



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE CELULAR POR
APOPTOSIS Y NECROSIS EN CÉLULAS HeLa,
INDUCIDO POR 5 CASIOPEÍNAS DE LA FAMILIA III.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Q U Í M I C A
P R E S E N T A
TÉLLEZ MARTÍNEZ ELOÍNA MIREYA



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	NORAH YOLANDA BARBA BEHRENS
Vocal	LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMAN
Secretario	MARIA ISABEL GRACIA MORA
1er. Suplente	MIREYA RODRÍGUEZ PENAGOS
2°. Suplente	ELPIDIO GARCÍA RAMIREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Experimentación Animal

Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. María Isabel Gracia Mora

SUPERVISOR TÉCNICO:

M.V.Z. Macías Rosales Lucia

SUSTENTANTE

Téllez Martínez Eloína Mireya

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi **mamá**, quién me dio la vida, de quién aprendí el gusto por el estudio, mis valores y por hacer indirectamente más perfecto aquello en lo que creo. Gracias a cada uno de los integrantes que forman mi **familia**.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, la máxima casa de estudios, por haberme permitido formar parte de ella.

A la **Facultad de Química**, que me ha dado tantas alegrías, conocimientos y excelentes profesores.

A las instalaciones de **UNEXA**, Conjunto E, a cargo de mi asesora de tesis M. en C. **Isabel Gracia Mora**, de la que le estoy muy agradecida por haber aceptado ser mi asesora y porque aprendí cosas muy valiosas de ella. A los compañeros de UNEXA, **Mabel, Marisol, Héctor, Paco** por los momentos convividos.

A mi supervisor técnico M.V.Z. **Lucía Macías Rosales** por la ayuda ofrecida en el laboratorio de cultivo celular, especialmente por el tiempo dedicado, que aunque se encontraba ocupada, siempre de manera sonriente estaba dispuesta a ayudar.

Al **jurado revisor** que participaron leyendo, opinando, corrigiendo.

Gracias a mis amigos más cercanos por haber compartido una amistad, por dejarme gratamente en la memoria anécdotas muy divertidas, por todos los momentos compartidos de complicidad y de conocimiento durante la carrera: **Claudia (clapeyron), Fabián, Flavio, Lidia, Martha, Iliana, Dulce, Beto, Mixcoha (ojo), Isaac (chucho mochilas), Pancho, Armando Retama, Ariadna, Xavier, Adela, Ana**. El alzheimer no perdona y perdón sin dejo a alguien afuera pero GRACIAS A TODOS.

A **Albert Einstein** por sus aportes a la ciencia.

A **Pink Floyd y David Bowie**, compañeros fieles e inseparables durante muchas madrugadas de estudio.

Gracias a todos y cada uno de los que lean y han leído este trabajo porque, por ese simple hecho, ya forman parte de él.

Gracias a Dios...porque mi memoria ya está empastada...

Y hablando de apoptosis...

In Memoriam

De mi papá, mi hermano, mi abuelita,
el Sr. Florentino, la Sra. Pily y
de mi buen amigo químico Fabián.

“Il faut faire de la vie un
rêve et faire d'un rêve une
réalité”.

“Hay que hacer de la vida un
sueño y de un sueño una
realidad”.

Pierre Curie (1859-1906)



ÍNDICE

Índice		V
Lista de figuras		VIII
Lista de Tablas		X
Lista de abreviaturas		XI
RESUMEN		1
CAPITULO 1 INTRODUCCION		3
1.1	Cáncer	3
1.2	Cáncer cérvico-uterino	6
1.2.1	Prevención de cáncer cérvico-uterino	7
1.3	Tratamientos para el cáncer	10
1.3.1	Quimioterapia	11
1.3.2	Tipos de quimioterapia	12
1.4	Antineoplásicos específicos de fase	13
1.4.1	Antineoplásicos no específicos del ciclo celular	17
1.5	Compuestos con metales usados como antineoplásicos	20
1.5.1	Cobre: cofactor esencial	21
1.6	Casiopeínas [®]	24
1.6.1	Casiopeína [®] III-ia	29
1.6.1.1	Características de la Casiopeína [®] III-ia	29
1.6.2	Estructura de las Casiopeínas [®]	32
CAPITULO 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		33
2.1	Hipótesis	33
2.2	Objetivos	33
2.2.1	Objetivo general	33
2.2.2	Objetivos particulares	33



CAPITULO 3 ANTECEDENTES	35
3.1	Busulfán® 35
3.2	Apoptosis y necrosis 36
3.2.1	Ejemplos de apoptosis y necrosis 38
3.3	Ciclo celular y apoptosis 43
3.4	Cambios morfológicos y bioquímicos de la apoptosis y necrosis 43
3.5	Mecanismos moleculares de la apoptosis 46
3.5.1	Reguladores 46
3.5.2	Familia Bcl-2 47
3.5.3	La molécula p53 48
3.5.4	Inhibidores, IAPs (Proteínas inhibidoras de apoptosis) 49
3.5.5	Caspasas 49
3.5.5.1	Vías de señalización 52
3.5.5.1.2	Vía intrínseca 52
3.5.5.1.3	Vía extrínseca 55
3.6	Enfermedades degenerativas 58
3.7	Métodos de detección de apoptosis 59
3.7.1	Citometría de flujo 59
3.7.1.2	Kit de anexina V 60
3.8	Electroforesis en gel de agarosa 63
3.9	Modelos <i>in vitro</i> 64
3.10	Fase preclínica de fármacos 64
3.11	Justificación 65
CAPITULO 4 DESARROLLO EXPERIMENTAL	68
4.1	Material, equipo, reactivos y soluciones 68
4.2	Síntesis de Casiopeínas® 70



4.2.1	Análisis Elemental	71
4.2.2	Espectroscopía de Infrarrojo	71
4.3	Técnicas de cultivo celular	71
4.3.1	Cuantificación de células	72
4.3.2	Obtención del cultivo a confluencia	74
4.4	Citometría de flujo	75
4.4.1	Preparación de PI (yoduro de propidio)	75
4.4.2	Kit de marcaje	76
4.4.3	Tratamientos	77
4.5	Electroforesis en gel de agarosa	78
CAPITULO 5 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS		80
5.1	Espectroscopía de Infrarrojo	80
5.1.1	Análisis elemental	80
5.1.3	Citometría de flujo	81
5.2	Resultado Final	84
5.2.1	Datos obtenidos por apoptosis	84
5.2.2	Datos obtenidos por necrosis	85
5.3	Resultados de electroforesis en gel de agarosa	90
CAPITULO 6	CONCLUSIONES	92
	BIBLIOGRAFÍA	94
	ANEXOS	102



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Factores intrínsecos y extrínsecos del cáncer.
- Figura 2 Alteraciones en las etapas de desarrollo de un tumor metastásico.
- Figura 3 Características de las células tumorales.
- Figura 4 Historia del cáncer cervical.
- Figura 5 Ciclo celular.
- Figura 6 Estructura de antimetabolitos.
- Figura 7 Estructura de productos naturales específicos de fase.
- Figura 8 Estructuras de CDDP (II) y sus derivados.
- Figura 9 Estructura de antineoplásicos no específicos del ciclo celular.
- Figura 10 Plastocianina.
- Figura 11 Ceruloplasmina humana (proteína plasmática).
- Figura 12 Estructura de la superóxido dismutasa (SOD).
- Figura 13 Estructura general de las casiopeínas.
- Figura 14 Estructura de Busulfán®.
- Figura 15 Homología de la vía apoptótica en tres diferentes organismos.
- Figura 16 Entradas y salidas en el ciclo celular.
- Figura 17 Vía genética de la muerte celular programada en organismos superiores.
- Figura 18 Activadores de muerte.
- Figura 19 Comparación del daño al ADN efectuado por p53.
- Figura 20 Poro mitocondrial.
- Figura 21 Formación del apoptosoma.
- Figura 22 Esquema de un ligando de muerte.
- Figura 23 Vía intrínseca y extrínseca.
- Figura 24 Kit de anexina V.
- Figura 25 Representación de análisis por citometría de flujo con células marcadas con IP y anexina V.



- Figura 26 Diseño de fármacos.
- Figura 27 Cuantificación de células apoptóticas y necróticas medidas por Kit de anexina V, con Busulfán[®] y Casiopeína[®] [Cu(4,7difeníl-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ sobre células HeLa.
- Figura 28 Cuantificación de células apoptóticas y necróticas medidas por Kit de anexina V, con Busulfán[®] y Casiopeína[®] [Cu(4,7dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ sobre células HeLa.
- Figura 29 Cuantificación de células apoptóticas y necróticas medidas por Kit de anexina V, con Busulfán[®] y Casiopeína[®] [Cu(5,6dimetilfenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ sobre células HeLa.
- Figura 30 Cuantificación de células apoptóticas y necróticas medidas por Kit de anexina V, con Busulfán[®] y Casiopeína[®] [Cu(4,4dimetilbipyridina)(acetilacetato)]NO₃ sobre células HeLa.
- Figura 31 Cuantificación de células apoptóticas y necróticas medidas por Kit de anexina V, con Busulfán[®] y Casiopeína[®] [Cu(5,N0₂-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ sobre células HeLa.
- Figura 32 Comparación de la muerte por apoptosis de las cinco diferentes Casiopeínas[®] a tres diferentes concentraciones con Busulfán[®] sobre la línea celular HeLa.
- Figura 33 Comparación de la muerte por necrosis de las cinco diferentes Casiopeínas[®] a tres diferentes concentraciones con Busulfán[®] sobre la línea celular HeLa.
- Figura 34 Fotografía de electroforesis.
- Figura A1.1 Flujo del líquido en un citómetro de flujo.
- Figura A1.2 Proceso para la obtención de parámetros celulares mediante el citómetro de flujo.



Figura A1.3	Histograma
Figura A1.4	Gráfico de puntos.
Figura A1.5	Gráfico de contorno.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de la Familia de las Casiopeínas [®] .
Tabla 2	Esquema comparativo de las diferencias de la muerte celular por apoptosis y necrosis.
Tabla 3	Genes moduladores del proceso apoptótico.
Tabla 4	Patologías asociadas a alteraciones en el proceso de apoptosis.
Tabla 5	Patrón de tinción de las células viables, apoptóticas y necróticas, teñidas con yoduro de propidio y anexina V.
Tabla 6	Claves de las Casiopeínas [®] empleadas.
Tabla 7	Bandas presentes en el espectro de infrarrojo.
Tabla 8	Resultados de análisis elemental.



LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Factor activador de apoptosis
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Apaf-1	Factor activador de apoptosis 1
ANT	Adenina Nucleotide Translocator
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenina trifosfato
Bad	Promotor de muerte asociado a Bcl/X _L /Bcl-2
Bax	Proteína asociada a Bcl-2
Bid	Dominio de muerte para la interacción BH3, del inglés BH-3 Interacting Domain Death
CaCU	Cáncer cérvico uterino
DD	Dominio de muerte
FDA	Food and Drug Administration
VPH	Virus del Papiloma humano
FADD	Dominio de muerte asociada a Fas
Fas	Ligante activador de apoptosis
Fas CD95/ APO-1	Fas es miembro de la familia de receptores TNF.
FLIP/FLICE	Proteína inhibidora de FLICE/ proteína ICE Similar a Fas Caspasa8
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
ICE	Proteína conversora de interleucina
INOR	Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
IP	yoduro de propidio
KDa	KiloDalton
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pap	Papanicolau
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino fosfato
PNDOP	Programa nacional de detección oportuna de cáncer cervicouterino
PS	Fosfatidilserina
Smac/Diablo	Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/ proteína de unión directa a IAP (Direct IAP Binding protein of Low PI)
TRADD	Proteína con dominio de muerte asociada a TNF-R1
TNFR	Factor de necrosis tumoral (TNFR1)
VDAC	Canal iónico de voltaje



RESUMEN

Teniendo su origen desde la antigüedad, el cáncer es un grupo de enfermedades que causan altos índices de mortalidad afectando todos los grupos sociales y, etarios. Esta enfermedad se caracteriza por una multiplicación anormal y desordenada de las células, la cual normalmente presenta resistencia a señales que inducen la muerte celular (apoptosis). Al tener un crecimiento incontrolado, las células cancerosas tienden a diseminarse fuera del lugar de origen e invadir tejidos por extensión o infiltración (metástasis). En México, durante las últimas décadas, el cáncer cérvico-uterino (CaCU) representa un problema de salud pública, colocándolo como el segundo cáncer más común después del cáncer de mama.

Debido a la importancia que desde hace años ha presentado esta enfermedad, la Dra. Lena Ruiz Azuara dentro de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, inició un proyecto encaminado al desarrollo de fármacos antineoplásicos con el fin de contar con alternativas de antineoplásicos que puedan llegar a manos de la población con menor toxicidad y costo que los ya existentes. Estos fármacos fueron nombrados como Casiopeínas[®] y contienen al Cobre (II) como centro metálico y dos ligantes bidentados en su esfera de coordinación, uno de ellos es una diimina (N-N) y el otro puede ser un aminoacidato (N-O) o donador (O-O) como el salicilaldehído o el acetilacetato. Actualmente se cuenta con más de 100 Casiopeínas[®] sintetizadas, y algunas de ellas han sido evaluadas biológicamente mostrando actividad antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo*.

Siendo que en los organismos pluricelulares la muerte celular es un proceso fuertemente regulado, donde la supresión o sobre expresión de apoptosis es asociada a la aparición del cáncer, el interés de



estudio en la búsqueda del mecanismo de acción de las Casiopeínas[®] fue el de conocer si estos complejos eran capaces de inducir apoptosis y/o necrosis sobre las células HeLa (carcinoma cérvico-uterino). Para ello, en este trabajo se sintetizaron y evaluaron 5 Casiopeínas[®], manteniendo un lado de la molécula constante y modificando el otro empleando diferentes sustituyentes en la diimina. Se utilizó como testigo positivo al Busulfán[®], un fármaco antitumoral conocido en el mercado comercial. La metodología empleada para la evaluación de muerte celular fue la citometría de flujo. A las células tratadas con las cinco diferentes Casiopeínas[®], se les unió un primer marcaje con Anexina 5 para conocer si la muerte celular era por apoptosis y un segundo marcaje con yoduro de propidio, para conocer si la muerte celular era debida a necrosis. Como técnica confirmatoria se utilizó electroforesis en gel de agarosa, con la finalidad de evaluar el “patrón en escalera” típico de la apoptosis. En este trabajo se obtuvo evidencia de que el cambio de sustituyentes en las Casiopeínas[®], afecta el comportamiento apoptótico, siendo particularmente la Casiopeína[®] [Cu(5,6 dimetil-1-10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ y [Cu(4,4-dimetil-2,2-bipiridina)(acetilacetato)]NO₃ las que muestran un porcentaje notablemente mayor en la inducción de apoptosis sobre células HeLa que el fármaco conocido como Busulfán[®].



CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Cáncer.

El término cáncer deriva del latino *cancrem*, cangrejo, que a su vez procede del griego *carcinós*, cangrejo de mar. En el siglo II de nuestra era Galeano nombró cáncer a los tumores encontrados en los pacientes, debido a que las venas entumecidas que aparecen sobre la piel cercana a los órganos atacados por tumores, recuerdan las patas de un cangrejo.

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizado por un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos (metástasis) y, aunque no son conocidas todas las causas por las que se origina el cáncer, sabemos que su etiología es multifactorial participando tanto factores intrínsecos y extrínsecos (Figura 1).



Figura 1. Factores intrínsecos y extrínsecos del cáncer.

El cáncer, que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula y en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única, sino un conjunto de enfermedades siendo clasificadas en función del tejido y célula de origen como son:



- carcinomas: aquellos cuyo origen son las células epiteliales; como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y de los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas.
- sarcomas: cuyo origen son las células del tejido conectivo y las células musculares (tejidos blandos), como son huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.
- y en el tercer tipo se encuentran aquellos que no se ajustan a ninguna de las dos categorías anteriores que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas como son la leucemia y los tumores del sistema nervioso. Dentro de la leucemia encontramos a la leucemia aguda linfoblástica, aguda mieloblástica, mieloide crónica, y linfática crónica (1).

Pudiendo ser la mutación de uno o varios genes que dé lugar al desarrollo de un tumor, es probable que éste no se manifieste inmediatamente, sino que su avance sea un proceso prolongado donde un diagnóstico de cáncer detectado en la actualidad, pudo haberse mantenido en periodo de latencia, por ejemplo, desde hace quince años.

Las diferentes fases de una neoplasia maligna se clasifican en tres etapas y se enlistan a continuación (Figura 2).

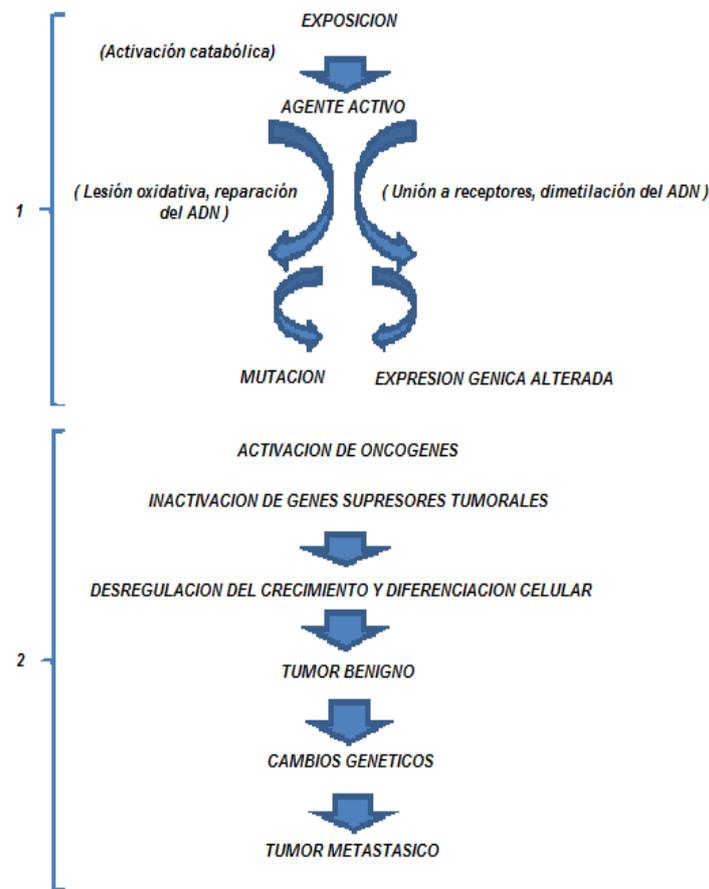


Figura 2. Alteraciones en las etapas de desarrollo de un tumor metastásico.

1= Iniciación 2= Promoción y 3=progresión

Exposición

La carcinogénesis como tal, es un proceso que consta de tres etapas según el modelo establecido por la biología celular.

1. **Iniciación:** es el resultado directo de la administración del agente cancerígeno, es un proceso rápido y habitualmente reversible, mediante el cual se producen los cambios permanentes en la estructura del ADN de la célula.

2. **Promoción:** es el proceso por el cual se estimula la formación tumoral en el tejido expuesto, los cambios tisulares y celulares suelen ser de carácter reversible durante un largo periodo de latencia hasta que aparece la primera célula tumoral autónoma.



3. Progresión: es el periodo de transformación maligna completa de la célula, que alcanza su máximo grado de malignidad.

Estudios realizados en tumores humanos así como en modelos animales muestran que las células tumorales, a través de una serie de cambios genéticos, van adquiriendo características que las diferencian de las células sanas (2) (Figura 3).



Figura 3. Características de las células tumorales.

1.2. Cáncer cérvico-uterino.

En México el cáncer cérvico-uterino es un fuerte problema de salud pública y por tal razón constituye una prioridad su prevención, control y tratamiento. Este tipo de cáncer sigue siendo uno de los más frecuentes en la mujer, presentando un número importante de defunciones a nivel mundial, aproximadamente 274,000 mujeres mueren cada año por esta causa y 68,000 en América Latina,



presentando México una de las tasas más altas (3). A partir del año 2006, el cáncer cérvico-uterino es la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas en el grupo de edad que comprende entre 30 a 54 años, siendo superada por el cáncer de mama (4) (5).

En México, mediante los programas de salud, la mortalidad a causa del cáncer cérvico-uterino logró bajar en los últimos 15 años, de 25.3 en 1990 a 15.6 defunciones por cada 100,000 mujeres en el 2005, lo que representa un descenso promedio anual de 3.2% (6).

Estas variaciones de incidencia y la mortalidad del cáncer cérvico-uterino pueden relacionarse con diferencias en el acceso a los servicios y en la calidad de los mismos, así como también pueden influir factores como son la ubicación geográfica, la situación socioeconómica, aspectos culturales y psicosociales.

1.2.1. Prevención de cáncer cérvico-uterino.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que el CaCU es una de las neoplasias potencialmente curables. La posibilidad de detectar de manera temprana esta neoplasia, hace factible reducir la mortalidad secundaria al padecimiento. La enfermedad es precedida durante meses o años de una lesión premaligna *in situ*. Este organismo reconoce dos componentes en los programas de detección temprana del CaCU: el diagnóstico temprano y el tamizaje.

El diagnóstico temprano, se basa en actividades de educación a la población y de capacitación al personal de salud para identificar de manera precoz los síntomas y signos de cáncer que lleven al diagnóstico, así como a un tratamiento temprano. El tamizaje, es la identificación de una enfermedad en fase preclínica a través de la utilización de pruebas, que puedan ser aplicadas de forma rápida y extendida a la población en riesgo aparentemente sana.

Hacerse exámenes Papanicolau periódicamente permite detectar y tratar las células cambiantes oportunamente, ya que suele tomar



varios años para que las células normales del cuello uterino se conviertan en células cancerosas. Sólo en las etapas muy tardías, cuando el cáncer se ha extendido más allá del cuello de la matriz, es cuando aparecen otros signos poco alentadores: la paciente baja de peso, puede presentar problemas urinarios de tipo infeccioso, sangrados anormales o de obstrucción al flujo de orina, por la invasión de la vejiga; o bien, estreñimiento o sangrado, por la invasión del colon y el recto. Cuando el tumor se ha extendido a sitios lejanos como el hígado, el cerebro o los pulmones, que son sitios frecuentes de diseminación del tumor a través de la sangre, puede provocar síntomas, dependiendo del lugar afectado (7) (8).

Esta neoplasia maligna lleva un seguimiento, que desde su inicio a nivel del epitelio hasta su invasión al estroma, es muy lento y por eso es debido precisar en qué etapa se encuentra la enfermedad. Este tipo de cáncer se cataloga en dos tipos, el cáncer no agresivo cuando las células anormales se limitan a la superficie del cérvix, y el agresivo cuando las células anormales se extienden más allá del cérvix hacia otros órganos o tejidos (9) (Figura 4).

Estudios realizados en México muestran que el factor de riesgo más importante para contraer el cáncer de cérvix es la infección con ciertos tipos del virus del Papiloma humano (VPH), siendo que en el 80% de los casos de cáncer cérvico-uterino se detecta en el ADN viral de las lesiones intraepiteliales (lesiones malignas), principalmente el VPH-16 está clasificado como un factor de alto riesgo (10).

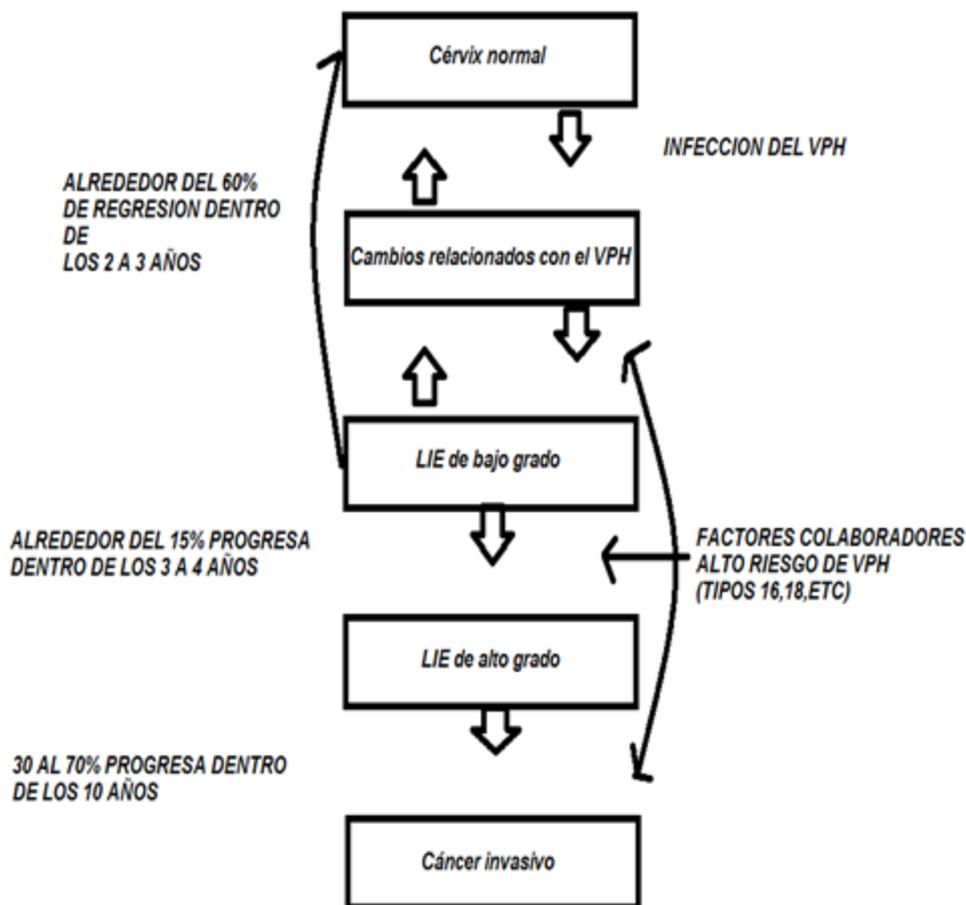


Figura 4. Historia del cáncer cervical. El cáncer cérvico-uterino (CaCU) es una mutación celular de la unión escamocolumnar en el epitelio del cuello uterino, el cual se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución que son producidas en etapas de displasia leve, moderada y severa (11). LIE =Lesión intraepitelial escamosa.

En México, desde el año de 1974 existe un programa nacional de detección oportuna (PNDOC) del CaCU, el cual es gratuito y tiene como prioridad que todas las mujeres en edad susceptible, sin importar condición económica, cultural o geográfica puedan tener acceso a los beneficios del mismo (12) (13).

Actualmente estudios aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) han aceptado la efectividad de la vacuna contra el VPH tipo 6, 11, 16 y 18. Las edades adecuadas para aplicar la vacuna se comprende de 9 a 17 años y en mujeres entre 18 y 26 años que no hayan tenido relaciones sexuales, aunque la disposición de esta prueba en México es de difícil acceso en ciertos casos, debido a que



su costo es elevado.

1.3. Tratamientos para el cáncer.

Son diferentes los tratamientos que se emplean para combatir el cáncer, los cuales son usados dependiendo del lugar, el tipo y el avance de la enfermedad, así como también del estado físico del paciente. Los tratamientos son divididos en categorías basadas en su fin y modo de acción, y para una mayor eficacia contra el cáncer son usados frecuentemente en combinación, ya sea simultáneamente o secuencialmente.

CIRUGÍA: Es el tratamiento más antiguo que se conoce y muchas veces es el primer tratamiento para varios tumores sólidos. Cuando el cáncer es detectado en una etapa temprana y localizados en un lugar concreto, la cirugía puede ser suficiente para remover las células cancerosas.

RADIACIÓN: Puede ser usada en conjunto con cirugía y/o tratamientos con fármacos. Este tipo de terapia mata a las células cancerosas mediante rayos de energía alta. Los radioisótopos más utilizados en el tratamiento del cáncer son los siguientes:

Cobalto-60: Usado para radioterapia externa de rayos.

Holmio-166: Ha sido desarrollado para la diagnosis y el tratamiento del cáncer de hígado.

Yodo 125: Usado en braquiterapia, para tratar cánceres de próstata y de cerebro.

Yodo-131: Utilizado en cáncer de tiroides.

Iridio 192: Es aplicado en forma de alambre como fuente de radiación en la radioterapia interna para tratamiento de cáncer.

Lutecio-177: Es utilizado como emisor gamma para la visualización, mientras que la emisión beta se emplea en terapia de pequeños



tumores.

Paladio-103: Usado en braquiterapia para realizar implantes permanentes en las primeras etapas del cáncer de próstata.

Renio-186: Utilizado como alivio de dolor del cáncer de huesos.

Samarium-153: Se usa para aliviar el dolor de cánceres secundarios alojados en los huesos. También es usado para cáncer de próstata y de mama.

Estroncio-89: Es efectivo en la reducción de cáncer de próstata y cáncer de huesos.

Itrio-90: Utilizado en el tratamiento de braquiterapia para el cáncer, cesio, oro, y rutenio también son usados en braquiterapia.

VACUNAS: El propósito de las vacunas contra el cáncer, es estimular las defensas de nuestro cuerpo administrando proteínas para aumentar la respuesta inmune contra las células cancerosas.

ANTICUERPOS: Este tipo de tratamiento involucra el uso de anticuerpos para combatir las células cancerosas, estos anticuerpos son manufacturados para su uso como fármacos, aunque la desventaja que presenta actualmente es que son de corta duración.

QUIMIOTERAPIA: Se utilizan fármacos terapéuticos dirigidos a las células cancerosas que siguen dividiéndose.

La apoptosis, tema central de este trabajo, al parecer es la vía final común por la que parece que la quimioterapia termina ejerciendo su efecto citotóxico, por lo que a continuación se hace una breve descripción de este tipo de tratamiento.

1.3.1. Quimioterapia.

La era moderna de la quimioterapia del cáncer comenzó después de la Segunda Guerra Mundial con la introducción de las mostazas



nitrogenadas y los agentes alquilantes, los cuales fueron desarrollados para el uso clínico al descubrir que destruían los leucocitos humanos. Actualmente, la quimioterapia, es una de las principales tecnologías terapéuticas que se utilizan para combatir el cáncer y consiste en usar sustancias químicas para destruir células cancerosas.

A diferencia de la radioterapia y la cirugía, que sólo son adecuadas para tratar el cáncer en zonas localizadas, la quimioterapia debe su eficiencia a poder controlar un cuadro metastásico, aunque cuando son utilizados los tres tratamientos de manera combinada, se amplía el espectro de actividad del tratamiento, aumentando las posibilidades para lograr que el cáncer pueda eliminarse.

1.3.2. Tipos de quimioterapia.

- **Quimioterapia curativa:** se puede curar la enfermedad en relación a la extensión de la enfermedad.
- **Quimioterapia complementaria o adyuvante:** ayuda en el pronóstico en cuanto a la supervivencia global o prolongación del intervalo libre de enfermedad.
- **Quimioterapia de inducción o neoadyuvante:** permite lograr una reducción del tumor de cara a realizar un tratamiento local más conservador.
- **Quimioterapia simultánea con radioterapia.**
- **Quimioterapia paliativa:** se administra cuando el cáncer ya no es curable y el objetivo del tratamiento es incrementar en cierta medida la supervivencia asintomática y aliviar los problemas clínicos.

En el tratamiento contra el cáncer, la quimioterapia emplea fármacos que son diseñados para interferir con la neoplasia, aunque estos agentes no son solo selectivos para las células tumorales. El uso de



estos fármacos antineoplásicos tienen la capacidad de poder disminuir el metabolismo de las células neoplásicas o destruirlas totalmente, alterar los procesos de división celular e inhibir su crecimiento y multiplicación, así como de ejercer acción sobre todas las células con mayor tasa de proliferación como son en los epitelios, médula ósea y células germinales. En años recientes se ha empleado el término intensidad de la dosis, para definir la cantidad de fármaco suministrado por unidad de tiempo, en general miligramos por metro cuadrado por semana, este término fue introducido por Hryniuk en 1984 (14) (15).

Estas sustancias pueden ser de origen natural, sintético o semisintético y son clasificadas según su mecanismo de acción y dentro de éste según la estructura química del antineoplásico, donde una vez que se presenta la enfermedad es importante saber que tratamiento distinguirse y para lo cual suelen determinarse dos factores:

- el tipo de cáncer (el tipo de células anormales que provoca el cáncer)
- el estadio del tumor (es decir, cuánto cáncer se ha extendido en el cuerpo, si es que esto ha ocurrido) (16).

Al ser reconocidos los factores que presenta la enfermedad, debe ponerse a consideración el tipo de medicamento que deberá ser administrado, estos fármacos usados en quimioterapia son clasificados en las siguientes categorías que a continuación se muestran en función a su origen y en su manera de interactuar con la química y ciclo celular.

1.4. Antineoplásicos específicos de fase.

Los agentes citotóxicos durante una fase cíclica de un periodo de vida específico, se denominan específicos para el ciclo celular. Estos



fármacos antineoplásicos bloquean o influyen algunas de las 4 etapas del ciclo de la mitosis, destruyendo una fracción de células que pasa por esa fracción del ciclo. Son útiles en las neoplasias de crecimiento muy rápido (17) (Figura 5).

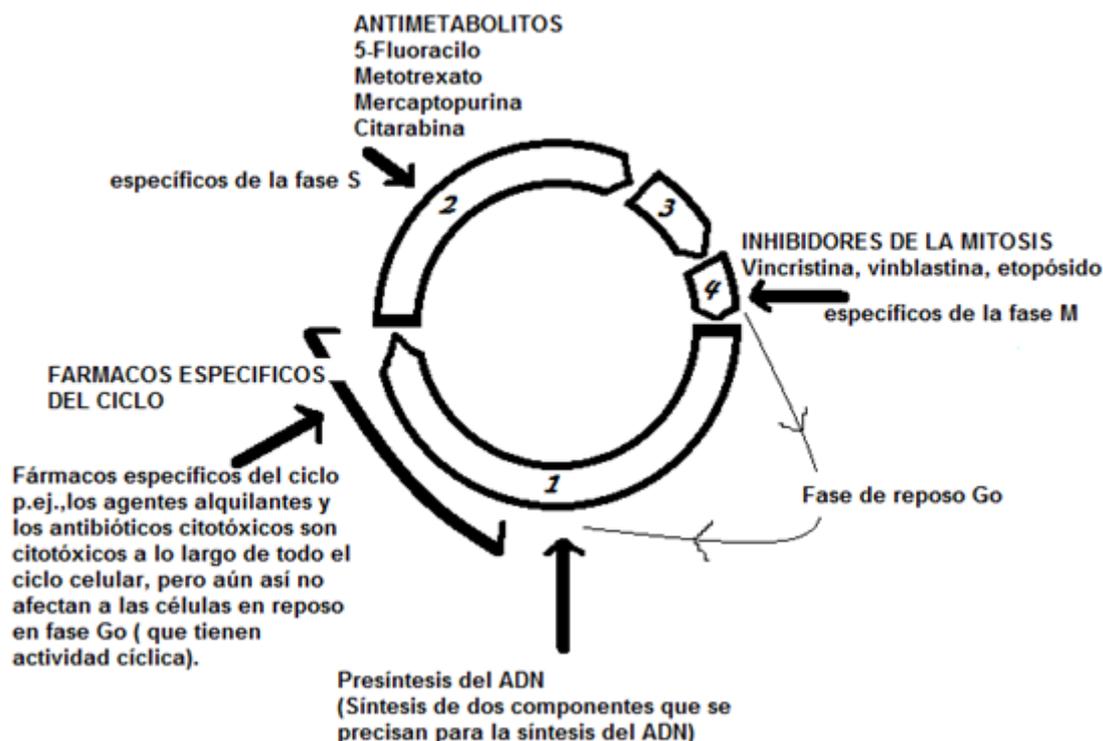


Figura 5. Ciclo celular. G₁- Síntesis de los componentes celulares necesarios para la replicación celular. Es el 40% del ciclo. 2. **Fase S**- Luego de sintetizados, ocurre la replicación del genoma del ADN. Es el 39 % del ciclo celular. 3. G₂- Ocupa el 19% del ciclo celular y en ella se sintetizan los componentes necesarios de la mitosis. 4. **Fase M**- ocupa el 2%. G₀. Etapa de descanso, al reincorporarse vuelve a G₁ (18).

Antimetabolitos: Son sustancias análogas a componentes naturales. Interfieren con la biodisponibilidad normal de los precursores de los nucleótidos de purina o pirimidina. Son específicos de la fase S del ciclo celular, afectan al ARN, ADN, síntesis de proteínas y la replicación celular, dentro de los que destacan (Figura 6):

- Análogos de ácido fólico: Inhiben a la enzima dihidrofolato reductasa, impidiendo la conversión a folato reducido necesario para la síntesis del ADN. Ejemplo: metotrexato.



- Análogos de pirimidina: Se incorporan en la vía metabólica de la síntesis del ADN y ARN, inhiben la síntesis de enzimas necesarias para la formación de los ácidos nucleicos. Ejemplos: fluoxuridina, fluoracilo y citarabina.
- Análogos de las purinas: Actúan reemplazando a los nucleótidos e interrumpiendo la síntesis del ADN y ARN. Ejemplos: fludarabina, mercaptopurina y tioguanina.

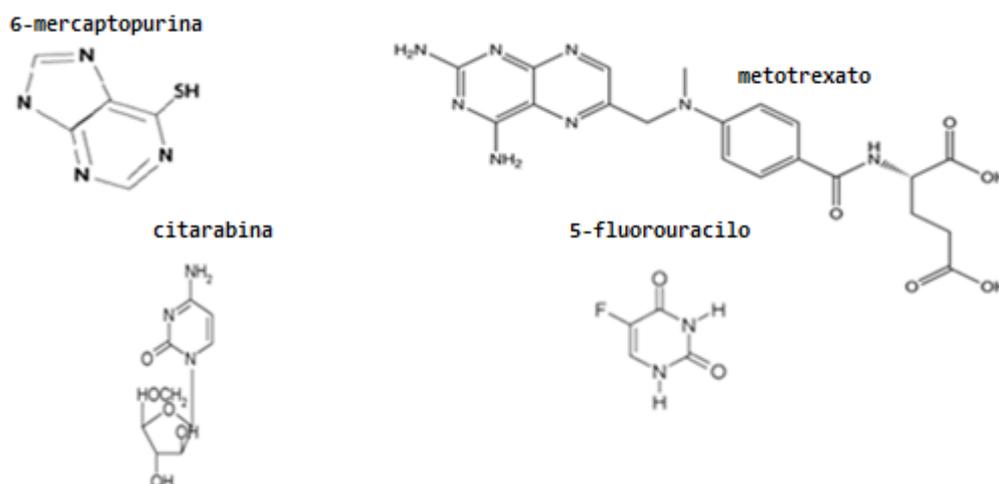


Figura 6. Estructura de antimetabolitos.

Productos naturales:

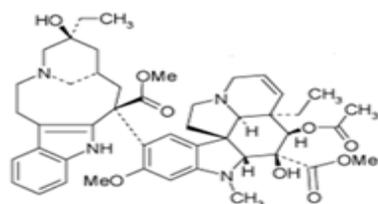
Alcaloides de la vinca: Son derivadas de la planta del bígaro, *Catharanthus roseus*, conocida también como el bígaro de Madagascar. Trabajan dependientes del ciclo celular parando la mitosis de las células afectadas causándoles la muerte. El mecanismo empieza con la unión a los monómeros de tubulina, evitando que los microtúbulos sean formados. Existen cuatro alcaloides de la vinca en usos clínicos: vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina (Figura7).

Podofilotoxina: Es un inhibidor de metafase, previene la unión de la proliferación de la tubulina requerida para el ensamble de los

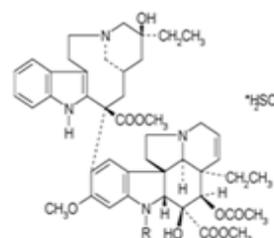


microtúbulos. En altas concentraciones inhibe el transporte de nucleósidos a través de la membrana celular. Su acción quimioterapéutica se asume a la inhibición del crecimiento y la habilidad para invadir el tejido de las células virales infectadas. Ejemplo: tenipósido.

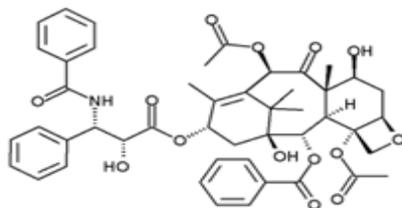
Taxol: Se producen a partir de la corteza del árbol del pacífico (*Taxus*). Inhiben las estructuras microtubulares dentro de la célula, provocando la muerte celular. Son activos sobre tumores sólidos resistentes a otros fármacos.



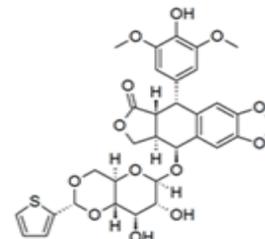
vinblastina



vincristina R= CHO



taxol



teniposido

Figura 7. Estructura de productos naturales específicos de fase.

Hormonas: Comprende un amplio grupo de fármacos que actúan en tumores cuyo crecimiento depende del estímulo hormonal. Determinadas líneas celulares muestran una dependencia hormonal para su crecimiento y desarrollo (mama, endometrio, y próstata) mientras que otras (tejido linfoide) son fuertemente inhibidas por los glucocorticoides. Las hormonas que se utilizan en el tratamiento antineoplásico hormonal son las siguientes:



- Corticosteroides suprarrenales
- Progestágenos
- Estrógenos
- Antiestrógeno
- Andrógenos
- Antiandrógeno
- Análogo de hormona liberadora de gonadotropina

1.4.1. Antineoplásicos no específicos del ciclo celular.

Por otro lado los fármacos que no son específicos de una fase, tienen acción durante cualquier fase del ciclo celular y sea cual sea su fase en el ciclo provocan un descenso exponencial continuo de la supervivencia de las células, porque afectan a todas las células. Son útiles en tumores grandes de crecimiento lento.

Agentes de alquilación: Logran su acción citotóxica mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleofílicas presentes en la células. Los agentes alquilantes pueden reaccionar con el agua, lípidos, proteínas, ARN y ADN, pero la alquilación de este último, parece ser de fundamental importancia para el efecto anti tumoral. Forman aductos con las bases del ADN, provocando la interrupción de síntesis, la mayoría de los agentes alquilantes tienen dos grupos funcionales y cada uno de ellos puede interactuar con una base del ADN, formando enlaces intra e intercadena dentro de la doble hélice. Una vez alquilada una base del ADN, puede ser eliminada y reemplazada por la misma base o puede dar origen a toda una serie de fenómenos que pueden llevar a la degradación del ADN, la inhibición de su síntesis o a la producción de mutaciones. La base alquilada cambia su estructura espacial en forma tal, que permite un acoplamiento anómalo: G-T y A-C en lugar de los normales G-C y A-T.



- Mostazas nitrogenadas: Fue de los primeros llamados agentes alquilantes, enfermos afectados de linfomas se trataron por primera vez con éxito en la Universidad de Yale en 1943. Estos compuestos son capaces de reemplazar un átomo de hidrógeno en otra molécula por un radical alquilo. Ejemplo la ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, mecloretamina.
- Alquilsulfonatos: Son derivados de ésteres alcanosulfónicos. Ejemplos: busulfán[®], treosulfán, manosulfán.
- Nitrosoureas: Son agentes alquilantes bifuncionales o monofuncionales, los cuales son compuestos inestables que se descomponen a agentes alquilantes produciendo enlaces cruzados interhebras en el ADN. El 6 de la guanina es el sitio preferido de ataque. Ejemplos: carmustina, estreptozotocina.

Los complejos de coordinación: En el compuesto inorgánico *cis*-diaminodicloroplatino II (CDDP), conocido también de manera comercial como *cis-platino*, el platino se encuentra en estado de oxidación 2⁺. Este compuesto actúa preferentemente sobre las bases del ADN, en particular con el nitrógeno en posición 7 de la guanina debido a su gran nucleofilia. Además se comporta como un agente bifuncional, produciendo enlaces en una de las hebras del ADN y dando como resultado errores de transcripción y la imposibilidad de que las cadenas se separen para la replicación. Derivados del CDDP (II) que mejoran su toxicidad son el carboplatino y el oxaliplatino (Figura 8).

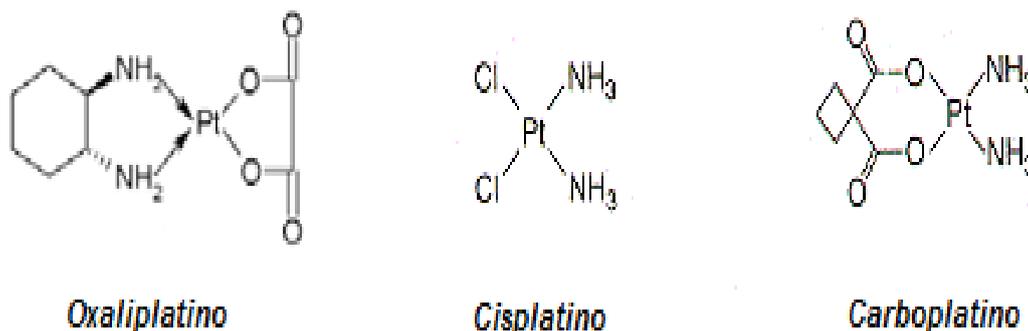


Figura 8. Estructuras de CDDP (II) y sus derivados. Actualmente el CDDP (II) y el carboplatino se encuentran autorizados a nivel mundial y el oxaliplatino solamente en algunos países. Las tres estructuras mantienen una geometría cuadrada plana-d⁸.

Productos naturales: Este tipo de agentes se logran a partir de la riqueza natural.

Antibióticos antitumorales: Funcionan al unirse con el ADN para evitar la síntesis de ARN. Estos fármacos también impiden el crecimiento celular al imposibilitar la replicación de ADN. Los antibióticos antitumorales evitan que el ADN se vuelva a fijar a sí mismo, lo que provoca la muerte celular. Esta categoría de medicamentos sirve para tratar una variedad amplia de cánceres incluyendo el testicular y la leucemia. Ejemplos: doxorubicina y mitomicina-C, carmustina y ciclofosfamida (Figura 9).

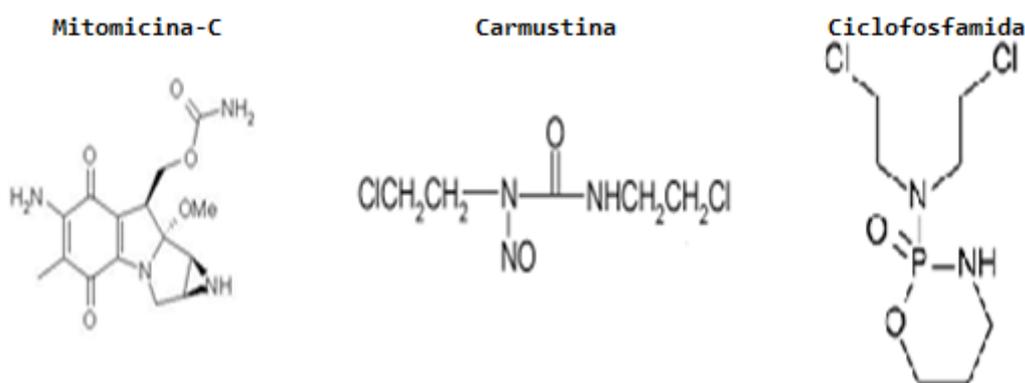


Figura 9. Estructura de antineoplásicos no específicos del ciclo celular.

Existe una resistencia al tratamiento mediante una respuesta celular a los ataques citotóxicos al ADN, siendo ésta la limitación más importante para el empleo exitoso de los numerosos antineoplásicos



disponibles. La resistencia celular a un agente quimioterapéutico se considera como la aptitud fenotípica que una célula pueda presentar, para tolerar la dosis de un fármaco que sería tóxica en una célula normal. Esta resistencia puede estar ligada a factores intrínsecos y extrínsecos. Los factores extrínsecos son basados en el crecimiento del tumor, en la anatomía y en la farmacocinética. En cuanto a los mecanismos intrínsecos, la resistencia se puede ejercer respecto a diferentes fármacos a la vez o bien con respecto a un solo fármaco mediante diferentes tipos de mecanismos (19) (20).

Un exceso de glutatión (21), una disminución en la acumulación intracelular del fármaco por la sobreexpresión de la glicoproteína-P (Gp-P) (22) y la evasión de la apoptosis, puede ser parte de una respuesta celular de estrés, para asegurar la supervivencia de las células al aumentar la reparación del ADN y con esto contribuir a la carcinogénesis, la progresión del tumor y por ende a la resistencia del tratamiento (23).

1.5. Compuestos con metales usados como antineoplásicos.

Los mecanismos de toxicidad de los compuestos que tienen metales son diversos, no obstante, todos se basan en la capacidad de coordinación de los iones metálicos a las biomoléculas, y a pesar de la toxicidad que presentan, varios compuestos con metales han presentado aplicaciones terapéuticas. Durante los años cincuenta se demostró en estudios realizados en animales, que existían sustancias químicas que tenían efectos antitumorales y gracias a la aplicación de la química inorgánica en la medicina, en la década de los sesenta se logró hallar uno de los mejores fármacos en la lucha contra el cáncer, el cisplatino, el cual se ha usado en diversos tipos de cáncer, como es el cáncer de testículos, vejiga, estómago, ovario y esófago. A partir de este descubrimiento, más compuestos con metales se han



introducido en la búsqueda de antitumorales probándose variados sistemas modelo, con el objetivo de descubrir nuevos fármacos más efectivos y menos tóxicos. También se han utilizado desde hace aproximadamente 50 años, compuestos de Au (I) en el tratamiento de artritis reumatoide, el oro normalmente es administrado en forma de complejo, en el cual el metal está coordinado a átomos de S, por ejemplo, $\text{Na}_3[\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]$.

Para finales de los 60s con la aplicación de fármacos antitumorales en cánceres humanos, se había probado que la quimioterapia podía inducir remisiones en cánceres como la leucemia linfoblástica aguda, el tumor de Wilms, el linfoma de Burkitt y la enfermedad de Hodgkin. Actualmente novedosas terapias con complejos metálicos con rodio, iridio y titanio tienen impacto en la medicina antitumoral, la aplicación de estos fármacos ha requerido conocimientos de los mecanismos de acción y del metabolismo de esos medicamentos así como de sus efectos sobre los tejidos normales. Pero a pesar de que la quimioterapia tiene un amplio espectro de acción contra las células cancerígenas, continúa la búsqueda de nuevos fármacos debido principalmente a la toxicidad que provoca en el organismo. El objetivo, por ejemplo, de utilizar un ión metálico esencial dietario dentro de un compuesto antineoplásico plantea la posibilidad de una toxicidad menor en el organismo como podría ser el caso de la utilización del cobre.

1.5.1. Cobre: cofactor esencial.

Símbolo químico Cu. El nombre del cobre proviene de la palabra en latín *cuprum*, vocablo que a su vez deriva de la expresión latina *aes cyprium* que significa "metal de Chipre", gracias a la gran importancia que tuvieron las minas cupríferas de esta isla en el universo greco-romano. El cobre es un metal de transición y se encuentra en la familia IB de la tabla periódica de los elementos, con número atómico



29, peso atómico de 63.546 (+/- 0.003), dos isótopos naturales y tiene la siguiente configuración electrónica [Ar] 4s²3d⁹. Los estados de oxidación de este metal pueden ser 0, I, II, III y IV, siendo los más raros el cobre (0) y el (IV) y los más abundantes el cobre (I) y (II). Los números de coordinación para el cobre (II) son 4, 5 y 6.

El cobre es un metal esencial para nuestro organismo, el cual una vez que es ingerido se une a la albúmina y se absorbe por el intestino delgado hasta la corriente sanguínea, donde es ligado a las proteínas de transporte para llevarlo hasta el hígado para su posterior distribución a través del cuerpo. Principalmente se encuentra distribuido en cerebro, riñón, corazón e hígado.

El cobre muestra un gran carácter oxidante y presenta gran capacidad para formar complejos de coordinación con moléculas orgánicas y dentro del entorno celular, el cobre se encuentra de manera usual en estados de oxidación Cu²⁺ y Cu⁺, de esta forma el Cu²⁺ lo podemos encontrar unido al nitrógeno en cadenas de histidina y al Cu⁺ interaccionando con el sulfuro de cisteína o la metionina (24). Estas características del cobre hacen posible su uso como cuproteínas, permitiendo al cobre ser un cofactor para múltiples enzimas, donde el metal se encuentra unido a residuos aminoacídicos específicos en el sitio protéico catalíticamente activo y cuando es incorporado en las cuproenzimas, es utilizado en reacciones de transferencia electrónica que regulan procesos tales como la respiración mitocondrial, metabolismo de neurotransmisores y melaninas, homeostasis del hierro, protección antioxidante, amidación de glicinil-péptidos para biosíntesis de neuropéptidos, y formación de tejidos conectivos.

Dentro de las enzimas conocidas como cuproproteínas se encuentran la citocromo-c oxidasa, la catalasa, la dopamina beta-hidroxilasa, las tirosinasas, las lisil dismutasa así como elemento central de la proteína hemocianina de artrópodos y moluscos, donde gracias a este elemento la coloración de su sangre es azul, equivalente a la



hemoglobina humana para el transporte de oxígeno. Este metal se encuentra en la estructura de metaloproteínas como son la Plastocianina, ceruloplasmina, así como en la superóxido dismutasa (Figura 10, 11 y 12).

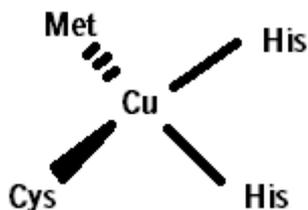


Figura 10. Plastocianina. La plastocianina está formada por un átomo de cobre coordinado por dos histidinas, una metionina y una cisteína, durante la fotosíntesis funciona como un agente transportador de electrones entre los Fotosistemas II y I (25).

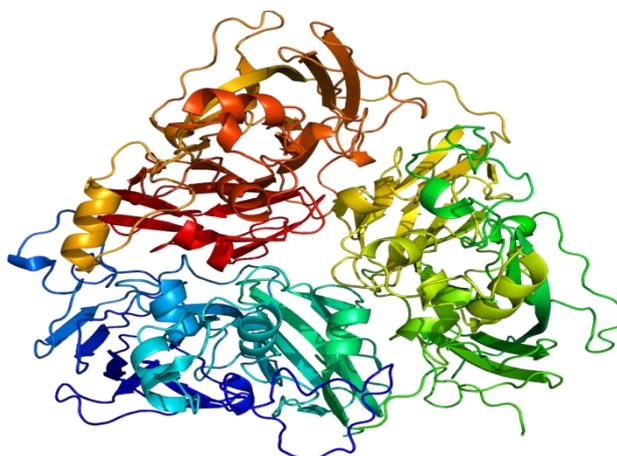


Figura 11. Ceruloplasmina humana (proteína plasmática). Contiene 6 átomos de cobre en su estructura. Su función es el transporte de cobre y la oxidación de Fe (II) a Fe (III) mediante la siguiente reacción (26).

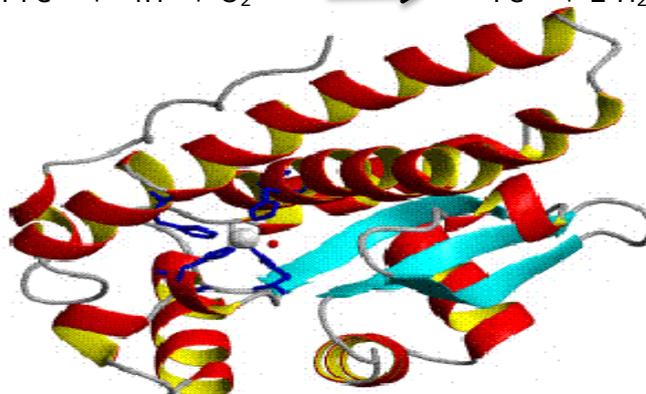


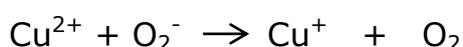
Figura 12. Estructura de la superóxido dismutasa (SOD). Elimina al radical superóxido por dismutación: $2\text{O}_2^- \xrightarrow{\text{SOD}} \text{O}_2 + \text{O}_2^{2-}$. En los humanos existen tres tipos de SOD: SOD2: la Mn-SOD mitocondrial, SOD1: la Cu/Zn-SOD Citosólica y la SOD3: extracelular (EC-SOD) (27).



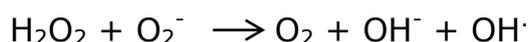
La capacidad del Cu para cambiar su estado redox cuando entra en contacto con productos intermediarios del metabolismo aerobio, conocido como ERO (especies reactivas de oxígeno) le hace ser fuertemente citotóxico, ya que induce la producción de radicales hidroxilo por catálisis de la reacción de Fenton (28).



Y el Cu^{2+} se reduce en presencia del radical superóxido:



El balance neto es el siguiente, conocido como reacción de Haber-Weiss:



Los seres vivos poseen estrategias para proveer al organismo así como para defenderlo de una toxicidad, un exceso de cobre en el organismo, puede llevar a problemas serios de salud como son por ejemplo, daño neurológico, daño al hígado, anormalidades de los huesos o hasta causar síntomas de intoxicación con una ingesta de 30g en el organismo, y conjuntamente, al existir en numerosas fuentes alimentarias ricas en cobre; se considera que su deficiencia es rara, a no ser que se presente en un contexto de síndrome de malnutrición, o en que se vea reflejada en las diversas patologías asociadas a alteraciones en la función de las cuproproteínas como son las enfermedades de Menkes (29), Creutzfeld-Jacob (30) y de Alzheimer (31).

1.6. Casiopeínas®.

Por su efecto en la salud humana y con la esperanza de desarrollar una curación, el cáncer ha sido el centro de un enorme esfuerzo de



investigación durante decenios, así, en respuesta a las necesidades de encontrar un fármaco más eficaz y a un mejor costo que los que ya existen en el mercado, en 1975 la Doctora Lena Ruiz, inició un proyecto encauzado hacia el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos, las Casiopeínas[®]. Con la ayuda de un grupo multidisciplinario de investigadores pertenecientes a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, durante la década de los 80's y 90's, el diseño del fármaco se centró en las siguientes características:

- Se recurrió al cobre (II) como centro metálico, debido a que es un metal esencial, y se espera que la toxicidad del compuesto sea menor que la de los fármacos usados comercialmente en terapias contra el cáncer, como es el caso de *cis*-platino (II) y Busulfán[®] (32).
- El cobre, al tener su estado de oxidación (II), se espera que pueda coordinar ligantes siguiendo una geometría cuadrada plana o pirámide de base cuadrada.
- El cobre de los compuestos puede participar en ciclos redox, liberando especies reactivas de oxígeno que dañan al ADN.

Se pensó en que las Casiopeínas[®] podían tener una interacción directa con el ADN formando enlaces de coordinación con el centro metálico por sustitución de uno de los ligantes o por una reacción de adición o bien unirse directamente al ADN mediante enlaces débiles por intercalación en el apilamiento de las bases. Las características por las que se cree que es posible esta interacción, se debe a la semejanza en la planaridad que muestra con algunos fármacos anticancerígenos como es el caso del *cis*-platino, el cual se une directamente al ADN.

La presencia de la nube de electrones deslocalizados en los anillos de la diimina la hace capaz de lograr interacciones de apilamiento.



- la molécula consta de un ligante bidentado tipo diimina (N-N), siendo bipyridina o fenantrolina y un ligante secundario que puede ser un α -aminoacidato (N-O) o un donador tipo O-O (acetilacetato o salicilaldehidato). Se utilizó a la bipyridina y a la fenantrolina, porque se conoce que estos ligantes tienen capacidad de intercalarse con el ADN (33).
- así mismo el donador tipo (O-O) o (N-O) podrían ser los responsables de lograr la selectividad tumoral de la molécula debido a la variación en la hidrofobicidad que presentan.

En 1992 fueron patentadas bajo el nombre de Casiopeínas[®] y debido a que han sido numerosas las variaciones en la estructura de las Casiopeínas[®], se realizó una clasificación y se muestra a continuación en la siguiente tabla. La fórmula general de las Casiopeínas[®] es $[CuLL']NO_3$, donde el ligante L es una diimina aromática del tipo de la fenantrolina o la bipyridina, con uno o más sustituyentes y el ligante L' es un aminoacidato o un ligante aniónico donador por dos oxígenos como el acetilacetato o el salicilaldehidato (Tabla 1).



FAMILIA	FORMULA GENERAL
Casiopeína [®] I	[Cu(4,7difenil-1,10 fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeínas [®] II	[Cu(4,7dimetil-1,10 fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeínas [®] III-ia	[Cu(N-N)(acac)]NO ₃ el donador NN es variable y puede ser: <ul style="list-style-type: none"> • 4,4-dimetil-2,2-bipiridina • 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina • 5-nitro-1,10-fenantrolina • 5-metil-1,10-fenantrolina • 5-cloro-1,10-fenantrolina • 1,10-fenantrolina, 2,2-bipiridina • 4,7-difenil-1,10-fenantrolina
Casiopeínas [®] III-S	[Cu(N-N)(salal)]NO ₃
Casiopeínas [®] IV	[Cu(4,4'-dimetil-2,2-bipiridina)(O-N)]NO ₃
Casiopeínas [®] V	[Cu(5-nitro-1,10-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeínas [®] VI	[Cu(5,6 dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeínas [®] VII	[Cu(1,10-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeínas [®] VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-10-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeínas [®] IX	[Cu(4,4-dimetil-2,2-bipiridina)(O-N)]NO ₃

Tabla 1. Clasificación de la Familia de las Casiopeínas[®].

Donde O-N: α-aminoacidato; acac: acetilacetato; salal: salicilaldehidato. Los compuestos más estudiados actualmente son la Casiopeína I-gli, Casiopeína II-gli y la Casiopeína IIIia siguiendo un estricto control de calidad del principio activo como materia prima marcado por la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).

Las siguientes Casiopeínas[®] han demostrado tener actividad citostática, citotóxica, y antineoplásica en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*.

**Casiopeínas®:**

Igli	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(glicina)]NO ₃
IIgli	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicina)]NO ₃
IIIHa	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO ₃
III 5,6	[Cu(5,6-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO ₃
III-ia	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO ₃
III-5aNO _{2a}	[Cu (5-NO ₂ -fenantrolina)(acetilacetato)]NO ₃

Y han sido caracterizadas mediante:

- análisis elemental
- IR
- UV-VIS
- conductividad
- momento magnético
- y estructura de rayos X en monocristales.

Debido a la similitud que las Casiopeínas® tienen en cuanto a estructura con el CDDP (II), éste es usado como testigo positivo en la mayoría de los análisis realizados.

En investigaciones hechas en relación al crecimiento celular sobre modelos tumorales humanos como modelos tumorales murinos *in vitro*, se concluyó que las Casiopeínas® son activas en todos los modelos como fueron HeLa, SiHa, CaSki, C33, CaLo, InB1, melanoma B16 y carcinoma de pulmón de Lewis, donde se observó una mayor actividad en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino presentando una inhibición de crecimiento de hasta el 50% con dosis de 10 a 100 veces menores que las usadas con Cisplatino.

Mediante estudios QSAR del tipo de compuestos [Cu(1,10-fenantrolina)(acac)]NO₃ se pudo llegar a la conclusión, que el anillo extra que tiene la fenantrolina en comparación con la bupiridina le ayuda a mantener una mayor actividad biológica, siendo los



compuestos de fenantrolina tetrametilada los más activos y a su vez los más tóxicos.

En la determinación de espectroscopia por UV-visible, se obtuvieron los máximos de detección específicos para las materias primas analizadas (Casiopeína[®] IIgli y III-ia), los cuales se pueden tomar como un parámetro de referencia (especificidad) para la caracterización de estos compuestos.

Entre muchos de los estudios podemos mencionar a la Casiopeína[®] II gli que presenta un PM de 423.5 g/mol y un de pka de 5.4. Este complejo ha mostrado ser potencialmente citotóxico, y se ha probado que tiene una menor toxicidad que el CDDP (II). Los estudios hechos se han desarrollado en células HeLa, Calo, murinas de leucemia L1210, contra los tipos de cáncer S180, B16 y LW1 (34) (35) (36).

1.6.1. Casiopeína[®] III-ia.

En particular la Casiopeína[®] III-ia [**Cu(4,4dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetato)]NO₃**, se encuentra en etapa preclínica con un alto potencial antineoplásico, utilizando líneas de carcinoma cérvico-uterino (HeLa y SiHa), mostrando ser una de las menos tóxicas (37) (38).

Ensayos realizados mediante estudios QSAR, mostraron que la actividad antineoplásica debida a este compuesto, se relaciona con el tipo y cantidad de sustituyentes presentes en el ligando bidentado tipo diimina (N-N).

En este trabajo de investigación se usó a una de las Casiopeínas[®] más activas, la Casiopeína[®] III-ia:

1.6.1.1. Características de la Casiopeína[®] III-ia.

- Polvo fino, libre de partículas extrañas, homogéneo, color azul (claro).



- Presenta solubilidad en agua y metanol.
- La DL50 por administración intravenosa en ratón es de 15.85 mg/kg.
- La DL50 por administración intraperitoneal en ratón es de 17.7 mg/kg.
- Reduce la expresión de metalotioneína, medio usado por las células cancerosas para eliminar a los fármacos anticancerígenos basados en metales (39) (40).
- Al parecer su toxicidad se debe al donador N-N y los compuestos que poseen acetilacetato como segundo ligante.
- Volumen de distribución aparente es de 44.8mL.
- Tiene un coeficiente de partición de 0.358.
- Pka de 8.25.
- A temperatura constante se mantiene como una molécula estable tanto en estado sólido como en solución acuosa (41).

A continuación se enlistan algunos estudios realizados de este compuesto dentro de los muchos trabajos que se han llevado a cabo.

- Se plantea el mecanismo de acción de la Casiopeína[®] IIIia estimándose que la generación de radicales libres que causan daño oxidativo a la célula no ocurre en el citosol (42).
- En medios ácidos ($\text{pH} \leq 5$), la Casiopeína[®] IIIia se protona y se disocian los ligantes, por lo que no puede administrarse de manera oral (43).
- Evaluando el efecto genotóxico sobre *Drosophila* se observa que este es menor que el de otros anticancerígenos empleados en quimioterapia (38).
- Se evaluó en modelos *in vivo* utilizando tumores humanos xenotransplantados en ratones desnudos (*nu/nu*) comprobando una doble actividad antitumoral con respecto a CDDP (II) (44).
- También se sabe que los complejos mixtos de cobre



denominados Casiopeínas[®], interactúan preferentemente con adenina, esta interacción es de tipo apilamiento, lo cual lleva a pensar que estos complejos tendrán como mecanismo de acción el de ser intercaladores con el ADN. Los complejos formados por fenantrolinas sustituidas (-CH₃, -C₆H₅, -H) y aminoácidos tendrán un efecto intercalante mucho mayor que aquellos complejos que contienen bipyridinas sustituidas (-H, -CH₃) y acetilacetato o salicilaldehído (45).

- Se validó el modelo de determinación de la Casiopeína[®] IIIa por el método de HPLC y se realizaron estudios de farmacocinética en rata y perro. Con respecto a la toxicidad en perros se observaron edemas pulmonares y cardiotoxicidad después de la administración de dosis letales de 10 mg/kg (38).
- Evaluando el potencial citotóxico de la Casiopeína[®] mediante la determinación de su efecto sobre el índice mitótico en células de médula ósea de ratón, se obtuvo en valor de 9.9 para la mitomicina C, 3.7 para el cis platino y 1.8 para la Casiopeína[®]. Estos datos revelan que aun cuando las dosis empleadas son próximas para la Casiopeína[®] y para el CDDP (II) (14 y 17 mg/Kg) el potencial citotóxico del compuesto de prueba es dos veces menor que para el CDDP (II) (46).
- Se observa que este compuesto tiene efecto teratogénico, induciendo malformaciones esqueléticas en embriones y fetos de ratón cuando las dosis usadas están alrededor de los 7mg/Kg.



1.6.2. Estructura general de las Casiopeínas®.

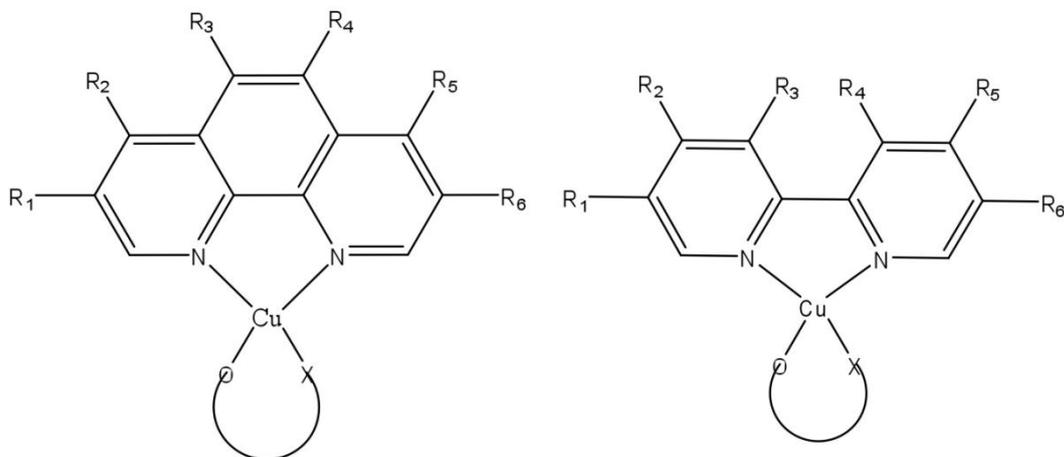


Figura 13. Estructura general de las casiopeínas.
Dónde **X**= -N, -O. **N-O**= Aminoacidoato. **O-O**= Salicilaldehydato o Acetilacetato.

**CAPITULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.****2.1. Hipótesis.**

Las Casiopeínas[®] serán capaces de inducir apoptosis en una magnitud igual o mayor a la del fármaco control utilizado (Busulfán[®]). La técnica de citometría de flujo será lo suficientemente sensible para detectar diferencias entre cada una de las Casiopeínas[®] y el efecto de ellas, y las del fármaco control para poder determinar una tendencia entre su estructura y su actividad antineoplásica.

2.2. Objetivos.**2.2.1. Objetivo general.**

Evaluar la posible actividad antitumoral de cinco Casiopeínas[®], [Cu(4,7difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃, [Cu(4,7dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃, [Cu(5,6dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃, [Cu(4,4dimetil-2,2'-bipyridina)(acetilacetato)]NO₃ y [Cu(5,NO₂-1,10fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ para producir muerte celular utilizando a la citometría de flujo como una técnica sensible en la viabilidad celular sobre la línea tumoral de cáncer cérvico-uterino HeLa.

2.2.2. Objetivos particulares.

- Sintetizar cinco Casiopeínas[®]
- Caracterizar a los complejos mediante espectroscopía de infrarrojo (IR) y análisis elemental.



- Evaluar el porcentaje de apoptosis y/o necrosis en células HeLa inducido por las cinco Casiopeínas[®] anteriormente mencionadas.
- Evaluar si las Casiopeínas[®] incrementan el porcentaje de células en apoptosis y/o en necrosis en la Línea celular HeLa, de manera similar al de las tratadas con otro agente antineoplásico utilizado actualmente en quimioterapia (Busulfán[®]).
- Evaluar la influencia de los cinco sustituyentes diferentes de las casiopeínas en la apoptosis y necrosis.
- Determinar la concentración idónea de la mejor Casiopeína[®] capaz de inducir la muerte celular por apoptosis mediante el porcentaje evaluado en citometría de flujo.



CAPITULO 3. ANTECEDENTES.

3.1. Busulfán®.

Dentro de los agentes antineoplásicos alquilantes del grupo de los metanosulfonatos se encuentra el fármaco llamado Busulfán®, el cual penetra en las células mediante difusión pasiva. El Busulfán®, siendo un agente electrofílico, reacciona con residuos de guanina del ADN para formar entrecruzamientos con cuatro carbonos di-guanina, lo que provoca una lectura errónea del código del ADN y la ruptura de la cadena simple. Se ha demostrado que el grado de entrecruzamiento del ADN y la citotoxicidad del compuesto son proporcionales a la dosis. Su acción no es específica a ninguna fase del ciclo celular (34), aunque en ensayos *in vitro* han mostrado que las células en replicación son más sensibles a Busulfán® durante la fase G1, el progreso del ciclo celular se encuentra bloqueado en la fase G y al contrario, las células cultivadas en fase S, que implica la síntesis de ADN, no se ven afectadas porque el sistema de reparación del ADN está activo en esta fase y mientras que en las células resistentes pueden eliminar los entrecruzamientos del ADN producidos por Busulfán® en un plazo de 6 horas, en las células no resistentes tratadas de forma parecida, los entrecruzamientos del ADN permanecen sin cambios, incluso al cabo de 24 horas (47) (48).

La manera en que actúa el Busulfán® es cuando se hidroliza en medio acuoso logrando liberar grupos metilsulfonato en los extremos opuestos de la estructura alquímica de cuatro carbonos, produciendo con esto iones carbonio que alquilan el ADN. Se considera que el daño del ADN en células que se dividen rápidamente es el responsable de gran parte de la citotoxicidad de Busulfán® (49) (Figura 14).

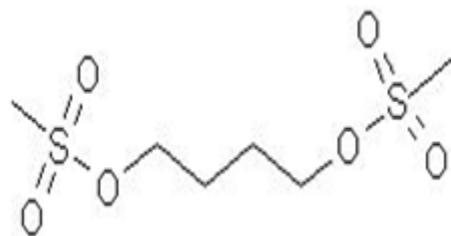


Figura 14. Estructura de Busulfán®.

Nombre IUPAC: 1,4-butanediol-dimetanesulfonato. Fórmula química: $C_6H_{14}O_6S_2$. Peso molecular: 246.304 g/mol. Actualmente es usado principalmente en leucemia crónica mielógena.

Según la Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer, el Busulfán® es considerado como carcinógeno humano pudiendo provocar el desarrollo de displasia broncopulmonar, aunque en dosis habituales de 2 a 3 mg/m² al día, se distingue por tener pocos efectos farmacológicos (50).

3.2. Apoptosis y Necrosis.

Con la caracterización de la carcinogénesis, el cáncer pasó de ser sólo una enfermedad con alteraciones en la proliferación celular, a una con desbalance entre proliferación y apoptosis.

El término apoptosis ya era conocido desde la antigua Grecia y Roma en un contexto médico y filosófico, teniendo sus raíces desde Hipócrates (470-377 A.C), padre de la Medicina Occidental, la apoptosis es relatada como la destrucción de los tejidos de gangrena y más tarde también es mencionada en el siglo II con Galeano (129-201), médico del emperador Marco Aurelio donde comienza a elaborarse el concepto de necrosis, aunque es a mediados del siglo XX cuando se despierta principalmente la atención a este proceso.

La palabra apoptosis viene del vocablo griego (apo-separación y ptosis-caída), y fue elegida para diferenciarla de la muerte que ocurre de forma natural o la muerte provocada por un daño agudo (necrosis). Los embriólogos describieron a la apoptosis como una



muerte celular programada, debido a que la célula inicia una serie de acontecimientos ordenados en tiempo y espacio que se encuentran controlados genéticamente (51). Estos cambios en la apoptosis son debidas fundamentalmente a dos causas:

- recambio celular, es decir al término de un proceso de diferenciación
- y regeneración, a causa de daño tisular, que puede ser de naturaleza física o química (52).

En 1972, John F. Kerr, Andrew H. Willie y Alistair R. Currie proponen que la muerte celular responde a un programa de muerte intracelular, que puede ser activado o inhibido por estímulos tanto fisiológicos como patológicos (53).

Y actualmente la mayor parte del conocimiento que se tiene de la genética molecular de la apoptosis, proviene de investigaciones sobre el gusano *Caenorhabditis elegans*, debido a la homología que tiene con organismos superiores. La apoptosis en este nemátodo ha sido tomada como referente del proceso en todos los sistemas y esto ha podido identificar una parte importante de la red de mecanismos que lo controlan. El sudafricano Sydney Brenner, uno de los fundadores de la biología molecular, lo eligió entre miles de organismos como modelo experimental para estudiar el sistema nervioso y el cerebro humano. Este gusano tiene 19.099 genes, un poco más de la mitad del número de genes con que, según se estima, cuenta el ser humano (54) (55).

El análisis genético, realizado inicialmente en *Caenorhabditis elegans*, ha demostrado que la muerte celular es un proceso regulado a nivel genético y depende de un balance de señales procedentes del medio ambiente celular. En 1986, el grupo de H.R Horvitz inicia el estudio



de los genes identificando 14 genes que poseen algún rol en la muerte programada de las células; estos genes fueron bautizados como *ced* (por *C. elegans* death genes), siendo particularmente tres los genes que controlan la ejecución del proceso apoptótico, los genes *ced-3* y *ced-4* inducen apoptosis en las células y el gen *ced-9* la inhibe (56).

En total se han detectado 14 caspasas en mamíferos, 4 en *C. elegans* y 7 en *Drosophila melanogaster* (Figura 15).

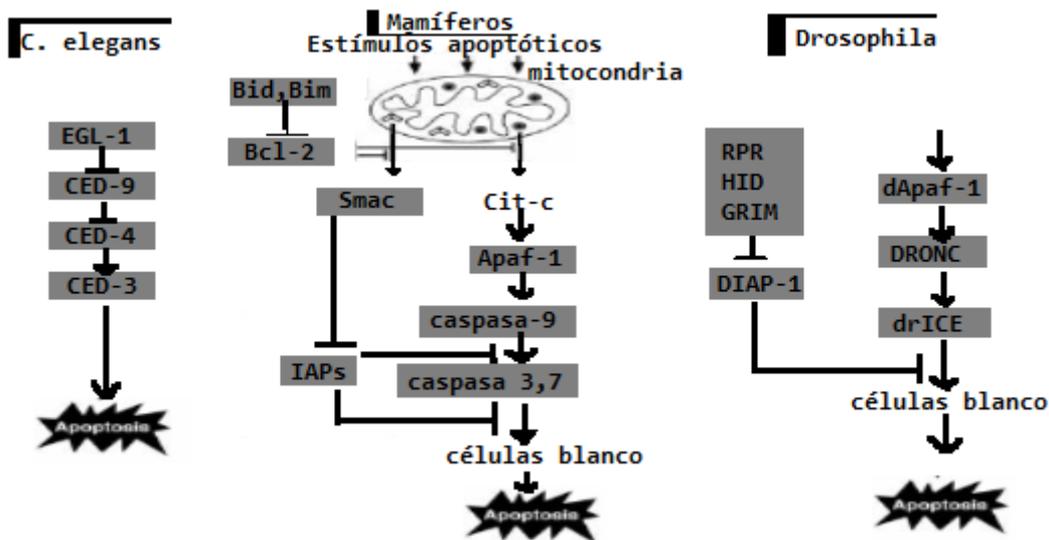


Figura 15. Homología de la vía apoptótica en tres diferentes organismos.
 EGL-1, Bid y Bim son inhibidores, CED-9 y Bcl-2 son reguladores, CED-4 y Apaf 9 son adaptadores, CED-3, Caspasa 9 y DRONC son efectores.

El estudio del nemátodo *C. elegans* estableció las bases para la caracterización, que hoy día aún es incompleta, de la compleja red de procesos que culminan con la apoptosis celular y que se explicará más adelante.

3.2.1. Ejemplos de apoptosis y necrosis.

Dos formas de muerte celular son habituales en el organismo: necrosis y apoptosis.



La muerte celular es conocida desde hace mucho tiempo, pero se consideraba que este proceso era siempre perjudicial para el organismo, ahora se sabe que muchas células en un organismo deben morir para que el conjunto sobreviva. Las células inducen su muerte en el momento que ya no son útiles para el organismo o en el caso de que comiencen a volverse potencialmente peligrosas, los seres pluricelulares, por ejemplo, en su desarrollo llegan a su forma final porque eliminan de modo selectivo cierto número de células.

- Por ejemplo, durante la etapa embrionaria de todos los invertebrados ciertas neuronas deben enviar proyecciones largas y finas desde los axones hasta el músculo que deberán controlar. Si una neurona no realiza esa unión, o la hace de modo inadecuado, está destinada a morir por apoptosis.
- Otro ejemplo lo muestra el nemátodo *C. elegans*, el cual para llegar al estado adulto tiene que perder por apoptosis 131 células de su organismo.
- Moldear estructuras o formas. La apoptosis es importante para dar forma a diferentes órganos y estructuras en el desarrollo, como ocurre en los humanos durante el desarrollo fetal eliminando las membranas interdigitales y obteniendo la individualización de los dedos. Por el contrario, la apoptosis se encuentra bloqueada en las extremidades de los patos por lo que éstas mantienen su característica pata palmeada. Otro ejemplo lo encontramos en la fusión de estructuras como el esternón y del paladar (57).
- Remover estructuras transitorias. En el desarrollo de algunos organismos existen estructuras transitorias que son necesarias en una etapa, pero removidas conforme avanza el desarrollo. Por ejemplo, la pérdida de la cola de los renacuajos durante la metamorfosis de los anfibios, la pérdida de la cola en los embriones humanos en desarrollo, los ductos de Müllerian que



forman el útero y los oviductos en las hembras de los mamíferos que son eliminados por apoptosis en los machos, así como también, en los machos la testosterona dirige la muerte de las células de las glándulas mamarias (58).

- Controlar el número de células. Hay órganos en los cuales se producen una gran cantidad de células y posteriormente se reduce el número por muerte celular. En el caso del sistema nervioso, aproximadamente el 50% de las células que se producen son eliminadas. Se ha considerado que solo sobreviven las células capaces de hacer contacto con las células blanco y las demás son descartadas. Durante el desarrollo se forman neuronas en exceso, controlándose la excesiva producción con un reajuste de su número por muerte celular, lo que permite posteriormente la muerte de las neuronas menos capacitadas. Por otra parte, la apoptosis también participa en la involución de órganos como la eliminación del endometrio al iniciarse la menstruación y se hace presente en las mamas cuando termina la lactancia (59).
- Función inmune. Eliminar células anormales, mal ubicadas, no funcionales o dañinas al organismo. A la apoptosis se le ha asignado un papel en el control de eventos del sistema inmune, como es la selección de linfocitos T. La apoptosis interviene en los mecanismos de defensa especialmente en infecciones virales, en estas circunstancias las células infectadas sufren apoptosis inducida por linfocitos a fin de evitar la replicación viral y por tanto la propagación de la infección. Dos ejemplos interesantes de inducción de apoptosis están en el sistema inmunológico. Originados en la médula ósea, los linfocitos T "maduran" en la glándula denominada timo (de ahí la T), entran en la sangre y en el sistema linfático y pasan a tener un papel primordial en la defensa contra los microorganismos. Los linfocitos T poseen moléculas proteicas en su superficie



(receptores) que reconocen sustancias extrañas y las combaten. Pero algunos linfocitos contienen receptores que reconocen elementos del propio organismo, lo que provocaría una auto agresión si las células fuesen activas. Durante la maduración en el timo sólo sobreviven los linfocitos que se unen a componentes extraños; el resto es eliminado por medio de la apoptosis (60).

- Producir células diferenciadas. Se encuentran tipos celulares en los que la diferenciación terminal requiere que las células mueran, como es el caso de los queratocitos. En éstos la sobreexpresión de bcl-2 inhibe su diferenciación terminal in vitro (61).
- El proceso de diferenciación terminal es otro ejemplo. En diferentes tejidos, como es el epitelio intestinal, las células proliferan y se diferencian; las células una vez diferenciadas no proliferan, alcanzando un estado en el que la célula no responde a factores de crecimiento.
- Apoptosis y envejecimiento. Dentro de los procesos de muerte celular programada también se incluyen otros tipos de muerte celular, como la asociada a la senescencia o envejecimiento. Este proceso se ha relacionado con una acumulación de daños en su material genético y se ha descrito una reducción de los telómeros del ADN celular a lo largo de la vida de las células. Esto se traduce en una pérdida de la estabilidad de la cromatina que ocasiona la muerte de la célula (62).
- Daño al ADN. Las células defectuosas o anormales en las que se ha producido un daño en el ADN también se eliminan por apoptosis, siendo éstas sustituidas por nuevas células. La lesión en su genoma hace que las células puedan llegar a desarrollar cáncer. Las células responden a la lesión al ADN incrementando la producción de p53, un poderoso inductor de apoptosis. Las mutaciones en p53 producen una proteína defectiva que



frecuentemente se detecta en células cancerosas. Una señal que puede desencadenar la apoptosis de una célula, es la pérdida de la adhesión a la matriz extracelular que la rodea. De una manera extrínseca, la radioterapia y la quimioterapia inducen la apoptosis en algunos tipos de cáncer.

Así, de manera natural durante el desarrollo de un organismo, se eliminan por apoptosis células anormales con localización errónea, no funcionales o potencialmente peligrosas, de forma que solo completen el proceso de desarrollo células no dañadas. La apoptosis por tanto es un proceso fisiológico normal donde la muerte celular aparece de una manera programada, al contrario de la apoptosis, la muerte celular en la necrosis al sufrir daños graves tales como falta de oxígeno, insuficiencia de sangre al tejido o isquemia, acción de sustancias químicas o tóxicas, una infección o el desarrollo de una enfermedad autoinmune, no ocurre de manera ordenada. Los factores que pueden producir necrosis son de naturaleza variada pero son dos los que se han usado más frecuentemente para comprender la patogenia de la necrosis: la necrosis por coagulación y por licuefacción.

- Necrosis de coagulación, generalmente causada por isquemia, en que el órgano tiene un aspecto opaco y seco. Puede verse esta necrosis en bazo, corazón y riñón. Una variedad de esta necrosis es la caseificación que se presenta especialmente en la tuberculosis como focos nodulares.
- Necrosis de licuefacción, se forma rápidamente; por ejemplo, después de una quemadura en la piel al producirse una ampolla, en que tenemos un líquido seroso.



3.3. Ciclo celular y apoptosis.

Dentro del ciclo celular el mecanismo apoptótico puede iniciarse en el tercio final G1 para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN y en la fase G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis, pero siendo el caso de un proceso tumoral, el organismo no controla la proliferación celular ni la entrada en ciclo de las células cancerosas (Figura 16).

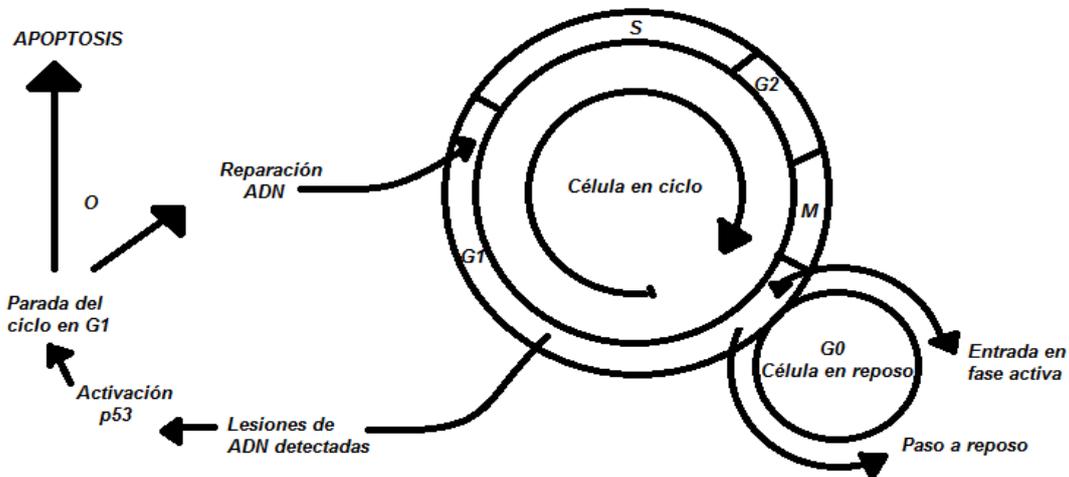


Figura 16. Entradas y salidas en el ciclo celular.

La velocidad de crecimiento de un tumor dependerá de la duración del ciclo celular, y por otra parte, de la proporción entre el número de células en reposo sobre el número de células activas (63).

3.4. Cambios morfológicos y bioquímicos durante la apoptosis y necrosis.

La apoptosis es un tipo de muerte celular que puede ser distinguido de la necrosis por criterios morfológicos y bioquímicos. Durante la apoptosis es posible notar cuatro fases diferentes, la fase de activación, fase de ejecución, fase de engullimiento y la fase de degradación, presentando características muy bien definidas (Figura 17).

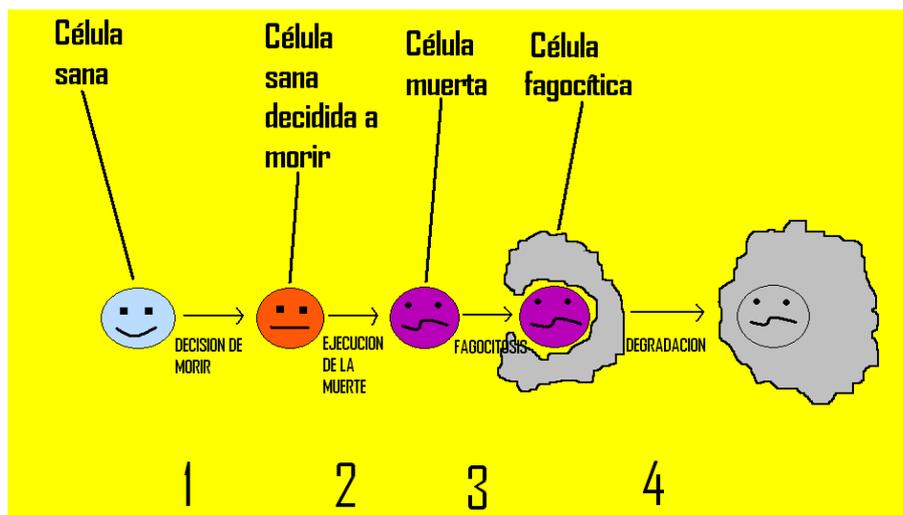


Figura 17. Vía genética de la muerte celular programada en organismos superiores. 1.-Activación de receptores: desequilibrio entre factores inductores e inhibidores. 2.-Fase temprana: Activación de proteasas y endonucleasas, Fase intermedia: Fragmentación de ADN, Fase tardía: Emisión de cuerpos apoptóticos. 3.- Detección de fosfatidilserina (PS), 4.-Evita liberación de componentes intracelulares.

Morfológicamente durante la apoptosis, se observa que la célula adquiere una forma redondeada y se separa de las células contiguas, durante este proceso, se presenta una alta condensación nuclear y citoplasmática en forma de cuerpos apoptóticos envueltos por membrana celular que son rápidamente fagocitados por células especializadas llamadas macrófagos, o en algunos casos por células adyacentes a la célula apoptótica. Cada fragmento posee membrana e incluso puede contener organelos celulares que preservan su estructura aún después de ser fagocitados, los lisosomas normalmente permanecen intactos aún después de la fragmentación de la célula y el contenido celular no es vertido al espacio extracelular, por lo tanto no se genera una respuesta de tipo inflamatoria (64).

En contraste, durante el proceso de necrosis se observan cambios intracelulares como son la picnosis (condensación del núcleo), cariólisis (disolución de la cromatina), cromatolisis, (disolución de los cromosomas) y carriorexis (fragmentación de la cromatina) (Tabla 2).



APOPTOSIS	NECROSIS
Muerte fisiológica. Proceso muy regulado y controlado	Muerte no fisiológica, muerte accidental traumática. Proceso no regulado
Se produce durante el desarrollo, mantiene la homeostasis tisular y elimina células dañadas.	No se produce durante el desarrollo
Inducida por estímulos intracelulares o extracelulares	Inducida por un daño celular o tisular
Proceso energéticamente activo y que requiere la biosíntesis de proteínas. Degradación mediada por caspasas.	Proceso energéticamente pasivo.
Siguen un orden específico de eventos. Condensación de la cromatina y fragmentación internucleosomal del ADN genómico. Mantenimiento estructural de orgánulos	La célula se hincha, se lisan orgánulos subcelulares y se desintegra de forma desordenada. Existe daño a células vecinas.
Mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática. El contenido celular queda englobado en los cuerpos apoptóticos. No se produce inflamación.	La ruptura de la membrana conduce a la liberación del contenido extracelular, asociada a la inflamación.

Tabla 2. Esquema comparativo de las diferencias de la muerte celular por apoptosis y necrosis. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por virus o microorganismos, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes (65).

Desde el punto de vista bioquímico las células apoptóticas se caracterizan por presentar una reducción en su potencial mitocondrial liberando así al citocromo c, presentan acidificación intracelular, producción de radicales oxidantes, degradación de la cromatina en fragmentos oligonucleosomales y externalización de residuos de fosfatidilserina para unirse a los macrófagos que fagocitan los cuerpos apoptóticos. Los cambios bioquímicos que se producen al activarse la señal de la apoptosis, está referida a la degradación del ADN nuclear, siendo un evento irreversible. En primer lugar ocurre un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática (pre-lisis del ADN) con una importante afluencia de iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} , donde se



activan o sintetizan unas enzimas específicas llamadas endonucleasas que cortan el ADN en fragmentos regulares, en un periodo entre algunos minutos y algunas horas. Sólo las partes del ADN protegido por las proteínas del nucleosoma quedan intactas generando mono y oligonucleosoma. Los fragmentos del ADN pueden ser observados bajo electroforesis formando un diseño consistente en múltiplos de aproximadamente 180 a 200 pb., produciendo el característico patrón de escalera utilizado como marca bioquímica en el reconocimiento de la apoptosis. Estos cambios bioquímicos son estimulados por la activación de un conjunto de enzimas proteolíticas llamadas caspasas, que se describirán con detalle más adelante (66).

3.5. Mecanismos moleculares de la apoptosis.

3.5.1. Reguladores.

Las células del organismo reciben un gran número de señales de manera constante como son la proliferación, diferenciación y por supuesto la apoptosis. Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis, es necesario que la célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte.

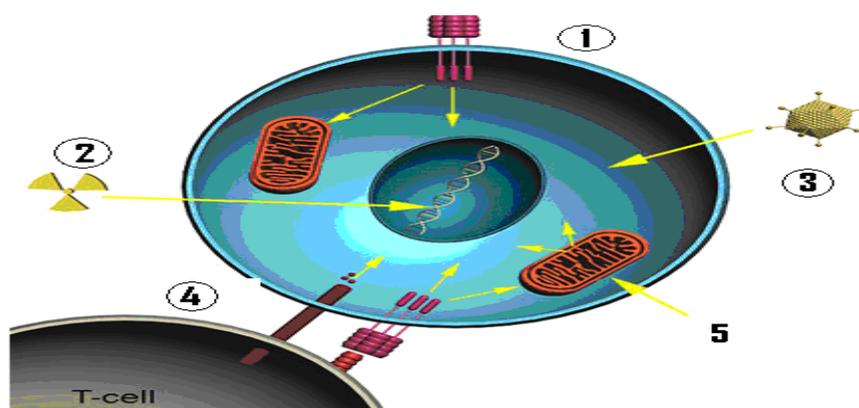


Figura 18. Activadores de muerte.

1. Presencia de ligandos que inducen la muerte a receptores en la superficie de la célula.
2. Estrés celular por exposición a la radiación.
3. Sustancias químicas o sustancias virales.
4. Inducción de la apoptosis por linfocitos citotóxicos a través de la granzima.
5. Señales intrínsecas inician la apoptosis a través de las mitocondrias.



La naturaleza de los inductores de muerte celular puede ser de tipo físico, fisiológico, biológico o químico y para lo cual se requiere de genes involucrados en la regulación de la apoptosis (Figura 18).

A nivel molecular las siguientes proteínas son pieza clave en los mecanismos que controlan el ciclo celular, la proliferación y la muerte de las células (Tabla 3).

GEN	LOCALIZACION
Bcl-2/ Bcl/XL	Membrana mitocondrial, membrana nuclear y retículo endoplásmico
Bax/ bak/ bad	Membrana mitocondrial, membrana nuclear y retículo endoplásmico
myc	Núcleo
p53	Núcleo
APO-1/ Fas	Membrana celular
ALT/ VIT E	Citosol
CPP32	Citosol

Tabla 3. Genes moduladores del proceso apoptótico.

3.5.2. Familia Bcl-2.

Dentro de los genes reguladores más representativos del proceso apoptótico se encuentra la familia Bcl-2, p53 e IAPs.

La familia Bcl-2 se encuentra conformada por una familia de genes que codifica numerosos miembros que promueven la vida (bcl-2, bcl-xL, bag y otros) y otros que promueven la muerte (bax, bak, bcl-xs, bad). Estas dos, (Bax y Bak) son las que liberan al citocromo c desencadenando con ello toda la cascada de señalización de la activación de caspasas. Bcl-2 y Bcl-XL, inhiben la apoptosis, bloqueando en parte la liberación de citocromo-C. Estas proteínas se encuentran frecuentemente asociadas en pares, y dependiendo del tipo de pares y de su proporción relativa, la célula puede sobrevivir o morir. Normalmente se encuentran asociadas a diferentes



membranas celulares como retículo endoplásmico, mitocondria y núcleo, siendo capaces de alterar la funcionalidad de las membranas donde se encuentran cambiando el potencial de membrana y facilitando la salida o entrada de iones. En células cancerígenas se observa un aumento de Bcl2 y Bcl-XL.

3.5.3. La molécula p53.

Otra molécula importante en la modulación del proceso apoptótico es el factor de transcripción p53, esta molécula es un potente inductor de apoptosis y en ocasiones las células que presentan mutaciones en el gen que codifica para p53 desencadenan en células cancerosas (Figura 19).

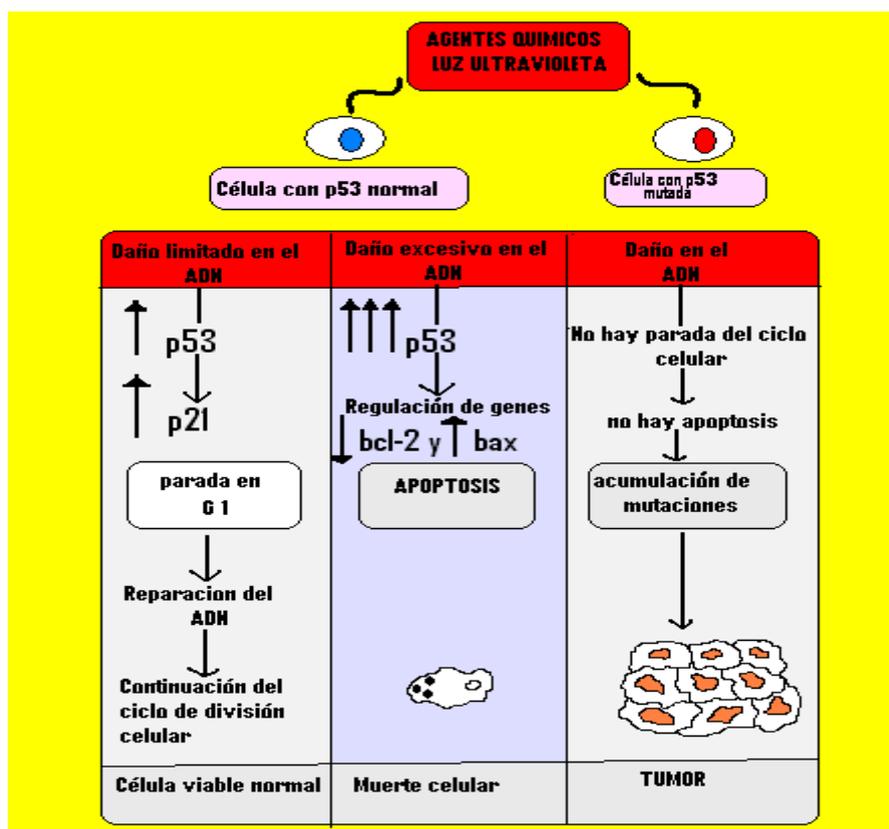


Figura 19. Comparación del daño al ADN efectuado por p53. Los carcinomas más comunes debido a alteraciones de p53 en el ADN son las de hígado, mama, colon, pulmón y osteosarcoma.

Los mecanismos moleculares involucrados inducen no solamente el cese del ciclo celular sino la expresión de diversas proteínas como



Bax, y las proteínas PIG (glicosil-fosfatidilinositol), que podrían estar involucradas con la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (radicales libres) y del nitrógeno. El gen p53, denominado guardián del genoma es capaz de activar una serie de genes transcritos como p21 (inhibidor del ciclo celular en G1) o de llevarlo a un proceso de apoptosis (67).

La vía que se active dependerá de las señales que le lleguen, sean internas o externas.

3.5.4. Inhibidores, IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins).

Aunque las caspasas son una maquinaria perfecta encargada de la ejecución de la muerte celular, existen las proteínas IAPs que se encargan de inhibir el proceso apoptótico y para ello lo logran de dos maneras:

- Se unen a las procaspasas impidiendo su activación.
- Se unen a las caspasas inhibiendo su actividad.

En una célula normal la caspasa inmediatamente es bloqueada por las IAPs, de modo que no puede cortar estructuras celulares y por lo tanto no hay muerte. En una célula envejecida o dañada, las IAP son inmediatamente desaparecidas por lo que las caspasas pueden iniciar la muerte. En la enfermedad del cáncer, las proteínas IAP bloquean a las caspasas y por lo tanto las células cancerosas no pueden morir (68) (69).

3.5.5. Caspasas.

La apoptosis implica una programación genética de la célula, que promueve una cascada dependiente de energía de cambios morfológicos y bioquímicos en el interior de la célula, que conducen



como consecuencia al desensamblaje de la célula, a su muerte y su posterior eliminación. Esta cascada de señalización se encuentra gobernada por un sistema proteolítico que incluye a una familia de proteasas denominadas caspasas.

El nombre de Caspasa, introducido en 1966, comienza con la letra "C" por contener un residuo de cisteína en su centro activo, termina en "asa" por tratarse de una enzima y se intercala "asp" debido a su especificidad en realizar proteólisis tras un residuo aspartato. Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos que se convierten en la forma activa por rotura proteolítica. Una vez activas, las caspasas producen la hidrólisis a partir de residuos de ácido aspártico en la proteína sustrato. Principalmente las caspasas presentan una localización citosólica, aunque se han observado en el interior de mitocondrias, del retículo endoplásmico y en el núcleo (70).

En los mamíferos, la familia de las caspasas está constituida por 14 caspasas y son nombradas por el orden cronológico de su descubrimiento: caspasa-1, caspasa-2, etc. Todas las caspasas presentan características bien definidas:

- Tienen un dominio N-terminal, el cual es muy variable tanto en su secuencia como en su longitud
- La región catalítica está formada por dos dominios, uno grande ("20 KDa) y otro pequeño ("10 KDa), que darán lugar a las dos subunidades de la enzima una vez activada
- Las caspasas se dividen en dos grupos, en caspasas iniciadoras y efectoras, según la longitud de su región reguladora N-terminal o predominio. Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteolisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora (71).



El proceso de activación permite a las caspasas lograr un efecto cascada que se va llevando a cabo desde la señal de inicio, provocando una reacción en cadena que conduce a la activación de otras caspasas y a la muerte de la célula. Por lo tanto, la regulación de la activación de las caspasas es fundamental para determinar la supervivencia o muerte celular (72).

En la interacción existente entre la señal de apoptosis y la puesta en marcha de la cascada de proteólisis mediada por caspasas, es necesario conocer la existencia de una serie de proteínas, los adaptadores. Entre estos adaptadores se encuentran FADD, TRADD y Apaf-1. Para ello posee dos regiones de unión que son las que distinguen a las moléculas adaptadoras. Por una parte, un dominio DD (death domain) por el cual se une a una región homóloga presente en la región intracitoplasmática de CD95, y por la otra, un dominio DED (death effector domain).

La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación organizativa de las células ocurriendo los siguientes sucesos:

- corta el contacto con las células vecinas
- reorganiza el citoesqueleto
- activa las endonucleasas
- apaga la replicación y elimina la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), molécula implicada en la maquinaria celular que repara el daño en el ADN
- participa en la destrucción de la lámina nuclear y de las proteínas del citoesqueleto
- induce a la célula a exhibir señales que las marcan para ser fagocitadas (fosfatidilserina) y desintegrar las células en cuerpos apoptóticos (73).



3.5.5.1. Vías de señalización.

Son dos las principales vías de señalización que conducen a la muerte celular por apoptosis y son extracelulares o vía extrínseca (vía de receptores de muerte) e intercelulares o vía intrínseca (vía mitocondrial). Estas vías de señalización son reguladas principalmente por las familias anteriormente mencionadas.

3.5.5.1.2. Vía intrínseca.

Los mecanismos moleculares que conducen a la apoptosis son una detallada cascada de eventos que suceden desde la superficie celular hasta los cambios finales en el núcleo y que aunque se conocen muchas de las proteínas clave que están reguladas en la muerte celular programada, no todas están todavía completamente esclarecidas (74).

La vía intrínseca requiere la liberación de proteínas mitocondriales tales como el citocromo c y smac/diablo. Durante la apoptosis por la vía intrínseca se observa frecuentemente una parada de la fosforilación oxidativa, y pérdida del potencial transmembrana mitocondrial. Este evento se ha asociado a la apertura del poro de permeabilización. El poro mitocondrial es muy importante ya que participa en la regulación del calcio, pH, volumen mitocondrial, potencial de membrana y además funciona como un canal aniónico.

La apertura del poro genera la salida hacia el citosol de factores apoptóticos como son:

- Salida del citocromo c, el cual desencadena la activación de las caspasas. Se sugiere que la formación y apertura del poro provocaría una despolarización de la mitocondria, seguida de un aumento en el volumen mitocondrial y subsecuente ruptura de la membrana externa permitiendo la salida del citocromo c



- Smac/diablo (Direct IAP Binding protein of Low PI) bloquea la acción de las proteínas inactivadoras de la apoptosis (IAP)
- El factor inductor de la apoptosis (AIF) estimula la apoptosis a nivel nuclear independiente de las caspasas.

El poro mitocondrial es un canal que atraviesa la membrana interna y la externa, entre cuyos componentes se encuentra el ANT (Adenina Nucleotide Translocator, Translocador de ATP/ADP), el VDAC o porina (canal iónico de voltaje-Dependent Anion Channel), el receptor de benzodiazepina, la cinasa, la clorofila D y la hexocinasa II. La alteración mitocondrial activada por estrés puede explicarse por la activación de Bax al inducir la apertura del poro mitocondrial a través de p53. Sin embargo, la liberación del citocromo c puede ser inhibida por Bcl2 (Figura 20).

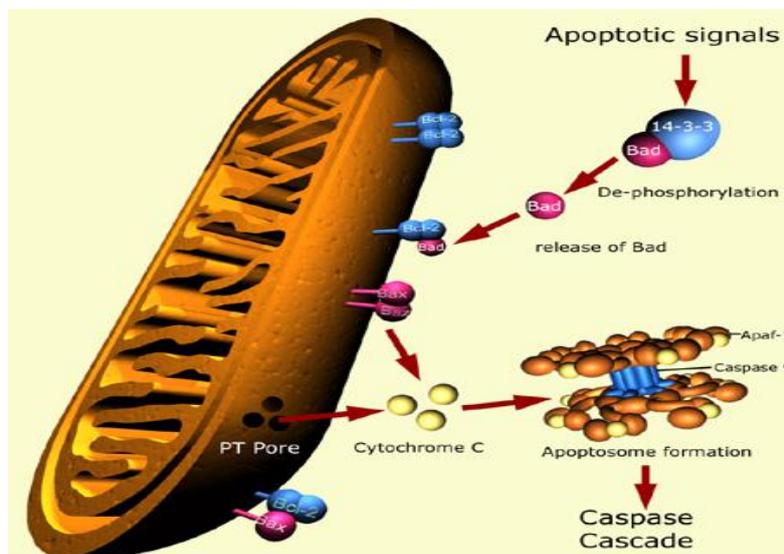


Figura 20. Poro mitocondrial.

En una célula sana la membrana externa de la mitocondria expresa la proteína Bcl-2 en su superficie. Bcl-2 se une a una molécula de proteína denominada Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) y de esta manera Apaf se mantiene en forma inactiva, sin embargo, cualquier alteración del equilibrio interno de la célula, por



ejemplo, la elevación de las especies reactivas de oxígeno, causa que la mitocondria libere al citocromo c.

La salida al citosol del citocromo c es la pieza imprescindible para la formación del apoptosoma, el citocromo c se liga a la proteína citosólica Apaf-1 que estabilizada por su unión a ATP les permite asociarse entre ellas. El resultado es una estructura similar a una rueda que permite reclutar siete moléculas de procaspasa 9 y que al unirse dos apoptosomas provoca la activación de la caspasa (75) (76) (77) (78) (Figura 21).

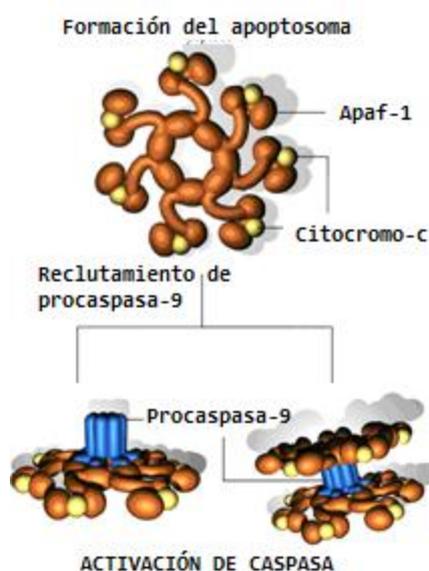


Figura 21. Formación del apoptosoma.

Se sugiere que Apaf-1 es un regulador alostérico de la caspasa 9, ya que uno y otro funcionan como subunidades de una holoenzima. La procaspasa-9 sufre una autoproteólisis, se vuelve activa y a su vez activa a caspasa 3. La activación secuencial de las caspasas crea una cascada de caspasas que conlleva a la digestión de proteínas estructurales en el citoplasma, la degradación del ADN cromosómico y a la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos. En tanto, Smac/diablo segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria, es un inhibidor de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) (79) (80). La permeabilización de la membrana mitocondrial se regula por las



acciones opuestas de los miembros de la familia Bcl-2. Las proteínas proapoptóticas Bcl-2, como Bax y Bak, pueden activarse directamente por interacción con la proteína Bid que posee solo el dominio BH3. Alternativamente, la unión de otras proteínas apoptóticas, como Noxa, Puma, Bad y Bim a las antiapoptóticas Bcl2 y BclXL, origina la inactivación de Bax y Bak. La liberación regulada de factores pro-apoptóticos de la mitocondria causa la inducción de las caspasas iniciadoras y efectoras o ejecutoras y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial (81).

3.5.5.1.3. Vía extrínseca.

La vía extrínseca o también llamada "vía de los receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Los receptores de muerte más conocidos son la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNFR1), ambos son proteínas transmembrana con sus dominios receptores expuestos en la superficie de la célula y que transmiten las señales apoptóticas por medio de un ligando específico llamado FasL y TNF respectivamente. La unión de TNF α al TNRF-1 da lugar a la agrupación de dominios intracelulares. Esto permitirá la unión de una molécula adaptadora denominada TRADD. La unión del ligando a su receptor genera la señal de apoptosis activando directamente a las caspasas (82).

Al unirse el ligando al receptor se producen proteínas adaptadoras que permiten la unión de la procaspasa 8 favoreciendo su activación, esta enzima sufre activación catalítica y se convierte en la caspasa 8 activa. La caspasa 8 es la iniciadora de la cascada de caspasas y puede activar a otras caspasas posteriores como son las caspasas 3, 6 y 7 conduciendo de esta manera a la formación de cuerpos apoptóticos y a la fagocitosis de la célula (83) (84) (Figura 22).

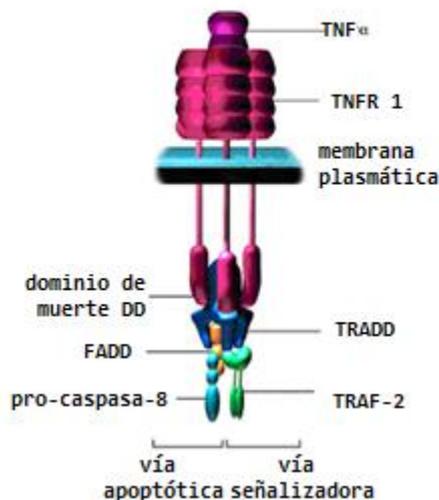


Figura 22. Esquema de un ligando de muerte.

La vía intrínseca y la extrínseca convergen a nivel de la activación de la caspasa-3 mediante p53, aunque en la mayoría de las ocasiones este solapamiento no se presenta y las dos vías operan de manera independiente (85). Tras la activación del receptor Fas por la vía extrínseca, la caspasa-8 puede también activar a un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 denominado Bid y con ello desencadenar la activación de la ruta intrínseca (Figura 23).

Normalmente se encuentra en forma inactiva en el citosol, sin embargo, la ruptura por la caspasa-8 permite a Bid translocarse a la mitocondria, donde altera la membrana y libera el citocromo c al citosol. Esto conduce a la activación de la caspasa-9, amplificando aún más la cascada de apoptosis que se inició por la activación directa de la caspasa-8 mediante los receptores implicados en la muerte celular (86).

Se encuentran otras vías que desencadenan apoptosis como la llamada vía de la ceramida, la cual es la mediadora central de diversas vías apoptóticas y básicamente puede ocurrir por la activación de la síntesis de *novo* o por la activación de la hidrólisis de esfingomielina. Es sabido que tanto la quimioterapia como la radioterapia producen un aumento en los niveles de ceramida que anteceden a la primera manifestación bioquímica de apoptosis (87).



3.6. Enfermedades degenerativas.

La apoptosis tiene una función biológica importante en el desarrollo y la homeostasis de las poblaciones celulares y en la patogénesis y expresión de los procesos de las enfermedades (Tabla 4).

INCREMENTO DE LA APOPTOSIS	INHIBICION DE LA APOPTOSIS
Enfermedades neurodegenerativas	Cáncer
Alzheimer	Leucemias y linfomas
Parkinson	Gliomas y neuroblastomas
Rinitis pigmentosa	Tumores hormona-dependientes
Epilepsia	Enfermedades autoinmunes
Degeneración cerebelosa	Lupus eritematoso
Enfermedades hematológicas	Glomerulonefritis autoinmune
Anemia aplásica	Miastenia gravis
Síndrome mielodisplásico	Enfermedades inflamatorias
Linfocitopenia T CD4+	Asma bronquial
Daño tisular	Inflamación pulmonar
Infarto de miocardio	Infecciones víricas
Accidente cerebrovascular	Adenovirus (E16)
Daño renal tras isquemia	Hérvpesvirus
Riñón poliquístico	Poxvirus
Daño hepático por alcohol	Baculovirus

Tabla 4. Patologías asociadas a alteraciones en el proceso de apoptosis. La apoptosis se ha relacionado con la patogénesis del cáncer ya que las células malignas evaden los mecanismos apoptóticos.

La patogénesis de varias enfermedades humanas muestra que un indicio apoptótico, puede contribuir tanto a notar que existe una enfermedad como a la progresión de ella. Se ha observado que existe una relación directa entre las alteraciones en el equilibrio que existen con los procesos de muerte celular programada y la proliferación celular, dadas por el incremento o por la inhibición de la apoptosis.

Un incremento puede dar lugar a las enfermedades degenerativas y su inhibición a las enfermedades replicativas (como el cáncer) (91).

Un aspecto importante será la respuesta de los tumores a las diferentes terapias antineoplásicas, sean tratamientos con agentes



biológicamente activos, hormonal, radioterapia o quimioterapia, ya que según el tratamiento que se elija podrá ser capaz de desencadenar la apoptosis y/o necrosis en mayor o menor grado.

3.7 Métodos de detección de apoptosis.

La detección de apoptosis se realiza por métodos directos e indirectos, procurando evidenciar los cambios estructurales y funcionales, detectando los fragmentos celulares resultantes, demostrando la presencia de genes relacionados con apoptosis (como bcl-2 y p53), etc.

Métodos para detectar apoptosis:

- Análisis de expresión de genes
- Análisis de expresión de proteínas: receptores de la muerte y ligandos, caspasas (caspasa-3), miembros familia Bcl-2, citocromo c, etc.
- la microscopía óptica y electrónica
- microscopía de fluorescencia
- visualización histoquímica mediante TUNEL (Terminal deoxi-transferase mediated X-dUTP Nick End Labeling)
- demostración de los característicos peldaños que aparecen mediante electroforesis en gel de agarosa
- ELISA (Enzyme Linked immunosorbent assay) que utiliza anticuerpos monoclonales, técnicas inmunocitoquímicas
- y en el estudio particular de nuestra investigación el análisis de células mediante la citometría de flujo con anexina.

3.7.1 Citometría de flujo.

La citometría de flujo CMF es una técnica de análisis que apareció en los años 70 utilizando Neón, Helio y Argón como fuente de luz y



gracias al actual desarrollo tecnológico como son óptica, electrónica, anticuerpos y fluorocromos que acompaña a la citometría de flujo, se ha logrado reducir tanto la complejidad de los instrumentos como una gran expansión en el número y en el rango de aplicaciones, tanto básicas como clínicas.

La citometría de flujo es un método de análisis cuantitativo que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de manera individual al inferir en una fuente de luz. Una de las características analíticas más importantes del citómetro de flujo es la de poder medir múltiples parámetros celulares como son el tamaño de la célula, la complejidad de la membrana celular, relación de parámetros dentro de una población celular, relación de parámetros en células individuales, evolución de parámetros dinámicos, correlación con parámetros determinados con otras técnicas tras separación celular y por supuesto cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo (92) (93) (94) (95) (96).

ANEXO A. Estructura básica de un citómetro de flujo.

3.7.1.2. Kit de anexina V.

Para la cuantificación celular en el citómetro de flujo podemos utilizar el kit de Annexin V: es una proteína que tiene afinidad por aminofosfolípidos como la fosfatidilserina que se encuentra en las membranas de las células apoptóticas. Esta proteína está marcada con Fluoresceína de manera tal que pueda ser cuantificada por un citómetro.

En las células normales la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática es asimétrica, la membrana interna contiene fosfolípidos aniónicos como fosfatidilserina (PS) y la externa



fosfolípidos neutros. Durante las fases iniciales de la apoptosis se producen cambios en la superficie celular.

Uno de éstos es la alteración de la membrana plasmática, donde se produce una translocación de la fosfatidilserina de la cara interna a la cara externa de la membrana. Para detectar la apoptosis se usó el Kit de detección de apoptosis, en el cual la anexina-V esta conjugada con el isotiocianato de fluoresceína (FITC) pudiendo detectar esta fluoresceína en el citómetro de flujo (Figura 24).

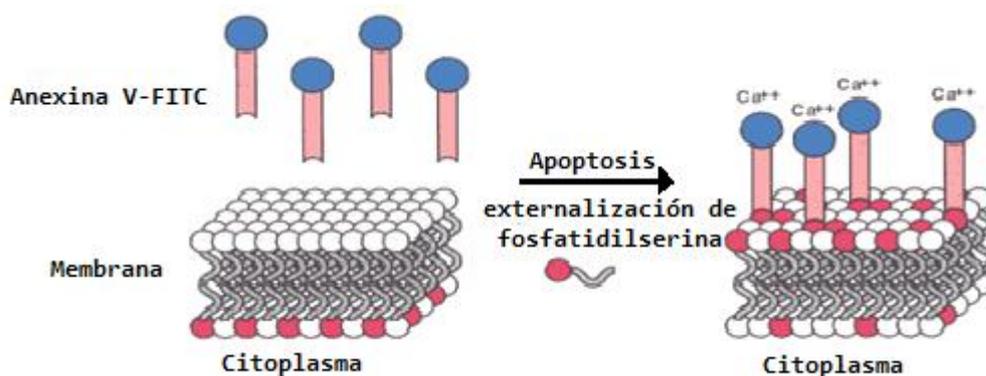


Figura 24. Kit de Anexina V

La Anexina-V es una proteína dependiente de Ca^{2+} que une fosfolípidos cargados negativamente, la cual tiene una gran afinidad de unión a los restos PS. Por lo tanto la anexina puede unirse a los restos PS de las células apoptóticas por estar accesibles a la cara externa de la membrana plasmática. De esta manera se puede discriminar entre células apoptóticas y células normales. Ahora bien la célula necrótica presenta otra serie de cambios anteriormente mencionados, donde la membrana de las células necróticas se permeabiliza, estas pueden unir también anexina, pero para distinguirlas de las apoptóticas se utilizó un colorante de unión a ADN, el Ioduro de propidio (IP). Solo las células con la membrana permeabilizada (necróticas) podrán tomar este fluorocromo. El marcaje simultáneo con yoduro de propidio y el kit de Anexina-V permite discriminar las células apoptóticas de las necróticas, y de las



células viables. Las células viables no presentan translocación de la fosfatidilserina ni ruptura de la membrana plasmática y son dobles negativas para el marcaje. Las células en fases iniciales de la apoptosis son positivas para la Anexina-V y negativas para el yoduro de propidio, ya que tienen translocada la fosfatidilserina pero mantienen la membrana íntegra. Las células necróticas presentan translocación de la fosfatidilserina y rotura de la membrana y, por lo tanto, son doble positivas para el marcaje (Figura 25).

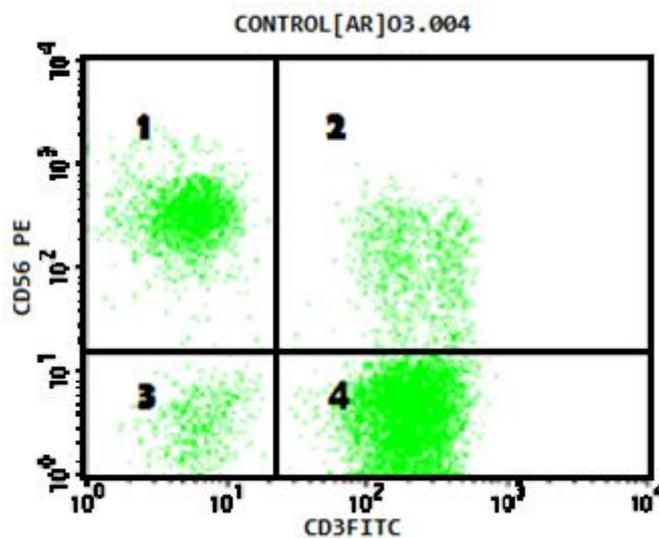


Figura 25. Representación de análisis por citometría de flujo con células marcadas con IP y anexina V. 1. Región donde se exhiben las células positivas al IP. 2. Región de células positivas a ambas fluorescencias (IP y anexina). 3. Células sin marcaje. 4. Células positivas a anexina.

Así, si se pega la Anexina a la fosfatidilserina y no se tiñe con yoduro de propidio será debido a apoptosis, y si se tiñe será debido a necrosis. Una fluorescencia emitida en el citómetro de flujo corresponderá a apoptosis, y dos fluorescencias emitidas corresponderán a necrosis (Tabla 5).

	VIABLES	APOPTÓTICAS	NECRÓTICAS
Tinción con Anexina-V	-	+	+
Tinción con yoduro de propidio	-	-	+

Tabla 5. Patrón de tinción de las células viables, apoptóticas y necróticas, teñidas con yoduro de propidio y anexina-V. (+)= Positivas. (-)= Negativas



De esta manera distinguimos:

Células viables: no unen anexina y excluyen IP

Células en apoptosis temprana: unen anexina y excluyen IP

Células en apoptosis tardía: unen anexina e incorporan IP

Células necróticas: Unen anexina e incorporan IP, o sólo incorporan IP. De esta forma el histograma que se obtiene se puede dividir en cuatro cuadrantes.

3.8. Electroforesis en gel de agarosa.

Existen muchos mecanismos utilizados en el proceso de purificación del ADN dentro de los cuales se encuentra la electroforesis en gel de agarosa, que es una de las técnicas más empleadas en biología molecular y celular.

La electroforesis en gel de agarosa es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada, con la finalidad de separar biomoléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa. Fue empleado por primera vez en el año 1937, pero su importancia vino a incrementarse cuando en los años cincuenta E. L. Durrum y Arne W.K. Tiselius, impulsaron la electroforesis de zona, nombre que se asignó a la separación de materiales en un campo eléctrico en presencia de algún tipo de soporte; aunque este término se limitó originalmente al análisis de coloides y partículas submicroscópicas (97).

Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. Es importante la utilización de marcadores de tamaño



conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN problema. En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta, logrando con ello que se vean las bandas correspondientes a las muestras de ADN aplicado y los marcadores de peso molecular, donde la separación mostrará distintas bandas correspondientes a cada componente de la mezcla (98).

3.9. Modelos *in vitro*.

Los estudios que son realizados con células de mamíferos han logrado demostrar la gran funcionalidad que presentan para lograr avances significativos en evaluaciones genotóxicas y aún que las líneas celulares puedan carecer, por ejemplo, de una real interacción entre epitelio, estroma y matriz, respuesta inmune del huésped, así como de diferir del tumor que les dio origen, presentan una excelente manipulación, homogeneidad y reproducibilidad para lograr ser útiles herramientas en investigaciones.

HeLa es una de las líneas celulares usadas para investigación y es considerada como la primera línea de células inmortales humanas.

Esta línea se obtuvo de la American Tissue Culture Collection (ATCC). Originada en una biopsia de cáncer cérvico-uterino en una mujer de raza negra, esta línea celular tiene aproximadamente 60 años desde que el doctor George Otto Gey consiguió aislar las células en cultivo por primera vez; se dividen en 24 horas y son capaces de multiplicarse muy rápidamente presentando resistencia a apoptosis.

3.10. Fase preclínica de fármacos.

El desarrollo de un fármaco comprende desde la síntesis, la obtención biotecnológica y por supuesto toda la fase preclínica, incluida la



toxicología; de manera tal que se asegure que el compuesto es aceptable en cuanto a eficacia y seguridad para su ensayo en el organismo.

Durante el estudio preclínico, se evalúan los efectos tóxicos y farmacológicos del fármaco a través de pruebas in vitro e in vivo en animales de laboratorio, deben realizarse ensayos de genotoxicidad y absorción del fármaco.

Uno de los objetivos de desarrollar nuevos fármacos es el de proponer nuevos medicamentos con mejor biodisponibilidad, menor toxicidad y menores reacciones secundarias para el organismo (Figura 26).

Desarrollo de fármacos:

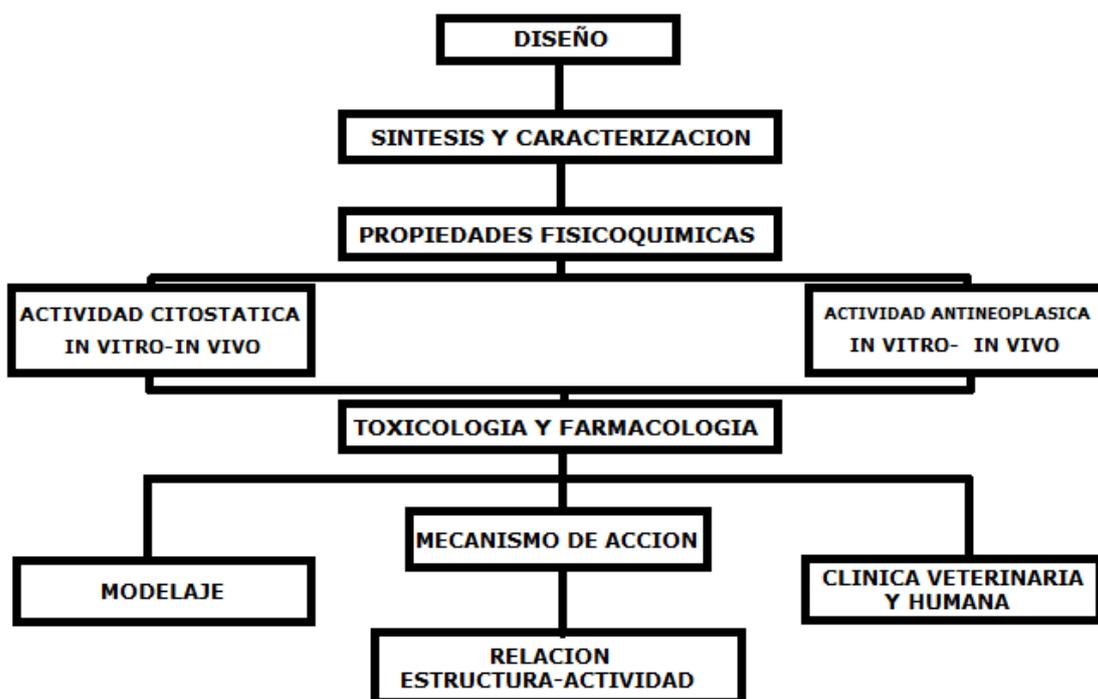


FIGURA 26. Diseño de fármacos.

3.11. JUSTIFICACIÓN.

Entre los tumores neoplásicos, figuran en un lugar destacado por su frecuencia de incidencia en la población mexicana los del cáncer



cérvico-uterino. La quimioterapia ha sido una de las armas más relevantes en el tratamiento de dicha neoplasia, aún a pesar del conocimiento de los efectos nocivos causados, que son más acentuados normalmente cuanto mayor es la dosis administrada, estos efectos pueden llegar a ser tan fuertes que pueden obligar a la interrupción del tratamiento.

En estudios previos se ha adquirido el conocimiento de que algunas Casiopeínas[®] han mostrado actividad antitumoral sobre líneas celulares tumorales, sin embargo, poco se ha estudiado en lo referente a nivel celular en cuanto a apoptosis se refiere, por lo que realizar estudios sobre el porcentaje de suicidio celular que pudieran llegar a inducir las Casiopeínas[®] sobre células neoplásicas, representa gran relevancia para evaluar la eficacia con la que las Casiopeínas[®] pudieran llegar a eliminar un porcentaje de células cancerígenas de la manera en que de forma natural, lo hace el ser humano dentro de su homeostasis regular.

Así mismo, anteriormente las Casiopeínas[®] sólo han sido evaluadas en comparación con el CDDP (II), principalmente, a la relevancia que presenta este fármaco en cuanto a la función antineoplásica que ofrece y a la similitud en estructura que comparten los dos compuestos (cuadrada plana). Sin embargo no se ha utilizado a otro fármaco antineoplásico para evaluar a las casiopeínas, es por ésta razón que se decidió utilizar a otro fármaco conocido comercialmente como es el caso de Busulfán[®], agente alquilante usado principalmente en leucemia crónica mielógena.

La apoptosis es posible evaluarla debido a que durante este suceso la membrana plasmática sufre un cambio que es posible detectarlo a través de la Citometría de flujo y a su vez mediante esta técnica, cuantificar las células apoptóticas y diferenciarlas con las que puedan deberse a necrosis.

Una de las vías importantes a investigar es el porcentaje de inducción de apoptosis que los Casiopeínas[®] podrían llevar a cabo o no, así



como conocer si el cambio del sustituyente en las cinco diferentes Casiopeínas[®] reflejan importancia o presentan cambios significativos dentro del proceso apoptótico de estos fármacos sobre la línea de cáncer cérvico-uterino. Con base a esto en el presente trabajo se evaluaron cinco diferentes Casiopeínas[®], sobre la línea celular de cáncer cérvico-uterino con el fin de conocer la capacidad de inducir apoptosis en menor o mayor grado que el fármaco de referencia Busulfán[®].

Para la determinación de la apoptosis se eligió la asimetría de la membrana celular, ya que la pérdida de la asimetría de la membrana es considerada como un suceso que se presenta en un proceso apoptótico. Para su determinación se eligió a la Citometría de flujo, debido a que es una técnica que nos permite determinar y cuantificar las células apoptóticas, así como también las células que a diferencia de la apoptosis puedan deberse a necrosis.

Es por esta razón que uno de los intereses de este trabajo es saber si las Casiopeínas[®], compuestos que en estudios previos han mostrado actividad antitumoral sobre líneas tumorales como son HeLa, SiHa, CaLo, serán capaces de inducir apoptosis.

**CAPITULO 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.****4.1. Material, equipo, reactivos y soluciones.**

Agua estéril

Balanza analítica

Busulfán®

Bomba de vacío

Botellas de cultivo (25cm²)

Campana de Flujo laminar clase II

Centrífuga clínica de 1000 a 2500 rpm Solbal

Filtros estériles de 0.22 µL

Incubadora de CO₂ Labline

Línea tumoral HeLa

Microscopio óptico Olympus

Micropipetas automáticas y puntas estériles para las mismas

Pipeta automática de 2 a 10 µL

Pipeta automática de 10a 100 µL

Pipeta automática de 100 a 1000 µL

Portaobjetos

Tanque de nitrógeno líquido

Termómetro de -20 a 100°C

Tubos cónicos estériles de propileno de 15 mL

Tubos Eppendorf

Tubos para centrifuga

Ultracongelador Revco (-70°C)

Soluciones:

Acido acético al 1%

Antibiótico y antimicótico: 10,000 unidades/mL de penicilina G sódica

10,000 µg/mL de sulfato de estreptomicina b en solución salina al



0.85%

Azul tripano al 0.4%

Medio de cultivo (D-MEM, Dulbecco 's Modified Eagle Media)

Medio de cultivo RPMI-1640 suplementado

Suero Fetal Bovino (GIBCO 20%v/v)

Sulforrodamina B al 10%

Tripsina (Eagles 10%v/v)

Electroforesis en gel de agarosa:

Agarosa (Boehringer Mannheim)

Bromuro de etidio (10 mg/mL). (iiiiMUY PELIGROSO, USAR GUANTES!!!!).

Citometría de flujo:

Componentes del kit Anexina-V-FLUOS

Equipo de electroforesis (cubeta, soporte, peine, fuente de alimentación)

Micropipetas automáticas y puntas desechables para las mismas.

Marcadores de peso molecular.

Soluciones y Materiales para electroforesis:

10x TBE: 0.89 M Tris-borato, 0.02M EDTA (pH 8.0).

Solución Anexina-V-Fluoresceína.

Solución yoduro de propidio.

Tampón Hepes (Amortiguador).

Transiluminador de luz UV.



4.2. Síntesis de Casiopeínas[®].

Síntesis y caracterización. Se sintetizaron cinco compuestos de coordinación de cobre de acuerdo a lo reportado en las patentes (99) (100). Fueron sintetizadas a partir de nitrato de cobre (II), el ligante cargado acetilacetato y de la diimina correspondiente mezclándolas en cantidades estequiométricas (1:1:1) en una mezcla de etanol-agua (1-1). Se ajustó el PH con solución acuosa de amoníaco y se precipitó el producto por evaporación parcial de disolventes. Finalmente se recristalizó en agua caliente para su purificación.

Las Casiopeínas[®] se caracterizaron por análisis elemental y por espectroscopía de infrarrojo con ayuda del Espectrofotómetro FT-IR Nicolet Avantar 320 (4000-400 cm⁻¹) y el Espectrofotómetro IR Bruker Vector 22 (800-200 cm⁻¹).

Debido a que se han sintetizado alrededor de 100 compuestos ha sido necesario organizar a las Casiopeínas[®] mediante familias. En la siguiente tabla se muestran las claves asignadas a los compuestos en base a su fórmula (Tabla 6).

CLAVE	FÓRMULA CONDENSADA
1)III-Ha	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO ₃
2)III-Ea	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO ₃
3)VIacac	[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO ₃
4)III-ia	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO ₃
5)III-5a NO _{2a}	[Cu(5-NO ₂ -1,10 fenantrolina)(acetilacetato)]NO ₃

Tabla 6. Claves de las Casiopeínas[®] empleadas.



4.2.1. Análisis Elemental.

Para el análisis elemental se necesitó una muestra de 1 mg del compuesto sintetizado y se realizó el análisis en el equipo R-126 Fette mediante una curva patrón de sulfacetamida.

4.2.2. Espectroscopía de Infrarrojo.

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron usando la técnica de pastilla de KBr (Bromuro de potasio). Aproximadamente se muelen 70 mg de KBr anhidro en un mortero de ágata. Después se añade 1 mg de compuesto y se muele hasta obtener un sólido muy fino. El sólido se prensa en la pastilladora por cinco minutos. Al terminar se obtiene el espectro de infrarrojo.

4.3. Técnicas de cultivo celular.

Para proceder al descongelamiento de las células HeLa, se mantuvo la campana de flujo laminar estabilizada y encendida previamente 15 minutos antes de iniciar la sesión de trabajo. Las células se encontraban originalmente en criotubos que se sacaban del tanque con nitrógeno líquido a (-70°C) y se introducían en un baño de agua previamente calentado a 37°C. En la campana de flujo laminar se preparó un tubo cónico falcon con 10 mL de medio de cultivo D-MEM para diluir el crioespesor y en cuanto se observó el descongelamiento, la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, el sobrenadante se desechó y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL mezclando homogéneamente el paquete celular. Al finalizar, la suspensión celular obtenida se utilizó para la siembra en las cajas de cultivo. El medio de cultivo se encontraba suplementado con suero fetal bovino al 10%, aminoácidos, antibióticos y antifúngicos.



Observaciones: Cada vez que se descongelaban las células se dividían en dos frascos, uno para la realización de los experimentos y otro para volver a congelar. De esta manera nos asegurábamos que todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo permanecieran disponibles en el laboratorio, para trabajos posteriores. El DMSO es un anticongelante que impide la formación de cristales de agua en el interior de las células, manteniendo la integridad celular.

Al término, se realizó la viabilidad y el conteo de células.

4.3.1. Cuantificación de células.

Por separado en un tubo de microfuga de 1.5 mL se colocaron 20 μ L de la suspensión celular y 80 μ L de azul tripano, se mezcló perfectamente y se transfirieron cuidadosamente a las dos secciones de la cámara de Neubauer. Se colocó el hematocitómetro en el microscopio óptico utilizando el objetivo a 10x. Posteriormente se procedió a contar el número de células teñidas y no teñidas por mm^2 , para que el conteo sea más preciso se recomienda que el conteo sea entre 100 y 500 células por mm^2 , la cuenta se repitió en las otras secciones y posteriormente se hicieron los cálculos correspondientes a la viabilidad y al número de células por mL de suspensión.

$$C = \tilde{N} * FD * 10^4$$

Donde

C= Células por mililitro

\tilde{N} = Promedio de células contadas

10^4 =Factor de conversión de la cámara

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{(\text{Toc} - \text{Teñ})}{\text{Toc}} * 100$$

Dónde:

Toc=Total de células contadas y **Teñ**= Células teñidas



CONTEO DE CELULAS HeLa= C1, C2, C3, C4

	VIVAS		MUERTAS		
C1	172		26		
C2	201		35		
C3	80		36		
C4	224		39		
SUMA	677	+	136	=813	TOTALES

$$\text{VIVAS/TOTALES} \times 100 = 83.27\% \text{ de viabilidad}$$

Conteo de número de células:

Vivas $677/4 \times 5 \times 10,000 = 8,462,500$ número de células totales en el vial de HeLa descongelado.

Al conocer el número de células con las que cuento, se dividieron entre el número de cajas que se quiere proliferar y el resto fué congelado y guardado en el banco de células. En cada caja se colocaron 200,000 células para la siembra.

Se necesitaron 5 cajas de 25 cm² con 1,000,000 de células HeLa para sembrar.

8,462,500 células de HeLa -1,000,000 células que se utilizaron para sembrar = 7,462,500 células que se congelaron y guardaron en el banco de células HeLa.

$$\begin{array}{r} \text{En } 980 \mu\text{L} \text{ ----- } 8,462,500 \text{ células Hela} \\ \times \quad \text{-----} 200,000 \text{ células} \end{array}$$

X=23.16 μL de células HeLa por caja

$$23.16 \times 5 \text{ cajas} = 115.8 \mu\text{L}$$

980 μL -115.8 μL = 864,2 μL para congelar

$$864,2 \mu\text{L} / 3 = 288 \mu\text{L}$$

7, 462,500 de células HeLa/3 viales de 1 mL para congelar = 2487500 células HeLa en 288 μL de solución. Cada uno de los 3 viales para congelar tiene 288 μL células HeLa+ 612 μL de SFB + 100 μL de DMSO= 1mL.

Observaciones: Las células a congelar deben guardarse dentro de un criotubo en el congelador hasta el momento de su descongelación



y así mismo debe etiquetarse con el número de células contenidas. Cada vez que se congela un stock celular se anota en el criotubo el número exacto de pases de la línea celular. El número de pases indica cuántas veces se ha subcultivado la línea celular. Es importante trabajar con células que tengan pocos pases porque las líneas celulares establecidas tienden a ser inestables, de manera que algunas características fisiológicas y morfológicas del cultivo pueden cambiar con el tiempo.

Posteriormente se procede a la siembra en cajas de cultivo triangulares de 25 cm².

Las 200,000 células HeLa que se sembraron en las cinco diferentes cajas de células HeLa se les deja en continuo monitoreo hasta llegar a un 80% de confluencia.

Se realiza por duplicado para las cinco diferentes Casiopeínas[®].

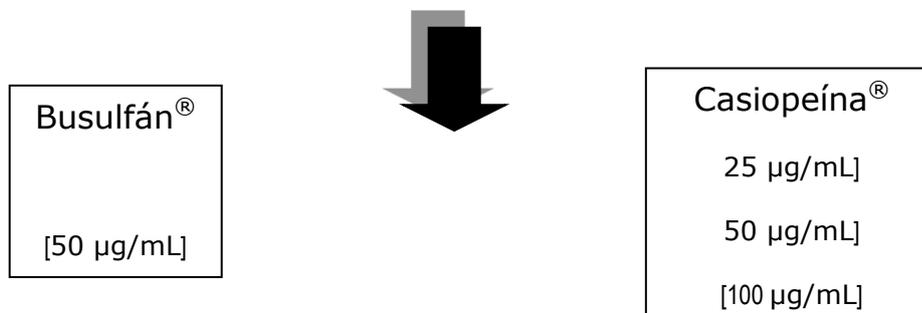
4.3.2. Obtención del cultivo a confluencia.

Las 200,000 células después de haber sido lavadas son colocadas en cajas de cultivo triangulares 25 cm², con 5 mL de medio de cultivo adicionado en 10% de suero fetal bovino (SFB), (4.5 mL de medio D-MEM y 0.5 mL de SFB), este cultivo se incubó a 37° C ± 2°C y 5% de CO₂. Fue revisado diariamente el cultivo para estimar el porcentaje de confluencia cambiándose el medio de cultivo cada 48 horas. Al tener el cultivo entre el 70 y el 90% de confluencia se procedió a la aplicación del fármaco.

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

SIEMBRA EN LAS CAJAS DE CULTIVO DE 25 cm²

Para realizar la siembra de los fármacos se empleó a Busulfán[®] y a las cinco diferentes Casiopeínas[®] en las concentraciones siguientes:



Las concentraciones de los fármacos se adicionan a las cajas de cultivo conteniendo células HeLa.

- C₁) HeLa
 - C₂) HeLa + Casiopeína[®] [100 µg/mL]
 - C₃) HeLa + Casiopeína[®] [50 µg/mL]
 - C₄) HeLa + Casiopeína[®] [25 µg/mL]
 - C₅) HeLa + Busulfán[®] [50 µg/mL]
- C= Caja de cultivo

Lo anteriormente mencionado se realizó para cada una de las 5 diferentes Casiopeínas[®] por duplicado.

Las cajas son mantenidas en la incubadora durante 24 horas. Al día siguiente se cambió el medio PBS estéril a la misma hora y se llevaron las cinco diferentes cajas a la tripsinización en la UAM-IZTAPALAPA para su análisis en el citómetro de flujo.

4.4. Citometría de flujo.

MARCAJE CON PI

4.4.1. Preparación de PI (yoduro de propidio).



El protocolo pide utilizar el PI en una concentración de 50 µg/mL.

Para preparar la solución hay que utilizar guantes para manejar al PI.

Se toma cierta cantidad de PI =0.0003 mg y se realizan los cálculos para obtener una concentración de 50 µg/mL.

4.4.2. Kit de marcaje.

1.- Anexina + Amortiguador Hepes (2 µL de anexina)

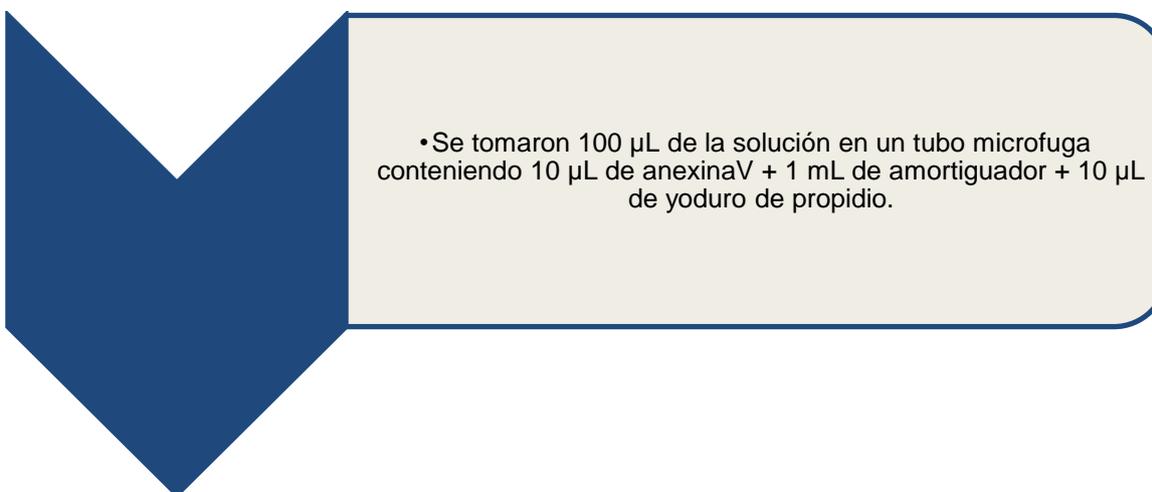
2.- PI + Amortiguador Hepes (10 µL de PI [50 µg] por cada 100 µL de Amortiguador Hepes)

3.- Anexina + PI + Amortiguador Hepes (10 µL de Anexina + 500 µL de Amortiguador Hepes)+ 10 µL de PI.

Se realizó el tratamiento para cada una de las 5 cajas de cultivo por duplicado.



Se continuó con el protocolo de Anexin V.





A la muestra 1 se agregó amortiguador, muestra 2 se agregó 10 µL PI [50 µg/mL], muestra 3 sólo agregamos 10 µL de anexina y a la muestra 4, 5, 6, 7, 8 se agregó 10 µL Anexina + 10 µL de PI [50 µg/mL]+amortiguador.

Se incubó por 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y al término se colocaron 500 µL de Hepes.

4.4.3. Tratamientos.

Las células resuspendidas en la solución de IP [50 µg/mL] y Anexina [50 µg/mL] se procesaron con 8 tratamientos diferentes:

PI=yoduro de propidio

1.Células HeLa sin tratamiento	--	--
2.Células HeLa	+	PI
3.Células HeLa	+	Anexina
4.Células HeLa	+	PI +Anexina
5.Células HeLa con Casiopeína [®] 25 µg/mL	+	PI +Anexina
6.Células HeLa con Casiopeína [®] 50 µg/mL	+	PI + Anexina
7.Células HeLa con Casiopeína [®] 100 µg/mL	+	PI + Anexina
8.Células HeLa con Busulfán [®] 50 µg/mL	+	PI + Anexina

Posteriormente las muestras se introdujeron una por una en el citómetro de flujo a 488 nm de excitación y un filtro de 560 nm para la detección del PI, logrando con ello la obtención de un histograma donde fue registrado en cantidad de porcentaje a las células apoptóticas, vivas y necróticas. La parte experimental en el citómetro de flujo finalizó con un total de 62 resultados, los cuales fueron analizados estadísticamente en un programa específico llamado WinMDI donde se pudo determinar en base a los resultados el



comportamiento celular de las cinco diferentes Casiopeínas[®] en comparación con Busulfán[®].

ANEXO B. Ejemplo de los 62 histogramas obtenidos en el citómetro de flujo.

4.5. Electroforesis en gel de agarosa.

Se escogió a las Casiopeínas[®] VIacac y III-ia para realizar la electroforesis debido a que los datos obtenidos en el citómetro de flujo demostraron que estas dos al ser aplicadas sobre las células HeLa presentan un mayor porcentaje.

Mediante esta técnica de análisis se comparó la apoptosis de las Casiopeínas[®] con Busulfán[®] sobre las células HeLa.

Se realizó la extracción de ADN genómico con ADNzol[®] (101).

A cada paquete celular se adicionaron 300 μ L de ADNzol[®], se lisaron las células por pipeteo suavemente y se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugo por 10 minutos a 100,00g y se transfirió el sobrenadante viscoso a un tubo donde se precipitó el ADN con 0.5 mL de EtOH al 100% y 1 μ L de glicógeno con el fin de aumentar la eficiencia del precipitado de ADN de bajo peso molecular. Se procedió a realizar la electroforesis en gel y se corrió en el gel de agarosa en los pocillos colocando nuestro basal Busulfán[®] y las 2 Casiopeínas anteriormente mencionadas. Se selló con cinta adhesiva el soporte donde se vertió el gel de agarosa y se colocó el peine que sirvió para formar los pocillos del gel. Una vez que la solución de agarosa alcanzó los 50°C, se le añadieron 2 μ L de bromuro de etidio (10 mg/mL) y se procedió a mezclar. **iiiPONER GUANTES!!!**

Se vertió la solución de agarosa con bromuro de etidio en el soporte, previamente sellado y se dejó polimerizar durante unos 30 minutos.



Se aplicaron 10 μ L de la muestra previamente preparada en los pocillos y 10 μ L de marcadores de peso molecular de 100 pb.

Se tapó la cámara de electroforesis y se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación. Se programó la fuente a unos 100 voltios y se comenzó a correr la electroforesis que duró unos 30-45 minutos.

Una vez acabada la electroforesis se visualizaron los fragmentos de ADN mediante luz UV y se realizó una fotografía de la imagen. La corrida se realizó por triplicado.



CAPITULO 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

5.1. Espectroscopía de Infrarrojo.

	COMPUESTO SINTETIZADO	BANDAS PRESENTES EN EL ESPECTRO DE IR
III-Ha	[Cu(4,7difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO ₃	C=O 1520 cm ⁻¹ (acac) C=C 1520 cm ⁻¹ aromáticos (fenantrolina) NO ₃ ⁻ 1385 cm ⁻¹
III-E-a	[Cu(4,7 dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO ₃	C=O 1577 cm ⁻¹ (acac) C=C 1520 cm ⁻¹ aromáticos (fenantrolina) NO ₃ ⁻ 1375 cm ⁻¹ C-H 869 cm ⁻¹ CH ₃ 3051 cm ⁻¹
Vlacac	[Cu(5,6 dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO ₃	C=O 1520 cm ⁻¹ (glicina) C=C 1520 cm ⁻¹ aromáticos (fenantrolina) NO ₃ ⁻ 1385 cm ⁻¹
III-ia	[Cu(4,4 dimeti-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO ₃	C=O 1568 cm ⁻¹ (acac) C=C 1520 cm ⁻¹ aromáticos (fenantrolina) NO ₃ ⁻ 1380 cm ⁻¹ CH ₃ 3071 cm ⁻¹
III-5a NO ₂ a	[Cu(5,NO ₂ -1,10 fenantrolina)(acetilacetonato)]NO ₃	C=O 1565 cm ⁻¹ (acac) C=C 1520 cm ⁻¹ aromáticos (fenantrolina) NO ₃ ⁻ 1372 cm ⁻¹ CH ₃ 3051 cm ⁻¹

Tabla 7. Bandas presentes en el espectro de infrarrojo.

5.1.2. Análisis elemental.

Los porcentajes que a continuación se enlistan para C, H, N, no difieren significativamente de los calculados teóricamente, comprobando con ello la obtención del compuesto deseado (Tabla 8).



	Compuesto sintetizado	Análisis elemental	% teórico	Fórmula mínima	PM(g/mol)
III-Ha	Cu(4,7 difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)NO ₃	%N 9.11 %C 50.3 %H 3.89	%N 9.36 %C 50.9 %H 4.27	CuC ₃₀ N ₃ O ₅ H ₂₅ .H ₂ O	588.51
III-E-a	[Cu(4,7dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)NO ₃	%N 9.32 %C 49.92 %H 4.49	%N 9.32 %C 50.61 %H 4.69	CuC ₁₉ N ₃ O ₅ H ₁₉ .H ₂ O	450.9
Vlacac	[Cu(5,6 dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)NO ₃	%N 9.16 %C 50.10 %H 4.78	%N 9.23 %C 50.75 %H 4.56	CuC ₁₉ N ₃ O ₅ H ₁₉ .H ₂ O	470.98
III-ia	[Cu(4,4dimeti-2,2'-bipyridina)(acetilacetato)NO ₃	%N 9.41 %C 46.36 %H 3.23	%N 9.46 %C 47.30 %H 3.43	CuC ₁₆ N ₃ O ₃ H ₁₉ .H ₂ O	382.76
III-5a NO ₂ a	[Cu(5,NO ₂ -1,10-fenantrolina)(acetilacetato)NO ₃	%N 10.4 %C 42.23 %H 3.23	%N 10.6 %C 43.42 %H 3.53	CuC ₁₈ N ₄ O ₆ H ₁₉ .H ₂ O	400.97

Tabla 8. Resultados de análisis elemental. Fórmulas mínimas y pesos moleculares.

Mediante la caracterización por medio de la espectroscopía de infrarrojo y su análisis elemental de los cinco compuestos (Casiopeínas[®]), se comprobó, que el compuesto se encuentra puro y se pudo continuar con las pruebas de evaluación de apoptosis sobre la línea celular HeLa.

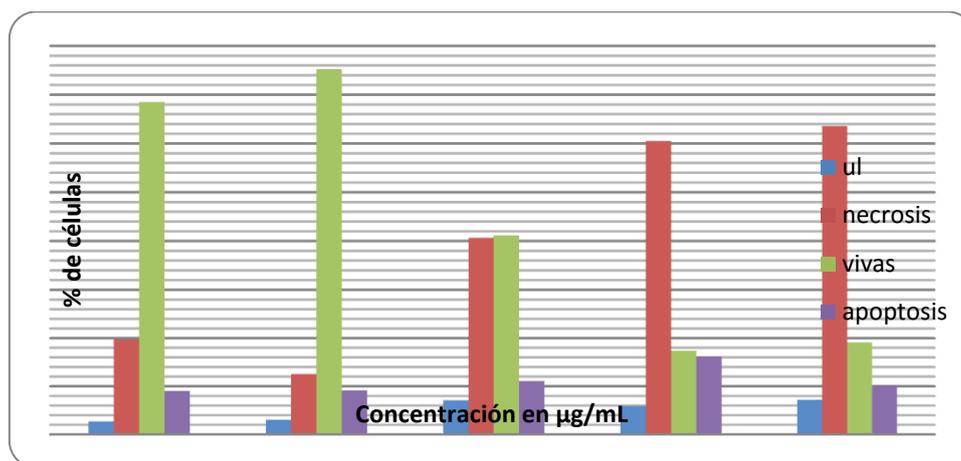
5.1.3. Citometría de flujo.

La señal de FITC se detectó a 518 nm y el log de esta fluorescencia se representó en el eje X. La señal de IP se detectó a 620 nm y el log de esta se representó en el eje Y.

Los datos obtenidos por citometría de flujo se muestran a continuación.



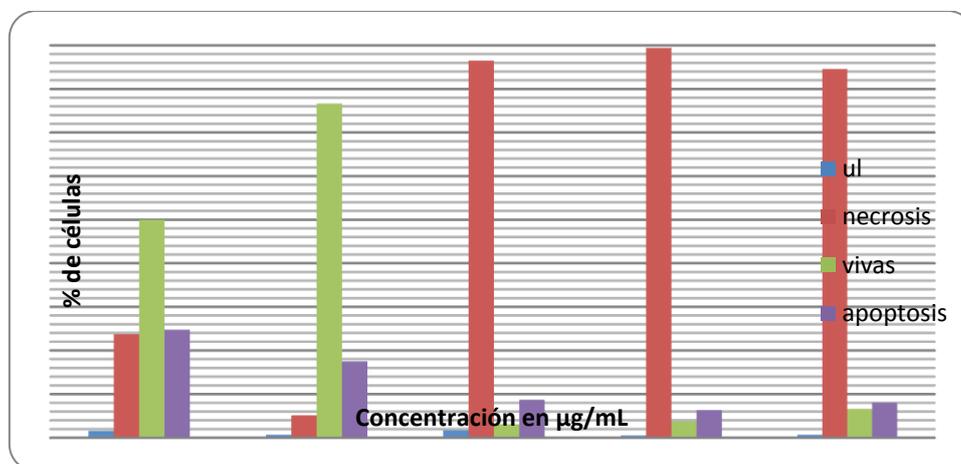
Resultado 1. Casiopeína® III-Ha:



	Basal	Busulfán	Cas [25 µg/mL]	Cas [50 µg/mL]	Cas [100 µg/mL]
µL	2.71	3.07	7.08	5.90	7.17
Necrosis	19.74	12.54	40.68	60.54	63.58
Vivas	68.51	75.24	41.18	17.37	19.15
Apoptosis	9.05	9.15	11.07	16.20	10.11

Figura 27. Cuantificación de células apoptóticas y necróticas medidas por Kit de anexina V, con Busulfán® y Casiopeína® [Cu(4,7difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ sobre células HeLa.

Resultado 2. Casiopeína® III-E-a:

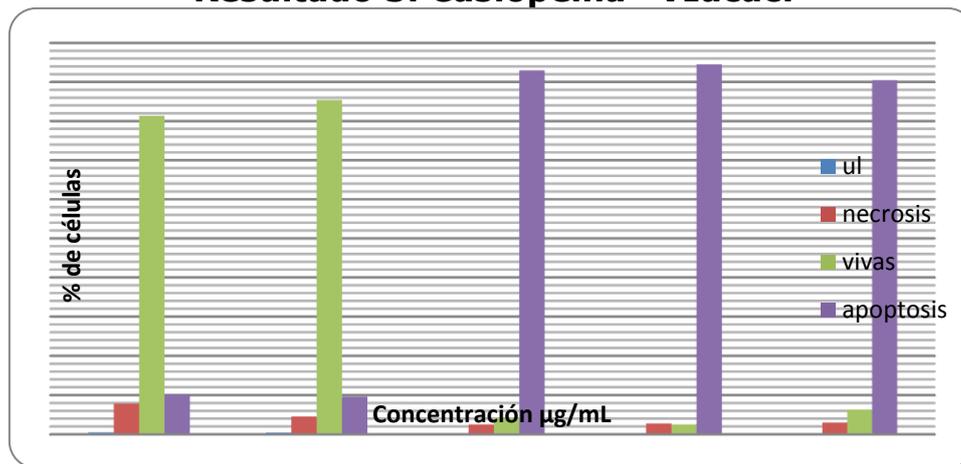


	Basal	Busulfán	Cas [25 µg/mL]	Cas [50 µg/mL]	Cas [100 µg/mL]
µL	1.59	0.69	1.67	0.53	0.68
Necrosis	23.72	5.14	86.51	89.42	84.61
Vivas	49.97	76.66	3.11	3.71	6.65
Apoptosis	24.73	17.53	8.72	6.35	8.07

Figura 28. Cuantificación de células apoptóticas y necróticas medidas por Kit de anexina V, con Busulfán® y Cas [Cu(4,7dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ sobre células HeLa.



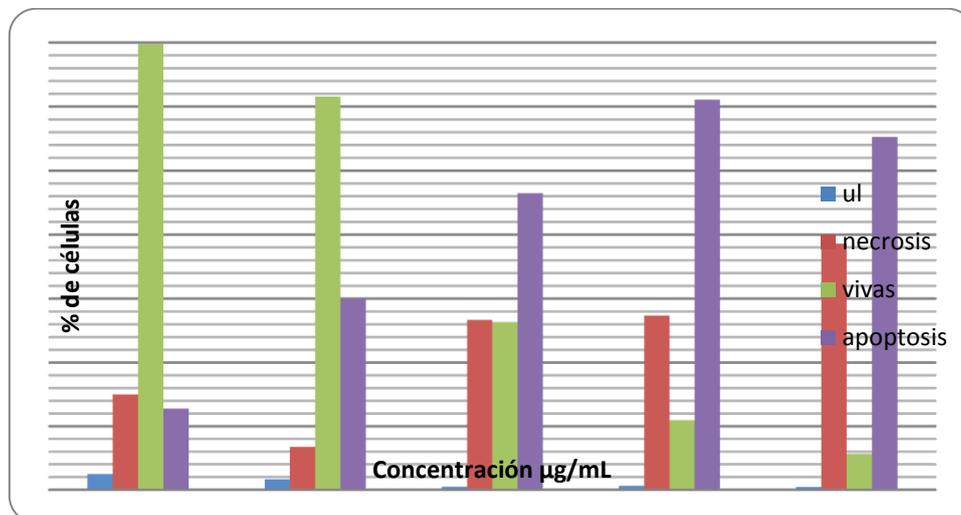
Resultado 3. Casiopeína® VIacac:



	Basal	Busulfán	Cas [25 µg/mL]	Cas[50 µg/mL]	Cas[100 µg/mL]
µL	0.54	0.46	0.25	0.16	0.13
Necrosis	7.85	4.54	2.56	2.79	3.04
Vivas	81.38	85.39	4.18	2.53	6.34
Apoptosis	10.24	9.63	93.02	94.53	90.50

Figura 29. Cuantificación de células apoptóticas y necróticas medidas por Kit de anexina V, con Busulfán® y Cas [Cu(5,6dimetilfenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ sobre células HeLa.

Resultado 4. Casiopeína® III-ia

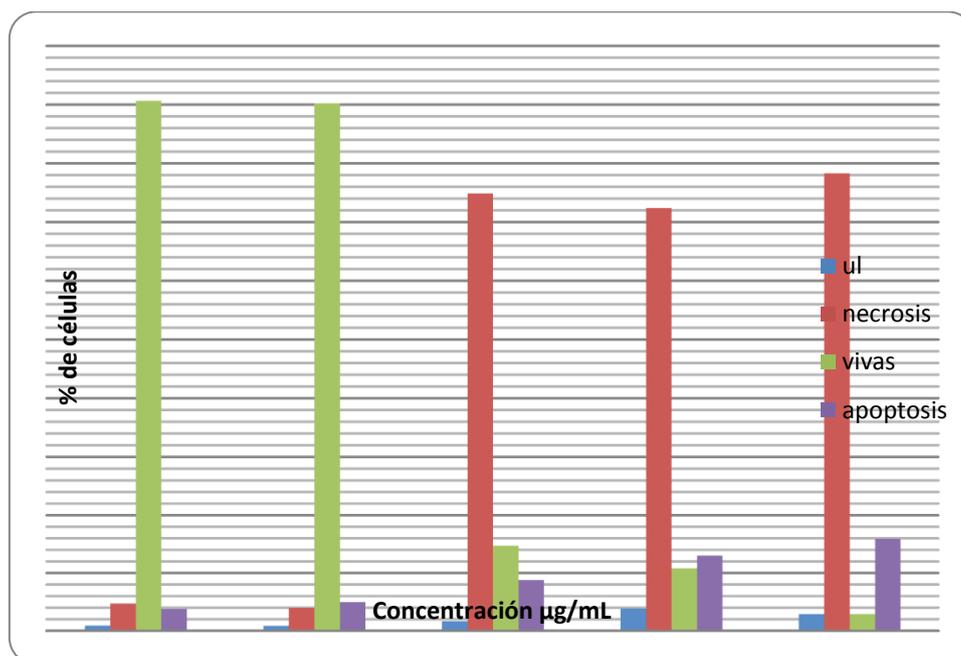


	Basal	Busulfán	Cas [25 µg/mL]	Cas[50 µg/mL]	Cas[100 µg/mL]
µL	2.49	1.64	0.49	0.62	0.46
Necrosis	15.00	6.77	26.69	27.35	38.60
Vivas	69.75	61.59	26.36	10.96	5.65
Apoptosis	12.76	30.00	46.47	61.07	55.28

Figura 30. Cuantificación de células apoptóticas y necróticas medidas por Kit de anexina V, con Busulfán® y Casiopeína® [Cu(4,4dimetilbipiridina)(acetilacetato)]NO₃ sobre células HeLa.



Resultado 5. Casiopeína® III-5a NO₂a:



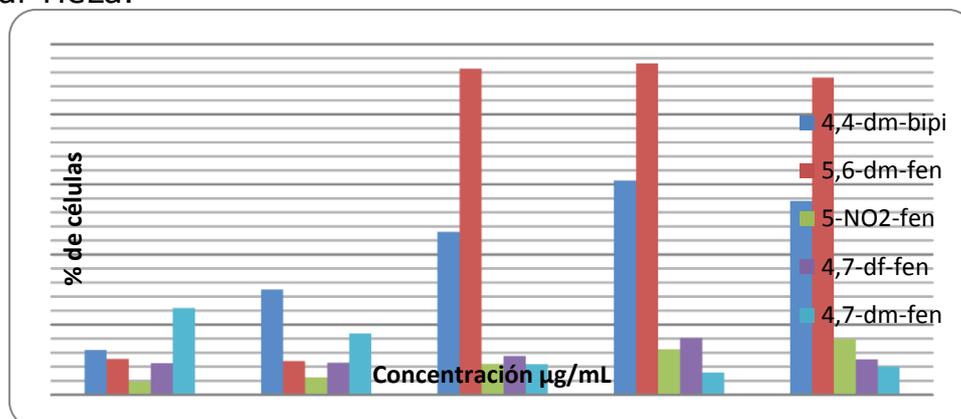
	Basal	Busulfán	Cas [25 µg/mL]	Cas[50 µg/mL]	Cas[100µg/mL]
µL	0.90	0.86	1.66	3.83	2.88
Necrosis	4.70	3.96	74.88	72.38	78.31
Vivas	90.64	90.22	14.70	10.81	2.90
Apoptosis	3.77	4.97	8.78	12.99	15.92

Figura 31. Cuantificación de células apoptóticas y necróticas medidas por Kit de anexina V, con Busulfán® y Casiopeína® [Cu(5,NO₂-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃ sobre células HeLa.

5.2. Resultado final.

5.2.1. Datos obtenidos por apoptosis.

En la siguiente gráfica se muestran los datos obtenidos en la muerte debida a apoptosis a tres diferentes concentraciones de las 5 diferentes Casiopeínas® con respecto a Busulfán® sobre la línea celular HeLa.



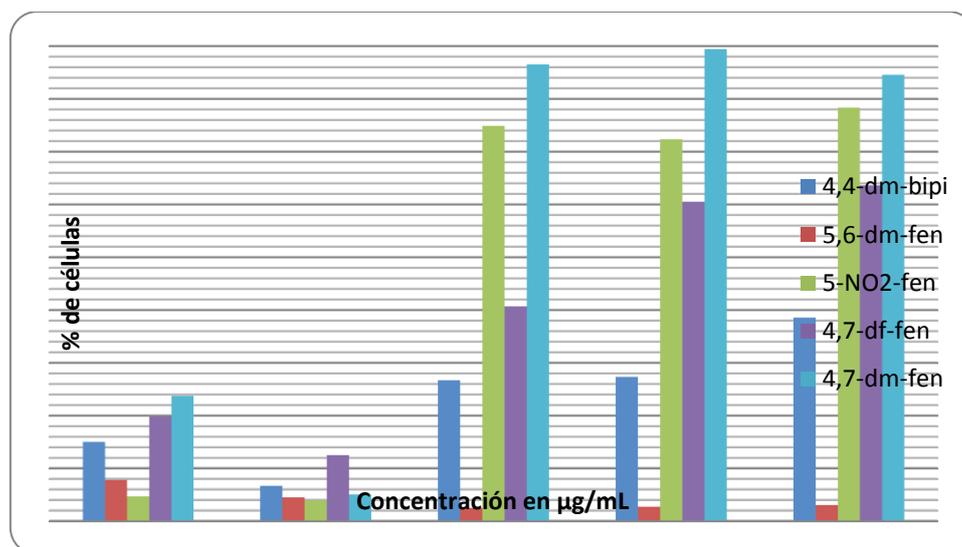


PORCENTAJE POR APOPTOSIS					
Clave de Casiopeína®	Basal-HeLa	Busulfán [50 µg/mL]	[25 µg/mL]	[50 µg/mL]	[100 µg/mL]
III-Ha	9.05	9.15	11.07	16.20	10.11
III-E-a	24.73	17.53	8.72	6.35	8.07
Vlacac	10.24	9.63	93.02	94.53	90.50
III-ia	12.76	30.00	46.47	61.07	55.28
III-5a NO ₂ a	3.77	4.97	8.78	12.99	15.92

Figura 32. Comparación de la muerte por apoptosis de las 5 diferentes Casiopeínas® a tres diferentes concentraciones con Busulfán® sobre la línea celular HeLa.

5.2.2. Datos obtenidos por necrosis.

En la siguiente gráfica se muestran los datos obtenidos en la muerte por necrosis a tres diferentes concentraciones de las 5 diferentes Casiopeínas® con respecto a Busulfán® sobre la línea celular HeLa.



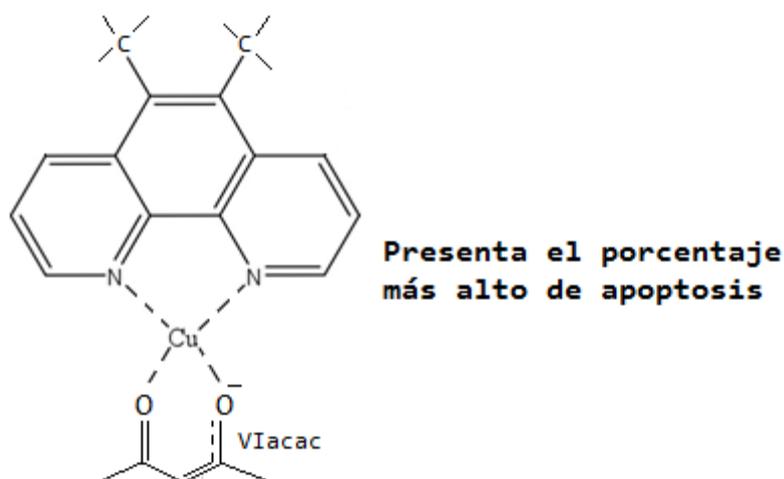
PORCENTAJE POR NECROSIS					
Clave de Casiopeína®	Basal HeLa	Busulfán [50 µg/mL]	[25 µg/mL]	[50 µg/mL]	[100 µg/mL]
III-Ha	19.74	12.54	40.68	60.54	63.58
III-E-a	23.72	5.14	86.51	89.42	84.61
Vlacac	7.85	4.54	2.56	2.79	3.04
III-ia	15.00	6.77	26.69	27.35	38.60
III-5a NO ₂ a	4.70	3.96	74.88	72.38	78.31

Figura 33. Comparación de la muerte por necrosis de las 5 diferentes Casiopeínas® a tres diferentes concentraciones con Busulfán® sobre la línea celular HeLa.

Al analizar cuantitativamente mediante el kit Anexina-V-FLUOS los resultados en porcentaje observados demuestran que las



Casiopeínas[®] VIacac y III-ia inducen un importante índice apoptótico en los tres diferentes tratamientos [25, 50 y 100 µg/mL]; siendo la más representativa los resultados obtenidos con la Casiopeína[®] VIacac.



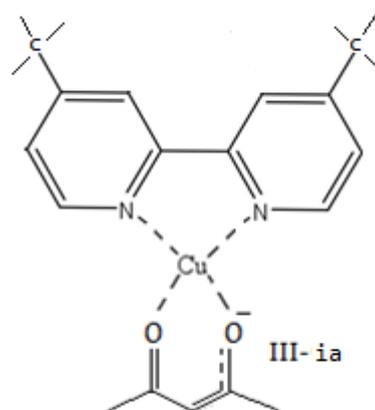
Casiopeína[®] VIacac: [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO₃

Comparando los resultados obtenidos de apoptosis a una concentración de 50 µg/mL con respecto a Busulfán[®], encontramos que el valor más alto lo proporciona la Casiopeína[®] VIacac, mostrando un índice apoptótico discriminantemente mayor con un 94.53% contra un 9.63% de apoptosis obtenido con Busulfán. A la misma concentración en ambos de 50 µg/mL encontramos que el Busulfán[®] presenta mayor necrosis que esta Casiopeína[®] aunque no con mucha diferencia, Busulfán[®] muestra un porcentaje de 4.54% y la Casiopeína[®] VIacac un porcentaje de necrosis de 2.79%. La inducción de apoptosis por esta Casiopeína[®] es por demás extremadamente significativa probándola en oposición con un fármaco ya establecido en el mercado como es el caso de Busulfán[®]. Algo que resulta importante es que la Casiopeína[®] VIacac muestra alto nivel de inducción apoptótico y al mismo tiempo los valores más bajos de necrosis presentando los porcentajes de 2.56% para una concentración de 25 µg/mL, 2.79% para una concentración de



50µg/mL y 3.04% para una concentración de 100 µg/mL.

Comparando los resultados obtenidos de la Casiopeína[®] III-ia ocuparía el segundo lugar en inducción de apoptosis, mostrando un porcentaje menor que la anteriormente mencionada. En una concentración de 25 µg/mL muestra un porcentaje apoptótico de 46.47%, mostrando casi la mitad del resultado obtenido con la Casiopeína[®] VIacac de 93.02%. Con Busulfán[®] a la misma concentración de 50 µg/mL se observa que la Casiopeína[®] muestra lo doble en porcentaje apoptótico con un 61.07% que Busulfán[®] con un porcentaje de 30.00%. Así mismo la Casiopeína[®] III-ia presenta mayores índices de necrosis que la Casiopeína[®] VIacac con un porcentaje de 26.69%; 27.35% y 38.60% para las concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL respectivamente, pero en comparación con Busulfán[®] presenta una necrosis más alta puesto que el porcentaje de Busulfán[®] es de tan solo 6.77%. Esto nos revela que la Casiopeína[®] III-ia también es mejor inductora de apoptosis que nuestro fármaco a comparar Busulfán[®].

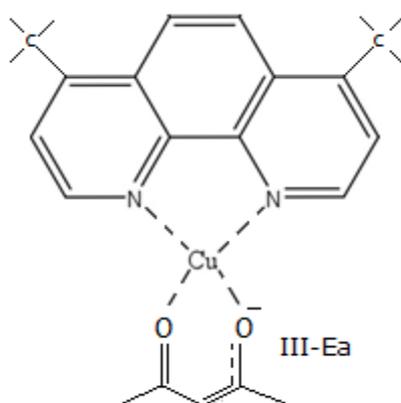


Casiopeína[®] III-ia: [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO₃

La Casiopeína[®] que mostró en menor proporción el nivel más bajo en apoptosis fue la Casiopeína[®] III-Ea con un porcentaje de apoptosis de apenas un porcentaje de 8.72 para la concentración de 25 µg/mL,



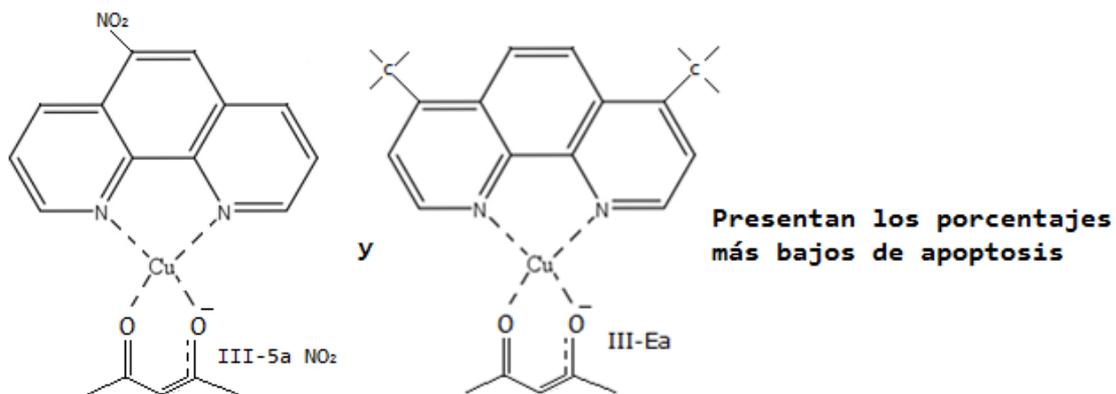
6.35 para la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 8.07 para la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Esta Casiopeína[®] muestra a su vez los valores más altos en necrosis presentando un porcentaje de 86.51 para la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$, 89.42 para la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ y de 84.61% para la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados nos muestran evidencia de que esta Casiopeína[®] presenta alto nivel de necrosis y bajo nivel de apoptosis sobre las células HeLa.



Casiopeína[®] III-Ea: $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetionato})]\text{NO}_3$

De las cinco Casiopeínas[®], la III-Ea mostró el promedio más bajo de apoptosis con un 6.35% a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, y en comparación con busulfán presenta tres veces más apoptosis el busulfán con un 17.53 % que esta Casiopeína[®].

La Casiopeína[®] III-5a NO₂a también mostró valores muy bajos en sus porcentajes de apoptosis, en promedio el porcentaje para esta Casiopeína[®] fue apenas un 12.57, aunque presento valores más altos en comparación con Busulfán, éste alcanzó tan sólo un porcentaje de 4.97 y en necrosis el promedio alcanzado fue de 75.19 y muy elevado en comparación con Busulfán con un porcentaje de 3.96.

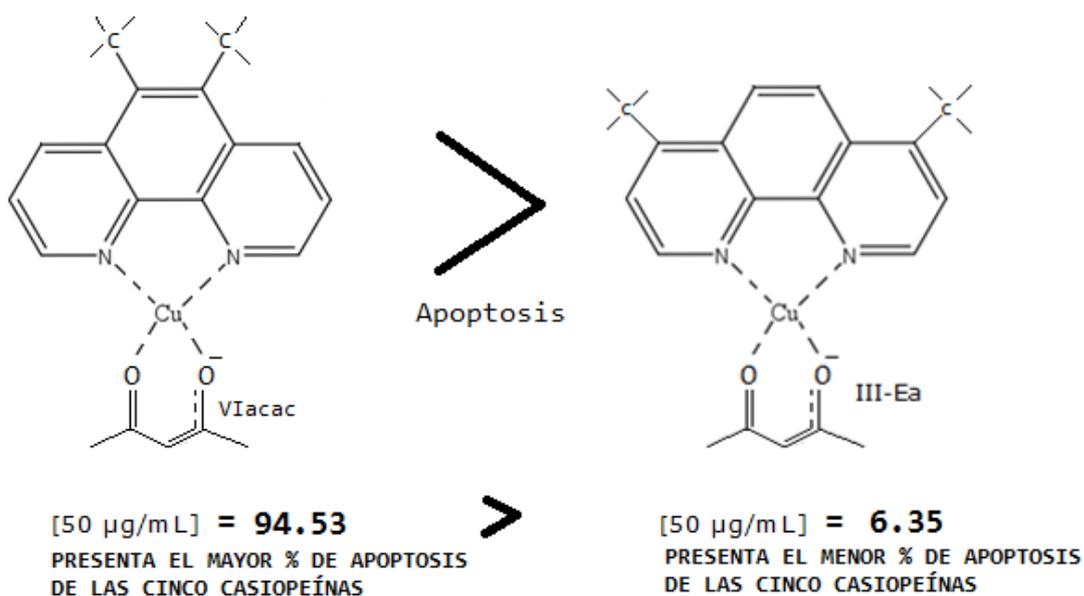


Casiopeína® III-5a NO₂: Cu(5,NO₂-1,10 fenantrolina)(acetilacetonato)]NO₃

Casiopeína® III-Ea: [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO₃

Estas dos, la Casiopeína® III-5a NO₂a y la Casiopeína® III-Ea presentan bajo nivel apoptótico y alto nivel necrótico.

Comparando la Casiopeína® III-Ea y la VIacac donde el compuesto presenta los mismos sustituyentes pero en diferente posición, el índice apoptótico presentado en las tres concentraciones es de casi 90 unidades de diferencia favoreciendo a la VIacac con un porcentaje de 93.02, 94.53, 90.50 contra un porcentaje de 8.72, 6.35 y 8.07 para las concentraciones de 25, 50 y 100 respectivamente.



De acuerdo a los resultados el orden entre las cinco Casiopeínas® en



A simple vista notamos en la fotografía las bandas características que son de apoptosis. En el carril 1 se presenta una buena degradación del ADN, en los carriles 2, 3, 4 se observa a la Casiopeína[®] III-ia con bandas en la parte superior de ADN íntegro, en los carriles 5, 6, 7 se observa a la Casiopeína[®] VIacac sin bandas en la parte superior demostrando que no hay ADN íntegro.



CAPITULO 6. CONCLUSIONES.

- Se logró sintetizar 5 compuestos de coordinación y caracterizarlos mediante espectroscopía de infrarrojo (IR) y análisis elemental.
- Se evaluó la actividad antitumoral de las cinco Casiopeínas[®] propuestas en este trabajo: **III-Ha**, **III-E-a**, **VIacac**, **III-ia**, **III-5a NO₂a** utilizando citometría de flujo ya que es una técnica sensible en la evaluación de viabilidad celular. Esta técnica permitió el análisis de poblaciones celulares, ya que fue capaz de detectar la emisión de los diferentes marcadores, a fin de evaluar la vía de muerte celular sobre la línea celular HeLa. El Kit de anexina V FLUOS efectivamente permitió diferenciar entre células necróticas o apoptóticas.
- Aunque todas las Casiopeínas[®] inducen apoptosis, es notable la actividad apoptótica de la Casiopeína[®] **VIacac** que es capaz de inducir, desde la dosis más baja alrededor de un 90% de apoptosis, así mismo, la Casiopeína[®] **III-ia** muestra una apoptosis de alrededor del 50% desde la concentración más baja; ambas mostrando un porcentaje notablemente mayor sobre células HeLa que el Busulfán[®] empleado como fármaco de referencia. Mediante este estudio se conoce que la mejor Casiopeína[®] capaz de inducir la muerte celular por apoptosis es la **VIacac** al presentar un porcentaje de 94.53 a una concentración de 50µg/mL.
- En el caso de las Casiopeínas[®] **III-Ha**, **III-E-a** y **III-5a NO₂a** la muerte celular fue debida a necrosis.
- Se observa una tendencia general que muestra que las Casiopeínas[®] inducen necrosis a medida que la concentración aumenta, es decir a la dosis de 100µg/mL y un incremento en la apoptosis a la concentración de 50µg/mL.



- Al evaluar la influencia que tiene el cambio de los sustituyentes en las Casiopeínas[®] se observa que estos cambios influyen drásticamente en la inducción de vía de muerte celular en HeLa.
- Al utilizar como prueba confirmatoria a la electroforesis en gel de agarosa, comprobamos los resultados obtenidos por citometría de flujo confirmando que la Casiopeína[®] **VIacac** presenta mejor apoptosis que la Casiopeína **III-ia**.

Con base en los resultados de este estudio sobre la correlación directa que existe entre las características moleculares del compuesto y la función en la actividad biológica que cumple, se estimula el interés por profundizar sobre la vía que pueda encaminarnos a destacar u optimizar un compuesto de entre las más de 100 Casiopeínas[®] sintetizadas.



BIBLIOGRAFÍA.

1. **Scientific American.** El cáncer. Segunda edición Barcelona España. Pág. 12. 1986.
2. **Alberts Bruce, Alexander Jonhson.** Biología molecular de la célula. Ediciones Omega S.A. 4ª edición. Barcelona España. Capítulo 23. 2004.
3. **Jacques Ferlay.:** Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, IARC Cancer Base No.5. 2002.
4. **Epidemiología del cáncer.** Secretaría de Salud pública. México. 2000.
5. **Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, 2003.** México: Secretaría de Salud. 2007.
6. **Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.** 2005.
7. **Bergeron C.** The 2001 Bethesda System. Salud Pública México. Calidad de la citología cervical. Págs. 106, 340-344. Vol. 17/No. 2/Abril-Junio. 2006
8. **Dzul-Rosado KR, Puerto-Solís M, González-Losa MR.** Cáncer cérvico-uterino: actualización de métodos para su detección. Rev. Biomed. Págs.233-241. Volumen 15. 2004.
9. **Weber Ferro Jose,** Atlas de Patología, Buenos Aires. Argentina. Págs.1-10. 1997.
10. **Castañeda-Iñiguez Maura Sara, Toledo-Cisneros Rebeca, Aguilera Delgadillo Mario.** Factores de riesgo para cáncer cérvico-uterino en mujeres de Zacatecas. Salud Pública de México, Vol. 40, No. 4. 1998.
11. **Ministerio de Salud.** Comisión Nacional de Cáncer Cérvico-uterino. Diagnóstico y tratamiento. Pág. 3. Chile. 2004.
12. **Lazcano Ponce E, Rascón-Pacheco R, Lozano-Ascencio R, Velasco-Mondragón HE.** Mortality from carcinoma of the uterine cervix in Mexico: Impact of screening 1980-1990. Act. Cytol. Págs. 506-512. 1996.
13. **Programa. "Detección Oportuna del Cáncer Cérvico-uterino",** de la Unidad Médica Familiar (UMF) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), México.
14. **M.D. Smith Cedric.** Farmacología. Editorial Médica Panamericana S.A, primera edición, Buenos Aires Argentina. Título del original en inglés: Textbook of pharmacology Saunders-Philadelphia, P.A. Cap. 58. 1992.
15. **Fernández-Cid Fenollera Alfonso.** Mastología. Elsevier, España. Segunda edición. Pág. 683. 2000.
16. **Al. Sarraf M:** Head and neck cancer: Chemotherapy Concepts, Semin. Oncol. Págs. 15-70. 1988.



17. **Chabner B. Allegra C. Curt G, Celebresi P.** The pharmacologic basis of therapeutics, novena edición. New York. MacGraw-Hills. Págs. 1233-1287. 1996.
18. **Taylor Magali, Dawson James.** Farmacología integrada. Dawson. Segunda edición. Edición Elsevier, España. Págs. 20-30. 2003.
19. **JB Lippincott.** Principles of Cancer Management: Chemotherapy. Cancer, Principles and Practice of Oncology, 6th Edition. Editado por VT DeVita, SHellman y SA Rosenberg Company, Philadelphia. Págs. 289-386. 2001.
20. **Tamm I., Schriever F., Dörken B.** Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. Lancet. Oncol. Págs.33-42, Vol.2. 2001.
21. **JM Estrela, Ortega A, Obrador E.** Glutathione in cancer biology and therapy. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. Págs. 143-181, Vol. 43. 2006.
22. **Graudens E, V Boulanger, Mollard C, R-Samson Mariage, X Barlet, G Gremy, C Couillault, Lajemi M, D-Tonneau Piatier, P Zaborski, E Eveno, C Auffray, Imbeaud S:** Deciphering celular states of innate tumor drug responses.Genome Biol.: R19. PubMed Abstract | BioMed Central Full TextBiol del Genoma de 2006, Vol. 7. 2006.
23. **S. Fulda y K.-M. Debatin,** " Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy ," Oncogene , vol. Debatin, " frente a la apoptosis extrínseca vías intrínseca en la quimioterapia contra el cáncer ", Oncogene. Págs. 4798-4811. No. 25, 34. 2006.
24. **Lippard,S.J. y Berg,J.M.** Principles of bioinorganic chemistry. University Science Books (Eds.), Mill Valley, CA. 1994.
25. **Díaz Quintana A., Hervás M., Navarro J.A & M.A. De la Rosa.** Plastocyanin and cytochrome c6: The soluble electron carriers between the cytochrome b6f complex and photosystem I. En: Structure of Photosynthetic Proteins. Germany Weinheim. Wiley-VCH Págs. 181-200. 2008.
26. **Holmberg CG, Laurell C-B.** "Investigations in serum copper. II. Isolation of the Copper containing protein, and a description of its properties". Acta Chem. Scand. 2: 550-56. doi:10.3891/acta.chem.scand.02-0550. 1948.
27. **Sentman M. L., Granstrom M., Jakobson H.** «Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 281. Págs. 6904-6909. 2006.



28. **Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C.** Free radicals in biology and medicine. Claredon Press (Eds). Oxford, U.K. 1989.
29. **Schlief, M.L., West, T., Craig, A.M., Holtzman, D.M. y Gitlin, J.D.** Role of the Menkes copper-transporting ATPase in NMDA receptor mediated neuronal toxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Págs.103, 14919-24. 2006.
30. **Westergard, L., Christensen, H.M. y Harris, D:A.** The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. Biochimica et Biophysica Acta 1772. Págs. 629-44. 2007.
31. **Crouch, P.J., White, A.R. y Bush, A.I.** The modulation of metal bioavailability as a therapeutic strategy for the treatment of Alzheimer´s disease. The FEBS Journal 274. Págs. 3775-3783. 2007.
32. **Gaetke, L.M., Chow CK.** Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. Vol. 189. 2003.
33. **Ruili, H.,.** Anticancer metal compounds in NCI´s tumor-screening database: putative mode of action. USA: Biochemical pharmacology. Vol.69. 2005.
34. **Ruiz-Ramírez L., Gracia-Mora I., Moreno-Esparza R., D. Diaz, L. Gasque, L. Huerta, L. Mayet, C. Lomelí, J.** The antitumor activity of several transition metal complexes. The Inorg. Biochem. Págs. 43, 615. 1991.
35. **Ruiz Ramírez L., Gracia-Mora I., Mendoza A., Pérez G., Ferrer-Sueta, A. Tovar, M. Breña, P. Gutiérrez, M.P. Cruces Martínez, E. Pimentel, A. Natarayan, J.** Antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeinas I, II, III. Inorg. Biochem. 51, 406. 1993.
36. **Ruiz Ramírez L., De la Rosa ME, Gracia Mora MI., Mendoza A. Pérez G, Breña-Valle M, Gutiérrez P., Pimentel E., Cruces Martínez MP., Natarajan AT.**
37. **Casiopeína drugs: A new class of antineoplastic and genotoxic compounds: J Inorg Biochem. 59, 2-3, 1995.**
38. **Gracia Mora I, Ruiz Ramírez L, Gómez Ruiz C., M.Tinoco Méndez, A. Márquez Quiñones, L.Romero De Lira, A. Marin Hernández, L. Macias Rosales, M. E. Bravo Gómez.** "Knight´s move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeínas, Evaluated by an in vitro Human and murine cancer cell line panel". Metal Based Drugs, Vol.8. Págs. 19-28. 2001.
39. **Tovar Tovar Araceli, Ruiz Ramírez Lena, Campero A., Ropmerosa A., Moreno Esparza R., M.J. Rosales Hdz,** Structural and reactivity studies on 4,4-dimethyl-2-



- 2-bipyridine, acetylacetonate copper (II) nitrate (Casiopeína III-I) with ADN constituents, by UV-vis and EPR Techniques., J. of Inorganic Biochemistry. 2004.
40. **Ruiz Ramírez L., Gracia Mora I, Moreno Esparza R., Díaz D., Gasque L., Huerta L., Mayet L., Lomelí C.** " The antitumor activity of several transition metal complexes", Journal of inorganic Biochemistry. Págs. 43, 615. 1991.
 41. **Kelley S.L., Basu A., Teicher B.A., Hacker M.P., Hamer D.H. and Lazo J.S.** Overexpression of metallothionein Confer resistance to anticancer drugs. Science 241. Págs. 1813-1815, 1988.
 42. **Newton., Strasser** A ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of FAS or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy. J Exp Med. jan 3; Págs. 195-200. 2000.
 43. **Alemón Medina R, Muñoz-Sánchez JL, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L.** Induction of oxidative damage by copper based antineoplastic drugs (Casiopeínas). México: Cancer Chemother. Pharmacol. Págs. 219-228. Vol. 60. 2007.
 44. **Hernandez Alvaro Marín, Gracia Mora Isabel, Ruiz Ramírez Lena, Moreno Sánchez Rafael,** Toxic effects of copper based antineoplastic drugs (casiopeínas). Biochemical Pharmacology. Págs. 1979-1989. Vol. 65. 2003.
 45. **Carvallo Chaigneau, Francisco, Gracia Mora Isabel,** El ratón desnudo (nu/nu) como modelo de evaluación de fármacos antitumorales. México : UNAM, 2001.
 46. **Tovar Araceli, Ruíz Ramirez Lena, Campero Celis Antonio.** Interacción entre Casiopeínas y Adenina. Primer Congreso en Casiopeínas, Taxco Guerrero. 2002.
 47. **Ostrosky, P., Montero, R., Hernández Ruiz Ramirez L., Gasque L., herrera L., Ruiz, M., Cortinas, C. and Rodríguez,** Citostatic Effect of some New Copper Complexes, R. Mutagenesis. Págs. 11-80. 1988.
 48. **González Alcaraz Francisco.** Nomenclatura de química orgánica. España. Primera edición. Editorial Ingramur, S.L. Págs. 55-56. 1991.
 49. **Vera, L ., et al.,.** Cancer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos que interagem com a ADN. Brasil : Quim Nova. 2005.
 50. **Buggia I, Locatelli F, Regazzi MB, Zecca M.** Busulfán®. The annals of Pharmacotherapy. Vol. 68. Págs. 1055-1062. Vol.8. 1994.
 51. **Chaney SG, Sancar A.** ADN repair enzymatic mechanisms and relevance to drug response. Journal of



- the National Cancer Institute 1996. Págs. 1346-1360. Vol. 19. 1996.
52. **Busulfex.** A textbook of drug design and development P. Krogsgaard- Larsen, T. Liljefors y U. Madsen. Segunda edición. Harwood Academic Publishers. 1996.
53. **Aubert G. y Lansdorpe P.M.** Telomeres and aging. *Physiol Rev.* Págs. 557-579. Vol. 88. 2008.
54. **Glucksmann A.** Cell death in normal vertebrate Ontogeny. *Biol. Rev.* Págs. 59-86. Vol. 26. 1951.
55. **Kerr J.F., Wyllie A.H. y Currie A.R.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* Págs. 239-257. Vol. 26. 1972.
56. **Lizarde Iracheta maría Antonieta.** *Rev. R. Acad. Cienc.Exact. Fís. Nat. España.* El suicidio y la muerte celular. Vol. 101, No.2. 2007.
57. **Brenner S.** The genetics of *Caenorhabditis elegans* *Genetics* 77, Págs. 71-94. 1974.
58. **Hengartner Mo, Horvitz Hr.** Caenorhabditis elegans cell survival gene encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2 *Cell.* Págs. 665-676. 1994.
59. **Glucksman A.** Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Págs.* 59-86. *Rev.* 26. 1951.
60. **Baehrecke E.H.** How death shapes life during development. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.,* Págs. 779-787. *Rev.* 3. 2002.
61. **Barde, Y.A.** Trophic factors and neuronal survival. *Neuron.* Págs. 1525-1534. No. 2. 1989.
62. **Oppenheim. R.W.** Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev Neurosci.* Págs. 453-501. No. 14. 1991.
63. **Nataraj. A., Pathak, S., Hopwood. V., McDonell, T., and Ananthaswamy. H.** Bcl-2 oncogene blocks differentiation and extends viability but does not immortalize normal human keratinocytes. *Int. J. Oncology.* Págs. 1211-1218. No.4. 1994.
64. **Torroella Kourí Marta.** Bases genéticas del cáncer. Fondo de cultura económica. México. Págs. 13-17. 1998.
65. **Lanore Didier, Delprat Cristel.** Editorial biomédica Quimioterapia anticancerosa. Primera edición. Elsevier España. Cap. 1. 2004.
66. **Lizarbe Iracheta Ma. Antonia.** *Rev.R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp).* El suicidio y la muerte celular. VIII Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica. Págs. 1-33. Vol.101, No2. 2007.



67. **Cornella et al.** **Nefrología**. Vol. XIX. Suplemento 1. Bases moleculares de la apoptosis celular y su relación con la patología renal. 1999.
68. **Cascales Angosto María**. Bases moleculares de la apoptosis. Academia de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Vol. 69. 2003.
69. **Harris CC**. Tumors suppressor genes, multistage carcinogenesis and molecular epidemiology. IARC Scientific Publication. Págs. 67-85. No. 116. 1992.
70. **Thompson CB**. Science. Págs. 1456-1462. No. 267. 1995.
71. **Mackay I.R., Leskovsek N.V. y Rose N.R.** Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. J Autoimmun. Págs. 5-11. No. 30. 2008.
72. **Gac. Med. Mex.** Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. Artículo de revisión. UNAM. Vol. 139. No 5. 2003.
73. **Alnemi E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvensen G. Thomberry N.A., Wong W.W y Yuan J.** Human ICE/ICED-3. Protease Nomenclatura. Cell. Págs. 87, 171. 1996.
74. **Martha Elinos Báez Carmen**. Artículo de revisión. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. Págs. 493-498. Vol. 39 No.5.2003.
75. **Gallardo Pérez Juan Carlos, Surián Rodríguez Maribel, Guzmán Gallegos Adriana**. En el umbral de la muerte: proteínas que la inhiben. No. 39. 2005.
76. **Sastry PS, Rao KS**. Apoptosis and the nervous system. J. Neurochem. Págs. 1-20. No. 74. 2000.
77. **Tansey, W.P.** Death, Destruction and the proteosome. N. Enl. J. Med. Págs.351,393-394. 2004.
78. **Fesik S. W. Shi, Y.** Perpectives Structural Biology: Controlling the caspasas. Science. Págs. 294, 1477-1478. 2001.
79. **Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, n et al.** Capase-12 mediates endoplasmic reticulum specific apoptosis and citotoxicity by amiloid beta. Nature. Págs. 96-103. No. 403. 2000.
80. **Gurney, M.E., Tomasselli, A.C., Heinrikson, R.L.** Perpectives: Neurobiology, stay the executioners hand Science. Págs. 288-284. 2000.
81. **Roberts D.L., Merrison W., Macfarlane M., and cohen G.M.** The inhibitor of apoptosis protein binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. J. Cell Biol. Págs. 221-228. 2001.
82. **Decaudin D,**. Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: A prospective novel target of cancer therapy.



- (Review Marzo II). Int J. Oncol. Págs.141-152. No. 12. 1998.
83. **Ashkenazi A, Dixit VM.** Death receptors: signaling and modulation. Science. Págs. 1305-1308. No. 281. 1998.
 84. **Reed JC.** Apoptosis and cancer: Strategies for integrating Programmed Cell Death. Seminars in Hematology. Págs. 9-16. No. 37. 2000.
 85. **Hengartner MO.** The biochemistry of apoptosis. Nature 2000; 407: 770-776. 21. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell. Págs. 491-501. No. 94. 1998.
 86. **Bouvard, V., Zaitchouk T, Vacher M, Duthu A, Canivet M, Choisy-Rossi C, Nieruchalski M, May E.** "Tissue and cell-specific expresión of the p53-target genes : bax, fas, mdm2 and Waf1/p21, before and following ionizing irradiation in mice ." Oncogene. Págs. 649-660. No. 19. 2000.
 87. **Radin NS.** Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. Biochem J 371: Págs. 243-256. 2003.
 88. **Haupt S; Berger M., Goldberg Z., And Haupt Y.** Apoptosis-the p53 network. Journal of Cell Science. Págs. 4077-4085. 2003.
 89. **Cuello F. Mauricio, Sumie Kato, Sadarangini K Anail et al.** Muerte celular mediada por receptores: rol de las hormonas esteroidales ováricas en la apoptosis inducida por el ligando TRAIL en cánceres ginecológicos Boletín. No1 escuela de medicina U.C. Universidad Católica de Chile. Vol. 31. 2006.
 90. **Liu, J.R, opipari, A.W., Tan,L., Yiang, Y, Zhang, Y., Tang, H., and Nunez, G.** Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance. Cancer Res. Págs. 62, 924-931. 2002.
 - 90 **Devarajan , E., Sahin, A.A., Chen, J.S., Chrishnamurphy, R.R., Aggarwal, N., Brun, A:M., Sapino, A., Zhang, F., Sharma, D., Yhang, X.H.** Down regulations of caspase 3 in breast cancer: a posible mechanism for chemoresistance. Oncogene. Págs. 8843- 8851. No.21. 2002.
 - 91 **Ferreira, C.G., Van der Valk, P., Span, S.W., Jonker, J.M., P.E., Kruyt, F.A., and Giaccone, G.** Assessment of IAP proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non small-cell lung cancer patients. Ann concol. Págs. 799-805. No. 12. 2001.
 - 92 **Rieseberg, M.; Kasper, C.; Reardon, K.F. y Scheper T.** Flow Cytometry inbiotechnology. Appl. Microbiol.



- Biotechnol. Scheffold, A. y Kern, F. 2000. Págs. 350-360. No. 56. 2001.
- 93 **Wedemeyer, N. y Pötter, T.** Flow cytometry: an "old" tool for novel applications in medical genetics. Clinical Genetics. Págs.1-8. No.60.2001.
- 94 **Crossland-Taylor, P.J.** A Device for Counting Small Particles Suspended in a Fluidthrough a Tube. Nature. Págs. 37-38. No. 171. 1952.
- 95 **Bonner, W. A.; Hulett, H.R.; Sweet, R.G. y Herzenberg, L.A.** Fluorescence Activated Cell Sorting. The Review of Scientific Instruments. Págs. 404-409. No. 43. 1972.
- 96 **Colligan,J.F., Kruisbeek, Margulies, D.H; Sevach, E.M; Strober, W.** Current protocols in immunology. National institutes of health. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Cap.5 Cell sorting. 2001.
- 97 **Berk Arnold, Harvey Lodish.** Molecular cell biology. Quinta edition. New York, Estados Unidos. Ed. Freeman and company . Chapter 3. 2004.
- 98 **Luque Cabrera José.** Biología molecular e ingeniería genética. Editorial Elsevier, Madrid España. Pág.138. 2001.
- 99 **Dirección General de Invenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico (SECOFI).** Registros Número 18801-120579 y 18802-120580.
- 100 **Ruiz-Azuara Lena.** Process to obtain new mixed copper aminoacide complex from phenylphenantroline to be used as anticancerigenic agent. U.S. Patent. April 21 (1992) Number 5, 107,005. U.S. Patent Re35, 458, Feb. 18. (1997).
- 101 **Fundación Revista de Medicina.** Buenos Aires. Ediciones Finadiet. Vol. 47. Pág. 335. No. 3. 1987.



ANEXO 1. Estructura básica de un citómetro de flujo.

El citómetro de flujo se compone de tres partes.

Sistema fluídrico	<ul style="list-style-type: none"> • Inyección de la muestra y cámara de flujo
Sistema óptico	<ul style="list-style-type: none"> • Fuentes de luz y detectores
Sistema eléctrico	<ul style="list-style-type: none"> • Amplificador-convertidor y sistema informático

El sistema fluídrico consta de dos fluidos, uno que contiene en suspensión a la muestra y otro que lo envuelve a fin de darle estabilidad (Figura A1.1). Ambos fluidos (solución fisiológica, PBS, aire) no se mezclan porque circulan a diferente presión. La suspensión celular ya procesada y teñida, se inyecta en la cámara de flujo del citómetro, a través de un capilar a una presión mayor que la del flujo acarreador para asegurar que las células permanezcan centradas y viajen una detrás de otra en un chorro de inyección. En este punto es cuando las células interactúan físicamente con un haz de luz monocromática, dispersando la luz en todas las direcciones. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. La luz dispersada hacia adelante (llamada forward scatter a 0 grados) está relacionada con el tamaño de la célula. La luz dispersada hacia los lados, a 90 grados del eje del haz lumínico (light scatter a 90 grados) provee información sobre la granularidad, tamaño y morfología celular.

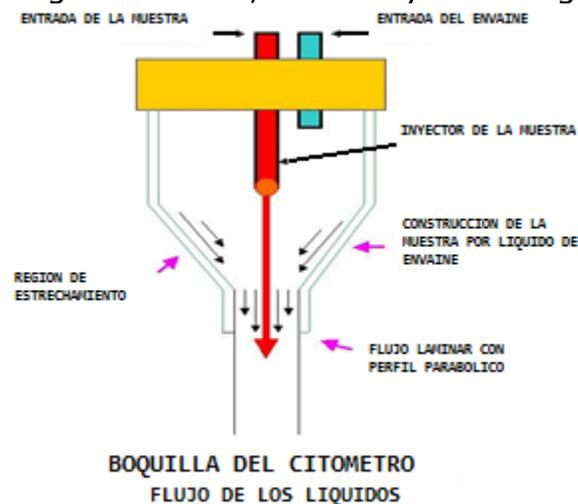


Figura A1.1. Flujo del líquido en un citómetro de flujo.



El sistema óptico se compone de dos tipos de ópticas:

- La óptica de excitación: compuesta de láser y las lentes para enfocar y dirigir el haz de luz
- La óptica de lectura: compuesta por las lentes de recolección de luz emitida luego de la interacción entre el haz de láser y las partículas, y el sistema de espejos y filtros para direccionar longitudes de onda específicas hacia los detectores correspondientes.

Los filtros ópticos son aquellos que seleccionan las longitudes de onda que deja pasar hacia el detector y pueden ser: (Figura A1.2).

- de interferencia (dicroicos que reflejan las longitudes de onda no deseadas)
- de absorción (absorben las longitudes de onda no deseadas). De estos hay tres tipos: filtros band pass, short pass y long pass.

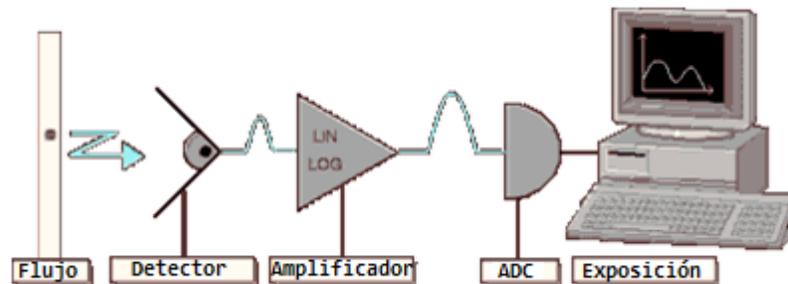


Figura A1.2. Proceso para la obtención de parámetros celulares mediante el citómetro de flujo.

Las señales eléctricas analógicas son convertidas en señales digitales que son procesadas por un ordenador con el fin de generar histogramas o un despliegue de dos parámetros (dot plot o contour plot), el cual presenta un informe numérico que muestra células totales en cada región y el porcentaje del total de éstas, con el fin de poder medir simultáneamente varios parámetros en una misma célula (Figura A1.3, A1.4, A1.5).

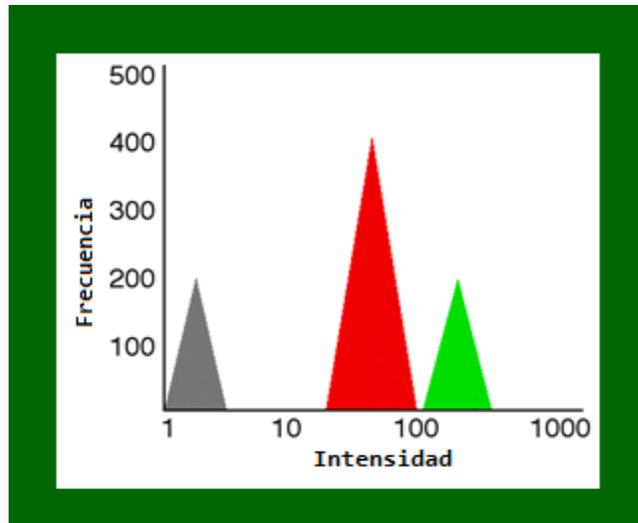
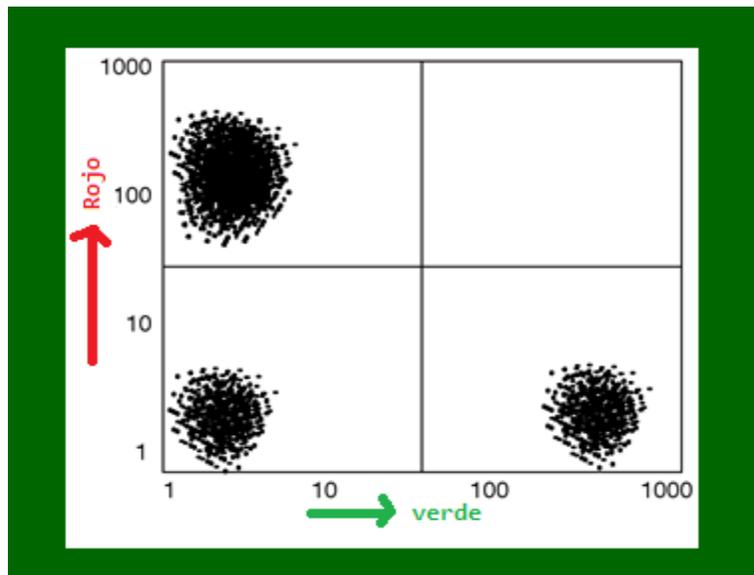


Figura A1.3. Histograma.



A1.4. Gráfico de puntos. Cada punto representa una célula individual.

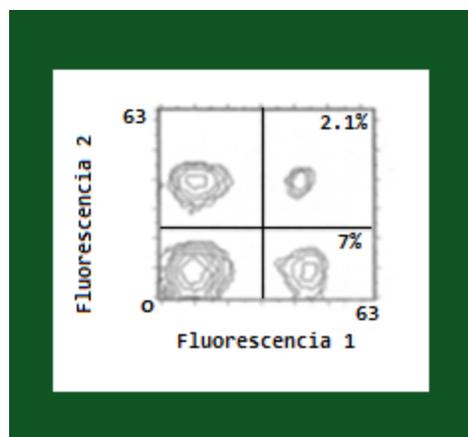


Figura A1.5. Gráfico de contorno.



VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.

Algunos de los inconvenientes de utilizar una suspensión de partículas es que al hacerlas pasar de una en una, como es el caso de la citometría de flujo, se pierda información sobre la arquitectura de los tejidos que componen las células o de las propias células, así como la interacción entre las células y el medio que las rodea. Frente a este inconveniente la citometría de flujo presenta múltiples ventajas frente al microscopio de fluorescencia y las técnicas citoquímicas, como son:

- Posibilidad de analizar un elevado número de partículas en un corto período de tiempo (5000 partículas/segundo).
- Posibilidad de cuantificar por medio de canales medios de fluorescencia.
- Mayor sensibilidad y objetividad que le permiten detectar enfermedad mínima residual y caracterizar poblaciones celulares poco abundantes en condiciones normales como los basófilos.
- Permite almacenar la información del análisis para poder utilizarla en cualquier momento y reanalizar análisis hechos con anterioridad.
- Posibilidad de cuantificar las moléculas antigénicas presentes en un grupo celular.

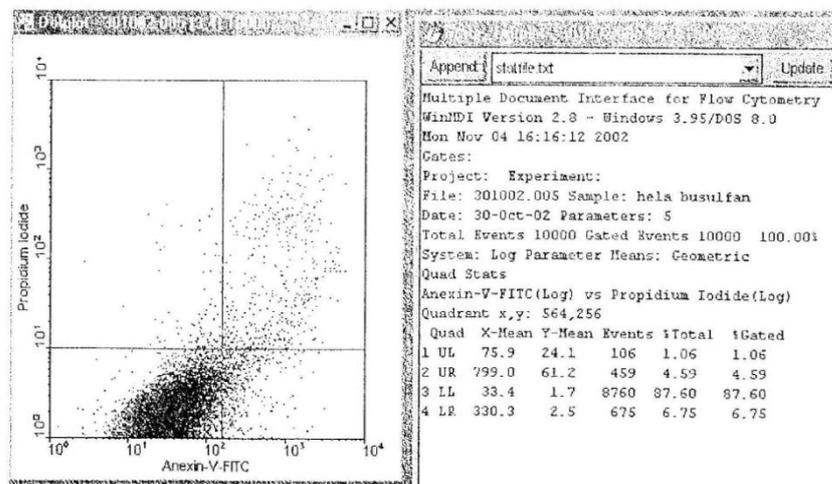
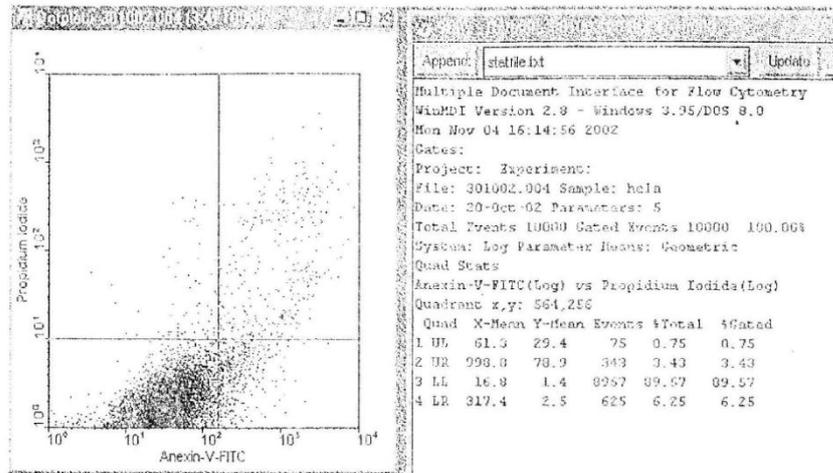
La CMF es una técnica sencilla que se aplica en la rutina diaria de muchos laboratorios clínicos y de investigación, capaz de proporcionar resultados de forma rápida que pueden ser aplicables al diagnóstico. Así, en disciplinas como la inmunología, hematología y oncología, en las que la citometría de flujo se aplica fundamentalmente a la rutina clínica, han aumentado notablemente los aspectos de investigación básica y junto con el desarrollo tecnológico ha permitido aumentar la resolución y la sensibilidad de los citómetros de flujo haciendo posible su utilización para el estudio de partículas de pequeño tamaño y microorganismos.



ANEXO 2
Ejemplo de uno de los 62 histogramas obtenidos en el
citómetro de flujo.

Basal y Busulfan

301002



Vlacac:

Casiopéina[®][Cu(5,6 dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]N₃