



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y
CÁNCER
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL
CÁNCER

**“Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del
compuesto organometálico 3e en líneas celulares de
cáncer de mama”**

TESIS

Que para obtener Título de

BIÓLOGA

PRESENTA

Torner Acosta Daniela Alejandra

Director de Tesis: Dr. Hugo López Muñoz



**FES
ZARAGOZA**

Ciudad de México, 2023



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.

Agradecimientos

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Dr. Hugo López Muñoz por su tiempo, paciencia, regaños, conocimiento y valiosas aportaciones a este trabajo. Gracias por siempre estar para resolver mis dudas y ayudarme durante todo este proceso.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez por sus valiosas aportaciones a este trabajo y por darse el tiempo de escuchar mis dudas y resolverlas.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández por su tiempo, paciencia, atención y comentarios a este trabajo.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado por su tiempo y atención al revisar este trabajo, así como sus comentarios y observaciones.

A la Dra. Elizabeth Gómez Pérez por su tiempo, paciencia. Gracias por compartirme un poco de sus conocimientos.

Este trabajo se realizó con el apoyo de los proyectos PAPIIT IN219221, IN215922 e IN222321.

Dedicatorias

A mi mamá

Por estar siempre presente, no perder la confianza en mí y apoyarme de todas las maneras posibles. A ti te debo todo lo que he logrado hasta ahora, nunca te podré agradecer lo suficiente por todo lo que has hecho por mí. Gracias por existir y ser mi mamá, te amo.

A mi hermana

Por ser mi compañera en las cosas bonitas y no tan bonitas la vida, por escucharme siempre sin juzgar y por hablarme de cosas que te apasionan, aunque no las entienda.

A Fer

Por tu cariño, comprensión y ternura, por todo el tiempo que hemos compartido, por estar para mí en todo momento y ayudarme en el desarrollo de este trabajo con tus consejos y conocimiento. Gracias por ser mi apoyo y mi escape.

A mi familia

Por apoyarme siempre y ser mis más grandes fans.

A mis amigos

Valery, Angeles e Itzel por hacer esta etapa de mi vida una de las más bonitas. A Luis y a Dani por hacer del labo toda una experiencia. A Priscila y Crespo por estar presentes a pesar de la distancia.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
La Célula	2
Ciclo Celular	2
Muerte celular	3
Necrosis	4
Apoptosis	5
Cáncer	8
Cáncer de Mama	10
Compuestos Organometálicos	13
Antecedentes	13
Planteamiento del Problema	15
Justificación	15
Hipótesis	15
Objetivos	16
Metodología	17
Resultados	21
Discusión	29
Conclusiones	32
Bibliografía	33
Apéndice	39

Resumen

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por grupos de células anormales que crecen sin control y pueden tener diferente origen, entre los diferentes tipos de cáncer se encuentra el cáncer de mama, conocido por su alta tasa de incidencia y mortalidad en mujeres en México y en el mundo. En la actualidad se utilizan diferentes tratamientos para erradicar esta enfermedad, los principales son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, estos tres tratamientos no son efectivos en estadios avanzados de la enfermedad, además de ser poco eficaces, comprometen la calidad de vida del paciente al crear un ambiente citotóxico en el organismo que desencadena en la respuesta inflamatoria y generar necrosis tisular. Por esto es necesario buscar nuevas y mejores alternativas para su tratamiento. En este sentido, diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de estudiar a los compuestos organometálicos y de coordinación, de los cuáles el cisplatino forma parte, y que, a pesar de ser utilizado ampliamente en la quimioterapia, presenta múltiples efectos secundarios, como la nefrotoxicidad y el daño hepático. Por ello, se buscan nuevos compuestos como son los organometálicos, dentro de los que destacan los organoestaños, que han mostrado resultados favorables, como la inducción de muerte apoptótica en cultivos de células tumorales y un menor efecto necrótico, con lo que se espera disminuir los efectos secundarios causados por la quimioterapia.

Por tal motivo, en el presente trabajo se estudió el efecto antiproliferativo y necrótico del compuesto pentacoordinado de bistrimetilsililmetilestaño (IV) derivado de un ligante tridentado que contiene piridoxal (3e) en las líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y JC. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el compuesto 3e posee actividad biológica como agente antitumoral ya que los ensayos de proliferación muestran que el compuesto abate en 50% a las células tumorales MDA-MB-231 y JC a concentraciones de 0.233 $\mu\text{g/ml}$ y 0.302 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Al evaluar la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados con los compuestos en la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), se encontró que el compuesto 3e no induce muerte necrótica a las células tumorales. Al evaluar el ciclo celular, se observó que el compuesto 3e detiene a las células de la línea MDA-MB-231 en las fases G₂/M y al realizar la cuantificación de caspasa 3 activa en los cultivos celulares a través de citometría de flujo, se obtuvieron los siguientes porcentajes, en MDA-MB-231 65.29 % y JC 51.14 %, probando que el compuesto 3e induce muerte apoptótica en estas líneas. Por último, se realizó un ensayo de proliferación en linfocitos humanos, en el cual el compuesto 3e no afectó el potencial proliferativo de dichas células demostrando ser selectivo.

Es por estos resultados que el compuesto 3e podría ser un buen candidato para evaluarse como agente terapéutico.

Introducción

La Célula

La célula es la unidad fundamental, funcional y estructural básica de la vida (Alberts et al., 2015). En 1839, el zoólogo alemán Theodor Schwann hizo pública la teoría celular, en la cual postuló dos principios, primero que todos los organismos están compuestos por una o más células y segundo que la célula es la unidad estructural de la vida. Mas tarde en 1885, Rudolf Virchow agregó el tercer postulado, las células solo pueden surgir de la división de una célula preexistente (Karp, 2004).

Ciclo Celular

El ciclo celular es un proceso ordenado que tiene como objetivo la duplicación y transmisión del material genético de una generación celular a la siguiente. (Israels e Israels, 2001). El ciclo celular se puede dividir primero en dos grandes fases, la interfase que agrupa a G1, S y G2; y la fase de Mitosis que en una célula humana típica que prolifera en cultivo dura 1 hora, mientras que la interfase podría ocupar 23 horas de un ciclo de 24 horas (Alberts et al, 2015). En la interfase la célula crece y duplica sus cromosomas en preparación para la división celular (Campbell y Reece, 2005). En la fase G1 la célula crece, hay duplicación de organelos citoplasmáticos y se producen todas las proteínas necesarias para la síntesis de ADN. La síntesis de histonas y otras proteínas asociadas al ADN tiene lugar en la fase S, al terminar el núcleo contiene el doble de ADN y proteínas nucleares. Durante la fase G2, comienzan a ensamblarse las estructuras directamente asociadas con la mitosis y la citocinesis (Curtis, et al.,2006).

Procesos como la replicación del ADN, mitosis y la citocinesis están controlados por dos familias de proteínas, las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y las ciclinas, las cuales se unen a las primeras para controlar sus reacciones de fosforilación. Estas proteínas van a estar ligadas directamente con la progresión del ciclo celular y van a estar presentes en cada una de sus etapas., Figura 1 (Lagunas, et al, 2014). El inicio de la fase S está controlado por el complejo ciclina E/CDK2, continua con el complejo ciclina A/CDK2 durante toda la fase (Duronio y Xiang, 2013). El complejo ciclina A/CDK2 lleva a la transición de la fase S y el complejo ciclina A/CDK1 lleva a la transición de G2 a M. Por último, la transición de G2 a M está controlada principalmente por los complejos ciclina B/CDK2 (Fragoso, et al. 2004).

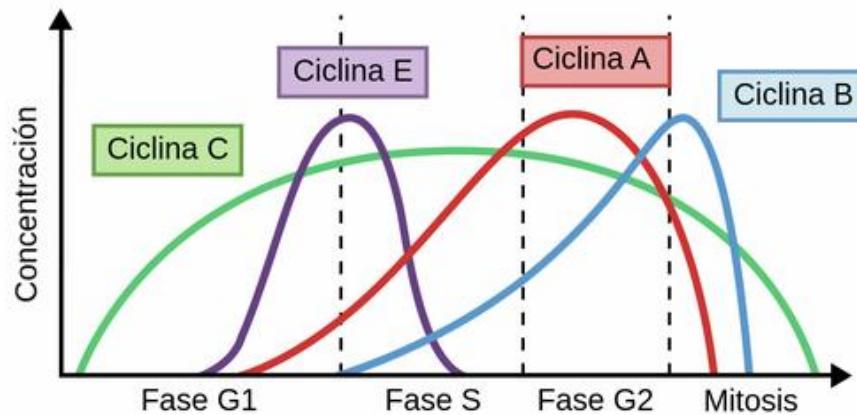


Figura 1. Ciclinas a lo largo del ciclo celular. Obtenido de: <https://theory.labster.com/cyclin-and-cyclin-dependent-kinase-es/>

Iniciado el ciclo celular, la célula puede tomar cuatro caminos, la senescencia, diferenciación, apoptosis y proliferación. Durante el ciclo existen una serie de puntos de control que ayudan a que este se lleve a cabo sin errores, puede ser controlado por inhibidores de CDK como p21 y p16, por otras moléculas ligadas a los receptores de factores de crecimiento como las proteínas de la familia Rb, p107, p130, actuando en diferentes etapas de este. (Montes et al. 2013).

Dependiendo del grado de error presentado, se podrá reparar, pero si este es irreversible se lleva a un punto sin retorno, la muerte de la célula.

Muerte celular

Las células tienen un tiempo de vida bien definido, el cual puede tener variaciones dependiendo de su tipo celular y las condiciones en las que esta se encuentra. La muerte celular no solo ocurre por daño presente en la célula, sino que es un proceso, que mientras sea ordenado, permite conservar la homeostasis del organismo controlando la densidad celular de tejidos, renovando y eliminando células que hagan posible la supervivencia del organismo, es totalmente normal.

La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes. Cuando los mecanismos de muerte celular fallan o son deficientes pueden provocar enfermedades autoinmunes, cáncer, miocardiopatías y otras alteraciones en los procesos inflamatorios (Adolfo, 2002), como padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer,

la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (Sanz y Tavernarakis, 2005).

La muerte celular, según criterios clásicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos regulados, como la apoptosis, y la no regulada o necrosis, Figura 2.

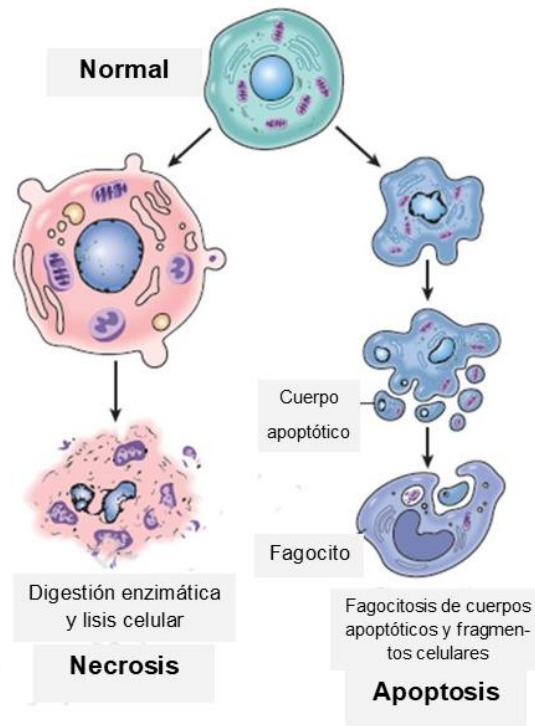


Figura 2. Comparación de los cambios morfológicos ocurridos en la necrosis y apoptosis. Obtenido y modificado de: <https://medical-junction.com/apoptosis-vs-necrosis/>

Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte accidental, o no programada, que ocurre cuando factores externos superan las condiciones fisiológicas del tejido y someten a la célula a estrés excesivo e incontrolable (Yan et al. 2020). Cuando la célula se encuentra en estado necrótico presenta hinchamiento de orgánulos, dilatación del retículo endoplásmico, ruptura de la membrana. (Hanson, 2016).

Al romperse la membrana celular se libera al exterior el contenido citoplasmático, dentro del cual se encuentran enzimas citoplasmáticas que sirven como marcadores bioquímicos de muerte necrótica, como es el caso de la determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), algunas de estas enzimas

pueden causar daño a las células vecinas, activando la respuesta inflamatoria. (Lizabarde, 2007)

Apoptosis

El término 'apoptosis' fue introducido en 1972 para describir un mecanismo general de eliminación celular controlada, que es complementario pero opuesto a la mitosis en la regulación de poblaciones de células animales y que está involucrado en la renovación celular en muchos tejidos normales (Kerr, 1972).

En la apoptosis existe un orden en el proceso de eliminación celular desencadenado por diversas causas, como la falta de factores de crecimiento, a nivel molecular, por el encendido de genes específicos. El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas. La primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda o de ejecución, se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis, por último, en la etapa de eliminación, donde los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (Hengartner, 2000).

Este tipo de muerte celular puede ser inducida por múltiples estímulos, entre los que figura el estrés oxidativo, la radiación, la ausencia de factores de crecimiento y la exposición al factor transformador del crecimiento β , el sistema Fas/Ligando Fas o el factor de necrosis tumoral α (Solis, 2004).

Características morfológicas:

- a) Aumento brusco de la densidad intracelular, debido a la dilatación del retículo endoplásmico.
- b) Incremento moderado y sostenido, de la concentración de calcio libre citoplasmática.
- c) Translocación de grupos glicanos a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos.
- d) Alteración conformacional del citoesqueleto, lo que produce deformación debido a la actividad de las proteasas llevando a la modificación del transporte intracelular retrógrado de factores de crecimiento y de proteínas.
- e) Aumento y activación de la síntesis de proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular, finalizando con la condensación y fragmentación de la cromatina, por acción de endonucleasas endógenas en los oligonucleosomas (Jordán, 2003).

Los principales componentes efectores de la apoptosis son las caspasas, estas se pueden dividir en dos subgrupos según su estructura y los aspectos temporales de su activación durante la muerte celular. Las caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10) son las principales responsables de iniciar la cascada de activación de caspasas, poseen largos dominios, circulan inactivas en forma de monómeros y para su activación es necesaria su dimerización. Los dímeros se forman debido a su reclutamiento a través de la unión de sus prodominios al adaptador FADD. En contraste, las caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7) son responsables del desmantelamiento real de la célula mediante la división de sustratos celulares, contienen solo un pequeño predominio, circulan inactivas en forma de dímeros y tan solo es necesaria la escisión por parte de una caspasa iniciadora para su activación. Tras la activación, las caspasas iniciadoras propagan las señales de muerte al activar las caspasas efectoras corriente abajo en forma de cascada. Las caspasas efectoras activadas escinden selectivamente un conjunto restringido de proteínas diana (proteínas del citoesqueleto, proteínas estructurales, nucleares y enzimas, y algunos controladores de activación de caspasa) para producir las características morfológicas y bioquímicas asociadas con la apoptosis (Fink y Cookson, 2005; Nicotera y Melino, 2004).

La apoptosis puede ser dividida en dos vías principales, intrínseca y extrínseca, Figura 3.

Las vías de señalización extrínseca que inician la apoptosis implican interacciones mediadas por receptores transmembrana. Éstos involucran receptores de muerte que son miembros de la superfamilia del gen receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (Elmore, 2007). Los receptores de muerte más conocidos son Fas y TNFR1 (receptor TNF), son proteínas transmembrana con dominios receptores expuesto en la superficie de la célula (Cascales, 2003). La unión del ligando de muerte al receptor de muerte resulta en la formación del sitio de unión para una proteína adaptadora y el complejo ligando-receptor-adaptador se conoce como DISC (complejo de señalización que induce muerte). El DISC, inicia el ensamblaje y activación de la procaspasa 8 (Sosa et al., 2012), la caspasa 8 puede entonces activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003). La caspasa 8 al igual que la caspasa 9 inicia la cascada amplificadora de activación que conduce al desmantelamiento celular, a la formación de cuerpos apoptóticos y a la fagocitosis de la célula (Cascales, 2003). La caspasa 8 puede activar a Bid (miembro proapoptótico de la familia Bcl-2) y ésta inducir la liberación del citocromo C y Apaf-1 (factor activador de proteasa apoptótica 1) de la mitocondria para formar el apoptosoma y activar también la vía intrínseca (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003).

La vía intrínseca es desencadenada en respuesta a diferentes estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes, daño del ADN, estrés y otras señales que provocan la translocación a la mitocondria de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003). Esta familia agrupa moléculas involucradas en la permeabilidad de la mitocondria, distinguiéndose entre moléculas antiapoptóticas (A1, bcl-2, bcl-w, bcl-xL, bfl-1, brag-1, mcl-1 y NR13) y proapoptóticas (bad, bak, bax, bcl-xs, bik, bid, bim y hrk (Pedrera et al.,2010).

Requiere la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales tales como el citocromo y smac/diablo (Angosto, 2003). La liberación del citocromo C al citosol, se acompaña de pérdida del potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003). El citocromo liberado al citosol se une a Apaf-1, que en presencia de dATP, provoca que Apaf-1 oligomerice en el complejo heptamérico conocido como apoptosoma, la procaspasa 9 es reclutada entonces a este apoptosoma donde se activará por autoescisión proteolítica. Una vez activa se disocia del complejo y proteoliza a la procaspasa 3 dando lugar a su forma activa (Vázquez, 2013), mientras que smac/diablo se une y antagoniza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP) (Angosto, 2003). La evasión de la apoptosis (muerte celular programada) es de los eventos cruciales que la célula desarrolla durante su proceso tumorigénico, las células afectadas no activan el proceso de apoptosis, porque sus alteraciones genéticas no lo permiten y escapan a los puntos de control que posee nuestro organismo suprimiendo las señales que permiten la muerte de las células mutadas, iniciando la proliferación descontrolada y agresiva (Serrano, 2001).

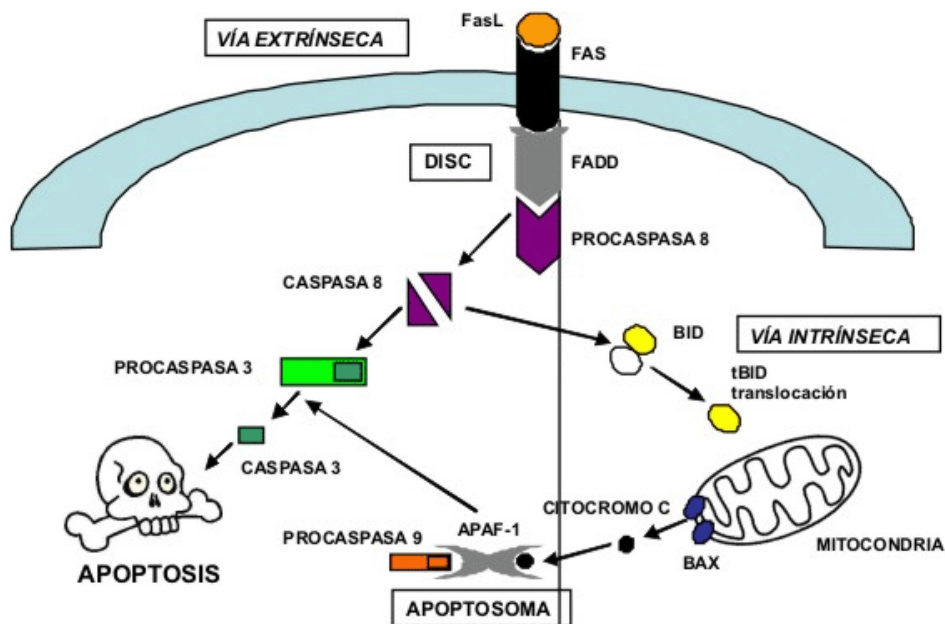


Figura 3. Apoptosis, vía intrínseca y extrínseca. Obtenido de:
https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332011000300009

Cáncer

El término cáncer agrupa entidades clínicas de diferente origen y características, es considerado como un conjunto de células que se dividen anormalmente, lo que conduce a la formación de agregados que crecen dañando tejidos vecinos, se nutren del organismo y alteran su fisiología. Además, estas células pueden migrar e invadir tejidos lejanos, donde encuentran un nicho apropiado para continuar su crecimiento originando metástasis que en muchas ocasiones es la causa de muerte de los individuos afectados. (Mitrus, et al. 2012). El proceso por el cual las células normales se convierten en células tumorales es denominado carcinogénesis, principalmente causado por mutaciones en el material genético, dichas mutaciones les confieren a las células la capacidad de dividirse sin control y generar descendencia con la misma alteración, estas presentan mayores capacidades de sobrevivencia y crecimiento, y ventajas proliferativas respecto a células normales (Hanahan y Weinberg, 2000). Normalmente, las células del sistema inmune son capaces de eliminar a estas células tumorales, en un proceso denominado inmunovigilancia tumoral. Sin embargo, algunas de estas células pueden adquirir nuevas capacidades que les permiten evadir estos mecanismos de control y se desarrolla la neoplasia. El rol de las alteraciones genéticas en la carcinogénesis se descubrió gracias al genoma humano, genes homólogos a genes

retrovirales relacionados previamente con el desarrollo de tumores. En células humanas normales estos genes se denominaron protooncogenes y se relacionan con el crecimiento y proliferación de las células normales. Cuando se encuentran mutados se denominan oncogenes y su mutación es de tipo dominante. Esto generalmente se traduce en aumento de sobrevivencia y proliferación. (Weitzel, et al. 2011).

Hanahan y Weinberg el año 2000, tras un exhaustivo análisis de la literatura publicada, describieron 6 características que son compartidas por las células tumorales: Independencia de señales de crecimiento, insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento, invasividad y metástasis, potencial ilimitado de replicación y angiogénesis sostenida. El año 2011, estos autores describieron 2 nuevas características: reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción inmune. Ahora en el año 2022 se analiza agregar cuatro nuevas características que son desbloquear la plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos y células senescentes, dando en total de 12 hallmarks. Figura 4. (Hanahan, 2022).



Figura 4. Características compartidas de las células tumorales (Hannahan, 2022).

Cáncer de Mama

El cáncer de mama es de las neoplasias malignas que se originan cuando las células saludables del tejido mamario empiezan a cambiar y proliferar sin control, formando una masa o conglomerado de células.

Al igual que en otros tipos de cáncer, existen factores que solos o en conjunto hacen a personas más vulnerables a padecer esta enfermedad entre ellos están la edad avanzada, menstruación temprana, obesidad, consumo de bebidas alcohólicas, antecedentes familiares, edad avanzada al momento del primer parto o no haber dado a luz, alteraciones genéticas (BRCA 1 y BRCA 2, PTEN en el síndrome de Cowden, P 53 en el síndrome de Li-Fraumeni, STK11 en el síndrome de Peutz-Jeghers, CDH1 en el síndrome de cáncer gástrico difuso). (SEOM, 2021).

Clasificación

Desde el año 2000, gracias al desarrollo de tecnologías de análisis genómico y a la identificación de patrones de expresión genética, se confirmó que cada cáncer mamario es único y tiene una firma genética distintiva. Empleando un agrupamiento jerárquico se definieron cuatro clases mayores, Tabla 1: subtipo Luminal A, Luminal B, Her2-positivo y Basal-like (Perou, 2000).

El subtipo Luminal A es el más común (50 a 60% del total). Los tumores luminales pueden ser ductales infiltrantes o lobulillares. Presentan receptores hormonales positivos y HER2/neu negativo.

El subtipo Luminal B representa el 10 al 20% de todos los tumores mamarios. Tienen un fenotipo más agresivo que los A. Aunque también expresan receptores hormonales (ER y PR), se diferencian del anterior en un mayor índice proliferativo y posibilidad de HER2/neu positivo.

El subtipo HER2-enriched supone del 15 al 20% de los tumores mamarios. No expresa receptores hormonales.

El subtipo Basal-like o Triple negativo representa el 10 a 20% de los cánceres de mama. Se caracteriza por la ausencia de los 2 receptores hormonales y de HER2/neu. La mutación de la p53 es frecuente y explica la agresividad y el peor pronóstico. La mayoría de los cánceres de mama en mujeres portadoras de BRCA1 son de este subtipo (Lam y Jiménez, 2014).

Tabla 1. Tipos moleculares de cáncer de mama. Obtenida de: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-familia-semergen-40-articulo-actualizacion-del-cancer-mama-atencion-S1138359314001701>

Subtipo	Receptores para estrógenos y progesterona	HER2/neu	Índice de proliferación (por Ki-67)	Pronóstico
Luminal A	ER y PR positivos	Negativo	Bajo (< 14 %)	Bueno
Luminal B	ER y PR positivos	Negativo/baja expresión	Alto (> 14 %)	Bueno
HER2	ER y PR negativos	Alta expresión	Alto	Malo
Basal-like (triple negativo)	ER y PR negativos	Negativo	Alto	El de peor pronóstico

Histológicamente, el cáncer de mama se puede clasificar en in situ (25%) e invasivo (75%). Entre los tumores in situ se encuentra el carcinoma ductal, el cual es el más común, y carcinoma lobulillar; mientras que los invasivos se clasifican en carcinoma ductal invasivo y lobulillar invasivo, Figura 5. (Boekhout et al; 2016).

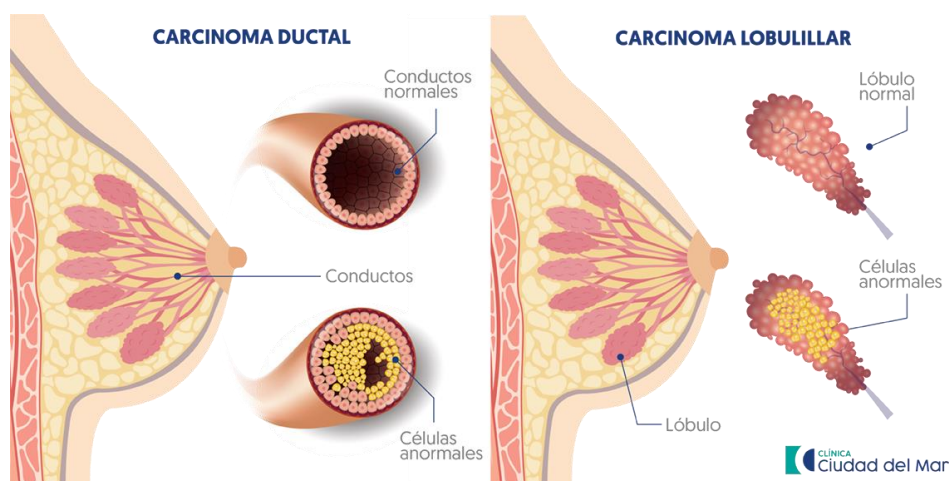


Figura 5. Cáncer de mama ductal y lobulillar. Obtenido de: <https://www.ccdm.cl/cancer-de-mama/tipos-de-cancer-de-mama/>

De acuerdo con datos de la OMS en México la incidencia y la mortalidad del cáncer de mama ocupan el primer lugar con 29 929 casos y 7 931 defunciones (IARC, 2020).

Tratamiento

El tratamiento para el cáncer de mama se compone principalmente de locales (cirugía y la radioterapia) y terapias sistémicas (quimioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida), estas terapias tienen sus indicaciones precisas dependiendo del paciente (Lee et al., 2015).

- La cirugía. Tiene como objetivo eliminar la mayor cantidad de células cancerígenas como sea posible, evaluar la presencia de metástasis y de los ganglios linfáticos, restaurar la forma de la mama. Hay dos tipos de cirugías, la primera es cirugía con conservación de la mama (se extirpa solamente la parte de la mama que tiene cáncer); y la segunda es la mastectomía (se extirpa totalmente la mama e incluso todo el tejido mamario).
- La radioterapia. Tratamiento que usa rayos o partículas de alta energía para eliminar las células cancerígenas. La utilización de la radioterapia depende de qué tipo de cirugía se realizó, además de si el cáncer involucra metástasis, el tamaño y la afección a la piel. Los dos tipos principales de radioterapia que se utilizan para el tratamiento del cáncer de mama son radioterapia externa y braquiterapia (Duffy et al., 2020).
- Quimioterapia. Está dividida en quimioterapia adyuvante y neoadyuvante. La primera hace referencia a la quimioterapia posterior a un tratamiento quirúrgico, con el objetivo de eliminar las células cancerosas que puedan haber permanecido, tiene el objetivo de evitar la recaída. La segunda hace referencia a la administrada antes de una cirugía o la usada como terapia estándar (en casos donde no puede haber un abordaje quirúrgico). Dentro de los fármacos más empleados se encuentra la doxorubicina, epirubicina, paclitaxel, docetaxel, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida y el carboplatino (Palmero et al., 2021).
- Terapia hormonal. Este tipo de terapia se utiliza en mujeres que padecen cáncer de mama con receptores positivos (ER-positivo y/o PR-positivo) después de un tratamiento quirúrgico para evitar el riesgo de recaída. Los medicamentos más empleados en la práctica clínica son el tamoxifeno y los inhibidores de la aromatasa (Davies et al., 2011).
- Terapia dirigida/biológica. Utilizada en los casos donde los medicamentos de quimioterapia no son eficaces, tal es el caso del cáncer de mama HER2 positivo. El medicamento más usado en esta terapia es el trastuzumab (anticuerpo monoclonal humanizado IgG contra HER2), el cual inhibe la proliferación de células humanas tumorales que sobreexpresan HER2. Éste puede ser usado antes de la cirugía para tratar el cáncer de mama en etapa inicial, o para tratar el cáncer de mama avanzado.

Compuestos Organometálicos

Los compuestos organometálicos son complejos metálicos que contienen al menos un enlace covalente carbono-metal, estos tienen diferentes conjugaciones estructurales, así como una diversa estereoquímica, lo que permite realizar diseños de sus ligandos teniendo como objetivo controlar su actividad, además de ser compuestos estables, sin carga y relativamente lipofílicos (Gasser et al., 2010). Lo cual los ha colocado como tratamiento prometedor gracias a que sus enlaces carbono-metal ejercen efectos electrónicos y estéricos que permiten controlar su actividad en sistemas biológicos. En el caso específico de los compuestos organometálicos de estaño (COE) desde la década de 1980 se ha estudiado su actividad antiproliferativa, mostrando resultados prometedores hasta el día de hoy (Crowe et al., 1980). En los COE debe existir al menos un enlace Sn-C, presentan fórmula general $[SnR_nX_{4-n}]$, donde $n = 1-4$, R es un ligando alquilo o arilo y X puede ser halógeno, hidrógeno, metal o grupo unido al estaño a través de un átomo de oxígeno, azufre, nitrógeno, halógeno, etc. (Ceballos, 2014).

Gracias a su gran diversidad de variaciones en sus ligandos se han podido formar varios compuestos diorganoestánicos y triorganoestánicos (IV) con alta actividad antiproliferativa in vitro contra una variedad de cánceres cuya actividad antitumoral puede ser atribuida a su capacidad inductora de apoptosis (Tabassum y Pettinari, 2006) a las células a través de la inhibición en la síntesis de ADN y otras macromoléculas, la interacción directa del derivado organoestaño con la membrana celular o el aumento de la concentración intracelular de iones Ca^{2+} , también se ha sugerido que estos compuestos tienen efectos antiproliferativos a través de la unión a grupos tiol de las proteínas (Ceballos, 2014).

Antecedentes

Los compuestos de organoestaño (COE) han mostrado tener mejor actividad que otros compuestos organometálicos conocidos, como el cisplatino que genera tanto resistencia a medicamentos, como diferentes efectos secundarios que afectan la calidad de vida de los pacientes, esto ha impulsado el estudio de los COE que son complejos metálicos benignos (Gómez-Ruiz, 2010). La química de complejos de organoestaño(IV) de bases de Schiff ha atraído mucha atención debido a sus actividades farmacológicas como actividades antibacterianas, antifúngicas y antitumorales, además de presentar formas simples, versatilidad de ligandos, así como complejos estables.

En este trabajo se evaluó el efecto antiproliferativa y apoptótico específicamente de un compuesto pentacoordinado de bistrimetilsililestano(IV) derivado de un ligante tridentado que contiene piridoxal (3e), Figura 6. Su actividad biológica se debe en gran medida a él piridoxal que es la forma biológicamente activa de la vitamina B6, que actúa como coenzima en varios procesos biosintéticos, metabólicos o reguladores, y que en presencia de metales el piridoxal funciona como catalizador en diferentes reacciones metabólicas importantes, como la transaminación, la descarboxilación y la racemización de aminoácidos (Gómez-Ruiz, 2010).

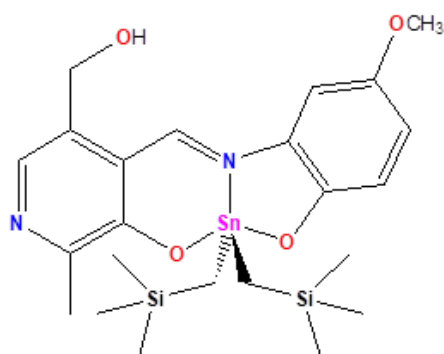


Figura 6. Compuesto pentacoordinado de bistrimetilsililestano (IV) derivado de un ligante tridentado que contiene piridoxal (12,12-Bis(trimetilsilil)metil-4-hidroximetil-8-metoxi-1-metilbenzo[d]-pirido[4,3-h]-11,13,2,6-dioxazaestanonina) 3e. Obtenida de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022328X17305077>

En el 2017, Galván-Hidalgo y colaboradores, presentaron las propiedades químicas y físicas de varios compuestos organometálicos sintetizados por ellos, también mostraron su concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) para la línea MDA-MB-231 obtenida a través de la técnica de sulfurodamina B.

Línea Celular	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µM)
MDA-MB-231	0.227	0.35

Tabla 2. Resultados de actividad antiproliferativa del compuesto 3e para la línea MDA-MB-231 (Galván-Hidalgo et al, 2017)

Planteamiento del Problema

Los tratamientos actuales contra el cáncer de mama, como la cirugía, quimioterapia y radioterapia han probado ser poco eficaces en estadios avanzados de la enfermedad, además de afectar la calidad de vida de los pacientes. Debido a esto existe la necesidad de encontrar nuevas terapias y tratamientos, en este sentido los compuestos organometálicos en la actualidad son estudiados como posibles candidatos para el tratamiento del cáncer de mama, mostrando resultados alentadores.

Por esto, el presente trabajo pretende estudiar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del compuesto organometálico 3e en líneas celulares de cáncer de mama.

Justificación

En México y en el mundo el cáncer de mama es el tipo de mayor incidencia y número de muertes en mujeres, en el 2020 se registraron más de 2 millones de casos en México.

Actualmente los tratamientos contra el cáncer resultan ser poco efectivos en estadios avanzados de la enfermedad, así como perjudiciales para la calidad de vida de los pacientes. En consecuencia, es necesario buscar nuevas alternativas para el tratamiento de cáncer de mama, que sean efectivas además de ser amables con la calidad de vida del paciente. Una de estas alternativas son los compuestos organometálicos, como el compuesto 3e, que puede tener una importante actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerígenas por lo que resulta importante realizar investigaciones sobre este tipo de compuestos y potencial como tratamiento contra el cáncer.

Hipótesis

Ha sido reportado que algunos compuestos organometálicos con centro de estaño(IV) presentan actividad antiproliferativa y citotóxica en líneas celulares tumorales, por lo que se espera que el compuesto 3e presente actividad antiproliferativa y apoptótica en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y JC.

Objetivos

General

Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del compuesto organometálico de estaño 3e.

Particulares

- Determinar la actividad antiproliferativa del compuesto 3e en líneas celulares de cáncer de mama a través de la determinación de la IC₅₀ mediante la técnica de incorporación del cristal violeta.
- Evaluar la actividad necrótica del compuesto 3e en cultivos de células tumorales, por medio de la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares.
- Evaluar el efecto del compuesto 3e en el ciclo celular.
- Evaluar el efecto apoptótico del compuesto 3e en las líneas celulares MDA-MB-231 y JC a través de la inmunodetección de la caspasa-3 activa por citometría de flujo.
- Evaluar el efecto antiproliferativo del compuesto 3e en cultivos de células no tumorales (linfocitos de sangre periférica) mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína.

Metodología

Cultivo de líneas celulares.

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y JC fueron cultivadas en cajas Petri de cristal de 100mm (Pirex, USA) con 10 ml de medio RPMI 1640 (Microlab, MEX) con L-glutamina rojo fenol y bencilpenicilina, al 5 % de suero neonato de ternera y 3 % de suero fetal de bovino (SFB), previamente desactivado a 57 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en incubación (Nuair, USA) a temperatura de 37 °C con 5 % de CO₂ y a 1 atmósfera de presión y húmeda a punto de rocío.

Preparación del compuesto.

En una balanza analítica se pesó 1 mg de compuesto 3e y se solubilizó en 1000 µL de dimetil sulfóxido (DMSO), se realizaron alícuotas de 20 µl y se mantuvieron en congelación. Posteriormente se utilizaron 10 µl del compuesto en 1000 µl de medio de cultivo RPMI 1640 (Microlab, MEX) al 5 % de suero neonato. De esta solución se tomaron los microgramos necesarios para llevar a cabo los ensayos experimentales.

Evaluación de la actividad antiproliferativa mediante la técnica de incorporación de cristal violeta.

Las líneas celulares se cultivaron en placas de cultivo de 96 pozos (Corning, USA) a una densidad de 7000 células/pozo en 100 µl de RPMI 1640 (Microlab, MEX) al 5 % de suero de neonato y 3 % de SFB, se incubaron a 37 °C a 5 % de CO₂ a 1 atmósfera de presión y húmeda a punto de rocío durante 24 h. Una vez transcurridas las 24 h se retiró el medio de la placa y las células se estimularon a diferentes concentraciones

Transcurridas las 24 h del tratamiento se retiró el medio de cultivo e inmediatamente fueron fijadas con 50 µl de glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, USA) durante 20 minutos en agitación constante. Al término se lavó el fijador con agua corriente y se dejó secar al aire. Posteriormente se añadieron 50µl de colorante cristal violeta al 0.1 % (Sigma-Aldrich, USA) en solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6 con agitación constante por 20 minutos. Se retiró y se eliminó el exceso de colorante lavando con chorro de agua corriente y se dejó secar al aire. Posteriormente se agregaron 100 µl ácido acético (J. T. Baker, USA) al 10 % y se dejó en agitación

constante durante 20 minutos con la intención de solubilizar el colorante retenido. Transcurridos los 20 minutos de agitación la absorbancia fue determinada en un lector de placas (Epoch) a 590 nm. Una vez obtenidas las absorbancias se procedió a realizar una curva de dosis respuesta. Los datos fueron linealizados y mediante la ecuación de la recta se determinó la concentración en la cual la concentración celular disminuía al 50 % (IC₅₀, concentración inhibitoria 50) así como el coeficiente de relación para dicha recta.

Determinación de la actividad necrótica mediante la evaluación de la actividad de la enzima lactato Deshidrogenasa (LDH).

Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Corning, USA) a una densidad de 7000 células/ pozo en 100 µl de medio RPMI-1640 (Microlab, MEX) al 5 % de suero neonato de ternera y 3 % de SFB, se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío durante 24 h. Transcurridas las 24 h se retiró el medio de cultivo y se realizaron las siguiente condiciones: Blanco, control basal con únicamente medio de cultivo RPMI-1640, un control con el vehículo usado (DMSO), un control positivo en el que las células fueron lisadas durante una hora con 100 µl de una solución al 2 % de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich USA) en RPMI-1640 y los tratamientos con las diferentes concentraciones del compuesto. Pasadas las 24 h los medios fueron retirados y pasados a una placa cónica de 96 pozos (Corning, USA) y se centrifugaron (Centrífuga Orto alresa, digicen 21 R) a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, posteriormente se recuperaron del sobrenadante 40 µl y se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) y se agregaron 40 µl de compuesto de reacción (kit CytoTox 96) a cada pozo. La placa se mantuvo a temperatura ambiente protegida de la luz con papel aluminio durante 25 minutos. Finalmente se colocó solución de paro (Ácido Acético 1 M) y se midió la absorbancia en un lector de placas (Epoch) a 490 nm. Una vez obtenidas las absorbancias se realizó el procesamiento de los datos correspondiente para la cuantificación de la enzima.

Inmunodetección de caspasa-3 activa por citometría de flujo.

Las células MDA-MB-231 y JC fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad de 500,000 células por pozo con un volumen de 2 ml de RPMI-1640 suplementado con suero de neonato al 5 % y 3 % SFB durante 24 h. Posterior a las 24 h se estimularon las células de acuerdo con las siguientes condiciones: Control (cambio de medio por medio fresco), Vehículo (DMSO, Sigma-Aldrich, USA), control positivo de muerte apoptótica con colchicina (Sigma-Aldrich, USA), cisplatino y las concentraciones correspondientes a las IC₅₀ de cada línea celular. Posterior a la

estimulación los cultivos se dejaron incubar por 24 h. Trascorridas las 24 h se recuperó el medio de los cultivos y se despegaron las células con tripsina pasándolas a tubos de 15 ml, a continuación se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y las células se fijaron con 500 µl etanol al 70 % en PBS filtrado durante 30 minutos a 4 °C, transcurrido el tiempo las células fueron lavadas con 5 ml de PBS dos veces por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos cada lavado y colocadas en tubos de citometría, terminados los lavados se agregó 50 µl de anticuerpo primario, anticaspasa-3 activa (anticuerpo producido en conejo, SIGMA) en una relación 1:1000 en PBS filtrado y se dejó con el anticuerpo durante una noche a una temperatura de 4 °C. Posteriormente las muestras se lavaron dos veces con PBS filtrado, se agregó 50 µl de anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FIT-C (anticuerpo de ratón, anti conejo, anti caspasa-3 activa) en una relación de 1:1000 de PBS. Durante 2 h las muestras se mantuvieron protegidas de la luz a una temperatura de 37 °C. Transcurrido el tiempo las muestras se lavaron dos veces con PBS filtrado. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo (BD FACAS Aria II, USA).

Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo.

Las células MDA-MB-231 y JC fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad de 500,000 células por pozo con un volumen de 2 ml de RPMI-1640 suplementado con suero de neonato al 5 % y 3 % SFB durante 24 h. Posterior a las 24 h se estimularon las células de acuerdo con las siguientes condiciones: Control (cambio de medio por medio fresco), Vehículo (DMSO, Sigma-Aldrich, USA), control positivo de muerte apoptótica con colchicina (Sigma-Aldrich, USA), cisplatino y las concentraciones correspondientes a las IC₅₀ de cada línea celular. Posterior a la estimulación los cultivos se dejaron incubar por 24 h. Trascorridas las 24 h se recuperó el medio de los cultivos y se despegaron las células con tripsina pasándolas a tubos de 15 ml, a continuación se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos (Dinac, USA), se desechó el sobrenadante y las células se fijaron con 500 µl etanol al 70 % en PBS filtrado durante 30 minutos a 4 °C, transcurrido el tiempo las células fueron lavadas con 5 ml de PBS dos veces por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos cada lavado y colocadas en tubos de citometría, terminados los lavados se agregó 20 µl de RNAsa, y se dejó durante 20 minutos a una temperatura de 4 °C. Posteriormente se agregaron 5 µl de yoduro de propidio, inmediatamente las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo (BD FACAS Aria II, USA).

Evaluación del efecto del compuesto sobre la proliferación de linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CFSE)

Se obtuvieron de 20 ml de sangre periférica de un donador aparentemente sano, en tubos Vacutainer con EDTA (BD Franklin Lakes N.J., USA), posteriormente se agregaron 5 ml de sangre a tubos cónicos de vidrio de 15 ml (Pirex, USA) los cuales contenían previamente 5 ml de Histopaque (Sigma-Aldrich, USA). A continuación, los linfocitos se marcaron agregando 50µl de carboxifluoresceína (Sigma, USA) (2 µl de CSFE/ml de RPMI-1640 20 %) durante 15 minutos protegidos de la luz. Se realizan dos lavados agregando 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 al 5% SFB, la muestra se centrifugó (Dinac, USA) durante 5 minutos a 1500 rpm y se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 al 20 % de SFB. Los linfocitos se activaron con fitohemaglutinina (Microlab, USA) (20 µl de PHA/ml RPMI-1640) y se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 ml (Corning, USA) a una densidad de 1×10^6 células/ml de RPMI-1640 al 20 % SFB y PHA. Las células contenidas en cada uno de los tubos cónicos de 1.5 ml (Nest, USA) se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad de 200,000 células/pozo en 200 µl de RPMI-1640 al 20 % de SFB considerado los siguientes tratamientos: control sin activar, control activado, control sin marca y activado, control sin activar y sin marca. Se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ a una atmósfera húmeda por 72 horas.

El cultivo se estimuló considerando las siguientes condiciones: control sin activar (con CSFE y sin PHA), control activado (con CSFE y con PHA), control sin marca y activado (Sin CSFE y con PHA), control sin activar y sin marca (sin CSFE y sin PHA), vehículo e IC₅₀ correspondientes a cada línea tumoral del compuesto 3e. Transcurridas las 24 horas se colectaron los linfocitos en tubos de citometría (un tubo por condición) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregaron 500 µl de verseno, se realizaron dos lavados y el botón celular se resuspendió en 500 µl de PBS filtrado. Finalmente, las muestras se analizaron con el citómetro de flujo (BD FACS Aria II, USA) y los datos obtenidos fueron procesados en el programa Flowing Software 2.5.1.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos son una representación de la media de al menos tres experimentos independientes con seis repeticiones cada uno aplicando un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey con una significancia de $p < 0.05$ comparada con el control.

Resultados

Actividad antiproliferativa del compuesto 3e en líneas celulares de cáncer de mama.

Para determinar el efecto antiproliferativo del compuesto 3e las células tumorales fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratadas con diferentes concentraciones del compuesto 3e durante 24 horas, el número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta determinando la concentración que abate con el 50% de número celular (IC_{50}).

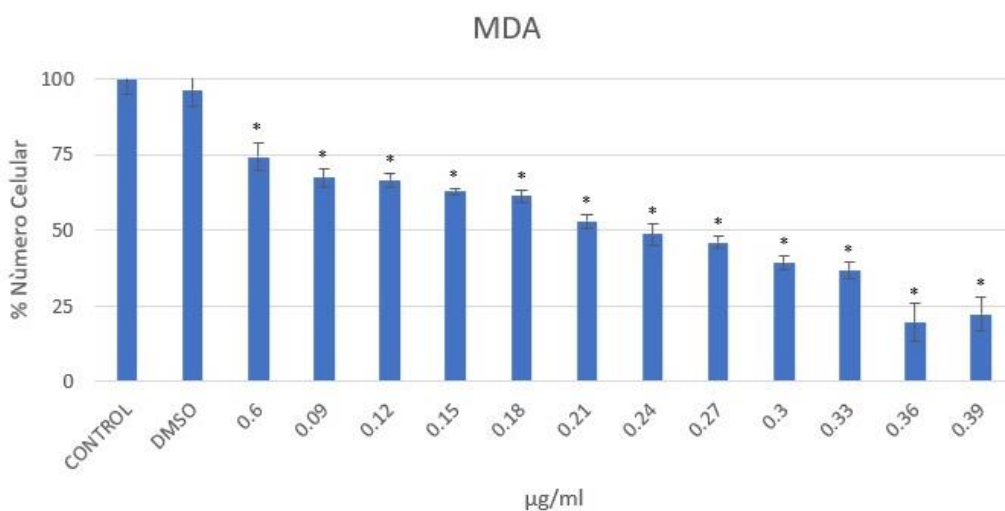


Figura 7. Efecto antiproliferativo del compuesto 3e en la línea celular MDA-MB-231. Los datos obtenidos son representativos de 3 ensayos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

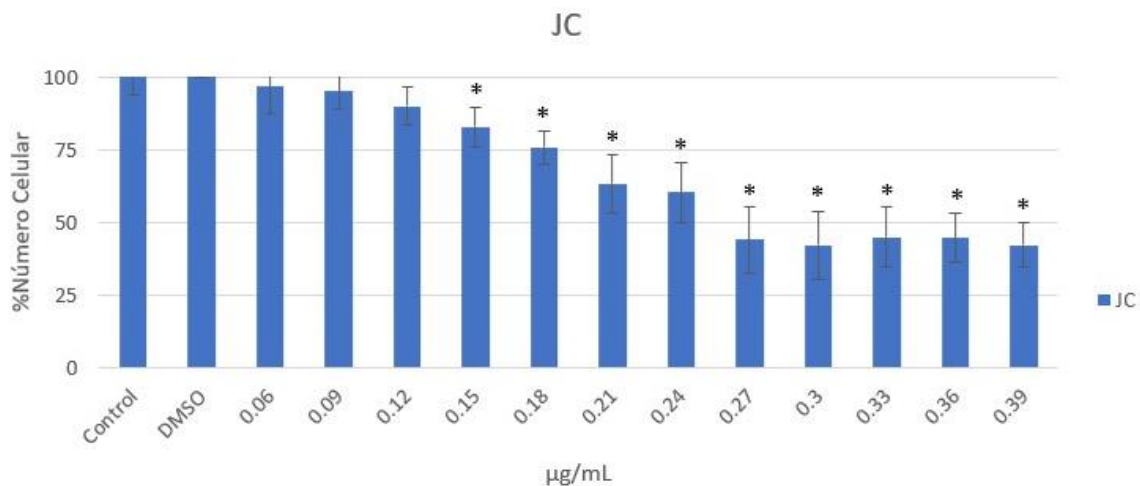


Figura 8. Efecto antiproliferativo del compuesto 3e en la línea celular JC. Los datos obtenidos son representativos de 3 ensayos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control (ANDEVA seguida de una prueba de Tukey).

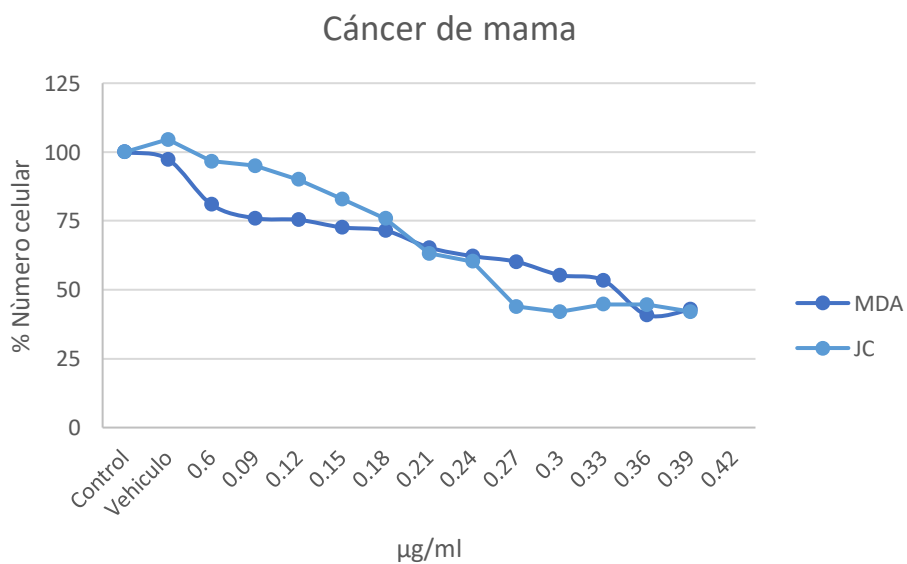


Figura 9. Curva dosis respuesta comparativa del compuesto 3e en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y JC.

Línea Celular	IC ₅₀ (µg/ml)
MDA-MB-231	0.233
JC	0.302

Tabla 3. Valores de la concentración del compuesto 3e que inhiben en un 50% el número celular (IC₅₀), para las líneas celulares de cáncer MDA-MB-231 y JC expresada en µg/ml.

Los resultados obtenidos (Figura 9) muestran que el compuesto 3e afectó el potencial proliferativo en las dos líneas celulares de manera dosis-dependiente, en donde a mayor concentración del compuesto disminuye el número celular. La Tabla 3 muestra los valores de IC₅₀ para cada línea celular.

Efecto necrótico del compuesto 3e en líneas celulares de cáncer de mama.

Una vez determinado que el compuesto 3e afecta el potencial proliferativo de las células tumorales, se procedió a evaluar si esta disminución en el número celular se debe a la inducción de muerte por necrosis, por lo que se midió la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares MDA-MB-231 y 4T1 tratados con el compuesto 3e. La actividad de la enzima LDH fue considerada como un marcador de muerte necrótica por la pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática.

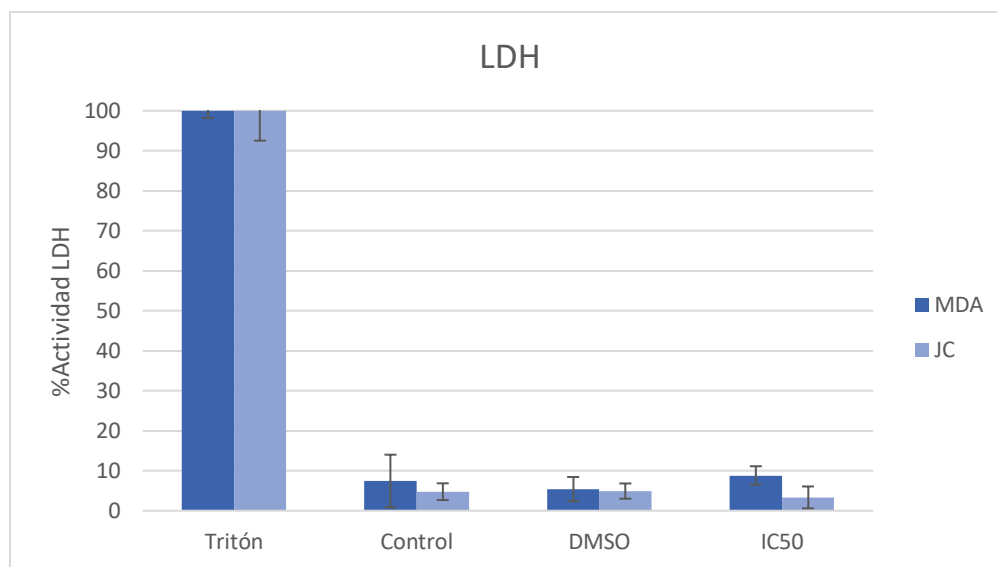


Figura 10. Actividad de LDH presente en los sobrenadantes de células tumorales tratadas con el compuesto 3e en las concentraciones de IC_{50} respectivas para cada línea celular y se tomó como control positivo de necrosis el tratamiento con Tritón-X100. Los datos mostrados son representativos de 3 ensayos independientes y se les realizó una prueba de ANDEVA seguida de una prueba Tukey con $p < 0.05$ vs control.

Los valores mostrados en la Figura 10 indican que el compuesto 3e no induce muerte necrótica en las líneas celulares MDA-MB-231 y JC, ya que no hay presencia de actividad de LDH, por lo que la disminución celular no se debe a este tipo de muerte.

Evaluación del Ciclo Celular

Una vez que se encontró que la disminución en el número celular de los cultivos tratados con el compuesto 3e no se debe a la inducción de muerte por necrosis, se procedió a evaluar si presenta un efecto citostático y las células se encuentran solamente detenidas en alguna fase del ciclo celular. Para ello, los cultivos de células MDA-MB-231 y JC fueron tratadas con la IC_{50} obtenida para cada una de ellas, marcadas con yoduro de propidio y se evaluó la distribución de ADN por citometría de flujo.

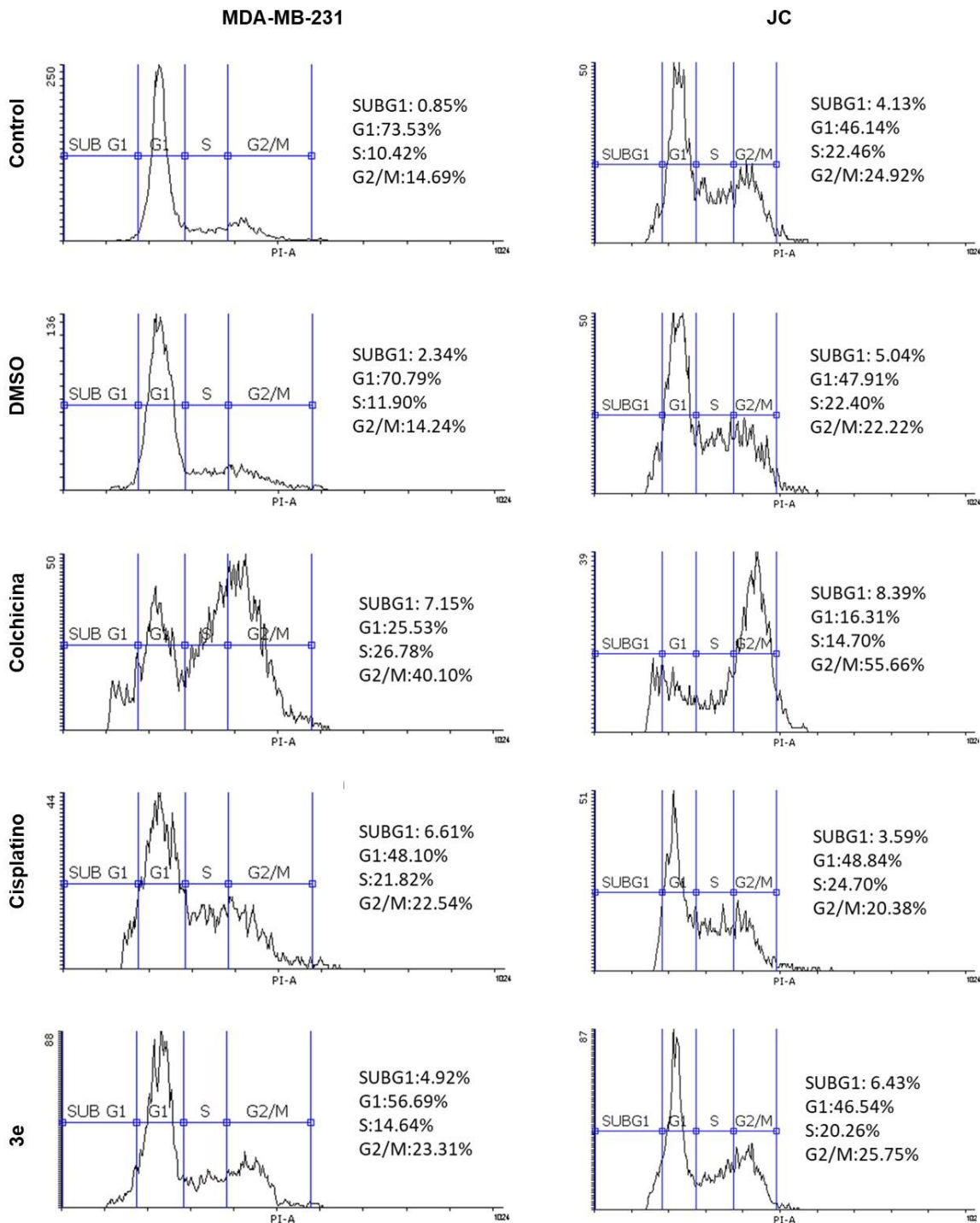


Figura 11. Efecto del compuesto 3e en el ciclo celular en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y JC. Control (células sin tratamiento), vehículo (DMSO), control positivo (colchicina), cisplatino y la IC50 para el compuesto 3e. Las imágenes son representativas de 3 ensayos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que hay una disminución en el número de células que se encuentran en la fase G1 del ciclo celular y un incremento en la fase G2/M del ciclo celular de las células MDA-MB-231 tratadas con el compuesto 3e, sugiriendo que el compuesto las detiene en esta fase del ciclo celular y probablemente se esté activando alguna ruta de muerte celular programada.

Actividad apoptótica del compuesto 3e en líneas celulares de cáncer de mama.

Con el propósito de determinar si el compuesto 3e induce a las células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231 y JC a una muerte por apoptosis, las células fueron sembradas y estimuladas con la IC50 respectiva de cada línea celular durante 24 horas y se evaluó la presencia de la caspasa 3 activa por citometría de flujo.

MDA-MB-231

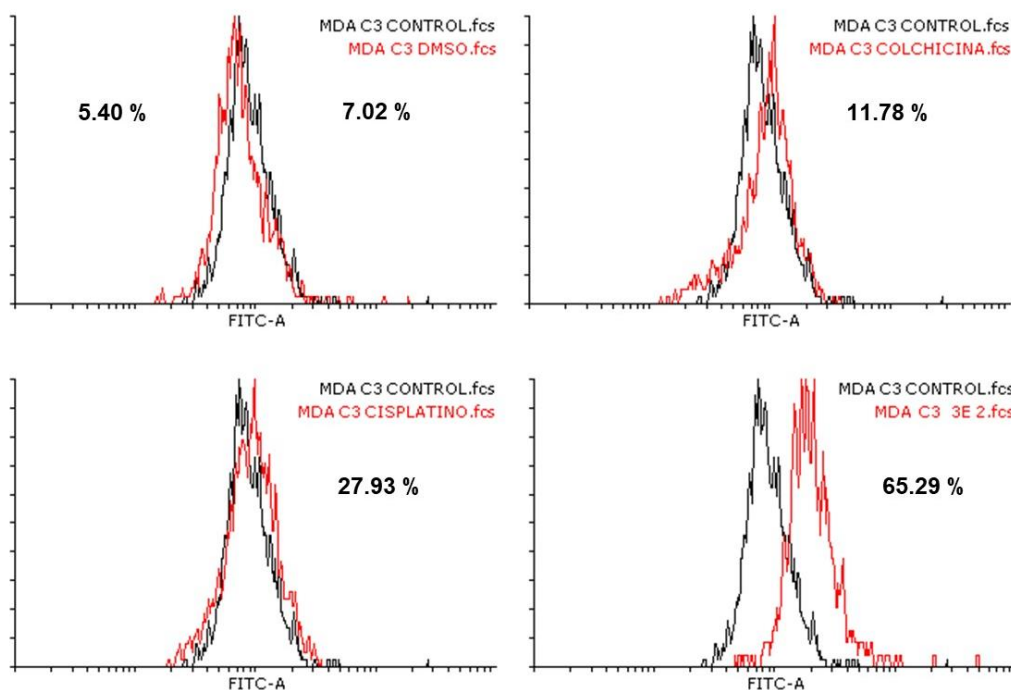


Figura 12. Efecto del compuesto 3e sobre la presencia de caspasa 3 activa en cultivos de la línea celular MDA-MB-231. Control (células sin tratamiento), vehículo (DMSO), control positivo (colchicina), cisplatino y tratamiento con la IC50 obtenida para el compuesto 3e. Las imágenes son representativas de 3 ensayos independientes.

JC

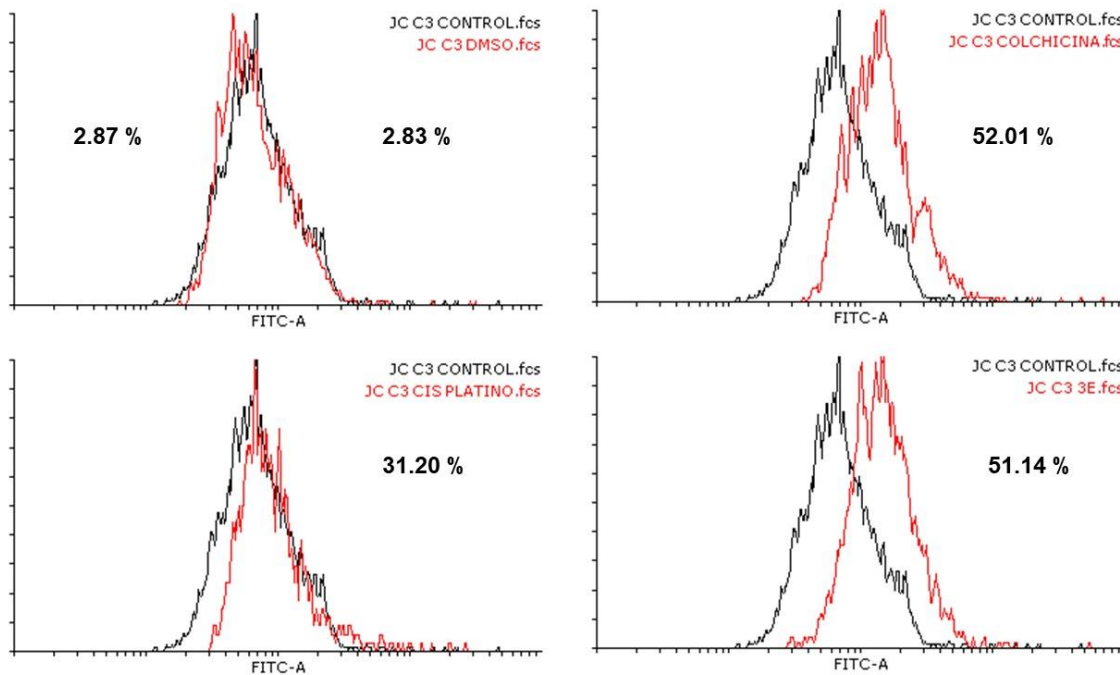


Figura 13. Detección de la caspasa 3 activa en cultivos de la línea celular JC tratados con el compuesto 3e. Control (células sin tratamiento), vehículo (DMSO), control positivo (colchicina), cisplatino y la IC50 tratamiento con la IC50 obtenida para el compuesto 3e. Las imágenes son representativas de 3 ensayos independientes.

Los resultados obtenidos muestran un incremento de más del 50% de la caspasa 3 activa en los cultivos de las líneas celulares JC y MDA-MB-231 tratados con el compuesto 3e, lo que indica que este compuesto induce a las células tumorales de cáncer de mama a una muerte celular apoptótica. Adicionalmente los resultados indican que el cis platino incrementa en menor medida la presencia de caspasa 3 en los cultivos tratados sugiriendo que induce en menor medida este tipo de muerte celular.

Finalmente, con la finalidad de determinar la selectividad del compuesto se evaluó si este afecta el potencial proliferativo de linfocitos humanos.

Actividad del compuesto 3e en cultivos de linfocitos humanos.

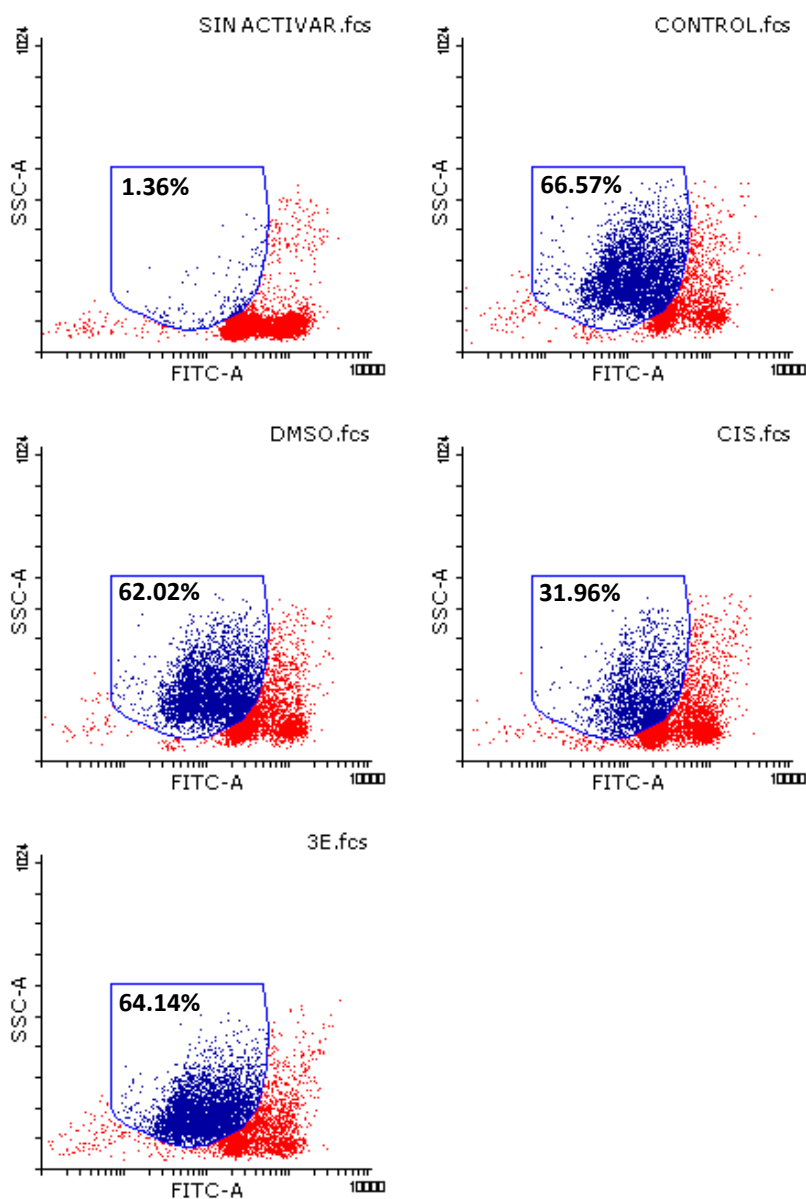


Figura 14. Efecto del compuesto 3e en cultivos de linfocitos humanos. Las células linfocíticas fueron activadas con fitohemaglutinina por 24h y tratadas con 0.302 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto 3e por 48h. Las imágenes son representativas de 3 ensayos independientes.

Los resultados muestran que el compuesto 3e no afecta el potencial proliferativo de los linfocitos humanos mostrando que tiene cierta selectividad por las células tumorales, también se observa que el cis platino si afecta la proliferación de este tipo celular.

Discusión

El cáncer de mama es un gran problema de salud a nivel mundial siendo el de mayor incidencia en mujeres y con la mayor tasa de mortalidad según datos de la OMS. Los tratamientos para las primeras etapas de la enfermedad cuando el tumor está localizado suelen ser exitosos, dichos tratamientos son la cirugía y la radioterapia. Pero en etapas más avanzadas estos tratamientos ya no son suficientes y se recurre, en la mayoría de los casos a la quimioterapia en la cual se utilizan sustancias citotóxicas que suelen ser no selectivas, afectando la calidad de vida del paciente.

Debido a esto es de vital importancia encontrar mejores terapias y quimioterapéuticos que no solo tengan un buen rendimiento en la disminución de células tumorales, sino que estos permitan al paciente tener una buena calidad de vida

En las últimas décadas los compuestos organometálicos desde el descubrimiento del cisplatino han ganado una gran importancia en su estudio como terapéuticos en el tratamiento de diversas enfermedades, en especial los compuestos de organoestaño que a diferencia del cisplatino prometen tener mejores resultados, como menor toxicidad, mayor actividad antiproliferativa aun con bajas concentraciones y menores efectos secundarios. (Varela-Ramírez et al., 2011 y Florea y Busselberg, 2011).

Como ya se ha reportado anteriormente los compuestos organometálicos muestran resultados prometedores, siendo el objetivo de este trabajo evaluar su efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico.

Primero se realizó la técnica de cristal violeta para obtener su concentración inhibitoria media o IC_{50} y así determinar su actividad antiproliferativa. Esta técnica demostró que el compuesto 3e tiene un efecto dosis dependiente tanto en la línea celular MDA-MB-231 como en la línea JC, con una IC_{50} de 0.233 y 0.302 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, las cuales corresponden a lo anterior reportado por Gómez y colaboradores en el 2017 en donde se obtuvo una IC_{50} de 0.227 $\mu\text{g/ml}$ en la línea MDA-MB-231, además de ser más bajas en relación con el cisplatino, compuesto que lleva décadas siendo uno de los quimioterapéuticos más conocidos con una IC_{50} 13.03 $\mu\text{g/ml}$. Las IC_{50} de otros compuestos organoestaños son bajas, por ejemplo, resultados publicados muestran que en líneas celulares de cáncer de mama se obtuvieron IC_{50} de máximo 1 $\mu\text{g/ml}$ (Martel, 2014). Otro compuesto organometálico es el compuesto trifenilestanil 2-fenil-1,2,3-triazol-4-carboxilato el cual fue probado contra las células de cáncer cervicouterino exhibió una IC_{50} de 0.00447 $\mu\text{g/ml}$ y fue más activo que el cisplatino (Varela-Ramírez et al., 2011).

Evaluado el efecto antiproliferativo del compuesto 3e posteriormente se determinó si el compuesto induce una muerte necrótica, esto mediante la evaluación de la actividad de la enzima LDH en los medios de cultivo. Esta prueba dio como resultado un porcentaje de actividad LDH bajo (menor al 10 %) para ambas líneas en comparación del control positivo el tritón y sin diferencia significativa en comparación de los controles, representando así una ventaja sobre otros compuestos organometálicos y quimioterápicos como el cisplatino que obtienen un porcentaje mayor al 30% en la línea MDA-MB-231 (Laskar et al, 2017) induciendo muerte necrótica resultando en una respuesta inflamatoria teniendo efectos secundarios agresivos.

Posteriormente se realizó la evaluación del compuesto en el ciclo celular, este demostró que el compuesto 3e a su concentración inhibitoria media detiene el ciclo celular en las fases G2/M en la línea celular MDA-MB-231. Algunos artículos señalan que los compuestos organometálicos pueden parar el ciclo en las fases G0/G1 (Attanzio et al., 2020) y G2/M en líneas celulares de cáncer embrionario y gástrico (Yunlan et al., 2014 y Asanagi et al., 2016) Siendo en estas fases donde se encuentran los principales checkpoints del ciclo que son las principales dianas de diferentes medicamentos (Attanzio et al., 2020).

Para determinar el tipo de muerte que induce el compuesto 3e en las líneas celulares se realizó la prueba de positividad de caspasa 3 activa en los cultivos celulares tratados con este. Para ambas líneas se observa en el histograma dos picos separados, el del control y otro con las células tratadas con la IC₅₀ del compuesto demostrando que estas son positivas a caspasa 3 activa en un 55.29 % en MDA-MB-231 y 51.14 % en JC, que a su vez prueba que las células están muriendo por muerte apoptótica, lo que ya ha sido previamente reportado para otros compuestos organometálicos en diferentes líneas celulares de hepatocarcinoma, cáncer de mama y colorrectal (Ge et al., 2013; Girasolo et al., 2017 y Kamaludin et al., 2019). Attanzio y colaboradores sugieren que los compuestos organometálicos pueden activar la vía de apoptosis intrínseca, lo que lleva a la generación de daño en el ADN, estrés oxidativo y, posteriormente, la activación de p53. Aunque aún falta hacer otros ensayos para observar la morfología o la fragmentación del DNA, la cuantificación de la caspasa 3 es una prueba importante de su actividad apoptótica, lo que demuestra el potencial que tiene el compuesto 3e como una posible terapia.

Muchos quimioterapéuticos y fármacos utilizados para el tratamiento de cáncer tienen la característica de atacar no solo células tumorales, sino que también atacan otras células con una gran tasa de división como las células sanguíneas, provocando múltiples efectos secundarios. Por ello es importante realizar la evaluación del efecto antiproliferativo del compuesto 3e en células no tumorales (linfocitos humanos) y así observar su efecto en células normales. Se obtuvieron los

siguientes resultados: con una concentración del 0.302 µg/ml se obtuvo un porcentaje de proliferación del 64.14% mientras que en el cisplatino el porcentaje fue de 31.96%. Estos resultados son favorables ya que Carraher y Roner en el 2014 reportaron que algunos compuestos organometálicos son tóxicos para las células del sistema inmunológico causando la muerte de estas por medio de apoptosis y necrosis.

Conclusiones

El compuesto 3e afecta el potencial proliferativo de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y JC de manera dosis-dependiente con IC50 de 0.233 y 0.302 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

El compuesto 3e no induce muerte por necrosis en los cultivos celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y JC.

El compuesto 3e detiene a las células tumorales MDA-MB-231 en la fase G2/M del ciclo celular.

El compuesto 3e induce muerte por apoptosis en los cultivos de células tumorales MDA-MB-231 y JC.

El compuesto 3e no afecta el potencial proliferativo de linfocitos humanos a una concentración de 0.302 $\mu\text{g/ml}$.

Bibliografía

- Adolfo, G. (2002). Mecanismos de muerte celular: Apoptosis y Necrosis. Simposio sobre anestesia y estrés. *Revista Argentina de Anestesiología*. 60, 391-402.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Biología molecular de La Célula* (5ªed.). Omega: España. pp. 1225-1226
- American Society of Clinical Oncology (ASCO). (2019). Cáncer de mama. Consultado el 12 de enero de 2021. Disponible en <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-mama/introducci%C3%B3n>
- Angosto, M. C. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 69(1), 37-64.
- Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett*. 2005; 579 (15): 3287-3296.
- Asanagi, M., Yamada, S., Hirata, N., Itagaki, H., Kotake, Y., Sekino, Y., et al. (2016). Tributyltin Induces G2/M Cell Cycle Arrest via NAD(+)-dependent Isocitrate Dehydrogenase in Human Embryonic Carcinoma Cells. *J. Toxicol. Sci.* 41 (2), 207–215.
- Attanzio, A., D'Agostino, S., Busà, R., Frazzitta, A., Rubino, S., Girasolo, M. A., et al. (2020). Cytotoxic Activity of Organotin(IV) Derivatives with Triazolopyrimidine Containing Exocyclic Oxygen Atoms. *Molecules* 25 (859), 1–16.
- Baehrecke E.H. (2002) How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 779-787
- Boekhout AH, Gietema JA, Milojkovic Kerklaan B, van Werkhoven ED, Altena R, Honkoop A. (2016). Angiotensin II-receptor inhibition with candesartan to prevent trastuzumab-related cardiotoxic effects in patients with early breast cancer: a randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2 (8): 1030-1037.
- Campbell, N., y Reece, J. (2005). *Biología* (7ªed.). España: Médica Panamericana. pp. 221-222

- Carraher, C. E., y Roner, M. R. (2014). Organotin polymers as anticancer and antiviral agents. *Journal of Organometallic Chemistry*, 751(8), 67-82
- Cascales, A. M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 69(1), 36-64.
- Ceballos, T.J. (2014). Estudio de las propiedades biológicas y catalíticas de nuevos complejos organometálicos (Doctoral dissertation). Universidad Rey Juan Carlos, España
- Crowe, A. J., Smith, P. J., y Atassi, G. (1980). Investigations into the antitumour activity of organotin compounds. I. Diorganotin dihalide and di-pseudohalide complexes. *Chemico-Biological Interactions*, 32(1), 171-178.
- Curtis, H., Barnes, N. S., Schnek, A., y Flores, G. (2006). *Invitación a la Biología* (6ª ed.). España: Médica Panamericana. pp. 95-96.
- Davies GC, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D. (2011). Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 378(9793): 771-784.
- Degterev A. y Yuan J. (2008) Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9, 378-390.
- Duffy SW, Vulkan D, Cuckle H, Parmar D, Sheikh S, Smith R. (2020). Effect of mammographic screening from age 40 years on breast cancer mortality (UK Age trial): results of a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*. 21 (9): 1165-1172.
- Duronio RJ and Xiong Y. Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013; 5(3):a008904.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- Fink, S. L., y Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73(4), 1907-1916.

- Florea, A.-M., and Busselberg, D. (2011). Cisplatin as an Anti-tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers* 3, 1351–1371.
- Fragoso, R., Baltasar, H., y Esparza, J. (2004). El ciclo celular: Características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotechnología aplicada*.
- Galván-Hidalgo, J., T. Ramírez-Apan, A. Nieto-Camacho, Hernández-Ortega, S., Gómez, E. (2017). Schiff base Sn(IV) complexes as cytotoxic agents: Synthesis, structure, isosteric and bioisosteric replacement, *Journal of Organometallic Chemistry*, 848, 332-343.
- Gasser, G., Ott, I., y Metzler-Nolte, N. (2010). Organometallic anticancer compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(1), 3-25
- Ge, R., Maa, W. H., Li, Y. L., y Li, Q. S. (2013). Apoptosis Induced Neurotoxicity of Di-n-butyl-di-(4 Chlorobenzohydroxamato). *Toxicol. Vitro* 27, 92–102.
- Girasolo, M. A., Tesoriere, L., Casella, G., Attanzio, A., Capobianco, M. L., Sabatino, P., et al. (2017). A Novel Compound of Triphenyltin(IV) with N-Tert-Butoxycarbonyl-Lornithine Causes Cancer Cell Death by Inducing a P53-dependent Activation of the Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Inorg. Chim. Acta* 456, 1–8.
- Gómez-Ruiz, S. (2010). Evolución y desarrollo de complejos metálicos con aplicación potencial como agentes antitumorales. *Investigación Química*, 106(1), 13-21.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanson B. Necroptosis: a new way of dying? *Cancer Biol Ther.* 2016; 17 (9): 899-910. doi: 10.1080/15384047.2016.1210732.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. (2020). Cancer Today. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/home>

- Kamaludin, N. F., Ismail, N., Awang, N., Mohamad, R., and Pim, N. U. (2019). Cytotoxicity Evaluation and the Mode of Cell Death of K562 Cells Induced by Organotin (IV) (2-methoxyethyl) Methylthiocarbamate Compounds. *J. Appl. Pharm. Sci.* 9 (6), 10–15. doi:10.7324/JAPS.2019.90602
- Karp, G. (2004). *Biología Celular y molecular: conceptos y experimentos*. Mc Graw Hill
- Lagunas, M. D. C., Mendiola, A. V., & Soto C.I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, Vol. 17.
- Lam SW, Jimenez CR, Boven E. (2014). Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. *Cancer Treat Rev.* 40(1): 129-138.
- Laskar S, Sánchez-Sánchez L., López-Ortiz M, López-Muñoz, H., Escobar-Sánchez M,L, Sánchez AT, Regla, I. Multicomponent synthesis of some new (1s,4s)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane dithiocarbamates and their in vitro antiproliferative activity against CaSki, MDA-MB-231 and SK-Lu-1 tumour cells as apoptosis inducing agents without necrosis. *J Enz Inhib Med Chem.* 2017; 32(1): 1129–1135.
- Lee O, Ivancic D, Allu S, Shidfar A, Kenney K, Helenowski I. (2015). Local transdermal therapy to the breast for breast cancer prevention and DCIS therapy: preclinical and clinical evaluation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 76 (6): 1235-1246.
- López, R. (2003). La Regulación Del Ciclo Celular y el Cáncer. *Vertientes*, 6, pp 40-44.
- Martel, P. (2014). Efecto citotóxico de compuestos pentacoordinados de estaño en líneas celulares de cáncer.
- Mitrus, E. Bryndza, A. Sochanik, S. Szala. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumour Biol*, 33, pp. 911-917

- Montes, S., Rodríguez, A. y Borunda, J. (2013). *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Ed. McGrawHill Education. México.
- Nicotera, P., y Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis–necrosis switch. *Oncogene*, 23(16), 2757-2765.
- Palmero, J., Lassard, J., Juárez, L. y Medina, C. (2021). Cáncer de mama: una visión general. *Acta médica grupo ángeles*. 19 (3): 354-360.
- Pedrera, M., Gómez, J., Molina, V., Risalde, M., Romero, F., Rodríguez, B., Ruiz, E., y Córdón,. (2010). Mecanismos Inductores y Vías de la Apoptosis en la Diarrea Vírica Bovina. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 23(1), 69-82
- Perou, C., Sorlie T., Eisen M., Van De Rijn, M., Jeffrey, S., Rees, C. (2000). Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 406: 747-752.
- Sánchez, C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*. Vol. 24, N. 3. p.p. 553-562.
- Sánchez-Torres, L., y Diosdado, V. (2003). Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Técnica Pecuaria en México*,41(1), 49-62
- Serrano, J. (2001). La apoptosis (muerte celular programada): Inducción a la apoptosis por fitopreparados y nutraceuticos. *Natura Medicatrix*, 19(5), 234-240
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2021). Cáncer de mama. Disponible en: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?showall=1>
- Sosa, R., Brandan, N. y Jeréz, J. (2012). Catedra de Bioquímica-Apoptosis. UNNE. Recuperado de: <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/apoptosis.pdf>

- Tabassum, S. y Pettinari, C. (2006). Chemical and biotechnological developments in organotin cancer chemotherapy. *Journal of Organometallic Chemistry*, 691(8), 1761-1766.
- Varela-Ramírez, A., Costanzo, M., Carrasco, Y. P., Pannell, K. H., & Aguilera, R. J. (2011). Cytotoxic effects of two organotin compounds and their mode of inflicting cell death on four mammalian cancer cells. *Cell Biology and Toxicology*, 27(3), 159-168
- Vázquez, T. (2013). Estudio de la apoptosis inducida por la inhibición de la vía de la PI3K/AKT (Doctoral dissertation). Universidad de Barcelona, España.
- Yan G, Elbadawi M, Efferth T. (2020) Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Acad Sci J*. 2020: 39-48. doi: 10.3892/wasj.2020.40.
- Yunlan, L., Juan, Z., and Qingshan, L. (2014). Antitumor Activity of di-n-butyl-(2,6-difluorobenzohydroxamato) Tin(IV) against Human Gastric Carcinoma SGC-7901 Cells via G2/M Cell Cycle Arrest and Cell Apoptosis. *Plos One* 9 (3), 1–13.
- Weitzel, N., Blazer, K., Macdonald, R., Culver, J. y Offit, K. (2011). Genetics, genomics, and cancer risk assessment: State of the Art and Future Directions in the Era of Personalized Medicine. *CA Cancer J Clin*.

Apéndice

•Medio de cultivo RPMI-1640

RPMI-1640 (Laboratorio Microlab)	10.42 g
NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 ml con agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado con vacío a través de una membrana con poro de 0.47 µm. El medio de cultivo se complementa con 5 % de suero de neonato. Se almacena a 4 °C.

•Desactivación del suero

El suero de ternera neonata se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca en baño maría a 56 °C durante 30 minutos.

•Verseno

Etilen-diamen-tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.40 g
Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	8.00 g
Cloruro de potasio (KCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.40 g
Tris (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Una vez disueltos completamente se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1 N y se afora a 1000 ml con agua bidestilada. El verseno se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm² y temperatura de 120 °C durante 20 minutos. Se almacena a 4 °C.

•Tripsina

Es preparada al 0.05 % en verseno en condiciones estériles.

•Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Fosfato diácido de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.20 g
Fosfato monoácido de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2.16 g
Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	8.0 g
Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.20 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se filtra por medio de membranas con diámetro de 22 µm. La solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm² y temperatura de 120 °C durante 20 minutos. Se almacena a 4 °C.

- Glutaraldehído

Se utilizan 1.57 ml de Glutaraldehído (70 % v/v) se agregan 98.43 ml de agua bidestilada.

- Solución de Cristal Violeta

Hidróxido de sodio (NaOH) (Sigma-Aldrich, E.U.A) 3.96 g

Ácido fórmico (Sigma-Aldrich, E.U.A) 4.28 g

Cristal Violeta (Sigma-Aldrich, E.U.A) 1.0 g

Se preparan 500 ml de Cristal Violeta en una concentración de 0.1 %. Previamente se prepara una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 Mm con un pH de 6. Posteriormente se adiciona el Cristal Violeta, se diluye y se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

- Solución de ácido acético

A 90 ml de agua bidestilada se le agregan 10 ml de ácido acético (J.T.Baker).

- Paraformaldehído

Paraformaldehído al 2 % en PBS, se disuelve a baño maría sin que la temperatura rebase los 60 °C.