



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* DE
COMPUESTOS PENTACOORDINADOS DE ESTAÑO EN LAS LÍNEAS
CELULARES HeLa Y HCT-15**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

NIDIA BARRAGÁN VARA



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor Bernardo Lucas Florentino**

VOCAL: **Profesor María Isabel Gracia Mora**

SECRETARIO: **Profesor Ana María Vázquez Álvarez**

1er. SUPLENTE: **Profesor Francisco Sánchez Bartéz**

2º SUPLENTE: **Profesor María Elena Bravo Gómez**

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de cultivo celular, Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:

M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora _____

Supervisor técnico:

M. en C. Francisco Sánchez Bartéz _____

Sustentante:

Nidia Barragán Vara _____

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	2
2.1 Cáncer.	2
2.2 Estadísticas del cáncer.	3
2.3 Patogenia del cáncer.	4
2.4 Características especiales de las células cancerosas	7
2.5 Cáncer cérvico-uterino.	10
2.6 Cáncer de colón.	14
2.7 Tratamientos para el cáncer.	19
2.8 Quimioterapia antineoplásica.	21
2.9 Compuestos de estaño.	27
2.10 Apoptosis.	30
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.	38
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	44
5.1 Gráficos de viabilidad contra concentración	44
5.2 Concentración de inhibición (CI ₅₀).	48
5.3 Determinación de apoptosis por TUNEL	50
5.4 Determinación de la apoptosis por análisis citomorfológico. .55	
6. CONCLUSIONES.	57
7. REFERENCIAS.	58

Agradecimientos

A mis padres Irma y Francisco. Por dedicar muchos años de su vida en la mía, por su amor, apoyo incondicional, palabras de aliento, comprensión, paciencia, consejos, enseñanzas en todos los aspectos y animarme a siempre ir hacia adelante. Por ustedes estoy hasta donde me encuentro ahora, gracias absolutamente por todo, los amo.

A mi hermano Alejandro. Por acompañarme también en todos estos años y compartir conmigo innumerables experiencias, buenos momentos y muchas peleas, por enseñarme que a pesar de todo siempre debo dar mi mejor sonrisa y por siempre estar ahí cuidándome.

A mi abue Benigna. Por tus enseñanzas, consejos, ayuda, cariño y cuidados a lo largo de tu vida, hasta donde estés, gracias.

A toda mi familia. Contar con un grupo familiar tan hermoso ha contribuido de forma fundamental en mi formación como persona, su alegría, platicas, confianza, ánimos, por todo lo bello y particular de las reuniones y por la calidad de personas que son.

A Abigail. Por estos años recorridos desde aquellos primeros días en la secundaria, a pesar de la distancia, las ocupaciones siempre has estado ahí para brindarme consejos, reír o darme un jalón de orejas cuando ha sido necesario, por todas tus locuras y compartir este tiempo de amistad.

A Erick. Por compartir junto conmigo prácticamente todo este camino, poco más de cinco años no son poca cosa, por cada uno de los consejos y ayuda proporcionados en lo personal como en la parte escolar, por los desvelos, las materias, los equipos, por las infinitas experiencias que me dejaste al concluir la licenciatura, por caminar junto a mí, cuidarme de distintas maneras, por las risas y por los disgustos. Todo ha influido de manera significativa en mí, gracias por todo.

A mis queridos Moros. Su buen humor, su caballerosidad no moderna, las muy agradables reuniones, los días de karaoke, ayudaron de manera importante a tener una sonrisa, y adquirir más experiencias agradables. Gracias por su amistad

A Manuel. Por ser ese gran amigo y estar ahí pese al acomodo de circunstancias, las largas platicas, disposición a escucharme, tus palabras, los abrazos sinceros y oportunos, aquellas cervezas repentinas, las risas y la paciencia que tienes como instructor.

A Carlos. Por compartir tus experiencias, la tranquilidad de tus platicas, opiniones francas y consejos, porque con tus bromas y chistes me ayudaste a generar momentos de relajación al igual que con aquellos recorridos por el centro y tus tantas recomendaciones de lugares para visitar.

A Gabriel. Por hacerme reír mucho, a carcajadas literal, con tus chistes, críticas y enseñanzas aspectos poco comunes en mi vida sumado a la relación de experiencias con capítulos de Los Simpson, también por tus opiniones serias y consejos cuando fueron necesarios.

A Flori. Por la confianza brindada y tu forma particular de demostrar cariño, ya que a pesar de que siempre me molestes sé que me quieres, por las bromas y por esa actitud positiva cuando te preguntábamos como te encontrabas.

A Memo. Por compartir distintos momentos bailando, fue una etapa que creo nos acerco más y me alegro por eso. Con tus gestos y algunas frases celebres generaron momentos muy graciosos en muchas ocasiones, gracias también por la confianza, comentarios y buena vibra.

A Ivar. Por esas platicas, las ocurrencias que tienes, por luchar en lo que haces así también trasmites ese sentimiento y también por aquellos momentos salsosos que pudimos compartir.

A la bandota. Cada uno de ustedes, Erick, Moy, Beto, Aarón, Ángel, Liliana, Mony, Nadia, José, René, Vilma, Ale, Alan, Marco, Jaime y Darío, son parte fundamental de este camino que recorrimos por la Facultad, considero nos hicieron como una familia y los quiero como ello, los viernes de departamentales no hubieran sido lo mismo sin ustedes, las reuniones de fin de semestre, los distintos viajes que organizamos como grupo contando el aspecto de la cocina y que los niños no deben ir solos a comprar despensa, los festejos de cumpleaños, los consejos de cada uno, las charlas variadas, palabras de aliento, abrazos, risas, espero se siga conservando con el mismo cariño por muchos años más. Gracias a todos por brindarme tantas buenas experiencias y aprendizajes que quedaran grabadas en mi vida, sin duda son parte fundamental de este logro.

A la M. en C. Isabel Gracia. Por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis junto a su grupo de trabajo, porque desde el primer día me brinda su apoyo, confianza, conocimientos y facilidades para poder desarrollarme profesionalmente y como persona.

A Lidia. En el desarrollo del trabajo fuiste muy importante, gracias por tu tiempo para enseñarme los métodos y técnicas para poder sacar adelante este trabajo, por tus consejos para realizarlo mejor y también por tu apoyo, aparte de ser una excelente compañera de trabajo te convertiste en una buena amiga.

A Sol. Porque con tu carácter y manera de ver las cosas también contribuiste a que mi estancia en el laboratorio fuera más agradable, gracias por brindarme tu amistad, por escucharme, por tus palabras y consejos.

Al profe Paco. Por el apoyo en revisión de la tesis, por cuestionar el trabajo experimental y escrito y compartir los conocimientos todos acerca de lo que se hace.

A Erick Vicente, Liliana, Erikita y Luis. Sin duda alguna sin ustedes no hubiera sido lo mismo, me llevo muchas agradables experiencias, muchas platicas, risas. De cada uno me llevo aprendizajes distintos y agradezco hayan hecho mi estancia más placentera.

A todo el grupo de trabajo de la UNEXA. Lucía, gracias por llenar de alegría y buen humor muchos momentos; Héctor por siempre tener algo que platicar y disposición de enseñar y aprender; QFB. Celedonio gracias por la ayuda que me proporcionó para poder realizar las técnicas de apoptosis, recomendaciones y tiempo; Adriana y Vania por la confianza proporcionada pesar de habernos convivido poco y por compartir sus experiencias para poder seguir creciendo. Mabel, por siempre tener una sonrisa cuando uno llegaba y una forma amable de tratar a las personas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por ser la gran institución educativa que es y por recibirme como parte de su comunidad estudiantil, porque desde mi primer día me ha proporcionado recursos para crecer profesionalmente y como persona.

A la Facultad de Química. Por proporcionarme una educación de alto nivel, por contar con académicos dedicados a su labor docente y a la ciencia, dispuestos a transmitir sus conocimientos y por haberme formado como QFB.

A la Cía. De Danza Folklórica "She-Ve-U". Por acompañarme gran parte de este camino, por constituir parte importante de él con todos sus integrantes y enseñanzas, al director Gerardo José Rosas por permitirme ser parte de este sueño, regaños, lecciones y por compartir tu amor a la danza.

Al grupo "Salsa Ciencias". Que aunque los conocí al final también, son un pilar importante en este camino, me dio la oportunidad de conocer personas increíbles, Manuel, Sairi, Miguel, César, Alma, Pichón, Felipe, Laura, Karen, Dafne, Quique, Mario, Fer, gracias por brindarme su amistad y ratos agradables, darme la oportunidad de pertenecer a distintos proyectos, por los buenos momentos y las platicas compartidas. Sairi, gracias particularmete por ser la gran mujer que eres, por esos ideales, por ese cariño.

A Manuel Díaz. Por el apoyo brindado desde el momento en que te comencé a tratar, por la versatilidad que te caracteriza, por las sugerencias en el ámbito del baile y otros aspectos, por las experiencias que se comienzan acumular y tanto aprecio. Gracias extras por la corrección de estilo de éste escrito.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas son un gran reto de salud pública debido a que son una de las principales causas de mortalidad en el mundo. El cáncer es una de las patologías englobadas dentro de este grupo.¹

Este padecimiento representa aproximadamente un 13% de las defunciones mundiales: 7.9 millones de muertes por año. En México es la tercera causa de muerte.²

El tipo de tumor, su estadio (cuánto ha crecido y si se ha diseminado o no desde su ubicación original) y el estado físico del paciente deben considerarse para elegir el tratamiento a utilizar para combatir la enfermedad.³ Entre las principales terapias se encuentran la resección quirúrgica, la irradiación y la quimioterapia. Esta última, es la más utilizada ya sea de forma aislada o como complemento de otras formas de tratamiento.^{3, 4} El término quimioterapia describe el uso de fármacos con acción selectiva para perjudicar a un organismo invasor, idealmente sin causar daño al hospedero; sin embargo, con frecuencia este término se ha utilizado específicamente al método terapéutico antineoplásico. Cabe mencionar que el uso de esta terapia trae consigo una serie de efectos secundarios graves como son: alteración de la cicatrización, debilitamiento del sistema inmune, genotoxicidad en células no transformadas, entre otros.^{5, 6}

Debido a lo anterior, la búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos seguros y eficaces, es una prioridad en la investigación, con lo cual se justifica este trabajo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer

El cáncer es el término usado para denominar a un grupo de enfermedades que se caracterizan por una multiplicación y diseminación incontrolada de formas anormales de las propias células del cuerpo como consecuencia de una serie de alteraciones somáticas del DNA. El crecimiento celular no regulado y sin invasión a tejidos circundantes una característica de las neoplasias benignas; las neoplasias malignas sí presentan invasión a otros tejidos.^{7, 8}

Existen más de 100 diferentes tipos de cáncer, la mayoría toman el nombre del órgano o de las células en donde se presentan, en el cuadro 1 se muestra ejemplos de los nombres que reciben algunos tipos de tumores benignos o malignos.^{6, 7}

Cuadro 1. Denominación de los nombres que recibe el tipo de tumor según su tejido de origen.⁷

Denominación de los tipos de tumores		
Tejido	Neoplasia benigna	Neoplasia maligna
Hígado	Hepatoma	Carcinoma hepatocelular
Tejido fibroso	Fibroma	Fibrosarcoma
Tejido graso	Lipoma	Liposarcoma
Hueso	Osteoma	Osteosarcoma
Pulmón	Adenoma pulmonar	carcinoma pulmonar

El sufijo "oma" se utiliza para denotar tumores benignos. El cáncer de tejidos epiteliales se denomina "carcinomas"; a los de tejidos no epiteliales (mesenquimatosos) se les nombra "sarcoma". Al cáncer de células hematopoyéticas se designa como leucemia y al cáncer de sistema linfático como linfoma.^{7, 8}

2.2. Estadísticas del cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, para 2020, el cáncer podría cobrar la vida de 10.3 millones de personas en el mundo, afectando actualmente a 6.7 millones de personas cada año. En nuestro país, la tasa de defunción por esta enfermedad está en aumento. De 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer se incrementó casi diez puntos, tendencia que resulta preocupante por todo lo que implica la incidencia de esta enfermedad como la capacidad de las instituciones de salud para brindar la atención adecuada y oportuna, los años perdidos en el proceso de la enfermedad y el impacto económico y emocional en la familia del paciente.

De acuerdo con las defunciones por tumores malignos en 2008, entre los hombres, el mayor porcentaje de lesiones malignas fue en próstata (8.1%), seguido por los tumores de tráquea, bronquios y pulmón (7.0%); y entre las mujeres, el cáncer de mama (7.6%), seguido por los tumores malignos de ovarios y cérvico-uterinos (6.4%).³

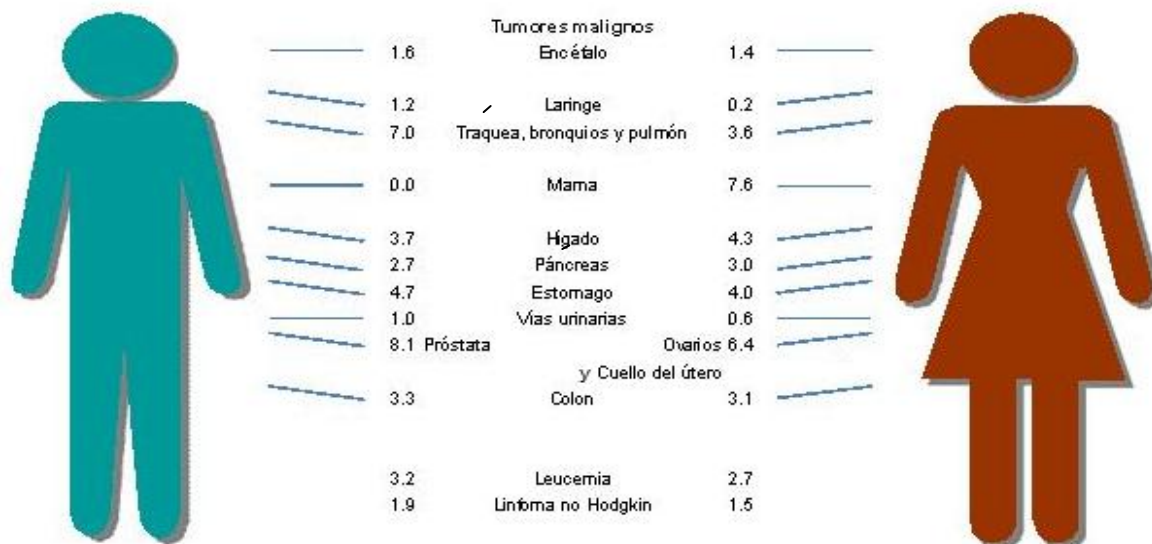


Figura 1. Porcentaje de defunciones por tumores malignos para cada sexo 2008.³

La Secretaria de Salud (SSa) reporta que del egreso hospitalario por cáncer en 2008, la leucemia tuvo mayor presencia (8.7%), seguida de cáncer de mama (5.8%), de cuello de útero (3.3%) y ovario (2.1%).³

2.3. Patogenia del cáncer

En los organismos multicelulares, el número total de células resulta de mantener el equilibrio entre las células en proliferación (mitosis) y la muerte celular. Una interrupción de esta delicada armonía puede conducir al desarrollo de cáncer.⁹

La carcinogénesis es un proceso complejo en el que suelen aparecer más de un cambio genético, además de una serie de factores epigenéticos adicionales (exposición con agentes químicos, radiación y agentes biológicos o virus), que no ocasionan el cáncer por sí mismos, pero aumentan la probabilidad de que la mutación o mutaciones genéticas lo provoquen^{6, 7}. Existen tres categorías principales de cambios genéticos importantes:

- *Activación de protooncogenes a oncogenes*: Los protooncogenes son genes que normalmente controlan la división celular, la apoptosis y la involución, pero se pueden convertir en oncogenes, que inducen la transformación maligna, mediante la acción de virus o carcinógenos.
- *Inactivación de genes supresores de tumor*: Las células normales contienen genes con la capacidad de suprimir los cambios malignos, denominados genes supresores de tumor (antioncogenes) y la pérdida de la función de éstos puede ser el acontecimiento crítico de la carcinogénesis. El gen supresor de tumor *P53* codifica para la proteína del mismo nombre, la cual puede provocar el suicidio de células.
- *Genes de reparación de DNA*: Los genes reparadores de DNA codifican proteínas cuya función normal es corregir errores que

surgen durante el proceso de replicación antes de que las células se dividan. Las mutaciones en este tipo de genes pueden conducir al fracaso en la reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA), lo cual a su vez permite que mutaciones subsecuentes se acumulen.^{6, 7} En la figura 2 se muestran los procesos de proliferación normal y los de una célula cancerosa.

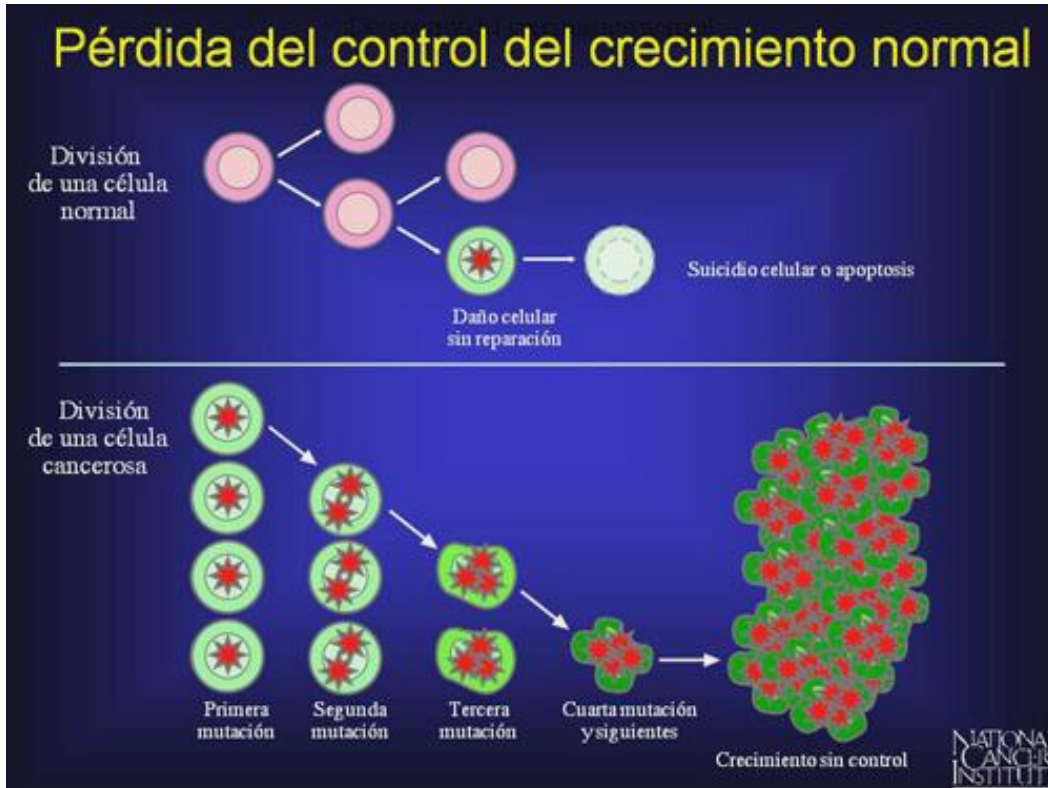


Figura 2. Proceso de proliferación celular durante el cáncer.⁷

La exposición a agentes carcinógenos es la responsable de activar la mayoría de los tipos de cáncer. El desarrollo de la carcinogénesis puede dividirse en diferentes períodos:

- *Iniciación*: Es el resultado directo de la administración del agente químico. Es un proceso rápido, irreversible mediante el cual los productos químicos producen cambios permanentes en la estructura del DNA de la célula diana. Esta etapa implica tres

procesos fundamentales para la célula: metabolismo, reparación del DNA y proliferación celular; la alteración de cualquiera de estas tres fases puede dar comienzo a la carcinogénesis.

- *Promoción*: Es el proceso por el cual se estimula la formación tumoral en el tejido expuesto. En este caso, los cambios tisulares y celulares suelen ser de carácter reversible durante un largo período de latencia, hasta que aparece la primera célula tumoral autónoma, debido a que los agentes promotores producen una alteración en la transducción de señales celulares que reside finalmente en una alteración de la expresión génica. La continuidad del estado de promoción depende en una población celular depende de la administración continua del agente promotor; la eficiencia de esta etapa es sensible a la edad de la célula, a factores de la dieta y hormonales y un buen estado del sistema inmune.
- *Progresión*: El agente progresor es capaz de convertir una célula iniciada o en un estado de promoción a una célula potencialmente maligna, implicando que este período sea el de completa transformación de la célula donde se alcanza su máximo grado de malignidad que puede llevar a metástasis. Es un proceso irreversible, se observa una inestabilidad cariotípica múltiple e incluye la alteración del aparato mitótico, trastorno en la función de los telómeros, hipometilación del DNA, recombinación, amplificación y transposición génica. ¹⁰

La figura 3 representa esquemáticamente la evolución de las fases acabadas de mencionar (iniciación, promoción y progresión) del proceso de la carcinogénesis química.

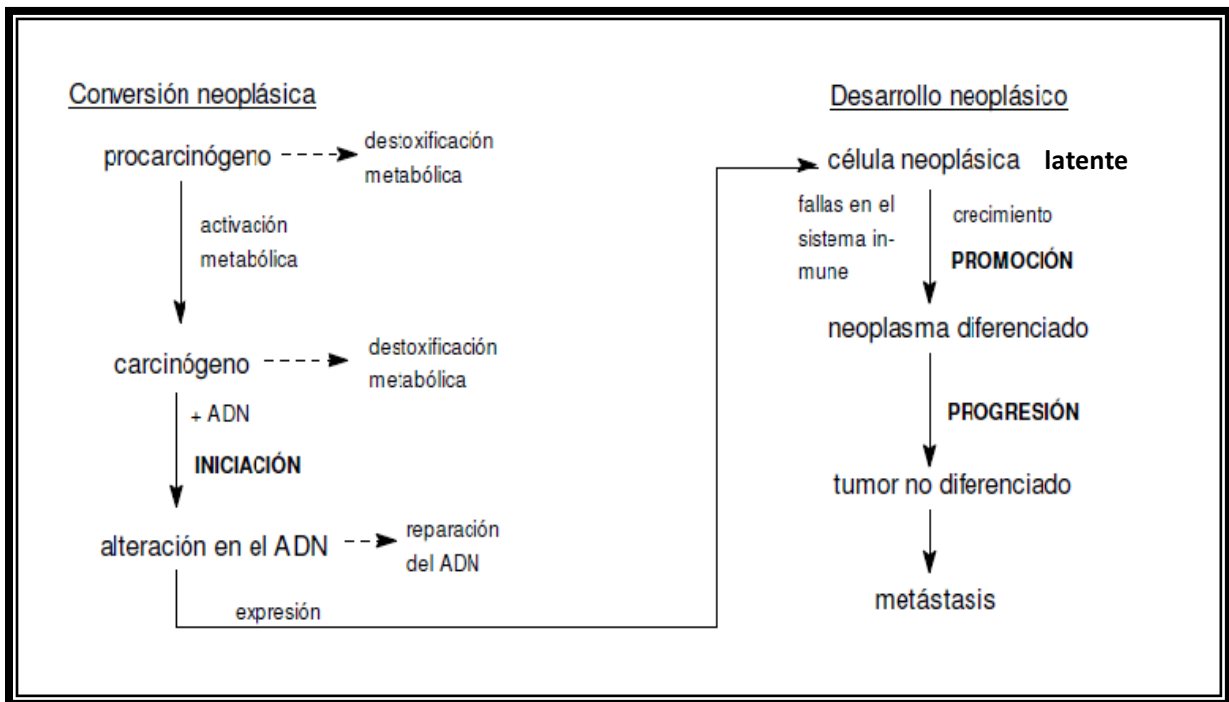


Figura 3. Modelo de carcinogénesis química.¹⁰

2.4. Características especiales de las células cancerosas

Las células cancerosas representan, en grados variables, tres características que las distinguen de las células normales:

- **Proliferación incontrolada:** El ciclo celular es el conjunto de eventos que van desde el nacimiento hasta la división de cualquier célula. Es decir, la proliferación celular propiamente dicha. Algunas células cancerosas proliferan lentamente y otras más rápido, por tanto, el aspecto significativo de este tipo de células no es que proliferen más rápido que las normales, sino que su proliferación no se encuentra sujeta a los procesos reguladores normales de la división celular y el crecimiento tisular. La inactivación de los genes supresores de tumores y la transformación de los protooncogenes en oncogenes pueden conferir autonomía de crecimiento a una célula y así dar lugar a una proliferación incontrolada debido a alteraciones de sistemas celulares como los factores de crecimiento, transductores del

ciclo celular, maquinaria apoptótica y vasos sanguíneos locales (angiogenia).⁵

- *Anaplasia y pérdida de la función:* Una característica especial del crecimiento y división celular es la diferenciación celular, que se refiere a los cambios de las propiedades físicas y químicas, y por consiguiente con las funcionales de las células a medida que proliferan en el embrión, para formar las distintas estructuras y órganos corporales. Las células cancerosas pierden las características de especialización de su tejido de procedencia para convertirse nuevamente en un tipo de células totipotenciales, en un grado variable en los distintos tumores. Por lo general, un cáncer mal diferenciado se multiplica más rápido y tienen un peor pronóstico que uno bien diferenciado.^{5,}

11

- *Metástasis como método de invasividad:* Las células normales no se encuentran fuera de su tejido de origen, ya que durante la diferenciación y el crecimiento de los tejidos y órganos, las células desarrollan ciertas relaciones específicas entre sí. Estas relaciones se mantienen debido a varios factores de supervivencia específicos de tejidos (antiapoptóticos), de modo tal que, que si pierden dichas características las células mueren.

La invasión es la consecuencia de desequilibrios entre la formación y la remoción de matriz extracelular en la zona de choque. Para lograr la invasividad, una célula cancerosa debe adherirse al tejido, por acción de potentes enzimas (p. ej. lipoproteinasas, que lisan la matriz extracelular) y migrar a través del epitelio digerido presentándose una característica distinta de las células cancerosas: su alta de actividad de proteasas.^{5, 12}

Las metástasis son tumores secundarios originados por células que se han liberado desde el tumor inicial o primario y que han alcanzado otras localizaciones por los vasos sanguíneos o linfáticos, o como consecuencia de haberse descamado en cavidades corporales. El proceso de metástasis por vía sanguínea se inicia con el desarrollo y organización de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) hacia la masa neoplásica, que posibilitan la nutrición y crecimiento. ^{5, 12}

En la figura 4, se muestran los factores que influyentes en el proceso de carcinogénesis.

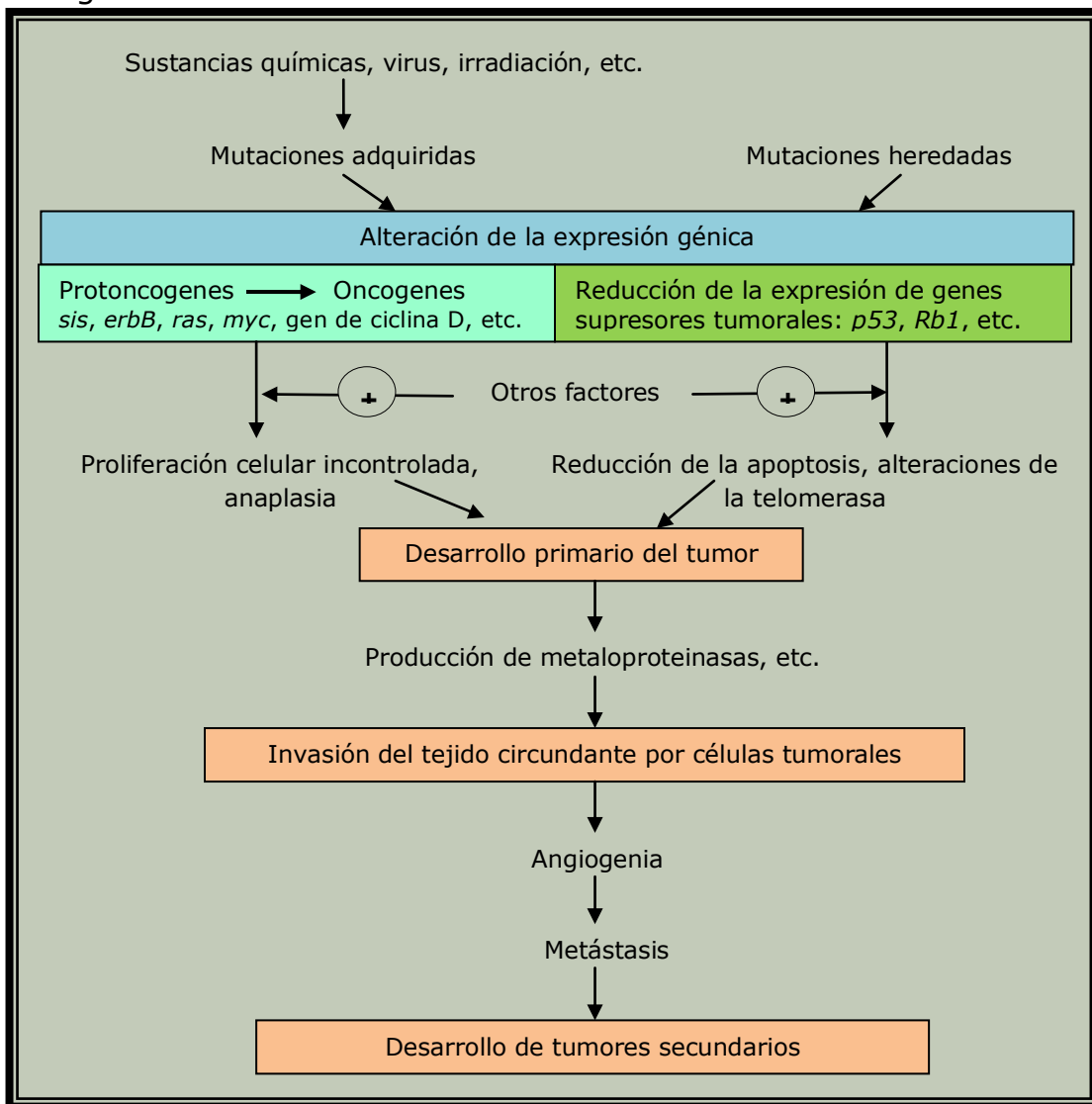


Figura 4. Representación del proceso de carcinogénesis. ^{Adaptado de 5}

2.5. *Cáncer cérvico-uterino*

El útero es un órgano muscular hueco que se ubica en la pelvis femenina, entre la vagina y el recto, tiene la forma de una pera. En el embarazo, sirve como lugar de sujeción y alimentación del feto en el desarrollo antes de su nacimiento.

En la especie humana y los primates, la cavidad del útero presenta un estrechamiento en forma de ranura y está recubierta por mucosa (endometrio); hacia afuera siguen una capa muscular (miometrio) de unos 2 cm de grosor y una túnica peritoneal en las zonas del cuerpo y del fondo (perimetrio). El espacio del tejido conjuntivo a los lados del útero se conoce como parametrio, en él discurren estructuras importantes como el uréter y los vasos sanguíneos que se dirigen al útero.^{13, 14}

El útero mide, de 3 a 4 cm de longitud y unos 2.5 cm de diámetro; consiste de dos partes: el cuerpo del útero y el cuello uterino, este último conecta el cuerpo del útero con la vagina.

El cuello uterino o cérvix es la porción fibromuscular inferior del útero que se proyecta dentro de la vagina. Esta apertura deja que salga la sangre del útero durante la menstruación y también deja que entren los espermatozoides al útero y a las trompas de Falopio.¹⁵

La figura 5 muestra el modelo anatómico del aparato reproductor femenino interno, donde se distinguen, entre otras, las siguientes estructuras: los ovarios (donde se producen y maduran los óvulos), las trompas de Falopio (conductos que comunican a los ovarios con el útero y en los que se produce la fecundación), el útero y sus respectivas mucosas (miometrio y endometrio) y la vagina (canal que comunica con el exterior y dan entrada a los espermatozoides).

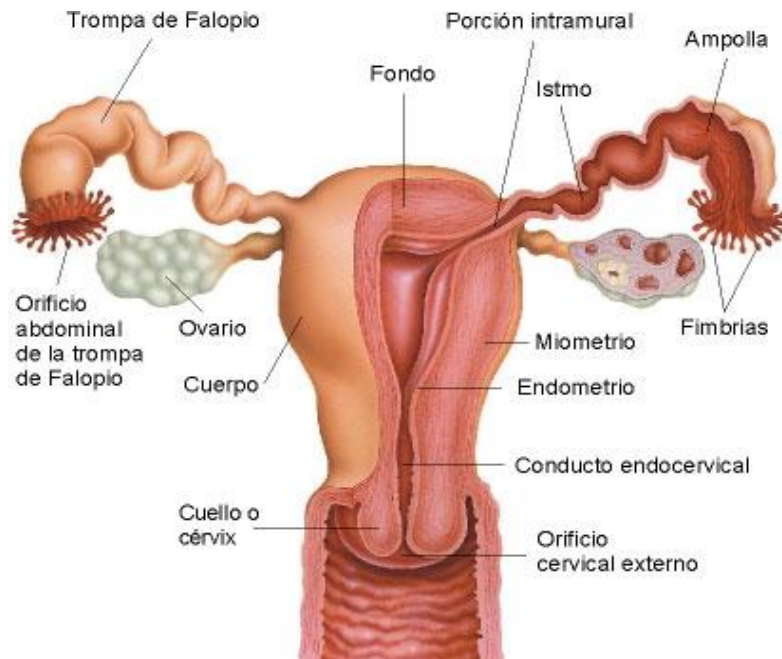


Figura 5. Anatomía del aparato reproductor femenino interno.¹⁶

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) representa el 9% de los casos de cáncer en la población femenina y es la tercera causa de muerte de mujeres a nivel mundial, con más de 529 000 nuevos casos y 275 000 muertes por año. 85% de los casos se presentan en países en vías de desarrollo. La prevalencia global estimada del cáncer cérvico-uterino es de 11.7%.^{17, 18}

En México es la primera causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores de 25 años. El Sistema Nacional de Salud Mexicano brinda atención médica aproximadamente a 9 000 casos de cáncer cérvico-uterino invasor y se registran 4 000 muertes anualmente.

El cáncer cervical se encuentra clínicamente estadificado con base, primeramente, en la inspección y palpación del cérvix, vagina, parametrios y paredes pélvicas. Los criterios de estadificación para CaCu están dados por la International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) y en nuestro país la Secretaria de Salud establece que

la estadificación para el cáncer cervicouterino se hará de acuerdo con este sistema, el cual se presenta en el cuadro 2.¹⁶

Cuadro 2. Criterios para la estadificación del cáncer cérvico-uterino.¹⁷

AJCC TNM FIGO			
Categorías	Estadio	Descripción	
TX	---	Tumor primario no valorable	
T0	---	Sin evidencia de tumor primario	
TIS	0	Carcinoma <i>In situ</i>	
T1	1	Carcinoma <i>In situ</i> confinado al cérvix (debe descartarse la extensión al cuerpo uterino)	
T1a	1a	Carcinoma invasivo diagnosticado sólo por microscopia. Todas las lesiones macroscópicamente visibles son T1B/lb. Invasión estromal con un máximo de profundidad de 5mm medidos de la base del epitelio, y una diseminación horizontal menor a 7mm. La invasión al espacio vascular, venoso o linfático no afecta la clasificación.	
T1a1	1a1	Invasión estromal no más profunda de 3mm y no mayor de 7mm de diseminación horizontal.	
T1a2	1a2	Invasión estromal mayor de 3mm pero menor de 5mm y no mayor a 7mm de diseminación horizontal.	
T1b	1b	Lesión visible limitada al cérvix o enfermedad microscópica mayor que T1a2/1a2.	
T1b1	1b1	Lesión clínicamente visible no mayor de 4cm.	
T1b2	1b2	Lesión clínicamente visible mayor a 4cm.	
T2	II	El tumor se extiende más allá del útero, pero no a las paredes laterales de la pelvis, ni al tercio inferior de la vagina.	
T2a	IIa	Compromiso vaginal sin compromiso parametrial.	
T2b	IIb	Tumor con compromiso parametrial.	
T3	III	El tumor se extiende a las paredes parametriales de la pelvis, causa hidronefrosis o se extiende al tercio inferior de la vagina.	
T3a	IIIa	Compromiso del tercio inferior de la vagina sin extensión a la pared pélvica.	
T3b	IIIb	Tumor que se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o desfuncionaliza el riñón.	
T4	IVa	Tumor que invade la mucosa de la vejiga o recto, y/o se extiende más allá de la pelvis verdadera.	
M1	IVb	Metástasis a distancia.	
Ganglios linfáticos regionales (N)			
NX		Ganglios linfáticos regionales no valorables.	
N0		Sin metástasis a ganglios linfáticos regionales.	
N1		Metástasis ganglios linfáticos regionales.	
Metástasis a distancia			
MX		Metástasis a distancia no valorables.	
M0		Sin metástasis a distancia.	
M1		Con metástasis a distancia.	
Estadios por grupo			
Estadio 0	TIS	N0	M0
Estadio I a 1	T1a1	N0	M0
Estadio I a 2	T1a2	N0	M0
Estadio I a b	T1b1	N0	M0
Estadio I a 2	T1b2	N0	M0
Estadio IIa	T2a	N0	M0
Estadio IIb	T2b	N0	M0
Estadio IIIa	T3a	N0	M0
Estadio IIIb	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3a	N1	M0
	T3b	Cualquier N	M0
Estadio IVa	T4	Cualquier N	M0
Estadio IVb	Cualquier T	Cualquier N	M1

El virus del papiloma humano (HPV por sus siglas en inglés) ha sido identificado como el principal factor etiológico en la carcinogénesis cervical. El HPV puede ser clínicamente clasificado como de bajo riesgo (Low Risk-HPV "LR-HPV") y de alto riesgo (High Risk-HPV "HR-HPV") dependiendo de la propensión relativa de las lesiones asociadas a este virus, sometiéndolas a progresiones malignas. La cepa HPV16 es el tipo de HPV de alto riesgo más prevalente, seguido de la cepa HPV18. LR-HPV genera displasias moderadas o verrugas genitales, mientras que RH-VPH se asocian con displasias cervicales o displasias cervicales intraepiteliales (CIN), entre otras. La mayoría de estos tipos de cáncer provienen de lesiones que estuvieron tras un largo período de exposición a la infección, ya que la mayoría de las infecciones por HPV son subclínicas y transitorias, y en la mayoría de los casos se resuelven espontáneamente a consecuencia de la respuesta inmune del hospedero. En pocos sujetos, cuando el virus no es suprimido, la infección progresa a CIN y desarrollándose hasta carcinoma cervical.^{18, 19, 20}

Se sabe, que un tipo de proteínas denominadas E6 y E7 se encuentran codificadas en HPV y juegan un rol crítico en el carcinoma cervical, dado que E6 es una oncoproteína viral que se une a p53 mientras que E7 se une a un retinoblastoma (RB), proteína de la familia de supresores de tumor y de esta manera se altera la división celular.²¹

HeLa es una línea celular de cáncer cérvico-uterino positiva para HPV18, que se obtuvo de una biopsia de una mujer afroamericana que se llamaba Henrietta Lanks por el hospital de la Universidad Johns Hopkins de Baltimore en 1952 y fue clasificada como cáncer cervical invasivo.²⁰

Las células resultan positivas a queratina con la tinción por inmunoperoxidasa. La expresión de P53 es baja y los niveles de de pRB (supresor de retinoblastama) son normales. Las condiciones de propagación son en medio Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM)

suplementado al 10% con suero fetal bovino con una atmosfera 95% de aire y 5% CO₂ a 37 °C.²²

Con ayuda de la línea de cultivo de células HeLa se produjo la vacuna contra la poliomielitis (Salk), las primeras células híbridas entre ser humano y ratón, innumerables ensayos en cáncer, medicamentos para la enfermedad de Parkinson y mapeo genético.²³

2.6. *Cáncer de colon*

El colon y el recto forman parte del intestino grueso, que a su vez es parte del sistema digestivo, el cual se encarga de absorber los nutrientes de los alimentos para producir energía y eliminar los desechos sólidos del organismo. Después de la masticación y deglución del alimento, sólo se requieren 5 o 10 segundos para que descienda al esófago y entre al estómago, donde permanece de 2 a 6 horas para su digestión parcial. La digestión final y la absorción de nutrientes se producen en el intestino delgado durante un período que comprende de 5 a 6 horas. En un período de 12 a 24 horas, el material no digerido se desplaza al intestino grueso y las heces se eliminan a través del ano.

El intestino grueso se encuentra conectado al intestino delgado por una unión en forma de T, donde un esfínter controla el movimiento del material; a un brazo de la T en forma de saco se le denomina ciego del cual, en los seres humanos, sobresale una extensión similar a un dedo que se le conoce como apéndice.^{15, 24}

Una función importante del colon es la recuperación del agua que ha ingresado en el canal alimentario como disolvente de diversos tubos digestivos. Los desechos del tracto digestivo, las heces, se hacen más sólidas al moverse a lo largo del colon mediante el peristaltismo, además en el colon también habita la microbiota habitual humana que contribuye con la síntesis de algunas vitaminas (vitamina K y vitaminas del complejo B), colabora con procesos digestivos y compite con los

microorganismos patógenos por nutrientes. El colon consta de 4 secciones:

- *Colon ascendente*: Inicia en la zona de unión del colon y e intestino delgado. Se extiende hacia arriba por el lado derecho del abdomen.
- *Colon transverso*: Se desplaza por el cuerpo desde el lado derecho hacia el izquierdo en el abdomen superior.
- *Colon descendente*: Sigue por el lado izquierdo hacia abajo.
- *Colon sigmoide*: Se une al recto y al ano.^{15, 24}

En la figura 6 se indican las partes que constituyen al intestino grueso.

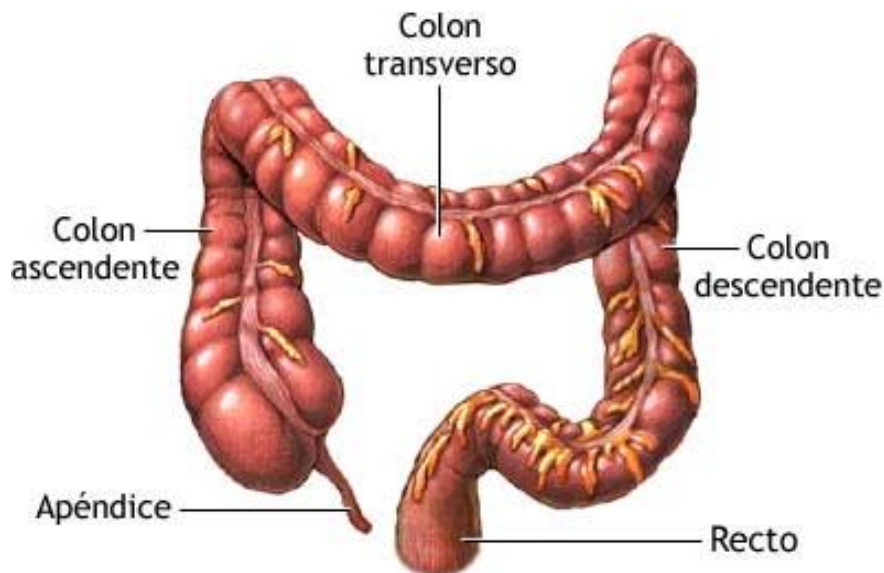


Figura 6. Anatomía del intestino grueso en humanos.²⁵

El cáncer de colon es uno de los cánceres más comunes en todo el mundo; es el tercero con mayor prevalencia en el mundo occidental para hombres y mujeres; representa el 10% de nuevos casos y el 10%

de muertes. La OMS estima que 945 000 nuevos casos se producen anualmente, con 492 000 muertes. Como ocurre en la mayoría de los tipos de cáncer, la interacción de los efectos ambientales y la genética desempeñan un papel importante en la carcinogénesis del colon.^{26, 27}

Los factores ambientales y el estado metabólico juegan un claro papel en los cambios moleculares que pueden modificar el riesgo de cáncer de colon. Observaciones epidemiológicas sugieren que la dieta, los fármacos (anti-inflamatorios no esteroideos), antioxidantes y calcio pueden retrasar la aparición de este tipo de cáncer o causar la regresión de su adenoma precursor, sugiriendo así que el ambiente puede constituir un importante efecto protector. Específicamente para este tipo de cáncer, la obesidad y sus efectos posteriores pueden conducir a una serie de cambios que aumentan el riesgo de la enfermedad.²⁶

Aproximadamente del 5 al 10% de todos los clases de cáncer de colon se desarrollan en el establecimiento de definidos síndromes de cáncer hereditario, siendo las dos formas principales la poliposis adenomatosa familiar (FAP), la cual es el primer cambio patológico, adenoma, que se considera una lesión premaligna, y el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC). La FAP es una enfermedad autosómica dominante que, en aproximadamente el 80% de las personas afectadas, se puede identificar una mutación en el gen *APC* (Adenomatous poliposis coli); un grupo pequeño con FAP y FAP atenuada presentan mutaciones bialélicas del gen *MYH*. Los pacientes con FAP pueden desarrollar más de 100 adenomas colorrectales. Las variantes genotípicas principales entre la FAP y la FAP atenuada son que en FAP la mutación asociada a mayor riesgo en el desarrollo del tumor se da entre los codones 1445 y 1578 mientras que en FAP atenuada presentan mutación en 5' (cercano al codón 1517) o en 3' (cercano al codón 1900) en el gen *APC*.

HNPCC también es un desorden autosómico dominante causado por mutaciones puntuales de los genes reparadores. Los tumores

provenientes de este síndrome tienen una característica molecular típica, conocida como inestabilidad microsatelital, la cual se define como mutaciones frecuentes en los microsatélites, en pequeñas repeticiones de secuencias de DNA; aproximadamente el 15% de los casos se ve afectada en desajustes de la caja de adenina (A_{10}) en la región codificada por el receptor TGF- β tipo II del gen *TGFBR2* afectada por mutaciones. Tradicionalmente la carcinogénesis colorrectal puede explicarse por dos vías de gatekeeper: La responsable del 85% de los casos esporádicos de cáncer colorrectal es el mecanismo interno de la FAP, donde se encuentran los genes que regulan el crecimiento (mutación en el gen supresor de tumor *APC*). La HNPCC es el otro camino, causante del 15% de los casos esporádicos de cáncer colorrectal.^{27, 28}

Adicional a la acumulación de alteraciones genéticas, los cambios epigenéticos acumulados transforman las células normales del epitelio del colon en células de adenocarcinoma. Los principales mecanismos epigenéticos en el cáncer de colon son:

- *Metilación de DNA*: El patrón de metilación del DNA se establece en el desarrollo y se mantiene a lo largo del genoma; en el cáncer, varias islas CpG se encuentran metiladas. Este tipo de aberraciones cromosómicas son el primer paso en la progresión del cáncer de colon, ya que la hipometilación del DNA activa los protooncogenes y la inestabilidad genómica.
- *Modificación de histonas*: Las proteínas histonas se ensamblan con el DNA en nucleosomas que funcionan como reguladores de la transcripción. Las diferentes modificaciones postranscripcionales de las histonas influyen en su región amino terminal, afectando la estructura de la cromatina que establece un complejo de silenciamiento de genes.

- *No codificación de microRNAs*: Los miRNAs son tipos de RNA endógenos no codificados que inhiben la traslación de pares de base en la región 3'. Se predice que hasta un tercio de los RNAm se encuentran regulados por miRNAs. Poseen secuencias promotoras que se une a p53, cuya actividad se pierde en los tumores colorrectales.²⁹

Los criterios de estadificación de cáncer de colon se lleva a cabo mediante un procedimiento quirúrgico y se divide en etapas de acuerdo al cuadro 3.

Cuadro 3. Criterios para la estadificación del cáncer de colon.⁷

Estadio	Descripción
Etapa 0	Carcinoma <i>in situ</i> .
Etapa I	Existe diseminación fuera de la capa más interior del colon, complica la pared interior del colón pero sin haberse diseminado a la pared exterior.
Etapa II	Diseminación fuera del colon a tejidos vecinos, pero no a ganglios linfáticos.
Etapa III	Existe diseminación a ganglios linfáticos, pero no a otras partes del cuerpo.
Etapa IV	Diseminación a otras partes del cuerpo.
Recurrente	Significa que el cáncer ha reaparecido después de haber sido tratado.

HCT-15 es una línea celular de cáncer de colon que se caracterizan por defectos en el sistema de reparación de DNA (proteína hMSH6); además contienen una secuencia mutante de *p53*.³⁰

Las células resultan ser positivas para queratina con la tinción de inmunoperoxidasa y negativas para CSAp. Las condiciones de propagación de esta línea celular son medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% a una temperatura de 37 °C. Han sido utilizadas en diversos estudios contra el cáncer.³¹

2.7. *Tratamientos para el cáncer*

Para combatir el cáncer se utilizan diversos tratamientos que dependen de un gran número de factores, dentro de los cuales se pueden mencionar: el tipo de cáncer, la localización, tamaño de la masa tumoral, edad y estado general del paciente. El tratamiento básico del cáncer se basa en tres pilares: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, que pueden administrarse solos o en asociación. Además, se utilizan otros tratamientos, como la inmunoterapia o la terapia génica.

- *Cirugía*: Es la forma más antigua de tratamiento del cáncer. Cerca del 60% de los pacientes se someten a cirugía, ya sea por sí misma o en combinación con otras terapias. Sin embargo, sólo puede ser utilizada si el tumor está bien localizado y diferenciado.
- *Radioterapia*: Es la utilización de radiación para el tratamiento del cáncer, la cual proviene de rayos γ , rayos X de alta energía (cuya importancia radica en que se pueden radiar zonas específicas sin dañar tejido sano), o bien de radiofármacos de algunos de los elementos radioactivos como ^{60}Co , ^{198}Au , ^{131}I . La radiación al pasar por agua produce electrones que a su vez producen radicales libres que pueden dañar el DNA y de esta forma provocar la muerte celular mediante mecanismos de apoptosis. A pesar de ser una técnica bien establecida se sigue investigando determinar tiempos óptimos de exposición y frecuencia de la radiación empleada.^{15, 32}
- *Quimioterapia*: Como tratamiento antineoplásico, consiste en la administración de medicamentos de acción intensa y se utiliza generalmente cuando existe metástasis o como tratamiento complementario posterior a una cirugía para evitar la reaparición.

Debido a que estos medicamentos afectan células en proliferación continua (normales y cancerosas) se ven involucradas reacciones adversas no deseables como son una alta toxicidad en distintos órganos, alteración de la cicatrización de las heridas, inmunosupresión, pérdida del cabello, náuseas y vómito, los cuales también dependen de la cantidad administrada y la duración del tratamiento.^{15, 33}

- *Inmunoterapia*: También conocida como bioterapia o modificadores de la respuesta biológica, consiste en la estimulación o restauración del sistema inmune para combatir el cáncer, lo cual se lleva a cabo mediante la administración de vacunas (células tumorales muertas o antígenos tumorales), inmunomoduladores (interleucinas), interferones o anticuerpos monoclonales que pueden estar acoplados o no, a isótopos radioactivos o fármacos antineoplásicos. Puede utilizarse también para disminuir los efectos secundarios de los fármacos quimioterapéuticos.^{15, 34}
- *Terapia génica*: Es una nueva alternativa de tratamiento, la cual hace uso del conocimiento del genoma humano, la virología, la biología molecular y la inmunología para combatir esta enfermedad. El tratamiento radica en la inserción de un gen funcional para sustituir un gen defectuoso o ausente, restaurando así la función normal de la célula. Hasta inicios del 2009, la terapia génica seguía siendo experimental, por lo cual aplicarla en el cáncer es todo un reto, debido a que esta enfermedad no es causada por un defecto genético único, sino por una combinación de defectos genéticos; muchos tratamientos genéticos están siendo estudiados actualmente para ver qué tan seguros y eficaces podrían ser.³⁵

2.8. Quimioterapia antineoplásica

De manera general los fármacos quimioterapéuticos clásicos actúan sobre la síntesis de DNA o en los mecanismos que intervienen en la mitosis, que es el proceso real por el cual una célula se divide en dos células nuevas y se presenta la proliferación celular. Los principales fármacos antineoplásicos se pueden dividir en las siguientes categorías generales; que se presentan a continuación en la figura 7.

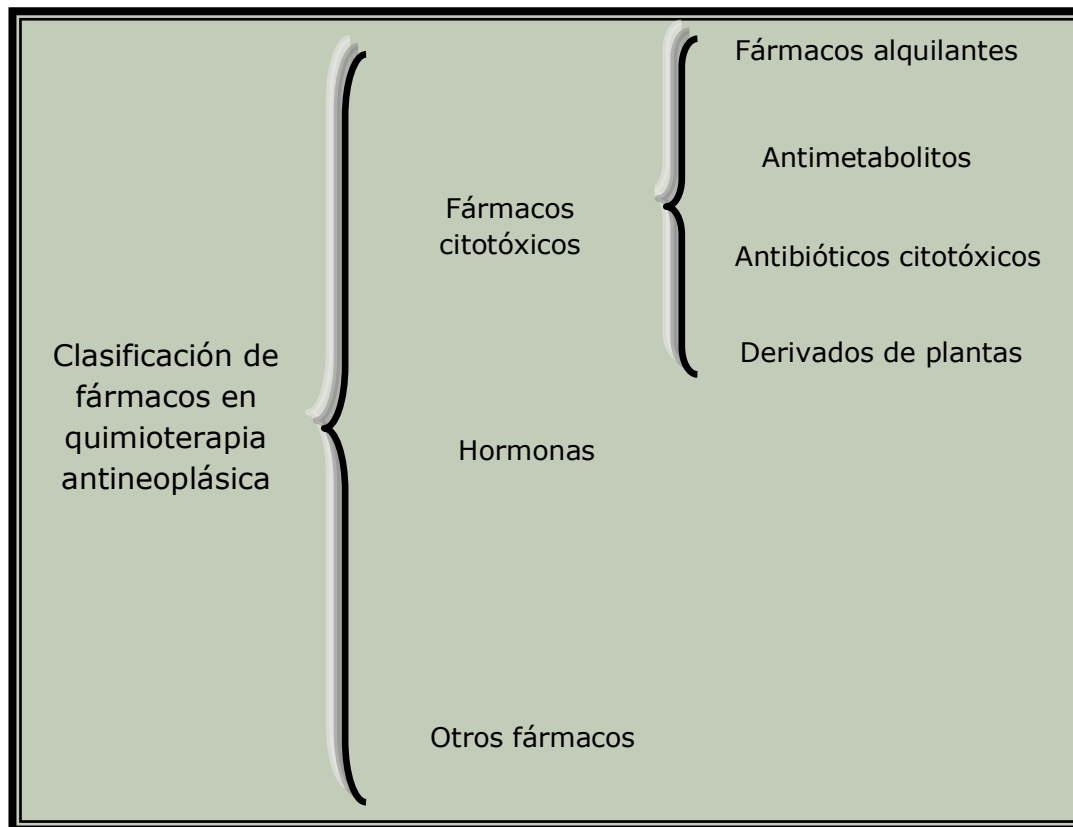


Figura 7. Clasificación de los principales fármacos antineoplásicos.⁵

2.8.1 Fármacos citotóxicos

a) Fármacos alquilantes y compuestos relacionados: Fueron los primeros fármacos quimioterapéuticos descubiertos, utilizados por Goodman y Gilman para tratar a un hombre con linfoma. Este tipo de fármacos contienen grupos químicos que pueden formar enlaces covalentes con componentes de la célula, siendo

el ión carbonio el reactivo intermedio. La mayoría presenta dos grupos alquilantes (son bifuncionales) y pueden establecer enlaces entrecruzados entre dos puntos nucleófilos, como el nitrógeno 7 (N7) de la guanina del DNA. Su principal efecto tiene lugar durante la síntesis de DNA; la lesión resultante de DNA desencadena la apoptosis. Los efectos secundarios son la mielodepresión, esterilidad y riesgo de leucemia no linfocítica.^{5,}

33

El cuadro 4 enlista los principales fármacos pertenecientes a este grupo.

Cuadro 4. Principales fármacos del grupo de alquilantes.^{5, 33}

Agentes alquilantes					
Mostazas nitrogenadas	Nitrosoureas	Alquilsulfonatos	Etilenoiminas	Triazenos	Complejos de platino *
Ciclofosfamida Clorambucilo Iofosfamida Melfalán Estramustina	Lomusina Carmustina Estramustina Fotesmustina	Busulfán Treasulfán	Tiotepa	Dacarbacina Temozolomida	Cis Platino Carboplatino Oxaliplatino

* Acción análoga a los alquilantes.

El Cis-diamino-dicloro platino(II) (*Cis platino*) es un complejo de coordinación planar hidrosoluble que contiene un átomo central de platino rodeado por dos átomos de cloro y dos grupos amonio. Cuando entra en la célula, el cloro se disocia, lo que deja un complejo reactivo que reacciona con el agua y que posteriormente interactúa con el DNA. Produce enlaces cruzados en el interior de las hebras, probablemente entre el N7 y O6 de las moléculas adyacentes de guanina, lo que da lugar a la desnaturalización de la cadena de DNA. Es muy

nefrotóxico, salvo que se instauren regímenes de hidratación y diuresis, su mielotoxicidad es baja, produce náuseas y vómitos muy intensos, sin embargo los antagonistas del receptor 5-HT₃ (por ejemplo ondansetrón) son eficaces para prevenir algunos de esos síntomas logrando así atenuar el tratamiento con *Cis platino*.^{5, 36, 37}

Para el cáncer cérvico-uterino, a partir del estadio Ib2 la cirugía no es opción terapéutica para este tipo de pacientes, debido a la elevada proporción de márgenes positivos y factores de alto riesgo de recidiva, por lo cual la radioterapia pélvica concomitante con quimioterapia basada en *Cis platino* son la opción de tratamiento para los estadios siguientes.^{5, 38}

En el caso del cáncer de colon existen actualmente siete fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamento (FDA), dentro de los cuales se encuentra el oxaliplatino en combinación con el 5-fluorouracilo (5-FU) y leucovorin, lo cual se conoce como régimen FOLFOX. El oxaliplatino es un análogo de *Cis platino* pero con patrones de actividad y toxicidad diferentes, en monoterapia es un fármaco que ha demostrado una actividad similar al 5-FU, con un porcentaje de respuestas efectivas entre el 17 y 22%.^{39, 40}

- b) Antimetabolitos: Este tipo de fármacos actúan bloqueando o interrumpiendo las vías de síntesis de DNA y RNA al sustituir los elementos fundamentales de estas moléculas. Estos agentes dañan durante la fase S del ciclo celular.

Los principales fármacos del grupo de antimetabolitos, se enlistan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Principales fármacos del grupo de antimetabolitos.^{5, 33}

Antimetabolitos		
Antagonistas de folato	Análogos de pirimidina	Análogos de purinas
Metotrexato	Fluorouracilo Raltitrexed Permetrexed Capacitabina Gemcitabina	Fludarabina Pentostatina Cladribina Mercaptopurina Tioguanina

c) Antibióticos citotóxicos: Se trata de un grupo muy empleado de fármacos, que ejercen sus efectos principalmente al actuar de forma directa sobre el DNA inhibiendo su duplicación. En general no se deben combinar con radioterapia, porque la toxicidad acumulada será demasiado alta.

Los fármacos básicos que constituyen este grupo se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Principales fármacos del grupo de antibióticos citotóxicos.^{5, 33}

Antibióticos citotóxicos	
Antraciclinas	Otros
Doxorrubicina	Dactinomicina
Idarrubicina	Bliomicina
Epirubicina	Mitomicina
Mitoxantona	Procarbacin

d) Derivados de plantas: Varias sustancias naturales ejercen poderosos efectos citotóxicos y se han ganado un lugar en el arsenal de fármacos antineoplásicos. Su mecanismo de acción se basa en la unión con la tubulina e inhiben su polimerización a microtubulos, lo que impide la formación de husos en las células que realizan mitosis, originando una detención en

metafase. Los efectos tóxicos que presentan son mielodepresión y neurotoxicidad, la cual varía dependiendo de la planta utilizada.^{5, 33, 34, 36}

En el cuadro 7 se indican los principales fármacos pertenecientes al grupo de derivados de plantas.

Cuadro 7. Principales fármacos del grupo de derivados de plantas.^{5, 33}

Derivados de plantas		
Alcaloides de la vinca (<i>Vinca minor</i>)	Taxanos (<i>Taxus</i>)	Camptotecinas
Vincristina	Paclitaxel	Irinotecán
Vinblastina	Docetaxel	Topotecán
Vindesina		
vinorelbina		

2.8.2 Hormonas: Los tumores derivados de tejidos sensibles a hormonas pueden ser dependientes de hormonas, un efecto que se relaciona con la presencia de receptores esteroideos en las células malignas. Su crecimiento puede inhibirse por las hormonas que tienen acciones opuestas, por antagonistas hormonales o por fármacos que inhiben la síntesis de las hormonas endógenas. Así mismo, los isótopos radioactivos son importantes en el tratamiento de tumores sensibles a hormonas, como por ejemplo el yodo radioactivo (¹³¹I) para el tratamiento de cáncer de tiroides.

El cuadro 8 enlista ejemplos de los principales fármacos que engloba el grupo de hormonas.

Cuadro 8. Principales fármacos del grupo de hormonas. ^{5, 33}

Hormonas						
Hormonas				Antagonistas hormonales		
Glucocorticoesteroides	Estrógenos	Progestágenos	^a AHLG	Anti - estrógenos	Anti- androgenos	^b ISHS
Prednisolona Dexametasona	Dietilbestrol Etiniloestradiol	Megestrol Norehisterona Medroxi- progesterona	Goserrelina Buserrelina Leuprorrelina Triptorrelina	Tamoxifeno Toremifeno Letrozol Amino - glutetinida	Flutamida Bicalutamida	trilostano

^aAHLG: Análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas.

^bISHS: Inhibidores de la síntesis de hormonas suprarrenales.

2.8.3 Otros fármacos: Aquí se engloban a los fármacos quimioterapéuticos que ejercen su acción de manera ligeramente diferente y por lo tanto no se les clasifica en ninguna de las otras categorías. Ejemplos de ellos son la crisantaspasa, amsacrina, mesilato de imatinib y modificadores de la respuesta biológica (interferón α , aldesleucina y tretinoína). ^{5, 33, 35}

En la figura 8 hace una recapitulación de los fármacos actualmente disponibles para llevar a cabo el tratamiento quimioterapéutico, mencionando los distintos grupos en los que se encuentran clasificados, la cual, como ya se ha mencionado se establece en base a su mecanismo de acción.

Los sitios de acción en los que pueden actuar son: a nivel de la síntesis de purinas, de pirimidias, de desoxirribnucleótidos, de DNA o de RNA, así como también a nivel de la de proteínas, las enzimas o los microtúbulos.

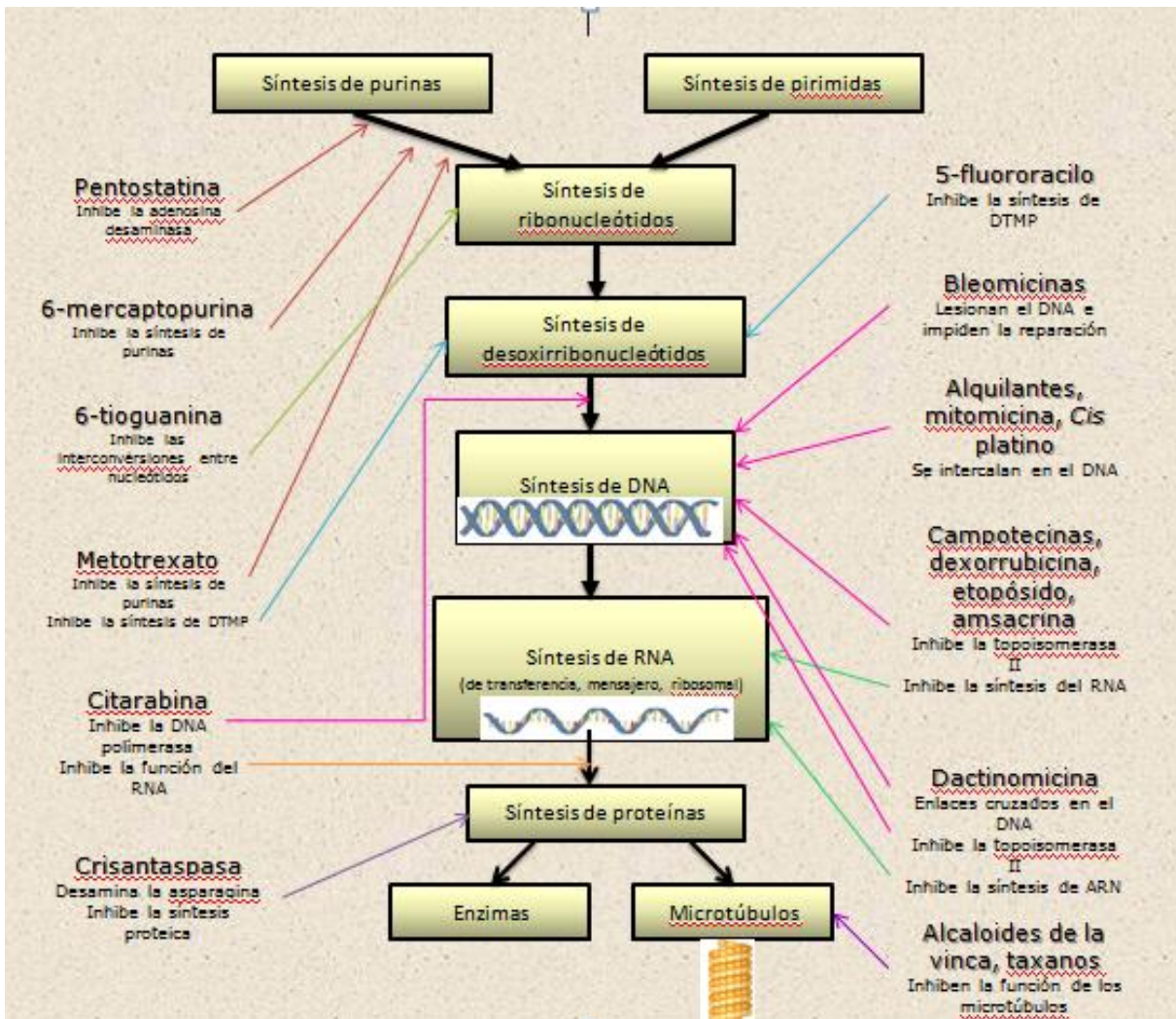


Figura 8. Principales sitios de acción de los fármacos antineoplásicos utilizados comúnmente. Adaptado de 5

2.9. Compuestos de estaño

La química de derivados de estaño ha despertado mucho interés en las últimas décadas, debido principalmente a sus diversas aplicaciones biológicas y en el campo de los materiales. De la misma manera ha surgido un gran interés en complejos metálicos de bases de Schiff derivados de aminoácidos y salicilaldehído, gracias a sus propiedades estructurales, magnéticas y electroquímicas, así como su uso potencial como modelos para una serie de importantes sistemas biológicos.

El metal como tal se deriva de muchos minerales, principalmente de la casiteria (SnO_2). Los usos más comunes de los compuestos inorgánicos de estaño se encuentran como estabilizadores de polímeros en el PVC, fungicidas, pastas dentales, amalgamas, desinfectantes y antibióticos. Una de las más importantes áreas de investigación en química bioinorgánica es el estudio de los compuestos diorganoestánicos por la actividad citotóxica y antiproliferativa que se les ha asociado. Además los complejos de estaño (IV) se caracterizan por la presencia de uno o más enlaces carbono – estaño y han demostrado ser citotóxicos contra el adenocarcinoma de mama MCF -7 y el carcinoma de colon WiDr (16). Los compuestos de estaño se han sintetizado para investigar su posible actividad *in vitro* e *in vivo* en células de cáncer y con referencia al *cis* platino. En general, la toxicidad de los compuestos orgánicos de estaño parece aumentar con la longitud de la cadena de los grupos orgánicos de alquilo, que a menudo son más activos que los arilo.^{41, 42}

El grupo de trabajo del doctor Norberto Farfán, sintetizó complejos diorganoestánicos (IV) de base de Schiff mediante un procedimiento de una etapa que conducen a la formación exclusiva de un producto con buenos rendimientos.

Previamente, en la Unidad de Experimentación Animal, se realizaron estudios con 17 de esos compuestos en un panel de tres líneas celulares de cáncer: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HCT-15 (adenocarcinoma de colón) y HeLa (adenocarcinoma de cérvix), dónde el porcentaje de concentración de supervivencia frente a cada compuesto (0-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se puso a prueba y la concentración inhibitoria medio (CI_{50}) se determinó por análisis Probit. Los compuestos reportaron en esos estudios, alta actividad antineoplásica sin importar la línea celular, sin embargo en la búsqueda de una mejor CI_{50} y de la optimización de los compuestos, se decidió realizar más estudios con otros sustituyentes.⁴¹

Las claves de los compuestos estudiados se asignaron con las letras NF, la molécula núcleo y los distintos sustituyentes de cada uno de los compuestos que se probaron en este proyecto para la obtención de la CI_{50} no pueden ser revelados. Las claves de los compuestos utilizados se y las líneas donde fueron probados se muestran en el cuadro 9:

Cuadro 9. Clave de los compuestos utilizados.

Clave del compuesto	Línea celular en la que se probó
NF60	HCT-15
NF61	HCT-15
NF66-OH	HCT-15
NF69-OH	HCT-15
NF73	HCT-15
NF74	HCT-15 y HeLa
NF82	HCT-15 y HeLa
NF85	HCT-15
NF86	HCT-15
NF87	HCT-15
NF88	HCT-15 y HeLa

La comprensión de los eventos moleculares que regulan la apoptosis en respuesta a la quimioterapia contra el cáncer, y como las células cancerosas evaden la muerte apoptótica, ofrece nuevas oportunidades para un enfoque más racional para el desarrollo de terapias moleculares dirigidas para esta enfermedad.⁴⁸

2.10. Apoptosis

La apoptosis es un tipo de suicidio celular que tiene un rol central en la morfogénesis, el desarrollo, la homeostasis y en los mecanismos de defensa de los organismos pluricelulares. Es un proceso innato, evolutivamente conservado mediante el cual las células sistemáticamente inactivan, desensamblan y degradan su propia estructura y componentes funcionales para completar su propia muerte.^{43, 44}

Las células apoptóticas presentan varias modificaciones bioquímicas tales como: corte de la proteína, la proteína de reticulación, ruptura del DNA, el reconocimiento fagocítico, contracción de ellas mismas y condensación de sus organelos, dando como resultado la formación de cuerpos apoptóticos.

Otra de las características bioquímicas es la expresión de marcadores de superficie celular que se traducen en el reconocimiento temprano de fagocitosis de las células apoptóticas por las células adyacentes, permitiendo la fagocitosis lo que compromete mínimamente al tejido circundante; pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, incremento del calcio intracelular, decremento de la síntesis macromolecular y pérdida de los iones de la célula. La externalización de la fosfatidilserina (lípidos de la membrana) en la superficie de la célula apoptótica, que funciona como una señal de reconocimiento para los fagocitos.^{9, 43, 44}

Las caspasas (**C**isteyne – **as**partic acid – prote**ases**) son una familia evolutivamente conservada de proteasas con residuos de cisteína en su sitio catalítico que escinden las proteínas con secuencias específicas de aminoácidos. Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos (pro-caspasas) en la mayoría de las células, que tras la escisión proteolítica se activan para convertirse en las caspasas que cortan a los sustratos de diferentes proteínas. Esta cascada proteolítica, en la que la

que una determinada caspasa puede activar a otras caspasas, amplifica la vía de señalización apoptótica y por lo tanto conduce a la muerte celular rápida. Se han identificado 14 tipos de caspasas identificadas en los seres humanos, de las cuales, dos terceras partes juegan un papel importante en la apoptosis, dependiendo de su punto de entrada en la vía apoptótica.

Las caspasas iniciadoras se activan y se unen a las proformas inactivas de las caspasas efectoras. Las caspasas efectoras, a su vez se unirán de forma secuencial a proteínas substratos dentro de la célula, que conducen a la apoptosis.

Se han descrito y caracterizado dos principales vías de señalización para la ejecución de la apoptosis dependiente de caspasas; la vía extrínseca o muerte del receptor y la vía intrínseca o mitocondrial. Ambas vías convergen en la misma vía de ejecución o término, la cual es iniciada por la escisión de la caspasa 3 que resulta en la fragmentación del DNA, la degradación de las proteínas del citoesqueleto y nucleares, la reticulación de proteínas, formación de cuerpos apoptóticos, la expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas y finalmente la absorción por ese mismo tipo de células.^{9, 43, 44, 45, 46}

* Vía extrínseca (muerte del receptor): Esta vía de señalización implica iniciar la apoptosis mediante interacciones transmembranales mediadas y regidas por un receptor de muerte, en los cuales se incluye a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), que es un grupo de proteínas de membrana de tipo 1 con característicos dominios extracelulares ricos en cisteína y cuentan con un dominio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos llamado el "dominio de muerte", el cual desempeña un papel fundamental en la transición de la señal de muerte de la superficie celular de las vías de señalización intracelular. Los ligandos mejor caracterizados y los receptores de muerte correspondientes identificados hasta la fecha, incluyen

FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5. Otros receptores de esta familia también son TRAMP, DR6, EDAR y NTR.^{46, 47}

La secuencia de eventos que definen la fase extrínseca de la apoptosis se encuentran mejor caracterizadas con los modelos FasL/FasR y con TNF α /TNFR1 puesto que en ambos hay un agrupamiento de los receptores y la unión con el ligando homólogo trimérico. Posterior a la unión del ligando, las proteínas citoplasmáticas adaptadoras son incorporadas y exhiben sus dominios de muerte correspondientes para poder unirse con sus receptores. La unión del ligando Fas con su receptor resulta en la unión de la proteína adaptadora FADD y la unión del ligando TNF con el receptor correspondiente da como resultado la proteína adaptadora TRADD. Consecutivamente FADD se asocia con la procaspasa 8 a través de la dimerización del dominio efector de muerte, formando un complejo de señalización de muerte (DISC), dando como resultado la activación autocatalítica de la procaspasa 8 e iniciando la fase de ejecución de la apoptosis a través de las caspasas efectoras. Varios autores han reportado que la pro-caspasa 8 también puede activarse por algunos fármacos antineoplásicos, estrés oxidante y radiaciones ionizantes o ultravioleta, aunque generalmente, dichos agentes inducen apoptosis por la vía mitocondrial.

La apoptosis mediada por la muerte del receptor puede ser inhibida por una proteína llamada c-FLIP que si se uniera al complejo FADD-caspasa 8, este complejo quedaría sin efecto. Otros receptores de muerte pueden utilizar las vías de transducción de señales similares a las anteriores.^{46, 47}

En algunos tipos de células, la señal originada por los receptores de muerte no es suficientemente fuerte para ejecutar la apoptosis, por ello es requerida la participación de la vía intrínseca.⁴⁸

En la siguiente figura, se esquematiza para la vía extrínseca y para la vía intrínseca, los principales eventos apoptóticos tomando como ejemplo la aplicación de quimioterapia y radioterapia.

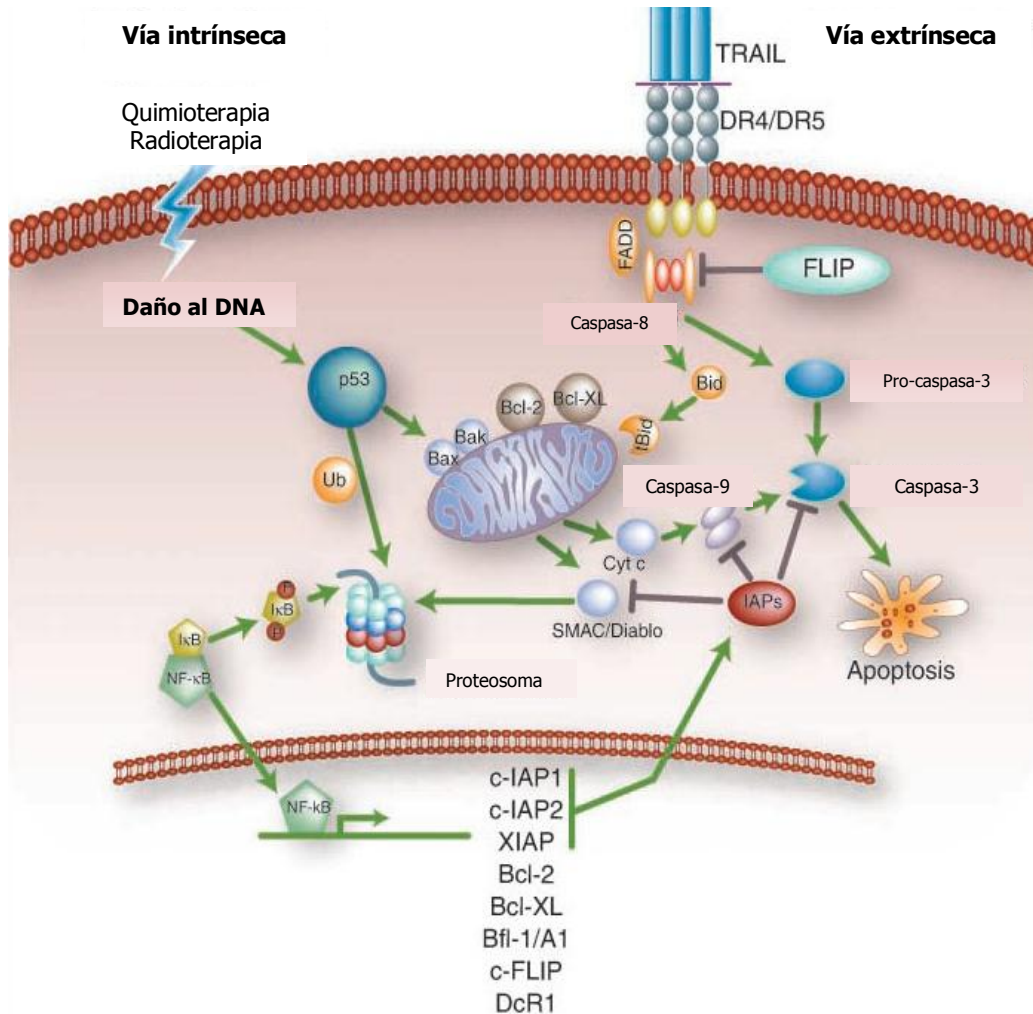


Figura 9. Esquema de los eventos apoptóticos de las vías principales.⁴⁹

* Vía intrínseca (mitocondrial): Este proceso es activado como respuesta al estrés celular debido a diversos agentes como radiación, sustancias químicas, etc. La activación de la caspasa está estrechamente vinculada a la permeabilización de la membrana externa por los miembros proapoptóticos de la familia Bcl. Existen numerosos estímulos citotóxicos y señales proapoptóticas de transducción que convergen en la mitocondria para inducir la permeabilización de la membrana externa mitocondrial.

Esta permeabilización está regulada por la familia de proteínas Bcl-2, lípidos mitocondriales, proteínas que regulan el flujo bioenergético metabólico y componentes del poro de transición de permeabilidad.

Tras la ruptura de la membrana mitocondrial externa, un conjunto de proteínas que se encuentra normalmente en el espacio entre las membranas mitocondriales interna y externa se liberan, incluyendo Citocromo *c*, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF y endonucleasa G. Una vez que estas proteínas apoptogénicas se encuentran en el citosol, desencadenan la ejecución de la muerte celular mediante la promoción de la activación de caspasas o actuando como efectores de la muerte independientes de caspasas.⁴⁸

* Mecanismos dependientes de caspasas. La liberación de Citocromo *c* de la mitocondria activa directamente la caspasa 3 a través de la formación del complejo citocromo *c*/ Apaf-1/procaspasa 9, denominado apoptosoma. El apoptosoma se une a una proteína citosólica con un N-terminal en el dominio de reclutamiento de la caspasa (CARD) y se libera la caspasa 9 activada. Además la caspasa activada produce otros daños aparte de la permeabilización de la mitocondria como la generación de especies reactivas de oxígeno.

Otras proteínas liberadas por las mitocondrias, como smac/DIABLO y Omi/HtrA2, facilitan la activación de la caspasa mediante la neutralización de los inhibidores endógenos de las caspasas, el inhibidor de proteínas de apoptosis (IAP). Dando lugar a la existencia de un equilibrio dinámico entre las moléculas efectoras pro y antiapoptóticas, que permite que la célula pueda enfrentarse al daño mitocondrial limitado.^{46, 47, 48}

* Mecanismos independientes de caspasas. Existe un segundo grupo de proteínas proapoptóticas, las cuales son mediadoras mitocondriales independientes de caspasas, que están conformadas por AIF (factor inductor de apoptosis), endonucleasa G y CAD, éstas se liberan durante

la apoptosis; sin embargo es un evento tardío que se produce después de que la célula se ha comprometido a muerte. Todas estas proteínas contribuyen a la condensación de la cromatina y a la fragmentación del DNA.

El control y la regulación de estos eventos apoptóticos mitocondriales ocurre a través de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2, sobre la cual, la proteína supresora de tumor p53 tiene un papel fundamental en su regulación, sin embargo los mecanismos exactos no se han elucidado todavía. Agentes terapéuticos más convencionales, por ejemplo etopósido, *Cis* platino o paclitaxel, provocan la permeabilización mitocondrial de una manera indirecta mediante la activación de las perturbaciones del metabolismo intermedio o mediante el aumento de la concentración de segundos mensajeros pro-apoptóticos.^{47, 48, 49}

La familia de proteínas Bcl-2 que regula la permeabilidad de la membrana mitocondrial, pueden ser proapoptóticas o antiapoptóticas, estas proteínas tienen un significado especial, ya que pueden determinar si la célula se compromete a la apoptosis o anula el proceso. Se cree que el principal mecanismo de acción de la familia Bcl-2 es la regulación de la liberación de Citocromo c de la mitocondria mediante la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.^{50, 51}

* Ensayos para detección de apoptosis

Como ya se mencionó anteriormente la apoptosis se produce a través de una compleja cascada de señalización que se encuentra estrechamente regulada en múltiples puntos por lo cual hay muchas oportunidades para evaluar la actividad de las proteínas implicadas; sin embargo muchas características de la apoptosis y la necrosis se pueden solapar, por lo que es crucial llevar a cabo dos o más ensayos diferentes para confirmar que se está produciendo la muerte celular por apoptosis.

Existen una gran variedad de ensayos disponibles, pero cada ensayo tiene ventajas y desventajas que pueden hacer que sea aceptable a utilizar para una aplicación pero no apropiado para otra finalidad. Por lo tanto al elegir los métodos de detección de la apoptosis en las células, tejidos u órganos, la comprensión de los pros y los contras de cada ensayo es crucial.

Los ensayos para apoptosis, basándose en la metodología, se pueden clasificar en seis grupos principales, que son:

1. Alteraciones citomorfológicas
2. Fragmentación del DNA
3. Detección de las caspasas, sustratos fragmentados, reguladores e inhibidores
4. Alteraciones de membrana
5. Detección de apoptosis en preparaciones completas
6. Ensayos mitocondriales

La técnica de TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling) detecta los fragmentos de DNA cortados por la acción de la endonucleasa y marcándolos colorimétricamente. Durante la apoptosis, la fragmentación del DNA conduce a un aumento de hidroxilos libres en los extremos 3'. La técnica consiste en la incorporación de nucleótidos marcados a éstos extremos de las cadenas simples del DNA mediante la desoxiuridina trifosfato (dUTP).⁴⁷

Esta tiene el inconveniente de confundir necrosis con apoptosis de acuerdo a la técnica utilizada para marcar las células. El número de células marcadas depende de las condiciones experimentales utilizadas, por lo que es necesario utilizar técnicas morfológicas de identificación nuclear específicas para el éxito de este ensayo.^{47, 54}

A pesar de esto, TUNEL es el método de elección para la rápida identificación y cuantificación de células apoptóticas, ya que existen al menos dos razones para preferirlo sobre otros:

1. El proceso es rápido. De 2 a 5 minutos para la condensación de la cromatina y la fragmentación celular. 3 horas para la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos.
2. La imagen de la célula apoptótica se ha ampliado y ganado algunos matices: el núcleo apoptótico se puede condensar sin dividir y, en las etapas iniciales de la apoptosis, el núcleo puede encontrarse ligeramente agrandado mientras que el DNA está comenzando a fragmentarse. ⁵⁵

De las primeras manifestaciones morfológicas de la presencia de muerte celular se encuentran los cambios en la organización de la membrana citoplasmática y la aparición de la condensación de la cromatina; para determinar estos cambios en la célula apoptótica se puede utilizar tanto la microscopía de luz (campo claro, fluorescencia) como la microscopía electrónica. Por medio de la primera se pueden apreciar cambios en la organización celular tales como la condensación de la cromatina o la aparición de cuerpos apoptóticos. La observación de características morfológicas se mantiene como parámetro clave. ⁵⁵

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos generales

- Evaluar el efecto antineoplásico de compuestos pentacoordinados de estaño en las líneas celulares HeLa (carcinoma cérvico-uterino) y HCT-15 (carcinoma de colon).

Objetivos particulares

- Obtener la concentración inhibitoria media (CI_{50}) para las líneas celulares HeLa y HCT-15 de los compuestos de estaño.
- Determinar para cada línea celular, cuál compuesto presenta mayor efecto, así como observar si la respuesta es dosis dependiente.
- Observar si los compuestos inducen apoptosis en las líneas celulares a través de los ensayos de TUNEL y fluorescencia.

Hipótesis

Basándose en lo previamente reportado sobre los compuestos organometálicos de estaño, se espera que las moléculas ensayadas presenten un efecto antineoplásico similar o igual en ambas líneas celulares, así como también su CI_{50} sea menor que la del testigo positivo *Cis* platino.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Fármacos

- Los compuestos pentacoordinados de estaño fueron proporcionados por el Dr. José Norberto Farfán García del departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química.
- *Cis*-Diamino-dicloro-platino(II) “*Cis platino*” Marca Alfa ÆSAR[®], polvo 2g. Jonhson Matthey Company. Lote 23F45R. Número CAS 15663-27-1.
- Kit de detección de muerte celular *in situ*, POD. Marca Roche[®]. Lote 12469600.
- Naranja de acridina. Marca Sigma-Aldrich[®], polvo. Lote MKBF7516V. Número CAS 65-61-2.
- Bromuro de etidio. Marca Sigma-Aldrich[®], polvo. Lote BCBF8587V. Número CAS 1239-45-8.

Proliferación de las líneas celulares

Se descongelaron las líneas celulares a 37 °C, se lavó con 9 mL de medio de lavado F-12 (Gibco™), se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco™), 1% de aminoácidos no esenciales MEM NEAA (Gibco™) y 1% de solución antibiótica-antimicótica (Gibco™) para después llevar a cabo el conteo de células vivas en la cámara de Neubauer utilizando el método de exclusión por tinción con azul tripano. Posteriormente las células se sembraron en cajas de cultivo de 25 cm² con 5 mL de medio RPMI 1640 suplementado y se incubaron en una atmósfera húmeda a 37 °C y 5% de CO₂.

Ambos cultivos fueron revisados diariamente para estimar el porcentaje de confluencia realizándose un cambio de medio cada 48 horas. Al obtener un cultivo con una confluencia entre (70 y 90)% se efectuaron pases sucesivos para los cuales se retiró el medio y las células se cosecharon con 1 mL de trispsina-EDTA al 0.25% (Gibco™), se incubaron a 37 °C por un minuto, se agitaron hasta observar el desprendimiento de las células, la reacción se paró con medio de lavado y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Nuevamente el sobrenadante se desechó y pellet se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado.

La proliferación celular se llevó a cabo por dos ciclos de confluencia, lo que permitió obtener suficiente cantidad de células para realizar los ensayos.

Ensayo de inhibición de la proliferación

Las células HeLa y HCT-15 se sembraron en placas de 96 pozos con un número de 2.0×10^5 células en un volumen total de 100 μ L por pozo. Las placas se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas para que puedan adherirse al plástico.

Transcurrido el tiempo de incubación se aspiró el medio y se adicionaron 180 μ L de medio suplementado nuevo y 20 μ L de de cada una de las concentraciones (0.01, 0.1, 1 y 10 μ g/mL) de los compuestos NF y el *Cis* platino mientras que al control negativo sólo se les adicionó 200 μ L de suero RPMI 1640 suplementado; los fármacos se agregaron inmediatamente después de preparadas las disoluciones para evitar la degradación de los compuestos y se dejaron incubar 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Una vez realizado el cernimiento primario con las concentraciones anteriormente mencionadas, se seleccionan las concentraciones de 1 hasta 12 μ g/mL para los compuestos NF73, NF74

(sólo en HeLa), NF82 (sólo en HCT-15), NF86, NF87 y NF88 y las concentraciones de 0.3 a 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los compuestos NF60, NF61, NF66OH, NF69OH y NF85; se dejaron incubar a las mismas condiciones. Al término de la incubación, se aspiró el medio y las células fueron fijadas con 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% por una hora a 4 °C. Al finalizar el tiempo se lavaron 5 veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Tinción con sulforrodamida B

Se adicionaron 100 μL de sulforrodamida B (SRB) al 0.4% p/v (preparada con solución de ácido acético al 1% v/v) a cada uno de los pozos con células y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se lavaron 2 veces con 100 μL de ácido acético al 1% v/v y se dejaron secar a temperatura ambiente.

El colorante celular se solubilizó con 100 μL de TRIS-Base 10 mM (pH 10.5) durante 5 minutos y con agitación mecánica suave. Finalmente el colorante celular se leyó en un lector de microplacas a una longitud de onda de 564 nm.^{52, 53}

Para cada línea y compuesto, se determinó la capacidad de inducir el 50% de inhibición de la capacidad proliferativa, considerando como proliferación celular máxima (100%) la de los cultivos control, para este análisis se utilizó el programa estadístico SSPS 16[®].

Técnica de TUNEL

Para la determinación de esta prueba se sembraron 2.0×10^5 células por pozo en portaobjetos estériles de 8 pozos, se incubaron a 37 °C y 5% de CO_2 durante 24 horas. Pasado ese tiempo se aspiró el medio y administró $\frac{1}{2}$ CI_{50} y $\frac{1}{4}$ CI_{50} determinada para cada compuesto en el

ensayo de inhibición de la proliferación; por cada pozo se colocó un volumen final de 200 μL y se incubaron los portaobjetos a las mismas condiciones por 24 horas.

Al término de la incubación, las células fueron fijadas con 300 μL de acetona concentrada fría por pozo durante 10 minutos, después de retirar el fijador se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la rehidratación de los portaobjetos empleando alcohol etílico a distintas concentraciones para después efectuar la recuperación antigénica con una solución de citrato de sodio pH 6.0 (Bio SB[®]), en una olla de presión a 15 lb y 121 °C durante 10 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se lavaron con Tris-amortiguador con tween 20 a pH 7.2–7.6 durante 5 minutos, seguido de la aplicación de la reacción mixta de TUNEL (100 μL por pozo), incubándose a 37 °C durante 1 hora en cámara húmeda y en oscuridad total. Al término de la incubación se lavó con tris-amortiguador y se adicionó el convertidor POD (Roche[®]) y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Al finalizar el tiempo se lavó nuevamente con tris-amortiguador y se prosiguió a revelar la reacción de TUNEL con diamino bencidina (BiosB[™]) por 5 minutos formando un producto final permanente de color café. A continuación las laminillas fueron lavadas y contrateñidas con hematoxilina de Harris (Meyer[®]) por 3 minutos, finalmente fueron lavadas con agua destilada, deshidratados, cubiertos con resina y observados al microscopio. Las células positivas a la reacción de TUNEL poseen un núcleo con coloración café, mientras que las que resultaron negativas poseen un núcleo en color morado.

De igual manera la intensidad de la coloración en las células positivas se puede clasificarse en: Ligeramente (+), moderadamente (++) e intensamente (+++), lo cual nos muestra que tan agresivo fue el tratamiento con los cultivos. La evaluación se realizó contando el porcentaje de células positivas en un campo de 10X y 40X.

Análisis citomorfológico por microscopía de fluorescencia (doble tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina)

Para realizar este ensayo se sembraron 2.0×10^5 células por pozo en portaobjetos estériles de 8 pozos, se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Pasado ese tiempo se aspiró el medio y administró $\frac{1}{4}$ CI₅₀ determinada para cada compuesto en el ensayo de inhibición de la proliferación; por cada pozo se colocó un volumen final de 200 µL y se incubaron los portaobjetos a las mismas condiciones por 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se volvió a aspirar el medio y se realizó la tinción de las células con 10 µL de la mezcla naranja de acridina (100 µg/mL) y bromuro de etidio (100 µg/mL), se dejaron secar a temperatura ambiente y protegidas de la luz, a continuación se neutralizaron con una solución de PBS a pH 6.4, se secaron y se observaron en el microscopio de fluorescencia a 10X y 40X para observar su morfología y coloración. Las células fueron contabilizadas como viables (núcleos verdes normales), apoptóticas (núcleos verdes irregulares o naranjas con fragmentación o condensación de la cromatina) o necróticas (tinción naranja uniforme sin condensación de la cromatina).

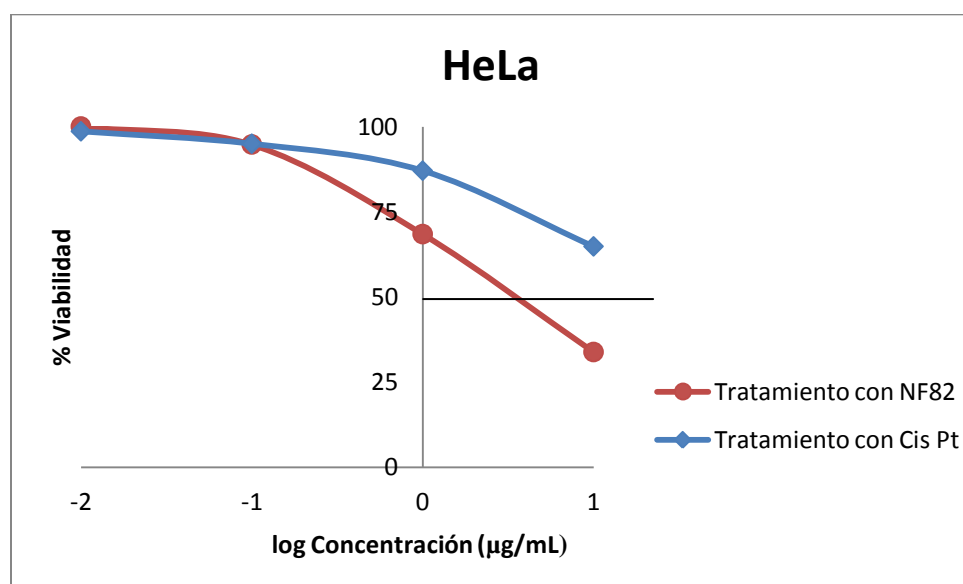
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Gráficos de viabilidad contra concentración.

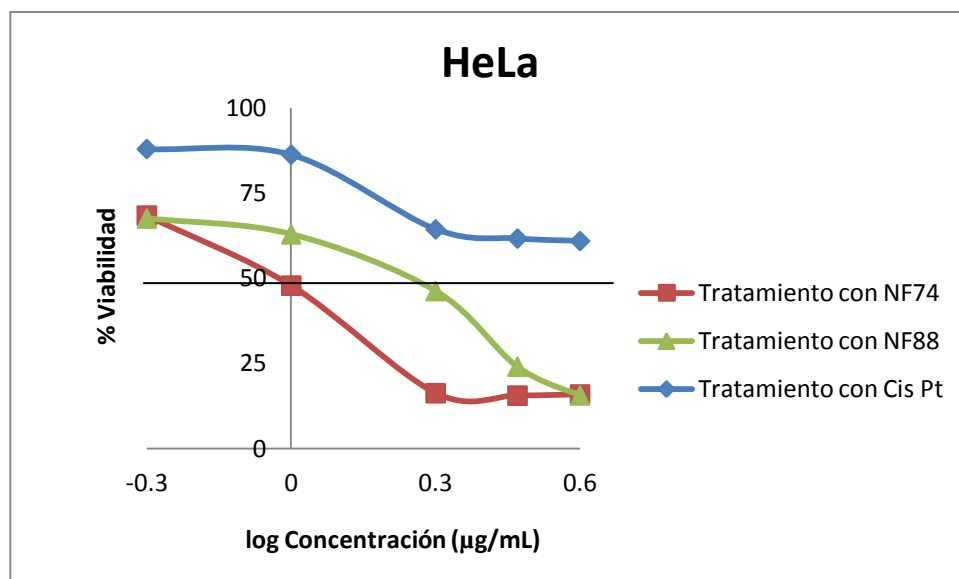
Se graficaron los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en los ensayos colorimétricos contra el logaritmo de la concentración expresada en $\mu\text{g/mL}$ de cada compuesto tanto para ambas líneas celulares. En las gráficas 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos para HeLa; los gráficos 3, 4, 5 y 6 presentan los que se obtuvieron para HCT-15.

Se empleó como control positivo el *Cis* platino, por ser el antineoplásico inorgánico más empleado actualmente en los procedimientos de quimioterapia.

Línea celular HeLa



Gráfica 1. Ensayo de inhibición en la línea celular HeLa en $\mu\text{g/mL}$



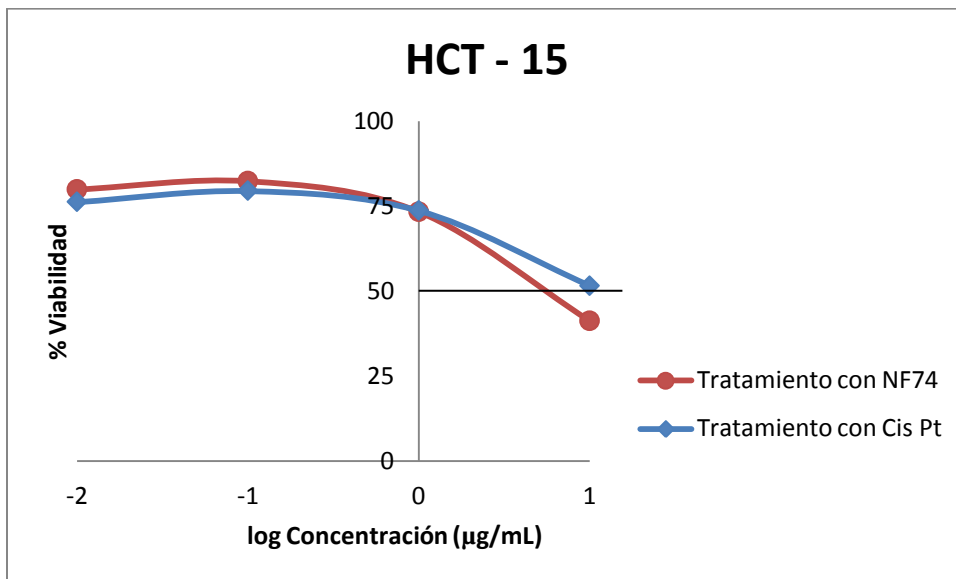
Gráfica 2. Ensayo de inhibición en la línea celular HeLa en µg/mL

En los gráficos para la línea celular HeLa se observa que los tres compuestos evaluados muestran un porcentaje de inhibición de la proliferación mayor que el *Cis* platino.

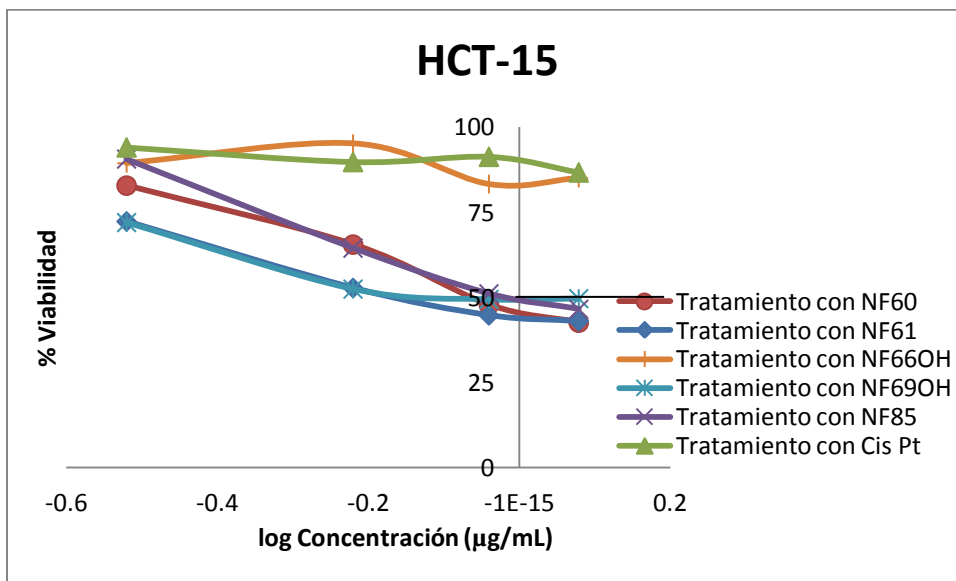
En la gráfica 1, se observa que el compuesto NF82 actuó de la manera esperada en el primer cernimiento con las concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 10 µg/mL.

Asimismo puede apreciarse que el compuesto con mayor actividad sobre esta línea fue el NF74 que se probó a concentraciones de 0.5 a 4 µg/mL, eso mismo se corroboró al determinar la concentración inhibitoria media para cada compuesto.

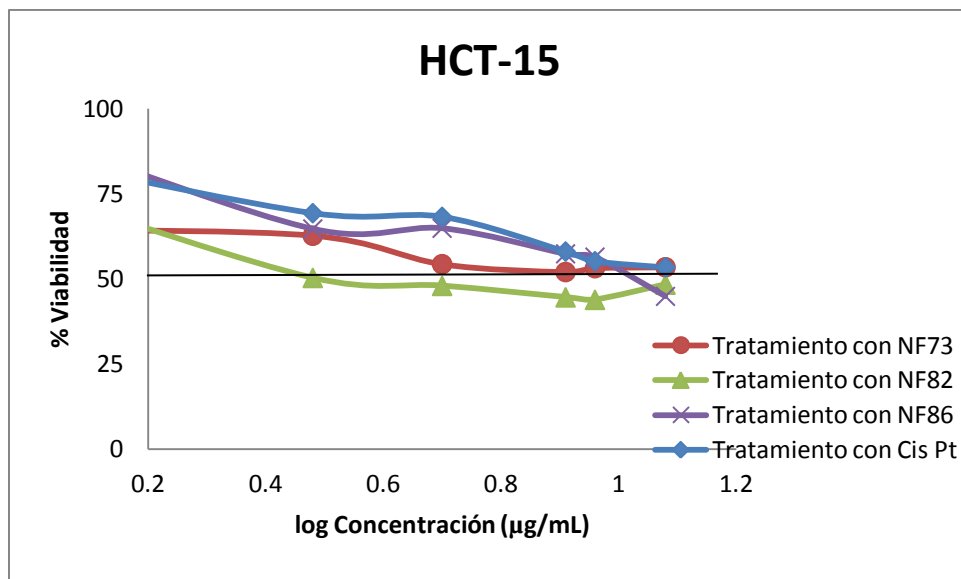
Línea celular HCT-15



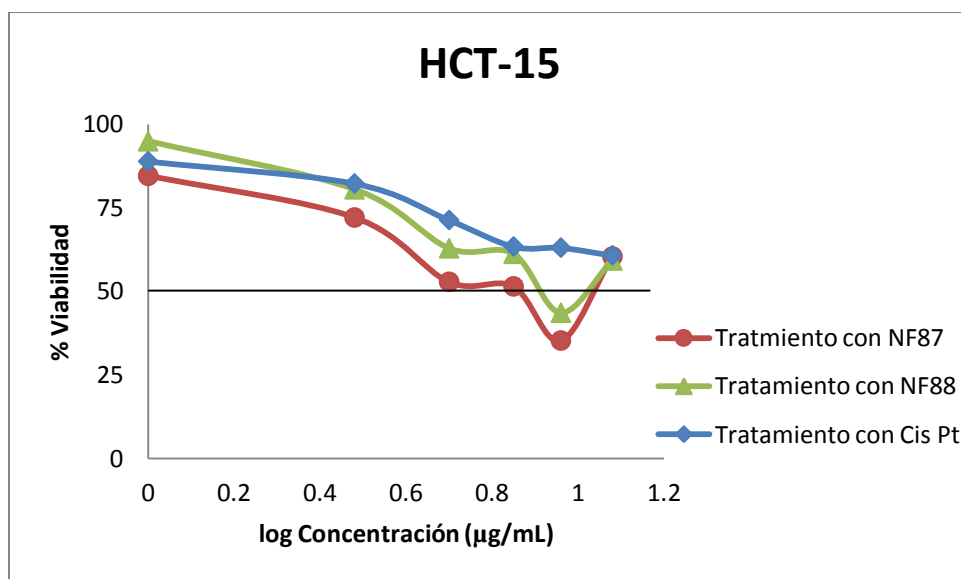
Gráfica 3. Ensayo de inhibición en la línea celular HCT-15 en µg/mL



Gráfica 4. Ensayo de inhibición en la línea celular HCT-15 en µg/mL



Gráfica 5. Ensayo de inhibición en la línea celular HCT-15 en µg/mL



Gráfica 6. Ensayo de inhibición en la línea celular HCT-15 en µg/mL

Para los compuestos evaluados en la línea HCT-15 se aprecia, al igual que en los ensayos para HeLa, que todos poseen una mayor actividad antiproliferativa en comparación con el *Cis* platino; en la gráfica 3 se muestra el compuesto que se determinó la CI_{50} en el primer cernimiento (0.01, 0.1, 1.0 y 10 µg/mL), en la gráfica 4 los compuestos con los que

se determinó la concentración esperada en el rango de 0.3 a 1.2 µg/mL, las gráficas 5 y 6 muestran los compuestos que se determinaron en el rango de (1,3,5,7,9 y 12) µg/mL ; a pesar de que no todos los compuestos tienen el mismo comportamiento, ya que para alcanzar el 50% de la inhibición de la proliferación celular fue necesario utilizar las distintas concentraciones antes mencionadas, en esta línea, sobresalen los compuestos del gráfico 4, siendo los más activos el NF60, NF61, NF69-OH y NF85, lo cual pudo corroborarse en el momento de determinar la CI₅₀ para cada compuesto.

5.2 Concentración inhibitoria media (CI₅₀).

Mediante el ensayo de inhibición de la proliferación celular se calculó la concentración inhibitoria media de cada compuesto para cada línea celular utilizando el programa estadístico SPSS 16[®] (Statistical Package for the Social Sciences). Los resultados de este ensayo se muestran en los cuadros 10 y 11.

Línea celular HeLa

Cuadro 10. Ensayo de inhibición celular en la línea HeLa

Compuesto	Límite de confianza de la dosis al 95%	CI50 (µg/mL)	CI50(µM/mL)
Cis Pt	7.353 – 52.636	13.13	43.7
NF74	0.630 – 0.931	0.79	1.5
NF82	1.125 – 28.624	3.41	6.3
NF88	1.013 – 1.457	1.24	2.1

La determinación de las CI₅₀ para los compuestos, revalida los resultados obtenidos en las gráficas de proliferación celular, se puede observar que todos cuentan con una gran actividad, las diferencias que

se observan pueden ser atribuidas más a las propiedades fisicoquímicas como liposolubilidad.

Línea celular HCT -15

Cuadro 11. Ensayo de inhibición celular en HCT-15.

Compuesto	Límite de confianza de la dosis al 95%	CI50 (µg/mL)	CI50(µM/mL)
Cis Pt	10.147 – 18.815	12.93	41.3
NF60	0.728 – 1.219	0.88	1.7
NF61	0.619 – 1.026	0.77	1.6
NF66OH	5.863 – 18.045	8.96	17.1
NF69OH	0.709 – 1.703	0.94	1.9
NF73	----	7.34	14.1
NF74	----	9.71	18.0
NF82	0.488 – 8.901	4.07	7.5
NF85	0.858 – 1.191	0.99	1.7
NF86	7.592 – 22.598	10.86	19.5
NF87	5.047 – 8.299	6.28	10.3
NF88	7.029 – 11.180	8.55	14.3

De acuerdo a los resultados que se muestran en el cuadro anterior, se puede dividir al conjunto de compuestos probados en 3 subgrupos (de acuerdo al rango en los cuales se encuentra el valor de su CI₅₀). Para facilitar el estudio de la actividad biológica en la línea HT-15. Dichos subgrupos son:

- Subgrupo 1.- Compuestos con actividad menor a 2 µM/mL. A esta categoría pertenecen los compuestos con clave NF60, NF61, NF69-OH y NF85.
- Subgrupo 2.- Compuestos con actividad entre 4 y 7.5 µM/mL. Aquí podemos encontrar a los compuestos con la clave NF73, NF82 y NF87.
- Subgrupo 3.- Compuestos con actividad mayor a 8 µM/mL. Destacan los compuestos con clave NF66-OH, NF74, NF86 Y NF88.

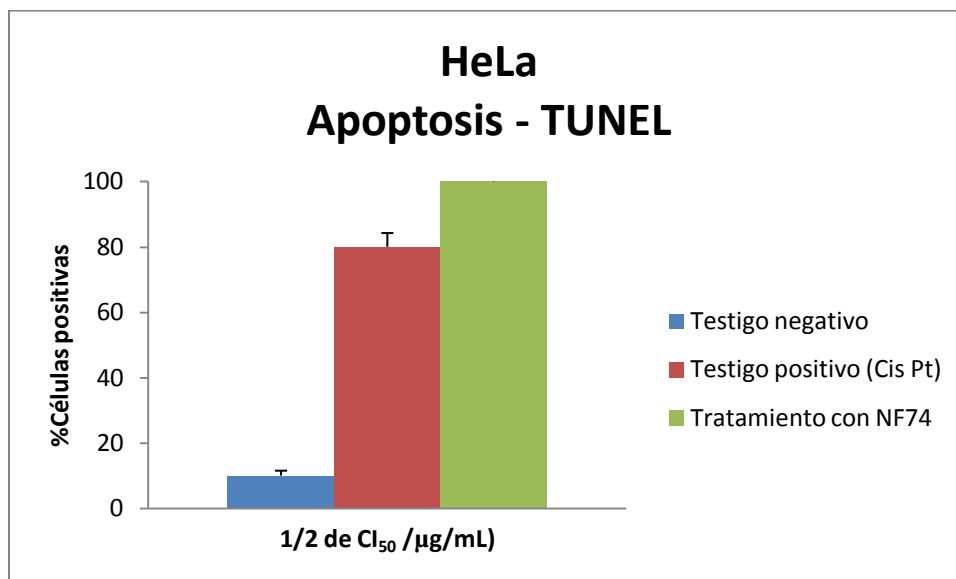
Ha de mencionarse que la propiedad liposoluble de las moléculas empleadas puede ser un factor importante dentro del estudio, lo que puede sustentarse con los resultados del subgrupo 3 que presentan una actividad biológica mayor implicando las propiedades de solubilidad como también el hecho de las fuerzas de atracción y la afinidad de los compuestos mencionados.

5.3 Determinación de la apoptosis por TUNEL.

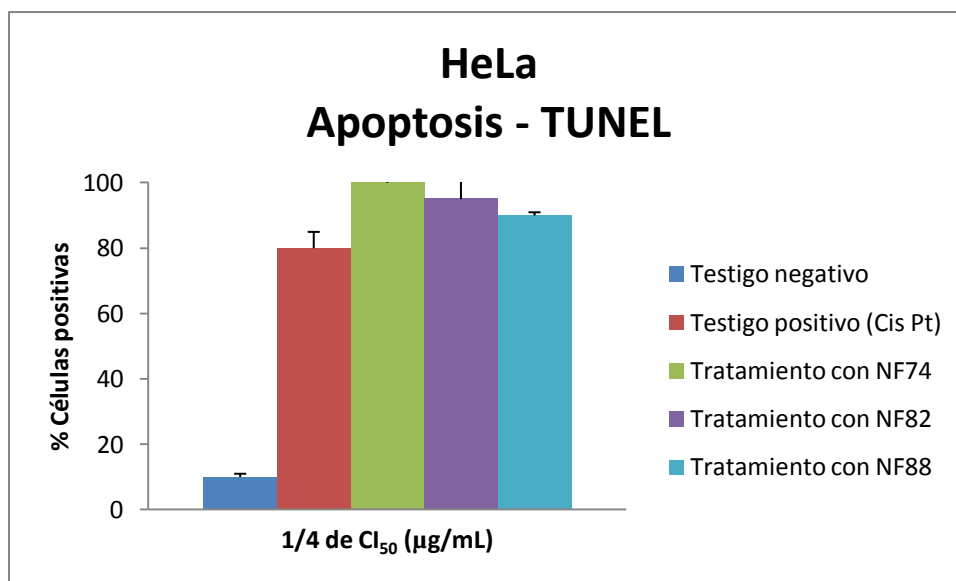
En la determinación de la apoptosis por el método de TUNEL, las células fueron tratadas con la mitad y un cuarto de la CI_{50} determinada para cada compuesto, en presencia de un testigo positivo (*Cis platino*) y de un testigo negativo (sin tratamiento).

Las gráficas 7, 8, 9 y 10 se muestran la representación en barras de los porcentajes promedio de las células positivas a la evaluación de la apoptosis mediante éste método en cada línea celular. En las figuras 10 y 11 se aprecian imágenes de la morfología celular que se observada después de realizar los ensayos, comparando con el testigo negativo, testigo positivo y compuesto más representativo respecto a imagen de la técnica con cada línea celular.

Línea celular HeLa



Gráfica 7. Representación de barras de células positivas ante la técnica de TUNEL utilizando la mitad de la CI₅₀ determinada en µg/mL.



Gráfica 8. Representación de barras de células positivas ante la técnica de TUNEL utilizando un cuarto de la CI₅₀ determinada en µg/mL.

Los resultados obtenidos en ambas gráficas muestran que el *Cis* platino induce un 80% de apoptosis en las células; para los compuestos probados se distingue un porcentaje de células apoptóticas que difiere significativamente de manera cualitativa comparando con ambos testigos. Cabe mencionar que se tuvo que utilizar un medio y un cuarto de las CI_{50} determinadas puesto que, la superficie de contacto al realizar los experimentos fue menor a la utilizada en los ensayos de proliferación y por tanto si se utilizaban las concentraciones determinadas en ese ensayo, resultaba en la muerte de todas las células.

El porcentaje de muerte celular que muestra el testigo negativo se considera como el normal, ya que es muy pequeño en comparación con los porcentajes que se obtuvieron en los distintos tratamientos. Es de mencionarse que el proceso de apoptosis es natural y además las condiciones de trabajo en las que fueron sometidas también son causa de muerte.

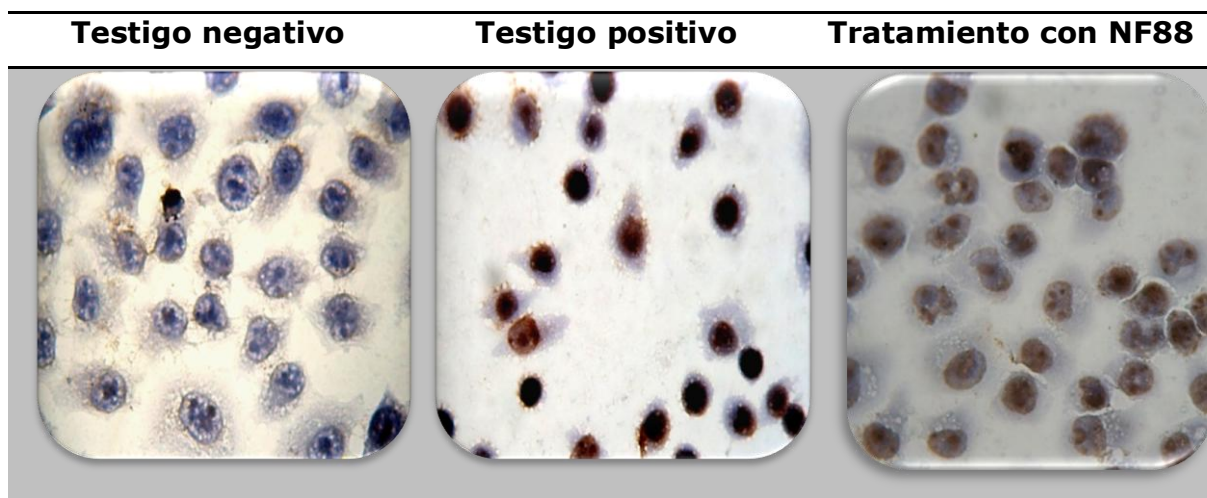
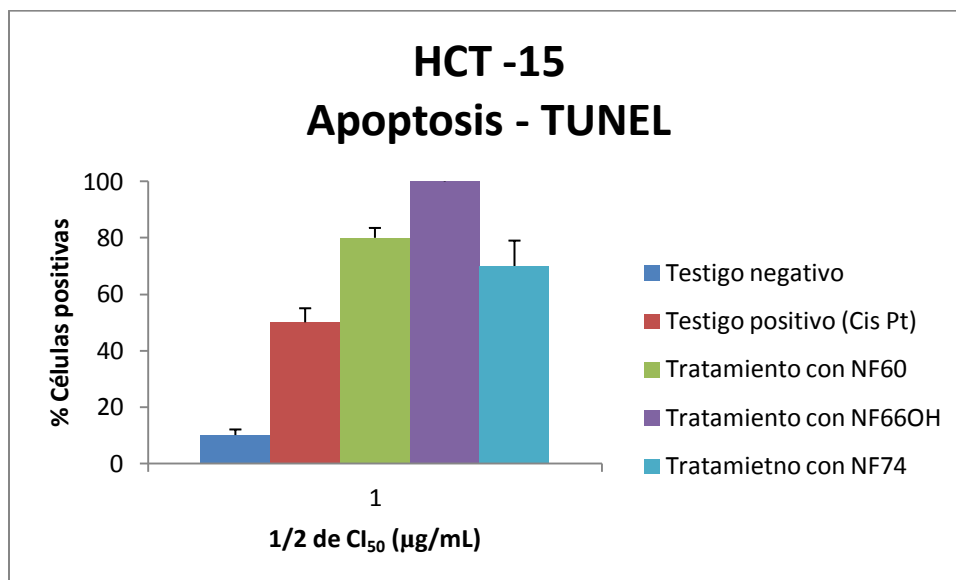


Figura 10. Morfología celular por la técnica de TUNEL.

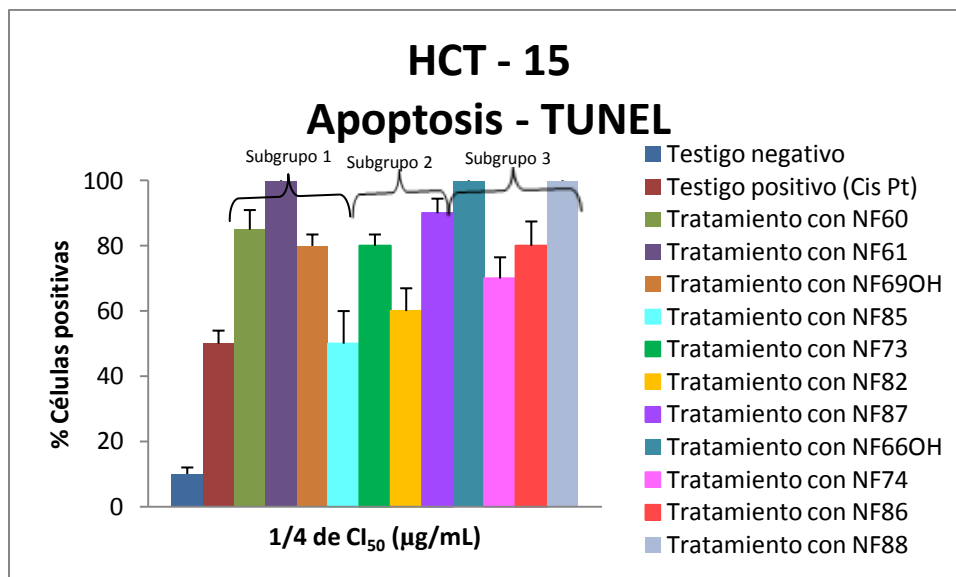
Con las imágenes podemos corroborar que efectivamente se indujo la apoptosis de las células, ya que para ambos tratamientos las células resultaron ser positivas para la reacción de el ensayo de TUNEL, sin

embargo el tratamiento con *Cis* platino presenta mayor intensidad de coloración en comparación con los demás compuestos (todos con menor intensidad) lo que implica que los compuestos probados son menos agresivos pero quizá con la misma potencia o un poco más que el fármaco utilizado actualmente. Dado que el testigo positivo resultó ser negativo para la reacción, se confirma la confiabilidad de los resultados obtenidos y en la imagen se ejemplifica con el compuesto NF88 la actividad que se obtuvo.

Línea celular HCT-15



Gráfica 9. Representación de barras de células positivas ante la técnica de TUNEL utilizando la mitad de la CI₅₀ determinada en µg/mL.



Gráfica 10. Representación de barras de células positivas ante la técnica de TUNEL utilizando un cuarto de la CI_{50} determinada en $\mu\text{g/mL}$.

Para esta línea celular, el comportamiento en cuanto potencia del tratamiento, hablando particularmente de la concentración utilizada para llevar a cabo los ensayos, fue igual al que se obtuvo en HeLa puesto que las concentraciones se disminuyeron a la mitad y a un cuarto de las obtenidos en los ensayos con sulforrodamida B para obtener resultados confiables, ya que si no se hacía de esta manera, todas las células se morirían. En las gráficas se observa que el *Cis* platino tiene un menor efecto en esta línea puesto que su promedio de proliferación es de un 40%, en lo que respecta a los demás tratamientos se advierte que todos inducen apoptosis con mayor potencia que la que muestra el testigo positivo y que la muerte celular presenta el testigo negativo, se considera parte del proceso natural de las células. Sin embargo, algo que llama la atención es el compuesto NF85 que en los ensayos de proliferación resultó ser de los más potentes y su inducción de la apoptosis es mucho menos si se compara con los otros compuestos de esta misma familia.

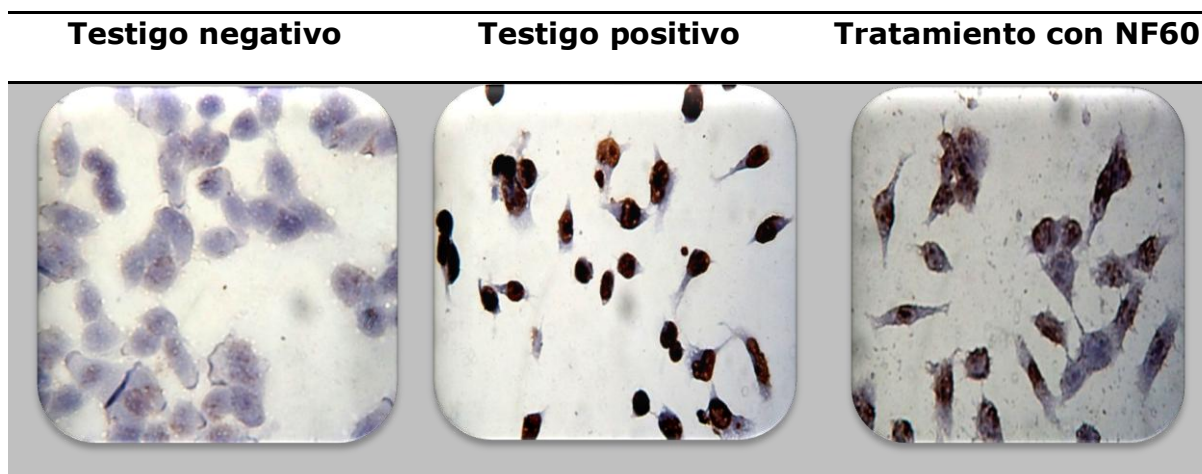


Figura 11. Morfología celular por la técnica de TUNEL.

Respecto a la intensidad presentada en las pruebas, vemos nuevamente que todos los compuestos utilizados presentaron una intensidad moderada (++) respecto el *Cis* platino cuya coloración fue intensa (+++), lo que demuestra que el uso de estos compuestos para la quimioterapia presentan menor agresividad que los utilizados actualmente.

5.4 Determinación de la apoptosis por análisis citomorfológico

En las imágenes correspondientes a las figuras 12 y 13 se distingue la morfología celular al final de la técnica de fluorescencia para determinar la inducción de apoptosis en las líneas celulares en las que se evaluaron los compuestos.

Línea celular HeLa

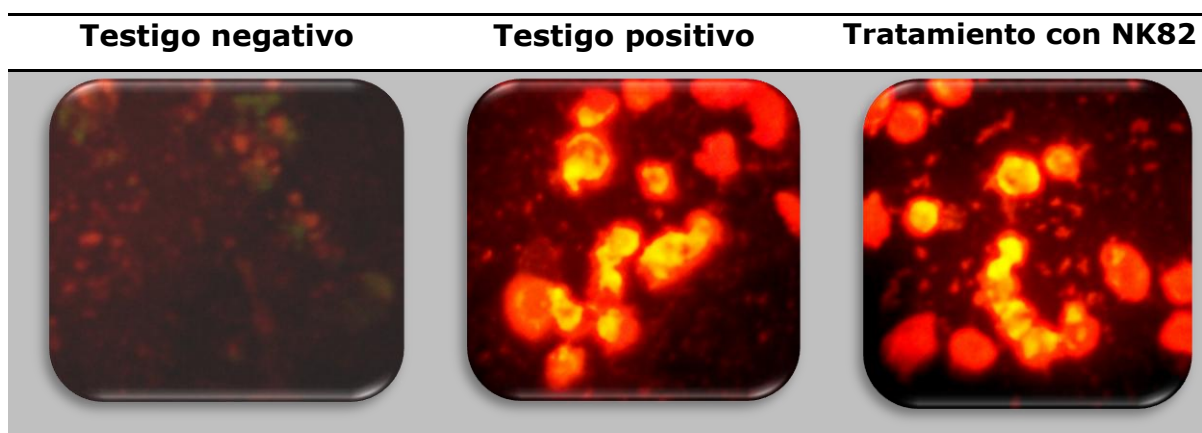


Figura 12. Morfología celular por la técnica de fluorescencia.

Línea celular HCT-15

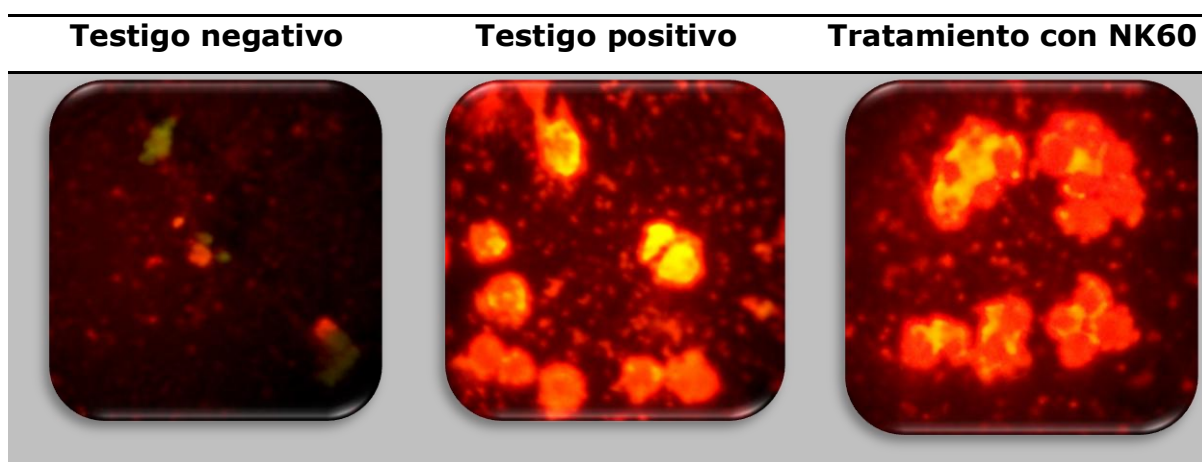


Figura 13. Morfología celular por la técnica de fluorescencia.

En este ensayo se confirma que los compuestos inducen apoptosis, en el porcentaje en que se obtuvo con los ensayos de TUNEL, utilizando solamente el cuarto de CI_{50} , ya que fue con la concentración en la que mejor se pudo apreciar la morfología de las células posterior a los diversos tratamientos. Por lo tanto, se puede decir que estos fármacos son prometedores para utilizarse en un futuro como fármacos en la quimioterapia antineoplásica después de someterse a las demás fases pre-clínicas y clínicas.

6. CONCLUSIONES

Basado en los resultados obtenidos se concluye que todo el grupo de compuestos probados en los ensayos de viabilidad celular presentan mayor actividad que el *Cis* platino en las dos líneas celulares en que fueron evaluados.

Se obtuvo satisfactoriamente la CI_{50} de la mayoría de los compuestos tanto en HeLa como en HCT-15. Para HeLa el compuesto con mayor actividad fue el NF74 y para HCT-15 fue el NF 61; sin embargo que la susceptibilidad en cada línea depende en gran parte de los sustituyentes de las moléculas probadas. Se puede afirmar que el efecto es dosis-dependiente, pero diferente para cada compuesto y también para la estirpe celular en el que se administren.

Los ensayos de TUNEL y fluorescencia muestran que los compuestos inducen la apoptosis en las células, dichos resultados junto con lo obtenido en estudios previos⁴¹, donde se determinó que este proceso no se da por la vía intrínseca (vía mitocondrial), nos lleva a sospechar que el proceso de muerte celular que promueven este grupo de compuestos es la vía extrínseca (TNF), con lo que se puede llegar a elucidar uno de los posibles mecanismos de acción de las moléculas trabajadas.

7. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud (WHO)
http://www.who.int/topics/chronic_diseases/en/index.html.
Consultado: 06/Noviembre/2012.
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI)
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51>.
Consultado: 06/Noviembre/2012.
3. Centro Médico de la Universidad de Maryland
http://www.umm.edu/esp_ency/article/001289trt.htm.
Consultado: 08/Noviembre/2012.
4. Katzung, B.G. *Farmacología Básica y Clínica*. Capítulo 55 (Edward Chu): Quimioterapia del cáncer. 2001. Mc Graw Hill. Nueva York. pp. 1011-1047.
5. Korolkovas, A. *Compendio esencial de Química farmacéutica*. Capítulo 25: Introducción a los agentes quimioterapéuticos. 1983. Reverté. Madrid. pp. 467-470.
6. Rang, H. y Dale, M. *Farmacología*. Capítulo 51: Quimioterapia antineoplásica. 2008. ELSEVIER. Madrid. pp. 645, 718-735.
7. Instituto Nacional del Cáncer (INC)
<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>. Consultado: 12/Noviembre/2012.
8. S. Fauci, Anthony. *Harrison: Principios de Medicina Interna*. Capítulo 6: Oncología y hematología. 2008. Mc Graw Hill. Madrid. pp. 700 – 722.
9. G. Cotter, Thomas. 2009. *Apoptosis and cancer: the genesis of a research field*. Nature. 9, 501 -507.

10. Universidad de Navarra: Laboratorio de pediatría.
<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol23/n1/colab.html>
Consultado: 12/Noviembre/2012.
11. Guyton, A. y Hall, J. *Tratado de fisiología médica*. Capítulo 3: control genético de la síntesis proteica, las funciones de la célula y la reproducción celular. 2011. ELSEVIER. Madrid. pp. 37-41.
12. F. Alonso, Daniel. *El desafío del cangrejo: Avances en el conocimiento, prevención y tratamiento del cáncer*. Capítulo 4: ¿Qué es el cáncer? 2003. Siglo XXI editores. Buenos Aires. pp. 38-41.
13. Botella Llusia, José. *El útero fisiología y patología*. Capítulo 1: Anatomía y relaciones pelvianas. 2005. Díaz de Santos. Madrid. pp. 1-18.
14. Faller, Adolf. *Estructura y función del cuerpo humano*. Capítulo 11: Órganos genitales. 2006. Paidotribo. Badalona. pp. 520-525.
15. Instituto Nacional de Cancerología (INCAN)
<http://www.infocancer.org.mx> (Cáncer cérvico-uterino, cáncer colorrectal y tratamientos). Consultado:14/Noviembre/2012.
16. García Hernández, Héctor. Morfofisiología del aparato reproductor femenino. <http://temariodmorfo.blogspot.mx/2012/03/aparato-reproductor-femenino.html>. Consultado: 16/Noviembre/2012.
17. Chavarro Vicuña, Nelly. 2009. *Cáncer cervicouterino, artículo de revisión*. Anales de Radiología México. 1, 61-79.
18. De Freitas, Antonio Carlos. 2012. *Susceptibility to cervical cancer: An overview*. Gynecologic Oncology. El SEVIER. 126(2), 1-4.
19. Arbyn, M. *Worldwide burden of cervical cancer in 2008*. Annals of Oncology. 22, 2675-2686.
20. Di Domenico, F. 2012. *Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and Chemoterapeutic effects of polyphenol*. Biochimica et Biophysica Acta. 1822(5), 737-747.

21. Hun Soon, Jung. 2012. *The synergistic therapeutic effect of cisplatin with Human Papillomavirus E6/E7 short interfering RNA on cervical cancer cells lines in vitro and in vivo*. International Journal of Cancer. 130(8), 1925-1936.
22. American Type Culture Collection (ATCC), línea celular HeLa <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-2&Template=cellBiology>. Consultado: 03/Diciembre/2012
23. Fuentes Albuero, Adolfo. 2011. *Recordando a Henrietta Lacks*. Gaceta Mexicana de Oncología. 10(5), 249-251.
24. Campbell, N and Reece, J. *Biología*. Capítulo 41.4: Cada órgano del sistema digestivo de los mamíferos tiene funciones especializadas para el procesamiento de los animales. 2007. Editorial Médica Panamericana. Madrid. pp. 855-862.
25. Centro de salud. Net. <http://www.centrodesalud.net/cancer-de-colon-una-vida-saludable-ayuda-a-prevenirlo>. Consultado: 03/Diciembre/2012.
26. K. Sikalidis, Angelos. 2011. *Roles of Hormones and Signaling Molecules in Describing the Relationship Between Obesity and Colon Cancer*. Pathology and Oncology Research. 17(4), 785-790.
27. Jürgen Weitz. 2005. *Colorectal cáncer*. Lancet. Heidelberg. 365(9454), 153-165.
28. Makoto Mark, Taketo. 2012. *Roles of stromal microenvironment in colon cancer progression*. Journal of Biochemistry Advance Access. 151(5), 1-17.
29. G. Dumitrescu, Ramona. 2012. *Cancer Epigenetics: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. 863, 177-185.
30. Marchetti, Paolo. 2004. *Apoptosis Induced by Oxalinplatin in Human Colon Cancer HCT15 Cell Line*. Anticancer Research. 24(1), 219-226.

31. American Type Culture Collection (ATCC), línea celular HCT-15
[http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetail/
tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL225&Template=cellBiology](http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetail/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL225&Template=cellBiology)
. Consultado: 03/Diciembre/ 2012.
32. Rubin, Philip. *Oncología Clínica: Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. Capítulo 4: Principios de la cirugía oncológica; Capítulo 6: Principios de radiología oncológica y radioterapia antineoplásica. 2003. ELSEVIER. Madrid. pp. 62-74, 99-125.
33. Badía, Xavier. *La aportación de los medicamentos quimioterapéuticos al tratamiento del cáncer. El valor del medicamento*. Capítulo 5: Un antes y un después en el tratamiento del cáncer: La aportación de los medicamentos quimioterapéuticos. 2002. Fundación Farmaindustria. Madrid. pp. 12-19.
34. Peter Roitt. *Inmunología: Fundamentos*. Capítulo 17: Inmunología tumoral. 2008. Editorial Médica Panamericana. Madrid. pp. 426-455.
35. American Cancer Society (ACS)
[http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treat
menttypes/index](http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/index). Consultado: 12/Diciembre/2012.
36. Solón Navarrete Hurtado. 2011. *Cardiotoxicidad por quimioterapia. Un enfoque práctico para el clínico*. Insuficiencia Cardíaca. 6(3), 131-143.
37. *Diagnóstico y tratamiento del cáncer cervicouterino*: México. Secretaria de Salud. 2010.
<http://www.imss.gob.mx/profesionales/guiasclinicas/gpc.htm>.
Consultado: 09/Diciembre/2012.
38. Solís, José. 2007. *Cáncer cervicouterino estadio bIII tratado con radioquimioterapia concomitante basada en Cis platino*:

- Experiencia inicial hospital Carlos Van Buren*. Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología. 72(1), 11-19.
39. Aranda Aguilar, E. 2004. *Tratamiento del cáncer de colon estadios II, III y IV*. Oncología. 27(4), 258-261.
40. Oncologist-approved cáncer information from the American Society of Clinical Oncology. <http://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer>. Consultado: 12/ Diciembre/2012.
41. Kobakhidze, Nikoloz, Farfán, Norberto. 2010. *New pentacoordinated Schiff-base diorganotin (IV) complexes derived from non polar side chain α -amino acids*. Journal of Organometallic Chemistry. 695, 1189-1199.
42. Alama, Angela. 2009. *Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotins as antitumor agents*. Drug Discovery Today. 14(9-10), 500-508.
43. Müllauer L. Wohlfart. *Apoptosis Regulatory, Genes and Disease*. Encyclopedia of Life Sciences. Sciences. Nature Publishing Group. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0006044.pub2/pdf>. Consultado: 15/Diciembre/2012.
44. D. Winkler, James. *Apoptosis and inflammation*. Capítulo 2: Cascadas de señalización de la apoptosis. 1999. Birkhäuser. Basel. pp. 7-18.
45. G. Chen, George. *Apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy*. Capítulo 1: Vías de señalización de la apoptosis y resistencia a la apoptosis en células de cáncer de cerebro. 2009. Springer. Berlín. pp. 1-11.
46. Chen M, Wang, J. 2002. *Initiator caspases in apoptosis signaling pathways*. Apoptosis. 7(4), 313-319.
47. Elmore, Susane. 2007. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicologic Pathology. 35(4), 495-516.

48. Fulda, S. 2006. *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. *Oncogene*. 25, 4798 – 4811.
49. G.E. de Vries, Elisabeth. *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Pathway and Its Therapeutics Implications*. *Clinical Cancer Research*. 12(8), 2390-2393.
50. O. Hengartner, Michael. 2000. *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*. 407, 770-776.
51. Gupta. S. 2003. *Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis*. *International Journal of Oncology*. 22(1), 15-20.
52. Barron Sosa Lidia. *Influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa y apoptótica del quelato mixto de cobre casiopeína III-IA[®] en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos*. Segundo Congreso Nacional de Química Médica. Querétaro. 2006.
53. Escobar M, Linamaría. 2009. *Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(2), 49-56.
54. I. Schinoni, María. 2006. *Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado*. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*. 36(4), 211-217.
55. Negoescu, Adrien. 1997. *TUNEL: Improvement and Evaluation of the Method for In Situ Apoptotic Cell Identification*. *Biochemica*. 2, 12-17.