



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO PROAPOPTÓTICO DE LA  
CASIOPEÍNA I-GLY EN LA LÍNEA CELULAR  
GLIOMA C6 DE RATA *IN VITRO*”

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO  
PRESENTA  
ROBERTO ARIEL MORALES REYES

DIRECTORA  
DRA. MARÍA CRISTINA TREJO SOLÍS



MEXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*La scienza più utile è quello il cui frutto è la più comunicabile*

*Leonardo da Vinci*

1. Datos del alumno  
Morales  
Reyes  
Roberto Ariel  
Teléfono: 41676349  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biólogo  
09710538-1
2. Datos del tutor  
M. en C.  
María Cristina  
Trejo  
Solís
3. Datos del Sinodal 1  
Dr.  
Julio Eduardo Roque  
Morán  
Andrade
4. Datos del Sinodal 2  
Dra.  
Lena  
Ruiz  
Azuara
5. Datos del Sinodal 3  
Dra.  
María Dolores  
Jiménez  
Farfán
6. Datos del Sinodal 4  
M. en C.  
Juan Carlos  
García  
Ramos
7. Datos de la tesis  
Efecto proapoptótico de la casiopéina I-gly en la línea celular glioma C6 de rata *in vitro*  
97 p.  
2010



FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Efecto proapoptótico de la casiopeína I-gly en la línea celular glioma C6 de rata in vitro**

realizado por Morales Reyes Roberto Ariel con número de cuenta 0-9710538-1 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Propietario Dra. Lena Ruíz Azuara

Propietario M. en C. María Cristina Trejo Solís ma. Cristina Trejo S.  
Tutora

Suplente Dra. María Dolores Jiménez Farfán

Suplente M. en C. Juan Carlos García Ramos

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 12 de abril de 2010

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

\*nlm.

A:

**Mis padres...** no tengo como agradecerles, todo lo que soy, es por ustedes...

*Suus sua suum vita de aliquis vir es lo qui quae que quod suus sua suum sententia hacen de ille illa  
illud*

Marco Aurelio

**Mi familia** (hermanos, tíos, primos y sobrinos)...con quienes aprendí...

*..humbly my best to love, to tell the truth, to be honest, possessing nothing that I needed, in earning  
the salary to work, always watch what I eat and drink, in never having fear, to respect the beliefs of  
others, always seek the best for everyone, to be a brother to all my brothers*

Mohandas Gandhi

**Nadia** ...tu sabes que esto no es por mí, ni para mí, es por y para los dos...

*У меня нет никого, кроме тебя...  
...прижавшись друг к другу, и молчали или же, мечтая вслух о своей будущей счастливой  
жизни, говорили короткие ...*

Антон П. Чехов (Дуэль )

**Mis amigos...**ni siquiera necesito nombrarlos, ni agradecerles, nunca lo hemos necesitado...

*Those friends thou hast, and their adoption tried,  
Grapple them unto thy soul with hoops of steel.*

William Shakespeare (Hamlet)

**Mi abue**....dondequiera que estes...

*Blóm eru ódauðleg ... Þú klippir þau í haust og þau vaxa aftur í vor, – einhversstaðar...*

Halldór K. Laxness (Atómstöðin)

...y a todas las personas que tienen alguna enfermedad para la cual esta “ciencia de lento aprendizaje”, no ha encontrado como mejorar las cosas y ayudarlos en ese difícil camino; espero que este modesto trabajo ayude en algo.

*...porque nada permite calar más hondo en el espíritu de los demás investigadores que confrontar  
severamente su interpretación personal con la realidad misma.*

*Santiago Ramón y Cajal (Recuerdos de mi vida)*

## AGRADECIMIENTOS

- **Universidad Nacional Autónoma de México.**

Tantos años de formación, tantos conocimientos pero sobre todo tanta gente con la que aprendí todo lo que soy como profesionista.

- **Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.**

### *Laboratorio de Neuroinmunología*

Todo mi agradecimiento a los doctores: Esperanza García, Patricia Guevara, Graciela Ordoñez, Guadalupe Palencia, Benjamín Pineda, al Mtro. Mario, a Fernando y Miguelito y muy muy particularmente a la Dra. Ma. Cristina Trejo. Por todo el tiempo que pase con ustedes y en el cual siempre me ayudaron a aprender, en algo que yo desconocía y con toda la paciencia me enseñaron, siempre con la mejor disposición, aún cuando mi ignorancia les hacía gastar materiales y tiempo. Pero sobre todo por su amistad y apoyo para llevar a cabo este trabajo.

A todas las personas que conocí en este Instituto que no pertenecían a este laboratorio y me ayudaron y apoyaron en la realización del trabajo: Dra. Lucinda Aguirre, Dra. Dora Luz de la Cruz, Dra. Laura, Dr. Edgar Rangel, Dra. Carmen, Dra. Mariana Hdz y a todas las personas que de alguna manera me ayudaron y no recuerdo ahora.

- Al enorme equipo que coordina la Dra. Lena Ruiz Azuara desde la Facultad de Química (y del cual me siento muy honrado de haber formado parte), por las facilidades para abastecernos de Casiopeínas y demás cosas que nos proveyeron, así como el valiosísimo apoyo económico durante mi trabajo.
- M. en C. Juan Carlos García Ramos. Por las horas extras como sinodal, discutiendo el trabajo y sobre todo, por el apoyo de carácter “científico” en el momento que más perdido estaba.
- Todas las personas que se me olvidan en este momento y que me apoyaron y aguantaron durante este largo camino. La omisión no es intencional, pero son tantos, que difícilmente podría recordarlos ahora a todos, pero ustedes saben quienes son y cuanto les agradezco y aprecio.



## INDICE

Abreviaturas.....	8
RESUMEN .....	10
1. INTRODUCCION.....	11
2. ANTECEDENTES .....	14
2.1. Apoptosis.....	14
2.2. Especies reactivas de oxígeno .....	19
2.3. Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.....	21
2.4. Cáncer .....	24
2.5. Tratamientos para el cáncer.....	26
2.6. Casiopeínas .....	30
3. HIPOTESIS .....	35
4. OBJETIVO GENERAL.....	36
4.1 Objetivos específicos .....	36
5. METODOLOGIA.....	38
5.1 Manejo de Cultivo Celular.....	38
5.2. Ensayo de Viabilidad Celular .....	40
5.3. Determinación de la Morfología Celular .....	40
5.4. Western Blot .....	41
5.5. Extracción de ADN.....	43
5.6. Determinación de muerte celular.....	44
5.7. Medición de formación de especies reactivas de oxígeno (ERO).....	45
5.8. Determinación de la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) .....	47
5.9. Determinación de la actividad enzimática de Catalasa (CAT). .....	48
5.10. Determinación de la actividad enzimática de Glutatión Peroxidasa (GPx).....	48
5.11. Análisis estadístico .....	49





---

6. RESULTADOS.....	50
6.1. Morfología .....	50
6.2. Viabilidad celular .....	51
6.3. Ciclo celular.....	54
6.4. Fragmentación de ADN.....	58
6.5. Inducción de formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) por efecto de Cas I-gly.....	61
7. DISCUSIÓN .....	69
8. CONCLUSIONES.....	82
9. GLOSARIO.....	83
REFERENCIAS.....	86



## Abreviaturas

µg: microgramos.

µl: microlitros.

AC: anticuerpo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADP: adenosín difosfato.

AIF: factor de inducción de apoptosis.

Amp: ampere.

Apaf-1: factor proteasa-activador de apoptosis 1.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

Cas I-gly: casiopeína I-gly [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>.

Cas IIgly: Casiopeína-IIgly [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>.

CAT: catalasa.

Cit c: citocromo c.

Co: cobalto.

CO<sub>2</sub>: bióxido de carbono.

CRADD: dominio CASP2 y RIPK1 conteniendo un adaptador con dominio de muerte.

Cu: cobre.

CuZnSOD (SOD1): superóxido dismutasa de cobre-zinc.

DCFH-DA: diacetato de diclorofluoresceína.

DMSO: dimetilsulfóxido.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

EMSA: ensayo de retardo de movilidad electroforética.

ERO: especie reactiva de oxígeno.

FADD: proteína fas-asociada con dominio de muerte.

Fe: hierro.

G0: etapa quiescente; fuera de ciclo celular.

G1: intervalo 1 de ciclo celular.

G2: intervalo 2 de ciclo celular.

GPx: glutatión peroxidasa.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno.

HGF: factor de crecimiento hepático.



HIF: factor inducible por hipoxia.

HO: radical hidroxilo.

hr: hora.

LTR: microscopia confocal de excitación.

M: mitosis.

mA: miliampere.

MD: Maryland.

ml: mililitros.

mM: milimolar.

Mn: manganeso.

MnSOD (SOD2): superóxido dismutasa de manganeso.

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio.

NAC: N-acetil-cisteína.

Ni: níquel.

nm: nanómetro.

NN: quelatos diminas.

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: anión nitrato.

O<sub>2</sub>: oxígeno.

O<sub>1</sub>: oxígeno atómico.

O<sub>3</sub>: ozono.

<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: oxígeno en estado singulete.

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ión superóxido.

OO: quelatos donadores por oxígeno.

PBS: tampón fosfato salino.

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

rpm: revoluciones por minuto.

S: etapa de síntesis dentro del ciclo celular.

SDS/PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SNC: sistema nervioso central.

SOD: superóxido dismutasa.

TNF: factor de necrosis tumoral.

TRIS-HCl: cloro tri(hidroximetil) aminoacetato.

U/ml: unidad sobre mililitro

VEGF: factor de células endoteliales.

Zn: zinc.



## RESUMEN

El cáncer es un grupo de enfermedades que están relacionadas con mutaciones y alteraciones celulares en procesos como la diferenciación, proliferación y muerte. Estos padecimientos se cuentan entre las principales causas de muerte tanto en México como en el resto de mundo. En particular, los tumores del sistema nervioso central siguen siendo uno de los tipos que presenta más resistencia a los tratamientos existentes, por lo cual ha sido necesario desarrollar nuevas investigaciones para encontrar tratamientos alternativos. En este marco se han estudiado y sintetizado nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades. Dentro de ellos están las Casiopeínas® estudiados y sintetizados en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, constituidos por iones metálicos, como el cobre (Cu). Algunos de estos, han presentado efectividad como fármacos antineoplásicos, mientras que otros se continúan estudiando. Este es el caso de la casiopeína I-gly (Cas I-gly), en la cual se ha observado actividad antineoplásica en algunas líneas celulares. Se investigó su efecto sobre la línea del glioma C6 de rata, donde mediante diversas pruebas se observó la efectividad como inductor de apoptosis de las células afectadas a diferentes dosis. Se encontró que en presencia del fármaco, las células presentan alteraciones de tipo morfológico, de manera dosis-dependiente, ocasionando un decremento en el porcentaje de las células metabólicamente activas, atacando por igual a la célula sin importar la fase del ciclo celular en que se encuentre. Se encontró evidencia de actividad de caspasas 3 y 9, así como fragmentación del ADN. De esta manera se puede decir que la Cas I-gly funciona como inductor de apoptosis por vía intrínseca en células murinas del tipo glioma C6, debido a la formación de ERO's en cualquier fase del ciclo celular.



## 1. INTRODUCCION

El cáncer abarca un grupo de enfermedades que atacan al ser humano en el cual hay afectación de protooncogenes y genes supresores de tumores con lo cual las células adquieren capacidad descontrolada de crecimiento (Bissonette et ál; 1992; García-Carrancá 2003; Hanahan y Weinberg, 2000). Esto puede ocasionar el desarrollo de tumoraciones de diversa naturaleza en el organismo.

En el caso particular del Sistema Nervioso Central, el 2% de los tumores malignos corresponde a neoplasias primarias con una incidencia de 5-8/100,000 (DeAngelis, 2001). A pesar de las numerosas investigaciones realizadas, los tipos de glioma más comunes de este sistema (glioblastoma multiforme y astrocistoma anaplásico), permanecen sin tener un tratamiento adecuado. Ambas neoplasias se caracterizan por presentar altas tasas de proliferación celular y angiogénesis (Yamada et ál; 2006) y continúan siendo resistentes a cualquier tratamiento quirúrgico, radioterapia, quimioterapia sistémica o local así como inmunoterapia.

Estudiar la fisiopatología e identificar tratamientos alternativos es de vital importancia lo que ha estimulado el diseño, la síntesis y la evaluación de compuestos con un espectro terapéutico más amplio. En este marco, en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, se han



desarrollado las Casiopeínas®. Por más de 15 años se han diseñado y sintetizado este grupo de compuestos de coordinación que contienen como centro a metales de la primera serie de transición (Mn, Fe, Co, Ni, Zn y Cu) y quelatos diaminas (NN), con quelatos aminoácidos o donadores (OO) de fórmula general  $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$  y  $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$  (Ruíz et ál; 1995; Tovar et ál; 2006).

A la fecha se han sintetizado aproximadamente 100 de estos compuestos y algunos de ellos han mostrado actividad citotóxica y antineoplásica en diversos modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*. En estudios previos se ha encontrado actividad antineoplásica de la casiopeína III-iA sobre líneas murinas de melanoma B16 y carcinoma de pulmón de Lewis y la II-gly ha demostrado actividad antineoplásica y citotóxica en líneas celulares C6 de glioma maligno de rata y carcinoma cérvico-uterino humano: HeLa y CaLo (Carvallo et ál; 2008; De Vizcaya-Ruiz et ál; 2000; Trejo et ál; 2005).

Los mecanismos moleculares por los cuales las casiopeínas ejercen tales efectos antineoplásicos y citotóxicos son desconocidos, sin embargo se ha descrito que los metales de transición y algunos de sus complejos son tóxicos en diferentes organismos. Dicha toxicidad se ha atribuido a los iones metálicos, en especial a los de cobre, por su potencial para participar en reacciones de Fenton



y su consecuente generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Stons, S. J. y Bagchi 1995).

En este sentido, un aumento en la concentración de ERO puede producir peroxidación de lípidos poliinsaturados en los organelos y la membrana plasmática, oxidación de enzimas que contienen grupos sulfhidrilos, carbonilación y polimerización de proteínas. También ocasiona despolimerización de polisacáridos, hidroxilación de purinas o pirimidinas y cortes de cadena sencilla o doble de ADN (Southorn, P. A. y Powis, 1988) y todos estos procesos pueden llevar a la célula a entrar en un proceso apoptótico.

En el caso de la casiopeína I-gly se tiene poca información acerca de sus mecanismos de acción, sin embargo si se ha probado que ocasiona rompimiento de la doble cadena de ADN (Sánchez-Bartéz, 2006), lo que nos indica la posible efectividad de este compuesto como fármaco antineoplásico. Es de suma importancia conocer los efectos de esta casiopeína sobre la proliferación celular, inducción de apoptosis y los posibles mecanismos moleculares involucrados en el efecto proapoptótico de dicho fármaco en el glioma experimental C6 en células de ratas Wistar *in vitro*, con la finalidad de colaborar en la búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas para el tratamiento de los pacientes con esta enfermedad mediante compuestos, que por ser diseñados y sintetizados en México los volverían accesibles a grandes núcleos de población.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Apoptosis

A principios del siglo XIX, en 1839, se introduce el concepto de célula en la biología y casi simultáneamente (apenas tres años después) se comienza a describir el proceso de la muerte celular en los trabajos de Vogt. Unas décadas después, Virchow comienza a describir y discutir el proceso conocido como ciclo celular (Bras et ál; 2005). Dentro de su trabajo también señala y comienza a describir de manera sistemática el proceso por el cual las células mueren. Dicho proceso, lo analiza usando diferentes términos, sin mucha diferencia del concepto de necrosis que tenía Galeno varios siglos antes (Majno y Joris, 1995). A partir de entonces, diferentes investigadores se dieron a la tarea de describir el proceso por el cual las células morían. En el siglo XX, en la década de los 50's, De Duve propone que las células pueden morir por procesos internos como la explosión de lisosomas y en la década siguiente se comienza a estudiar a los radicales libres como causa de daño intracelular (Majno y Joris, 1995). Finalmente, en 1972 Kerr, Willie y Currie, proponen la apoptosis como una vía alterna a la necrosis, de la cual se diferenciaba, por ser un proceso altamente regulado de muerte celular (Valencia y Morán, 2004) y que puede estar relacionado con una tensión oxidativa prolongada (Hansberg, 2002). Estipulan





claramente a la necrosis como un proceso de muerte violento, el cual es originado por estímulos ambientales que ocasionan una disrupción de la homeostasis celular (Bras et ál; 2005) y establecen que no todas las células mueren de esta forma, entendiendo con esto, que no significan lo mismo (Majno y Joris, 1995). De esta manera, establecen a la necrosis y la apoptosis como formas de muerte celular, diferentes en su naturaleza y origen, lo que ocasionó una gran cantidad de estudios posteriores.

En la actualidad se sabe que las células pueden morir por al menos, tres formas generales según la clasificación de Clarke (Bras et ál; 2005), y a su vez, existen miles de estímulos que pueden causarlas.

La clasificación de Clarke se basa en el involucramiento lisosomal y propone tres tipos básicos de muerte celular programada (Bras et ál; 2005):

La apoptosis o muerte celular programada de tipo I, que ocurre tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Durante el desarrollo de este tipo se han identificado diferentes eventos celulares que la diferencian de los otros procesos de muerte celular, como: la constricción celular, la fragmentación oligonucleosomal del ADN, la condensación de la cromatina, que llevara a la aparición del núcleo picnótico y la desintegración controlada de la célula en cuerpos apoptóticos. También se presenta la degradación de proteínas de diferentes tipos y entre ellos están las caspasas (Bras et ál; 2005; Valencia y



Morán, 2004). Todos estos eventos van ocurriendo a diferentes tiempos de éste proceso, de manera muy ordenada (Bras et ál; 2005) y manteniendo a la membrana celular y a las mitocondrias bien preservadas (Wyllie et ál; 1980; Ziegler y Groscurth, 2004).

El segundo tipo de muerte celular programada, involucra la autofagocitosis de organelos celulares. Primeramente, se forman vacuolas autofágicas y se presenta una dilatación de la mitocondria y el retículo endoplasmático, así como un ligero alargamiento del aparato de Golgi. Finalmente, estas vacuolas autofágicas se fusionan con los lisosomas donde los componentes citoplasmáticos pueden ser degradados por fagocitosis (Bras et ál; 2005).

El tipo III, también conocido tipo-necrosis, se caracteriza por la ausencia de lisosomas y se subdivide en dos categorías: de tipo A y de tipo B. En ambas se presenta un aumento en el tamaño de los organelos celulares, el rompimiento de la membrana plasmática y desintegración del citoplasma, diferenciándose entre sí, debido a que el tipo B presenta una destrucción citoplasmática mucho más moderada, una dilatación de la cisterna del retículo endoplasmático y en su fase terminal, los restos de la célula pueden ser heterofagocitados (Bras et ál; 2005).

El desarrollo de estos mecanismos de muerte para controlar el número celular fue un evento esencial en la evolución de organismos multicelulares. En particular el mecanismo activo de control nombrado apoptosis, que es requerido



para la formación de órganos durante el desarrollo, la homeostasis celular y para el buen funcionamiento del sistema inmune (Raff, 1992; Steller, 1995).

Respecto a las caspasas mencionadas en el proceso apoptótico tipo I, son una familia de cisteín aspartato proteasas que se encuentran como moléculas inactivas (denominadas pro-caspasas), que al recibir la señal apoptogénica sufren un rompimiento proteolítico, dando lugar a dos subunidades que constituyen, por un lado a la enzima activa o caspasa y por otro, a una subunidad más pequeña e inactiva (Ahmad et ál; 1997; Duriez y Shah, 1997; Kidd, 1998). Las caspasas fueron implicadas en el proceso de apoptosis con el descubrimiento de CED-3 (producto de un gen requerido para muerte celular en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*). CED-3 está relacionado con la enzima convertidora de interleucina 1- $\beta$  mamífera (ICE o caspasa 1), que a pesar de no participar en la apoptosis, dio pie al descubrimiento de una familia de proteasas con papeles diversos en inflamación y apoptosis (Yuan et ál; 1993). Las caspasas activadas por una señal apoptótica tienen como blanco varios sustratos celulares, como otras caspasas, actina, poli-ADP-ribosa, polimerasa, fodrina y laminas, los cuales son responsables de los cambios morfológicos observados en las células en apoptosis (Buendía et ál; 1999; Martin y Green, 1995).



Se han identificado dos vías de apoptosis relacionadas con las caspasas, las cuales están intercomunicadas, la extrínseca y la intrínseca. La primera es mediada por receptores de muerte localizados en la superficie celular, como la familia Fas yTNF- $\alpha$  (Nagata, 1997), que están ligados a proteínas adaptadoras específicas, como FADD o CRADD (Ahmad et ál; 1997). Estas moléculas adaptadoras interaccionan con las caspasas iniciadoras (2, 8 y 10) disparando su autoactivación (Muzio et ál; 1998; Martin et ál; 1998) y a su vez estas, activan a las caspasas efectoras (3, 6 y 7) (Muzio et ál; 1997).

La segunda vía, también conocida como intrínseca, está relacionada con la mitocondria e inicia con la liberación al citoplasma de varios factores contenidos en ella (como citocromo *c*, AIF, Omi/Htr2, Smac/DIABLO) y la posterior activación de vías dependientes e independientes de las caspasas. El citocromo *c* liberado se une a Apaf-1 y promueve su oligomerización (Liu et ál; 1996; Srinivasula, 1998). El reclutamiento de la pro-caspasa 9 al complejo Cit *c*-Apaf-1, da lugar a la formación del apoptosoma. Este apoptosoma ocasiona la activación de la caspasa 9 que fragmenta y activa a la caspasa 3 (Li et ál; 1997). En ambas vías, la activación de caspasas efectoras (3, 6 y 7) por caspasas iniciadoras (9, 2, 8 y 10) amplifica la señal apoptótica, para asegurar la muerte celular en una forma rápida, evitándose que el proceso de muerte se revierta.



## 2.2. Especies reactivas de oxígeno

Parte fundamental de la homeostasis celular, está relacionada con elementos químicos que pueden llevar a la célula a entrar en un proceso de muerte. En particular, el caso del oxígeno resulta ser muy importante debido al impacto que ha tenido en la célula a lo largo de su evolución (Carvallo et ál; 2007; Hansberg 2002; Zorov et ál; 2000).

El oxígeno es uno de los principales elementos presentes en la composición de la atmósfera terrestre y prácticamente todo es de origen biológico (Hansberg, 2002; Zorov et ál; 2000). Es un elemento altamente reactivo que tiende a formar compuestos con casi cualquier otro elemento (Hansberg, 2002) así como radicales libres altamente tóxicos (Halliwell, 1992).

Esto ocasiona que se generen diferentes agentes oxidantes que llevan a las células a entrar en un proceso de muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis, pues se ha sugerido que ambas se pueden ocasionar dependiendo del tiempo en que una célula sea expuesta a estas moléculas (Valencia y Morán, 2004). La principal toxicidad se da, debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) las cuales se originan por la ruptura o la excitación del dioxígeno ( $O_1$ ,  $O_3$ ,  $^1O_2$ ) o por la reducción parcial del mismo ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO\cdot$ ). Estas especies son derivados del dioxígeno ( $O_2$ ) y son mucho más reactivas que



en el estado basal del oxígeno en triplete (Hansberg, 2002; Sanocka y Kurpisz, 2004).

Dentro de las células se encuentran diversas sustancias como flavinas, porfirinas, quinonas y en organismos fotosintéticos la clorofila, que son excitados por la luz y pueden transferir esa energía al  $O_2$  y formar oxígeno en estado singulete ( $^1O_2$ ) (Lledías y Hansberg, 2000), producido también por la dismutación espontánea del  $O_2^-$ , por la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o de ácidos hipohalogenosos (Hansberg, 2002). Así mismo, en presencia de algún reductor se puede formar el ión superóxido ( $O_2^-$ ).

En el caso particular del sistema nervioso de mamíferos, la muerte de las neuronas incluye la participación, a diferentes niveles, de ERO como el peróxido de hidrógeno, el ión superóxido y el radical hidroxilo (Valencia y Morán, 2004). Esto puede deberse a diferentes aspectos básicos de la estructura misma de este sistema, como la membrana lipídica, que es muy rica en ácidos grasos polinsaturados los cuales son particularmente sensibles al ataque de dichas ERO (Halliwell, 1992).

Esto ha llevado a investigar el papel de la formación de ERO como causa de muerte celular y se ha podido observar que al someter a las células a diferentes condiciones de estrés oxidativo, estas muestran daños relacionados con el proceso apoptótico (Valencia y Morán, 2004). Se ha demostrado que estas



moléculas llevan a la muerte celular por diversas vías, por ejemplo, el caso del peróxido de hidrógeno, está relacionado con la interacción con moléculas proapoptóticas como las caspasas iniciadoras (Valencia y Morán, 2004).

### **2.3. Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos**

En este contexto, parte de la evolución de la célula ha consistido en el desarrollo de mecanismos antioxidantes que eviten que muera de manera descontrolada por efecto del oxígeno. Estos mecanismos se engloban en dos grupos fundamentales, los mecanismos enzimáticos y los no enzimáticos (Carvalho, 2007; Hansberg, 2002), que tienen varias funciones y los hay específicos para ciertas especies, mientras que otros mantienen el estado redox celular en general (Hansberg, 2002).

Los diferentes mecanismos tanto enzimáticos como no enzimáticos se han presentado como una respuesta evolutiva sumamente eficiente de defensa contra los diversos agentes oxidantes para el desarrollo de los organismos aerobios. Esto ha sido fundamental para su éxito en un ambiente que presenta alto grado de estrés oxidativo, en una atmósfera como la terrestre (Carvalho 2007).

Básicamente, se diferencian por su origen y son de dos tipos, los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En el caso de los sistemas



antioxidantes de naturaleza enzimática, los organismos cuentan con una amplia gama de enzimas dispuestas para este fin. Se cuenta con las superóxido dismutasas (CuZnSOD [SOD1] y MnSOD [SOD2]) las cuales dismutan el  $O_2^{\cdot-}$  en  $O_2$ , y  $H_2O_2$  y lo hacen de manera altamente eficiente e independientemente del pH. Estas dismutasas pueden ser intracelulares como las que contienen  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  en su sitio activo, extracelulares (ECSOD) y las que tienen Mn(III) o Fe(III) en su sitio activo y que pueden ser citosólicas o de los organelos celulares (Hansberg, 2002).

La CuZnSOD o SOD1 es una enzima homodimérica de 33 kDa abundante en el citosol celular, particularmente de glóbulos rojos y neuronas (Hart et ál; 1998); muy resistente a la desnaturalización y que en eucariontes, es el antioxidante que tiene una de las mayores actividades, protegiendo a la célula del estrés oxidativo. Su proceso está dado en dos pasos que involucran la alternancia de oxidación-reducción del cobre en el sitio activo auxiliado por el átomo de zinc (Hart, et ál; 1999; Huang, et ál; 2006). El caso homólogo en bacterias lo presenta MnSOD o SOD2, el cual es un homodímero o tetrámero que también se presenta en eucariontes. Alteraciones de estas enzimas pueden ocasionar situaciones patológicas, por citar un ejemplo, se ha sugerido que alteraciones en el nivel de MnSOD pueden estar relacionados con la enfermedad de Parkinson entre otros síndromes (Christianson, 1997).





También está presente la glutatión peroxidasa (Gpx), la cual es una enzima selenio-dependiente que reduce los hidroperóxidos o lipoperóxidos, utilizando el glutatión como agente reductor (Cisneros et ál; 1997; Epp, 1983; Hansberg, 2002). Se le ha asociado con varias enfermedades y en algunos pacientes con cáncer se ha encontrado aumento en su actividad (Cisneros et ál; 1997)

Otra de las enzimas más importantes es la catalasa (CAT) la cual es capaz de llevar a cabo la dismutación del  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$  con gran eficiencia, en un pH de entre 4 y 11 (Halliwell, 1992; Hansberg, 2002; Zorov et ál; 2000). Evolutivamente tiene un origen común para todos los organismos por lo que se le encuentra desde arqueobacterias hasta eucariontes variando el sitio celular donde se encuentre, de acuerdo a los diferentes grupos taxonómicos (Hansberg, 2002).

Los sistemas no enzimáticos pueden tener diferente naturaleza química. Entre estos están: el ascorbato (vitamina C) producido tanto por plantas como animales a partir de la glucosa (Zwolińska, 2006). Este reduce al Fe (III) y desecha el  $H_2O_2$ . El tocoferol (vitamina E) actúa como desactivador y recolector de  $^1O_2$  limitando la propagación de la lipoperoxidación. También tienen una importante actividad antioxidante los carotenos como el retinol (vitamina A) que, debido a sus dobles ligaduras coordinadas es un excelente desactivador del  $^1O_2$ .



Las melaninas son otro ejemplo de antioxidantes no enzimáticos, capaces de reaccionar con cualquier ERO (Hansberg, 2002).

Estos mecanismos actúan para evitar que las células sean atacadas por las ERO y entrar en el proceso apoptótico, sin embargo no pueden retrocederlo y al activarse las caspasas y la endonucleasa cromosomal las células morirán. Esta tensión oxidativa además de la importancia como causa de muerte celular, también juega un papel muy importante dentro de los procesos de diferenciación y proliferación celular (Hansberg, 2002). El control de la producción de las ERO han sido ampliamente estudiado en los campos de medicina y biotecnología en el desarrollo de fármacos para tratar enfermedades que están relacionadas con alteraciones del ciclo celular (de la Torre et ál; 1996; Uribe et ál; 2008).

#### **2.4. Cáncer**

El cáncer es un grupo de enfermedades, en el que las células afectadas adquieren capacidad de crecimiento descontrolado a través de un proceso de múltiples pasos, que involucra el avance gradual de una célula normal a una neoplásica (del griego *neos*=nuevo, *plasia*=crecimiento). Durante este proceso se generan mutaciones e inactivación de las vías relacionadas con diferenciación y apoptosis, así como la activación de las vías que promueven la proliferación y la diferenciación celular.



Muchas mutaciones tienen lugar en protooncogenes y en genes supresores de tumores, lo que resulta en una desregulación del ciclo celular (Bissonette et ál; 1992; García-Carrancá 2003; Hanahan y Weinberg, 2000). Como resultado de lo anterior, las células cancerosas siguen un esquema de proliferación propio, lo que les confiere la permanencia no sólo en el tejido donde se originan sino también pueden alcanzar lugares distantes a este nuevo crecimiento (Weinberg, 1996).

Observaciones de modelos humanos y animales, señalan que el desarrollo tumoral actúa como una sucesión de cambios genéticos, cada uno de ellos brindándole ventajas en el tipo de crecimiento y dando lugar a una transformación progresiva de células normales a neoplásicas (Moncevičiūtė-Eringienė, 2005). Existen más de 100 tipos de cáncer, los cuáles dan lugar a subtipos encontrados en distintos órganos y tejidos. Se enumeran seis alteraciones básicas que dictan un comportamiento maligno (Hanahan y Weinberg, 2000):

- Auto suficiencia en señales de crecimiento
- Insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento
- Potencial replicativo ilimitado
- Angiogénesis
- Invasión y metástasis



- Resistencia tumoral a apoptosis

## 2.5. Tratamientos para el cáncer

El tratamiento del cáncer, tanto en nuestro país como el resto del mundo, ha llevado al desarrollo de muchas investigaciones, aunque los resultados aún no son del todo satisfactorios, en América por ejemplo, es la tercera causa de muerte y en México, la primera en mujeres mayores de 40 años (Merck, 2010; Tovar, et ál; 2006). La quimioterapia es empleada en el tratamiento de tumores de vejiga, mama, cuello uterino, riñón, pulmón, boca, ovarios, entre algunos otros con muy buenos resultados. Señalando que en términos médicos se considera que el tratamiento ha sido exitoso cuando el paciente ha alcanzado un período de entre 5 y 10 años, sin presentar ningún síntoma de la enfermedad (Merck, 2010).

En otros casos, los tratamientos de este tipo han demostrado un bajo porcentaje de efectividad como son los relacionados con melanomas, páncreas y cerebro. Por otro lado se han desarrollado tratamientos a base de radiación donde se destruirá a las células cancerígenas aunque, dañando también tejidos normales, principalmente aquellos que tienen reproducción rápida (Merck, 2010).

En la actualidad, estos tratamientos se suelen utilizar de manera simultánea aunque la tasa de sobrevivencia de los pacientes es baja, se puede mencionar, por



ejemplo, que los tratamientos más utilizados para el cáncer de colon son el 5-fluorouracilo y oxaloplatino con una efectividad de apenas entre el 20 y 30% (Carvallo, et ál; 2006). Los fármacos anticancerígenos que se utilizan se agrupan en varias categorías: agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides derivados de plantas, antibióticos antitumorales, enzimas, hormonas y modificadores de la respuesta biológica, utilizándose comúnmente en combinación (Merck, 2010).

Sin embargo los tratamientos resultan muy agresivos para los pacientes y también suelen presentar fuertes efectos secundarios gastrointestinales, sanguíneos (como la citopenia) y dermatológicos (Merck, 2010). En este marco han sido realizados diferentes estudios en los cuales se han buscado elaborar mejores tratamientos a base de elementos con propiedades similares, pero con una mayor efectividad, más baratos y con menor impacto colateral en los pacientes (Ginés y Cervera, 2000). Tal es el caso de varios compuestos que en la actualidad se están probando como alternativas a los agresivos y costosos tratamientos existentes, a base de metales principalmente de platino que se usan en varios tratamientos por ejemplo el carcinoma ovárico humano (Trejo, et ál; 2005).

Los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) han presentado bastante resistencia a los tratamientos convencionales pues tienen diferente naturaleza (DeAngelis, 2001), por lo que se buscan nuevas alternativas. Se puede



mencionar que en la actualidad el glioblastoma multiforme y el astrocitoma anaplásico son considerados los únicos tipos de gliomas cerebrales de alto grado y los tumores cerebrales primarios más frecuentes (Kleihues y Ohgaki, 1997) caracterizándose por presentar altas tasas de proliferación celular y angiogénesis (Yamada, et ál; 2006).

Ambos siguen siendo resistentes a cualquier tratamiento y usualmente conllevan sucesivos procesos quirúrgicos, radioterapias, inmunoterapias y quimioterapias, de hasta 6 meses y de los cuales alrededor del 80% de los pacientes muere (Cobbs, et ál; 1996). Estos dos procesos están relacionados con la capacidad de producción de factores de crecimiento, tales como: factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento hepático (HGF) y el factor de células endoteliales (VEGF(Arrieta, 2001 y 2002; Li, et ál; 2005; Grau, et ál. 2007).

El crecimiento de un tumor más allá de 2 cm de diámetro, requiere llevar a cabo múltiples cambios en su ambiente molecular. Uno de ellos, es la neovascularización, que es un proceso que integra alteraciones genéticas de las células cancerosas y la respuesta del hospedador, indispensable en la formación tumoral (Rak y Yu, 2004). La formación de nuevos vasos sanguíneos al sitio del tumor es un requisito indispensable para el crecimiento tumoral y metástasis. Esto se debe a que la sangre y los vasos sanguíneos son fuente no solo de



oxígeno, factores de crecimiento, nutrientes y metabolitos, sino también de hormonas, factores de crecimiento circulantes y derivados del endotelio paracrino, útiles para invasividad, actividad proteolítica y metástasis (Rak, et ál; 1996)

Como ejemplo, VEGF (factor de crecimiento endotelio vascular) es una citosina que tiene un importante papel en vasculogénesis y angiogénesis y su producción está regulada por la concentración local de oxígeno. La hipoxia estimula su producción, aumentando la actividad del factor inducible por hipoxia (HIF) y la estabilidad del RNAm. Sin embargo, la concentración celular de oxígeno no es el único regulador de síntesis de VEGF, ya que se ha demostrado que algunas células neoplásicas pueden producirlo en normoxia (Mukhopadhyay y Datta, 2004).

Además, la mayoría de las células cancerosas tienen defectos en el control normal de apoptosis. El primer ejemplo que caracterizó lo anterior, fue la translocación cromosomal 14:18 encontrada en pacientes con linfomas foliculares, la cual yuxtapone la porción reguladora de inmunoglobulinas con el gen antiapoptótico Bcl-2 (Tsujimoto, et ál; 1984), cuyo efecto es dar resistencia a apoptosis mediada por la vía extrínseca, así como la supresión de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, como Bax y Bak (Wei, et ál; 2001). Los componentes de la cascada de señalización de apoptosis, entre otros



reguladores, están entre los objetivos más promisorios para la modulación de la inflamación y de la muerte celular en el tratamiento del cáncer (Reed, 2002).

En el caso particular de gliomas cerebrales de alto grado, los tratamientos han sido muy controversiales y se utilizan combinando la radioterapia, neurocirugía y quimioterapia a base de fármacos como la temozolamida que es un agente alquilante que impide la replicación del ADN (Budke, et ál; 2003; Ginés y Cervera, 2000). En la actualidad es uno de los fármacos más utilizados y que tiene una efectividad por debajo del 50% con varios efectos secundarios en los pacientes.

## 2.6. Casiopeínas

Estudios epidemiológicos han reportado que a partir del diagnóstico de cáncer la sobrevivencia de un paciente es menor a un año, esto a pesar de el o los tratamientos a los que esté sujeto (Yamada, et ál; 2006). Es por ello que el estudiar la fisiopatología e identificar tratamientos alternativos es de suma importancia. En el caso particular de nuestro país, el desarrollo de terapias alternativas ha estimulado el estudio, diseño, síntesis y evaluación de compuestos con un espectro terapéutico más amplio.

Probablemente el objetivo principal en el estudio y desarrollo de fármacos antineoplásicos es conseguir un tipo de muerte selectiva donde se ataque a las





células afectadas sin dañar a las células sanas (Carvallo, et ál; 2008). A su vez, la mayoría de estos fármacos parece inducir apoptosis directamente por la vía mitocondrial, activando caspasas (Trejo, et ál; 2005).

También se ha descrito que los metales de transición y algunos de sus complejos son tóxicos en diferentes organismos y dicha toxicidad se le ha adjudicado a los iones metálicos, particularmente del cobre y hierro, por su potencial para participar en reacciones de Fenton, generando especies reactivas de oxígeno (ERO) (Carvallo, 2006; Hansberg, 2002; Rivero-Müller, 1999; Stons y Bagchi, 1995). De esta manera, el aumento en la concentración de ERO puede producir peroxidación de ácidos grasos polinsaturados en los organelos y la membrana plasmática, oxidación de enzimas que contienen grupos sulfhidrílos, carbonilación y polimerización de proteínas, despolimerización de polisacáridos, hidroxilación de purinas o pirimidinas y cortes de cadena sencilla o doble de DNA (Southorn y Powis, 1988).

Dentro de estos están las Casiopeínas<sup>®</sup>, que son compuestos de coordinación de cobre que han sido estudiados y sintetizados por alrededor de 15 años en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y actualmente registrados y patentados por esta misma institución. Dichos compuestos están constituidos por un ion metálico de la primera serie de transición (Cu) al que se encuentran enlazados quelatos diiminas (1,10-



fenantrolina o 2,2'-bipiridina) que pueden o no estar sustituidos (donadores N-N) y como segundo ligante donadores N-O ( $\alpha$ -aminoacidato o peptidos) o donadores O-O (acetilacetonato o salicilaldehidato) con formulas generales  $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$  y  $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$  (Ruiz et ál; 1995; Tovar et ál; 2006).

Así mismo, algunos de los aproximadamente 100 compuestos sintetizados, han mostrado actividad citotóxica y antineoplásica en algunos modelos experimentales tanto *in Vivo* como *in Vitro* presentando mayor efectividad que tratamientos de uso regular como el cisplatino (Serment, et ál; 2006). Además se ha probado su alta eficiencia al ser sumamente específicos para células afectadas ocasionando una toxicidad muy por debajo de la que presenta el tratamiento habitual con cisplatino, lo cual le confiere una mayor seguridad en su manejo y administración (Sánchez-Bartéz, 2006).

El diseño de estas moléculas está basado fundamentalmente en tres premisas: son compuestos que contienen un metal esencial para disminuir la toxicidad; contienen quelatos que favorecen la configuración *cis* alrededor del ión metálico y estos quelatos contienen diferente nivel de toxicidad. Todo esto se estudio contemplando su potencial función como fármacos antineoplásicos en base a los conocimientos que se tienen al respecto de otros fármacos que se usan y que contienen metales de transición (Gracia-Mora, et ál; 2001).



Actualmente se tienen ya resultados relacionados con la efectividad antineoplásica de compuestos con fenantrolina y al respecto de varias casiopeínas como la Cas-II-gly [Cu (4,7-dimetil-1,10 fenantrolina) (glicinato)] NO<sub>3</sub> que han presentado actividad antineoplásica y citotóxica en las líneas tumorales murinas C6 (Trejo et ál; 2005), y humanas CaLo, HeLa, SiHa, MCF-7 y HCT-15 (De Vizcaya et ál; 2000; Bravo, et ál; 2009). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales las Casiopeínas ejercen tales efectos antineoplásicos y citotóxicos aún no son conocidos completamente. Dos de las casiopeínas más estudiadas hasta el momento, son la Casiopeína III-ia [Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetato)] NO<sub>3</sub> y la Casiopeína II-gly [Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicinato) nitrato de cobre(II)] que tienen mecanismos de acción relacionados con la inhibición de  $\alpha$ -cetoglutarato y la liberación de citocromo *c*, así como el colapso del potencial de membrana y el desacople de la cadena respiratoria (Marín-Hernández et ál; 2003). Presenta actividad antineoplásica en líneas murinas de melanoma B16 y carcinoma de pulmón de Lewis LW1, así como en ratones desnudos xenotransplantados con las línea tumoral humana HCT-40 de carcinoma de mama. Estos tumores son altamente metastáticos por lo que los compuestos mencionados, resultan de prometedora relevancia en la clínica humana (De Vizcaya, et ál; 2000; Trejo, et ál; 2005; Carvallo, 2007).



La Casiopeína I-gly [Cu 4,7-difenil-1,10 fenantrolina) (glicinato)] NO<sub>3</sub> (Fig 1.), con nombre químico: nitrato de acuo (4,7-difenil-1,10 fenantrolina) (glicinato) cobre (II) tiene un peso molecular de 550.03 g/mol y ya ha demostrado tener actividad antineoplásica en líneas tumorales humanas como HeLa, SiHa y murinas como S180, L110 y B16 en concentraciones inferiores a lo requerido para mostrar la misma actividad con Cis-platino (Sánchez-Bartéz, 2006).

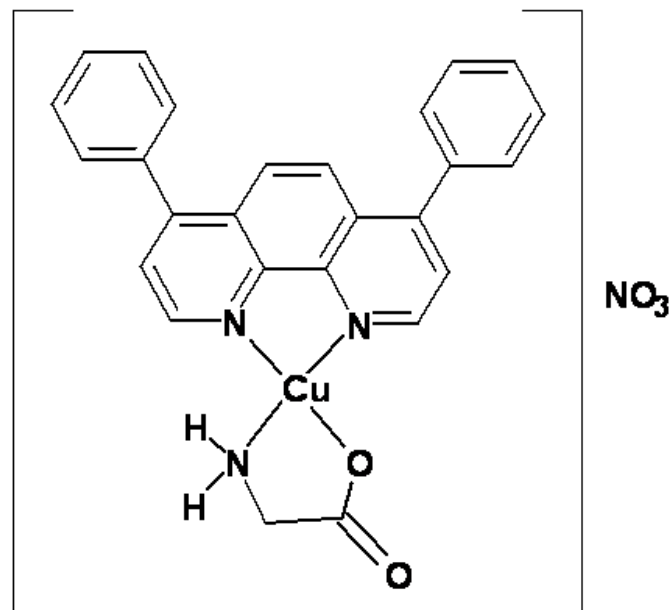


Figura 1. Estructura espacial de Cas I-gly.



### 3. HIPOTESIS

1. Si la Casiopeína I-gly (Cas I-gly) muestra un efecto antineoplásico en la línea C6 de rata *in vitro*, se observara una menor viabilidad celular, así como inducción de apoptosis a diferentes dosis del fármaco.
2. Si el mecanismo de inducción de apoptosis por Cas I-gly es a través de la generación de especies reactivas de oxígeno, se verá inhibido por la presencia de antioxidantes en las células de glioma C6 de rata.



## 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antineoplásico de la Cas I-gly y los posibles mecanismos moleculares involucrados en tal acción, en el glioma maligno experimental C6 de rata *in vitro*.

### 4.1 Objetivos específicos

1. Determinar los cambios en la morfología de las células de glioma C6 ocasionados por la acción de la Cas I-gly a diferentes dosis.
2. Determinar el efecto antineoplásico de la Cas I-gly sobre el glioma C6 de rata, mediante la determinación de la viabilidad celular usando el ensayo de MTT; la muerte celular con la técnica de yoduro de propidio por citometría de flujo; la inducción de apoptosis a través de la activación de caspasa 3 y 9 por la técnica de Western blot, así como análisis de ADN en geles de agarosa al 2% en grupos controles y tratados.
3. Determinar la formación de especies reactivas de oxígeno empleando la sonda diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), en grupos de cultivo controles y tratados.



4. Determinar el involucramiento de las especies reactivas de oxígeno sobre la viabilidad celular en grupos controles y tratados con el fármaco en presencia de cada uno de los siguientes antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y DMSO.
5. Determinar las actividades enzimáticas de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, por medio de ensayos bioquímicos.



## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Manejo de Cultivo Celular

Se utilizaron células de glioma C6 de rata, obtenidas de la American Tissue Culture Collection (Rockville, MD), clonadas en tumor glial de rata inducido con N-nitrosometilurea. De estas, se tomaron aproximadamente  $2 \times 10^6$  células en 1 ml de disolución de DMSO y se mantuvieron en un tanque con nitrógeno líquido. Se descongelaron en agua a temperatura ambiente y se mezcló con medio Dubelco Eagle modificado (Sigma Chemical Company) suplementado con suero fetal bovino (Gibco). La suspensión se centrifuga a 3,000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante obtenido se desechó y el pellet se resuspendió en 1 ml del medio preparado. Las células obtenidas se sembraron en 10 cajas de cultivo cada una con 4 ml de medio de cultivo.

Una vez en las cajas, las células se mantuvieron con medio de cultivo Dubelco modificado, suplementado con suero fetal bovino (Gibco) y adicionadas con solución de antibiótico (Sigma Chemical Co. o Gibco) al 10% y mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> bajo condiciones estériles. Estas cajas fueron revisadas diariamente para verificar el porcentaje de confluencia y cambiando el medio, dependiendo de dicha confluencia cada 24 o 48 hr.





Las cajas con células recibieron dos tipos de tratamiento. En el primero se administraron 6 diferentes concentraciones de 0, 1, 2.5, 5, 10 y 15  $\mu\text{g/ml}$ , de Cas I-gly, mismas que se utilizaron en el resto de los experimentos. Estas concentraciones, se utilizaron debido a que previamente ya han sido empleadas en estudios con Cas IIgly (Trejo, et ál; 2005), a excepción de la más alta de 15  $\mu\text{g/ml}$  la cual se añadió, para este trabajo. Por cada una de estas concentraciones se emplearon tres cajas y se incubaron por 24 horas.

En el segundo se utilizaron células a las cuales se administraron 5  $\mu\text{g/ml}$  por ser ésta la concentración intermedia de todas las que se usaron. La dosis se administró a cuatro lotes de tres cajas cada uno al conseguir una confluencia de más del 70%, reemplazando el medio por el tratamiento y se mantuvieron en incubación por 3, 6, 12 y 24 hrs respectivamente. El tratamiento se preparó con medio de cultivo adicionado con suero fetal bovino sin antibiótico y la cantidad correspondiente del compuesto.

Cumplido el tiempo de tratamiento las células se desprendieron del fondo de la caja con ayuda de un tallador, raspando toda la capa y recuperándola en tubos Falcon de 15 ml. Los tubos resultantes, se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo con antibiótico. La suspensión de células se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para su utilización en el resto de las pruebas realizadas.



## 5.2. Ensayo de Viabilidad Celular

Para determinar cuantitativamente el efecto de la Cas I-gly en la sobrevivencia de las células se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular empleando como colorante MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio). El MTT es una sal amarilla que es reducida por células metabólicamente activas con ayuda de la succinato deshidrogenasa para generar formazán de color púrpura (ATCC, 2001 y Castro de Pardo, 2006).

Para este ensayo se utilizaron cajas de 96 pozos en cada uno de los cuales se sembraron alrededor de  $3 \times 10^5$  células por pozo y se incubaron por 24 hrs. con medio de cultivo, suero fetal bovino y antibiótico. Al paso de las 24 hrs., se retiró el medio y se sustituyó por medio de cultivo adicionado con los tratamientos de casiopeína I-gly (1, 2.5, 5, 10 y 15  $\mu\text{g/ml}$ ) y otros dos grupos control, uno al cual se le agrego solamente DMSO al 20% sin tratamiento y otro con células sin ningún tratamiento ni adición. Se incubaron por 24 hrs y después de esto, fueron tratados con MTT a una concentración de 10  $\mu\text{g}$  por pozo.

## 5.3. Determinación de la Morfología Celular

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células en cámaras de portaobjetos de vidrio de 6 pozos, las cuales fueron expuestas a Cas Igly por 24 h con una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ . Se fijaron las células con 4 % de paraformaldehido, tiñéndolas con



Hematoxilina-Eosina (DakoCytomation). Se observó la morfología celular con un microscopio de luz a 20x.

#### 5.4. Western Blot

Para este procedimiento se comenzó por lisar las células obtenidas de los cultivos adicionando 250  $\mu$ l de buffer de lisis (CellLytic <sup>TM</sup>, Sigma, Chemical Co) mas inhibidores de proteasas (10mg/ml de leupetin, 1.0  $\mu$ g/ml de aprotinina y 0.1 mM de PMSF). Se agitaron por 30 minutos a 4°C y posteriormente se centrifugaron a 9,000 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y el pellet se desechó.

De esta suspensión se tomaron 10  $\mu$ l para cuantificar proteínas por el método de Lowry, en el cuál la muestra se mezcló en tubos de ensayo con 1 ml de agua bidestilada, 2 ml de reactivo A y 0.1 ml de reactivo B y se dejaron por 15 minutos después de los cuales se llevaron al espectrofotómetro y se leyeron a 560nm. Disolución A: tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre y carbonato de sodio, disolución B: Reactivo de Folin.

Para ser cargadas en los geles desnaturalizantes SDS/PAGE, las muestras de los lisados, fueron mezcladas con buffer de cargada 2X (TRIS-HCl 100mM, pH 6.8, SDS 4%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercapto-etanol 10%) y



calentadas a 65°C durante 7 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 9,000 rpm por 5 minutos a 4°C y posteriormente manteniéndolas en frío.

Fueron cargadas en gel de electroforesis de mix-acrilamida al 10% y 12% y se corrieron por un período de entre 1 y 2 hrs. y transferidas a membranas de nitrocelulosa por 2 horas a 0.20 Amp. Una vez transferidas se probaron con rojo de Ponceau para comprobar su estado.

Aquellas que presentaban un patrón adecuado de corrida, fueron bloqueadas con leche al 5% (Svelty, Nestle en polvo) en PBS 1X /1% tritón por un lapso de 2 a 4 hrs. Después del bloqueo se incubaron en bolsas individuales de plástico con los anticuerpos primarios, SOD2 (Santa Cruz), catalasa (Upstate) y SOD1 (Upstate). Estos se diluyeron para bloqueo en una mezcla de leche comercial al 5% (Lala Light), en PBS 1X y anticuerpo primario en una proporción 1:500  $\mu$ l, con esta solución se mantuvieron las membranas en agitación a 4°C por 24 hr.

Al día siguiente se lavaron las membranas 3 veces en solución de PBS 1X /1% tritón, cada una de ellas de 10 min. Al término de los lavados se agregaron los anticuerpos secundarios respectivos por 1 hr. a temperatura ambiente en agitación, seguido de 3 lavados con PBS 1X /1% tritón de 10 minutos cada uno.

Finalmente se revelaron por quimioluminiscencia. Para esto se utilizó el kit de revelación GE Healthcare Amersham (ECL Plus Western Blotting Detection System) por alrededor de 1 minuto y fue revelado con película Kodak XAR-5-ray



(Sigma Chemical Co.), a diversos tiempos desde 30 segundos y hasta 10 minutos. Este mismo proceso se utilizó para analizar caspasa 3 y 9. Después, las membranas utilizadas fueron desnudadas (eliminación del anticuerpo) para realizar una nueva prueba de western blot con actina como control de cargada, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Finalmente se cuantificaron las intensidades de las bandas en un densitómetro computarizado de Molecular Dynamics con el software ImageQuant versión 3.2.2.

## 5.5. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de acuerdo al procedimiento descrito en el kit Quantum PrepR AquaPure Genómico DNA<sub>Biorad</sub> para determinar su integridad o patrón de escalera, observándose en geles de agarosa al 12%, teñido con bromuro de etidio, de cada uno de los cultivos con las diferentes concentraciones después del período de incubación.

Para extraer el ADN total se incubaron cajas de 6 pozos con alrededor de 1,500,000 de células por cada pozo y se incubaron por 24 hrs. bajo el mismo procedimiento de cultivo celular ya mencionado y se aplicó el tratamiento a las diferentes concentraciones que se manejaron para todos los experimentos. Después de las 24 hrs. se desprendieron las células y se centrifugaron a 3,000



rpm por 10 minutos, después de lo cual, se desechó el sobrenadante, y al pellet resultante se agregaron 300 µl de solución de lisis pasando la disolución a tubos eppendorf de 1.5 ml. Se agregó también 1.5 µl de RNAsa y se incubaron por 1 hr. a 37°C.

Al término de la hora de incubación, se dejaron los tubos por 10 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 100 µl de solución amortiguadora de precipitación por cada tubo. Se centrifugaron a 9,000 rpm por 10 minutos a 4°C recuperando el sobrenadante y agregándole 300 µl de isopropanol. Esto se centrifugó una vez más a 9,000 rpm por 10 minutos a 4°C y obtuvimos un pellet (ADN) que se lavó con etanol al 70%. Se recuperó el pellet y se destaparon los tubos para evaporar el etanol y posteriormente el pellet fue redisolto en agua.

Estas muestras fueron corridas en gel de agarosa al 2% a 100V durante 1 hr a temperatura ambiente, cumplido el tiempo se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

## 5.6. Determinación de muerte celular

La inducción de la muerte celular fue determinada por la técnica de yoduro de propidio por citometría de flujo. Para este análisis, se cultivaron cajas de 6 pozos con  $1 \times 10^6$  de células por pozo por 24 hrs. siguiendo el procedimiento de cultivo



celular. Cada caja fue utilizada para cada una de las diferentes concentraciones manejadas.

Después del tiempo de incubación las células se desprendieron con ayuda de un tallador, recuperando el contenido de cada pozo por separado en tubos Falcon de 15 ml. Dichos tubos se centrifugaron a 3,000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y el pellet restante fue resuspendido con un poco del medio que aún conservaban los tubos y fijadas con etanol al 70 % en frío. Posteriormente las células fueron lavadas tres veces en PBS 1X, permeabilizadas e incubadas por 30 min con 1 mg/ml de RNAsa y 20 µg/ml de yoduro de propidio a temperatura ambiente en obscuridad. Finalmente, el análisis de las diferentes fases del ciclo celular se realizó en un citómetro de flujo, FACScan Becton Dickinson, San Jose California.

### **5.7. Medición de formación de especies reactivas de oxígeno (ERO)**

El diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) es una molécula no fluorescente que por acción de esterasas es transformado en DCFH. Esta molécula es oxidada posteriormente por ERO (anión superóxido, peróxido de hidrogeno y radical hidroxilo) para dar paso a 2,7-DCF que es altamente fluorescente. Para analizar la presencia de radical  $\cdot\text{OH}$  se utilizó esta metodología. Se lisaron células tratadas y sin tratar ( $5 \times 10^5$ ) en cajas de cultivo ( $0.7\text{cm}^2$ ) de 6 pozos y se



diluyeron en un concentración 1:10 con 40mM de TRIS (pH 7.4), se les añaden 5  $\mu$ M de DCFH-DA en metanol y se incuban por 15 minutos a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se lisaron las células y se registró la fluorescencia a una longitud de onda de 525 nm, haciendo una segunda lectura 60 min, después.

El contenedor fue térmicamente mantenido a 37°C. Se registro el nivel basal de la fluorescencia de las señales, tanto del control con metanol como de los sustratos, antes de calcular la formación de DCFH cuantificada a partir de una curva estandarizada con metanol (Sigma, Aldrich). La autofluorescencia del lisado celular fue siempre menor al 6%. El análisis se realizó con un espectrómetro de luminiscencia Parkin-Elmer LS50-B.

Para detectar la formación del anion superóxido (principal especie reactiva de oxígeno mitocondrial) se emplearon células cultivadas ( $5 \times 10^3$ ) en cajas redondas de 0.7 cm<sup>2</sup> de 8 pozos (Daigger Vernon Hills, IL USA) e incubadas con 5  $\mu$ M de agente Mitosox (Molecular Probes, Eugene, OR USA) a 37°C por 5 minutos.

Las imágenes generadas fueron observadas con microscopio confocal invertido de barrido láser (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) usando aceite x63 1.4 N.A. y objetivos planacromáticos.

La excitación de LTR a 510 nm fue provista por láser de helio-neón y la emisión de fluorescencia fue medida a 580 nm con un filtro de paso largo de barrera.





## 5.8. Determinación de la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD)

La actividad total de la SOD en los lisados totales de los cultivos controles y tratados, se realizó siguiendo la técnica de Pedraza-Chaverri (Pedraza-Chaverri, et ál; 2000). El ensayo de inhibición competitiva se realizó usando el sistema xantina/xantina oxidasa para reducir el NBT (nitroazul de tetrazolio), empleando una mezcla de reacción conteniendo una concentración final de 0.122 mM de EDTA, 30.6  $\mu$ M de NBT, 0.122 mM de xantina, 0.00 6% de albumina de suero bovino y 49 mM de carbonato de sodio. A 500  $\mu$ l del homogenado (1:100) se les agregaron 2.45 ml de la mezcla antes descrita y 50  $\mu$ l de xantina oxidasa (2.8 U/l, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA) y se incubaron a 27 °C durante 30 min. La reacción se detuvo con 0.08 mM cloruro de cobre y las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro de UV-Visible VIS Perkin-Elmer modelo lambda 20. La cantidad de proteína que inhibió la reducción de NBT al 50% se definió como una unidad de la actividad de SOD. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína. Para medir la actividad específica de MnSOD y CuZnSOD se inhibió con DDC (dietil-ditiocarbamato, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA ). Para el ensayo de la actividad de MnSOD, la muestra se incubo con 50 mM DDC a 30 °C durante una hora y entonces se dializó por 3 hr con 3 cambios de 400 volumen de amortiguador fosfatos 5mM pH 7.4 y 0.1 mM de EDTA. La actividad de CuZNSOD se obtuvo



restando la actividad de las muestras tratadas con DDC de la actividad total de SOD previamente medida.

### **5.9. Determinación de la actividad enzimática de Catalasa (CAT).**

La actividad de catalasa fue determinada usando el método de Aebi, (Aebi, H. 1984) en el cual se mide la descomposición del  $H_2O_2$  a 240 nm en un espectrofotómetro de UV-Visible VIS Perkin-Elmer modelo lambda 20. Los resultados de actividad son expresados como  $K/mg$  de proteína.

### **5.10. Determinación de la actividad enzimática de Glutación Peroxidasa (GPx)**

La actividad enzimática de GPx se determinó mediante la técnica de Hafeman y col (Hafeman et ál; 1974). Esta técnica permite valorar de manera indirecta la actividad de GPx que después de la reacción enzimática degrada una concentración inicial conocida de GSH a una concentración final desconocida que es comparada con una curva de calibración procesada simultáneamente. Se tomaron 30  $\mu l$  de cada uno de los lisados totales y se incubaron con 0.5 ml de GSH 2 mM (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA) + 0.50 ml de buffer de fosfatos 0.04M pH 7.0 + 0.25 ml de  $NaN_2$  0.01M, aforando a 2 ml con agua desionizada. Esta mezcla se agitó durante 5 min a 37 °C y se le agregó 1 ml de  $H_2O_2$  1.25 mM preincubando a la misma temperatura durante 3 minutos más.



Posteriormente, se sustrajo 1ml de la mezcla incubada y se le agregó 4 ml de ácido metafosfórico; esta mezcla se centrifugó durante 15 min; el GSH libre de proteínas se determinó usando 1 ml del centrifugado + 1 ml del amortiguador + 0.5 ml de DTNB (ácido 5,5- ditiobis-2-nitrobenzóico). Después de 2 min, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm. Para estas cuantificaciones se usó un espectrofotómetro de UV-VIS Perkin-Elmer modelo lambda 20. Los resultados de actividad se expresaron como U/mg de proteína.

#### **5.11. Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y fueron analizados con empleando la prueba  $t$  de student y prueba de Tukey para comparar grupos de medias, usando un criterio de confianza de 95%.



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Morfología

En general se puede decir que el sistema nervioso de los vertebrados es muy similar y en especial entre los mamíferos. Debido a esto se han utilizado varios modelos animales para el estudio de los tumores cerebrales, principalmente por la imposibilidad técnica de realizarlos con humanos (Grobber, et ál; 2002).

La necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas para los gliomas ha llevado a investigar posibles alternativas (Miura, et ál; 2008). Desde hace más de 40 años se comenzó a trabajar con cultivos celulares de rata de diferentes especies y subespecies. Las células gliales de rata (al igual que la mayoría de los mamíferos) presentan muchas similitudes con las humanas y en ellas se han probado modelos de glioblastomas inyectando células de glioma murino como el tipo C6 (Benda, et ál; 1968; Grobber, et ál; 2002; Miura, et ál; 2008).

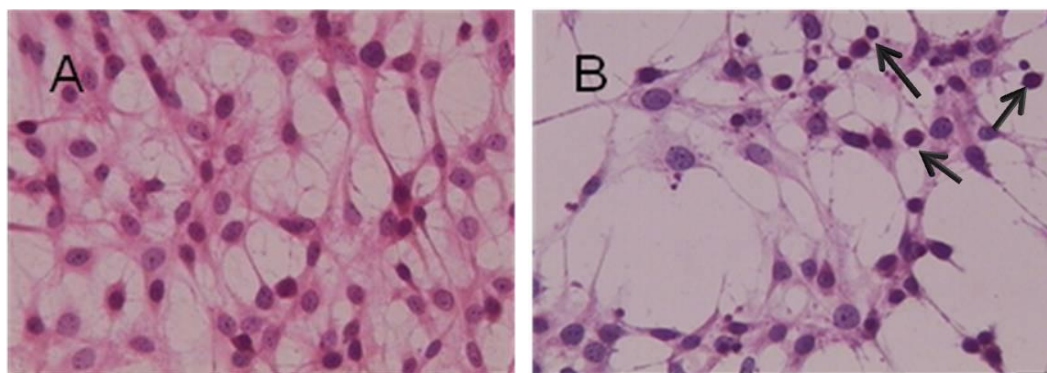
Estas, son células gliales con morfología de tipo fibroblastoide adherente con un citoplasma ramificado rodeando a un núcleo elíptico manchado con retículo endoplasmático amplio (Benda, et ál; 1968; ATCC, 2010).

En este estudio al someterlas a tratamientos con Cas I-gly encontramos los siguientes resultados. Las células controles (con DMSO al 20%) permanecieron morfológicamente sin ningún cambio en relación a aquellas que si recibieron



cualquiera de los tratamientos de Cas I-gly desde la concentración mas baja de 1  $\mu\text{g/ml}$ , hasta la mas alta de 15  $\mu\text{g/ml}$  (Fig 1.1 A), siendo evidentes las modificaciones en la morfología que presentaron las células que recibieron tratamiento.

Desde la dosis más baja (1  $\mu\text{g/ml}$ ) la célula adquiere una forma redondeada y contraída, además de presentar desprendimiento de la caja de cultivo (Figura 1.1 B). Estas alteraciones son más evidentes conforme se incrementa la dosis, lo que nos permite sugerir que Casiopeína I-gly induce cambios morfológicos de manera dosis-dependiente.



**Figura 2.** *A) Células de glioma C6 de rata sin tratamiento. B) Células de glioma C6 de rata con una dosis de Cas I-gly con una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ ; ya con esta dosis se pueden apreciar cambios morfológicos en la célula (señalados con flechas).*

## 6.2. Viabilidad celular

Para analizar la viabilidad celular en presencia del fármaco se realizó un ensayo de MTT por 24 hr. Al realizar dicha prueba, en la cual las células



metabólicamente activas hidrolizan las sales de tetrazolio (ATCC, 2001), las dosis utilizadas del fármaco ocasionaron una disminución en la viabilidad celular estadísticamente significativa al ser analizados por medio de una prueba estadística *t* de student, a partir de la primera dosis de 1 µg/ml.

En la tabla 1 se pueden observar los porcentajes de viabilidad que se obtuvieron presentándose de la siguiente manera:

Tabla 1 Viabilidad celular

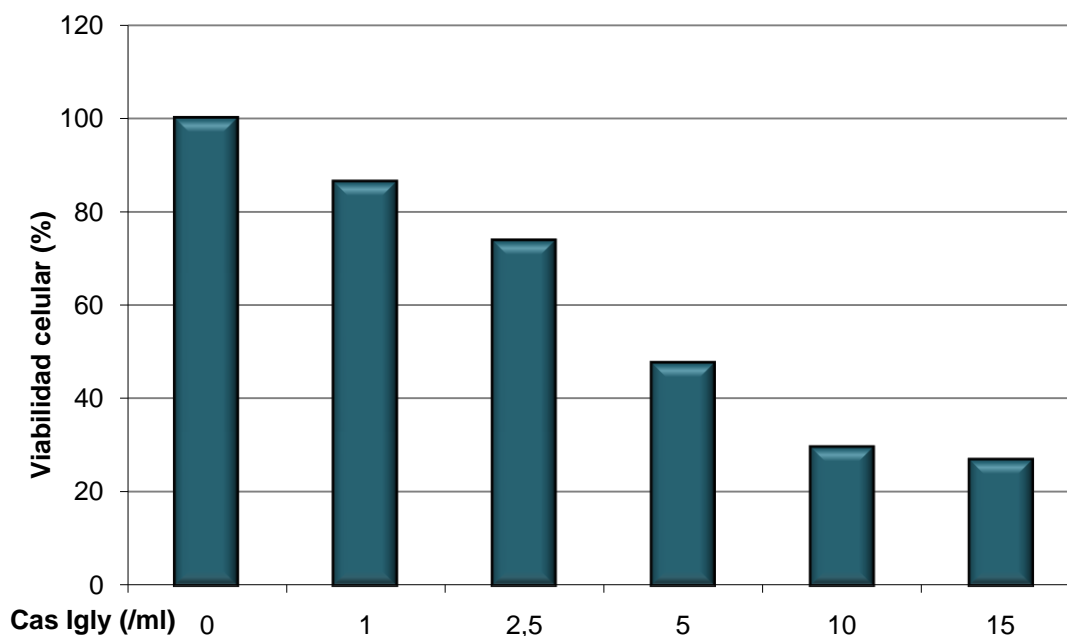
Dosis	Ctrl (0 µg/ml)	1 µg/ml	2.5 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	15 µg/ml
% células metabólicamente activas	100 ±	86.44 ±	73.84 ±	47.74 ±	29.72 ±	27.02 ±
	0.08	0.10	0.08	0.19	0.07	0.03

Se puede notar que a partir de las primeras dosis hay un descenso en la viabilidad, teniendo que entre el grupo control y el tratamiento a la dosis más baja (1 µg/ml) ya hay una diferencia en la viabilidad del 13.56%. Esto demuestra que aún a dosis bajas ya se presenta un efecto, ocasionando una disminución en la viabilidad. Entre este grupo y el siguiente, de dosis de 2.5 µg/ml la diferencia que se presenta es muy similar a la anterior con un 12.6%.

Es entre las dosis de 2.5 µg/ml y de 5 µg/ml, es donde se presenta la diferencia más grande, de 26.1%, indicando el cambio más importante. Lo cual también queda muy claro al observar el comportamiento en la gráfica (Fig. 3), pues se



puede observar que la viabilidad celular disminuye desde las primeras aplicaciones, pero presentando su punto crítico en el paso, entre las concentraciones de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  y 5  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 3.** Efecto dosis-dependiente de Cas I-gly en la viabilidad celular de células C6. Se llevó a cabo un ensayo de MTT para dicha medición.  $P \leq 0.05$

Al comparar el grupo tratado con la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , con el grupo control se observa que la diferencia se vuelve del 52.26% reduciendo la viabilidad a poco mas de la mitad con respecto al grupo control, indicándonos que a partir de esta concentración, mas de la mitad de las células no presentan actividad metabólica.



Con esto se pudo determinar que el fármaco, indujo la disminución de la viabilidad celular de una forma dosis-dependiente.

De la misma manera que en el caso de los estudios morfológicos, se puede establecer esta relación dosis-dependiente. De hecho en los análisis morfológicos las alteraciones que presentan las células confirman la inactividad del metabolismo celular y son congruentes con los resultados de la viabilidad celular, en donde también parece encontrarse que el punto crítico está entre las dosis de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  y 5  $\mu\text{g/ml}$ .

### **6.3. Ciclo celular**

En el caso del cáncer, las células crecen a un ritmo descontrolado en el que se crean diferentes alteraciones que afectan procesos y vías que están relacionadas con su proliferación y diferenciación. Muchas de las cuales traen como resultado desregulación del ciclo celular (Hanahan y Weinberg, 2000; Bissonette et ál; 1992; García-Carrancá 2003).

Se procedió entonces a analizar posibles diferencias en el efecto del Cas I-gly con relación a la etapa del ciclo celular donde se encontraban. Se evaluó si el compuesto podría estar afectando a las células en algún punto del ciclo celular en particular y con ello, disminuir la viabilidad como se describió en el apartado





anterior. Para esto se realizó un ensayo de citometría de flujo empleando como colorante el yoduro de propidio. Los resultados se presentan en la tabla 2.

En la etapa subG0 en el grupo control es menor del 25% en condiciones normales, sin tratamiento. A partir de la incorporación del fármaco el porcentaje de células que se encuentran en esta fase va aumentando considerablemente de manera que al llegar a la concentración más alta de 15  $\mu\text{g/ml}$  casi el total de células (~ 95%) se encuentran en esta fase.

**Tabla 2 Efecto de Cas I-gly en Ciclo Celular en Glioma C6**

Cas I-gly ( $\mu\text{g/ml}$ )	%subG0	%G0/G1	%S/G2	%M
0	22.76 $\pm$ 1.82	36.46 $\pm$ 3.39	21.52 $\pm$ 1.94	19.4 $\pm$ 5.04
1	26.29 $\pm$ 0.51	38.2 $\pm$ 4.49	20.3 $\pm$ 2.44	13.26 $\pm$ 1.54
2.5	28.38 $\pm$ 2.15	48.85 $\pm$ 3.08	14.75 $\pm$ 5.04	9.27 $\pm$ 6.08
5	83.75 $\pm$ 1.03	11.78 $\pm$ 0.76	3.61 $\pm$ 0.26	0.83 $\pm$ 0.05
10	91.03 $\pm$ 2.43	5.95 $\pm$ 1.54	2.13 $\pm$ 0.50	0.66 $\pm$ 0.25
15	94.23 $\pm$ 1.79	3.88 $\pm$ 0.82	1.23 $\pm$ 0.34	0.32 $\pm$ 0.17

Los resultados están expresados como media  $\pm$  desviación estándar. La significancia estadística ( $p \geq 0.05a$ ,  $p \geq 0.001b$ ,  $p \geq 0.0001c$ ), fue obtenida, comparando las células no tratadas contra las que recibieron tratamiento de Casiopeína I-gly (1, 2.5, 5, 10, 15  $\mu\text{g/ml}$ ).

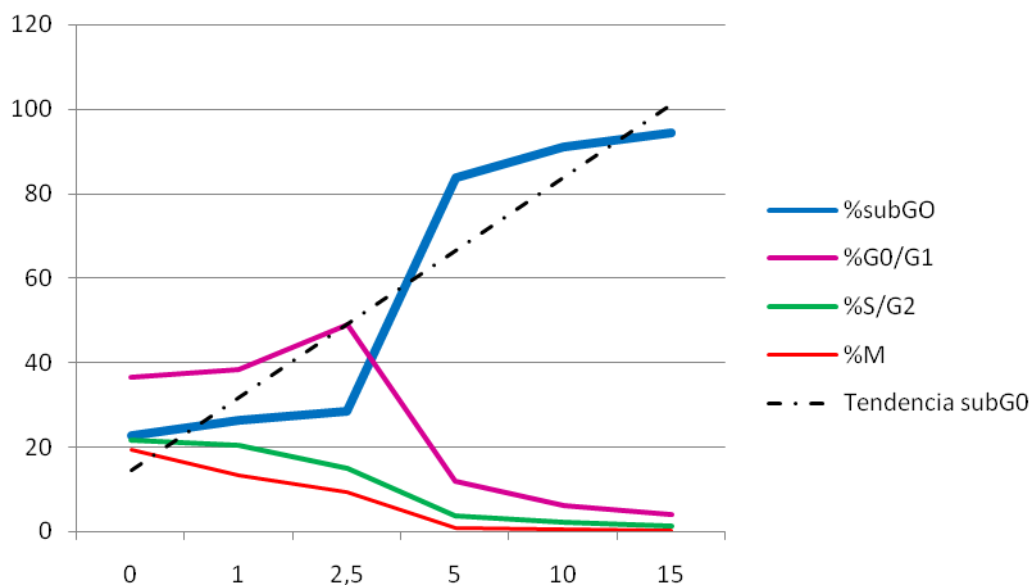
Por el contrario, el comportamiento del resto de los grupos es inverso, presentándose así que, a medida que la concentración aumenta, el porcentaje de células en determinada fase va disminuyendo. Tanto las fases G0/G1, como



S/G2 y M, van disminuyendo el número de células presentes en esa etapa a medida que la dosis aumenta. Esto es muy claro en la figura 4, en donde se puede observar las tendencias opuestas entre la fase subG0 y el resto.

Es evidente el aumento en el porcentaje de células que pasan a fase subG0 al añadir el fármaco y además también queda de manifiesto el hecho de que se presenta un efecto dosis-dependiente, donde se encuentra un cambio importante entre las concentraciones de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  y 5  $\mu\text{g/ml}$ .

En el siguiente grupo, en fase G0/G1, se puede encontrar que al contrario del grupo subG0, el porcentaje de células va resultando menor a medida que las dosis van siendo más altas, excepto por la dosis de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  que aumenta en relación a la dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Los siguientes grupos mantienen la misma tendencia a reducir el porcentaje de células en esta etapa.



**Figura 4.** Comportamiento de los porcentajes de células presentes en cada fase del ciclo celular.

Aún en las concentraciones más bajas e independientemente de la fase del ciclo celular donde se encuentren, las células pasaron a subG0. Podemos establecer que este caso, también se presenta un efecto dosis-dependiente, en el que el fármaco impedirá a las células continuar reproduciéndose, sin importar el momento en que se encuentren.

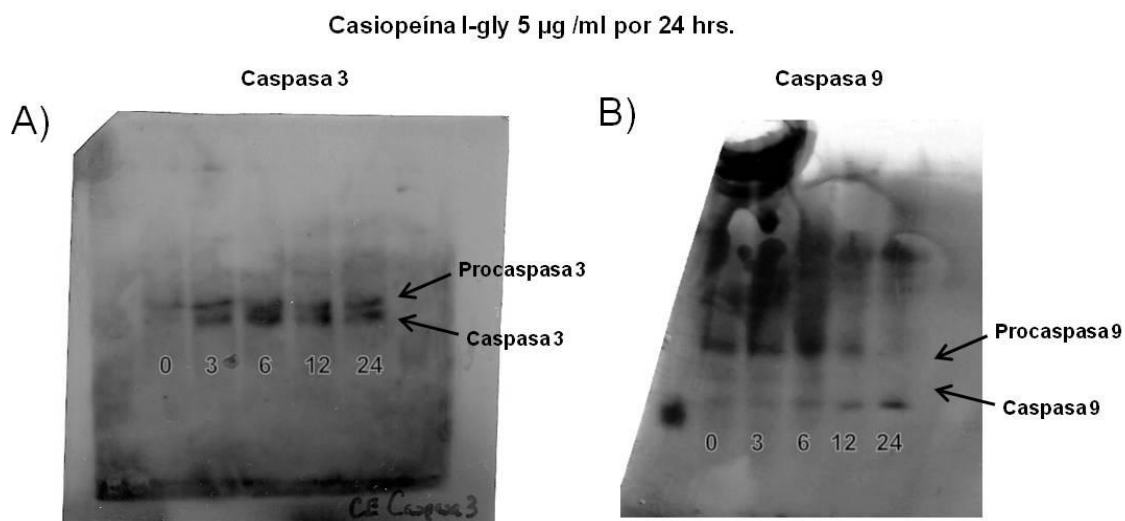
Todo esto nos permite decir que estamos observando un decremento en la viabilidad celular de manera dosis-dependiente, sin importar la fase del ciclo celular donde se encuentren, pues las está llevando directamente a la fase subG0 ocasionando su muerte. Estos resultados se han encontrado previamente con otros tipos de casiopeínas en donde la viabilidad también presentó un comportamiento similar dosis-dependiente (Carvallo et ál; 2008)



#### 6.4. Fragmentación de ADN

Una buena cantidad de fármacos antineoplásicos tienen una actividad relacionada con la inducción de apoptosis por vía intrínseca. Esto se relaciona directamente con la liberación de citocromo c, el cual se libera de la mitocondria para unirse con Apaf-1 (factor activante de caspasas apoptóticas) y la posterior activación de caspasas iniciadoras como la 9 y finalmente de las ejecutoras como la caspasa 3. Por consiguiente se procedió a investigar si la naturaleza del mecanismo está relacionada con dicha activación de caspasas.

Debido a esta importancia en el proceso apoptótico se determinó la posible actividad de caspasa 3 y 9 por medio de Western Blot en células controles y tratadas con casiopeína I-gly (Fig. 5).



**Figura 5.** Análisis de Western Blot para caspasa 3 (A) y 9 (B), de muestras obtenidas de cultivos control y tratados a diferentes tiempos de incubación a una misma concentración (5 µg/ml) a intervalos de 3, 6, 12 y 24 hrs. cada uno.



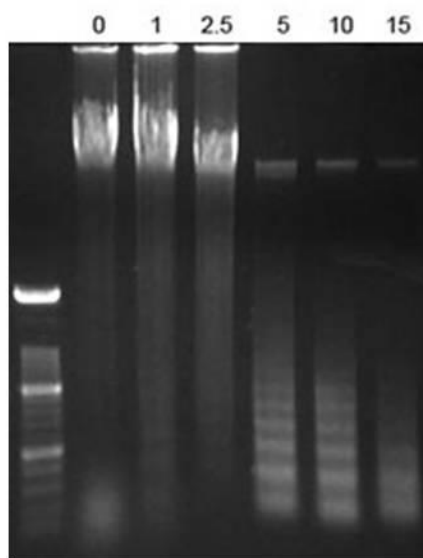
Para analizar la actividad de caspasas, se hizo utilizando una misma dosis de 5  $\mu\text{g/ml}$  a 3, 6, 12 y 24 hrs. Se utilizaron anticuerpos (AC) que los reconocieran fragmentos tanto inactivo (procaspasa 3; 30kd) como activo de caspasa 3 (17kd), así como caspasa 9, en sus formas activa (34kd) e inactiva (procaspasa 9; 47 kd).

En el caso de caspasa 3 se observó la activación, a medida que avanzó el tiempo, al igual que la caspasa 9, donde claramente se puede observar la activación relacionada con el tiempo. A medida que aumentó éste, la actividad fue aumentando también, siendo evidente a las 12 hrs, en comparación con la expresión que se tiene en el grupo control.

Al observar el patrón obtenido del gel de agarosa se puede observar claramente el fraccionamiento de ADN en un patrón de escalera (Figura 6). Dicho patrón está presente desde la concentración de 1 y 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , y con mayor claridad a partir de la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , continuando en las concentraciones de 10 y 15  $\mu\text{g/ml}$ . En el grupo control no se observó dicho patrón.



Concentraciones de Casiopeína I-gly 5 µg/ml  
por 24 hrs.



**Figura 6.** Efecto de la Cas I-gly en el ADN. Se puede observar el marcador en el carril extremo izquierdo, seguido por los extractos de células C6 control y los tratamientos después de 24 hrs. de incubación con las diferentes concentraciones de Cas I-gly.

De esta manera, la Cas I-gly demostró inducir apoptosis de manera dosis-dependiente, y como también ya se ha demostrado en trabajos previos con otras Casiopeínas® ocasiona la fragmentación de ADN aún a concentraciones bajas (Serment, et ál; 2006). En relación al aumento de niveles de caspasa 3, de manera indirecta, se pudo observar en el gel de agarosa y encontrar la formación de fragmentos nucleosomales de ADN esto además puede estar relacionado con la formación de ERO, promovidas por la reducción del centro metálico de cobre (Serment, et ál; 2006). La caspasa 9 mostró actividad tiempo-dependiente en el ensayo de cinética enzimática. Esto sugiere como una de las



vías de acción, un mecanismo dependiente de caspasas el cual puede ser mediado por la liberación del citocromo c y la consecuente formación del apoptosoma.

Con estos resultados se pudo encontrar uno de los mecanismos de acción del fármaco, que refuerza y explica lo encontrado en los ensayos previos, pues esta sería una de las respuestas a lo que se encontró en los análisis de ciclo celular, viabilidad celular y morfología.

#### **6.5. Inducción de formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) por efecto de Cas I-gly**

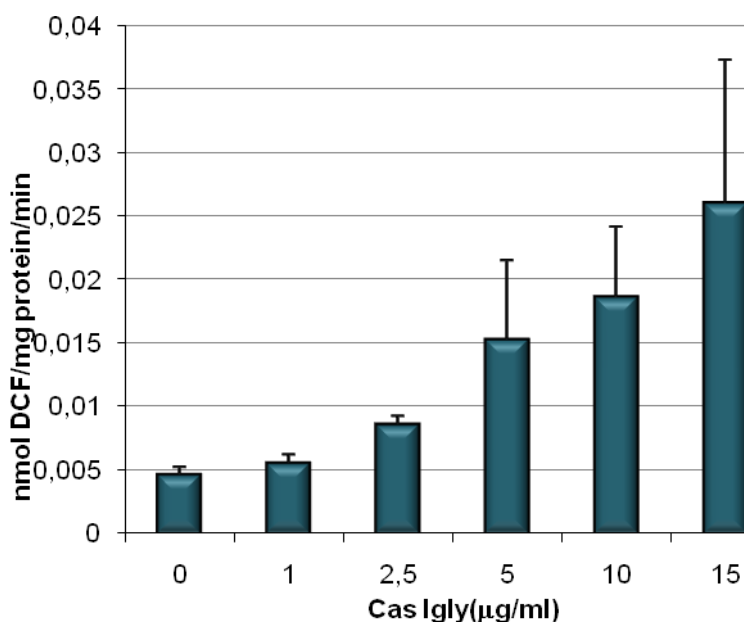
La generación de especies reactivas de oxígeno, es un evento de suma importancia en el desarrollo que puede ocasionar que las células mueran aún en condiciones normales. Sin embargo en el caso del cáncer las tasas de proliferación se incrementan debido a la incapacidad de las células de entrar de manera natural a un proceso de muerte, por lo que al generar dichas ERO se ocasiona una detención de la proliferación y diferenciación y con esto se consigue llevarlas a la muerte por apoptosis.

En trabajos previos se ha descrito que una de esas casiopeínas (Cas II-gly), presenta una importante actividad formando ERO, activando a su vez vías apoptóticas dependientes e independientes de caspasas (Trejo et ál; 2005;



Carvalho, 2007). Por lo tanto, se investigó si Cas I-gly es capaz de inducir la formación de dichas especies reactivas de oxígeno.

La generación de ERO fue determinada en lisados celulares de glioma C6 tratados con Cas I-gly usando la prueba de Diacetato de diclorofluoresceina (DCFH-DA) para verificar la presencia de especies reactivas de oxígeno. Se pudo observar un incremento significativo en la absorbancia en  $\lambda = x$  nm con las diferentes concentraciones que van de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  hasta 15  $\mu\text{g/ml}$  de Cas I-gly (Fig. 7).



**Figura 7.** Aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno por efecto de Cas I-gly en células C6. Resultados obtenidos usando la prueba de Diacetato de diclorofluoresceina (DCFH-DA).  $P \leq 0.05$  en 24 hrs.





Al determinar que, efectivamente se están produciendo ERO, se debía analizar su efectividad al momento de enfrentarse a los sistemas antioxidantes celulares, pues como ya se ha mencionado son mecanismos muy eficientes de eliminación de estas moléculas y con papeles muy específicos. Por esta razón se analizó la eficiencia del fármaco en presencia de sistemas antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos, utilizando diferentes enzimas y otros antioxidantes de diferente origen.

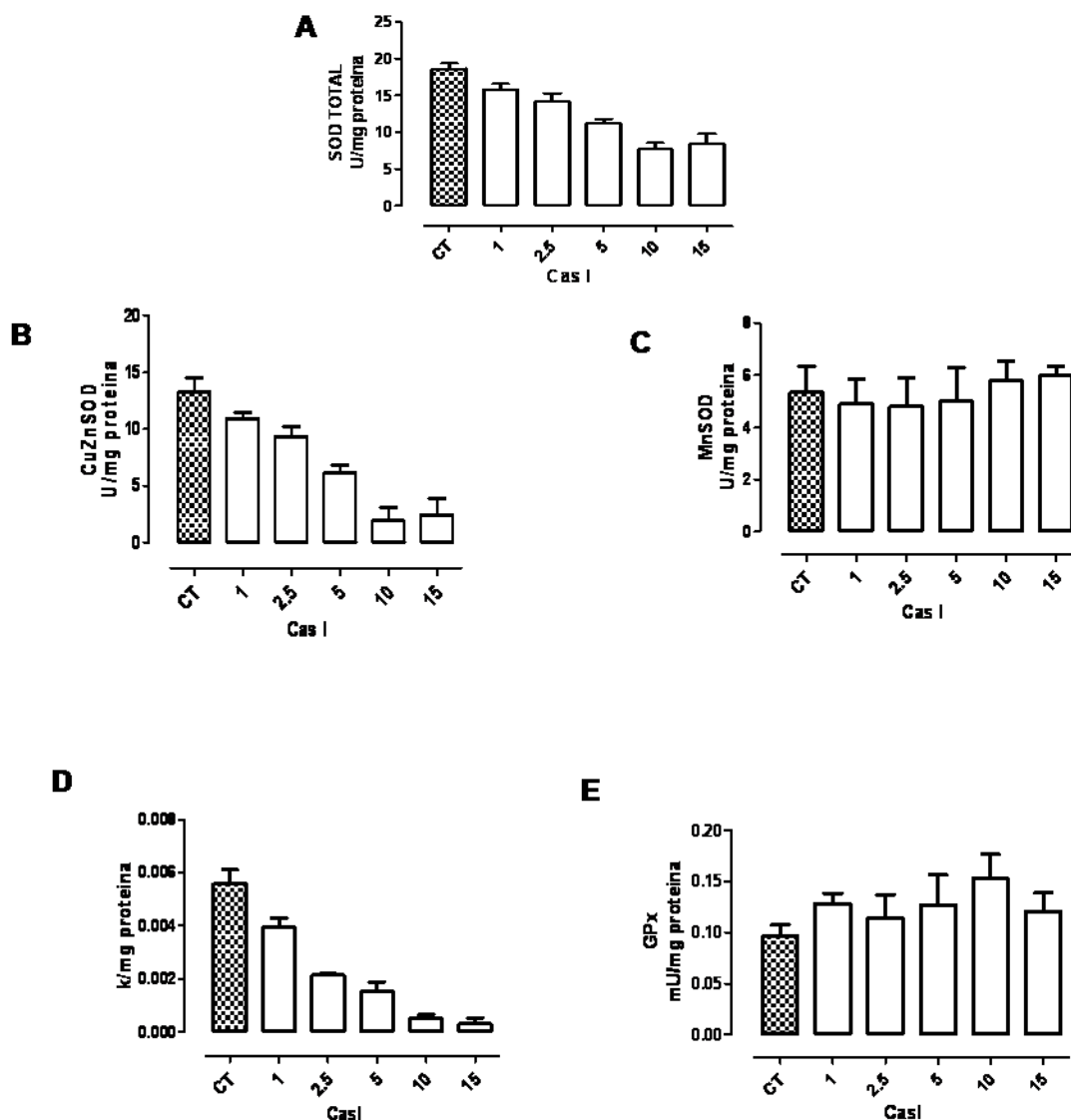
En particular algunas enzimas se vuelven fundamentales en la eliminación de ERO, como CAT, SOD y GPx y se vuelven esenciales para la sobrevivencia celular y aún cuando se presentan de manera extracelular pueden incrementarla en condiciones de estrés oxidativo. Al aplicar estas enzimas a las células de glioma C6, se pudo observar que las protegen, lo cual cambia al aplicar el tratamiento de Cas I-gly. Esto ocasiona que las células resistan la presencia de ERO pero sin conseguir mantener la viabilidad que se presenta en el grupo control.

Uno de los blancos de las especies reactivas de oxígeno son las enzimas antioxidantes las cuales trabajan en las células para evitar los daños que éstas pueden ocasionar. Por lo tanto el trabajo continuó con la determinación de las actividades enzimáticas de SODtotal, CuZnSOD, MnSOD, CAT y GPx, todas ellas, proteínas que están relacionadas con el mantenimiento celular y balance



redox. Por lo cual se procedió a determinar si su actividad se veía afectada por el fármaco, por un exceso de ERO o algún otro medio. Esto se realizó con lisados celulares de glioma C6 control y tratadas con 1, 2.5, 5, 10 y 15  $\mu\text{g/ml}$  de Cas I-gly por 24 hrs (Fig. 8). Los resultados se analizaron por medio de la prueba estadística de Tukey.

El tratamiento de Cas I-gly disminuye la actividad de SODtotal (Fig. 8. A) a las concentraciones de 1, 2.5, 5, 10 y 15  $\mu\text{g/ml}$  ocasionando decrementos porcentuales de 14.90%, 24.05%, 39.91%, 58.55% y 54,60% ( $15.82 \pm 0,72$ ,  $14.12 \pm 1.15$ ,  $11.17 \pm 0.61$ ,  $7.71 \pm 0.82$ ,  $8.44 \pm 1.32$  U/mg de proteína) respectivamente, mostrando un descenso en la actividad de la enzima.



**Figura 8.** A) Actividad de SOD total; cada barra representa a un grupo experimental de células de glioma C6. La primera es el grupo control sin ningún tratamiento. A partir de la segunda se encuentran los grupos sometidos a tratamiento de 1, 2.5, 5, 10 y 15 µg/ml por 24 hrs. siendo igual para los siguientes gráficos (B, C, D y E). B) Actividad de CuZnSOD, se incluye el ensayo de Western Blot con cinética enzimática a la misma concentración (5 µg/ml) por 24 hrs. C) Actividad de MnSOD por debajo se observa el resultado del análisis de Western Blot a diferentes concentraciones en un mismo tiempo. D) Actividad de catalasa mostrando, al igual que en el caso anterior el análisis de Western Blot con diferentes concentraciones. E) Actividad de glutación peroxidasa a diferentes concentraciones.



Esta enzima se calculo considerándola también por separado analizando la actividad de dos de sus tipos (CuZnSOD y MnSOD). En el caso de CuZnSOD (Fig 8. B) se obtuvo un decremento de actividad más dramático que en SODtotal presentando valores porcentuales negativos de actividad de 17.58%, 29.65%, 53.63%, 85.5% y 81.6% ( $10.92 \pm 0.54$ ,  $9.32 \pm 0.93$ ,  $6.14 \pm 0.68$ ,  $1.92 \pm 1.18$ , y  $2.44 \pm 1.43$  U/mg de proteína), respectivamente, a las mismas concentraciones del fármaco (1, 2.5, 5, 10 y 15  $\mu\text{g/ml}$ ). Por su parte la actividad enzimática del grupo control fue de  $13.25 \pm 1.28$  U/mg de proteína.

El mismo comportamiento se observó en la actividad de CAT (Fig 8. D) teniendo un decremento en su actividad de 29.10%, 29.10 %, 61.35 %, 72.28 %, 99.08 % y 100% ( $0.0039 \pm 0.00032$ ,  $0.0021 \pm 0.00008$ ,  $0.0015 \pm 0.00034$ ,  $0.0005 \pm 0.00015$  y  $0.00032 \pm 0.0002274$  U/mg de proteína) a las concentraciones de 1, 2.5, 5, 10 y 15  $\mu\text{g/ml}$  de Cas I-gly, respectivamente; mientras que la actividad del grupo control fue de  $0.00556 \pm 0.005034$  U/mg de proteína.

Sin embargo en el caso de MnSOD (Fig. 8. C) las diferencias porcentuales de descenso de actividad son de 8.07%, 10.13%, 5.94%, -8.26% y -12.34%, pudiendo observar incluso, un incremento de actividad a las concentraciones de 10 y 15  $\mu\text{g/ml}$  y sin presentar diferencias significativas a ninguna concentración ( $4.91 \pm 0.96$ ,  $4.80 \pm 1.12$ ,  $5.02 \pm 1.29$ ,  $5.78 \pm 0.75$ ,  $6.00 \pm 0.36$ ).



De la misma manera al analizar los datos de actividad de GPx (Fig 8 E) no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones ( $0.13 \pm 0.01$ ,  $0.11 \pm 0.01$ ,  $0.13 \pm 0.03$ ,  $0.15 \pm 0.02$  y  $0.12 \pm 0.02$ ). Asimismo los valores porcentuales de decremento nos indican aumentos en la actividad de esta enzima (33.02%, 17.91%, 31.68%, 58.28% y 24.84%).

CuZnSOD y CAT son enzimas muy importantes en el control y mantenimiento de los niveles de especies reactivas de oxígeno en la célula. Sin embargo en presencia de Cas I-gly (aún a bajas concentraciones) no pueden realizar su tarea de una manera totalmente eficiente. Esta eficiencia disminuye considerablemente a manera que la concentración del fármaco aumenta y sucede una relación proporcional, en la que la actividad de las enzimas disminuye a medida que aumenta la concentración del compuesto y en las concentraciones más altas la actividad se ve reducida casi en su totalidad después de 24 hrs.

Esto se podría relacionar con hecho de que el exceso de  $H_2O_2$  generado por CuZnSOD puede reaccionar con metales de transición como el Cu (Rivero-Müller, 1999). Sin embargo es de considerar que la actividad de CAT disminuye, puesto que esta enzima tolera altas concentraciones de peróxido, aumentando su actividad cuando la concentración aumenta (Baquero, 2005). Así, aumenta la toxicidad por la generación de ERO, altamente tóxicas para la célula. Este



comportamiento no se presentó para el caso de MnSOD y GPx probablemente por la ausencia de una molécula de algún metal del grupo mencionado.

Las actividades enzimáticas así como la expresión de MnSOD y GPx permanecieron sin cambio en ninguna de las concentraciones, habiendo utilizado el mismo esquema que en los casos anteriores (1, 2.5, 5, 10 y 15  $\mu\text{g/ml}$  de Cas I-gly).

En estudios con otras casiopeínas se ha sugerido que la oxido-reducción puede suceder desde antes de que la casiopeína cruce la membrana celular (Rivero-Müller, 1999). En este espacio extracelular la catalasa se encargaría de remover, por lo menos parcialmente, las ERO presentes en ese sitio.

En base a estos datos se puede concluir que una de las vías de inducción de apoptosis de la Cas I-gly es producir especies reactivas de oxígeno, sin embargo no es la única y presentan una alta eficiencia para llevar a las células neoplásicas a un proceso de muerte celular.



## 7. DISCUSIÓN

El estudio del cáncer y sus posibles tratamientos es una rama creciente y prometedora dentro de la investigación biomédica. Los estudios relacionados con esta área avanzan encontrando y describiendo las vías de funcionamiento de la enfermedad misma y sus posibles tratamientos.

Un buen modelo de investigación para el estudio de glioblastomas, han sido las células de glioma C6 de rata, las cuales presentan varias similitudes con las de otros mamíferos (Benda et ál; 1968; Grobber et ál; 2002; Miura et ál; 2008). Esto resulta relevante al pensar en los gliomas de alto grado cerebrales que afectan al ser humano y posibles alternativas terapéuticas que surgan de este modelo.

Este tipo celular ya ha sido estudiado con anterioridad para probar otras Casiopeínas (Trejo et ál; 2005) y en nuestro caso, los resultados nos indican que la Cas I-gly incrementa la muerte celular por apoptosis de manera dosis-dependiente. Parte fundamental del éxito en el desarrollo de nuevos tratamientos, consiste en conseguir precisamente la inducción de apoptosis, lo cual puede darse por diferentes vías, que pueden estar trabajando de manera independiente o simultánea y que se ha observado con otras casiopeínas (Carvallo et ál; 2008; Carvallo, 2007, Trejo et ál; 2005). En las diferentes pruebas realizadas se observa, que es efectiva aún desde sus concentraciones mas



bajas, induciéndolas a entrar en el proceso apoptótico por diversas vías, dependientes e independientes de caspasas.

Desde las concentraciones más bajas promueve la inducción de apoptosis de acuerdo a los cambios morfológicos y citológicos. Al igual que en el caso de Cas II-gly y Cas III-ia se ha identificado que una de las vías de acción es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Carvallo, et ál; 2008; Carvallo, 2007; Trejo, et ál; 2005; Serment, 2006).

En trabajos previos se ha descrito como funcionan otras casiopeínas para producir ERO (Kachadourian et ál; 2010). Se ha propuesto que una de las vías tiene que ver con la muy probable interacción de la casiopeína con compuestos tiólicos como el glutatión (Marín-Hernández et ál; 2003). Se ha propuesto que podría relacionarse con glutatión peroxidasa (Gpx), la cual estaría reaccionando con Cas I-gly reduciendo el complejo de cobre (Cu) y dando origen al radical glutatil ( $GS^{\bullet}$ ) que podría reaccionar con otro glutatión (GSH) para originar glutatión oxidado (GSSG) o también puede reaccionar un GSH con oxígeno para formar ion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y GSSG. La formación de  $O_2^{\bullet-}$  y GSSG también podría resultar de la oxido-reducción de Cas I-gly con glutatión y oxígeno (Kachadourian et ál; 2010).

Posteriormente la superóxido dismutasa convierte el  $O_2^{\bullet-}$  en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que reacciona con la casiopeína reducida para producir radical



hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) que puede iniciar el daño mitocondrial que se traduce en un desbalance de la expresión de proteínas de cadena respiratoria y un aumento en la producción de ERO. La consecuente disfunción mitocondrial resultaría como producto de los bajos niveles de GSH y el aumento de los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kachadourian et ál; 2010).

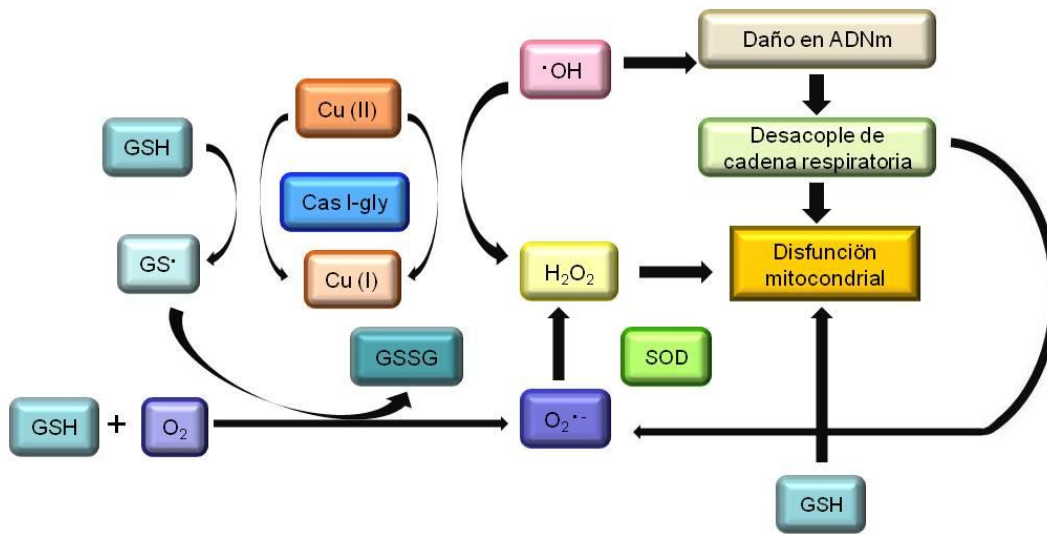


Figura 9 Hipótesis de la formación de ERO (Kachadourian et ál; 2010).

También se ha establecido que otro de los mecanismos esta relacionado con alteraciones mitocondriales no nucleares, como el colapso del potencial de membrana ocasionado por apertura de canales de  $\text{K}^+$ , pérdida en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibición del estado 3 de respiración por inducción de liberación del citocromo *c* y el consecuente incremento de las ERO (Marín-Hernández et ál; 2003).



Desde el nivel morfológico se pueden observar cambios típicos del proceso apoptótico, como el redondeo y la contracción claramente visible de las células, mientras que en el gel de agarosa se encontró la formación de fragmentos nucleosomales de ADN, así como la actividad de caspasa 3 y 9, pruebas de inducción de apoptosis por vía dependiente de caspasas (Carvalho, 2006; Trejo, 2005) y que no se habían descrito para el caso de Cas I-gly (Sánchez-Bartéz, 2006). Esto además nos indica que las células están pasando a fase subG0 del ciclo celular, lo cual ya se ha observado con algunos otros tratamientos antineoplásicos (Lin, 2006) y ocasiona que las células mueran por vía apoptótica sin importar la fase del ciclo en que se encuentren.

Los tratamientos a base de Cu han probado ocasionar alteraciones en el ciclo celular (Huster et ál; 2007; Trejo et ál; 2005) ocasionando en algunos casos, por ejemplo, en ciclinas y cinasas, y efecto que al parecer se presenta independientemente de la especie animal en la que sea aplicado (Huster et ál; 2007).

Se ha probado que el fármaco no ocasiona este efecto en células normales, incluso en trabajos *in vivo* probablemente debido a que la célula neoplásica es más vulnerable al haber cambios en su fisiología, como en el potencial de membrana (Sánchez-Bartéz, 2006), demostrando que las casiopeínas pueden ser más eficientes como antineoplásicos, que los tratamientos convencionales



(Tovar, 2006) que son altamente agresivos para todas las células, aún aquellas que se encuentran sanas como ya se ha probado en linfocitos (Sánchez-Bartéz, 2006).

En otros estudios se ha encontrado efecto del fármaco bajo ciertas condiciones de tiempo o con ciertas concentraciones (Trejo et ál; 2005), en nuestro estudio Cas I-gly empieza a actuar desde las concentraciones mas bajas, manteniendo un comportamiento dosis-dependiente.

Se sabe que los metales de transición producen alta toxicidad generando ERO y que pueden reaccionar de diferentes maneras con varias moléculas de los organelos, restando protección a la célula (Stons, y Bagchi, 1995; Southorn y Powis, 1988; Rivero-Müller, 1999). En particular el cobre (Cu) presenta alta propensión a participar en reacciones de Fenton y con ello ocasionar una alta toxicidad (Carvallo, 2007) por lo que algunos de estos metales son usados como agentes antineoplásicos, precisamente porque pueden eliminar células tumorales.

También se ha descrito que debido, precisamente a la presencia del Cu, otras casiopeínas catalizan ERO excediendo la capacidad de los mecanismos de protección de las mismas células. Se ha sugerido que esto sucede por efecto del potencial redox de las casiopeínas, principalmente relacionado con el centro de Cu por la presencia de fuertes agentes reductores (Rivero-Müller, 1999).



Esto ocasiona daño en biomoléculas y estructuras celulares que finalmente llevan a la célula a la muerte (Rivero-Müller, 1999). La presencia de Cu debe ser una de las causas de la efectividad de la Cas I-gly, pues se pudieron observar daños a diferentes estructuras celulares como las mitocondrias al observar cambios como la liberación del citocromo *c* y caspasas 3 y 9 y en estudios previos se ha demostrado que las casiopeínas causan daño a estos organelos por bloqueo de algunas vías y desacople de la cadena respiratoria así como peroxidación de lípidos, lo que ocasiona la liberación de factores apoptogénicos. (Serment, 2006).

Los electrones desapareados de las ERO les confieren una alta reactividad que ocasiona diferentes afectaciones y hay evidencia de que están relacionadas con una buena cantidad de enfermedades del sistema nervioso, encontrando que algunos neurotransmisores están relacionados con este proceso (Rukmini et ál; 2004). Para evitar el daño causado por las ERO, en condiciones normales, las células cuentan con sistemas antioxidantes enzimáticos que evitan que mueran por esta causa (Carvallo, 2007; Hansberg, 2002; Rukmini et ál; 2004), pero que no resultan suficientes para detener el trabajo de Cas I-gly. Básicamente encontramos que mientras CAT, SOD total y Cu/ZnSOD disminuyen su actividad de manera dosis-dependiente, MnSOD y Gpx no presentan un cambio significativo. Este comportamiento podría explicarse debido a diferentes causas:



En el caso de la superóxido dismutasas, se puede decir que en eucariontes se encuentran presentes actuando sobre el anión superóxido que se produce ocasionalmente durante la reducción del dióxígeno, lo cual ocurre de manera natural durante los procesos de respiración y fotosíntesis (Hart, et ál; 1999). Estas, son enzimas que contienen diferentes cofactores metálicos por lo que no todas mantienen una misma fórmula o estructura y gracias a los cuales son clasificadas (Huang et ál; 2006; Parker y Blake, 1988), y en este caso se les analizo en conjunto y por separado a aquellas que contienen Cu/Zn y Mn como cofactores encontrándose diferencias en sus actividades.

Podemos establecer que pueden existir diferencias en su comportamiento debido a causas estructurales y evolutivas. El tipo asociado a manganeso (Mn) esta relacionado evolutivamente con el que se coordina con hierro (Fe) y se encuentran presentes en procariontes y eucariontes mientras que CuZnSOD es exclusiva de eucariontes, lo que señala como más primitivas a las dos primeras (Parker y Blake, 1988). Esto además esta relacionado con el hecho de que las estructuras primarias, secundarias y terciarias son muy similares entre los tipos Fe y Mn, con particular similitud en los pliegues ternarios y siendo prácticamente idénticos los ligandos a cofactores metálicos guardando ninguna similitud con el tipo CuZnSOD.



En el caso particular del sistema nervioso (central y periférico) se tiene conocimiento que ambas superóxido dismutasas están presentes, aunque no están bien definidas sus distribuciones, mas se ha comprobado, que alteraciones en estas enzimas tienen relación con enfermedades de este sistema (Huang et ál; 2006; Pardo et ál; 1995). Los estudios al respecto de la localización particular de CuZnSOD aún son limitados y solo se ha descrito que hay una amplia presencia en sistemas nerviosos centrales, por lo menos para los casos murino y canino y en particular se ha identificado que es abundante y tiene importante actividad en células gliales (Pardo et ál; 1995).

En el caso de CuZnSOD, la presencia de Zn es fundamental para regular la capacidad de oxidar y reducir del Cu, debido a la fuerte coordinación que existe entre ellos por un puente de histidina (Chillemi et ál; 1997; Pardo et ál; 1995) que es único de esta enzima (Hart et ál; 1998). Si hay ruptura de estos puentes la molécula pierde estabilidad y no actúa adecuadamente perdiendo su estructura tridimensional y lo cual esta íntimamente relacionado con los cambios de concentración del zinc y en algunos casos se ha demostrado que la actividad de enzimas con características similares al glutatión pueden ocasionar una deficiencia por lo menos temporal del Zn (Huang et ál; 2006). Esto ocasionaría decrementos en la actividad de la enzima sin poder restablecerse, aún con adición de Zn, siendo el estrés oxidativo, la principal causa de los cambios



estructurales de SOD y se ha propuesto que aumentos en la peroxidación de lípidos pueden tener este efecto de la misma forma que con la catalasa (Huang et ál; 2006).

Por otro lado, la otra superóxido dismutasa analizada fue la MnSOD y se sabe que esta enzima parece bastante estable aún en concentraciones altas de  $H_2O_2$  (Parker y Blake, 1988). En otros tipos de cáncer (como el ovárico), se ha demostrado que la actividad de MnSOD se incrementa. En el caso de algunos glioblastomas y astrocitomas, se ha encontrado que un factor importante es el papel de  $TNF\alpha$ , pues en células que presentan una alta actividad de MnSOD también presentan una alta resistencia a la citotoxicidad de este factor, mayor resistencia a fármacos con actividad redox y con ello, a presentar daño en ADN (Cobbs et ál; 1996); el factor  $TNF\alpha$  también influye en la actividad de Gpx ocasionando la inhibición de su actividad (Cisneros et ál; 1997).

Mientras tanto, aquellas células que tienen una baja actividad de MnSOD, presentan alta propensión a sufrir los efectos de  $TNF\alpha$  y entrar en proceso de muerte celular (Cobbs et ál; 1996) lo cual podría estar sucediendo con la aplicación del fármaco, pues aunque no observamos que disminuye su actividad tampoco aumenta y se mantiene sin poder detener el efecto de las ERO generadas además de que sabemos que varios tipos de tumor presentan baja actividad de MnSOD (Oberley y Bueftner, 1979).



La Gpx esta involucrada en el proceso de reducción de  $H_2O_2$  y parece estar distribuida de manera uniforme en el cerebro y casi exclusivamente en células gliales (Moreno, et ál; 1995). También se ha demostrado que su actividad depende de la concentración de los sustratos a ser oxidados (Epp, et ál; 1983) y aumenta en el caso de células tumorales ocasionando una alta resistencia a fármacos. Además en el caso de otros trastornos del sistema nervioso se ha encontrado que existe una relación inversa entre la actividad de esta enzima y superóxido dismutasa. Cuando los pacientes presentan mayor actividad de SOD también expresan niveles menores en la actividad de Gpx, aún en el caso de personas sanas (Abdalla et ál; 1986).

En el caso del sistema nervioso, por lo menos en su sección central, la catalasa (CAT) esta asociada a pequeños componentes celulares como microperoxisomas, presentado una distribución bastante uniforme a lo largo del sistema (Brannan et ál; 1981; Zimatkin y Lindros, 1996). Se considera que, en general, el nivel de actividad de esta enzima, en el total del sistema nervioso es bajo, sin embargo de manera local puede tener una funcionalidad de importancia considerable (Gaunt y De Duve, 1976; Zimatkin y Lindros, 1996) y amplia relevancia en padecimientos neurológicos (Moreno et ál; 1995). La CAT se presenta prácticamente en todas las células del sistema nervioso aunque a diferentes concentraciones (Moreno et ál; 1995) y podría sugerirse que la





actividad que estamos observando puede también estar relacionada con el hecho de que se ha comprobado que los microperoxisomas con actividad de catalasas en células adultas, se encuentran casi exclusivamente en células gliales y algunas neuronas aminérgicas (Moreno et ál; 1995; Zimatkin y Lindros, 1996).

De esta manera es probable que se encuentre que las actividades de CAT y CuZnSOD presenten un aumento en su actividad puesto que se sabe que ambas, trabajan de manera coordinada, igual que lo hacen la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Ambos sistemas no trabajan de forma simultánea y de hecho se ha comprobado que CAT trabaja cuando se presentan altas concentraciones de ERO, mientras que Gpx lo hace a bajas y siendo mutuamente excluyentes (Cisneros, et ál; 1997). Esto podría explicar el decremento en las actividades de CAT y CuZnSOD pues al trabajar como un sistema conjunto a altas concentraciones, lo que se esta observando es que estas comenzarían a funcionar, pero no son suficientes para restaurar el potencial de membrana y Gpx estaría presentando el comportamiento típico de células tumorales en los cuales aumenta su actividad (Cisneros, et ál; 1997). Además podría sugerirse que se generan altas concentraciones de ERO por lo que la actividad de CAT/CuZnSOD se vuelve mas importante e inhibe a Gpx y sumado a la resistencia natural que esta enzima presenta en células tumorales,



podríamos establecer que su actividad no desciende aunque tampoco es suficiente para acabar con las ERO generadas.

Esto además, causaría el incremento de la actividad de SODtotal, pues también se ha encontrado que en condiciones de aumento del estrés oxidativo las actividades de esta enzima se incrementan como consecuencia de la descomposición oxidativa de algunos neurotransmisores (Rukmini et ál; 2004).

Como en el caso de otras casiopeínas, Cas I-gly, presenta un mecanismo dependiente de caspasas. En este caso tenemos evidencia de un proceso apoptótico por vía intrínseca donde esta funcionando la caspasa 9 como iniciadora, lo que esta relacionado con la liberación previa de citocromo *c*, un mecanismo que ya se ha comprobado en el funcionamiento de otras casiopeínas. De esta manera se esta generando el apoptosoma y la posterior activación de la caspasa ejecutora 3 la cual hidroliza a ICAD (DFF45/inhibidor de DNAsa-activada por caspasa 3 para obtener CAD que se transloca al núcleo, con lo cual ataca directamente a la cadena de ADN (Todor et ál, 2002), resultando una de las vías de fragmentación que observamos.

Otra posible vía por la que esta teniendo este efecto es debido a sus mismas propiedades químicas, pues se ha demostrado que el cobre unido a 1,10-fenantrolina forma un complejo que presenta actividad nucleasa, rompiendo la cadena de ADN por medio de un mecanismo oxidativo, por si solo y al trabajar



con peróxido de hidrógeno actúa como nucleasa artificial. De esta manera, ataca átomos de carbono (C1') de la desoxiribosa del ADN, en condiciones fisiológicas (Sigman et ál; 1979) y el ión de cobre en presencia de peróxido de hidrógeno es capaz de romper el ADN causando daño mayor que otros iones metálicos como el  $Fe^{+3}$  (Aruoma et ál; 1991).

De esta manera, los resultados nos indican que la Cas I-gly se presenta como un promisorio fármaco en el tratamiento de gliomas cerebrales de alto grado que actualmente no cuentan con alternativas que ofrezcan una sobrevida considerable.



## 8. CONCLUSIONES

Casiopeína I-gly ocasionó alteraciones apoptóticas en células de glioma C6, de manera dosis-dependiente, aún desde las concentraciones más bajas. Este comportamiento se pudo observar en las diferentes pruebas realizadas. En base a lo anterior se concluye lo siguiente:

1. Morfológicamente Cas I-gly esta induciendo cambios en las células desde las dosis más bajas y aumentando conforme las dosis se incrementaron.
2. La Cas I-gly disminuye la viabilidad de las células expuestas al fármaco también de una manera dosis-dependiente.
3. El fármaco esta actuando sin importar la fase de ciclo celular en el que se aplique ocasionando que las células pasen a fase subG0 y se presenta con una dependencia de la dosis.
4. Cas I-gly induce fragmentación del ADN como efecto de las caspasas 3 y 9 evidenciando la presencia del proceso apoptótico por vía intrínseca.
5. En base a las propiedades químicas que presenta el cobre que contiene la Cas I-gly presenta efectos sobre la viabilidad celular debido a la formación de especies reactivas de oxígeno y aún en presencia de sistemas antioxidantes enzimáticos, no permite que las células proliferen.



## 9. GLOSARIO

**Ácido nucleico.** Polímeros de alta masa molar, formados por la repetición de monómeros denominados nucleótidos, mediante enlaces fosfodiéster y que tienen importante papel en el proceso de síntesis de proteínas.

**Aminoácido.** Moléculas orgánicas de tamaño pequeño que cuentan con un grupo amino y uno carboxilo unidos a través de un átomo de carbono que completa su valencia con un átomo de hidrógeno y un residuo R que identifica a los diferentes compuestos, los cuales se combinan para formar proteínas.

**Angiogénesis.** Fenómeno fisiológico que ocurre durante el desarrollo embrionario y en la reparación de heridas. De manera desregulada, es un mecanismo clave en algunas condiciones patológicas, como en la génesis tumoral e inflamación crónica.

**Apoptosis.** Tipo de muerte celular en la que una serie de procesos moleculares en la célula conducen a su muerte. Este es el proceso normal mediante el cual el cuerpo se deshace de células innecesarias o anormales. El proceso de apoptosis puede estar impedido en las células cancerosas. También se llama muerte celular programada.

**Astrocitoma anaplásico.** Tumor que empieza en el cerebro o la médula espinal, cuyas células pequeñas en forma de estrella se llaman astrocitos.

**Bcl-2.** Familia de proteínas relacionadas con procesos de permeabilización mitocondrial y procesos apoptóticos de vía intrínseca. Su nombre se deriva de la primera proteína descubierta de esta familia, el protooncogén Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)

**Carbonilación.** Reacción química consistente en la introducción de una molécula de monóxido de carbono en otra molécula de naturaleza orgánica o inorgánica que produce carbonilos.

**Caspasa:** familia de cisteín aspartato proteasas que se encuentran en la célula; el residuo de cisteína les permite participar en la ruptura de proteínas, y son esenciales en el proceso de apoptosis.

**Citocromo c.** Proteína monomérica pequeña (con un solo polipéptido), que funciona como transportador electrónico mitocondrial entre los complejos respiratorios III y IV.

**Citometría de flujo.** Técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas alineadas, por delante de un haz de láser focalizado.

**Citopenia.** Deficiencia de uno o más tipos de células de la sangre, puede desarrollarse durante la terapia del cáncer.

**Citosina.** Una de las cinco bases nitrogenadas que forman parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Es un derivado pirimidínico, con un anillo aromático y un grupo amino en posición 4 y un grupo cetónico en posición 2.

**Citotóxicidad.** Calidad de tóxico para células.



**Compuestos de coordinación.** Complejo neutro o cargado constituido por un catión metálico y un conjunto de moléculas orgánicas denominados ligantes que posean átomos con pares de electrones que puedan compartir con el ion metálico.

**Despolimerización.** Transformación de un polímero en un compuesto más simple.

**Electroforesis.** Proceso que se utiliza para separar macromoléculas en una solución según la movilidad de estas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (electroforesis en papel o en acetato de celulosa), a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o en disolución (electroforesis libre).

**Enzima activa.** También denominada holoenzima, resulta de la combinación de una apoenzima y su(s) cofactor(es).

**Esterasa.** Enzima que cataliza reacciones de hidrólisis (fase I de la biotransformación) de ésteres carboxílicos (carboxiesterasas), amidas (amidases), ésteres de fosfato (fosfatasas), entre otros.

**Fármaco.** Cualquier sustancia, diferente de un alimento o un artefacto, que se utiliza para el diagnóstico, el alivio, el tratamiento y la curación de las enfermedades, así como para la prevención de las mismas.

**Gen.** Secuencia de nucleótidos del DNA que codifica un producto proteico. Incluye regiones anteriores y posteriores a la región codificante, así como secuencias interpuestas (intrones) entre segmentos codificantes (exones).

**Glioma.** Tipo de tumor que se origina en el cerebro o la médula espinal. Se le llama glioma puesto que se origina a partir de las células gliales.

**Hemangioblasto.** Célula mesodérmica embrionaria que origina el endotelio vascular y las células hematopoyéticas.

**Hidroxilación.** Cualquier proceso químico que introduzca unos o más grupos del oxhidrilo (- OH) en un compuesto (o radical).

**Hipoxia.** Trastorno en el cual, el cuerpo por completo (hipoxia generalizada), o una región de él (hipoxia de tejido), se ve privado del suministro adecuado de oxígeno.

**Homeostasis.** Estado de equilibrio dinámico o el conjunto de mecanismos por los que todos los seres vivos tienden a alcanzar una estabilidad en las propiedades de su medio interno.

**Inmunoglobulinas.** Proteínas plasmáticas producidas por el sistema inmune en respuesta a la presencia de sustancias extrañas potencialmente dañinas que puedan amenazar al organismo.

**Interleucina.** Proteína soluble de bajo peso molecular mediadora de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades.

**Metástasis.** Proceso en el que las células pierden su localización específica dirigiéndose a los tejidos y órganos próximos, desarrollando la capacidad de invadir otros tejidos, adquiriendo la posibilidad de crecer en localizaciones o ambientes diferentes a aquel sitio donde se originaron.



**Necrosis.** Proceso de muerte celular violento, originado por estímulos ambientales que ocasionan una disrupción de la homeostasis.

**Neoplasia.** Masa anormal de tejido, producida por multiplicación de algún tipo de células de manera descoordinada con los mecanismos que controlan la multiplicación celular en el organismo.

**Normoxia.** Nivel normal de oxígeno.

**Nucleasa.** Enzima que produce la rotura de los enlaces fosfodiéster de la cadena polinucleotídica de los ácidos nucleicos.

**Nucleosoma.** Formación nuclear en la que el ADN se enrolla alrededor de proteínas de tipo histona. Es el primer nivel de enrollamiento de ADN.

**Oncogen.** Gen cuya función es la de codificar proteínas como los factores de crecimiento, que regulan la transcripción o bien la replicación del ADN; indispensables para la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis.

**Oxidación.** Reacción química donde un metal o un no metal, cede electrones.

**Paracrino.** Secreción de una sustancia (hormona o factor de crecimiento) que es utilizada por las células adyacentes a las que la produce.

**Peroxidación.** Oxidación al grado mayor posible que causa la formación de un peróxido.

**Procaspasa.** Caspasa en forma inactiva, formada por dos subunidades de diferente peso molecular.

**Proteasa.** Enzima proteolítica que degrada total o parcialmente a las proteínas.

**Proteolítico.** Degradador de proteínas.

**Protooncogenes.** Genes de células normales que tienen la capacidad potencial de convertirse en oncogenes después de su activación por transducción debida a retrovirus, reordenamientos de ADN o mutaciones puntuales.

**Quelato.** Estructura molecular en la que los iones metálicos se hallan unidos a un compuesto orgánico.

**Reacción de Fenton.** Se produce de la catálisis de peróxido de hidrógeno con hierro que ocasiona la generación de radicales altamente reactivos de acuerdo a la siguiente reacción:  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$

**Tumor.** Nombre dado al aumento o lesión producida por el crecimiento anormal de células.

**Vasculogénesis.** Evento biológico que se inicia de manera temprana en el embrión partir de la diferenciación de células de la hoja visceral del mesodermo lateral hacia el hemangioblasto.

**Western blot.** Técnica usada para la detección de proteínas, mediante el uso de un gel de electroforesis el cual transferirá las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, donde se analizan con la ayuda de anticuerpos específicos.



## REFERENCIAS

1. Abdalla, D. S. P; Monteiro, H; Oliveira, J. A. y E. J. H. Bechara. (1986). Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in schizophrenic and manic-depressive patients. *Clinical Chemistry*. **32** (5): 805-807.
2. Aebi, H. (1984). Catalase In vitro. En: *Methods in Enzymology*. Colowick, S.P; Kaplan, N.O. y L. Packer (Eds.). **105**. Academic Press, Londres. Pp: 121–125.
3. Ahmad, M; Srinivasula, S; Wang, L., Litwack, G; Fernandes-Alnemri, T. y E. Alnemri. (1997). Spodoptera frugiperda caspase-1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is the target of the baculovirus antiapoptotic protein p35. *The Journal of Biological Chemistry*. **272** (3): 1421–1424.
4. Ahmad, M; Srinivasula, S; Wang, L; Talanian, R; Litwack, G; Fernandes-Alnemri T. y E. Alnemri. (1997). CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Research*. **57** (4):615-619.
5. Arrieta O; Guevara, P; Reyes, S; Palencia, G; Rivera, E. y J. Sotelo. (2001). Paradoxical effect of aspirin on the growth of C6 rat glioma and on time of development of Enu-induced tumors of the nervous system. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. **127**: 681-686.
6. Arrieta, O; García, E; Guevara, P; García-Navarrete, R; Ondarza, R; Rembao, D. y J. Sotelo. (2002). Hepatocyte growth factor is associated with poor prognosis of malignant gliomas and it is a predictor for recurrence of meningioma. *Cancer*. **94** (12): 3210-3218.
7. ATCC. (2001). *MTT Cell proliferation assay*. Catalog Number 40-1010K. [On line]. Manassas, VA. Disponible: <http://www.atcc.org>





8. ATCC. (2010). *Catalog Number CCL-107*. Rattus norvegicus. C6. [On line]. Manassas, VA. Disponible: <http://www.atcc.org>
9. Aruoma, O.L; Halliwell, B; Gajewski, E. y M. Dizdaroglu. (1991). Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*. **273**: 601-604.
10. Baquero, L; Castro, J. y C. Narváez. (2005). Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) maduración y senescencia. *Acta biológica colombiana*. **10** (2): 49-59.
11. Benda, P; Lightbody, J; Sato, G; Levine, L. y W. Sweet. (1968). Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. *Science*. **161** (3839):370–371.
12. Bissonette, R.P; Echeverri, F; Mahboubi, A. y D.R. Green. (1992). Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*. **359**: 552-554.
13. Brannan, T. S; Maker, H. S e I. P. Raes. (1981). Regional distribution of catalase in the adult rat brain. *Journal of Neurochemistry*. **36** (1): 307-309.
14. Bras, M; Queenan, B; y A. Susin. (2005). Review: Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Moscow)*. **70** (2): 231-239. *Translated from Вюкимя* **70** (2): 284-293.
15. Bravo-Gómez, M.E; García-Ramos, J.C; Gracia-Mora, I. y L. Ruiz-Azuara. (2009). [Antiproliferative activity and QSAR study of copper\(II\) mixed chelate \[Cu\(N-N\)\(acetylacetonato\)\]NO<sub>3</sub> and \[Cu\(N-N\)\(glycinato\)\]NO<sub>3</sub> complexes, \(Casiopeínas®\)](#). *Journal of Inorganic Biochemistry*. **103** (2): 299-309.
16. Budke, M; Isla-Guerrero, A; Pérez-López, C; Pérez-Álvarez, M; García-Grande, A; Bello, M.J. y J. Rey (2003). Estudio comparativo en el tratamiento de los gliomas de alto grado. *Revista de Neurología*. **37**: 912-916.



17. Buendía, B; Santa-María, A. y J.C. Courvalin (1999). Caspase dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *Journal of Cell Science*. **112**: 1743-1753.
18. Carvallo-Chaigneau, F; Trejo Solís, C; Gómez-Ruiz, C; Rodríguez-Aguilera, E; Macías-Rosales, L; Cortés-Barbarena, E; Cedillo-Peláez, C; Gracia-Mora, I; Ruíz-Ramírez, L; Madrid-Marina, V. y F. Constantino-Casas. (2006). *Cas III-ia induce apoptosis en HCT-15 a través de mecanismos dependientes de caspasas In Vitro y tiene efectos antiproliferativos In Vivo*. 2º Congreso Nacional de Química Médica. Queretaro, Qro. México.
19. Carvallo, F.R. (2007) *Efectos antiproliferativos y apoptóticos de las casiopeínas® Ilgly y III-IA en líneas tumorales humanas*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
20. Carvallo-Chaigneau, F; Trejo Solís, C; Gómez-Ruiz, C; Rodríguez-Aguilera, E; Macías-Rosales, L; Cortés-Barbarena, E; Madrid-Marina, V. y F. Constantino-Casas. (2008). Casiopeina III-ia induce apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biomaterials*. **21**:17-28.
21. Chillemi, G; Falconi, M; Amadei, A; Zimatore, G; Desideri, A. y A. Di Nola. (1997). The essential dynamics of Cu, Zn superoxide dismutase: suggestion of intersubunit communication. *Biophysical Journal*. **73**: 1007-1018.
22. Christianson, D. (1997). Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. **67** (2): 217-243.
23. Cisneros, E; Pupo, J. y E. Céspedes. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libre: III. Glutación peroxidasa. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*. **16** (1): 10-15.



24. Cobbs, C. S; Levi, D. S; Aldape, K y M. A. Israel. (1996). Manganese superoxide dismutase expression in human central nervous system tumors. *Cancer research*. **56**: 3192-3195.
25. Cosentino, C. (1997). Apoptosis y sistema nervioso. *Anales de la Facultad de Medicina*. Universidad Nacional Mayor de San Carlos. **58** (2).
26. De castro, C. (2006, diciembre, 1). *Práctica IV. 2. Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando pruebas de MTT*. [Online]. Disponible: <http://www.iupac.org/publications/>
27. De la Torre M; Casado, A; López-Fernández, M; Carrascosa, D; Casado, M; Venarucci, D y V. Venarucci. (1996). Role of antioxidant enzymes. *Neurochemistry Research*. **21**: 885-888.
28. De Vizcaya-Ruiz, A; Rivero-Müller, A; Ruiz-Ramírez, L; Kass, G.E.N; Kelland, L. R; Orr, R. M. y M. Dobrota. (2000). Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology in Vitro*, **14**:1-5.
29. DeAngelis, L. M. (2001). Brain tumors. *New England Journal of Medicine*. **2**: 114-123.
30. Duriez, P.J. y G.M. Shah. (1997). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochemistry and Cell Biology*. **75**: 337-349.
31. Epp, O; Ladenstein, R. y A. Wendel. (1983). The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase. *European Journal of biochemistry*. **133**: 51-69
32. Fan, S; Smith, M.L; Rivet, D.J; Duba, D; Zhan, Q; Kohn, K.W; Fornace Jr, A.J. y P.M O'Connor. (1995). Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Research*. **55**: 1649-1654.



33. Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, reumathoid and other diseases. *Nature Medicine*. **1**: 27-31.
34. Gaiddon, C; Jeannequin, P; Bischoff, P; Pfeffer, M; Sirlin, C. y J.P. Loeffler. (2005). Ruthenium (II)-derived organometallic compounds induces cytostatic and cytotoxic effects on mammalian cancer cell lines through p53-dependent and p53-independent mechanism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **315** (3): 1403-1411.
35. García-Carrancá, A. (2003). La célula cancerosa. En: Jiménez, L.F., Merchant, H. Ed. *Biología Celular y Molecular*. México DF. Pearson Ed.
36. Gaunt, G. L. y C. De Duve. (1976). Subcellular distribution of D-amino acid oxidase and catalase in rat brain. *Journal of Neurochemistry*. **26**: 749-759.
37. Ginés, J. y M. Cervera. (2000). *TEMOZOLAMIDA Informe para la Comisión de Farmacia y Terapéutica*. Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca.
38. Gracia-Mora, I; Ruíz-Ramírez, L; Gómez-Ruíz, C; Tinoco-Méndez, M; Márquez-Quiñones, A; Romero-De Lira, L;Marín-Hernández, A; Macías-Rosales, L. y M.E. Bravo-Gómez. (2001). Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelates copper compounds, Casiopeinas, evaluated by an In vitro human and murine cancer cell line panel. *Metal Based Drugs*. **8** (1):19-28.
39. Grau, S. J; Trillsch, F; Herms, J; Thon, N., Nelson, P. J; Tonn, J.C. y R. Goldbrunner. (2007). Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade. *Journal of Neuro-oncology*. **82** (2):141-150.
40. Grobber, B; De Deyn, P. y H. Slegers. (2002) Review. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Research*. **310**: 257–270.



41. Hafeman, D; Sunde, R. and W. Hoekstra. 1974. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *Journal of Nutrition*. **104**: 580–587.
42. Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. **59** (5): 1609-1623.
43. Hanahan, D. y A. Weinberg (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. **100**: 57-70.
44. Hansberg, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje bioquímico*. **26**: 19-54.
45. Hart, J. P; Balbirnie, M; Ogihara, N; Nersissian, A- M; Weiss, M.S; Selverstone, J. V. y D. Eisenberg. (1998). Subunit in the three-dimensional structure of a human CuZnSOD mutant fold in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Protein science*. **7**: 545-555.
46. Hart, J. P; Liu, H; Pellegrini, M; Nersissian, A-M; Gralla, E. B; Selverstone, J. V. y D. Eisenberg. (1999). A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase. *Biochemistry*. **38**: 2167-2178.
47. Huang, Y; Shih, C; Huang, C; Lin, C; Chou, C; Tsai, M; Liu, T; Chiu, J. y C., Chen. (2006). Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *Journal of cellular biochemistry*. **98**: 577-589.
48. Huster D; Purnat, T. D; Burkhead, J. L; Ralle, M; Fiehn, O; Stuckert, F; Olson, N. E; Teupser, D. y S. Lutsenko. (2007). High copper selective alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease. *The Journal of Biological Chemistry*. **282** (11): 8343-8355.
49. Izeradjene, K; Douglas, L; Tillman, D; Delaney, A. y J. Houghton. (2005). Reactive oxygen species regulate caspase activation in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-resistant human colon carcinoma cell lines. *Cancer research*. **65** (16): 7436-7445.



50. Kachadourian, R; Brechbuhl, H; Ruíz-Azuara, L; Gracia-Mora, I. y B. Day. (2010) Casiopeína Igly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cáncer A549 and H157 cells. *Toxicology*. **268**: 176-183.
51. Kidd, V.J. (1998). Proteolytic activities mediate apoptosis. *Annual Review of Physiology*. **68**: 533-573.
52. Kleihues, P; Burger, P. y B Scheithauer. (1993) *Histologic typing of tumors of the central nervous system*. Springer-Verlag. New York, NY.
53. Kleihues, P. y H. Ohgaki. (1997). Genetics of glioma progression and the definition of primary and secondary glioblastoma. *Brain Pathology*. **7**: 1131-1136.
54. Lledías, F y W. Hansberg. (2000). Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods in enzymology*. **319**: 110-119.
55. Li, P; Nijhawan, D; Budihardjo, I; Srinivasula, S; Ahmad, M; Alnemri, E. y X. Wang. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. **91**: 479-489.
56. Li, Y; Lal B; Kwon, S; Fan, X; Saldanha, U; Reznik, T.E; Kuchner, E. B; Eberhart, C; Laterra, J. y R. Abounader. (2005). The scatter factor/hepatocyte growth factor: c-met pathway in human embryonal central nervous system tumor malignancy. *Cancer Research*. **65**: 9355-9362.
57. Lin, B. (2006). *A novel resveratrol analog: its cell cycle inhibitory, pro-apoptotic and anti-inflammatory activities on human tumor cells*. Tesis de doctorado. Kent State University. Kent, OH.
58. Liu, X; Naekyung, C; Yang, J; Jemmerson, R. y X. Wang. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. **86**: 147-157.



59. Majno, G y I. Joris (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*. **146**: 3-15.
60. Marín-Hernández, A; Gracia-Mora, I; Ruíz-Ramírez, L. y R. Sánchez. (2003). Toxic effects of copper based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology*. **65**: 1979-1989.
61. Martin, D.A; Siegel, R.M; Zheng, L. y M. Lenardo. (1998). Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACH $\alpha$ 1) death signal. *Journal of Biological Chemistry*. **273**: 4345-4349.
62. Martin, S. y D. Green. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts *Cell*. **82**: 349-352.
63. Merck. (2010). *Manual de Información Médica*. Capítulos 164, 165 y 166. [On line]. Disponible: <http://www.msd.es/publicaciones>.
64. Miura, F; Ferreira Alves, M; Rocha, M; Silva, R; Oba-Shinjo, S; Uno, M; Colin, C; Sogayar, M. y S. Marie. (2008) Experimental Model of C6 Brain Tumors in Athymic Rats. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*. **66** (2-A):238-241
65. Moncevičiūtė-Eringienė, E. (2005). Neoplastic growth: the consequence of evolutionary malignant resistance to chronic damage for survival of cells (review of a new theory of the origin of cancer). *Medical Hypotheses*. **65**: 595-604.
66. Moreno, S; Mugnaini, E. y P. Cerù. (1995). Inmunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **43** (12): 1253-1267.
67. Mukhopadhyay, D. y K. Datta. (2004). Multiple regulatory pathways of vascular permeability factors/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. *Seminars in Cancer Biology*. **14**: 123-130.



68. Muzio, M; Stockwell, B; Stennicke, H.R; Salvesen, G.S. y V. Dixit. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *Journal of Biological Chemistry*. **273**: 2926-2930.
69. Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*. **81**: 505-512.
70. Oberley, L. W. y G. R. Bueftner. (1979). Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. *Cancer Research*. **39**: 1141-1149.
71. Pardo, C; Zuoshang, X; Borchell, D. R., Price, D; Sisodia, S. y D. Cleveland. (1995). Superoxide dismutase is abundant component in cell bodies, dendrites and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Neurobiology*. **92**: 954-958.
72. Parker M. W. y C. F. Blake. (1988). Iron and manganese containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS Letters*. **229** (2): 377-382.
73. Pedraza-Chaverri, J; Maldonado, P. D; Medina-Campos, O. N; Olivares-Corichi, I. M; Granados-Silvestre, M. A; Hernández-Pando, R. y M. E. Ibarra-Rubio. (2000). Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free radical biology & medicine*. **29** (7): 602-11.
74. Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. **356**: 397-400.
75. Rak, J; Filmus, J. y R.S. Kerbel. (1996). Reciprocal paracrine interactions between tumor cells and endothelial cells. The "angiogenesis progression" hypothesis. *European Journal of Cancer*. **32A**: 2438-2450.
76. Rak, J y J. Yu. (2004). Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand". *Seminars of Cancer Biology*. **14**: 93-104.
77. Reed, J.C. (2002). Apoptosis based therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*. **1**:111-121.





78. Rivero-Müller, A. (1999). *Speciation and reactivity of the antineoplastic copper-based compound: casiopeina II*. Doctoral thesis. School of Biological Sciences. University of Surrey. England.
79. Rukmini, M. S; D'Souza, B. y V. D'Souza. (2004). Superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. **19** (2): 114-118.
80. Sánchez-Bartéz, F. (2006). *Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las casiopeínas Igly, IIgly y III-ia en linfocitos, médula ósea de ratón y linfocitos humanos en cultivo*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
81. Sanocka, D. y M. Kurpisz. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive biology and endocrinology*. **2**: 1-12.
82. Serment, J; Reyes, E. y M. Valle. (2006). *Fragmentación de ADN por diferentes casiopeínas*. 2º Congreso Nacional de Química Médica. Queretaro, Qro. México.
83. Sigman, D.S; Graham, D.R; D'Aurora, V. y A. M. Stern. (1979). Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenantroline cuprous complex. Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Journal of Biological Chemistry*. **254** (24): 12269-12272.
84. Southorn, P. A. y G. Powis. (1988). Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reaction. *Mayo Clinic Proceedings*. **1**: 381-389.
85. Srinivasula, S.M; Ahmad, M; Fernandes-Alnemri, T. y S. Alnemri. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1 mediated oligomerization. *Molecular Cell*. **1**: 949-957.
86. Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cell suicide. *Science*. **267**: 1445-1449.
87. Stons, S. J. y D Bagchi. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*. **18**: 321-336.



88. Teodoro, J.G; Heilman, D.W; Paker, A.E. y M. Green. (2004). The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53. *Genes and Development*. **18**: 1952-1957.
89. Todor, A; Sharov, V. G; Tanhehco, E. J; Silverman, N; Bernabei, A, y H. N. Sabbah. (2002). Hypoxia-induced cleavage of caspase-3 and DFF45/ICAD in human failed cardiomyocytes. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. **283**: H990-H995.
90. Tovar, S; Gracia-Mora, I. y L. Ruíz-Azuara (2006). Evaluación antineoplásica de dos compuestos de coordinación mediante el empleo de modelos *In Vitro*. 2º Congreso Nacional de Química Médica. Queretaro, Qro. México
91. Trejo-Solís, C; Palencia, G; Zúñiga, S; Rodríguez-Ropón, A; Osorio-Rico, L; Sánchez-Torres, L; Gracia-Mora, I; Márquez-Rosado, L; Sánchez, A; Moreno-García, M.E; Cruz, A; Bravo-Gómez, M.E; Ruíz-Ramírez, L; Rodríguez-Enríquez, S. y J. Sotelo. (2005). Cas Igly induces apoptosis in glioma C6 cells *In vitro* and *In vivo* through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia*. **7** (6): 563-574.
92. Uribe-Carvajal, S; Araiza-Olvera, T; Cabrera-Orefice, A; Díaz-Ruíz, R; Guerrero-Castillo, S; Gutiérrez-Aguilar, M; Luévano-Martínez, L. A; Ruíz-Granados, Y. G. y D. González-Halphen. (2008). Control de la producción de especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias de diferentes especies de levaduras. *XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica*. Mérida, Yucatán.
93. Valencia, A. y J. Morán. (2004) Reactive oxygen species induce diferente cell death mechanism in cultured neurons. *Free radical biology and medicine*. **36** (9): 1112-1125.



94. Wei, M.C; Zong, W.X; Cheng, E.H; Lindsten, T; Panoutsakopoulou, V; Ross, A.J; Roth, K.A; MacGregor, G.R; THopmson, C.B. y S.J.Korsmeyer. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. **292**: 727-730.
95. Weinberg, R. (1996). How cancer arises. *Scientific American*. **275**: 62-70.
96. Wyllie, A.H; Kerr, J.F.R. y A.R. Currie. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*. **68**: 251-306.
97. Yamada, S; Bu, X.Y; Khankaldyyan, V; Gonzáles-Gomez, I; McComb, J.G. y Laug, W.E. (2006). Effect of the angiogenesis inhibitor cilengitide (EMD 121974) on glioblastoma growth in nude mice. *Neurosurgery*. **59**: 1304-1312.
98. Yuan, J; Shaham, S; Ledoux, S; Ellis, H.M. y H.R. Horvitz. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Cell*. **75**: 641-652.
99. Ziegler, U. y P. Groscurth (2004). Morphological features of cell death. *News on Physiological Science*. **19**: 124-128.
100. Zorov, D; Filburn, C; Klotz, L; Zweier, J. y J. Sollot. (2000). Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *Journal of Experimental Medicine*. **192** (7): 1001-1014.
101. Zwolińska, D; Grzeszczak, W; Szczepańska, M; Kiliś-Pstrusińska, K. y K. Szprynger (2006). Vitamins A, E and C as Non-Enzymatic Antioxidants and Their Relation to Lipid Peroxidation in Children with Chronic Renal Failure. *Nephron Clinical Practice*. **103** (1): 12-18.