en subunidad)	Peso molecular	Distribución
Transporte de O_2	hemocianina		2	$7-8 \times 10^6$	cefalópodos, gasterópodos crustáceos, etc.
Dismutación de O_2^-	superóxido dismutasa	1.15.1.1	2	35 000 ^a	eritrocito de mamíferos
Oxidación del Fe^{2+}	ceruloplasmina	1.16.3.1	2	30 000 ^b	hígado, cerebro
Oxidación del citocromo c	citocromo c oxidasa	1.9.3.1	8	151 000	suero humano
			2		mitocondria
			(+ hemo a + hemo a ₃)		
Oxidación de substratos orgánicos	tirosinasa	1.14.18.1	4	119 000 ^c	tejidos de mamíferos, etc.
	lacasa	1.10.3.x	4-6	120 000-141 000	<i>Rhus vernicifera</i>
	ascorbato oxidasa	1.10.3.3	4	60 000	<i>Polyporus versicolor</i>
	monoamino oxidasa	1.4.3.6	8	140 000	calabaza, pepino, etc.
	diamino oxidasa	1.4.3.6	1	170 000	plasma bovino
	D-galactosa oxidasa	1.1.3.9	1	96 000	plántulas de guisantes
			1	75 000	<i>Dactylium dendroides</i>
Monooxigenación	tirosinasa	1.14.18.1			
	dopamina-β-hidroxilasa	1.14.17.1	2	290 000	médula adrenal de bóvidos
Transporte de electrones (proteínas azules)	azurina		1	14 000	<i>Bordetella pertussis</i>
	plastocianina		2	21 000	espinacas, <i>Chlorella</i> , etc.
	estelacianina		1	16 800	<i>Rhus vernicifera</i>

^a Anteriormente eritrocupreina

^b Anteriormente hepatocupreina, cerebrocupreina

^c De los hongos

Fig. 8. Tabla de proteínas y enzimas del cobre. El número EN, corresponde a la designación (EC) por código de *Enzyme Commission Number* clasificadas por las reacciones que catalizan.

Los estados de oxidación más importantes del cobre son Cu(I) y Cu(II), siendo una de las estructuras más frecuentes de los complejos de Cu(II) la plana cuadrada y pirámide de base cuadrada; son normalmente verdes o azules y paramagnéticos (con electrones desapareados). Este centro metálico, puede participar en ciclos redox para liberar especies reactivas de oxígeno que pueden oxidar proteínas, lípidos, azúcares, RNA y DNA, como sucede en la reacción de Fenton, donde una alteración del funcionamiento de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa podría producir radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno catalizado por cobre Cu(II).

Las Casiopeínas[®]

Las Casiopeínas[®] son un grupo de compuestos de coordinación de cobre(II) con dos ligantes bidentados: un ligante de tipo diimina (N-N) que puede ser fenantrolina o bipyridina con diferentes sustituyentes y un segundo ligante cargado de tipo α -aminoacidato (N-O) o donador (O-O) acetilacetato.

Surgen en el año de 1980 diseñadas por la Dra. Lena Ruiz Azuara; para tener actividad antineoplásica; quien tomó en consideración tres factores principales para su síntesis⁴⁰:

1. Deben contener un metal esencial para disminuir la toxicidad.
2. Que contengan quelatos que favorezcan la configuración *cis* alrededor del ión metálico.
3. Que los quelatos mixtos presenten distintos grados de hidrofobicidad (ej: diimina)

La variabilidad en el tipo, número y posición de los ligantes, son los responsables de su actividad. Confiriéndoles la posibilidad de interactuar con las bases del DNA y la polaridad necesaria para su transporte.

En consecuencia a los distintos ligantes y sustituyentes, existe más de 100 compuestos y una clasificación para estos era necesaria, dando como resultado **IX familias** que se muestran en seguida:

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

Fig. 9. Sub familias de las Casiopeínas®

Por tanto, estos nuevos compuestos de coordinación apuntan a ser una alternativa más económica, por ser de producción nacional y prometedoramente más eficaz.

Los primeros reportes para estas moléculas indicaban su actividad antineoplásica *In Vivo* en implantes de tumores en ratones de líneas de leucemia L1210, sarcoma S180, melanoma B16, y una clona del linfoma L5178Y llamada Lw.1, presentando además una baja toxicidad aguda.⁴¹

Con este hallazgo experimental y en la búsqueda del mecanismo de acción, se demostraba tiempo después que estas moléculas interaccionan directamente con el DNA, por los resultados de mutagenicidad en *Drosophila melanogaster*^{42,43} y mediante electroforesis de agarosa evidenciaron que existían uniones fuertes con las bases específicas del DNA, para la familia I. II y III.⁴⁴

Años más tarde, en las evaluaciones experimentales sobre células de mamífero (SPD8, línea celular mutada de células V79 de hamster Chino) se dio a conocer que los porcentajes de mutaciones que producen las Casiopeínas® no son tan

altos como para representar un factor de inducción de un tumor secundario, como sucede con otras terapias antineoplásicas.⁴⁵

De manera específica, hoy en día se sabe que existe la inducción de daño oxidativo como mecanismo de citotoxicidad⁴⁶ y que efectivamente la Casiopeína[®] II-gly degrada el DNA mediante un mecanismo dependiente de oxígeno, obtenido probablemente de la formación directa de ERO como el radical hidroxilo ([•]OH), responsable de la ruptura de las hebras.^{47,48} *In Vivo*, la formación de dichos radicales libres por esta Casiopeína[®] II-gly es más compleja, afectando a los eritrocitos, pero tal hematotoxicidad se ve compensada por mecanismos hematopoyéticos revirtiéndose a los 15 días de la administración del fármaco vía intravenosa en un modelo con ratas.⁴⁹

Los principales mecanismos de toxicidad tanto para la Casiopeína[®] II-gly como para la III-ia se producen particularmente a nivel de corazón y de pulmón⁵⁰. Esto acorde a que desacoplan la cadena respiratoria por la inhibición de piruvato, 2-oxoglutarato deshidrogenasa y creatina cinasa, mostrando disminución sobre todo a nivel mitocondrial de la fosforilación oxidativa y del contenido de ATP en células tumorales.^{51,52} Ambas Casiopeínas[®] coinciden en que la inhibición producida sobre la vía glucolítica es más sensible que sobre β -oxidación y que su cardiotoxicidad es menor en comparación con el fármaco antineoplásico adriamicina.⁵¹

Estas moléculas también presentan mayor potencia antineoplásica *In Vitro* en varias líneas tumorales al compararlas con un fármaco de uso regular como el CDDP⁵³.

Se ha reportado *In Vitro* que del mismo modo que sucede con el CPPD, para algunas Casiopeínas[®] la vía de inducción de apoptosis es dependiente de caspasas. Con la Casiopeína[®] II-gly, esto se produce en células murinas de leucemia L1210 y células humanas de carcinoma de ovario CH1, tanto en células sensibles, como refractarias a cisplatino, donde se observó la condensación de

cromatina y fragmentación nuclear⁵⁴. Además *In Vitro* e *In Vivo* se cuenta con la evidencia experimental de que esta misma Casiopeína[®] induce apoptosis por las 2 vías (caspasas y no caspasas dependiente de la dosis empleada) sobre glioma C6.⁵⁵

Por otra parte, en el caso de la Casiopeína[®] III-ia se ha demostrado que el mecanismo de apoptosis *In Vitro* es dependiente de caspasas sobre la línea celular de adenocarcinoma de colon HCT-15.⁵⁶

Recientemente, los efectos antineoplásicos apoptóticos para la Casiopeína[®] II-Igy y III-ia se detectaron también en células de meduloblastoma, un cáncer de sistema nervioso central muy agresivo, que afecta principalmente a la población infantil.⁵⁷

Hasta el momento todos estos datos biológicos y los químicos y fisicoquímicos han determinado a 2 de las Casiopeínas[®] más efectivas: **II-gly** y **III-ia**, y sobre todo de baja toxicidad; colocándolas así en el rumbo para las fases clínicas.⁵⁸

Los estudios de correlación estructura-actividad QSAR ⁵⁹ mostraron que 6 Casiopeínas[®] (I-gly, VI-gly, VIII-gly, III-Ha, III-La y III-Ea) son más activas incluso que las hasta ahora evaluadas, en base al diseño que plantea que de alguna manera la sustitución en las diiminas modifica el grado de actividad y la modificación del ligante iónico (N-O u O-O) es la responsable de la selectividad del fármaco hacia el tipo de tumor.

2. Hipótesis

Sí los sustituyentes periféricos de la fenantrolina de las Casiopeínas[®] son determinantes en el efecto apoptótico y citotóxico la magnitud de dicho efecto sobre las distintas líneas celulares dependerá de la naturaleza y posiciones de dichos sustituyentes.

3. Objetivos

El objetivo del presente trabajo es comparar el efecto citotóxico por medio de la evaluación *In Vitro* de la CI_{50} (Concentración Inhibitoria 50) para 5 distintas Casiopeínas[®] (I-gly, VIII-gly, III-Ha, III-La y III-Ea) que tiene en común el ligante de fenantrolina con variaciones en los sustituyentes periféricos.

Se realizará en 3 líneas tumorales MCF-7, HeLa y HCT-15 a través del protocolo establecido por el NCI (por sus siglas en inglés: **N**ational **C**ancer **I**nstitute), mediante la detección espectrofotométrica de la proliferación celular con SRB.

Se desea también conocer el efecto apoptótico, dependiente de la CI_{50} obtenida, empleando la técnica TUNEL (por las siglas en inglés: **TdT** (*terminal dideoxynucleotidyl transferase*)-mediated **dUTP Nick End Labeling**) para la detección indirecta de la fragmentación de DNA originada en el mecanismo apoptótico o muerte celular programada, empleando esto como un marcador parcial del efecto y mecanismo del fármaco como antitumoral.

4. Metodología.

Materiales

1. Material biológico

Líneas celulares tumorales:

- ✓ HCT-15 (adenocarcinoma de colon)
- ✓ HeLa (carcinoma cérvico-uterino)
- ✓ MCF-7 (carcinoma mamario)

HCT-15

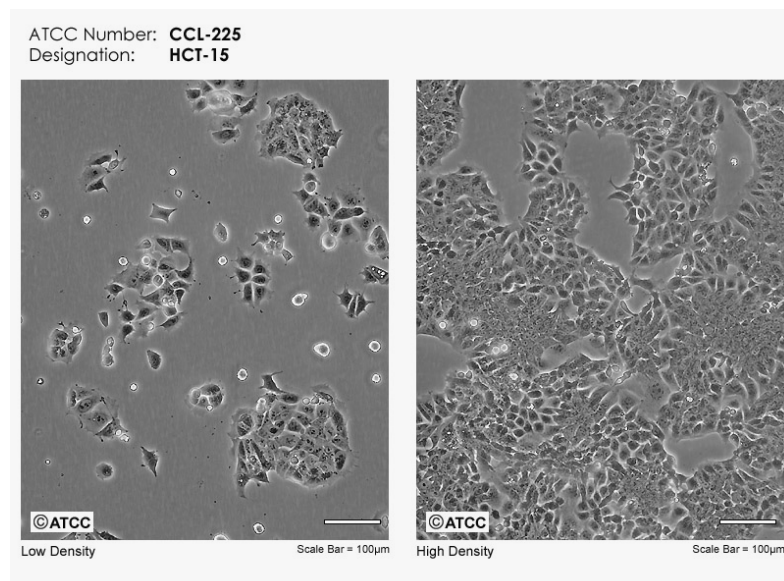


Fig. 9. Micrografía de morfología celular normal para la línea celular HCT-15, del lado izquierdo de la imagen se muestran células en baja densidad, en el lado derecho células en confluencia⁶⁰

Organismo de origen: *Homo sapiens* (humano)

Propiedades de crecimiento: *adherente*

Fuente: **órgano**, colon.

Estadío del tumor: Tipo C de Duke

Tipo: adenocarcinoma colorrectal

MCF-7

ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**

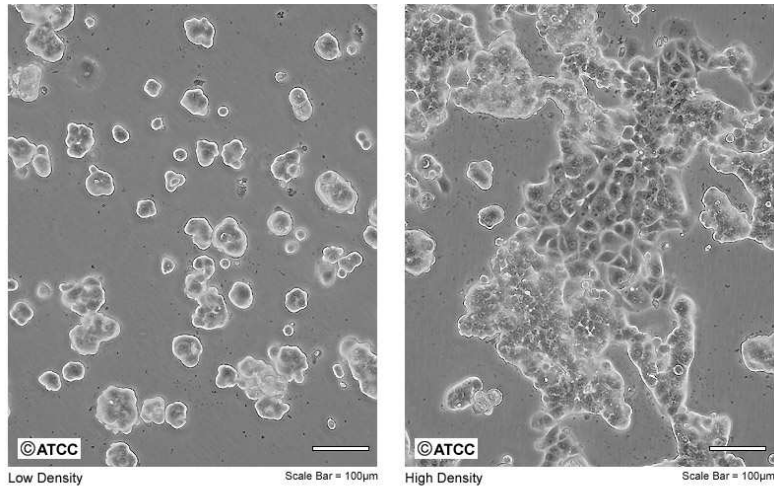


Fig. 10. Micrografía de morfología celular normal para la línea celular MCF-7, del lado izquierdo de la imagen se muestran células en baja densidad, en el lado derecho células en confluencia⁶¹

Organismo de origen: *Homo sapiens* (humano)

Propiedades de crecimiento: *adherente*

Morfología: *epitelial*

Fuente: **órgano**, glándula mamaria, pecho.

Tipo: adenocarcinoma epitelial; derivado del sitio metastático por efusión pleural.

HeLa

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**

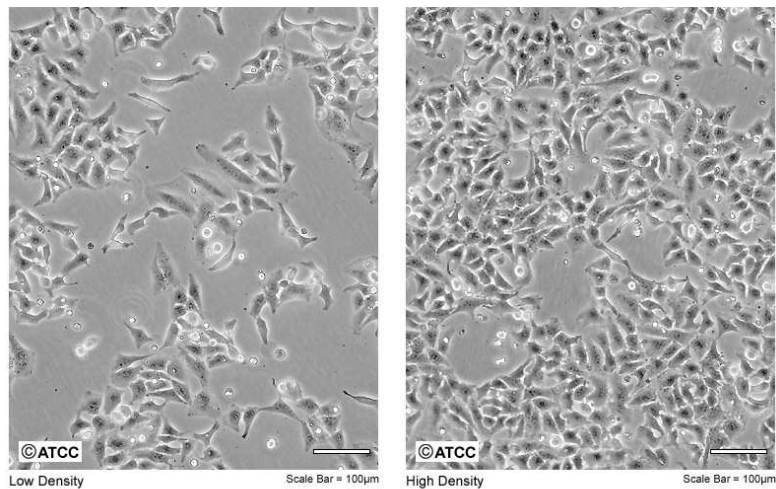


Fig. 11. Micrografía de morfología celular normal para la línea celular HeLa, del lado izquierdo de la imagen se muestran células en baja densidad, en el lado derecho células en confluencia⁶²

HeLa

Organismo de origen: *Homo sapiens* (humano)

Propiedades de crecimiento: *adherente*

Morfología: *epitelial*

Fuente: **órgano**, cérvix

Tipo: adenocarcinoma, epitelial

2. Fármacos

Antineoplásicos:

✓ Cisplatino

CDDP

Cis-diaminodicloroplatino(II)

Premion®, Pt 64.5% min

CAS # 15663-27-1

Lot. 23745R Alfa Aesar

P.M. 300.06 g/mol

✓ Casiopeínas®

Familias I y VIII:

- Cas I-gly.
- Cas VIII-gly

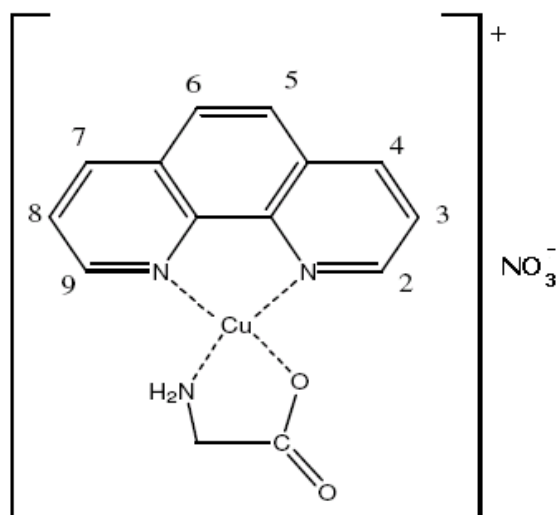
Familia III:

- Cas III-Ea
- Cas III-La
- Cas III-Ha

Las Casiopeínas[®] fueron sintetizadas en el Laboratorio de Química Inorgánica y Nuclear de la División de Estudios de Posgrado, Edificio B, de la Facultad de Química, UNAM por la M. en C. María Elena Bravo Gómez, a quien agradecemos esta colaboración.

Familias I y VIII.

Donador de tipo N-O de tipo aminoacido: glicina



- Cas I-gly.

Lote: 190MBG010506

Nitrato de acua (4,7-difenil-1,10-fenantrolina) (glicinato) cobre(II)

P.M. 568.06 g/mol

- Cas VIII-gly

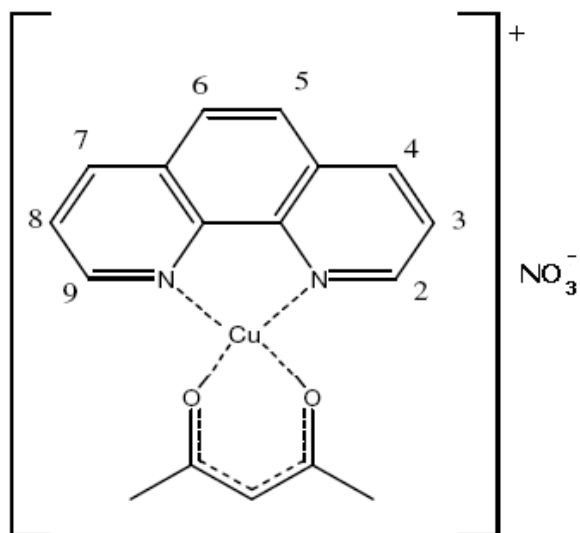
Lote: 195MBG120907.

Nitrato de acua (3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina) (glicinato) cobre(II)

P.M. 435.9 g/mol

Familia III

Donador de tipo O-O; acetilacetato.



- Cas III-Ea

Lote: 188MBG200306

Nitrato de (4,7-dimetil-1,10- fenantrolina) (acetilacetato) cobre(II)

P.M. 453.94 g/mol

- Cas III-La.

Lote: 193MBG050907

Nitrato de (5,6-dimetil-1,10- fenantrolina) (acetilacetato) cobre(II)

P.M. 468.08

- Cas III-Ha

Lote: 177MBG130405

Nitrato de (4,7-difenil-1,10- fenantrolina) (acetilacetato) cobre(II)

P.M. 575.08 g/mol

3. Material de Laboratorio

- ✓ Tubos Eppendorf 1.5 mL
- ✓ Criotubos
- ✓ Termómetro
- ✓ Cajas de cultivo estériles de 25 mL
- ✓ Placas de 96 pozos estériles
- ✓ Portaobjetos cultivo 8 pozos, inmunocitoquímica.
- ✓ Cubreobjetos.
- ✓ Pipetas Pasteur de vidrio
- ✓ Gradillas para tubos Falcon
- ✓ Gradillas para tubos Eppendorf
- ✓ Tubos cónicos Falcon: 15mL, 50mL, de propileno, nuevos y estériles.
- ✓ Puntas para micropipetas: 1.5 µL, 2.5µL, 10 µL, 200 µL, 1000 µL, nuevas y estériles.
- ✓ Filtros de membrana 0.22 µm.
- ✓ Cámara de Neubauer Marienfeld®
- ✓ Matraz Kitasato con sistema de manguera para vacío.
- ✓ Tinas estériles.

4. Equipo

- ✓ Centrifuga Becton Dicckinson J 600
- ✓ Campana de flujo laminar clase II Telstar mini-V / PCR
- ✓ Horno de microondas
- ✓ Lector de microplacas Labsystems Multiskan MS
- ✓ Balanza analítica Ohaus ® analytical plus AP25000
- ✓ Micropipetas Eppendorf 2 – 10 µL
- ✓ Micropipeta Eppendorf 10 - 100 µL
- ✓ Micropipeta Eppendorf 100 - 1000 µL
- ✓ Incubadora con CO₂ Lab-line
- ✓ Microscopio invertido Iroscope SI-PH
- ✓ Refrigerador
- ✓ Ultracongelador (-70°C) Revco ®
- ✓ Vortex
- ✓ Autoclave
- ✓ Ultracongelador
- ✓ Baño maría
- ✓ Microscopio óptico Olympus CH-2
- ✓ Bomba de vacío Cole Parmer ® L-79200-0

5. Reactivos

- ✓ Agua destilada
- ✓ PBS
- ✓ Tripsina-EDTA
- ✓ PBS-Albúmina
- ✓ Tris-base 10 mM (pH=10.5)
- ✓ Tris-buffer salino con tween 20 (pH=7.6) DakoCytomation
- ✓ Suero fetal bovino SFB gold PAA
- ✓ Aminoácidos no esenciales Gibco®
- ✓ Antibióticos (penicilina/ estreptomicina) Gibco ®
- ✓ Etanol
- ✓ Ácido acético glacial
- ✓ Agua destilada
- ✓ Resina
- ✓ Etanol 70%
- ✓ DMSO concentrado
- ✓ Medio de cultivo RPMI-1640 Sigma cell culture ®
 - L-glutamina
 - NaHCO₃
- ✓ Medio de cultivo D-MEM Gibco®
 - 4.5 g/L D-glucosa
 - 110 mg/L piruvato de sodio
 - L-glutamina
- ✓ Sulforrodamina B 0.4% (p/V)
- ✓ Ácido acético 1%
- ✓ Ácido tricloroacético 10%
- ✓ Azul tripano. 0.4% Gibco ®
- ✓ Kit: In Situ Cell Death Detection Kit, POD de *Roche Applied Science*.
- ✓ Solución recuperadora de antígenos Target retrieval.
- ✓ Bloqueador de peroxidasas BioSB Mouse/Rabbit
- ✓ Diaminobencidina DBA Dako

4.6. Metodología experimental

El procedimiento que se describe a continuación se realizó para cada una de las líneas celulares.

a. Descongelamiento de las líneas celulares

1. Retirar los criotubos del tanque con nitrógeno líquido o el ultracongelador a -70°C .
2. Descongelar con frotación manual de manera paulatina el criotubo con la línea celular, hasta que el hielo inicial luzca como suspensión líquida.
3. Dentro de la campana de flujo laminar colocar la suspensión celular a un tubo Falcon que contenga 10 mL de PBS-albúmina (medio D-MEM o medio de lavados).
4. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm.
5. Desechar el sobrenadante
6. Resuspender en 1 mL de medio de cultivo suplementado con los siguientes elementos:
 - Suero fetal bovino (10 %)
 - Aminoácidos no esenciales (1%)
 - Antibióticos (1%)

b. Viabilidad

1. En un tubo Eppendorf colocar 20 μL de la suspensión de células y 80 μL de la solución de azul de tripano.

El azul de tripano es un colorante vital que permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas de color azul). La tinción es posible por la falta de integridad de la membrana plasmática de las células lo que permite que el colorante se incorpore el espacio intracelular.

2. Se mezcla perfectamente y se transfiere a las dos secciones de la cámara de Neubauer.

3. Contar el número de células teñidas y no teñidas por mm² (objetivo 10X); se recomienda realizar la cuenta entre 100 y 500 células por mm². (Se contabilizan los cuatro cuadros grandes con 16 cuadros cada uno y se saca un promedio)
4. Calcular la viabilidad y el número de células por mL de suspensión.

Cálculo de número de células:

$$C = N \times 5 \times 10^4$$

Donde: C = células por mL
N = promedio de las células contadas
5 = factor de dilución empleado (20/80)
10⁴ = factor de conversión de la cámara

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = [(A - B)/A] \times 100$$

Donde:
A = total de células contadas
B = células teñidas

El porcentaje de viabilidad, debe superar el 50% para continuar con el procedimiento de cultivo celular.

c. Obtención del cultivo stock y confluencia

1. Sembrar en las botellas de cultivo de acuerdo a la capacidad de éstas.
2. Incubar a 37°C ± 2°C y 5% de CO₂ durante 1 hora.
3. Después de éste tiempo hacer cambio de medio de cultivo.
4. Revisar diariamente el cultivo para estimar el porcentaje de confluencia y el desarrollo de la morfología adecuada a la línea celular.
5. Cambiar el medio de cultivo cada 48 h.
6. Al tener el cultivo entre el 70 y 90% de confluencia se realiza la tripsinización.

d. Tripsinización o cosecha

1. Aspirar el medio de cultivo de las cajas de cultivo, teniendo la precaución de no alterar la monocapa de células adherida.
2. Lavar con 5 mL de PBS estéril (opcional)
3. Adicionar los mL necesarios de Tripsina-EDTA de acuerdo a la capacidad de las botellas de cultivo (25 cm² un 1 mL y 75 cm² 4 mL).
4. Dejar unos minutos las cajas a T ambiente y dar pequeños golpecitos para favorecer el desprendimiento de las células. También se pueden colocar en la incubadora durante unos minutos (opcional)
5. Observar al microscopio y las células deben encontrarse desprendidas de la superficie y disgregadas individualmente.
6. Detener inmediatamente la reacción de tripsina; adicionar 5 mL de PBS-albúmina estéril, o medio de lavados y en algunos casos se utiliza medio de cultivo caducado a cada caja de cultivo, resuspender vigorosamente.
7. Colocar en un tubo Falcon de 15 mL
8. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
9. Desechar el sobrenadante.
10. Resuspender el paquete celular en 1 mL de medio de cultivo.
11. Este es el mL de cultivo stock y el que se usó para todas las pruebas.

e. Cuantificación celular

1. En un tubo Eppendorf colocar 20 μ L de la suspensión de células y 80 μ L de la solución de azul de tripano.
2. Se mezcla perfectamente y se transfiere a las dos secciones de la cámara de Neubauer.
3. Contar el número de células no teñidas (viables) por mm² (objetivo 10X); se recomienda realizar la cuenta entre 100 y 500 células por mm². (Se cuentan los cuatro cuadros grandes y se saca un promedio)
4. Calcular el número de células por mL de suspensión, de la misma manera que se realizó en el porcentaje de viabilidad.

f. Ensayo de inhibición de la proliferación celular

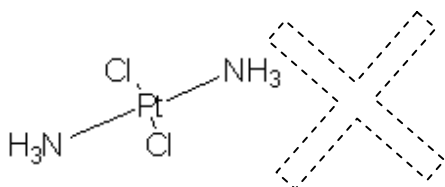
1. Preparar una dilución celular de 10^6 células/mL.
2. Adicionar 100 μ L de medio de cultivo suplementado en cada pozo de las placas para cultivo, placas de 96 pozo tipo ELISA.
3. Colocar 20 μ L de la dilución celular en cada pozo (20,000 células aproximadamente).
4. Incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h, para que se recupere de la tripsinización.
5. Aspirar el medio y adicionar 90 μ L de medio con SFB y 10 μ L de cada una de las concentraciones preparadas de los fármacos (**tabla 1**)

Preparación de las concentraciones de fármacos:

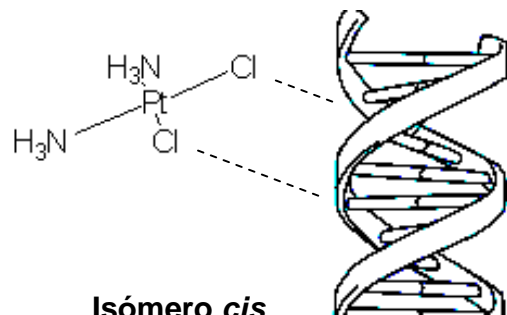
CISPLATINO

- Pesar 1 mg, disolver en un tubo Eppendorf con 200 μ L de DMSO.
- Tomar 20 μ L de la solución anterior y llevar a un volumen de 980 μ L. de agua previamente filtrada.
- De la segunda preparación tomar 100 μ L y llevar a 900 μ L y subsecuentemente 2 veces más.

Tanto la dilución como la adición de fármaco en el caso de CDDP, deben realizarse en un lapso de tiempo menor a los 30 minutos correspondiente a la vida media en solución de este fármaco; pasado este tiempo se transforma del isómero *cis* al isómero *trans*, que es inactivo, debido a que los ángulos geométricos de la forma plana 90° se convierten a 180°, lo que modifica la manera en la que se intercala con las hebras del DNA.⁶³



Isómero *trans*



Isómero *cis*

CASIOPEÍNAS[®]

- Pesar 1 mg, disolver en un tubo Eppendorf con 200µL de agua previamente destilada y filtrada. Todas las Casiopeínas[®] se disolvieron en agua, ya que ésta le confiere estabilidad proporcionando moléculas de agua en posición apical dentro de la geometría del compuesto.
- Tomar 20 µL de la solución anterior y llevar a un volumen de 980 µL. de agua previamente filtrada y colocada en tubos Eppendorf irradiados y estériles.
- De la segunda preparación tomar 100 µL y llevar a 900 µL y subsecuentemente 2 veces más.

Las concentraciones obtenidas serán las que se muestran en la **tabla 1**.

Antineoplásico	Concentraciones (µg/mL)			
Casiopeína [®]	0.01	0.1	1.0	10
Cisplatino	0.01	0.1	1.0	10
Blanco de proliferación	Células + medio de cultivo			

Tabla 1. Ensayo *In Vitro* de inhibición de proliferación celular.

6. Una vez adicionado el fármaco, incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante 24h.
7. Al término de las 24 horas, aspirar el medio y fijar las células con 100 µL de ácido tricloacético al 10% durante 1 h a 4°C.
8. Lavar 5 veces la placa con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente.

g. Tinción con sulforrodamina B

1. Adicionar 50 µL de la solución de sulforrodamida B al 0.4% (p/v en ácido acético) en cada uno de los pozos.

2. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar 5 veces con ácido acético al 1%. (Tener cuidado de aspirar todo el ácido en cada lavado).
4. Dejar secar a temperatura ambiente.
5. Solubilizar el colorante celular con 100µL de Tris Base 10 mM (pH=10.5) durante 5 minutos con agitación mecánica suave.
6. Leer en un lector de microplacas a una longitud de onda de 564 nm.
7. Determinar en cada línea y compuesto la capacidad para inducir el 50% de la inhibición de la capacidad proliferativa. Se considera la proliferación celular máxima de los cultivos control.

h. Determinación de la CI_{50}

Determinar en cada dosis la capacidad para inducir el 50% de la inhibición de la capacidad proliferativa. Se considera la proliferación celular máxima (100%) de los cultivos control, sin tratamiento.

Partiendo que la absorbancia leída para el control corresponde al 100%, se calculó el porcentaje que permanece de células vivas teñidas considerando el la absorbancia particular de cada pozo y el promedio por concentración.

Ejemplo:

	CONTROL Sin fármaco	C = 0.01µg/mL	C = 0.1 µg/mL	C = 1.0 µg/mL	C = 10 µg/mL
ABS 1	0.201	0.158	0.126	0.098	0.091
ABS 2	0.179	0.134	0.099	0.1	0.083
ABS 3	0.199	0.144	0.111	0.09	0.08
<i>PROMEDIO DE ABSORBIENCIAS</i>	<i>0.193</i>	<i>0.1453</i>	<i>0.112</i>	<i>0.096</i>	<i>0.0846</i>
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0.0121	0.0120	0.0135	0.0052	0.0056
PORCENTAJE DE PROLIFERACIÓN CELULAR	100.00 %	75.302	58.031	49.741	43.869

Tabla 2. Resultados de Absorbancias (ABS) obtenidos para Casiopeína[®] VIII-gly en la línea HCT-15.

Cálculo de porcentaje de proliferación, empleando la Ley de Lambert y Beer que relaciona de manera lineal un valor de (**A**) absorbancia de una solución de manera directamente proporcional a la (**C**) concentración de la misma; en este caso asociamos la absorbancia con el porcentaje de proliferación celular y posteriormente con la concentración que causó esta inhibición en la línea celular.

ABS Control = 0.193 → 100%

ABS promedio = 0.1453 → **x** %

x = $(0.1453 \times 100 / 0.193) = 75.3 \%$

Para cada concentración y cada línea se realizó por triplicado, es decir que finalmente se obtienen 9 lecturas de absorbancia, que se convierten en los 3 porcentajes de inhibición respectivos, permitiendo así mayor confiabilidad estadística, conservando una serie de blanco, es decir una línea de pozos que contienen las mismas células tratadas, pero sin fármacos en cada caso.

El empleo del cisplatino (CDDP) tiene la finalidad de utilizar una referencia de compuesto comercial de uso terapéutico con el cual sea factible comparar la magnitud del efecto a las mismas concentraciones.

Posteriormente se integran todos estos resultados de porcentajes de proliferación y concentraciones empleadas al programa *StatPlus 2005 Professional 3.5.2.1*. Este programa tiene como propiedad realizar de manera automática la correspondencia de datos finales para los triplicados y calcula mediante una interpolación la **CI₅₀**, es decir la concentración de fármaco que produce un 50% de inhibición en el crecimiento celular, con un nivel de significancia del 5%.

Una vez determinada las **CI₅₀** para cada una de las líneas y cada uno de los tratamientos, se procedió a la determinación de apoptosis por Inmunocitoquímica (TUNEL).

i. Inmunocitoquímica (TUNEL).

- **Placas de cultivo.**

1. Se marcan los portaobjetos de 8 pozos con lápiz de gráfico con los datos de la línea y el tratamiento.



2. Se preparan las placas de cultivo para inmunocitoquímica, sembrando en cada pozo 20,000 células (20 μ L de suspensión celular preparada en el momento), adicionando medio de cultivo suplementado suficiente para cubrir el área (200 μ L).
3. Las placas se colocan en la incubadora por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ para su recuperación y la formación de una monocapa en el fondo de la placa.
4. Al término de las 24 horas se aspira el medio y se adiciona 90 μ L de medio fresco suplementado y 10 μ L de cada una de las **CI₅₀** de las **Casiopeínas[®]** y del **cisplatino**.
5. Se incuban por 24 horas bajo las mismas condiciones a 37°C y 5% de CO₂.
6. Al término de la incubación los cultivos se fijan con una mezcla de etanol-ácido acético-agua (90mL-5mL-5mL), adicionando a cada pozo 500 μ L por 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Se desprende la parte superior de las placas, dejando expuesta la capa ya fijada.
8. Se colocan en el microondas en una tina a la que se adicionan 100mL de solución recuperadora de antígenos (pH 6.0, dilución 10X) durante 10 minutos, potencia 10, 1000 watts.
9. La solución luce turbia al término y se deja en reposo hasta el enfriamiento.
10. Las placas se retiran de la solución y se lavan con Tris-buffer Tween20 pH 7.6.

11. Se adiciona bloqueador de peroxidasas al 3% para el bloqueo de peroxidasas endógenas durante 5 minutos.
12. Se retira el bloqueador y se secan las orillas de las placas, con la finalidad de que en la siguiente adición se eviten derrames.

- **Adición de la reacción de TUNEL**

El kit *In Situ Cell Death Detection Kit, POD* de Roche Applied Science está integrado por 2 viales principales:

- Solución enzimática: (TdT) desoxinucleotidil transferasa terminal de timo de becerro recombinante en *E.coli*, en buffer de almacenamiento. Concentración 10X.
- Solución de marcaje: (fluorescein-dUTP) mezcla de nucleótidos en buffer, marcados con fluoresceína C. 1X.

1. Se realiza la mezcla de ambos en proporción 50 μ L de sol. enzimática por 450 μ L de solución de marcaje, de esta mezcla se adicionan 150 μ L a cada placa, cubriendo la superficie de células en su totalidad.
2. Las placas se colocan en una cámara humedecida con buffer, evitando que se sumerjan, y ésta se coloca en incubación en oscuridad durante una hora.
3. Al término de este tiempo se retiran de la incubadora, se lavan con buffer nuevamente y se colocan en reposo durante 5 minutos.
4. Secar nuevamente las orillas adicionar 50 μ L del convertidor – POD (enzima peroxidasa) e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
5. Lavar con buffer una vez más.
6. Adicionar DAB diamino bencidina (cromógeno; diluida en buffer 1mL/1gota con mezclado muy suave) por 5 minutos.
7. Lavar nuevamente.
8. Realizar el contrateñido con hematoxilina de Mayer's por 5 minutos.
9. Enjuagar con agua y dejar secar.
10. Finalmente las muestras son deshidratadas y cubiertas con resina para su posterior observación al microscopio.

5. Resultados

Sección 1. Porcentajes de inhibición celular

En primera instancia se muestra a manera de ejemplo una de las placas de 96 pozos, en donde es posible observar la coloración de la Sulforrodamina B y como ésta se va modificando con relación a la concentración agregada del tratamiento; es decir que a una mayor concentración hay una disminución en la proliferación celular, por tanto existirá una cantidad menor de células teñidas por pozo respecto al carril control en donde las células siguen un curso normal de proliferación.

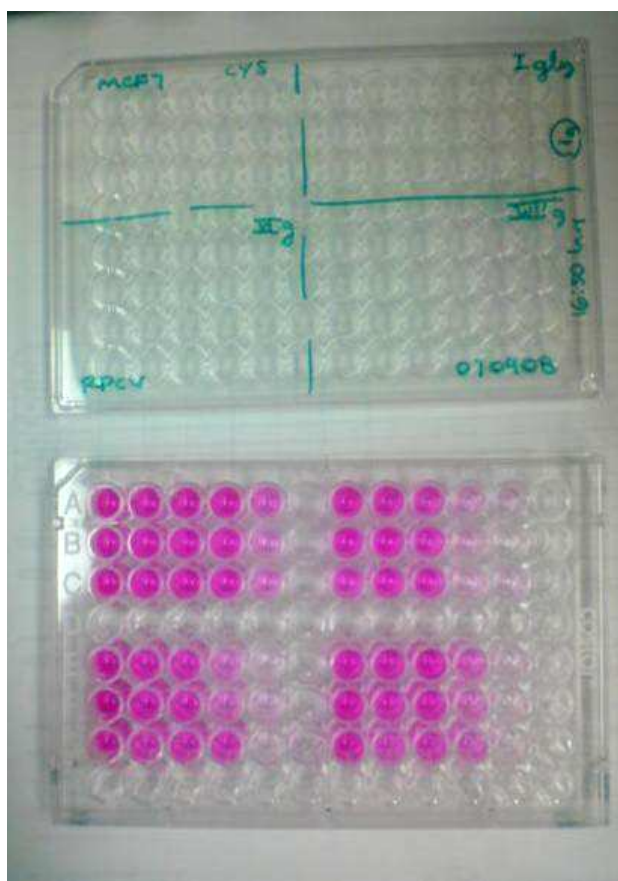


Fig.12. Placa de 96 pozos teñida con sulforrodamina B, con células MCF-7 distribuidas en 4 cuadrantes independientes: cisplatino en primer lugar, Casiopéinas® I-gly, IV-gly y VIII-gly. Cada cuadrante con el primer carril control y 4 concentraciones distintas de extremo izquierdo a derecho, por triplicado de arriba hacia abajo.

Estas placas son las que se colocan en el lector de microplacas y de las que se obtiene la ABS (absorbancia) que se convierte en porcentaje de inhibición celular mediante relacionar la ABS con una concentración. Por tanto en segundo lugar

encontramos una serie de tablas que contienen los datos correspondientes al porcentaje de inhibición celular por línea.

Datos correspondientes a la línea celular HeLa.

Concentración en pozo (µg/mL)	I-gly			±DS	VIII-gly			±DS
0.01	99.39	104.59	94.57	5.01	110.20	97.93	83.69	13.27
0.1	93.49	96.39	75.79	11.15	100.33	93.78	71.26	15.25
1.0	74.43	68.98	82.35	6.77	62.50	63.99	42.14	12.21
10.0	29.80	37.21	48.87	9.61	50.00	55.44	41.17	7.20

Tabla 3.1. Porcentajes de inhibición celular en HeLa para las Casiopeínas® I y VIII-gly

Concentración en pozo (µg/mL)	III-Ea			±DS	III-La			±DS	III-Ha*		±DS
0.01	96.23	100.00	92.22	3.89	78.84	96.72	106.54	14.05	106.54	80.77	18.22
0.1	89.12	75.33	87.52	7.54	71.45	99.13	78.51	14.38	78.50	77.35	0.82
1.0	80.75	44.71	64.46	18.05	31.82	39.52	47.35	7.77	47.35	51.28	2.78
10.0	51.46	42.95	38.47	6.60	29.12	35.81	44.55	7.74	44.55	47.01	1.74

Tabla 3.2. Porcentajes de inhibición celular en HeLa para las Casiopeínas® III-Ea, La y Ha

Concentración en pozo (µg/mL)	CDDP			±DS
0.01	95.93	95.78	98.65	1.62
0.1	95.63	81.60	98.99	9.22
1.0	97.89	70.89	92.12	14.22
10.0	36.20	39.97	53.60	9.16

Tabla 3.3. Porcentajes de inhibición celular en HeLa para las CDDP (cisplatino)

Datos correspondientes a la línea celular MCF-7

Concentración en pozo (µg/mL)	I-gly*		±DS	VIII-gly			±DS
	0.01	89.58	90.91	0.94	93.00	81.08	104.09
0.1	70.64	75.90	3.72	88.78	83.21	95.20	6.00
1.0	56.51	39.75	11.86	41.69	54.44	39.79	7.97
10.0	48.90	29.39	13.80	32.22	38.22	41.21	4.58

Tabla 3.4. Porcentajes de inhibición celular en MCF-7 para las Casiopeínas® I y VIII-gly

Concentración en pozo (µg/mL)	III-Ea			±DS	III-La			±DS	III-Ha			±DS
	0.01	104.29	100.00	80.46	12.70	103.29	103.24	98.92	2.51	94.21	91.43	85.30
0.1	87.94	97.67	78.54	9.57	96.54	100.16	86.73	6.95	88.02	94.38	91.60	3.19
1.0	79.76	70.40	56.71	11.59	55.71	51.05	42.87	6.50	81.64	81.74	64.62	9.86
10.0	37.42	65.75	36.40	16.66	39.10	37.60	35.99	1.56	38.12	34.97	33.12	2.53

Tabla 3.5. Porcentajes de inhibición celular en MCF-7 para las Casiopeínas® III-Ea, La y Ha

Concentración en pozo (µg/mL)	CDDP*		±DS
	0.01	104.70	87.48
0.1	95.62	88.17	5.72
1.0	85.58	81.82	2.95
10.0	55.43	44.77	6.36

Tabla 3.6. Porcentajes de inhibición celular en MCF-7 para las CDDP (cisplatino)

Datos correspondientes a la línea celular HCT-15

Concentración en pozo (µg/mL)	I-gly			±DS	VIII-gly			±DS
0.01	90.07	74.23	100.00	13.00	96.70	103.71	91.82	5.98
0.1	89.36	70.45	83.02	9.63	100.30	100.80	85.85	8.49
1.0	68.79	39.95	72.75	17.90	64.57	56.76	64.78	4.57
10.0	43.50	41.37	27.10	8.91	54.66	51.99	66.67	7.82

Tabla 3.7. Porcentajes de inhibición celular en HCT-15 para las Casiopeínas[®] I y VIII-gly

Concentración en pozo (µg/mL)	III-Ea			±DS	III-La			±DS	III-Ha			±DS
0.01	95.31	106.86	111.09	12.70	103.10	95.23	94.65	2.51	90.58	97.53	84.35	4.56
0.1	89.06	106.21	111.51	9.57	100.00	98.88	97.81	6.95	97.08	88.61	91.03	3.19
1.0	82.50	68.95	61.30	11.59	73.80	67.98	67.40	6.50	60.71	79.95	47.14	9.86
10.0	58.13	59.15	38.70	16.66	56.06	62.92	70.56	1.56	54.87	47.28	35.88	2.53

Tabla 3.8. Porcentajes de inhibición celular en HCT-15 para las Casiopeínas[®] III-Ea, La y Ha

Concentración en pozo (µg/mL)	CDDP*		±DS
0.01	104.52	94.30	7.22
0.1	94.15	84.39	6.90
1.0	86.20	82.58	2.57
10.0	46.57	24.03	15.94

Tabla 3.9. Porcentajes de inhibición celular en HCT-15 para las CDDP (cisplatino)

*Los datos de porcentajes que produjeron una desviación estándar muy elevada (**DS>20%**) durante la realización del triplicado experimental, se eliminaron para los cálculos posteriores.

Sección 2. Datos de Concentración Inhibitoria media (CI₅₀)

En la siguiente tabla se concentran los resultados obtenidos de la Concentración Inhibitoria Media CI₅₀ en valores μM y de $\mu\text{g/mL}$ (estos datos se encuentran sombreados para indicar que son las concentraciones que se emplearon en la segunda etapa experimental de inmunocitoquímica).

Organizados por el tipo de compuesto al que fueron sometidas las 3 líneas celulares, lo que nos permite visualizar un efecto más amplio del compuesto.

I-gly			VIII-gly		
	CI ₅₀ (μM)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		CI ₅₀ (μM)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
HeLa			HeLa		
	8.689	4.86		11.996	5.22
MCF-7			MCF-7		
	2.829	1.58		4.375	1.9
HCT-15			HCT-15		
	4.937	2.76		25.945	11.31

Tabla 4.1. CI₅₀ de las Casiopeínas[®] I y VIII-gly para las 3 líneas celulares

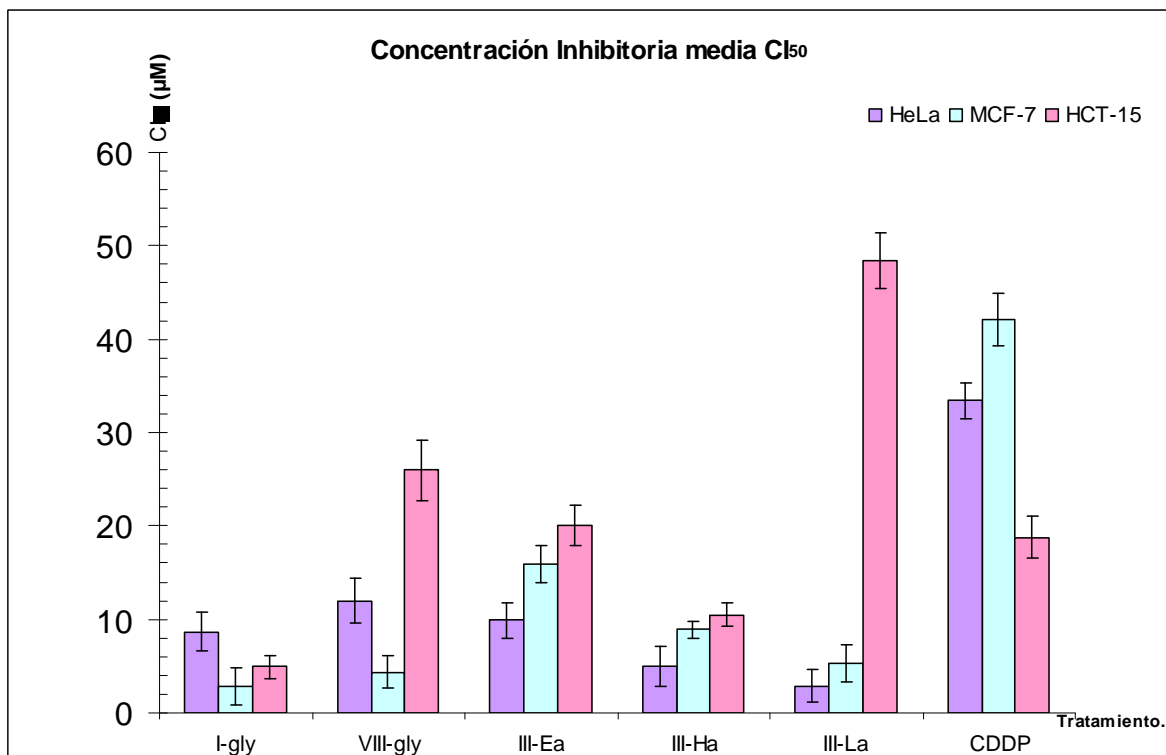
III-Ea			III-Ha			III-La		
	CI ₅₀ (μM)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		CI ₅₀ (μM)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		CI ₅₀ (μM)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
HeLa			HeLa			HeLa		
	9.873	4.45		4.958	2.85		2.871	1.35
MCF-7			MCF-7			MCF-7		
	15.893	7.16		8.903	5.11		5.285	2.48
HCT-15			HCT-15			HCT-15		
	20.054	9.04		10.523	6.055		48.418	22.7

Tabla 4.2. CI₅₀ de las Casiopeínas[®] III-Ea, La y Ha para las 3 líneas celulares

CDDP		
	CI ₅₀ (μ M)	CI ₅₀ (μ g/mL)
HeLa		
	33.451	10.03
MCF-7		
	42.094	12.63
HCT-15		
	18.791	5.64

Tabla 4.3. CI₅₀ de CDDP (cisplatino) para las 3 líneas celulares

En la siguiente gráfica muestro todas las CI₅₀ (μ M) con la finalidad de evidenciar alguna tendencia.



Gráfica 1. Concentración inhibitoria media CI₅₀, \pm IC 95% ($\alpha = 0.05$).

Sección 3. Inmunocitoquímica. Detección de apoptosis por TUNEL

En este apartado se muestran en primera instancia los portaobjetos empleados para esta determinación; los cuales fueron marcados con la línea celular y el compuesto con el que fueron tratadas cada una. La concentración empleada es la que corresponde a la CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$).



Fig.13. 3 Portaobjetos de 8 pozos cada uno, en 6 pozos las distintas Casiopeínas[®], uno con CDDP y un control negativo sin tratamiento.

En una segunda parte podemos ver las micrografías de la reacción de TUNEL, observadas con microscopía óptica. Únicamente se presenta el comparativo entre el resultado positivo y negativo para cada las 3 líneas celulares, independiente al tratamiento recibido.

Al término de esta sección se localiza una tabla **(5)** que concentra los datos de porcentaje de células apoptóticas, TUNEL positivas/negativas; por compuesto y por línea celular, el porcentaje se obtuvo con el conteo en un campo fijo de 100 células en total, diferenciando las positivas de las negativas mediante la identificación de agregados intracelulares de color café intenso.

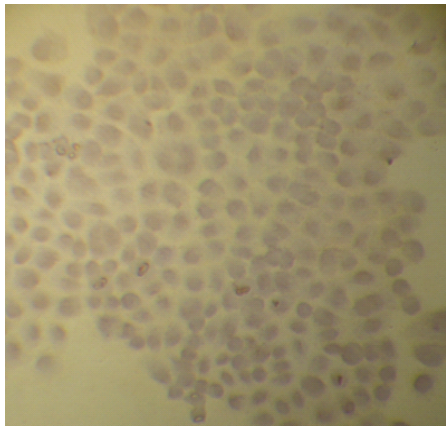
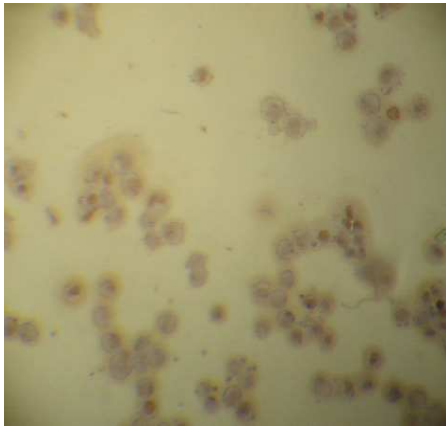
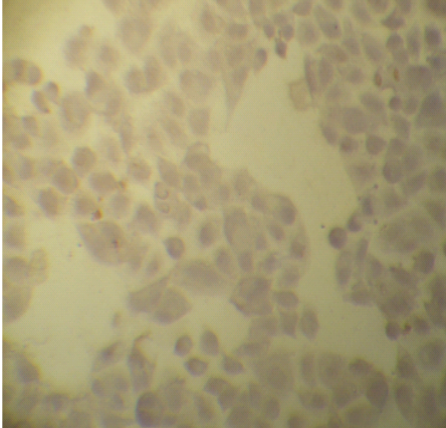
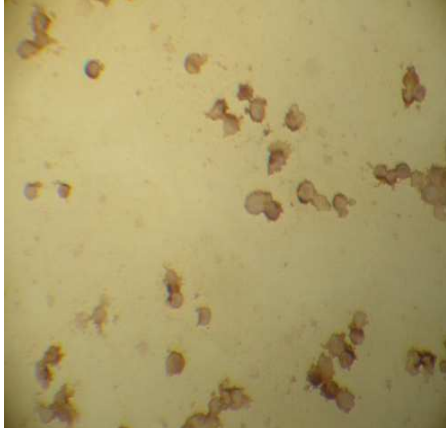
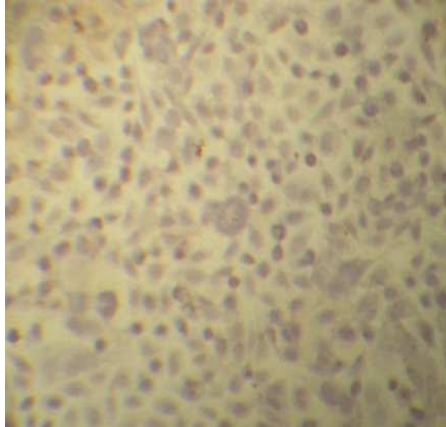
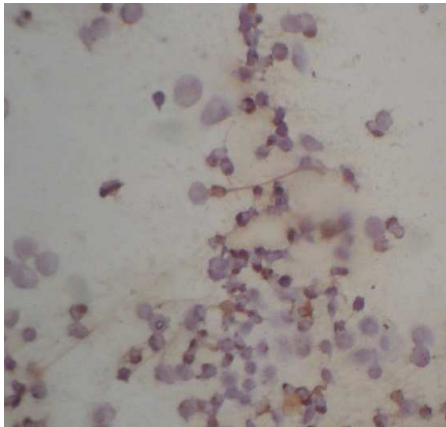
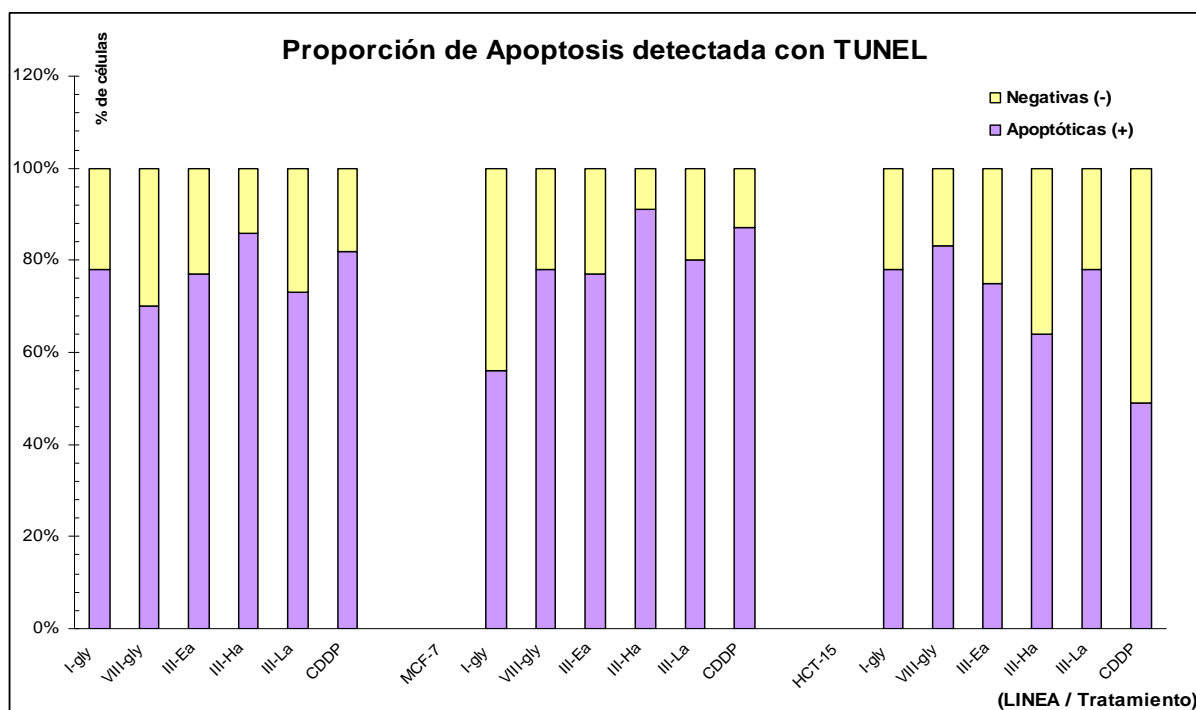
Línea celular	Control negativo	Resultado positivo para Apoptosis por TUNEL reacción
HeLa		
MCF-7		
HCT-15		

Fig.14. Micrografías de reacción TUNEL, 20X.

Sección 3.1. Porcentaje de apoptosis

Línea celular	HeLa		MCF-7		HCT-15	
CI ₅₀ de Tratamiento	TUNEL positivas (+) Apoptóticas.	TUNEL negativas (-)	TUNEL positivas (+) Apoptóticas.	TUNEL negativas (-)	TUNEL positivas (+) Apoptóticas	TUNEL negativas (-)
Casiopeína [®] I-gly	78%	22%	56%	44%	78%	22%
Casiopeína [®] VIII-gly	70%	30%	78%	22%	83%	17%
Casiopeína [®] III-Ea	77%	23%	77%	23%	75%	25%
Casiopeína [®] III-Ha	86%	14%	91%	9%	64%	36%
Casiopeína [®] III-La	73%	27%	80%	20%	78%	22%
Cisplatino	82%	18%	87%	13%	49%	51%

Tabla 5. Porcentaje de células apoptóticas observadas mediante la reacción TUNEL después de tratar cada línea celular con la CI₅₀ correspondiente.



Gráfica 2. Porcentaje celular de apoptosis en la inmunocitoquímica mediante detección por TUNEL

6. Análisis de resultados

Todos los ensayos se realizaron en un espacio exclusivo para cultivo celular, en donde se cuenta con los requerimientos de *cuarto limpio* para asegurar la calidad en los cultivos celulares y por consiguiente de las células empleadas, indispensable con el hecho de que siendo sistemas biológicos aislados pueden ser inestables si se modifica su medio de desarrollo, aunado a que son altamente susceptibles a contaminación.

Al llevar a cabo el monitoreo constante de temperatura de incubación (37°C) y el porcentaje de CO₂ (5%) podemos garantizar que todo el sistema permanece constante durante todas las determinaciones. Cada una de ellas se realiza por triplicado, empleado un criotubo distinto de la línea celular (fecha de criopreservación variable), permitiendo así un rango amplio de datos a comparar que contribuyan a una confiabilidad estadística mayor.

La cosecha y siembra de una cantidad de células fija (20,000 células vivas, determinado por tinción de azul tripano) en cada pozo de las placas garantiza de igual forma condiciones constantes del sistema.

Las sustancias de tratamiento se tomaron siempre de la misma fuente (vial o frasco), pesando con exactitud en cada ocasión, realizando el registro correspondiente, reduciendo los resultados obtenidos únicamente al efecto producido por la sustancia sobre la línea celular.

Para la detección de citotoxicidad, se ha demostrado que la tinción de sulforrodamina B, (SRB) tiene la mejor combinación de intensidad de teñido y linealidad⁶⁴, siendo más sensible que el método tradicional empleado por MTT.

MTT, se refiere a una prueba sobre la deshidrogenasa mitocondrial (enzima de todas las células vivas) que oxida la molécula amarilla del colorante vital MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) generando una coloración azul de diferentes intensidades de acuerdo con el grado de viabilidad de la célula, sin embargo se le considera un método destructivo, ya que se detecta una actividad enzimática a diferencia de SRB en donde incluso pueden almacenarse las placas, porque es un método de punto final estable, además de ser un método simple y más rápido que otros. Todo esto dirige los datos obtenidos a un rango de confiabilidad alto.

SRB es un colorante aniónico de color rosa intenso, que diluido en ácido acético, con dos grupos sulfónicos permite la unión electrostática de aminoácidos básicos que pertenecen a la proteínas de las células fijadas con ácido tricloroacético (TCA), por tanto el porcentaje de las células teñidas corresponde al número de células que permanecen vivas después de las 24 horas de incubación con el tratamiento. De tal manera que se relaciona de forma directamente proporcional la absorbancia con la sobrevivencia celular.

Sección 1. Porcentajes de inhibición celular

En los datos obtenidos (**tablas 3.1 a 3.9**) se hace evidente la disminución de la absorbancia en relación directa con el incremento en la concentración de la sustancia de tratamiento; consiguiendo en una mayoría de casos inhibir por encima del 50% el crecimiento celular.

Tomando en cuenta que el manejo de un sistema biológico involucra variabilidad *per se*, la confiabilidad en los datos se basa en la magnitud de la **DS** (Desviación estándar) donde el 20% es el límite máximo de desviación permitido para que el rango de datos experimentales sea confiable. Los datos de CDDP, que se desviaron por encima de 20%, durante la realización de las réplicas (**tablas 3.6 y 3.9**), tienen su origen principalmente en la transformación de CDDP de su isómero *cis* en su isómero inactivo *trans*. Debido a lo anterior y en los 2 casos restantes,

III-Ha en HeLa (**tabla 3.2**) y I-gly en MCF-7 (**tabla 3.4**), la desviación era muy cercana al 20% y se decidió no considerar el 3er. dato obtenido para mejorar la calidad del resultado. La desviación calculada para 2 de 3 ensayos (triplicados) se conserva, ya que tales datos son resultado de 6 lecturas de absorbancia independientes.

Todas las Casiopeínas[®] mostraron ser efectivas en la disminución de la proliferación tal como sucede con el tratamiento de referencia cisplatino.

Si nos detenemos a observar los porcentajes de manera particular encontramos que las concentraciones son independientes en las líneas, es decir que cada Casiopeína[®] presenta inhibiciones distintas en las distintas líneas, pero el rango de concentración requerida para este efecto se encuentra de manera constante en un valor real interpolado entre 1-10($\mu\text{g}/\text{mL}$), o un valor extrapolado $>10(\mu\text{g}/\text{mL})$.

La línea celular más sensible a todos los tratamientos es HeLa, ya que es la que presenta las concentraciones más pequeñas de inhibición, le sigue MCF-7, siendo HCT-15 la más resistente a los tratamientos.

Se ha demostrado que las líneas celulares de tumores de mama, próstata y leucemia son más sensibles a compuestos metálicos⁵⁹, esta diferencia en la sensibilidad es evidencia directa de la complejidad de las respuestas celulares a diversos compuestos químicos.

Cuando nos referimos a la magnitud de la Concentración Inhibitoria, la relación es inversamente proporcional, es decir que a medida que el valor de la concentración requerida para lograr la inhibición en la proliferación disminuye, la eficacia del tratamiento es mayor.

La información que podemos interpretar con mayor precisión es la que corresponde a las **CI₅₀**.

Sección 2. Concentración inhibitoria media (CI₅₀)

Si partimos de un mismo *valor de comparación*; en este caso la **CI₅₀**; dato que representa el mismo efecto producido: la concentración a la que se alcanza el 50% de inhibición en la proliferación celular; podremos encontrar una relación directa del sustituyente en la molécula con el efecto que está produciendo.

Para el caso particular de las Casiopeínas[®] que poseen como donador diimina a la fenantrolina, ésta es la molécula que probablemente permite la interacción de estos compuestos con el DNA, ya que el tamaño que le confieren los 3 anillos aromáticos podría intercalarse en las hebras, sin embargo no es el único mecanismo de acción debido a que como se ha mencionado la formación de ERO juega un papel importante en la citotoxicidad de ésta y otras familias de Casiopeínas[®].

Se sabe hasta ahora, que los compuestos de la familia III, forman complejos de transferencia de carga donde se observan apilamientos de tipo electrostático entre los anillos quelato del complejo metálico y los anillos de la adenina, esto fue caracterizado estructuralmente empleando cuando fue posible la técnica de Difracción de rayos X de monocristal y electrónicamente (EPR)⁵⁹. El primer paso de la reacción es la formación de un complejo de transferencia de carga complejo-ligante, seguido (en el caso de los complejo que contiene aminoácidos) por un reacomodo molecular previo a la salida del ligante cargado y la entrada de la adenina en la esfera de coordinación del átomo de cobre. Esto permitiría explicar por que las familias de Casiopeínas[®] que contienen aminoacidatos (familia I y II) presentan mayor reactividad con el DNA en experimentos con electroforesis de agarosa, mientras que los complejos que contienen ligantes O-O (familia III) presentan una interacción mucho más débil.⁶⁵

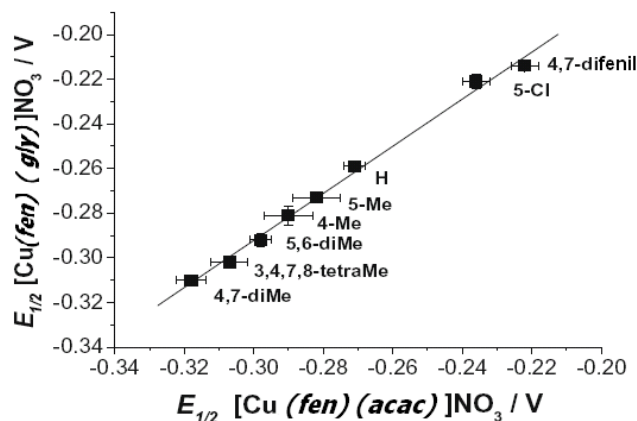
Estudios previos también señalan que en las moléculas de Casiopeínas[®] el efecto de los sustituyentes de la fenantrolina es más significativo que el que pudiera producir una modificación estructural en el extremo del donador O-O o N-O (acetilacetato o aminoácido). Por tanto la influencia de los sustituyentes en los parámetros electrónicos y el tipo de donador diimina son los que gobiernan la actividad a nivel molecular⁵⁹.

En el modelo teórico de QSAR publicado por el grupo de investigación⁵⁹, se observó que la actividad incrementa conforme incrementa el carácter electro donador de los sustituyentes en la parte diimina, esta información se derivó de la determinación del potencial de media onda ($E_{1/2}$).

El potencial de media onda, es un dato que nos indica el comportamiento redox del centro metálico y el intercambio de electrones posibles. De este mismo estudio QSAR se desprende el gráfico que muestro a continuación (**gráfica 2**), encontrando aquí una relación lineal en los potenciales de media onda para varios de los compuestos que pertenecen a esta familia, en donde los cambios de potencial significativos son los que se producen por los sustituyentes de la fenantrolina, independiente al hecho de que un grupo contenga como donador O-O acetilacetato, y el otro N-O aminoácido. Por consiguiente, la especie que presente un potencial de media onda mayor positivo, será el menos activo ya que su densidad electrónica es menor. Los que sean oxidantes más débiles serán los más activos.

El orden de creciente de actividad en base al $E_{1/2}$ obtenido de los estudios QSAR, en nuestro grupo de compuestos evaluados el siguiente: 4,7-difenil < 5,6-dimetil < 3,4,7,8-tetrametil < 4,7 dimetil.

Es decir: III-Ha = I-gly < III- La < VIII-gly < III-Ea.



Gráfica 2. Potencial de media onda para el par redox ($\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$) de los complejos $[\text{Cu}(\text{fenantrolina})(\text{acetilacetato})]^+$ Vs. $[\text{Cu}(\text{fenantrolina})(\text{glicina})]^+$. Los valores se encuentran reportados en volts \pm desviación estándar.⁵⁹

Otro hecho que podemos asociar con la actividad, además del potencial de media onda del Cu (II), es el grado de hidrofobicidad del compuesto, en donde un compuesto más hidrofóbico será más activo, en el entendido de que el tipo de transporte celular es difusión pasiva, el compuesto más hidrofóbico permeará mejor al interior de la célula atravesando la membrana celular, sin dejar de lado que se debe considerar el tamaño de la molécula y su grado de ionización.

En el caso particular de las Casiopeínas[®], partiendo del mismo estudio ya mencionado, se determinó que los compuestos con acetilacetato son más activos, porque son ligeramente más hidrofóbicos en comparación con los del glicina, sí además consideramos la polaridad que le confieren los sustituyentes electro donadores de la fenantrolina, un orden teórico creciente de difusión sería: 4,7-dimetil = 5,6-dimetil < 3,4,7,8- tetrametil < 4,7-difenil (glicinato) < 4,7 difenil (acetilacetato).

Es decir: III-Ea = III-La < VIII-gly < I-gly < III-Ha

Ambas series son complementarias, ya que en la primera nos orienta respecto a la participación del centro de cobre(II) en el mecanismo intracelular posible y la

segunda indica en qué proporción probablemente está difundiendo el compuesto al interior de la célula, siendo sin embargo una contribución menor.

La tabla a continuación es un resumen de los datos de $CI_{50}(\mu M)$ en cada línea celular.

$CI_{50} (\mu M)$	HeLa	$\pm I.C.$	MCF-7	$\pm I.C.$	HCT-15	$\pm I.C.$
I-gly	8.69	2.02	2.83	1.99	4.93	1.27
VIII-gly	11.99	2.38	4.37	1.68	25.95	3.18
III-Ea	9.87	1.84	15.89	1.94	20.05	2.22
III-Ha	4.96	2.22	8.90	0.91	10.52	1.29
III-La	2.87	1.69	5.28	2.01	48.43	2.99
CDDP	33.45	1.92	42.09	2.86	18.79	2.22

Los dos compuestos que presentan mayor actividad antiproliferativa en las 3 líneas de manera global son I-gly y III-Ha seguidos por VIII-gly.

Los valores más altos de CI_{50} los tiene la Casiopeína[®] III-La, el cisplatino, seguidos de III-Ea. Si relacionamos estos hallazgos experimentales con la serie propuesta de difusión del compuesto, podemos decir que en efecto las Casiopeína[®] III-La y III-Ea, independiente al hecho de son las más activas, están difundiendo en menor proporción al espacio intracelular, requiriendo por tanto altas concentraciones para alcanzar el efecto de inhibición en la proliferación.

III-Ea (4,7-dimetil) y III-La (5,6-dimetil) son isómeros, donde hay un cambio únicamente en la posición de los metilos, sin embargo esta sutil modificación estructural altera su mecanismo de acción y por consecuencia el valor de la CI_{50} . III-La es menos activa, ya que la dosis que se requiere para inhibir la población celular en el caso de HCT-15 supera incluso a la del cisplatino. Este fenómeno se sustenta con los datos obtenidos *In Vivo* de las DL_{50} que además indican que la Casiopeína III-La es más tóxica en comparación con la III-Ea.

Las 2 Casiopeínas[®] más activas I-gly y III-Ha así como VIII-gly están difundiendo en mayor proporción, generando así una magnitud superior en el efecto antiproliferativo a concentraciones más bajas, apoyado en la propuesta en que los compuestos de la familia (II) ligantes N-O, aminoacidato, presentan mayor reactividad con el ADN que los que contienen ligantes O-O (familia III), donde la interacción es más débil.

I-gly y III-Ha son análogos, difieren en el tipo de donador (O-O glicinato y N-O acetilacetato). A pesar de que se modifica la actividad, los cambios en los valores para CI_{50} son menores en comparación con lo que sucede entre III-Ea y III-La, es decir que los resultados obtenidos confirman que las modificaciones en los sustituyentes de la molécula de fenantrolina para este grupo de 5 Casiopeínas[®] son estructuralmente de mayor importancia que los del extremo del donador.

Debido a que cada estirpe celular es distinta, incluso por el sitio de localización del tejido, cada una posee mecanismos propios de difusión.

Es por ello que será necesario en experimentos futuros determinar el grado directo de permeabilidad de membrana de cada compuesto.

Principalmente, es notorio el hecho de que en los organismos completos la hidrofobicidad del compuesto es de suma importancia, ya que influye directamente sobre la actividad biológica siendo una de las propiedades principales relacionadas con el transporte de los fármacos al sitio de acción, en concordancia con el estudio teórico QSAR que también señala que la influencia de las propiedades hidrofóbicas es más importante en la actividad biológica dentro del organismo completo, debido a que es indispensable para los mecanismos de transporte⁵⁹.

La magnitud del efecto antiproliferativo alcanzado por las Casiopeínas[®] de manera global es comparable e incluso mayor para algunas de ellas que el compuesto de referencia cisplatino.

Sección 3. Inmunocitoquímica

Una vez que se ha delimitado lo referente a la concentración inhibitoria media (CI_{50}) requerida, una determinación que orienta de mejor manera la vía de muerte celular que se está activando por las Casiopeínas[®] es la detección inmunocitoquímica de la apoptosis.

Al adicionar la CI_{50} determinada, estamos asegurando que en el tratamiento lograremos inhibir el 50% de la población celular, por lo que únicamente deseamos conocer si la vía por la que sucede es la apoptosis.

Algunos antecedentes muestran que Cas III-Ea y III-Ha presenta fragmentación de DNA resultado del proceso de apoptosis.⁶⁶

La Cas I-gly presenta capacidad para inhibir la división celular e incrementar la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células sanas, afectando el DNA, por lo que podría afectar de manera similar a las células tumorales.⁶⁷

TUNEL, es una técnica inmunocitoquímica⁶⁸ específica, por que la cantidad de DNA fragmentado es tan grande en una célula apoptótica, que puede discriminarse fácilmente de una célula necrótica⁶⁹ donde a pesar de que también existe fragmentación de DNA al azar por endonucleasas la proporción es mucho menor.

Se sabe que el mecanismo para el tratamiento de referencia cisplatino es la apoptosis⁷⁰, mientras que los resultados de las micrografías (**figura 14**) indican que lo mismo sucede con las 5 Casiopeínas[®] probadas. Las diferencias entre las células que no reciben tratamiento (TUNEL negativas) son evidentes, ya que además de la inhibición en el porcentaje celular, existe la presencia de gránulos cafés (propios de la adherencia de la DAB a la POD unida a los fragmentos de

DNA). Los porcentajes de este fenómeno son altos en todas las líneas, lo que indica que la vía de muerte celular es la apoptosis (**gráfica 2**).

El mecanismo de inducción de apoptosis en el cáncer se encuentra modificado, por lo que el crecimiento de las células es descontrolado, si durante la investigación de nuevas terapias encontramos los tratamientos que afecten directamente esta vía de muerte celular, podemos decir que estamos en el rumbo correcto para el desarrollo de una manera quimioterapéutica de combatir este padecimiento.

Sin embargo, más adelante debemos adentrarnos en los mecanismos moleculares específicos de disparo de las cascadas de señalización para conocer las vías por las que se origina.

7. Conclusiones

Las Casiopeínas[®] presentan un porcentaje de inhibición celular comparable e incluso para algunas de ellas superior al del tratamiento de referencia cisplatino.

La magnitud del porcentaje de inhibición está relacionada con la línea celular, donde HeLa resultó ser la más sensible y HCT-15 la más resistente a la totalidad de los tratamientos.

La concentración inhibitoria media CI_{50} , varía respecto a la línea celular y principalmente a la Casiopeína[®] adicionada, dichas diferencias son producto de los sustituyentes de la fenantrolina (ligante de tipo N-N) de su estructura, encontrando una relación entre su hidrofobicidad y su actividad.

Para los isómeros geométricos III-La (5,6-dimetil) y III-Ea (4,7-dimetil) con 2 sustituyentes metilo, el valor de CI_{50} difiere por las posiciones de los metilos, la posición (5,6) en la fenantrolina es menos activa que la (4,7).

Se propone que las posiciones de los metilos de la Casiopeína[®] III-La (*Nitrato de 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina, acetilacetato cobre(II)*) influyen en que ésta difunda en menor proporción al espacio intracelular, requiriendo por tanto altas concentraciones el para alcanzar el efecto de inhibición en el crecimiento.

Sí se incrementa el número de metilos como sustituyentes de la fenantrolina; como sucede con la Casiopeína[®] VIII-gly (3,4,7,8-tetrametil); el valor de CI_{50} disminuye aún más.

Para los análogos III-Ha (O-O acetilacetato) y I-gly (N-O glicinato) la diferencia en el carácter del grupo donador es menos sensible, ya que los cambios producidos en el efecto antiproliferativo son de menor proporción, en ambos casos, la CI_{50} se calculó de forma interpolada.

Dentro de las 3 Casiopeínas[®] más activas está la III-Ha, con sustituyente (4,7-difenil), que le confiere mayor hidrofobicidad, lo que influye para que exista difusión en mayor proporción, generando así una magnitud superior en el efecto antiproliferativo y por consecuencia una CI_{50} aún menor.

Las Casiopeínas[®] I-gly (*Nitrato de acua, 4,7-difenil-1,10 fenantrolina, glicinato, cobre(II)*) resultó ser la más activa sobre las 3 líneas celulares utilizadas.

Con la adición de la CI_{50} determinada, todas las Casiopeínas[®] y el cisplatino presentaron el mecanismo de muerte celular por apoptosis.

Los porcentajes de células que mueren por esta vía son altos en todos los casos, por encima del 50%.

Referencias

- ¹ Perona, R. Sánchez-Pérez, I. *Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. Minireview*. Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, British Journal of Cancer, Spain, 2004, 90, 573 – 577.
- ² Agency for Toxic Substances & Disease Registry. (ATSDR) (http://www.atsdr.cdc.gov/es/general/cancer/benigno_maligno.html, acceso abril 2009)
- ³ Instituto Nacional del Cáncer. (NCI por sus siglas en inglés) (<http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>, acceso noviembre 2008)
- ⁴ Yokota, J., and Sugimura, T. *Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes*. National Cancer Center Research Institute, FASEB J., Japan, 1993 (7): 920 -925.
- ⁵ Yokota, J. *Tumor progression and metastasis*. Biology Division, National Cancer Center Research Institute, Carcinogenesis. March 2000, Vol. 21, No. 3, 497-503.
- ⁶ Organización Mundial de la Salud. (WHO por sus siglas en inglés) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.htm>, acceso noviembre 2008)
- ⁷ Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Medicine [online journal], 2006, 3(11):e442 (<http://medicine.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371/journal.pmed.0030442>, acceso 4 April 2007).
- ⁸ García Ribas, Ignacio. *La investigación clínica en Oncología desde la industria farmacéutica: el papel de los especialistas médicos en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos*. Departamento Médico de Lilly. Unidad de Oncología. Rev. Oncol. 2004; 6(9):547-51.
- ⁹ Asociación Mexicana de Lucha Contra el Cáncer, A.C. (<http://www.amLcc.org/quimioterapia.htm>, acceso noviembre 2008)
- ¹⁰ Thatte U, Dahanukar S. *Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation*. Department of Pharmacology, Seth GS Medical College, Mumbai, India, Drugs. 1997 Oct; 54 (4): 511-32.
- ¹¹ Singh N, Anand S., *Apoptosis in health and disease*. Department of Biochemistry, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi. Indian J. Physiol Pharmacol. 1995 Apr; 39(2):91-4.

¹² Rudin Charles M., Thompson C., *APOPTOSIS AND DISEASE: Regulation and Clinical Relevance of Programmed Cell Death*. Chicago, Illinois, Annual Review of Medicine, 1997 48, 267-281.

¹³ Burgues Gasion, J.P. et al. *Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga*. Madrid, Actas Urol. Esp., 2005; vol. 29, no. 9, pp. 846-859.

¹⁴ Soto M., Jeannette; Kessi C., Eduardo. *El ciclo celular y sus consecuencias no programadas - Premio Nobel a 25 años de investigación. Omni cellula et cellula, (R. Virchow, 1858)*. TECNO VET: Año 8 N^o1, marzo 2002.

¹⁵ Skeel RT. *Fundamentos biológicos y farmacológicos de la quimioterapia para el tratamiento del cáncer*. Quimioterapia del cáncer. 5^a ed. Madrid, S.L. 2000;3-19.

¹⁶ Solé FJ, et.al. *Regulación del ciclo celular. Bases moleculares de la carcinogénesis*. Biología molecular de los tumores. Ene Ediciones, Madrid, 1995;61-66.

¹⁷ Saraste, A, Pulkki, K. *Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis*. Finland, Cardiovascular Research, 45 (2000) 528–537.

¹⁸ Fischer, U., Schulze-Osthoff. K., *New Approaches and Therapeutics Targeting Apoptosis in Disease*. Institute of Molecular Medicine, Germany, Pharmacol Rev, 2005; 57:187–215.

¹⁹ Golstein, P.; Aubry, L.; Levraud; J. *Cell-death alternative model organisms: why and which?*. Nature Rev Mol Cell Biol. 2003; 4: 798-807.

²⁰ Jordán J. *Apoptosis: muerte celular programada*. OFFARM. 2003; 22 (6): 100-106.

²¹ Schulze-Bergkamen, H.; Krammer, P. *Apoptosis in Cancer - Implications for therapy*. Seminar Oncol 2004; 31 (1): 90-119.

²² Widlak, P. *The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis*. Department of Experimental and Clinical Radiobiology, Center of Oncology, Polan, Acta Biochimica Polonica. Vol. 47 No. 4/2000; 1037–1044

²³ In situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche Applied Science. No. Cat. 11 684 817 910. (<https://www.roche-applied-science.com/apoptosis>)

²⁴ IDEM 40

-
- ²⁵ Driscoll JS: *The preclinical new drug research program of the National Cancer Institute*. *Cancer Treat Rep* 68:63-76, 1984.
- ²⁶ Chabner, Bruce A. *In Defense of Cell-Line Screening*. Division of Cancer Treatment, NCI, Bethesda, *Journal of National Cancer Institute*, Vol. 82, No. 13, July 1990; 1083-1085.
- ²⁷ M. R. Boyd. *The NCI In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. Concept, Implementation, and Operation, 1985-1995*. *Drug Development: Preclinical Screening, Clinical Trials and Approval*, edited by B. Teicher, Totowa, NJ:Humana Press, 1997, p. 23-42.
- ²⁸ Kostova, Irena. *Platinum Complexes as Anticancer Agents*. Department of Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University, Bulgaria. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2006, 1, 1-22.
- ²⁹ De la Garza, J., et.al. *Semblanza histórica de los agentes antineoplásicos. Cáncer y quimioterapia (Perspectivas en México)*. *Memorias, UNAM, México*, 1992. pp.21-33.
- ³⁰ Desoize B. *Cancer and metals and metal compounds. Part II. Cancer treatment*. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;42(3):213–5.
- ³¹ P.Farrell, Nicholas. *Uses of inorganic chemistry in medicine*. Publish by the Royal Society of Chemistry, U.K., 1999, pp. 109-123.
- ³² Gonzalez, Victor M., et. al. *Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?* *Mol.Pharmacol.*, 59: 2001, 657–663.
- ³³ Jamieson ER and Lippard SJ. *Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts*. *Chem Rev* (1999) 99: 2467–2498.
- ³⁴ Ho, John W. *Potential and Cytotoxicity of cis-Platinum Complex with Anti-tumor Activity in Combination Therapy*. Department of Biochemistry, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, Hong Kong. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2006, 129-134 .
- ³⁵ Safaei,R. et.al. *The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs*. Department of Medicine and the Rebecca and John Moores Cancer Center, University of California, USA, *Journal of Inorganic Biochemistry* 98 (2004) 1607–1613A.
- ³⁶ Katano, K. et. Al. *Acquisition of Resistance to Cisplatin Is Accompanied by Changes in the Cellular Pharmacology of Copper*. California, USA. *Cancer Research*, Nov. 2002. 62, 6559–6565.

³⁷ Huang, R., Wallqvist, A. *Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action* .USA. *Biochemical Pharmacology* 69 (2005) 1009

³⁸ ® Marca registrada CASIOPEÍNA. Reg. 407543 SECOFI , 1992.

Ruiz-Azuara L. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II. Patente de invención, SECOFI no. 172248. Dic. 9 1993.

Ruiz-Azuara L. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo I. Patente de invención, SECOFI no. 172967. Enero 26 1994.

Ruiz-Azuara L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complex from phenylphenantroline to be used as anticancerigenic agents. U.S. patent, Ap21 (1992) Number 5,107,005. U.S. patent Re 35,458, Feb 18 1997.

Ruiz-Azuara L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate from methylate phenantroline complex to be used as anticancerigenic agents. U.S. Patent, Patent No. 5,576,326. Nov 19 1996.

³⁹ Ochiai, E. *Química Bioinorgánica*. Reverté, España, pp. 217-260.

⁴⁰ Ruiz, L., Gracia-Mora, I., "Advances in Cancer Research at UNAM." *Chapter: Research on metal compounds with anticancer activity*, Manual moderno, México, 2007, pp. 295-307.

⁴¹ Ruiz-Ramírez L, Gracia M. MI, Moreno ER, Gasque L, Huerta L, Mayet L, Ortiz V y Lomelí C *The antitumor activity of several transition metal complexes*. *J. of Inorg. Biochem.* (1991)43. 2-3.615

⁴² Ruiz-Ramírez L, Gracia-Mora I, De La Rosa ME, Sumano H, Gómez C, Pimentel E, et al. *Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) drugs: casiopeinas I, II, III*. *J Inorg Biochem.* 1993;406:1–2.

⁴³ Ruiz-Ramírez L, De La Rosa ME, Gracia-Mora I, Méndozza A, Pérez G, Ferrer-Sueta G, et al. *Casiopeinas, metal-based drugs a new class of antineoplastic and genotoxic compounds*. *J Inorg Biochem.* 1995;207:2–3.L.

⁴⁴ Tovar-Tovar A.; Ruiz-Ramirez L.; Moreno-Esparza R.; Briansó J.L. *Interaction of casiopeinas III with methionine, adenosinemonophosphate, puric and pyrimidic bases*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Volume 59, Number 2, August 1995 , pp. 206-206

-
- ⁴⁵ Arnaudeau C, Tenorio Miranda E, Jenssen D, Helleday T. *Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells* Mutat Res. 2000 Nov 9;461(3):221-8.
- ⁴⁶ Alemón-Medina R, Breña-Valle M, Muñoz-Sánchez JL, Gracia-Mora MI, Ruiz-Azuara L. *Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas)*. Cancer Chemother Pharmacol. 2007 Jul;60(2):219-28.
- ⁴⁷ Rivero-Müller A, De Vizcaya-Ruiz A, Plant N, Ruiz L, Dobrota M. *Mixed chelate copper complex, Casiopeina II gly, binds and degrades nucleic acids: a mechanism of cytotoxicity*. Chem Biol Interact. 2007 Feb 20;165(3):189-99.
- ⁴⁸ Alemón-Medina R, Muñoz-Sánchez JL, Ruiz-Azuara L, Gracia-Mora I. *Casiopeína II gly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide*. Toxicol In Vitro. 2008 Apr;22(3):710-5.
- ⁴⁹ De Vizcaya-Ruiz A, Rivero-Müller A, Ruiz-Ramirez L, Howarth JA, Dobrota M. *Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II*. Toxicology. 2003 Dec 15;194(1-2):103-13.
- ⁵⁰ Leal-García M, García-Ortuño L, Ruiz-Azuara L, Gracia-Mora I, Luna-Delvillar J, Sumano H. *Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of casiopeinas in anaesthetized dogs*. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2007 Sep;101(3):151-8.
- ⁵¹ Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Pavón N, Carvajal K, Moreno-Sánchez R. *Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism*. Toxicol Appl Pharmacol. 2006 Apr 1;212(1):79-88.
- ⁵² Marin-Hernandez A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramirez L, Moreno-Sanchez R. *Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas) on mitochondrial functions*. Biochem Pharmacol. 2003;65:1979–1989
- ⁵³ Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Gómez-Ruiz C, Tinoco-Méndez M, Márquez-Quiñones A, Lira LR, Marín-Hernández A, Macías-Rosales L, Bravo-Gómez ME. *Knigh'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*. Met Based Drugs. 2001;8(1):19-28.
- ⁵⁴ Vizcaya-Ruiz, A, Rivero-Muller, A. Ruiz -Ramirez, L Kass, G. L.R. Kelland, R. M, Dobrota, *Induction of Apoptosis by a Novel Copper-based Anticancer Compound- Casiopeina II In L 1210 and CH Cells*. Toxicology in Vitro (2000) 14, 1-5.

-
- ⁵⁵ Trejo-Solís C, Palencia G, Zúñiga S, Rodríguez-Ropon A, Osorio-Rico L, Luvia ST, Gracia-Mora I, Marquez-Rosado L, Sánchez A, Moreno-García ME, Cruz A, Bravo-Gómez ME, Ruiz-Ramírez L, Rodríguez-Enriquez S, Sotelo J. *Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms*. Neoplasia. 2005 Jun;7(6):563-74.
- ⁵⁶ Carvallo-Chaigneau F, Trejo-Solís C, Gómez-Ruiz C, Rodríguez-Aguilera E, Macías-Rosales L, Cortés-Barberena E, Cedillo-Peláez C, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L, Madrid-Marina V, Constantino-Casas F. *Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo*. Biometals. 2008 Feb;21(1):17-28.
- ⁵⁷ Mejia C, Ruiz-Azuara L. *Casiopeinas IIgly and IIIia induce apoptosis in medulloblastoma cells*. Pathol Oncol Res. 2008 Dec;14(4):467-72.
- ⁵⁸ Martínez Chapa, Karen Alicia. *Compilación de los estudios químicos y farmacológicos de las Casiopeínas® III-ia y II-gly*, Tesis Licenciatura (Químico)-UNAM, Facultad de Química, . México, 2008: 118.
- ⁵⁹ Bravo-Gómez ME, García-Ramos JC, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L *Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas)*. J Inorg Biochem. 2009 Feb;103(2):299-309..
- ⁶⁰ ATCC catalog.
(<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-225&Template=cellBiology>, acceso noviembre 2008)
- ⁶¹ ATCC catalog
(<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-22&Template=cellBiology>, acceso noviembre 2008)
- ⁶² ATCC catalog
(<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-2&Template=cellBiology>, acceso noviembre 2008)
- ⁶³ <http://www.humv.es/webfarma//Oncologia/CISPLATINO.doc>
- ⁶⁴ Skehan, P. et.al. *New colorometric cytotoxicity assay for anticancer screening*. J. Nac. Cancer Inst., 1990. Vol. 82; 1107-1112.

⁶⁵ Tovar, A y Ruíz L. *Estudio estructural y electrónico de una serie de complejos metálicos de Cu(II) (Casiopeínas ®) con actividad antineoplásica*. 2º Congreso Nacional de Química Médica , Querétaro, México; 2006

⁶⁶ Serment-Guerrero y col. *Fragmentación de DNA por diferentes Casiopeínas®*. 2º Congreso Nacional de Química Médica. Querétaro, México; 2006.

⁶⁷ Roldán, E. *Evaluación de las aberraciones cromosómicas en el cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína® I-gly*. 2º Congreso Nacional de Química Médica. Querétaro, México; 2006

⁶⁸ Roche Applied Science Manual: Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation. 3a. ed.

⁶⁹ Gold, R. et al. *Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques*. Lab. Invest. 71, (1994) 219.

⁷⁰ IDEM 29