



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

“Evaluación de la actividad antitumoral de compuestos heterocíclicos en cáncer cérvico-uterino, a nivel molecular y en un modelo murino”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
M. EN C. FRÍAS GONZÁLEZ SUSANA ENRIQUETA

DIRECTORES:
Dra. Cynthia Ordaz Pichardo
Dr. Alberto Mendoza Herrera



MÉXICO D.F. SEPTIEMBRE 2013



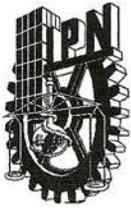
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 29 del mes de Agosto del año 2013 la que suscribe, Frías González Susana Enriqueta, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro B091289, adscrita a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Cynthia Ordaz Pichardo y el Dr. Alberto Mendoza Herrera y cede los derechos del trabajo titulado “Evaluación de la actividad antitumoral de compuestos heterocíclicos en cáncer cérvico-uterino, a nivel molecular y en un modelo murino” al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones dra_cynthia@hotmail.com, amendoza10@gmail.com y/o mssfrias@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M. en C. Susana E. Frías González
Nombre y firma del alumno(a)



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 12:00 horas del día 29 del mes de Agosto del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMH para examinar la tesis titulada:

"Evaluación de la actividad antitumoral de compuestos heterocíclicos en cáncer cérvico-uterino, a nivel molecular y en un modelo murino"

Presentada por el alumno:

Frías González Susana Enriqueta
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	2	8	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

Dr. Alberto Mendoza Herrera

Dra. Nury Pérez Hernández

Dr. Juan Salas Benito

Dr. Enrique Angeles-Anguiano



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA

Dr. César Augusto Sandino Reyes PÁTTIA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 28 de Abril del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENMyH en su sesión ordinaria No. 2 celebrada el día 27 del mes de Abril conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Frias	González	Susana Enriqueta
<small>Apellido paterno</small>	<small>Apellido materno</small>	<small>Nombre (s)</small>

Con registro:

B	0	9	1	2	8	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Evaluación de la actividad antitumoral de compuestos heterocíclicos en cáncer cérvico-uterino, a nivel molecular y en un modelo murino.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Evaluación de los efectos citotóxicos y genotóxicos de nuevos compuestos heterocíclicos en cultivos de células tumorales de cáncer cervical, su potencial para producir muerte celular por apoptosis y su efecto in vivo sobre tumores inducidos en ratones.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dra. Cynthia Ordaz Pichardo y Dr. Alberto Mendoza Herrera

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: **Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales** que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

Dr. Alberto Mendoza Herrera

Aspirante

M. en C. Susana E. Frías
González



Presidente del Colegio

Dr. Cesar Augusto Santibáñez Reyes
SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y HOMEÓPATA
ACREDITADO POR EL COMAEM 2009/2014"
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN



"2011, Año del Turismo en México"
"50 Aniversario de la Escuela Superior de Física y Matemáticas"

CONSTANCIA

El que suscribe hace constar que el Proyecto de Investigación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología:

**"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE UNA SERIE DE
COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER,
A NIVEL MOLECULAR Y EN UN MODELO MURINO"**

Propuesto ante el Comité de Bioética, por la:

D. en C. CYNTHIA ORDAZ PICHARDO

Ha sido aprobado por unanimidad, por considerarlo seguro en el sentido de que las instalaciones de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación cuenta con las condiciones de Bioseguridad para el desarrollo del mismo, además no implica ningún daño a los participantes, terceras personas, ni al medio ambiente en general. De igual manera aclara el manejo y buenas condiciones en que se mantendrán a sus animales de experimentación.

Se emite este Acuerdo dentro del marco de la Reunión del Comité de Bioética celebrada el día Viernes 18 de Febrero de 2011.

Se extiende la presente, para los fines legales que al interesado(a) convengan, en la Ciudad de México, Distrito Federal a los Veintiún días del mes de Febrero del año Dos Mil Once.

ATENTAMENTE
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

DR. GABRIEL CARLÍN VARGAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE BIOÉTICA
DE LA E.N.M. Y H.



SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE
MEDICINA Y HOMEOPATIA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN

Guillermo Massieu Helguera #239 Fracc. "La Escalera", Ticoman D.F. C.P. 07320 México, D.F.
Tels. 57 29 60 00 Exts
E-mail: enmh@ipn.mx

ESTE PROYECTO FUE REALIZADO EN LA ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (IPN) GRACIAS AL APOYO FINANCIERO DE LOS PROYECTOS SIP 20101395, 20110808 Y 20121122.

LA ALUMNA FUE BECARIA DE CONACYT Y DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE FORMACIÓN DE INVESTIGADORES (PIFI) DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Centro de Biotecnología Genómica y Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en donde se llevó a cabo la mayor parte de este proyecto.

A mis directores de tesis Dra. Cynthia Ordaz Pichardo (ENMH) y Dr. Alberto Mendoza Herrera (CBG).

A mi comité revisor: Dra. Nury Pérez Hernández
 Dr. Juan Salas Benito
 Dr. Enrique Angeles Anguiano

Al Dr. Andrés Romero Rojas (FESC-UNAM) y Dr. Alejandro García Carrancá (INCan y UNAM) por su colaboración y facilitación de instalaciones en la realización de algunos experimentos.

A mis compañeros del LBCPN y de otros laboratorios de la ENMH.

A mis amigos de la UNAM (FM, FQ, IQ) e INCMNSZ que siempre me apoyaron y asesoraron durante la realización de este trabajo.

A mi familia.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
RELACIÓN DE FIGURAS	iii
RELACIÓN DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS IMPORTANTES	vii
1.0 INTRODUCCIÓN	1
2.0 MARCO TEÓRICO	2
2.1 CÁNCER	2
2.1.1 Oncogenes	4
2.1.2 Genes supresores de tumor	4
2.2 LAS MUTACIONES PUEDEN ORIGINAR CÁNCER	5
2.2.1 Mutaciones espontáneas	5
2.2.2 Mutaciones inducidas	5
2.2.3 Mutaciones puntuales	7
2.2.4 Mutaciones cromosómicas	7
2.2.5 Mutaciones genómicas	7
2.3 LOS MARCADORES DEL CÁNCER	8
2.3.1 Señalización de proliferación continua	8
2.3.2 Evasión de supresores de crecimiento	9
2.3.3 Resistencia a muerte	9
2.3.4 Inmortalidad replicativa	10
2.3.5 Inducción de angiogénesis	10
2.4 METÁSTASIS	11
2.5 EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE	12
2.6 INFLAMACIÓN, UN EVENTO ASOCIADO A CÁNCER Y METÁSTASIS	14
2.7 MOLÉCULAS PARTICIPANTES EN LA RELACIÓN INFLAMACIÓN-CÁNCER-METÁSTASIS	14
2.7.1 Moléculas de adhesión celular	15
2.7.2 Integrinas	15
2.7.3 Citocinas	16
2.8 PARTICIPACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÁNCER	17
2.8.1 EROs y ADN	18
2.8.2 EROs y membrana mitocondrial	19
2.8.3 EROs y peroxidación lipídica	19
2.9 TIPOS DE MUERTE CELULAR	19
2.9.1 Necrosis	20
2.9.2 Apoptosis	20
2.9.2.1 Vías Apoptóticas	21

2.9.2.1.1	Vía Extrínseca de la apoptosis	21
2.9.2.1.2	Vía Intrínseca de la apoptosis	23
2.10	PARTICIPACIÓN DE LAS CASPASAS EN LA APOPTOSIS	26
2.11	OTROS TIPOS DE MUERTE CELULAR	28
2.11.1	Muerte celular autofágica	29
2.11.2	Catástrofe mitótica	29
2.11.3	Anoikis	29
2.11.4	Entosis	30
2.11.5	Parthanatos	30
2.11.6	Pyroptosis	30
2.11.7	Netosis	31
2.11.8	Cornificación	31
2.12	ANATOMÍA CELULAR DEL CÉRVIX	32
2.13	CÁNCER CÉRVICO-UTERINO	33
2.13.1	Neoplasia cervical intraepitelial (NCI)	33
2.13.2	Clasificación de las NCIs	34
2.13.3	Estadificación del Cáncer cervical	36
2.13.3.1	Definiciones de la Clasificación FIGO	38
2.13.3.1.1	Estadio I	38
2.13.3.1.2	Estadio II	38
2.13.3.1.3	Estadio III	38
2.13.3.1.4	Estadio IV	39
2.13.4	Manifestaciones clínicas	39
2.13.5	Detección y diagnóstico	40
2.13.6	Etiología	41
2.13.7	Epidemiología	44
2.13.8	Terapéutica	46
2.13.8.1	Cirugía	47
2.13.8.2	Radioterapia	48
2.13.8.3	Quimioterapia	49
2.14	PROPIEDADES DE LOS PRINCIPALES TIPOS DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS	51
2.15	VACUNA CONTRA EL VPH	52
2.16	DISEÑO DE FÁRMACOS <i>in silico</i>	53
3.0	ANTECEDENTES	55
3.1	COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS	55
3.1.1	Heterocíclicos	55
3.1.2	Estudios de compuestos del tipo piperidínicos	57
3.1.3	Estudios de compuestos del tipo morfolínico	58
3.1.4	Compuestos de la serie LQM300	59

3.2 COMPLEJOS METÁLICOS	60
3.2.1 Complejos metálicos antineoplásicos	61
3.2.2 Estudios de compuestos de cobre como antitumorales	61
3.2.3 El complejo de cobre(II) LQM402	64
4.0 JUSTIFICACION	66
5.0 HIPÓTESIS	67
6.0 OBJETIVOS	67
6.1 OBJETIVO GENERAL	67
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	67
7.0 MATERIALES Y MÉTODOS	68
7.1 CULTIVO CELULAR Y LÍNEAS CELULARES	68
7.2 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD CON MTT	69
7.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (REDUCCIÓN DE DPPH)	70
7.4 ENSAYO DE LIPOPEROXIDACIÓN, SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	70
7.4.1 Homogeneizado de cerebro de rata	70
7.4.2 Peroxidación lipídica inducida con algunos heterocíclicos de la serie LQM 300	71
7.4.3 Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	71
7.5 ENSAYO DE MUTAGENICIDAD <i>In vitro</i> : PRUEBA DE AMES	72
7.6 ENSAYO DE MUTAGENICIDAD <i>In vivo</i> : MICRONÚCLEOS	72
7.7 DETERMINACIÓN DE ANEXINA V EMPLEANDO CITOMETRÍA DE FLUJO	73
7.8 DETECCIÓN DE CASPASAS POR INMUNOANÁLISIS (WESTERN BLOT)	74
7.9 MODELO <i>In vivo</i> , INDUCCIÓN DE TUMORES	75
7.10 EVALUACIÓN DEL COMPLEJO DE COBRE LQM402 EN EL MODELO <i>In vivo</i>	76
7.11 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES ASOCIADOS A TUMOR PRODUCIDA POR EL COMPUESTO LQM402 EN TUMORES INDUCIDOS EN RATONES	77
7.11.1 Extracción de ARNm con el método basado en formol-cloroformo	78
7.11.2 Síntesis de cADN (RT-PCR)	78
7.11.3 Diseño de oligonucleótidos de genes de interés	79
7.11.4 Amplificación del cADN mediante PCR convencional (Punto final)	80
7.11.5 Amplificación del cADN mediante PCR en tiempo real (Cuantitativa)	81
7.12 PREPARACIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS DE ÓRGANOS DE RATÓN	81
7.12.1 Tinción de cortes histológicos con Hematoxilina-Eosina (H&E)	82
7.12.2 Técnica de TUNEL <i>In situ</i> para tejidos fijados	83
8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84
8.1 ENSAYOS REALIZADOS A COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS DE LA SERIE LQM300	84
8.1.1 Efecto de los compuestos LQM300 en la viabilidad de células de cáncer cervico-uterino	84
8.1.2 Efecto antioxidante de los compuestos LQM300	96

8.1.3 Evaluación de la genotoxicidad de los compuestos LQM300	109
8.2 ENSAYOS <i>In vitro</i> REALIZADOS CON COMPLEJO DE COBRE(II) LQM402	119
8.2.1 Efecto del complejo de cobre LQM402 en la viabilidad de células de cáncer cérvico-uterino	119
8.2.2 Alteración en la membrana de células HeLa inducida con el complejo LQM402	124
8.2.3 Expresión de proteínas asociadas a apoptosis en células HeLa tratadas con el complejo LQM402	128
8.2.4 Actividad del complejo LQM402 sobre el radical libre DPPH	131
8.2.5 Actividad del complejo LQM402 sobre la inhibición y producción de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico	132
8.2.6 Actividad genotóxica del complejo LQM402 con la prueba de Ames	136
8.2.7 Actividad genotóxica del complejo LQM402 en sangre periférica de ratones CD1 (Ensayo de Micronúcleos)	138
8.3 ENSAYOS <i>In vivo</i> REALIZADOS CON EL COMPLEJO DE COBRE(II) LQM402	141
8.3.1 Establecimiento de tumores de cáncer cervical en ratones Nu/Nu	141
8.3.2 Evaluación del complejo LQM402 sobre el desarrollo de tumores	141
8.3.3 Evaluación del complejo LQM402 sobre el peso de ratones con tumor inducido	146
8.3.4 Evaluación del complejo LQM402 sobre la expresión de genes asociados a tumor en tejido tumoral de cáncer cérvico-uterino inducido en ratones Nu/Nu	148
8.3.5 Evaluación de muerte celular con la técnica de TUNEL <i>in situ</i> promovida por el complejo LQM 402 en tejido tumoral de CaCu inducido en ratones Nu/Nu	160
8.3.6 Evaluación del efecto histopatológico del complejo LQM402 en ratones Nu/Nu con tumor inducido	163
9.0 CONCLUSIONES	177
9.1 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DE ALGUNOS COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS LQM300	177
9.2 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DEL COMPLEJO DE COBRE LQM402 <i>in vitro</i>	178
9.3 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DEL COMPLEJO DE COBRE LQM402 <i>in vivo</i>	180
10.0 PERSPECTIVAS	181
11.0 BIBLIOGRAFÍA	184

RESUMEN

Debido a que el cáncer cérvico-uterino ocupa el segundo lugar en mortalidad femenina por cáncer en México y a que los tratamientos actuales causan diversos efectos secundarios que reducen la calidad de vida de los pacientes, es necesario continuar la búsqueda de compuestos que sean capaces de eliminar células tumorales y tengan un mínimo efecto sobre células sanas. Por ello, en el presente trabajo se evaluó el potencial antitumoral *in vitro* de algunos compuestos heterocíclicos de nueva síntesis y considerando que uno de los fármacos más eficaces para el tratamiento de diversos tipos de cáncer es el *cis*-Platino, se evaluó también la capacidad antitumoral *in vitro* e *in vivo* de un complejo coordinado de cobre. Además, se realizaron pruebas de actividad antioxidante y genotóxica a todos los compuestos considerados para este proyecto y encontramos capacidades de actividad biológica diversa y selectiva entre ellos. Así, también en esta investigación se encontró que algunos compuestos heterocíclicos de la serie LQM300 tienen actividad citotóxica contra células tumorales de cáncer cérvico-uterino, son antioxidantes y no son genotóxicos, mientras que el complejo de cobre LQM402, además de su actividad citotóxica, induce características biológicas de muerte celular apoptótica, inhibe el desarrollo de tumores inducidos en ratones atímicos Nu/Nu, promueve la expresión diferencial de genes asociados a tumor, tiene capacidad dual como anti y pro-oxidante dependiente de la concentración y tampoco es mutagénico. Por lo tanto, los compuestos evaluados en este trabajo tienen potencial farmacológico.

ABSTRACT

Cervical cancer is the second cause of mortality in women in Mexico. Current anti-tumor treatments cause several side effects that reduce the quality of life for patients. Then, it is necessary to continue searching for compounds capable of removing tumor cells and have minimal effect on non-tumoral cells. In the present study, we evaluated the *in vitro* anti-tumor potential of some newly synthesized heterocyclic compounds. Moreover, taking into consideration that one of the most effective drugs for treatment of various cancers is the *cis*-Platinum, we also evaluated the *in vitro* and *in vivo* antitumor capacity of a new copper(II) complex. Additional tests were conducted in order to evaluate the antioxidant and genotoxic activities of the compounds included in this project. This research shows that some heterocyclic compounds from the LQM300 series have cytotoxic activity against tumor cells of cervical cancer, antioxidant activity on lipids, and have not genotoxic activity. By the other hand, the copper complex LQM402 showed cytotoxic activity, induced biological characteristics of apoptotic cell death on HeLa cells, inhibited the growth of cervical tumors induced in Nu/Nu mice, promoted differential expression of tumor associated genes, exhibited dual capacity as anti and pro-oxidant in a concentration-dependent way, and was non-mutagenic on Ames and Micronucleus tests. Therefore, the compounds tested in this thesis are pharmaceutically potential.

RELACIÓN DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Esquema de la progresión neoplásica	4
Figura 2.	Tipos de mutaciones	7
Figura 3.	Proceso metastásico	12
Figura 4.	Muerte celular programada	21
Figura 5.	Pasos y proteínas que participan en la vía extrínseca de la apoptosis	23
Figura 6.	Pasos y proteínas que participan en la vía intrínseca de la apoptosis	26
Figura 7.	Aspecto transversal del aparato reproductor femenino	33
Figura 8.	Etapas de la neoplasia cervical intraepitelial	35
Figura 9.	Epidemiología del CaCu a nivel mundial	45
Figura 10.	Epidemiología del CaCu en México	46
Figura 11.	Estructura de los heterociclos piperidina y morfolina	55
Figura 12.	Estructuras de los cuatro compuestos heterocíclicos de la serie LQM300 seleccionados para el estudio de su actividad citotóxica, antioxidante y mutagénica	60
Figura 13.	Estructura del complejo de cobre(II) LQM402	65
Figura 14.	Efecto de 4 compuestos heterocíclicos en la viabilidad de células HeLa a 24 h de exposición y evaluado con la técnica de MTT	85
Figura 15.	Efecto de 4 compuestos heterocíclicos en la viabilidad de células SiHa a 24 h de exposición y evaluado con la técnica de MTT	86
Figura 16.	Efecto de 4 compuestos heterocíclicos en la viabilidad de células Ca Ski a 24 h de exposición y evaluado con la técnica de MTT	87
Figura 17.	Efecto de 4 compuestos heterocíclicos en la viabilidad de células C-33 A a 24 h de exposición y evaluado con la técnica de MTT	88
Figura 18.	Efecto de 4 compuestos heterocíclicos en la viabilidad de Fibroblastos no tumorales a 24 h de exposición y evaluado con la técnica de MTT	89
Figura 19.	Estructuras de complejos de platino evaluados por Kasparkova et al. 2003a	90
Figura 20.	<i>trans</i> -Platino y algunos derivados	91
Figura 21.	Estructura del <i>cis</i> -platino	91
Figura 22.	Estructuras de las cloroalquilaminoantraquinonas más citotóxicas evaluadas por Pors et al. 2006	92
Figura 23.	Estructura del 3-(5-Nitro-2-tienil)-9-cloro-5-morfolin-4-il[1,2,4]triazolo[4,3-c]quinazolina (NTCHMTQ)	94
Figura 24.	Estructura del compuesto 2-[bencil(fenil)-amino]etil 1,4-dihidro-2,6-dimetil-5-(5,5-dimetil-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il)-1-(2-morfolinoetil)-4-(3-nitrofenil)-3-piridincarboxilato (PAK-200)	94
Figura 25.	Estructura de algunos compuestos derivados del inhibidor de PI3K (ZSTK474)	95
Figura 26.	Estructura del inhibidor de PI3K (NVP-BKM120)	96
Figura 27.	Capacidad antioxidante de cuatro heterocíclicos de la serie LQM300 evaluada como porcentaje de inhibición de DPPH	98
Figura 28.	Estructura de la Quercetina	99
Figura 29.	Estructura del α -Tocoferol	100
Figura 30.	Estructuras de las piperidinas (+)-3-O-feruloicasina, (-)-espectalina y (-)-3-O-acetilespectalina	101
Figura 31.	Estructura de los compuestos 3,8-dihidroquinolina, 2,4-di- <i>tert</i> -butilfenol y	

	2,8-dihidroxi-3,4-dimetoxiquinolina obtenidos de extracto metanólico de <i>S. subspinipes</i>	102
Figura 32.	Derivados del 1-[1-oxo-3(3,4-metilenedioxi-5-metoxifenil)-2Z-propenil] piperidina	103
Figura 33.	Estructuras de algunas tiomorfolinas sintéticas con actividad antioxidante	104
Figura 34.	Estructuras de algunos derivados de morfolinas	105
Figura 35.	Efecto de los heterocíclicos de la serie LQM300 en la inhibición de peroxidación lipídica inducida con FeSO ₄ 10 µM en homogenado de cerebro de rata	107
Figura 36.	Estructuras de los nitróxidos de piperidina Tempamina, Tempace, Tempo y Tempol	108
Figura 37.	Secuencia de síntesis de los compuestos morfolínicos evaluados por Matulenko et al. 2005	113
Figura 38.	Estructura del donador de óxido nítrico 3-morfolinosidnonimina (SIN-1)	114
Figura 39.	Efecto del compuesto LQM335 a diferentes concentraciones en la formación de micronúcleos en sangre periférica de ratones CD-1	115
Figura 40.	Frotis de sangre periférica de ratón CD-1 teñido con el colorante Giemsa	116
Figura 41.	Estructura del fármaco de referencia Ifosfamida	117
Figura 42.	Efecto citotóxico del complejo LQM402 en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino	119
Figura 43.	Tipos de unión del <i>cis</i> -Platino en las bases nitrogenadas del ADN	121
Figura 44.	Microscopía electrónica de nanopartículas y estructura del compuesto dinuclear Cu ₂ (OAc) ₄ (H ₂ O) ₂	122
Figura 45.	Estructura de la Casiopeína III-I	123
Figura 46.	Estructura del complejo de cobre [Cu(Cl)(PPh ₃) ₃]	123
Figura 47.	Estructuras de los complejos de cobre [Cu(MCLH)phen(H ₂ O)] · ClO ₄ y [Cu(phe)(L-Val) BPEI]Cl · H ₂ O	124
Figura 48.	Efecto del complejo LQM402 sobre la translocación de fosfatidilserina en células HeLa	126
Figura 49.	Estructura de la Casiopeína II	127
Figura 50.	Estructura del complejo de Cu(II) [Cu ¹¹ (5-C1-pap)(OAc)(H ₂ O) · 2H ₂ O y formula general de bis(tiosemicarbazones) derivados de glioxal-bis(4-metil-4-fenyl-3-tiosemicarbazona)	127
Figura 51.	Efecto del complejo LQM402 en la expresión de proteínas asociadas a apoptosis en células HeLa expuestas a diferentes tiempos de tratamiento	129
Figura 52.	Efecto del complejo LQM402 en la expresión de caspasa-3 en células HeLa expuestas a diferentes tiempos de tratamiento	130
Figura 53.	Estructuras de los complejos de cobre estudiados por Filomeni et al. 2007	131
Figura 54.	Efecto del LQM402 sobre la peroxidación lipídica inducida con FeSO ₄ en homogeneizado de cerebro de rata	132
Figura 55.	Concentración de TBARS inducida con diferentes concentraciones del complejo LQM402 en homogenado de cerebro de rata	134
Figura 56.	Actividad genotóxica del complejo LQM402 en la prueba de Ames	137
Figura 57.	Efecto genotóxico del complejo LQM402 en sangre periférica de ratones CD1	138
Figura 58.	Índice de EPC respecto a ENC en ratones CD1 tratados sólo con LQM402 a diferentes concentraciones o simultáneamente con Mitomicina C	139
Figura 59.	Estandarización del modelo xenográfico de CaCu	141
Figura 60.	Desarrollo de tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu	142
Figura 61.	Efecto del complejo LQM402 sobre el desarrollo de tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu	143

Figura 62.	Tamaño y aspecto de tumores inducidos en ratones atímicos	144
Figura 63.	Seguimiento del peso de ratones Nu/Nu con tumor inducido y tratados con LQM402 o <i>cis</i> -Platino	147
Figura 64.	Apariencia de ratonas atímicas Nu/Nu al inicio y final del tratamiento con <i>cis</i> -Platino	148
Figura 65.	Expresión relativa del gen p53 en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con <i>cis</i> -Platino y con diferentes concentraciones del complejo LQM402	150
Figura 66.	Expresión relativa del gen Ki67 en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con <i>cis</i> -Platino y con diferentes concentraciones del complejo LQM402	151
Figura 67.	Expresión relativa del gen de IL-6 en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con <i>cis</i> -Platino y con diferentes concentraciones del complejo LQM402.	153
Figura 68.	Expresión relativa del gen de MMP-10 en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con <i>cis</i> -Platino y con diferentes concentraciones del complejo LQM402	154
Figura 69.	Expresión relativa del gen de Integrina $\alpha 8$ en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con <i>cis</i> -Platino y con diferentes concentraciones del complejo LQM402	155
Figura 70.	Expresión relativa del gen MMP-9 en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con <i>cis</i> -Platino y con diferentes concentraciones del complejo LQM402	156
Figura 71.	Expresión relativa del gen VEGF en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con <i>cis</i> -Platino y con diferentes concentraciones del complejo LQM402	157
Figura 72.	Expresión relativa del gen Plexina-B en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con <i>cis</i> -Platino y con diferentes concentraciones del complejo LQM402	159
Figura 73.	Apoptosis en tejido de tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu	161
Figura 74.	Diferencias macroscópicas entre algunos órganos de ratonas Nu/Nu con tumor inducido y tratadas o no con <i>cis</i> -Platino	164
Figura 75.	Análisis histopatológico del hígado de ratonas Nu/Nu con tumor inducido y tratadas con el complejo LQM402 y <i>cis</i> -Platino	166
Figura 76.	Análisis histopatológico del bazo de ratonas Nu/Nu con tumor inducido y tratadas con el complejo LQM402 y <i>cis</i> -Platino	170
Figura 77.	Depósitos de hemosiderina en bazo de ratonas Nu/Nu con tumor inducido	171
Figura 78.	Análisis histopatológico del riñón de ratonas Nu/Nu con tumor inducido y tratadas con el complejo LQM402 y <i>cis</i> -Platino	174
Figura 79.	Morfología alterada de glomérulos y túbulos renales después del tratamiento con <i>cis</i> -Platino y LQM402	175

RELACIÓN DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Estadificación del cáncer cervical	37
Tabla 2.	Genes analizados en este estudio	80
Tabla 3.	IC ₅₀ del efecto citotóxico de los compuestos LQM300 que se evaluaron	90
Tabla 4.	IC ₅₀ de los compuestos heterocíclicos y los fármacos de referencia Quercetina y α -Tocoferol para reducir el radical DPPH	99
Tabla 5.	Efecto mutagénico de los compuestos heterocíclicos LQM300 en tres cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	111
Tabla 6.	Índice de EPC/ENC en sangre periférica de ratones tratados con LQM335	117
Tabla 7.	IC ₅₀ del efecto citotóxico del complejo LQM402 en células de CaCu	120

ABREVIATURAS IMPORTANTES

AAPH	2,2'-azobis(2-metil-propionamida) dihidroclorido
AIF	Apoptosis Inducing Factor (sigla en inglés). Factor Inductor de Apoptosis
BHA	Butilhidroxianisol
CaCu	Cáncer cérvico-uterino
Ca Ski	Línea celular de CaCu que contiene gran número de secuencias del genoma del virus del papiloma humano tipo 16
C-33 A	Línea celular de CaCu que no contiene secuencias del genoma del virus del papiloma
Cit C	Citocromo C
ENC	Eritrocitos Normocromáticos
EPC	Eritrocitos Policromáticos
EPCMN	Eritrocitos Policromáticos con presencia de Micronúcleo
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain (sigla en inglés). Proteína con Dominio de Muerte asociada a Fas
Fas	Ligando Fas o FasL. Proteína transmembranal señalizadora de apoptosis
FS	Fosfatidil Serina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HeLa	Línea celular de CaCu que contiene secuencias del genoma del virus del papiloma humano tipo 18
IFF	Ifosfamida
IL	Interleucinas: citocinas de bajo peso molecular que participan en diversas funciones como proliferación y diferenciación celular e inflamación.
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Nitric Oxide Synthase (sigla en inglés). Óxido Nítrico Sintasa: Enzima responsable de la síntesis de óxido nítrico
Ki67	Marcador de proliferación celular, también conocido como MKI67
LQM	Clave de compuestos sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la FESC-UNAM
MMP-9	Metaloproteinasa de Matriz-9
MMP-10	Metaloproteinasa de Matriz-10
NCI	Neoplasia Cervical Intraepitelial
NCIUS	National Cancer Institute, United States (sigla en inglés). Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos
PBS	Phosphate Buffer Solution (sigla en inglés). Solución amortiguadora de fosfatos
p53	El gen y su proteína se consideran guardianes del genoma por su importante participación en prevenir mutaciones genómicas
SiHa	Línea celular de CaCu que contiene secuencias del genoma del virus del papiloma humano tipo 16
TBARS	Tiobarbituric Acid Reactive Species (sigla en inglés). Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling. Método para detectar fragmentación de ADN marcando extremos terminales fragmentados de éste ácido nucleico.
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (sigla en inglés). Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
VPH	Virus del Papiloma Humano

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) sigue siendo una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial. Gracias a los métodos de diagnóstico temprano, el número de casos de incidencia y mortalidad por esta enfermedad se ha reducido y por lo tanto ha pasado a ser la segunda causa de muertes por cáncer en mujeres, después del cáncer de mama. Sin embargo, México tiene aún un elevado número de incidencia y mortalidad.

A pesar de que el uso de la vacuna contra el Virus del Papiloma Humano (VPH, principal causante de infecciones que conducen a CaCu) se está introduciendo en los sistemas de salud pública, ésta es una medida preventiva que tendrá resultados efectivos a largo plazo, por lo que para los casos en que ya existen lesiones neoplásicas o tumores establecidos, la quimioterapia con *cis*-diaminodicloroplatino (*cis*-Platino) es uno de los tratamientos de elección para el CaCu y aunque su costo es reducido, los efectos secundarios adversos siguen siendo uno de los principales problemas de éste y otros fármacos antineoplásicos disponibles. Por ello, aún continúa la búsqueda de nuevos productos tanto de origen natural como sintético que tengan efectividad para destruir células tumorales y que ocasionen un daño mínimo en células sanas.

En este proyecto de investigación se evaluó por primera vez el efecto citotóxico de algunos compuestos nuevos de la serie LQM diseñados *in silico* en líneas celulares de CaCu, así como su potencial genotóxico y la capacidad de los mismos como antioxidantes como primera etapa *in vitro*. Todos los compuestos mostraron diferente citotoxicidad y selectividad en las células evaluadas y prácticamente no mostraron ser genotóxicos, pero mientras algunos compuestos de la serie LQM300 mostraron tener propiedades antioxidantes, el único compuesto evaluado de la serie LQM400 (el complejo de cobre(II) LQM402) mostró tener un efecto dual como antioxidante e inductor de peroxidación lipídica dependiendo de la concentración.

En la segunda etapa de la investigación, se eligió al complejo de cobre LQM402 para evaluar su capacidad de inducir algunas características de muerte celular apoptótica, encontrando que existe la posibilidad de que este complejo induzca otro tipo de muerte celular, además de apoptosis, ya que indujo la translocación de fosfatidilserina en la

membrana de células HeLa y ocasionó la salida de citocromo C mitocondrial en estas mismas células, pero no activó a la caspasa-3, principal proteína efectora en la que convergen las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

En una tercera etapa, *in vivo*, se evaluó la capacidad del complejo de cobre LQM402 para inhibir el crecimiento de tumores inducidos con células HeLa en ratones Nu/Nu hembras. Comparado con *cis*-Platino, LQM402 no logró inducir la reversión tumoral a 20 días de tratamiento, pero sí mostró inhibir el crecimiento tumoral a partir del día 16. Las muestras de tumores de los animales tratados con el complejo LQM402 mostraron una expresión diferencial de algunos genes involucrados en procesos tumorales indicando, de manera general, que LQM402 tiene potencial para inhibir el desarrollo tumoral al modificar negativamente la expresión de genes como Ki67, Integrina $\alpha 8$ y Plexina-B.

Finalmente, en el estudio histopatológico de muestras de hígado, bazo y riñón de ratones con tumor inducido que fueron tratados con el complejo LQM402 o *cis*-Platino, se demostró que LQM402 causó menos daño en las estructuras tisulares de los tres órganos mencionados, mientras que se confirmó el alto efecto nefrotóxico del *cis*-Platino, por lo que se concluye que el complejo de cobre LQM402 tiene potencial como fármaco antitumoral contra CaCu.

2.0 MARCO TEÓRICO

2.1 CÁNCER

El cáncer es un conjunto de condiciones en los que las células de un organismo proliferan descontroladamente, puede considerarse como un proceso de microevolución que se produce en una escala temporal de meses o años en una población de células del cuerpo, y que a su vez, depende de los mismos procesos de mutación y selección natural que gobiernan la evolución a largo plazo de todos los organismos vivos. El cáncer resulta de un largo periodo de latencia, durante el cual ocurren y se acumulan mutaciones que con el paso del tiempo generan alteraciones en los mecanismos que regulan la diferenciación y la proliferación de las células afectadas. El proceso neoplásico ocurre en múltiples etapas, es multifactorial y ocurre al azar (Alberts *et al.*, 2002). Una célula normal puede convertirse en cancerosa por su interacción con agentes físicos, químicos o biológicos que inician a la célula en la progresión tumoral y le confieren una probabilidad mayor de malignización. Al promoverse la división, la célula iniciada forma un foco neoplásico benigno, el cual puede progresar hasta un fenotipo maligno (Figura 1). Esta promoción no es controlada por las células tumorales y cualquier ventaja fenotípica es un proceso totalmente aleatorio (Frias González 2007).

Estudios realizados con virus que inducen tumores en animales permitieron la identificación de los oncogenes celulares y los genes supresores de tumores. A su vez, el estudio de alteraciones en estos genes mostró que el cáncer es en realidad una variedad de diferentes enfermedades con características fenotípicas y comportamientos similares; entre ellos encontramos la proliferación descontrolada, la resistencia a la apoptosis y la posibilidad de invadir tejidos vecinos para diseminarse a órganos distantes de su tejido de origen (Zentella *et al.* 2007).

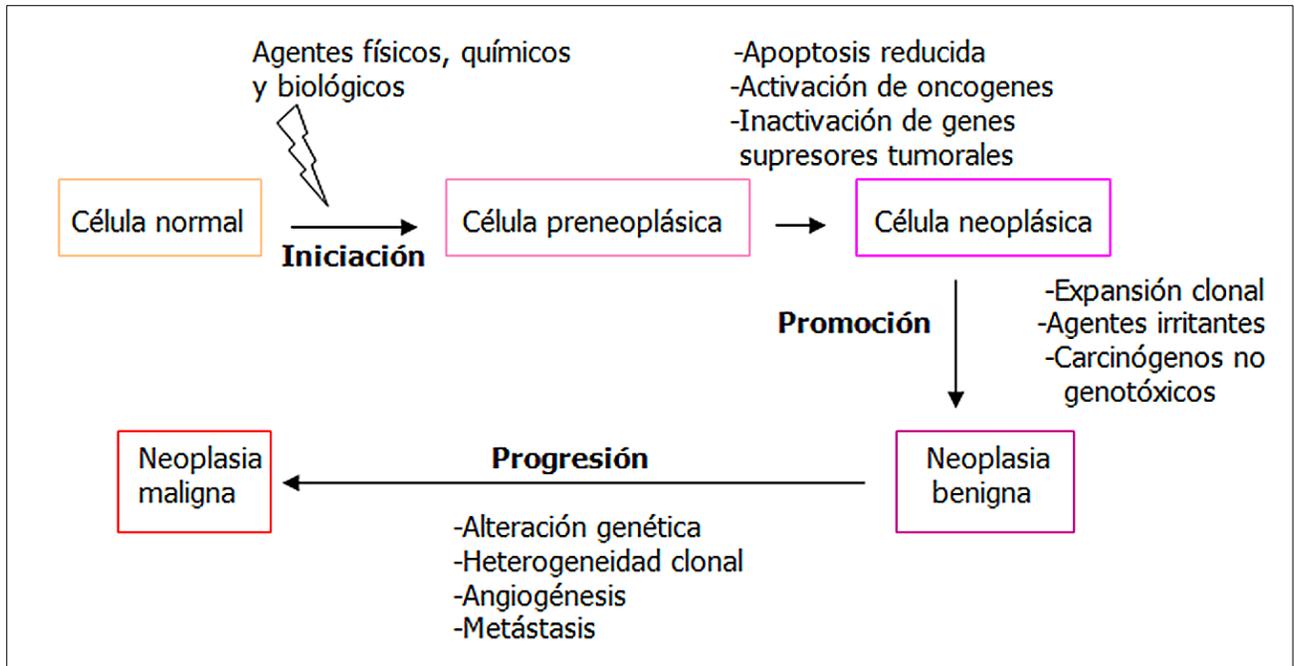


Figura 1. Esquema de la progresión neoplásica.

2.1.1 Oncogenes

Particularmente, los *oncogenes* son versiones alteradas de genes normales cuyas funciones son importantes para el control de la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación celular. Al ser genes que codifican para elementos que normalmente activan las vías de señalización mitogénica, sus mutaciones generan productos génicos permanentemente activos. Las versiones mutantes de los protooncogenes se denominan oncogenes, siendo *ras* y *myc*, los más frecuentes en la mayoría de los tumores humanos.

2.1.2 Genes supresores de tumor

Por su parte, los *genes supresores de tumor* promueven la formación de un tumor cuando existe una pérdida o inactivación de éstos o de sus productos proteicos (Hahn and Weinberg 2002). El representante más frecuente de este grupo de genes es p53, ya que las células que contienen mutaciones que inactivan la función de p53 no pueden detener la progresión del ciclo celular ni la replicación del ADN cuando está dañado. El resultado es que el material genético se replica con alteraciones cromosómicas, aumentando así, la tasa de acumulación de mutaciones (Zentella et al. 2007).

2.2 LAS MUTACIONES PUEDEN ORIGINAR CÁNCER

Un posible paso inicial para que una célula normal pueda generar cáncer es la alteración de un gen que participa en la regulación del ciclo celular. Esta alteración puede ocurrir por medio de mutaciones, que resultan en un aumento o disminución en la expresión de dicho gen (Yokota 2000). Una mutación se define como cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN. Existen dos formas generales en las que pueden ocurrir:

2.2.1 Mutaciones espontáneas

En general, la aparición de una mutación es un evento poco frecuente, sin embargo, pueden desarrollarse mutaciones sin la intervención de un agente mutágeno. Las mutaciones espontáneas ocurren debido principalmente a errores en la replicación del ADN durante la división celular; sea que una base nucleotídica adopte una forma tautomérica (isómeros estructurales) infrecuente o que exista un cambio en el marco de lectura. En este último caso, cuando existen secuencias cortas de nucleótido repetidos, hay una eliminación de segmentos de ADN que da lugar a la alteración del marco de lectura de codones. De manera general, la tasa de mutación espontánea en los organismos eucariotas es de $2-12 \times 10^{-6}$ mutaciones por gameto por gen. Dado que el genoma humano contiene 100,000 genes, podemos predecir que de 1 a 5 gametos humanos contienen una mutación en algún gen.

2.2.2 Mutaciones inducidas

Este tipo de mutaciones ocurre como resultado de la exposición a moléculas conocidas como mutágenos que dañan de forma directa al ADN, ya sea alterando su estructura química o interfiriendo en sus mecanismos de reparación. Los mutágenos no son específicos para un gen o grupo de genes pero en cambio introducen cambios al azar en el genoma (Krebs et al. 2009).

Se dice que el cáncer es multifactorial porque los factores o mutágenos que pueden causar daño al ADN y transformar una célula normal en cancerosa son muy diversos y pueden pertenecer a cualquiera de las siguientes tres categorías:

Mutágenos biológicos (virus, bacterias y parásitos). Estos agentes contienen elementos genéticos “transposables” que son secuencias de ADN capaces de autoreplicarse en forma independiente del ADN al que pertenecen y poseen una copia que puede moverse, brincar o translocarse a otro sitio en la misma molécula de ADN (por ejemplo un plásmido). Estas secuencias pueden ser:

- *Secuencias de inserción* (elementos IS) que sólo acarrean información genética para transposición.
- *Transposones* (Tn) que acarrean información genética adicional tal como genes que codifican para resistencia a antibióticos.

Mutágenos químicos (arsénico o asbesto, entre otros). Estos agentes cambian la estructura de las bases nitrogenadas y alteran sus propiedades de apareamiento con otras bases, pueden ocasionar cambios en la viabilidad celular y en ocasiones pueden ser corregidos. Entre los mutágenos químicos se encuentran los:

- *Agentes desaminantes* que remueven un grupo amino de una base.
- *Agentes alquilantes* que adicionan un grupo metil o etil a una base.

Mutágenos físicos

- *Radiación ionizante*. Rayos X y rayos gamma.
- *Radiación no ionizante*. Luz UV que causa la formación de dímeros de timidina (unión covalente de dos timidinas adyacentes sobre la misma hebra de ADN) (Krebs et al. 2009).

Se ha establecido también que los cambios celulares pueden ser **genéticos** si ocurrieron modificaciones en los genes (inserción, delección, translocación), células germinales, o **epigenéticos** si el cambio no se da en el ADN sino en la expresión de genes (metilación, por ejemplo) (Krebs et al. 2009). De esta manera podemos entonces clasificar a las mutaciones en tres tipos: Puntuales, genómicas y cromosómicas (Figura 2).

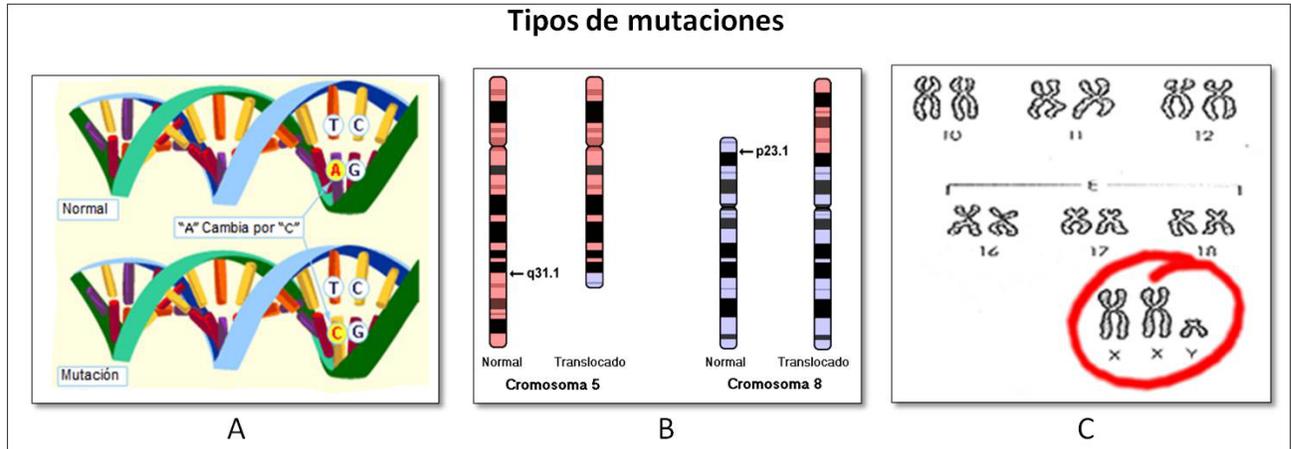


Figura 2. Tipos de mutaciones: Puntuales (A), Cromosómicas (B) y Genómicas (C).

2.2.3 Mutaciones Puntuales

Sustitución de bases. Cambio de un nucleótido por otro.

Delección. Se pierde un nucleótido y no se sustituye.

Inserción. Se introducen nucleótidos que no deberían estar.

Inversión. Dos segmentos de nucleótidos se invierten e intercambian.

2.2.4 Mutaciones Cromosómicas

Inversión. Inversión de un fragmento cromosómico.

Duplicación. Un fragmento cromosómico se duplica, lo cual generalmente se asocia a una delección en otro cromosoma.

Translocación. Es un cambio en la posición de un fragmento cromosómico. Puede ocurrir en un solo cromosoma, entre cromosomas homólogos o entre cromosomas distintos (Loeb and Loeb 2000).

2.2.5 Mutaciones Genómicas

Aneuploidía. Se afecta al número de ejemplares de un cromosoma sin afectar al juego completo (monosomías, trisomías, tetrasomías, etc).

Haploidía. Disminución en el número normal de juegos de cromosomas.

Poliploidía. Aumento en el número de juegos de cromosomas.

Durante la progresión tumoral la acumulación de mutaciones en diversos genes lleva a la pérdida de regulación en el metabolismo del ADN. Esta inestabilidad genética ha sido estudiada extensamente y se ha demostrado que es común que las células tumorales presenten un gran número de mutaciones a lo largo del genoma, las cuales se presentan en forma aleatoria (Loeb and Loeb 2000).

2.3 LOS MARCADORES DE CÁNCER

En el año 2011, Hanahan y Weinberg actualizaron su propuesta realizada por primera vez en el 2000 sobre los principales marcadores del cáncer que constituyen en conjunto un principio organizador y lógico para comprender la amplia diversidad de las enfermedades neoplásicas. En dicha discusión está implícita la noción de que una célula normal progresa hacia un estado neoplásico al adquirir ciertas características que la capacitan para volverse tumorigénica y en última instancia maligna, y aunque anteriormente un tumor se consideraba como una masa de células en proliferación, ahora se entiende como un tejido complejo formado de distintos tipos celulares interaccionando de forma heterotípica. Además, existen células no tumorales que son reclutadas por el tumor para conformar el estroma y microambiente tumoral (Hanahan and Weinberg 2011). A continuación se describen brevemente las características que identifican a las células tumorales.

2.3.1 Señalización de proliferación continua

Una de las principales características de las células tumorales es mantener una proliferación crónica. Cualquier tejido normal controla cuidadosamente la producción y liberación de señales de crecimiento y proliferación durante el ciclo de división celular asegurando el mantenimiento y función de la arquitectura tisular, pero las células tumorales son capaces de mantener esta señalización mediante diferentes vías como la producción de sus propios factores de crecimiento resultando en una estimulación autócrina, elevando la cantidad de proteínas receptoras en su superficie o modificándolas para facilitar la unión a cantidades limitadas del ligando o, alternativamente, enviando señales a células normales en el estroma asociado al tumor para estimular la producción de diversos factores de crecimiento (Hanahan and Weinberg 2011).

2.3.2 Evasión de supresores de crecimiento

Las células cancerosas deben eludir los programas que regulan en forma negativa la proliferación celular. Muchos de esos programas dependen de supresores de tumores que operan de diversas maneras para limitar el crecimiento y proliferación celular y que se han encontrado inactivados en cánceres humanos o animales (por ejemplo aquellos que codifican para las proteínas RB y TP53). El contacto célula-célula es otro mecanismo por el que las células normales controlan la estructura tisular pero este fenómeno se ha abolido en varios tipos de células de cáncer en cultivo, mediante la inhibición de genes que regulan a las moléculas de adhesión celular (por ejemplo el gen NF2) o desregulando proteínas que ayudan a mantener la integridad tisular (por ejemplo LKB1) que, al inhibirlas, hacen a las células susceptibles de transformación inducida por mitógenos (Hanahan and Weinberg 2011). Mediante esta transformación, las células llegan a ser independientes de factores que normalmente necesitaban para su crecimiento y adquieren habilidad para sobrevivir y proliferar en condiciones en las que normalmente no lo harían (Krebs et al. 2009).

2.3.3 Resistencia a muerte

La apoptosis es un mecanismo que por mucho tiempo ha sido considerado como un proceso que se activa en respuesta a daño al ADN y estrés celular generado por niveles elevados de señalización oncogénica, por lo cual es muy importante en la terapia antineoplásica. Sin embargo, diversas investigaciones reportan la atenuación de este mecanismo en aquellos tumores que logran progresar hacia altos grados de malignidad y resistencia a la terapia. El proceso apoptótico tiene un par de modalidades principales por lo que involucra la participación de una gran diversidad de proteínas que se mencionarán posteriormente, pero por el momento es suficiente mencionar que las células tumorales han desarrollado varias estrategias para superar la apoptosis entre las que se encuentran la pérdida de función de TP53, el incremento en la expresión de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL), la reducción de factores pro-apoptóticos (Bax, Bim, Puma) y el bloqueo de la ruta de muerte inducida por ligandos (Hanahan and Weinberg 2011).

2.3.4 Inmortalidad replicativa

La inmortalización se refiere a la propiedad de proliferación celular indefinida. Las células eucariotas tienen como característica fundamental un periodo de vida preestablecido, cuyo crecimiento y división están altamente regulados. Al límite del número de divisiones celulares se le llama "Limite de Heiflick" y es una propiedad que se pierde en una célula que se torna cancerosa (Krebs et al. 2009). Múltiples líneas de investigación indican que los telómeros que protegen los límites de los cromosomas están involucrados en la capacidad de proliferación ilimitada. Es conocido que la longitud del ADN telomérico indica cuántas generaciones o progenies pueden derivarse de un cromosoma, ya que este ADN telomérico se va reduciendo en cada replicación celular porque la enzima encargada de adicionar segmentos repetidos a la región terminal del ADN telomérico está casi ausente. Sin embargo, las células cancerosas expresan niveles significativos de telomerasa que extienden al ADN telomérico e incrementan la capacidad replicativa (Hanahan and Weinberg 2011).

2.3.5 Inducción de angiogénesis

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren nutrientes y oxígeno, así como rutas para eliminar sus desechos y dióxido de carbono. La nueva vasculatura asociada a un tumor y que hace posible que se cubran esas necesidades se genera mediante el proceso de angiogénesis. Este proceso se refiere a la dispersión de nuevos vasos a partir de otros ya existentes. La formación de nuevas células endoteliales y a su ensamble en otros tubos (vasculogénesis) ocurre activamente durante la embriogénesis pero posteriormente la vasculatura permanece en un estado quiescente. Durante el estado adulto, la angiogénesis se reactiva local y temporalmente en procesos fisiológicos como la reparación de tejido durante el ciclo reproductivo femenino. En contraste, la angiogénesis es activada y permanece prácticamente activa durante la progresión tumoral ocasionando que la vasculatura extienda nuevos vasos hacia el tumor para proporcionar nutrientes al tejido canceroso en expansión (Hanahan and Weinberg 2011). La activación de la angiogénesis en este caso es promovida por la comunicación química célula tumoral-célula endotelial en la que participan inductores como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Frías González 2007).

2.4 METÁSTASIS

Durante la progresión del cáncer se van generando clonas celulares que pueden tener más o menos ventajas que otras para sobrevivir y proliferar en su microambiente. Por lo tanto, dentro de un tumor existe una selección que favorece a las células más aptas que por lo general han perdido en mayor proporción las características del tejido de origen. La progresión de una hiperplasia a un cáncer metastásico resulta de las mutaciones en el genoma de la célula tumoral y la selección que ejerce el microambiente tisular donde se desarrolla. Al aumentar el número de células, el tumor empieza a incrementar su volumen. Esto es resultado y a la vez uno de los tres principales fenómenos que sufren las células durante su progresión a célula tumoral: Inmortalización, transformación y metástasis (Kerbel 2000).

La metástasis describe la etapa en la cual la célula cancerosa desarrolla la capacidad de romper las láminas basales que las mantienen contenidas. Es entonces cuando comienzan a invadir el tejido circundante pudiendo llegar hasta el torrente sanguíneo (intravasación), lo cual significa moverse de su lugar de origen para establecer una nueva colonia en otra parte del cuerpo (Krebs et al. 2009). Se considera que la capacidad de las células tumorales para separarse de un tumor primario, sobrevivir y migrar hacia otros tejidos es una característica que emerge de una subpoblación de células presentes en el frente del tumor original (Figura 3). Diversas evidencias soportan la idea de que dichas células evolucionan de manera independiente (Ansieau et al. 2008).

El proceso metastásico consiste de una serie de pasos secuenciales por los que avanzan las células tumorales. Entre los eventos que ocurren durante la metástasis se encuentran la dispersión de las células tumorales (Johnson 1999), incremento de la motilidad y capacidad de invasión (Brakebusch et al. 2002, Sheetz et al. 1999), evasión del sistema inmune (Lang et al. 2006), paro o restricción por tamaño en los vasos capilares, extravasación, y finalmente establecimiento de la metástasis (Chambers et al. 2002).

Aunque otros eventos como la angiogénesis son necesarios para la sobrevivencia del nuevo tumor secundario (Gupta and Zhang 2005). Durante estas diversas fases sobrevivirán las células tumorales que tengan las características físicas y moleculares que les permitan superar las limitaciones propias del camino que recorren y es importante resaltar que las células cancerosas no presentan comportamientos que no estén

codificados en el genoma, sino que simplemente los presentan fuera de tiempo y del lugar para el que están fisiológicamente programados.

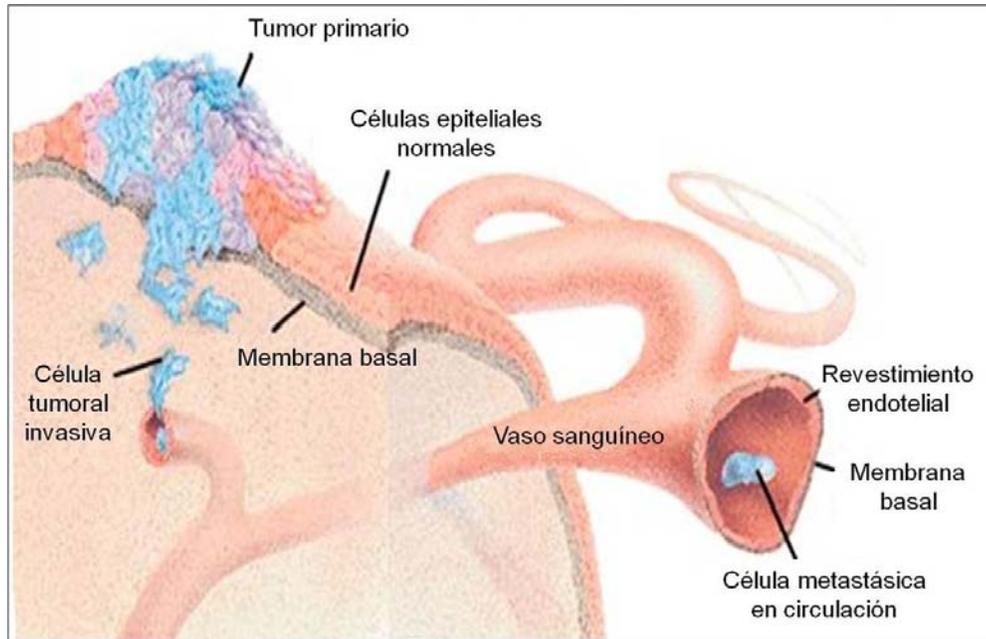


Figura 3. Proceso metastásico.

2.5 EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE

Desde que las células se tornan cancerosas y una vez que logran alcanzar el torrente sanguíneo o linfático, dependen de una exitosa evasión del sistema inmune, ya que éste es capaz de detectar y destruir a las células transformadas. Existe un número cada vez mayor de reportes que resaltan la función antitumoral del sistema inmune, y el papel activo que juega en la supresión del crecimiento de tumores tempranos.

Lang y colaboradores (2006) proponen seis mecanismos de escape característicos de las células tumorales. Estos incluyen la alteración de la maquinaria procesadora de antígenos, factores solubles inmunosupresores, microvesículas y exosomas derivadas del tumor, contra-ataque tumoral, fusión celular y desarrollo de la metástasis.

Dentro de la maquinaria procesadora de antígenos, la presentación de antígenos vía moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) es crucial para una respuesta inmune adecuada. Las alteraciones en el procesamiento y presentación de antígenos es un mecanismo usado comúnmente por los virus para evadir el sistema inmune del hospedero. De manera similar, la pérdida o regulación negativa de moléculas

de clase I del CMH es un mecanismo frecuentemente utilizado por los tumores para escapar del reconocimiento y destrucción por parte de los linfocitos T citotóxicos.

Otro mecanismo de escape tumoral es el uso de factores solubles inmunosupresores. Estos factores se han hallado en ratones experimentales a los que se les han inducido tumores y en pacientes con sistema inmune disminuido por presencia de cáncer. Aparentemente, las respuestas deficientes del sistema inmune en dichos pacientes se atribuyen a la secreción de citocinas inmunosupresoras, como la interleucina-10 y TGF- β (factor de crecimiento transformante beta). La primera es una citocina que regula la diferenciación, maduración y estado funcional de las células dendríticas. La segunda es una molécula que inhibe la activación, proliferación y actividad de los linfocitos T. El TGF- β se encuentra frecuentemente en altos niveles en tumores malignos y se asocia tanto con un mal pronóstico, como con la pérdida de la respuesta del tumor a la inmunoterapia.

Desde hace más de 25 años se describió la habilidad de los tumores para liberar o cubrirse de vesículas de membrana o exosomas. Existen estudios donde se ha encontrado en común el antígeno asociado a tumores FasL en microvesículas presentes en fluidos corporales de pacientes con cáncer colorectal, tumores de ovario o carcinoma de células orales. FasL induce apoptosis de células T activas, lo cual puede jugar un papel significativo en la eliminación del componente más efectivo de la respuesta antitumoral y provee además una explicación a la apoptosis espontánea de las células T en la circulación periférica de pacientes con cáncer.

FasL también está involucrado en el contra-ataque tumoral. La expresión de esta molécula por parte de los tumores implica que las células cancerosas son así mismo resistentes a la muerte celular inducida por FasL. Existen evidencias que sugieren que la expresión de esta molécula es relevante para la progresión tumoral y la formación de metástasis. Algunos estudios muestran que la expresión de FasL está asociada con metástasis a nodos linfáticos. Estos hallazgos indican la participación de dicha molécula en la evasión inmune, progresión tumoral y metástasis desarrollada al promover la sobrevivencia de las células tumorales en sitios hostiles inmunológicamente, así como por la inducción de apoptosis en las células normales vecinas al tumor, lo cual facilita la invasión de las células tumorales (Lang et al. 2006).

El concepto de fusión celular no es nuevo, pero ha resurgido bajo los aspectos de iniciación y desarrollo del cáncer. Los conceptos que se discuten incluyen la iniciación del cáncer por transformación de células troncales y la fusión de éstas con las células tumorales. Las células troncales pueden ser atraídas hacia el tejido tumoral por señales inflamatorias o de regeneración de tejido. Por su parte, las células troncales derivadas de la médula ósea son móviles y no residentes, tienen una baja restricción tisular y sobreviven tanto en ambientes asociados a un tejido sano como en ambientes asociados a un estado patológico. Después de fusionarse con otras células, las células troncales son capaces de transferirles algunas de sus características, lo cual puede promover un estado de dediferenciación, incluyendo un incremento en la proliferación, sobrevivencia, invasión y evasión inmune. Las células neoplásicas pueden adquirir además otras características del sistema inmune tal como la capacidad de migración activa y quimiotaxis. Por lo tanto, la fusión celular es un mecanismo celular para el cambio de fenotipo y función, que bien puede resultar en una aceleración de la progresión del cáncer (Lang et al. 2006).

El desplazamiento físico y dispersión a diversos tejidos del cuerpo por parte de las células de un tumor primario puede, en ocasiones, haber superado un estado de latencia antes del desarrollo de una masa tumoral secundaria. Aún no está claro cómo se inicia el proceso metastático pero hasta el momento se han sugerido tres teorías. Una de ellas postula que el potencial metastático de un tumor se basa en alteraciones genéticas en la tumorigénesis temprana. Otra de las hipótesis afirma que los factores interno-ambientales tales como citocinas y neurotransmisores funcionan como iniciadores de la actividad migratoria de las células tumorales, de manera similar a la regulación de la migración leucocitaria. La tercera hipótesis sugiere que las células tumorales adquieren su potencial migratorio a partir de la fusión con células troncales de origen mieloide. Donde la fusión o las alteraciones genéticas son quienes proveen a la célula tumoral del fenotipo migratorio, mientras que los factores interno-ambientales son los últimos iniciadores de la actividad metastásica (Lang et al. 2006).

2.6 INFLAMACIÓN, UN EVENTO ASOCIADO A CÁNCER Y METÁSTASIS

La angiogénesis y la infiltración de células inmunes se han asociado también a eventos inflamatorios y carcinógenos. Por una parte, el ambiente inflamatorio que rodea a

un tumor puede favorecer el rompimiento de la membrana basal, un proceso requerido para la invasión y migración de células tumorales. Además, las células tumorales pueden producir citocinas y quimiocinas para atraer células inmunes y facilitar tanto la evasión del mismo sistema inmune, como su establecimiento y desarrollo. Por otra parte, el incremento de macrófagos asociados a un tumor (TAM) se asocia a un mal pronóstico, ya que éste contribuye al desarrollo del tumor a través de diversos mecanismos. Uno de ellos es la liberación, por parte de los TAM, de IL-10 y prostaglandina E₂, los cuales suprimen la respuesta antitumoral. Otro es la facilidad que tienen los TAM de liberar factores angiogénicos como VEGF, EGF, endotelina-2 y activador de plasminógeno que promueven el crecimiento tumoral. Los TAM también pueden facilitar la invasión de las células tumorales al liberar metaloproteinasas de matriz e inducir la producción del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) y la enzima Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS) (Lu et al. 2006).

2.7 MOLÉCULAS PARTICIPANTES EN LA RELACIÓN INFLAMACIÓN-CÁNCER-METÁSTASIS

2.7.1 Moléculas de adhesión celular

Las células que poseen capacidades invasivas y metastásicas presentan alteraciones en la expresión de diferentes clases de moléculas de adhesión que median el anclaje celular a su microambiente. Las proteínas afectadas incluyen moléculas de adhesión celular (CAMs), principalmente miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y miembros de la familia de las cadherinas, cuya función es regular las interacciones célula-célula. Todas estas interacciones de adhesión convergen en vías de señalización reguladoras en la célula (Aplin et al. 1998, Campbell et al. 1998).

2.7.2 Integrinas

Los distintos microambientes invadidos influyen en las respuestas de las células malignas. De acuerdo con esto, la colonización exitosa de estos nuevos sitios, tanto distantes como locales, requiere de una adaptación que es lograda a través de cambios en el espectro de las subunidades de las integrinas, las cuales son expresadas por las células

invasoras (Lukashev and Werb 1998, Varner and Cheresch 1996). Las células de carcinoma facilitan la invasión mediante un cambio en la expresión de sus integrinas, que son responsables de las interacciones célula-matriz extracelular. Así, por ejemplo el cambio de integrinas $\alpha1\beta2$ que se unen a la matriz constitutiva de la lámina basal cambia por integrinas $\alpha3\beta1$ y $\alpha v\beta3$ preferencialmente a los nuevos componentes de matriz extracelular generados por proteasas extracelulares de las células invasivas (Lukashev and Werb 1998, Plantefaber and Hynes 1989).

2.7.3 Citocinas

Se ha demostrado que diversos miembros de las citocinas quimioatrayentes –más conocidas como quimiocinas– y sus receptores, participan de manera importante en pasos críticos de la tumorigénesis y/o metástasis. Las funciones de las quimiocinas se han detallado en los leucocitos, ya que éstos usan estas proteínas para detenerse en los vasos sanguíneos inflamados y como guía hacia sitios específicos de inflamación. *In vivo*, la activación de integrinas dependiente de quimiocinas resulta en una limitación firme de leucocitos en la superficie luminal de los vasos sanguíneos, principalmente para la diapedésis de estas células en los tejidos inflamados (Kakinuma and Hwang 2006). Las quimiocinas son también producidas por las células endoteliales en respuesta a moléculas involucradas en la reacción inflamatoria, inmunidad y trombosis. Los inductores de quimiocinas incluyen citocinas pro-inflamatorias como las interleucinas IL-1, IL-4, IL-13, IL-17, TNF, productos bacterianos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) ligeramente modificadas, trombina, fibrina, histamina e incluso la hipoxia (Mantovani et al. 1997). Existe evidencia de que la respuesta inmune del hospedero mediada por células es importante para el curso de una infección. En esta respuesta participan linfocitos T citotóxicos en cooperación con células presentadoras de antígeno, monocitos y células dendríticas. Todas ellas liberan citocinas que influyen la síntesis y acciones de otras en una red inmuno-reguladora de citocinas. La observación de un patrón de citocinas en el plasma de mujeres positivas para VPH durante la carcinogénesis de cáncer cervical en estadio III de una neoplasia cervical intraepitelial (NCI) ha permitido asumir que cambios significativos en la inmunocompetencia de leucocitos circulantes se encuentran involucrados en el desarrollo de la displasia cervical hacia el cáncer cervical, lo cual ha

sido demostrado al hallar cambios importantes en la cinética de liberación de citocinas en sangre de mujeres con displasia cervical con progresión a NCI II y NCI III (Bais et al. 2007).

Las citocinas han demostrado tener valor como potenciales marcadores tumorales especialmente útiles en el pronóstico y monitoreo del tratamiento. Cambios metabólicos y en el sistema inmune acompañan al crecimiento tumoral, en los que un número de citocinas como IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF) se han visto sobreproducidos durante la reacción de fase aguda. Por ejemplo, a principios de los 90's se encontró una elevada cantidad de IL-6 en un significativo porcentaje de pacientes con cáncer de diversos tipos, entre ellos renal, cervical, de vejiga, estómago y ovario (Kotowicz et al. 2008).

2.8 PARTICIPACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÁNCER

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) incluyen radicales libres generados como subproductos del metabolismo celular, entre ellos se encuentran el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y el óxido nítrico (NO), los cuales pueden promover eventos de proliferación y diferenciación celular cuando se encuentran en cantidades moderadas, pero en exceso, estas especies se consideran los responsables de la mayoría de alteraciones en las macromoléculas, a lo que se le conoce como estrés oxidativo.

El incremento en la producción de EROs depende de diversos mecanismos tales como la activación de oncogenes, metabolismo alterado, disfunción mitocondrial y pérdida de p53 funcional. Las citocinas y factores de crecimiento también estimulan la producción de especies reactivas para llevar a cabo sus efectos biológicos. Y adicionalmente, células como macrófagos y neutrófilos son productores de EROs (Barrera 2012).

El estrés oxidativo se ha asociado a daño celular en patologías como diabetes mellitus, aterosclerosis, cáncer, enfermedad de Parkinson, Alzheimer y al proceso de envejecimiento (Gupte and Mumper 2009). También es importante considerar que muchas de las displasias que desencadenan cáncer surgen en sitios de irritación, infección o inflamación crónica (Barrera 2012). En el caso del cáncer, las células tumorales tienen un metabolismo más activo comparado con células normales, y recientemente se han encontrado niveles altos de EROs en células de muchos tipos de cáncer, por lo que se

considera que un tumor es más susceptible y sensible a cambios en el balance de oxidación – reducción (Serment-Guerrero et al. 2011). Sin embargo, estos niveles altos de EROs que en células normales podrían causar muerte, son insuficientes para causar apoptosis o necrosis en las células tumorales. Además, las células tumorales presentan alteraciones que reducen los niveles de sus enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y peroxiredoxina sugiriendo una adaptación al estrés oxidativo (Barrera 2012, Gupte and Mumper 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, la presencia de bajos niveles de EROs se considera normal, pero estos pueden modificar funciones celulares dependiendo de su concentración. Cuando se trata de daño, un ligero incremento puede producir arresto celular transitorio en las fases G1, S o G2 del ciclo celular; pero un incremento desproporcionado, generalmente inducido por quimioterapia, agota las proteínas antioxidantes de las células induciendo un arresto permanente del ciclo celular que finalmente termina en senescencia o apoptosis (Barrera 2012). Los principales blancos de las EROs que pueden ser afectados negativamente son el ADN, la membrana mitocondrial interna –promoviendo la pérdida de reservas de ATP-, y los fosfolípidos de membrana – con la iniciación de la peroxidación lipídica-, cuya alteración puede conducir a muerte celular por apoptosis (Gupte and Mumper 2009).

2.8.1 EROs y ADN

El estrés oxidativo que induce daño al ADN puede afectar cadenas dobles o sencillas y activar los puntos de chequeo del ciclo celular para producir arresto en las fases previamente mencionadas inducido generalmente por un estímulo negativo de las proteínas reguladoras del ciclo celular p21 y p16. Si los procesos de reparación no pueden superar la cantidad de daño, se activa la senescencia celular mediada por las proteínas p53 y Rb. El estrés oxidativo también provoca la oxidación de las terminaciones teloméricas, lo que hace a los telómeros más susceptibles de fragmentarse e incrementa su velocidad de desgaste, o bien, se suprime la actividad de la telomerasa conduciendo a una senescencia prematura (Barrera 2012).

2.8.2 EROs y membrana mitocondrial

Señales de estrés como la privación de nutrientes puede causar la liberación de factores proapoptóticos independientes de caspasas mediada por la acción de proteínas de la familia Bcl-2 (Bax y Bak) por parte de la mitocondria. Al activarse esta vía apoptótica, el citocromo C es liberado hacia el citoplasma e inicia la activación de caspasas. La vía extrínseca de la apoptosis puede converger en la vía mitocondrial mediante la activación de receptores de muerte y la subsecuente escisión de Bid, este otro miembro de la familia Bcl-2 promueve la permeabilización de la membrana mitocondrial externa con lo que además de la liberación de citocromo C, también se liberan otros factores proapoptóticos. La mitocondria *per se* además es capaz de producir EROs y entrar en un estado de estrés oxidativo que conlleva a la apoptosis y que se mantiene durante el proceso (Pajusto et al. 2005).

2.8.3 EROs y peroxidación lipídica

Muchas de las patologías asociadas al estrés oxidativo resultan de la peroxidación de lípidos derivada de dicho estrés. Las especies reactivas antes mencionadas pueden alterar la bicapa de las membranas y ocasionar la peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados generando el radical lipoperoxil (LOO^\bullet) por la extracción de un carbón metileno, LOO^\bullet reacciona con otro lípido para producir un radical lipídico e hidroperóxido lipídico (LOOH). Los LOOH s son muy inestables y capaces de generar nuevos peroxilos y radicales alcoxi y descomponer productos secundarios, en su mayoría aldehídos (malonaldehído, hexanal, 4-hidroxinonenal o acroleína). Esta fragmentación de lípidos y la formación de compuestos reactivos pueden desencadenar cambios en la permeabilidad y fluidez de la bicapa lipídica y alterar la integridad celular. Aunque el aumento de EROs se ha demostrado en la mayoría de los tipos de cáncer, la concentración de productos derivados de la peroxidación de lípidos es aún materia de debate (Barrera 2012, Gupte and Mumper 2009).

2.9 TIPOS DE MUERTE CELULAR

La transformación maligna de las células normales consiste en la adquisición progresiva de una serie de cambios genéticos específicos que actúan desobedeciendo los

fuertes mecanismos de auto-reparación celular que existen en todas las células sanas. Entre estos mecanismos se incluyen la regulación de la transducción de señales, la diferenciación celular, la reparación de ADN, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis y la apoptosis. Por su parte, las células cancerosas responden a las terapias por diferenciación (lo cual es frecuentemente un proceso irreversible asociado a la inhibición de la proliferación y remoción apoptótica), arresto de la proliferación (el cual, en el caso de la senescencia, es indefinido), o muerte celular. Entre los tipos de muerte celular, la necrosis y la apoptosis son los más comúnmente encontrados y por consiguiente los más estudiados.

2.9.1 Necrosis

En algunos casos, las células tumorales pueden morir por necrosis. Este proceso aparentemente comienza con una incapacidad de las células para mantener la homeostasis, dirigiéndolas a una pérdida de la permeabilidad de la membrana y la consiguiente entrada de iones extracelulares y agua, lo que causa la expansión de la célula y organelos previo a la ruptura de la membrana (Williams 1991). El contenido celular es liberado en el espacio intercelular y existe autofagia (secuestro de grandes partes del citoplasma en vacuolas autofágicas). Este proceso puede ocurrir como resultado de una catástrofe mitótica (discernible morfológicamente por multi- o micronucleación y/o arresto mitótico previo a la apoptosis) (Zitvogel et al. 2008). Debido a la lisis celular, los contenidos citoplásmicos -incluyendo enzimas lisosomales- son liberados al fluido extracelular. Por este motivo, la necrosis es asociada con un daño excesivo a los tejidos lo que puede originar una respuesta inflamatoria (Zong and Thompson 2006).

2.9.2 Apoptosis

La muerte de células tumorales ocurre usualmente por apoptosis, un estereotipado patrón de cambios morfológicos que involucra la condensación de cromatina, fragmentación nuclear, contracción del citoplasma, invaginación de la membrana plasmática y la desintegración final de la célula en cuerpos apoptóticos rodeados de membrana (Figura 4). Estos cambios son raramente vistos *in vivo* debido a que las células que están en este proceso de muerte celular son reconocidas y engullidas por células

vecinas antes de entrar en las fases tardías del proceso apoptótico (Zitvogel et al. 2008).

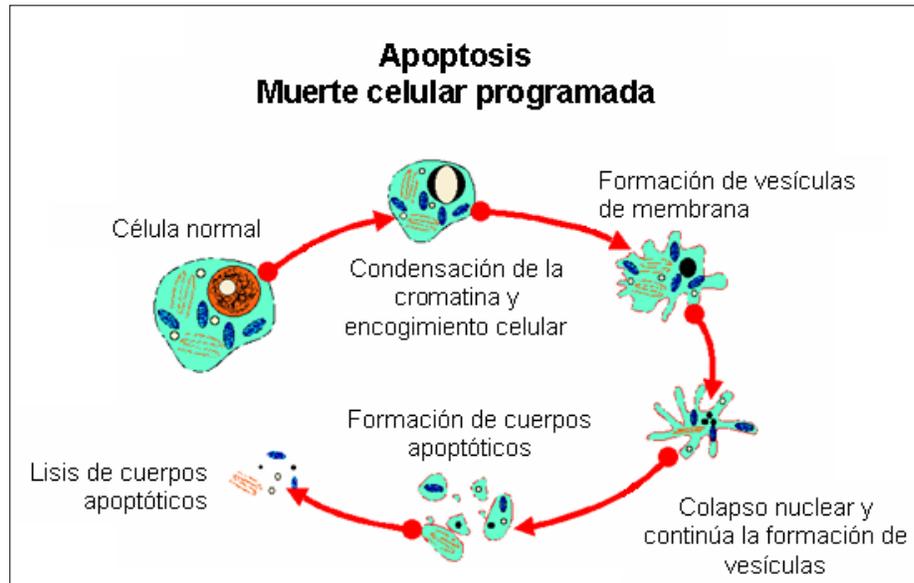


Figura 4. Muerte celular programada.

2.9.2.1 Vías Apoptóticas

Las señales de muerte pueden originarse de dos maneras. Una de ellas es mediante la vía extrínseca o citoplasmática a través del receptor de muerte Fas (miembro de la superfamilia del TNF) que participa en el mantenimiento de la homeostasis. La otra vía es la llamada vía intrínseca o mitocondrial que ocurre cuando ciertos estímulos conducen a la célula a liberar citocromo C y, por consiguiente, a activar señales de muerte. Los estímulos pueden ser externos o internos (como daño al ADN) (Degterev et al. 2003, Fulda and Debatin 2006, Ghobrial et al. 2005).

2.9.2.1.1 Vía Extrínseca de la apoptosis

En la superfamilia TNF, los receptores de muerte forman un subgrupo que incluye más de veinte proteínas con funciones de regulación de muerte celular y de diferenciación o regulación del sistema inmune. Estos receptores de muerte se caracterizan por poseer un dominio extracelular que contiene residuos ricos en cisteína y un dominio intracelular denominado dominio de muerte (DD) de alrededor de 80 aminoácidos. El DD es importante para transmitir señales apoptóticas desde la superficie celular hacia el interior de la célula (Fulda and Debatin 2006, Ghobrial et al. 2005). Cuando el ligando se une, los

receptores de muerte interactúan a través de sus dominios de muerte con los correspondientes dominios proteicos de moléculas adaptadoras como FADD (Dominio de muerte asociado a Fas), que a su vez poseen un segundo dominio de interacción en el extremo N-terminal denominado dominio efector de muerte (DED) y que facilita la unión al predominio DED de la procaspasa-8. Estos componentes forman el complejo de inducción de muerte (DISC) que activa a la caspasa-8 a través de un mecanismo de dimerización inducido por proximidad. En este punto, una alta concentración de la caspasa-8 dimerizada promueve su activación de manera autocatalítica y la subsecuente activación por escisión de proteínas efectoras (como procaspasa-3) lo cual resulta en su activación y ejecución de la muerte celular (Ghobrial et al. 2005, Shi 2004).

Los ligandos del receptor Fas comúnmente existen como trímeros, se unen y activan a sus receptores induciendo la trimerización del receptor. Una vez activados, los receptores reclutan y activan moléculas adaptadoras que poseen un dominio de muerte que reclutan la procaspasa 8 al complejo receptor, donde ésta sufre una activación autocatalítica. La caspasa 8 activada actúa sobre la caspasa 3 a través de dos rutas, la más compleja es donde la caspasa 8 escinde a la proteína que interactúa con Bcl-2 (Bid) y su región COOH- terminal es translocada a la mitocondria donde activa la liberación del citocromo C. El citocromo C liberado se une al factor activador de la proteasa apoptótica-1 (Apaf-1) junto con dATP y procaspasa 9 en donde esta es activada. La caspasa 9 activada escinde a la procaspasa 3 para activarla. La otra ruta es en la que la caspasa 8 escinde directamente a la procaspasa 3 activándola. Por su parte, la caspasa 3 rompe al factor de fragmentación (DFF) 45 en un factor heterodimérico de DFF40 y DFF45. El fragmento DFF45 se disocia de DFF40 induciendo la oligomerización de DFF40 que posee actividad. El oligómero DFF40 activo causa la fragmentación internucleosomal del ADN, lo cual es uno de los marcadores apoptóticos de la condensación de cromatina (Figura 5) (Lee E. W. et al. 2012).

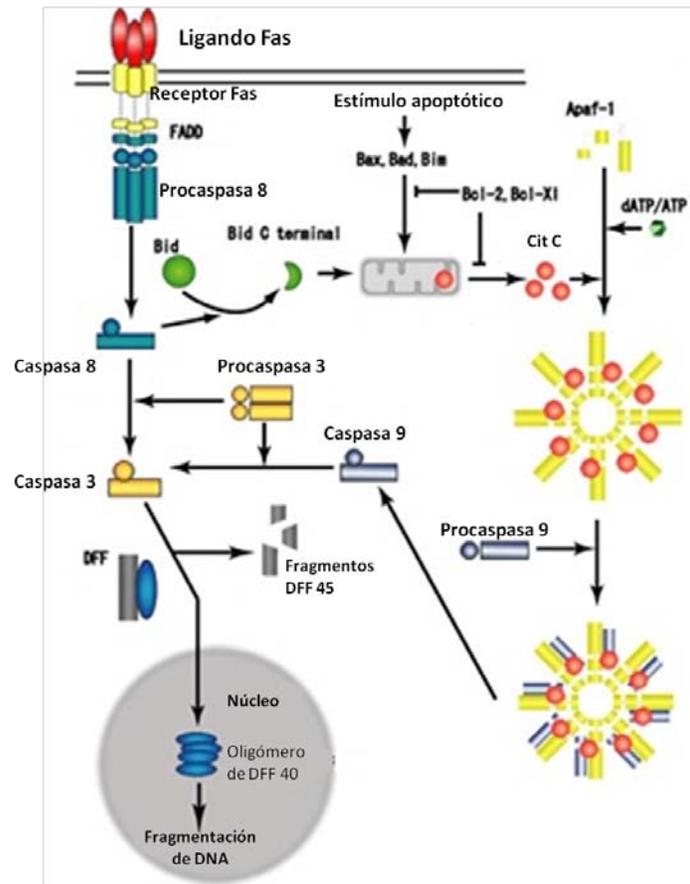


Figura 5. Pasos y proteínas que participan en la vía extrínseca de la apoptosis.

2.9.2.1.2 Vía Intrínseca de la apoptosis

En esta vía también conocida como vía mitocondrial, la activación de las caspasas se relaciona con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa mediante proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2. Diversos estímulos citotóxicos y señales proapoptóticas convergen en la mitocondria para inducir dicha permeabilización, la cual está regulada no sólo por las proteínas de la familia Bcl-2 sino también por lípidos mitocondriales, proteínas que regulan el flujo metabólico y componentes que brindan permeabilidad a los poros de membrana. Al permeabilizarse la membrana mitocondrial externa, un número de proteínas normalmente encontradas en el espacio intermembranal de la mitocondria son liberadas al citosol. Estas proteínas apoptogénicas, como citocromo C, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF y endonucleasa G, desencadenan la muerte celular al activar a las caspasas (Dubin and Stoppani 2000, Fulda and Debatin 2006). Entre tales proteínas apoptogénicas, el citocromo C funciona normalmente en el transporte de

electrones en la cadena respiratoria generando ATP. Se considera que durante la permeabilización se forman poros en la membrana mitocondrial para permitir la liberación del citocromo C hacia el citosol, proceso que es regulado por proteínas de la familia Bcl-2. La liberación del citocromo C promueve la activación de la caspasa-3 a través de la formación de un complejo denominado *apoptosoma*, el cual está constituido por citocromo C, Apaf-1 y caspasa-9. Una vez en el citosol, el citocromo C funciona como cofactor y se une a la región C-terminal de Apaf-1, que es una proteína con un dominio N-terminal de reclutamiento de caspasas (CARD). Esta unión facilita la asociación de dATP con Apaf-1 y provoca la exposición del extremo N-terminal CARD para la posterior oligomerización y reclutamiento de procaspasa-9. El apoptosoma es una molécula de alto peso molecular que sirve de plataforma para la activación de otras caspasas. La activación de la caspasa-9 no es debida a proteólisis, sino a un cambio conformacional; y en éste, el requerimiento principal para tal activación es la asociación de la caspasa-9 con el cofactor Apaf-1 (Dubin and Stoppani 2000, Fulda and Debatin 2006). Subsecuentemente, la procaspasa-3 es reclutada hacia el apoptosoma y activada por la caspasa-9. A partir de ese momento, la caspasa-3 activada puede cortar distintos sustratos en la célula para producir cambios morfológicos y bioquímicos que desencadenen la apoptosis. Se considera que la muerte celular ocurre, en la mayoría de veces, a través de esta vía activada por señales de daño al ADN y pérdida de adhesión, entre otras (Fan et al. 2005, Ghobrial et al. 2005).

La vía intrínseca de la apoptosis es iniciada por diversos estímulos principalmente caracterizados por la privación de factores de crecimiento o agentes genotóxicos tales como las quimioterapias antitumorales o radiación γ . Los eventos iniciales están representados por la activación de proteínas BH3 como Bid y Bim, estas proteínas activadas son translocadas subsecuentemente a la membrana mitocondrial donde se asocian a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L y las inactivan. Las proteínas antiapoptóticas Bax y Bad son activadas en la membrana mitocondrial donde generan un conducto permeable a proteínas para la consecuente liberación de citocromo C y otras proteínas. La liberación del citocromo C (cit C) induce la formación del apoptosoma en asociación con el complejo Apaf-1 y la caspasa 9. El factor inductor de apoptosis (AIF) liberado de la mitocondria es capaz de inducir apoptosis independiente de caspasas. La proteína Smac/DIABLO liberada también de la mitocondria interactúa con el inhibidor de

apoptosis (IAP) inactivándolo y conduciendo a la subsiguiente activación de caspasas (Figura 6) (Testa 2004).

Aunque existen argumentos que proponen que la apoptosis debe ser un evento no inmunogénico o aún tolerogénico (porque la muerte fisiológica ocurre mediante apoptosis pero no conduce a la autoinmunidad), y aunque la necrosis (que es frecuentemente patológica) ha sido referida como pro-inflamatoria, las ecuaciones teóricas en las que la apoptosis significa no inmunogénica y necrosis significa inmunogenicidad no se han confirmado o verificado experimentalmente. Además, parece ser que la apoptosis no es uniforme en términos bioquímicos, lo cual significa que hay varias vías que pueden conducir a la muerte celular e inducir cambios estímulo-específicos. De manera adicional, la fase de ejecución apoptótica puede involucrar un grado variable de reacciones catabólicas dependientes o independientes de caspasas (Zitvogel et al. 2008).

Durante la ejecución de apoptosis independiente de caspasas están involucradas proteínas del espacio intermembranal que se liberan al citosol ante las señales de muerte. Entre ellas destacan el factor inductor de apoptosis (AIF), especies reactivas de oxígeno (ROS), la serin proteasa mitocondrial (HtrA2/Omi), el calcio (Ca^{++}) y la endonucleasa G (Fan et al. 2005).

A pesar de que la vía de apoptosis y transducción de señales tienen un papel crucial en la eliminación de células tumorales en respuesta a agentes citotóxicos utilizados en el tratamiento de pacientes con cáncer, el significado de la apoptosis como mecanismo principal de muerte celular en pacientes con esta enfermedad ha sido cuestionado. Además de la apoptosis, las células tumorales han mostrado ser eliminadas -después del daño al ADN- de manera eficiente mediante necrosis, catástrofe mitótica o autofagia. Por tanto, los tipos de muerte celular no apoptótica también han sido considerados como respuesta hacia agentes citotóxicos (Fulda and Debatin 2006).

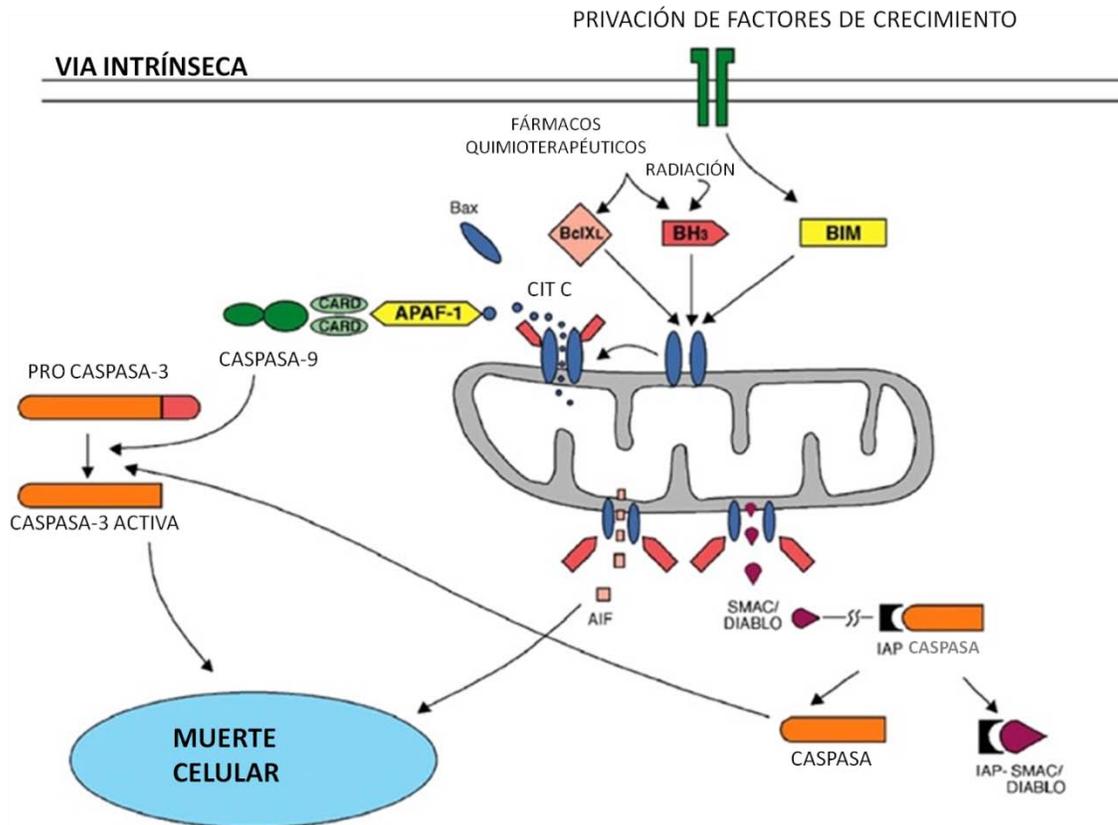


Figura 6. Pasos y proteínas que participan en la vía intrínseca de la apoptosis.

2.10 PARTICIPACIÓN DE LAS CASPASAS EN LA APOPTOSIS

La maquinaria intracelular de la apoptosis depende de una familia de proteasas llamadas caspasas. Actualmente se conocen más de catorce caspasas y de algunas de ellas aún se desconoce su función. Se ha visto que las caspasas 1 y 11 participan en el procesamiento de citocinas, mientras que las caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 están implicadas en la regulación y en la ejecución de la apoptosis. Todas las caspasas apoptóticas permanecen en las células como proenzimas inactivas, similares a los zimógenos de la coagulación sanguínea. Cuando las células entran en apoptosis, las caspasas se activan a través de uno o dos pasos proteolíticos que acaban por cortar el péptido precursor, dando como resultado la generación de los fragmentos grande y pequeño que constituyen a la enzima activa. Existen dos cascadas de activación para las caspasas que han sido más o menos bien caracterizadas y que son fundamentales en la regulación de la apoptosis: La cascada generada por los receptores de membrana (Death

Receptors) y la cascada desencadenada por cambios en la integridad de la mitocondria.

Con base en su estructura y secuencia, las caspasas se clasifican en iniciadoras o efectoras. Las primeras poseen prodominios largos y son capaces de activar a las caspasas efectoras mediante procesos proteolíticos; además, interaccionan con proteínas adaptadoras específicas. Sus prodominios largos poseen uno o dos dominios de interacción proteína-proteína denominados dominios efectores de muerte (DED). La activación de las caspasas iniciadoras se lleva a cabo mediante el contacto entre sus respectivos predominios largos con complejos moleculares adaptadores que favorecen la homodimerización. De esta manera se activa un zimógeno por la acción de otro (Chen y Wang, 2002; Fan *et al.*, 2005). Las caspasas 3, 6 y 7 son las llamadas caspasas efectoras. Su presencia es abundante y contienen un prodominio corto. Son responsables directas de características apoptóticas al fragmentar proteínas reguladoras y estructurales (Fan *et al.* 2005, Ghobrial *et al.* 2005).

De manera general, la apoptosis puede ocurrir por cualquiera de dos rutas principales. La vía extrínseca o citoplásmica es activada mediante el receptor de muerte Fas. La intrínseca o mitocondrial es iniciada cuando se libera el citocromo C de la mitocondria. Ambas rutas convergen en una vía común que involucra la activación de la cascada de caspasas y moléculas estructurales para finalmente culminar en la muerte celular. Las vías apoptóticas convergen en la caspasa 3 y las proteasas río arriba que convergen en ella son las caspasas 8 y 9 en las rutas extrínseca e intrínseca, respectivamente (Ghobrial *et al.* 2005).

2.11 OTROS TIPOS DE MUERTE CELULAR

El Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD) formuló una serie de recomendaciones en el año 2005, a partir de las cuales este campo de investigación ha progresado para detallar y establecer las diferentes modalidades de muerte celular. Un punto muy importante fue considerar que las características de muerte celular, entre las que se encontraban una masiva activación de caspasas, pérdida de potencial de membrana y completa permeabilización de la membrana mitocondrial externa y exposición de fosfatidilserina, no se presentan en todos los casos de muerte celular y mucho menos en todos los tipos celulares. Por lo que, en ausencia de un evento bioquímico claramente

definido como punto de no-retorno, el NCCD propuso que una célula es considerada muerta cuando se cumple alguno de los siguientes criterios morfológicos o moleculares:

- Pérdida de integridad de la membrana plasmática e integración de algún colorante *in vitro*
- Desintegración nuclear o celular en fragmentos discretos (que pueden ser cuerpos apoptóticos)
- Los fragmentos disociados han sido engullidos por alguna célula adyacente *in vivo*

Por lo tanto, las células arrestadas en alguna fase del ciclo celular se consideran vivas (Kroemer et al. 2009).

El progreso en la exploración bioquímica y genética promueve el descubrimiento de nuevas características, la continua actualización de estas definiciones y, por consiguiente, la adición de nuevas modalidades de muerte celular. Sin dejar de ser la apoptosis uno de los mecanismos más reportados debido a que puede ser activado por un gran número de condiciones, este tipo de muerte celular ya no sólo cuenta con los tipos intrínseco y extrínseco en los que participan las caspasas, sino que también puede ocurrir en forma independiente de éstas. De igual forma, mientras se pensaba que la necrosis era un tipo de muerte accidental con ausencia de características morfológicas, recientemente se ha aclarado que es un mecanismo regulado involucrado también en diversos escenarios fisiológicos y patológicos (Galluzzi et al. 2012).

De manera breve, a continuación se mencionan otros tipos de muerte celular que se presentan menos comúnmente y fueron descritos por Kroemer y colaboradores (Kroemer et al. 2009) y Galluzzi y colaboradores (Galluzzi et al. 2012).

2.11.1 Muerte celular autofágica

Con base en la morfología, este término fue ampliamente utilizado para indicar muerte celular acompañada por vacuolización citoplásmica masiva. Se ha observado que la autofagia puede mediar muerte celular *in vivo* durante el desarrollo de *D. melanogaster* y también que parece ser responsable de muerte celular de algunas células cancerosas, especialmente aquellas que carecen de moduladores de apoptosis como BAX, BAK o caspasas. No obstante, en la mayoría de casos conocidos, la autofagia constituye una respuesta citoprotectora activada en las células que mueren en el intento de combatir el

estrés al que están sujetas. Desde una perspectiva puramente morfológica, es fácil confundir a la autofagia, por lo que se recomienda el uso de marcadores específicos e inhibidores de este tipo de muerte celular.

2.11.2 Catástrofe mitótica

Este término se emplea generalmente para un tipo de muerte celular que ocurre durante la mitosis y esto es porque precisamente es activada por una mitosis aberrante, ejecutada durante esta fase de división celular o en la interfase subsecuente. Con base en consideraciones funcionales, la autofagia no constituye una ruta ejecutora de muerte celular como tal, sino un mecanismo oncosupresor que es iniciado por perturbaciones del aparato mitótico y durante la fase M del ciclo celular, por lo que es parecido en cierto grado al arresto mitótico y que finalmente activa la muerte celular por senescencia.

2.11.3 Anoikis

Este término fue introducido para describir la respuesta de células adherentes ante la ausencia de interacciones célula-matriz ya que la sobrevivencia de células adherentes no transformadas depende de señales traducidas por integrinas y factores de crecimiento en interacción con la matriz extracelular. Con base en consideraciones bioquímicas y funcionales, este tipo de muerte celular se define como una cascada letal restringida a células adherentes que se inicia con la separación de la matriz y que se caracteriza por la carencia de uniones de integrina- β 1, regulación negativa en la expresión de receptores a factores de crecimiento, inhibición de la señalización extracelular regulada por cinasa 1 y la sobreexpresión de la proteína BIM, miembro de la familia BCL-2. Es importante notar que en su mayoría, el programa de muerte celular iniciado por anoikis es ejecutado por la maquinaria de la apoptosis intrínseca.

2.11.4 Entosis

Mecanismo de muerte celular asociado a un fenotipo “célula-en-célula” frecuentemente mostrado por células no fagocíticas en muestras de tumores. La entosis puede ser provocada por la pérdida de interacciones con la matriz extracelular, pero sin la activación de caspasas ejecutoras, por lo que es diferente a la anoikis. Las principales

características de este tipo de muerte celular son que las células engullidas no salgan del fagosoma y muestren ser degradadas en el lisosoma, que el fenotipo “célula-en-célula” se origine por interacciones homotípicas y no involucren fagocitos y que el proceso no sea sensible a intervenciones químicas y genéticas que normalmente bloquean la apoptosis intrínseca dependiente o independiente de caspasas.

2.11.5 Parthanatos

Con un término acuñado partiendo de la personificación de la muerte en la mitología griega, Thanatos, esta modalidad de muerte celular involucra a las enzimas de respuesta al daño del ADN poli ADP-ribosa polimerasas (PARP) y en particular PARP1 que por sí sola constituye más del 90% de la actividad celular de PARP. En condiciones fisiológicas, PARP1 coopera con la maquinaria de reparación del ADN para asegurar la homeostasis genómica. Contrariamente, la sobreactivación de PARP1 tiene consecuencias tóxicas, incluyendo el agotamiento de NAD⁺ y ATP, así como la acumulación del polímero poli ADP-ribosa (PAR), que favorece la disipación del potencial de membrana mitocondrial y la liberación del Factor Inductor de Apoptosis (AIF). La interacción física de PAR y AIF parece ser requerida para este tipo de muerte celular.

2.11.6 Pyroptosis

Este término se refiere a un peculiar tipo de muerte de macrófagos infectados por *Salmonella typhimurium*. Otras bacterias que activan este atípica modalidad de muerte son *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis* y la toxina de *Bacillus anthracis*, pero se ha aclarado que este proceso no es específico de macrófagos ni de infección bacteriana. Además, la pyroptosis puede presentar características de la muerte apoptótica o necrótica. La particularidad bioquímica más distintiva de la pyroptosis es la activación temprana de la caspasa-1 que puede ocurrir en el contexto del complejo proteico conocido como inflamasoma, o bien, por complejo nombrado pyroptosoma. En ambos casos, la caspasa-1 cataliza la maduración proteolítica y liberación de las interleucinas IL-1 β e IL-18. En algunos casos, esto es seguido por la activación de caspasas y posterior muerte celular. Se ha reportado que la caspasa-1 media la activación proteolítica de la caspasa-7 sugiriendo una muerte celular con limitada

participación de caspasa-3, aunque aún se necesita comprobar si la pyroptosis realmente constituye una ruta de muerte celular por sí sola o si representa un caso particular de apoptosis intrínseca dependiente de caspasas.

2.11.7 Netosis

Este tipo de muerte se presenta por parte de neutrófilos y eosinófilos en respuesta a diversos estímulos, en la que exhiben una vacuolización masiva del citoplasma, descondensación rápida de la cromatina y ruptura de membranas nucleares y granulares, lo cual es requerido para la formación y liberación de las llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), estructuras microbidas compuestas de cromatina nuclear, histonas y proteínas antimicrobianas granulares. La netosis se considera restringida a células granulocíticas, y es insensible a inhibidores de caspasas y necrostatina-1, con lo que se demuestra que constituye una ruta de muerte celular diferente a la apoptosis y a la necrosis regulada. Sin embargo, este proceso puede suprimirse mediante inhibición farmacológica de la NADPH oxidasa o de la autofagia. Al parecer, se requiere la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) pero es insuficiente para que ocurra la netosis, lo cual sugiere que los componentes autofágicos de la netosis no pueden ser completamente atribuidos a la actividad de las ROS para promover la autofagia y que la netosis comparte características bioquímicas con la autofagia y la necrosis regulada.

2.11.8 Cornificación

Aunque las células pertenecientes a la capa basal de la epidermis responden continuamente a lesiones ligeras (por ejemplo por radiación UV) sufriendo apoptosis o necrosis, las células de la capa externa sufren continuamente una ruta de muerte celular fisiológica que se ha denominado “cornificación”. También conocida como “queratinización” o “formación de cubierta cornificada”, la cornificación es considerada frecuentemente como un programa de diferenciación terminal similar al que sufren otras células anucleadas como los eritrocitos y ciertos epitelios, en donde se asocia la activación de ejecutores de muerte, principalmente caspasas. Bioquímicamente, la cornificación se asocia con la síntesis de enzimas y sustratos requeridos para la formación del estrato córneo. En resumen, este proceso de muerte se caracteriza por estar restringido a

queratinocitos, estar funcionalmente asociado a la generación del estrato córneo de la epidermis y puede ser alterado, aunque no bloqueado, por la inhibición de transglutaminasas o caspasa-14 (Galluzzi et al. 2012, Kroemer et al. 2009).

2.12 ANATOMÍA CELULAR DEL CÉRVIX

El cuello uterino (cérvix) es el tejido que va desde el útero hasta el interior de la vagina. En condiciones normales, el cérvix está cubierto en su superficie externa por un epitelio escamoso estratificado y sin queratina. Este es continuo en la parte baja del epitelio que recubre la vagina y por arriba se continúa sobre la mucosa del epitelio columnar recubriendo el canal endocervical y sus criptas asociadas. Durante la pubertad, el embarazo y en algunas usuarias de anticonceptivos esteroideos, los cambios en el tamaño y la forma del cérvix resulta en una unión escamo-columnar que se continúa anatómicamente sobre el ectocérvix. Este proceso fisiológico expone a los tejidos previamente encontrados en el canal bajo endocervical hacia la vagina y entonces, el tejido forma un “cérvix ectópico”. La mayoría de neoplasias cervicales intraepiteliales (NCI) y carcinomas invasivos provienen del epitelio que cubre la región ectópica. Bajo condiciones fisiológicas, el epitelio columnar de la región ectópica sufre metaplasia hacia un epitelio escamoso estratificado. Es durante este proceso que el epitelio parece ser particularmente vulnerable a virus oncogénicos y probablemente a otros factores que llevan al desarrollo de una neoplasia intraepitelial más que hacia un epitelio normal. La neoplasia intraepitelial puede ser de tipo celular escamoso o columnar (Arends et al. 1998).

2.13 CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

El cáncer cervical o cáncer cérvico-uterino (CaCu) es uno de los cánceres más comunes en mujeres de todo el mundo y se forma en los tejidos del cérvix o cuello del útero, es decir, el pasaje que conecta al útero con la vagina (Figura 7). Cuando el cáncer se ha diseminado desde la superficie del cérvix hacia tejidos más internos del éste o hacia otras partes del cuerpo se le llama *cáncer cervical invasor* y cuando ha regresado después de un tiempo durante el cual no podía ser detectado, se le llama *cáncer cervical recurrente*. El cáncer puede volver al mismo lugar del tumor original (primario) o a otra

parte del cuerpo (NCIUS).

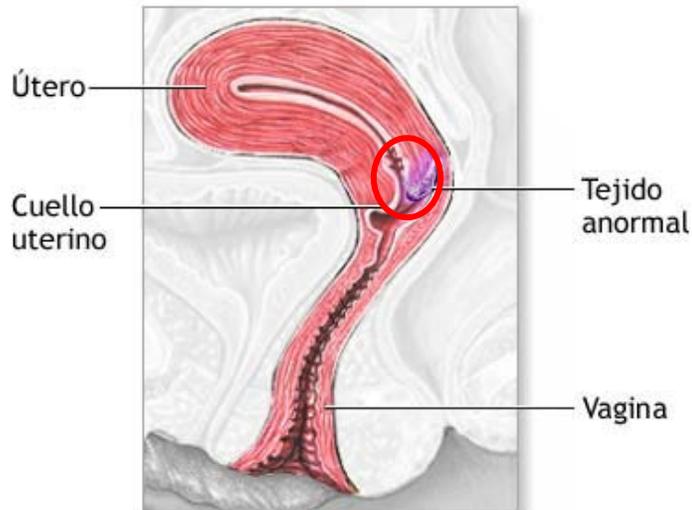


Figura 7. Aspecto transversal del aparato reproductor femenino. Se señala en un círculo el sitio de inicio del cáncer cérvico-uterino.

2.13.1 Neoplasia cervical intraepitelial (NCI)

El desarrollo de la enfermedad involucra cambios reversibles en el tejido cervical que llevan hacia diversas anomalías celulares y finalmente a cáncer. Las neoplasias y lesiones más frecuentes son los carcinomas de células escamosas y los adenocarcinomas, de donde los primeros son los más comunes (Kisseljev et al. 2008). De acuerdo al Instituto Nacional del Cáncer de Los Estados Unidos (NCIUS), el carcinoma de cuello uterino tiene sus orígenes en la unión escamosa columnar, ya sea en el canal endocervicouterino o en la porción cervicouterina. El CaCu se desarrolla a partir de una lesión precursora conocida como neoplasia cervical intraepitelial (NCI) (Whang and Lee 1997) que posteriormente puede convertirse en cáncer invasor, proceso que puede ser muy lento. Algunos estudios longitudinales han revelado que entre pacientes con cáncer del cuello uterino *in situ* que no han sido tratadas, entre el 30 y el 70% desarrollarán carcinoma invasor en un período de 10 a 12 años. Sin embargo, en alrededor del 10% de las pacientes, las lesiones pueden progresar de *in situ* a invasoras en períodos inferiores a un año. A medida que se hace invasor, el tumor irrumpe a través de la membrana basal e invade el estroma cervicouterino (NCIUS). La NCI es reconocida por disturbios en la maduración y estratificación celular, así como por la presencia de una citología atípica que

es generalmente clasificada de acuerdo al grado de maduración citoplásmica. Sin embargo, por definición, es necesaria la presencia de núcleos atípicos en todos los niveles del epitelio. Esto afecta la superficie epitelial y se extiende hasta las criptas basales (Arends et al. 1998).

En mujeres jóvenes, las NCI se presentan en el ectocervix; mientras que en mujeres de mayor edad, los tejidos que forman la región ectópica han bajado hacia el canal endocervical. Por lo tanto, en mujeres mayores, las NCI tienden a ser de más difícil acceso para toma de muestra para diagnóstico. La NCI se forma inicialmente en un área y si mediante cirugía se remueven los márgenes del tejido que están libres de la enfermedad, es probable que la lesión haya sido totalmente removida (Arends et al. 1998).

2.13.2 Clasificación de las NCIs

Las NCIs usualmente se dividen en tres grados según el grado de diferenciación:

NCI 1: Neoplasia cervical intraepitelial bien diferenciada. La maduración citoplásmica ocurre en los dos tercios superficiales del epitelio.

NCI 2: Neoplasia cervical intraepitelial medianamente diferenciada. La maduración citoplásmica empieza en el tercio medio del epitelio

NCI 3: Neoplasia cervical intraepitelial pobremente diferenciada. La maduración citoplásmica, que es mínima o ausente, ocurre solo en el tercio más superficial del epitelio.

La diferenciación de las neoplasias es raramente uniforme a lo largo del área afectada, la diferenciación más pobre tiende a reposar de manera adyacente hacia el epitelio columnar del canal endocervical. Para el diagnóstico de una NCI deben estar presentes algunas anomalías nucleares como alargamiento, pleomorfismo e hiperchromía en todos los niveles del epitelio incluyendo la capa basal. La hiperchromía no es un prerrequisito ya que algunas formas de NCI no tienen el núcleo profundamente. El grado de núcleos atípicos tiende a ser más grande en NCI 3 que en NCI 1. El número de mitosis normales varía y no afectan el diagnóstico, mientras que las mitosis atípicas deben estar presentes en todos los grados de NCI. Todos estos cambios se atribuyen a la presencia de infección por HPV (Arends et al. 1998).

La NCI es un crecimiento anormal y pre-canceroso de células escamosas en el cuello uterino. En la Figura 8 las imágenes representan la apariencia de tejido normal y

con neoplasia cervical intraepitelial (CIN por sus siglas en inglés) en los tres estadios. La mayoría de los casos permanecen estables y son eliminados por el sistema inmune del individuo sin intervención médica. Sin embargo, un pequeño porcentaje de casos progresan a cáncer del cuello uterino. La causa principal de estas neoplasias es una previa infección en particular por las cepas oncogénicas de HPV. No es necesaria la progresión por todos los estados antes del desarrollo de cáncer, pues existen evidencias de que el cáncer cervicouterino puede ocurrir sin que haya una detectable progresión a lo largo de los tres estadios y que una neoplasia intraepitelial de alto grado puede ocurrir sin que primero haya existido como una lesión de bajo grado (Agorastos et al. 2005, Monnier-Benoit et al. 2006).

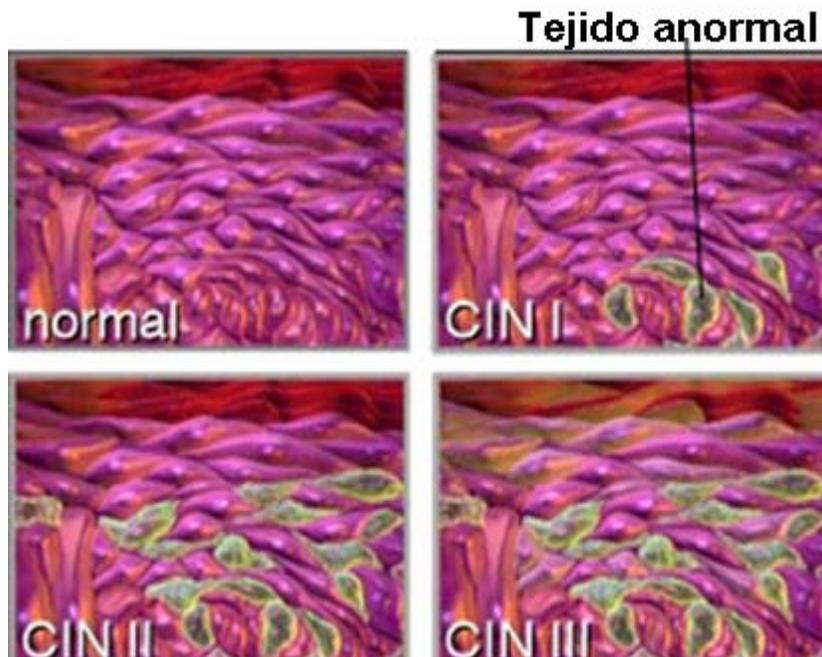


Figura 8. Etapas de la neoplasia cervical intraepitelial.

Además de la invasión local, el cáncer cérvico-uterino puede diseminarse por vía de los vasos linfáticos regionales o del torrente sanguíneo. La diseminación tumoral generalmente es una función de la extensión e invasión de la lesión local. A pesar de que, en general, el CaCu evoluciona de manera ordenada, ocasionalmente se puede presentar un tumor pequeño con metástasis distante. Por este motivo, se debe evaluar cuidadosamente a las pacientes en búsqueda de enfermedad metastásica (NCIUS).

2.13.3 Estadificación del Cáncer cervical

La estadificación quirúrgica antes del tratamiento es el método más preciso para determinar la extensión de la enfermedad (Gold et al. 2008). Los estadios se definen por clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) o por la clasificación TNM (Tabla 1) establecida en el año 2000 por el Comité Estadounidense Conjunto Sobre el Cáncer (AJCC) (Shepherd 1996).

Tabla 1. Estadificación del cáncer cervical			
Tumor primario (T)			
Categoría TNM	Clasif. FIGO	Subtipo TNM/FIGO	Definición TNM
TX			El tumor primario no puede ser evaluado
T0			No hay evidencia de tumor primario
Tis/0			Carcinoma <i>in situ</i>
T1	I		El carcinoma cervicouterino está estrictamente limitado al útero (no debe tenerse en cuenta la extensión al cuerpo)
		T1a/IA	Carcinoma invasor diagnosticado sólo mediante microscopía. Todas las lesiones visibles macroscópicamente—aún con invasión superficial—son T1b/1B. Invasión estromal con profundidad máxima de 5 mm medida desde la base del epitelio y expansión horizontal 7 mm o menos. Una invasión del espacio vascular, ya sea venosa o linfática, no afecta la clasificación
		T1a1/1a1	Invasión estromal 3 mm o más de profundidad y 7 mm o menos de extensión horizontal
		T1a2/1A2	Invasión estromal mayor de 3 mm y no mayor de 5 mm con expansión horizontal de 7 mm o menos
		T1b/1B	Lesión clínicamente visible confinada al cuello uterino o lesión microscópica >T1a/1A2
		T1b1/1B1	Lesión clínicamente visible 4 cm o menos en su mayor dimensión
		T1b2/1B2	Lesión clínicamente visible mayor de 4 cm en su mayor dimensión
T2	II		El carcinoma se ha extendido más allá del útero, pero no a la pared pélvica ni al tercio inferior de la vagina
		T2a/IIA	Tumor que no se ha extendido al parametrio
		T2b/IIB	Tumor que se ha extendido al parametrio
T3	III		Extensión a la pared pélvica o se extiende al tercio inferior de la vagina o causa hidronefrosis o disfunción renal
		T3a/IIIA	El tumor se ha extendido al tercio inferior de la vagina pero no se extiende a la pared pélvica
		T3b/IIIB	Diseminación del tumor a la pared pélvica o causa hidronefrosis o disfunción renal
T4	IVA		El tumor invade la mucosa de la vejiga o el recto o se extiende más allá de la pelvis misma (un edema de Bullar no es suficiente para clasificar un tumor como T4)
Ganglios linfáticos regionales (N)			
NX			Los ganglios regionales no pueden ser evaluados
N0			No hay metástasis de ganglios regionales
N1			Evidencia de metástasis de ganglios regionales
Metástasis a distancia (M)			
MX			La metástasis a distancia no puede ser evaluada
M0			No hay metástasis a distancia
M1	IVB		Existe metástasis a distancia

2.13.3.1 Definiciones de la Clasificación FIGO

2.13.3.1.1 Estadio I

El estadio I es el carcinoma estrictamente limitado al cérvix; no se debe tener en cuenta la extensión al cuerpo uterino.

- Estadio IA: Carcinomas invasivos sólo diagnosticados por microscopio. Todas las lesiones de gran magnitud aún con invasión superficial se consideran como cáncer en estadio IB. La invasión se limita a la invasión del estroma con una profundidad máxima de 5 mm* y no más de 7 mm de ancho. [*Nota: *la profundidad de la invasión debe ser 5 mm o menos desde la base del epitelio, ya sea que se origine en la superficie o en las glándulas. La invasión del espacio vascular, ya sea venoso o linfático, no debe alterar la clasificación.*]

- Estadio IA1: Invasión medida del estroma 3 mm o menos de profundidad y 7 mm o menos de diámetro.
- Estadio IA2: Invasión medida del estroma más de 3 mm pero 5 mm o menos de profundidad y 7 mm o menos de diámetro.

Estadio IB: Lesiones clínicas limitadas al cuello uterino o lesiones preclínicas de mayor extensión que el estadio IA.

- Estadio IB1: Lesiones clínicas 4 cm o menos de tamaño.
- Estadio IB2: Lesiones clínicas con tamaños mayores de 4 cm.

2.13.3.1.2 Estadio II

En el estadio II el carcinoma se extiende más allá del cérvix uterino, pero no se ha extendido a la pared pélvica. El carcinoma afecta la vagina, pero no llega a la sección tercia inferior.

- Estadio IIA: No hay complicación obvia del parametrio hasta dos tercios de la parte superior de la vagina se encuentran afectados.
- Estadio IIB: Complicación obvia del parametrio, pero sin llegar a la pared pélvica lateral.

2.13.3.1.3 Estadio III

El estadio III implica que el carcinoma se ha extendido a la pared pélvica o implica el tercio inferior de la vagina. Acorde al examen rectal, no hay espacio sin cáncer entre el

tumor y la pared pélvica. Se deben incluir todos los casos con hidronefrosis o con insuficiencia renal, a menos que se sepa que se deben a otras causas.

- Estadio IIIA: Sin extensión a la pared pélvica, pero sí al tercio inferior de la vagina.
- Estadio IIIB: Extensión a la pared pélvica, hidronefrosis o insuficiencia renal.

2.13.3.1.4 Estadio IV

El estadio IV implica que el carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis misma o ha afectado clínicamente la mucosa vesical o rectal.

- Estadio IVA: Propagación del tumor a órganos adyacentes a la pelvis.
- Estadio IVB: Propagación a órganos distantes.

2.13.4 Manifestaciones clínicas

Las mujeres con displasia o NCI de todos los grados son asintomáticas. Sin embargo, coexisten otras condiciones tales como un desgaste o erosión cervical que puede producir síntomas incidentales. En los cánceres invasivos, los dos síntomas predominantes son la descarga y el sangrado anormal vaginal y algunas pacientes se han quejado de la frecuencia y dolor al orinar (Souhami and Tobias 2005). Según el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCIUS por sus siglas en inglés), otras manifestaciones que se relacionan según el estadio clínico son:

- Sangrado vaginal anormal:

Sangrado que ocurre entre los períodos menstruales regulares

Sangrado después de relaciones sexuales, de un lavado vaginal o del examen pélvico

Períodos menstruales más prolongados y más abundantes que antes

Sangrado después de la menopausia

- Mayor secreción vaginal

- Dolor pélvico

- Dolor durante las relaciones sexuales

- Metrorragia (cualquier hemorragia vaginal procedente del útero, no asociada al ciclo menstrual)

- Salida involuntaria de orina o heces por la vagina

- Debilidad, pérdida de peso y anemia (González-Merlo et al. 2003).

2.13.5 Detección y diagnóstico

Los médicos recomiendan que las mujeres se realicen pruebas de Papanicolaou con regularidad a fin de ayudarse a detectar con tiempo el riesgo de padecer cáncer cervical. Una prueba de Papanicolaou (a veces llamada prueba de Pap o citología) es un procedimiento realizado en consultorio médico o en una clínica de salud durante un examen pélvico. Es un procedimiento mediante el cual se raspan células del cérvix para examinarlas al microscopio. Se usa para detectar cáncer y cambios que pueden resultar en cáncer. Esta prueba puede mostrar también estados no cancerosos, como infecciones o inflamación. El detectar y tratar las células anormales puede prevenir la mayoría de los cánceres cervicales. Además, la prueba de Pap puede detectar el cáncer que empieza, cuando hay más posibilidad de que el tratamiento sea eficaz. Para la mayoría de las mujeres, la prueba de Pap no es dolorosa y la misma muestra puede utilizarse para analizarla si existe infección de VPH.

Cuando se tienen resultados anormales de la prueba de Pap o de HPV, se sugiere la realización de otras pruebas para hacer un diagnóstico:

Colposcopia: El médico examina el cuello del útero o cérvix usando un colposcopio el cual combina una luz brillante con una lente de aumento para ver el tejido con más facilidad.

Biopsia: Consiste en la extracción de tejido con anestesia local. Un patólogo examina el tejido al microscopio para ver si hay células anormales. La biopsia puede obtenerse de distintas maneras:

Biopsia con sacabocados: Se utiliza un instrumento afilado para obtener muestras pequeñas de tejido cervical.

Escisión electroquirúrgica con asa: El médico usa un aro de alambre eléctrico para rebanar un pedazo delgado y redondo de tejido cervical.

Legrado o curetaje endocervical: Para esta técnica se emplea un raspador (un instrumento pequeño en forma de cuchara) para raspar una pequeña muestra de tejido del cérvix. Algunos médicos pueden usar un cepillo delgado y suave en lugar de un raspador.

Conización: La muestra de tejido que se extrae tiene forma de cono. Una conización

o biopsia de cono permite que el patólogo vea si las células anormales han invadido el tejido bajo la superficie del cérvix.

Al extraer tejido del cérvix se puede causar algo de sangrado u otro tipo de secreción. El sitio sana pronto generalmente. Algunas mujeres experimentan algo de dolor semejante a los calambres menstruales.

La obtención de imágenes por Resonancia Magnética (RM) no se emplean comúnmente para el diagnóstico de cáncer cervical, sin embargo, es importante su mención por la importancia para detectar sitios de metástasis. En este procedimiento se usan ondas de radio y un imán muy potente conectado a una computadora para crear imágenes detalladas de áreas internas del cuerpo. Estas imágenes pueden mostrar la diferencia entre el tejido normal y el tejido enfermo. La RM produce mejores imágenes de los órganos y del tejido blando que otras técnicas de exploración como la tomografía computarizada (TC) o la radiografía. La RM es especialmente útil para crear imágenes del cerebro, la columna vertebral, el tejido blando de las articulaciones y el interior de los huesos (NCIUS).

2.13.6 Etiología

En 1842, investigadores italianos reportaron escasos o nulos casos de cáncer cervical entre monjas católicas comparados con el resto de la población femenina italiana. Desde entonces, los epidemiólogos han reportado otras medidas de comportamiento sexual asociado con la incidencia de cáncer cervical, entre ellos el estatus marital, número de partos, edad de la primera relación sexual y número de parejas sexuales. Estos hallazgos condujeron a la búsqueda del agente sexualmente transmitido como causa de este tipo de cáncer. Sus teorías involucraron a la sífilis, la gonorrea, el virus del herpes y el virus de papiloma humano. En los 70's Harald zur Hausen postuló la participación y encontró ADN del virus de papiloma humano en cánceres cervicales. Una década después, su grupo de investigación fue el primero en aislar HPV-16 y HPV-18 (Haverkos 2004).

Es ampliamente conocido que algunos tipos específicos de virus de papiloma humano (HPV) son los agentes etiológicos principales tanto para el cáncer cervical como para sus precursores. A pesar de que el número de tipos de HPV son más de veinte, solo

ciertos tipos como el 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 56 y 58 son los altamente asociados al riesgo oncogénico con un alto grado de lesiones intraepiteliales y cáncer. Los HPV de alto riesgo oncogénico producen dos oncoproteínas designadas como E6 y E7, las cuales interactúan con proteínas endógenas reguladoras del ciclo celular, incluyendo p53 y Rb. La interacción de proteínas celulares endógenas y aquellas derivadas de virus converge en la desregulación en la progresión del ciclo celular y surge como punto crítico en el desarrollo de cáncer cervical. Un evento adicional que aparece jugando un papel en la progresión tumoral es la integración del ADN viral en el genoma del hospedero, lo cual frecuentemente perturba los marcos de lectura de E2. Esto resulta en la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 ocasionando inestabilidad genómica (Whang and Lee 1997).

En 1995, la Organización Mundial de la Salud (WHO) realizó un consenso para reunir una gran cantidad de datos biológicos y epidemiológicos con los que se concluyó que la infección con los HPV 16 y 18 es causa de cáncer cervical. Actualmente, los reportes indican que el HPV puede ser encontrado en 90-95% de los casos de cáncer cervical (Haverkos 2004).

Sin embargo, como la sola infección por HPV no es suficiente para la carcinogénesis cervical, la atención se ha dirigido sobre cofactores moleculares importantes en el proceso. Especialmente, varios tipos de alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores tienen un papel importante en la carcinogénesis del cáncer cervical.

Por otra parte, la co-carcinogénesis es un fenómeno causado por el efecto aditivo o sinérgico de dos o más agentes causantes de cáncer. Los oncólogos describen este fenómeno como una etiología compleja para el cáncer en un proceso de dos pasos: "Iniciación" y "Promoción" de los carcinógenos a la oncogénesis (Haverkos 2004).

Harald zur Hausen fue también el primero en reconocer que el virus del herpes simple-2 (HSV-2) y el HPV actúan de forma sinérgica para inducir el cáncer cervical (Haverkos 2004). Esta sinergia fue evaluada por el grupo de investigación de Hildesheim mediante el estudio de mujeres latinoamericanas con cáncer cervical invasivo. El estudio demostró un riesgo relativo al cáncer cervical de 1.2 en las mujeres que dieron positivo sólo para HSV-2. El riesgo relativo para las mujeres positivas para ADN de HPV 16/18 fue de 4.3, esto en comparación con aquellas que fueron positivas para HSV-2 y HPV 16/18

quienes presentaron un riesgo relativo de 8.8 al cáncer cervical. Lo cual sugirió la posible interacción biológica (Smith et al. 2002). Adicionalmente, el HSV-2 inactivado ha mostrado ser un factor transformante de células *in vitro*. Por lo que se sugirió que la infección por este virus puede iniciar mutaciones y carcinogénesis en células cervicales infectadas con HPV. HSV-2 ha sido encontrado en biopsias de entre un tercio y la mitad de pacientes con displasia o cáncer cervical pero no de forma consistente. Por ello se ha propuesto que HSV-2 actúa como un agente que causa cambios intracelulares sin que se requiera la retención de sus genes virales (Smith et al. 2002).

Diversos investigadores estadounidenses asociaron las duchas vaginales hechas con productos que contenían derivados de alquitrán o de carbón con el desarrollo de cáncer cervical, ya que el uso de ellas fue más común entre los casos de cáncer cervical que entre los controles; lo cual resultó en el retiro de las duchas vaginales con productos derivados del alquitrán y del carbón del mercado estadounidense (Haverkos 2004).

Fumar cigarrillos representa otra forma de exponerse a residuos de sustancias carcinógenas y éste hábito ha sido también asociado con el cáncer cervical. El humo del tabaco contiene y libera cerca de 4000 compuestos, algunos de los cuales son bien conocidos como carcinógenos tales como los bencil pirenos, compuestos policíclicos aromáticos y nitrosaminas. Uno de ellos es el NNK o 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona el cual se ha encontrado en la mucosa cervical de mujeres fumadoras en cantidades tres veces mayor que en la mucosa cervical de mujeres no fumadoras. El hallazgo de NNK en esta mucosa es probablemente el destino final del compuesto en la sangre. Pese a que fumar es un factor etiológico del cáncer cervical, no es el único necesario y parece ser un factor poco importante en estudios en países en desarrollo. En un estudio que abarcó 44 estados de Estados Unidos, 30 países de Europa y otros 74 en el resto del mundo se estableció una prevalente correlación entre el cáncer cervical y el hábito de fumar cigarrillos en países desarrollados. Sin embargo en África, donde los casos de cáncer cervical fueron mayores, los casos de fumadores fueron los más bajos. Esto estableció una correlación negativa entre el cáncer cervical y el hábito de fumar (Haverkos 2005). No obstante, el hábito de fumar sigue siendo importante en diversos tipos de cáncer, principalmente el de pulmón.

Otros compuestos derivados de alquitrán y del carbón que han sido asociados con

cáncer cervical como el factor más importante a escala global son aquellos carcinógenos generados por la quema de madera en estufas u hornos tradicionales. Es verosímil que la inhalación crónica de carcinógenos en el humo pudieran tener un efecto en la progresión del cáncer cervical, similar al observado por el humo del cigarro (Haverkos 2005).

2.13.7 Epidemiología

Las enfermedades oncológicas pertenecen a las causas líderes de muerte a nivel mundial, sobretodo en países en desarrollo. Reportes de la Organización Mundial de la Salud señalaron 7.6 millones de muertes por estas enfermedades en el 2008 y se calcula que aproximadamente 70% de esas muertes ocurrieron en países de bajo y mediano ingreso. Aproximadamente un 30% de dichas cantidades podría ser reducido si los casos fueran detectados y tratados en estadios tempranos, lo cual se ha demostrado con la mayor efectividad de los tratamientos en etapas iniciales. Cerca del 30% de las muertes por cáncer son debido a 5 principales hábitos de riesgo: Alto índice de masa corporal, bajo consumo de frutas y verduras, carencia de actividad física, uso de tabaco y consumo de alcohol. Muchos estudios se enfocan en la detección y localización de un tumor antes de la metástasis, ya que este proceso es la principal razón de muertes por cáncer; sin embargo, las muertes por cáncer siguen aumentando en todo el mundo y se estima cerca de 13.1 millones de muertes en el año 2030 (WHO, 2013).

A nivel mundial, los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon-recto, esófago y próstata son los más frecuentes en hombres. Mientras que en las mujeres los principales causantes de defunciones son los cánceres de mama, cérvico-uterino, pulmón, estómago y colon-recto (Garcia et al. 2007). En el caso de cáncer cérvico-uterino, la mayor incidencia está representada en países de medianos y bajos ingresos principalmente en América del Sur y África, seguidos por América Central, algunos países de África e India mientras que América del Norte y Europa son lugares con menor incidencia de este tipo de cáncer (Schiffman and Castle 2005) (Figura 9).

De acuerdo al INEGI, el cáncer representó la tercera causa de muerte entre las mujeres mexicanas en el 2007. Se reportaron 35,303 defunciones femeninas (15.4%), mientras que en los hombres fue la cuarta causa con 33,509 decesos (11.8%). Algunos tipos de cáncer se localizan de forma diferenciada en mujeres y hombres, ya sea por

factores biológicos o de riesgo, lo que influye en su prevalencia. En las mujeres los tres principales tipos de cáncer que causaron fallecimientos durante 2007 fueron: El de mama (13.8%), cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%); es importante señalar que si bien disminuyó el porcentaje de muertes por estos tipos de cáncer en comparación con 2006, se continúan manteniendo en los primeros lugares. En los hombres, el cáncer de próstata (15.7%), de tráquea, bronquios y pulmón (14%) y de estómago (9%) fueron las principales causas de muerte por neoplasias malignas durante 2007; al igual que en las mujeres, estas causas son similares a las de 2006, aunque el porcentaje de muertes que se les atribuyen ha disminuido. De acuerdo al volumen poblacional, 36 de cada 100 muertes son debidas a tumores malignos principalmente en cuatro entidades: Distrito Federal (10.7%), Estado de México (10.6%), Veracruz (7.8%) y Jalisco (7.3%) (INEGI Report).

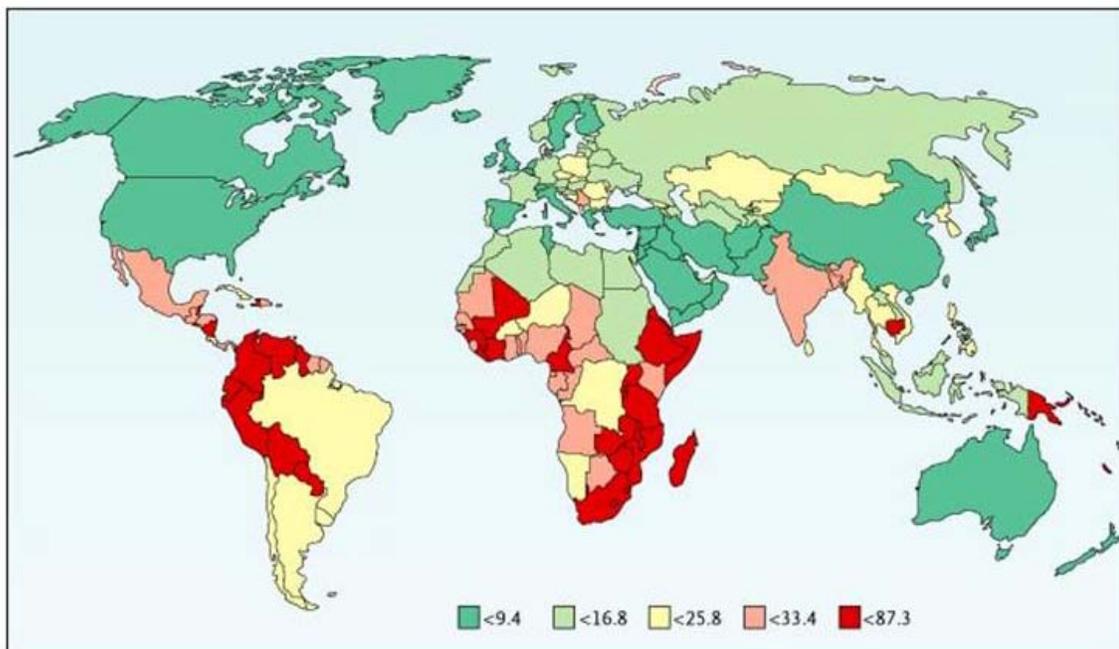


Figura 9. Epidemiología del CaCu a nivel mundial. Número de casos de incidencia por cada 100,000 mujeres.

El uso de la citología cérvico-vaginal convencional ha logrado reducir de manera importante la mortalidad por este tipo de cáncer en países desarrollados, pero en América Latina mueren alrededor de 32,000 mujeres cada año pese a la disponibilidad de la prueba (Almonte et al. 2010).

En México, en general, también se ha detectado una disminución en la mortalidad

por cáncer cervical. Con el objetivo de elucidar los factores que han contribuido a esta reducción, el grupo de Lazcano-Ponce (Lazcano-Ponce et al. 2008) realizó una correlación mediante regresión lineal de los indicadores nacionales de mortalidad por este tipo de cáncer, cobertura de pruebas de diagnóstico (Pap), nacimientos y producto interno bruto. Sus resultados dieron una correlación positiva entre el incremento de cobertura de diagnóstico y disminución en el número de nacimientos con una disminución de casos de cáncer cervical. También encontraron que las mujeres de las áreas central y principalmente el sur del país tienen un riesgo mayor que aquellas que viven en la zona norte de México (Figura 10). Así también, que existe una alta incidencia de falsos negativos en el diagnóstico (3.33 a 53.13%); por lo que recomiendan la acreditación de laboratorios de citología cervical para mejorar la precisión del diagnóstico.



Figura 10. Epidemiología del CaCu en México. Taza Estandarizada de Mortalidad debida a cáncer cérvico-uterino por cien mil mujeres y generalizada por regiones.

2.13.8 Terapéutica

Las estrategias terapéuticas comúnmente usadas para el tratamiento de enfermedades oncológicas son cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia. Aproximadamente el 50% de los pacientes diagnosticados con cáncer se recuperan de la enfermedad a través de alguno de estos métodos o mediante la combinación de ellos

(Martínez, 2003).

Las mujeres con cáncer cervical tienen muchas opciones de tratamiento. Las opciones comúnmente usadas para el cáncer cervical son la cirugía, radioterapia, quimioterapia o una combinación de métodos. La selección de tratamiento depende principalmente del tamaño del tumor y de si el cáncer se ha diseminado, aunque también puede depender de si existe un embarazo o la paciente planea embarazarse en el futuro. Se recomienda consultar a un especialista ginecólogo oncólogo, es decir un cirujano que se especializa en tratar cáncer en la mujer. Dado que los tratamientos del cáncer frecuentemente dañan células y tejidos sanos, los efectos secundarios son comunes y pueden no ser los mismos para cada persona.

2.13.8.1 Cirugía

La cirugía es una opción para las mujeres con estadio I o II de cáncer cervical. El cirujano extirpa el tejido que puede contener células cancerosas:

Cervicectomía uterina radical: El cirujano extirpa el cérvix, parte de la vagina y los ganglios linfáticos en la pelvis. Esta opción es para pocas mujeres que tienen pequeños tumores y que quieren intentar quedar embarazadas más adelante.

Histerectomía total: El cirujano extirpa el cérvix y el útero.

Histerectomía radical: El cirujano extirpa el cérvix, parte del tejido alrededor del cérvix, el útero y parte de la vagina.

Ya sea con la histerectomía total o con la radical, el cirujano puede extirpar otros tejidos.

Trompas de Falopio y ovarios: El cirujano puede extirpar tanto las trompas de Falopio como los ovarios. Esta cirugía se llama salpingooforectomía.

Ganglios linfáticos: El cirujano puede extirpar los ganglios linfáticos cercanos al tumor para ver si tienen cáncer. Si las células cancerosas se diseminaron a los ganglios linfáticos, esto significa que la enfermedad puede haberse diseminado a otras partes del cuerpo.

Después de una cervicectomía uterina radical, algunas mujeres tienen problemas de vejiga durante unos pocos días. La estancia en el hospital generalmente es de 2 a 5 días.

Con la histerectomía, la duración de la estancia en el hospital puede variar de varios

días a una semana. Es común sentir debilidad y cansancio por algún tiempo. También es posible tener problemas de náuseas y vómitos, así como de vejiga y de intestino. La mayoría de las mujeres vuelven a sus actividades normales de 4 a 8 semanas después de la cirugía. Después de este tratamiento, las mujeres ya no tienen período menstrual y no pueden quedar embarazadas.

Cuando se extirpan los ovarios, la menopausia aparece de inmediato. Los sofocos o bochornos y otros síntomas de la menopausia causada por la cirugía pueden ser más graves que los producidos por una menopausia natural. Se ha demostrado que algunos medicamentos ayudan con estos síntomas y pueden ser más eficaces si se comienzan a tomar antes de la cirugía (NCIUS, 2011).

2.13.8.2 Radioterapia

La radioterapia (llamada también terapia de radiación) es una opción para mujeres en cualquier estadio del cáncer cervical. Las mujeres en una etapa temprana de cáncer cervical pueden elegir terapia de radiación en vez de cirugía. Esta terapia también puede usarse después de la cirugía para destruir cualquier célula cancerosa que pudiera quedar en el área. Las mujeres con cáncer que se extiende más allá del cérvix pueden recibir radioterapia o quimioterapia. La terapia de radiación usa rayos de alta energía para eliminar las células cancerosas y afecta únicamente las células en la parte tratada.

Los médicos usan dos tipos de radioterapia para tratar el cáncer cervical. Algunas mujeres reciben ambos tipos de terapia:

Radioterapia externa: Una máquina grande dirige la radiación hacia la pelvis u otros tejidos donde se ha diseminado el cáncer. El tratamiento se administra ordinariamente en un hospital o clínica. Se puede recibir radiación externa 5 días a la semana durante varias semanas y cada tratamiento se lleva sólo unos pocos minutos.

Radioterapia interna: Se coloca un tubo delgado dentro de la vagina. El tubo contiene un material radiactivo. Es probable que la paciente necesite permanecer en el hospital mientras tiene colocada la fuente radiactiva (hasta 3 días) o bien, la sesión de tratamiento puede durar sólo unos pocos minutos. Una vez que se retira la sustancia radiactiva, no queda radioactividad en el cuerpo. La radiación interna puede repetirse dos o más veces durante varias semanas.

Los efectos secundarios de la radioterapia dependen principalmente de cuánta radiación se administra y de la parte del cuerpo que recibe el tratamiento. La radiación en el abdomen y pelvis puede causar náuseas, vómitos, diarrea, problemas urinarios y puede perderse el vello del área genital. Además, la piel de la parte tratada puede enrojecerse, researse y hacerse sensible. La paciente puede experimentar sequedad, comezón o ardor en la vagina. Es posible que el médico recomiende esperar a tener relaciones sexuales hasta que transcurran unas pocas semanas después que finalice el tratamiento de radiación.

Es probable sentir mucho cansancio durante la radioterapia, especialmente en las últimas semanas del tratamiento. El descanso es importante, pero los médicos generalmente aconsejan a sus pacientes que traten de estar tan activas como sea posible. Aunque los efectos secundarios de la terapia con radiación pueden causar molestias, éstos se pueden tratar o controlar.

Otro efecto secundario duradero es que la radioterapia dirigida al área pélvica puede dañar los ovarios. Generalmente se detienen los períodos menstruales y las mujeres padecen bochornos y resequedad vaginal. En las mujeres más jóvenes hay más probabilidad de que vuelva el período menstrual. Las mujeres que quieran quedar embarazadas después de la radioterapia deberán preguntar a su equipo de atención médica sobre cómo preservar sus óvulos antes de comenzar la terapia con radiación.

2.13.8.3 Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. Los fármacos para el cáncer cervical se suelen inyectar por vía intravenosa. Es posible recibir la quimioterapia en una clínica, en el consultorio del médico o en casa, pero algunas mujeres pueden necesitar permanecer en el hospital para el tratamiento. La quimioterapia generalmente se combina con radioterapia para el tratamiento del cáncer de cérvix y cuando el cáncer se ha diseminado a otros órganos, se puede usar sólo la quimioterapia.

Los efectos secundarios dependen principalmente de los fármacos que se usan y de la dosis. La quimioterapia destruye células cancerosas que crecen con rapidez, pero los fármacos pueden también dañar las células normales que se dividen con rapidez, tales como:

Glóbulos de la sangre: Cuando la quimioterapia hace bajar las concentraciones de glóbulos de la sangre sanos, se tienen más probabilidades de contraer infecciones, de magullarse o de sangrar con facilidad y puede sentirse mucha debilidad y cansancio. El equipo de atención médica realizará análisis de sangre para vigilar las concentraciones bajas de glóbulos de la sangre. Si las concentraciones están muy bajas, se puede detener la quimioterapia por un tiempo o reducir la dosis del fármaco. Existen además medicamentos que pueden ayudar a que el cuerpo produzca glóbulos nuevos.

Células en las raíces del pelo: La quimioterapia puede causar la pérdida del pelo. El cabello generalmente volverá a crecer al finalizar el tratamiento, pero es posible que sea diferente en color y textura.

Células que revisten el aparato digestivo: La quimioterapia puede causar falta de apetito, náuseas y vómitos, diarrea o llagas en la boca y labios. El equipo de atención médica puede suministrar medicamentos y sugerir otras formas de controlar estos efectos.

Otros efectos secundarios pueden incluir salpullido en la piel, hormigueo o adormecimiento de las manos y pies, problemas auditivos, pérdida del equilibrio, dolor en las articulaciones, hinchazón de piernas y pies. La mayoría de ellos desaparecen cuando termina el tratamiento (NCIUS, 2011).

Para algunos tipos de cáncer, la quimioterapia es la única terapia efectiva porque ésta distribuye el fármaco a través del sistema circulatorio (Martínez, 2003). Sin embargo, una complicación grave en el tratamiento anti-cáncer con quimioterapia es una respuesta terapéutica inadecuada, la cual es causada por la resistencia del organismo a los fármacos empleados. Por ello, la resistencia es uno de los motivos que promueven la búsqueda de nuevos compuestos efectivos contra células tumorales de origen tanto natural como sintético (Letasiova et al. 2006).

En el cáncer cervical localizado, la quimioterapia con *cis*-Platino aún representa la mejor opción de tratamiento pese a que usualmente resulta en una toxicidad excesiva y corta duración de la respuesta. Nuevos agentes quimioterapéuticos usados ampliamente en otros tipos de cáncer han sido empleados en combinación con *cis*-Platino en el tratamiento de cáncer cervical mejorando su eficacia como agentes solos. Sin embargo, la toxicidad sigue siendo el factor limitante en el caso de pacientes previamente irradiados o tratados con otros agentes (Savarese and Cognetti 2003).

2.14 PROPIEDADES DE LOS PRINCIPALES TIPOS DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

En la quimioterapia, los compuestos generalmente empleados para el tratamiento de enfermedades neoplásicas pueden ser clasificados en varios grupos.

Antimetabolitos: Entre ellos se encuentra el 5-fluorouracilo, el cual es un análogo de fluoropirimidina que afecta de manera negativa la síntesis de ADN y ARN en el nucleósido pirimidina. Gemcitabine es otro análogo sintético de pirimidina con el mismo efecto anterior y el metotrexato que inhibe a la dihidrofolato reductasa y por lo tanto agota el folato reducido de la célula, el cual se requiere para la síntesis de ADN.

Agentes alquilantes: Estos incluyen al melfalán y a la ciclofosfamida, la cual está químicamente relacionada a compuestos del gas mostaza pero con nitrógeno en vez de sulfuro. En el hígado, la ciclofosfamida es convertida a los metabolitos activos aldofosfamida y fosforamida uniéndose al ADN e inhibiendo la replicación de éste e iniciando la muerte celular.

Antraciclinas: Estos agentes terapéuticos se basan en compuestos de tetrahidronaftacenediona. Inhiben la síntesis de ADN y ARN por la intercalación entre los pares de bases de las cadenas nucleotídicas; por lo tanto previenen la replicación de las células en crecimiento rápido. Estos compuestos también crean especies reactivas de oxígeno mediadas por hierro que dañan al ADN y a las membranas celulares.

Inhibidores de ADN metiltransferasas: El 2'-deoxi-5-azacitidina (DAC) es un análogo químico del nucleótido citidina. Este se incorpora en el ADN o ARN e inhibe a la metiltransferasa de ADN. Por lo tanto, causa demetilación, lo cual a su vez conduce a la reactivación de genes silenciados, incluyendo genes supresores de tumores.

Compuestos del platino: Éstos incluyen al *cis*-Platino y al oxaliplatino. El segundo es un agente activo contra el cáncer de colon y actúa de manera sinérgica con el 5-fluorouracilo. Derivados activos del oxaliplatino forman tanto inter como intra cruzamiento de cadenas de ADN y platino, lo que resulta en la inhibición de la replicación y transcripción del ADN.

Agentes contra el huso mitótico: Entre ellos se encuentran los taxanos Paclitaxel (Taxol de Bristol-Myers Squibb) y el Docetaxel (Taxotere de Sanofi-Aventis). Su mecanismo principal es la estabilización del enlace tubulina-GDP en los microtúbulos. Los microtúbulos son esenciales para la división celular y los taxanos detienen este proceso. Al contrario de los

taxanos, los alcaloides de vinca destruyen los husos mitóticos (Zitvogel et al. 2008).

2.15 VACUNA CONTRA EL VPH

Considerando que el virus de papiloma humano ha sido reconocido como el agente etiológico principal para el cáncer cervical y su infección como la causa líder de muertes por cáncer en todo el mundo, en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones que contribuyen a documentar los mecanismos moleculares de la transformación maligna y la persistencia del virus. El entendimiento claro de la epidemiología molecular de HPV y la disponibilidad actual de técnicas de diagnóstico molecular han provisto la base para estrategias de prevención de infecciones por HPVs relacionados a carcinomas e incluso han sido desarrolladas las primeras vacunas altamente efectivas. Sin embargo, las investigaciones continúan en torno a estudios inmunológicos sobre la virología y epidemiología molecular de las infecciones por HPV con el objetivo de erradicar a estos importantes patógenos humanos (Menzo et al. 2007) y en consecuencia, al cáncer cervical.

Hace no más de una década, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) aprobó dos vacunas que previenen la infección por VPH para su introducción al mercado. Esto con el objetivo de prevenir el cáncer de cuello uterino. La primer vacuna, Gardasil[®], es una vacuna cuadrivalente que protege contra los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18 producida por Merck. La segunda, Cevaxix[®], es una vacuna bivalente dirigida específicamente contra los VPH tipos 16 y 18 que son los de alto riesgo y causantes de la mayoría (70%) de los casos de cáncer cérvico-uterino. Ambas vacunas tienen su origen basado en tecnología desarrollada en parte por científicos del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, que forma parte de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y que a su vez, otorgó la licencia de la tecnología para la producción y distribución de tales vacunas (Koutsky et al. 2002).

Gardasil[®] tiene ventaja sobre Cevaxix[®] por la protección adicional contra dos tipos de VPH causantes de verrugas genitales; sin embargo, se considera que un 10% de casos de verrugas genitales no se evitarán con esta vacuna. La aplicación de las vacunas contra VPH no garantiza la protección completa contra infecciones persistentes ni contra otros tipos de VPH. Las vacunas tampoco tratan una infección de VPH ya establecida ni impiden

otras enfermedades de transmisión sexual, pero su importancia radica en el potencial de reducir hasta en dos terceras partes el número de muertes por CaCu en todo el mundo, si todas las mujeres se vacunaran y si el efecto de protección es a largo plazo. Por ello se continúan realizando estudios para establecer las dosis adecuadas y posibles dosis de refuerzo que puedan mantener la efectividad de la vacuna durante varios años (Steinbrook 2006).

Sin embargo, aún cuando ya se tienen disponibles en el mercado estas vacunas para prevenir el cáncer cérvico-uterino, la búsqueda de nuevos compuestos con acción antitumoral continúa para el tratamiento de éste y todos los tipos de cáncer en los casos donde ya se han establecido. Para ello se hace uso de metodologías y materiales tradicionales como el uso de infusiones y extractos de plantas; o novedosos, como el diseño de compuestos mediante programas computacionales.

2.16 DISEÑO DE FÁRMACOS *in silico*

El término *in silico* es una expresión relativamente nueva acuñada para describir algo hecho por computadora o mediante simulación computacional, ya que hace referencia al silicio del que están hechos los semiconductores que permiten el almacenamiento de información. Este vocablo se usó por primera vez para especificar que ciertos experimentos biológicos habían sido llevados a cabo enteramente en un procesador y actualmente ya es un término universal referenciado en libros y revistas especializadas (Miramontes 1992).

Los métodos *in silico* se usan para la validación de técnicas, diseño de nuevas moléculas y predicción de los efectos biológicos de compuestos en la salud humana, sobretodo su toxicidad. De esta manera, se reducen los gastos que implica evaluar la toxicidad de numerosos compuestos en estudios *in vitro* e *in vivo* enfocándose sólo en aquellos que han sido seleccionados mediante estas metodologías, aún antes de su síntesis (Dearden 2003). Los toxicólogos también aprovechan las bases de datos públicas para explicar funciones biológicas a nivel molecular utilizando programas bioinformáticos con los que pueden detectar y cuantificar rápidamente secuencias expresadas y así predecir genes blanco y su modo de regulación, o bien, descubrir biomarcadores, genes pronósticos o de diagnóstico y hasta perfiles de expresión (Fielden et al. 2002). Por ello,

es importante considerar que estas nuevas tecnologías son herramientas útiles y que gracias a ellas se han descubierto nuevos fármacos como se verá más adelante, y es así también como se han desarrollado los compuestos evaluados en este trabajo.

3.0 ANTECEDENTES

3.1 COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS

3.1.1 Heterocíclicos

Los compuestos heterocíclicos son aquellos en donde al menos dos de los elementos que constituyen un anillo son distintos, a diferencia de los homocíclicos donde todos los elementos son del mismo tipo. Los compuestos heterocíclicos pueden ser inorgánicos, pero la mayoría de ellos contiene por lo menos un carbono y se clasifican de acuerdo a su estado de saturación y el número de heteroátomos. Las piperidinas son compuestos con un anillo de seis miembros, saturados y con un solo heteroátomo que es Nitrógeno. Las morfolininas también contienen al menos un anillo de seis miembros y son saturadas, pero la diferencia es la presencia de dos heteroátomos, Oxígeno y Nitrógeno (Figura 11) (Sainsbury 2002).

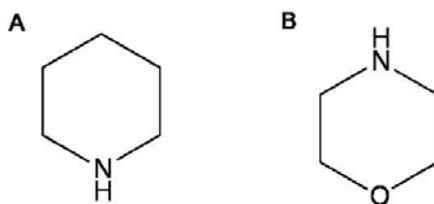


Figura 11. Estructura de los heterociclos A) piperidina y B) morfolina.

Muchos compuestos heterocíclicos son producto de la biosíntesis en plantas y animales y generalmente son metabolitos biológicamente activos. Algunos ejemplos son las toxinas que producen algunas plantas y que alejan a los depredadores o los pigmentos que exhiben algunos animales para atraer pareja o las plantas para atraer polinizadores (Sainsbury 2002).

Los heterocíclicos se encuentran en todos los tipos de compuestos orgánicos y se usan en diversas áreas de la vida cotidiana como óptica, electrónica, biología y farmacología. Colorantes, pesticidas, herbicidas y muchos medicamentos naturales son heterocíclicos (entre ellos la morfina) y casi todos los fármacos sintéticos conocidos también lo son (tales como diazepam, metronidazol, barbitúricos, captopril y metotrexato)

(Dua et al. 2011). Ejemplos de heterocíclicos esenciales para la vida son el grupo heme y sus derivados en la sangre, la clorofila indispensable para fotosíntesis en las plantas, las bases que componen a los ácidos nucleicos ADN y ARN y los azúcares que, al combinarse con fosfatos, otorgan la columna estructural que determina la topología de los ácidos nucleicos (Sainsbury 2002).

Por otra parte, todos los procesos biológicos en los organismos dependen de reacciones químicas en las que participan muchos compuestos heterocíclicos como vitaminas, enzimas, coenzimas, ATP, serotonina y ácidos nucleicos. Esto es porque los heterocíclicos pueden comportarse como ácidos o bases dependiendo del pH, interaccionar con agentes electrofílicos o nucleofílicos, ser oxidados o hidrogenados, producir complejos estables con iones metálicos y así participar en un amplio rango de tipos de reacciones. Además de los heterocíclicos naturales, muchos heterocíclicos sintéticos tienen un amplia distribución con uso terapéutico como antibacterianos, antifúngicos, antivirales, analgésicos, antiinflamatorios, relajantes musculares, anticonvulsivantes, inhibidores de peroxidación lipídica, antidepresivos, antihelmínticos y antitumorales, entre muchas otras aplicaciones importantes no farmacéuticas (Sainsbury 2002).

La mayoría de fármacos citostáticos o antineoplásicos interfieren con el proceso de división celular (mitosis) para matar selectivamente a las células que están en proliferación acelerada. Esto lo hacen mediante diversos mecanismos de acción tal como la inhibición de la síntesis de ADN. Los heterocíclicos antineoplásicos conocidos generalmente pertenecen a los agentes alquilantes (mostaza nitrogenada, bendamustina y uramustina) o a alguna de las tres clases de antimetabolitos: i) Análogos de purina (cladridina y mercaptopurina), ii) Análogos de pirimidina (5-fluorouracilo, azatioprin y azacitidina) y iii) Antifolatos (aminopterina y pemetrexed) (Dua et al. 2011). Actualmente existen varias referencias de nuevos heterocíclicos sintéticos del tipo piperidinas y morfolinas que confirman el potencial antineoplásico de este tipo de compuestos y a continuación se mencionan algunos de ellos.

3.1.2 Estudios de compuestos del tipo piperidínicos

Investigadores de la República Checa y España, Kasparkova y colaboradores en el 2003 evaluaron varios aspectos moleculares de complejos de platino con ligandos de piperidina. Las células empleadas fueron HeLa, CHO AA8 y CH1cisR, la primera proveniente de carcinoma cervical y las segundas son modificaciones de la línea original CHO proveniente de ovario de hámster sano, siendo la última una selección de clonas sensibles a un análogo de *cis*-Platino. Sus resultados indican que la sustitución de un grupo amino con una piperidina incrementa el potencial citotóxico y reduce la cantidad de platino acumulado en las células, lo cual es uno de los fenómenos asociados con la toxicidad de este tipo de fármacos antineoplásicos. Los compuestos fueron capaces de unirse al ADN formando aductos y causando efecto en eventos celulares consecuentes como el reconocimiento por proteínas de reparación (Kasparkova et al. 2003b).

En el Reino Unido y Nueva Zelanda, Pors y colaboradores en el 2006 estudiaron la citotoxicidad *in vitro*, el efecto como alquilantes y otros análisis de estructura-actividad de cloroetilamino-antraquinonas con anillos de piperidinil y pirrolidinil en las células de cáncer de ovario A2780 y las variantes AD resistente a doxorubicina y Cp70 resistente a *cis*-Platino. El mejor valor de IC₅₀ que obtuvieron fue menor a 40 nM y los valores obtenidos en el panel de líneas celulares del NCIUS fluctúan desde 96 hasta 182 nM. Los autores encontraron que existe interacción de sus moléculas con el ADN en concentraciones entre 0.01 y 10 μM pero no inducen el desenrollamiento de esta macromolécula (Pors et al. 2006).

En un trabajo que involucra investigadores de Israel, Palestina, República Checa y España, Najajreh y colaboradores, también en el 2006, realizaron la síntesis, caracterización y estudios *in vitro* e *in vivo* de varios complejos de *trans*-Platino con ligandos piperidino-piperidinas. Las células utilizadas en ambos modelos fueron de cáncer de ovario (A2780 y A2780cisR) y de colon (C-26). En la línea A2780, los complejos *trans*-[PtCl₂(Am)(pip-pip)]·HCl fueron citotóxicos con valores de IC₅₀ en el rango de 15-30 μM siendo más potentes que la molécula base *trans*-Platino, pero menos efectivos que el *cis*-Platino. Casi todos los complejos bisustituidos fueron mucho más activos contra la línea resistente A2780cisR que contra otras dos líneas resistentes CH1cisR y 41McisR (líneas immortalizadas de ovario de hámster resistentes a *cis*-Platino). En el modelo *in vivo* se

manejaron grupos a los que inyectaron células A2780 o C-26. Los compuestos sintetizados fueron significativamente menos tóxicos que *cis*-Platino aunque también menos efectivos para inhibir el crecimiento tumoral (Najajreh et al. 2006).

En colaboración de USA y Taiwan, Yang y colaboradores en el 2009 sintetizaron y evaluaron 19 análogos de tiloforina basados en fenantreno con diversos grupos funcionales de piperidina *in vitro* y en estudios mecanísticos. Los compuestos mostraron actividad inhibidora de la proliferación celular sobre cultivos de células tumorales nasofaríngeas (KB y KBvin), de pulmón (A549) y de próstata (DU145) con valores de IC₅₀ entre 0.08 y 18.09 μ M. Los autores señalan que el efecto citotóxico e inhibidor del crecimiento tumoral de estos compuestos se lleva a cabo a través de la activación de la proteína Akt, que participa en la proliferación celular y se encuentra mutada y sobreexpresada en células tumorales (Yang et al. 2009).

3.1.3 Estudios de compuestos del tipo morfolínico

En Japón, Iimura y colaboradores en el 2001 evaluaron la actividad citotóxica de compuestos análogos del docetaxel (deoxi-morfolinoetil) en células humanas de cáncer de pulmón PC-6, PC-12 y PC-6/VCR29-9 con la técnica de MTT. El rango de las concentraciones que inhibieron el 50% de la proliferación celular fluctuó de 0.26 a 40.4 ng/ml, lo cual indica su potencial antitumoral. Los mismos compuestos fueron evaluados *in vivo* sobre un modelo de tumores inducidos en ratones con células de melanoma B16 y BL6. Uno de los compuestos fue efectivo en inhibir el crecimiento del tumor a dosis de 112.5 mg/kg por vía oral y 75 mg/kg por vía intravenosa. Cuando la dosis efectiva del compuesto de referencia docetaxel para obtener el mismo efecto fue de 800 mg/kg (Iimura et al. 2001).

En Hungría, Hollosy y colaboradores en el 2002 estudiaron el efecto de las cetonas de Mannich con sustituyentes de los tipos morfolinil, pirrolidin y piperidil sobre células de adenocarcinoma humano A431 con la técnica de MTT. Ellos encontraron que sus compuestos tienen efecto inhibidor de la proliferación celular y que ésta es proporcional a la lipofilicidad de las moléculas. Este mismo efecto se manifestó al inducir apoptosis sobre las mismas células evaluando laminillas teñidas con hematoxilina-eosina, así como células

en suspensión tratadas con naranja de acridina y bromuro de etidio para su posterior observación en microscopio de fluorescencia (Hollosy et al. 2002).

En un trabajo en colaboración de Tailandia y Japón, Sutornchashwej y colaboradores en el 2005 evaluaron un análogo de morfolina y el extracto con acetato de etilo de *Bursatella leachii* sobre células KB (carcinoma epidermoide humano de nasofaringe), NCI-H187 (cáncer de células pequeñas de pulmón) y BC (células de cáncer de mama) empleando la técnica de SRB. Sus resultados de citotoxicidad arrojaron valores de ED₅₀ entre 0.86 y 1.20 µM. Los compuestos estimularon el ensamblaje de actina y mostraron actividad fungicida, aunque fueron inactivos en ensayos *in vitro* anti-malaria y anti-tuberculosis (Suntornchashwej et al. 2005).

En 2010, Venkatesan y colaboradores reportaron la síntesis de una serie de derivados de bis(morfolino-1,3,5-triazina), de las cuales, el compuesto 1-(4-[[4-(dimetilamino)piperidin-1-yl]carbonyl]fenil)-3-[4-(4,6-dimorfolin-4-il-1,3,5-triazin-2-il)fenil]urea (PKI-587) es un potente inhibidor de la vía de señalización fosfatidilinositol-3-quinasa. PKI-587 disminuyó la sobrevivencia y proliferación de las células tumorales modificadas MDA-361 y PC3MM2 de cáncer de mama y próstata, respectivamente y además tuvo importante actividad en la regresión de tumores en un modelo xenográfico con células MDA-361 (Venkatesan et al. 2010).

3.1.4 Compuestos de la serie LQM300

Los heterocíclicos evaluados en el presente trabajo se sintetizaron en el Laboratorio de Química Medicinal de la FESC-UNAM. Entre diversas series de compuestos de nueva síntesis, se estudiaron algunos de la denominada serie LQM300, cuya síntesis se realizó por el método de sustitución electrofílica aromática vía base de Mannich irradiando con luz infrarroja en ausencia de disolventes. La purificación de cada uno de ellos se realizó mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel como fase estacionaria y gradiente de hexano-acetato de etilo como fase móvil, agrupando las fracciones con base en los resultados obtenidos en cromatografías de capa fina (Velázquez et al. 2006). Los efectos cardiovasculares de algunos compuestos de esta serie fueron evaluados en ratas normotensas e hipertensas por Velázquez y colaboradores en 2008 comparándolos con los fármacos captopril, losartán y omapatrilat. Los resultados mostraron que, al menos dos

de los compuestos, tuvieron importante efecto al disminuir la presión arterial promedio así como las diastólica y sistólica, mientras que otros tuvieron un efecto menor pero mostraron la misma tendencia. Se encontró que algunos compuestos no sólo disminuyen la presión arterial sino también el ritmo cardiaco, por lo que podrían tener actividad anti-arrítmica (Velazquez et al. 2008). En el presente trabajo se evaluó por primera vez la actividad citotóxica, antioxidante y mutagénica de 4 compuestos de la serie LQM300 (Figura 12).

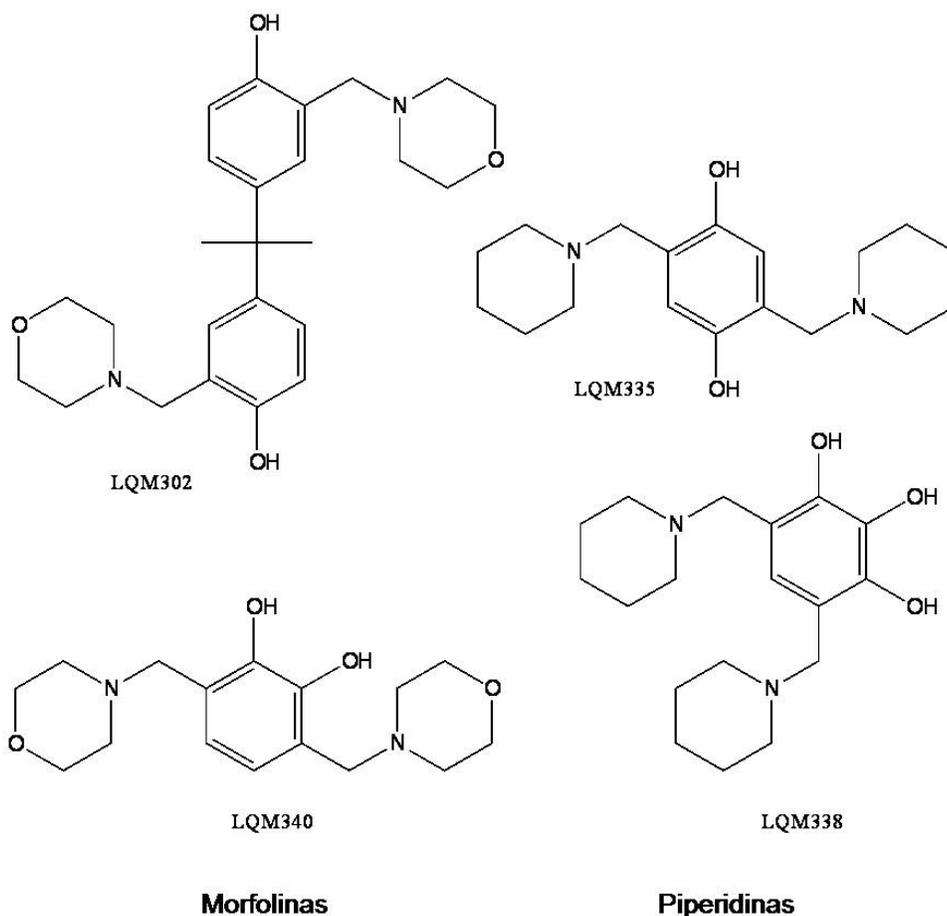


Figura 12. Estructuras de los cuatro compuestos heterocíclicos de la serie LQM300 seleccionados para el estudio de su actividad citotóxica, antioxidante y mutagénica.

3.2 COMPLEJOS METÁLICOS

Un complejo metálico es una estructura molecular en la que un átomo o ión metálico (generalmente un catión) forma un enlace con cierto número de aniones o moléculas dotadas de pares de electrones no compartidos. A los complejos metálicos

también se les llama compuestos de coordinación y generalmente contienen al menos un metal de transición que funciona como átomo aceptor, mientras que el ligante es o incluye al átomo donador que cede al menos un par de electrones (Enciclopedia-Universal 2012). Las numerosas combinaciones entre metales y ligantes resultan en compuestos con diferentes propiedades como solubilidad y polaridad que pueden, de igual manera, poseer diversos tipos de actividad biológica.

3.2.1 Complejos metálicos antineoplásicos

Los fármacos antineoplásicos que se utilizan generalmente para el tratamiento del cáncer causan efectos secundarios graves y generan resistencia, lo que demuestra la necesidad de buscar nuevas alternativas seguras para el tratamiento de esta enfermedad. El *cis*-diaminodicloroplatino (II) (*cis*-Platino) sigue siendo uno de los agentes quimioterapéuticos anti-tumorales actuales más eficaces y a partir de su éxito, se han sintetizado varios complejos derivados del platino con la intención de producir nuevos compuestos anti-neoplásicos que tengan una actividad semejante y que reduzcan los efectos adversos que los fármacos actuales producen (Uehara et al. 2011). Algunos de los nuevos complejos metálicos que se han creado y evaluado *in vitro* incluyen metales tales como el galio, oro, níquel, cobre, y zinc (Frezza et al. 2010, Laine and Passirani 2012). El cobre, al igual que otros metales traza, es esencial para la función de proteínas que están implicadas en varios procesos biológicos como la respiración, el metabolismo, la síntesis de ADN y las reacciones de oxidación-reducción (Marzano et al. 2009), mientras que su deficiencia o desequilibrio se asocia con trastornos neurológicos severos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson (Donnelly et al. 2008), de Wilson y de Menkes (Wang T. and Guo 2006). Debido a que las características químicas de los metales de transición proporcionan oportunidades para desarrollar nuevos fármacos contra el cáncer basados en metales con diferentes mecanismos de acción, los complejos que contienen cobre u otros metales representan una nueva generación de agentes antitumorales alternativos (Ruiz-Azuara and Bravo-Gomez 2010).

3.2.2 Estudios de compuestos de cobre como antitumorales

En India, Patil y colaboradores en 1989 sintetizaron 5 nuevos complejos de cobre

con 5-fenilazo-3-metoxi saliciliden tiosemicarbazona, entre otros compuestos. Además de los estudios de caracterización, los complejos más representativos fueron evaluados *in vitro* e *in vivo* contra células de leucemia P388 sensibles y resistentes a adriamicina (P388/S y P388/R). El estudio con células se llevó a cabo utilizando timidina tritiada como una medida indirecta de la concentración de ADN, con lo que observaron que a mayor concentración del compuesto (al que nombraron BRH2) hay una marcada inhibición en la síntesis de ADN, siendo significativa desde concentraciones bajas (0.2 µg/ml) en las células sensibles a adriamicina, seguidas no por mucha diferencia, por las resistentes (0.3 µg/ml). *In vivo*, el mismo compuesto evaluado en ratones transplantados con las mismas células y tratados en los días 1, 5 y 9 después de la inoculación con las células P388/S mostró incrementar la sobrevivencia de los ratones en un 50% (Patil et al. 1989).

En el mismo país, Murugkar y colaboradores en 1999 consideraron la efectividad del Taxol como fármaco antitumoral y su limitada biodisponibilidad y solubilidad en agua, para sintetizar un complejo de cobre derivado del 10-deacetilbaccatintiosemicarbazona (DABTSC), una molécula que previamente fue reportada como un análogo activo del Taxol y que es fácilmente obtenida de taxanos inactivos que son muy abundantes. Se evaluó la actividad antiproliferativa del nuevo compuesto con cobre CuTATSC a concentraciones entre 0.3 y 1.0 mg/ml sobre las células de cáncer de mama MCF-7 utilizando la técnica de MTT y la incorporación de timidina tritiada, encontrando que las células tratadas con el compuesto sin cobre permanecían en arresto en la proliferación, pero se mantenían viables, mientras que las tratadas con el complejo de cobre fueron no viables comparando con *cis*-Platino a las mismas concentraciones. La citotoxicidad de ambos compuestos no es significativamente distinta a concentraciones por debajo de 0.3 mg/ml (12.5 µM), pero el complejo de cobre es significativamente letal a dosis mayores de 0.5 mg/ml (25 µM) (Murugkar et al. 1999).

En la última década hubo un auge de publicaciones sobre la síntesis y estudio de nuevos complejos metálicos, principalmente de cobre. Entre ellos se encuentran las Casiopeínas[®], complejos de cobre que fueron diseñados con base en las actividades antitumorales de *cis*-Platino y otras series de metales de transición, de los cuales varios han sido patentados por la Dra. Ruiz-Azuara desde 1990. En México, Gracia-Mora y colaboradores reportaron en el 2001 algunas casiopeínas que fueron varias veces más

citotóxicas que el *cis*-Platino contra algunas líneas celulares de cáncer de cuello uterino como HeLa, SiHa, Ca Ski, C-33 A y CaLo evaluadas con la técnica de sulforodamina. Mientras que el *cis*-Platino requirió concentraciones de 4.5 μM a 35 μM para inhibir el crecimiento del 50% de células, HeLa, SiHa y Ca Ski, las casiopeínas fueron capaces de tener el mismo efecto a 24 h de exposición con cantidades 10 a 100 veces menores (Gracia-Mora et al. 2001).

En China, Guo y colaboradores (Guo et al. 2010) evaluaron un nuevo complejo de cobre [(ETDPA)Cu(phen)](ClO₄)₂ del cual se ha probado su potencial de unión al ADN. Se evaluó la proliferación celular en varias líneas tratadas con este compuesto a varias concentraciones (2 a 40 μM) durante 48 h empleando la técnica de MTT. La línea celular más sensible a este compuesto fue la de cáncer cervical HeLa con una IC₅₀ de 5.1 μM , seguida por las células de carcinoma esofágico ECA109 (5.2 μM), de cáncer de mama MCF-7 (6.5 μM) y de cáncer de pulmón (19.3 μM). El efecto del compuesto en la distribución del ciclo celular fue una significativa reducción de células en la fase G2/M a 24 h, mientras que a 48 h sólo el 2.7% de las células permanecieron en esa fase o en la fase de síntesis. La población de G1 se incrementó en un 58% del mostrado por las células control y a 68.5 y 80.5% a las 24 y 48 h posteriores al tratamiento, respectivamente. Tras la evaluación con fluorescencia de la proteína LC3 considerada como representativa de la formación de vacuolas, los autores sugieren la muerte celular por autofagia, ya que las células tratadas con su complejo de cobre mostraron una mayor densidad de fluorescencia al compararlas con el grupo control. El complejo de cobre también propició un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) de una manera dosis-dependiente, lo que sugiere una continua generación de EROs durante el proceso de muerte celular inducida con el complejo de cobre [(ETDPA)Cu(phen)](ClO₄)₂ (Guo et al. 2010).

Entre otros complejos de cobre que son citotóxicos contra diversos tipos de células cancerosas humanas, se encuentran los complejos ternarios de cobre (II) de aminocumarinas con fenantrolina reportadas por Jia y colaboradores en 2010. Algunos de estos compuestos inhibieron el crecimiento de las células PC3 de cáncer de próstata y las células cancerosas de leucemia mieloide humana HL-60 al incubarlas durante 24 – 48 horas con concentraciones de hasta 300 μM y evaluadas con el ensayo de fosfatasa

ácida. Estos complejos presentaron valores de IC_{50} de 2.4 a 35 μ M y una tendencia a interactuar y posiblemente dañar el ADN, aunque también inhibieron a las células normales de hígado de la línea L02 (Jia et al. 2010).

Raman y colaboradores también en 2010 reportaron el diseño y síntesis de complejos de cobre (II) y zinc (II) que mostraron ser citotóxicos frente a las líneas celulares tumorales humanas HeLa (cáncer cervical humano), Hep2 (cáncer epitelial de laringe humana), HepG2 (cáncer de hígado humano) y MCF-7 (células de cáncer de mama humano) al evaluarlos mediante el ensayo de MTT a 72 h de incubación con los compuestos. Particularmente, sus complejos de cobre fueron más citotóxicos contra todas las líneas tumorales que evaluaron al compararlos con los complejos de zinc, pero fueron menos potentes que el *cis*-Platino. La geometría adoptada por estos complejos les permite la unión con el ADN y posiblemente una actividad enzimática en la presencia de agentes oxidantes. Además, todos sus complejos mostraron tener actividad antimicrobiana contra la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (Raman et al. 2010).

En los últimos años, estas y otras publicaciones sobre complejos de cobre citotóxicos han demostrado que muchas veces su mecanismo de acción se basa en la intercalación en el ADN y la actividad de escisión sobre este ácido nucleico (Krishnamoorthy et al. 2012, Lakshmi Praba et al. 2011), así como en la capacidad de inducir apoptosis u otras formas de muerte celular (Boulsourani et al. 2011, Tardito et al. 2009), por lo que en este trabajo decidimos evaluar, con mayor detalle, al complejo de cobre LQM402.

3.2.3 El complejo de cobre(II) LQM402

El complejo de cobre(II) LQM402 (Figura 13) fue sintetizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por el grupo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano. La síntesis se realizó mezclando en etanol 1.081 g de cobre(II) acetato, 0.1 ml de NH_4OH y 1.602 g del ligante 2,6-Bis(morfolinometil)fenol reportado previamente por Velazquez *et al.*, 2008. La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 18 h a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente y el precipitado se colectó para recrystalizar en etanol y posteriormente filtrarlo. Como producto de síntesis se obtuvo el compuesto (μ_4 -Oxo) tetra- μ_4 -acetato{4-hidroxi-3,5-bis(morfolinometil)tetra cobre(II)} que son cristales de color verde

con un rendimiento de 86%, peso molecular de 1132 g/mol, fórmula $C_{44}H_{72}Cu_4O_{14}N_4$ y 198-200°C de punto de fusión.

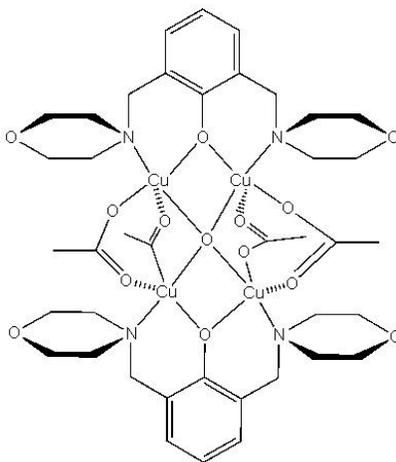


Figura 13. Estructura del complejo de cobre(II) LQM402 (Patente en trámite).

4.0 JUSTIFICACIÓN

Siendo el cáncer cervical y su metástasis la segunda causa de muertes en México en años recientes, es importante seguir realizando estudios que promuevan la continua búsqueda de agentes con potencial terapéutico contra esta enfermedad. Aunque el uso de plantas puede tener eficacia demostrada históricamente, es necesaria la evaluación seria de sus efectos benéficos y tóxicos, lo cual requiere de un trabajo extenso. Por otro lado, los avances en programación computacional permiten diseñar moléculas con posible acción terapéutica basada en otros compuestos cuya actividad y eficacia ha sido previamente comprobada. El principio de Relación Estructura-Actividad usada por programas de modelado molecular se basa en la hipótesis de que moléculas similares tienen actividades similares y en que moléculas de ciertos tipos pueden tener interacción entre ellas, aunque existe el problema de que a nivel molecular una diferencia mínima puede significar una gran diferencia en cuanto a actividad biológica.

Estudios realizados sobre compuestos sintetizados con base en modelado molecular han mostrado su efectividad citotóxica en diversas líneas celulares e incluso en algún modelo *in vivo*. Recientemente, se han generado diversos reportes de compuestos heterocíclicos y complejos de cobre diseñados *in silico* y su evaluación sobre células de diversos tipos de cáncer. Por ello se decidió estudiar diversos compuestos de este tipo, generados en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores - Cuatitlán (UNAM) ya que al ser de nueva síntesis, no existen reportes previos de sus efectos sobre modelos biológicos relacionados con cáncer. De aquí la importancia de evaluar la actividad citotóxica de algunos compuestos heterocíclicos de la denominada serie LQM sobre líneas celulares de carcinoma cervical, su posible efecto genotóxico *in vitro* e *in vivo*, así como ensayos que mostraran su posible efecto antioxidante. Además, estudiar al complejo de cobre LQM402 en pruebas sobre su efecto en la expresión de proteínas asociadas a muerte celular y complementarlo con un estudio en un modelo *in vivo*, con el que además de conocer el efecto del complejo LQM402 sobre el desarrollo de un tumor de CaCu inducido en ratones atímicos, también se analizaría la expresión diferencial de genes asociados a cáncer y el efecto apoptótico *in situ* del complejo de cobre en el tejido tumoral.

5.0 HIPÓTESIS

Diversos compuestos heterocíclicos y complejos metálicos han demostrado que ocasionan muerte celular en diversas líneas celulares cancerosas y en tumores humanos alterando su ADN, por lo tanto, heterocíclicos de la serie LQM diseñados *in silico* poseen actividad antitumoral.

6.0 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antitumoral de compuestos heterocíclicos de la serie LQM en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino, a nivel molecular y en un modelo murino

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la actividad citotóxica de algunos compuestos de la serie LQM en las líneas humanas de carcinoma cérvico-uterino HeLa, SiHa, CaSki y C-33 A mediante la técnica de MTT.
2. Analizar la capacidad antioxidante de compuestos de la serie LQM en los modelos de reducción de DPPH y producción/inhibición de TBARs.
3. Evaluar la genotoxicidad de algunos compuestos de la serie LQM utilizando la Prueba de Ames y la técnica de micronúcleos.
4. Determinar la capacidad del complejo de cobre LQM402 para inducir muerte celular programada en células de carcinoma cervical HeLa, evaluando la translocación de fosfatidil serina mediante citometría de flujo y la expresión de algunas caspasas apoptóticas mediante inmunoanálisis.
5. Analizar el efecto *in vivo* del complejo LQM402 sobre el desarrollo morfológico, histopatológico y expresión de genes asociados a cáncer en tumores inducidos en ratones Nu/Nu.

7.0 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CULTIVO CELULAR Y LÍNEAS CELULARES

Células de las líneas tumorales de carcinoma cervical HeLa, SiHa, Ca Ski, C-33 A y fibroblastos humanos no tumorales fueron mantenidas en cultivo con medio MEM modificado por Dulbecco (Gibco) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de antibiótico antimicótico penicilina/estreptomina de Gibco (10,000 unidades/ml y 10,000 µg/ml, respectivamente). Se emplearon las condiciones estándar de cultivo: Incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ humidificada. La expansión de células se realizó en cajas de cultivo de 100 x 20 mm (Corning) en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar utilizando el medio de cultivo DMEM, amortiguador de fosfatos para lavado y tripsina al 0.1% para resuspenderlas. Las diferencias que describe la American Type Culture Collection (ATCC) para las líneas celulares que utilizamos, radican principalmente en la inserción de fragmentos del genoma del virus VPH 16 o 18 en cada una de ellas y la presencia de formas mutadas o no del gen guardián P53 o de la proteína del retinoblastoma pRB. A continuación se mencionan las características generales descritas por la ATCC sobre el origen de las células utilizadas en este trabajo.

La línea celular **HeLa**, fue obtenida de un carcinoma cervical de una mujer de raza negra de 31 años, contiene secuencias del genoma del VPH18, expresión baja de P53 y niveles normales de pRB. **Ca Ski** fue establecida de una metástasis en el intestino delgado de una mujer caucásica de 40 años, contiene secuencias del genoma de VPH16 en un alto número de copias por célula (600 copias) y secuencias relacionadas al VPH18. Al ser una línea de células metastásicas puede considerarse que tiene un fenotipo más agresivo y probablemente resistente. La línea celular **SiHa** fue obtenida del carcinoma de células escamosas gado II de una mujer asiática de 55 años, contiene de 1 a 2 copias por célula del genoma de VPH16 y es positiva para los oncogenes p53 y pRB. Por su parte, la línea celular **C-33 A** proviene del carcinoma de una mujer caucásica de 66 años y las células no contienen secuencias del genoma de VPH. La proteína pRB está presente pero en un tamaño anormal mientras que la expresión de p53 es elevada y tiene una mutación en el codón 237, el cual resulta en la sustitución del aminoácido Arg por Cys.

Los **fibroblastos** se emplearon como un control no tumoral para conocer el efecto

de los compuestos sobre células sanas. Estas células pertenecen a un cultivo establecido a partir de piel de prepucio de recién nacido y tienen una vida media más larga comparada con otras líneas celulares de fibroblastos. La ATCC reporta que estas células tienen un cariotipo diploide normal, son negativos para telomerasa y tienen la capacidad de proliferar hasta 72 pases antes de considerarse senescentes (ATCC 2013).

7.2 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD CON MTT

Esta técnica permite medir de una forma directa la viabilidad celular frente a diferentes estímulos químicos (citotoxicidad). También nos permite, pero de una manera indirecta, medir la proliferación celular. Se trata de un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium a formazán, mediante la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables.

En placas de cultivo de 96 pozos se sembraron 8000 células/pozo de cada una de las líneas de carcinoma cervical HeLa y SiHa; y 10,000 células /pozo de las líneas Ca Ski y C-33 A en medio de cultivo DMEM suplementado con 7% de SFB y se mantuvieron en incubación a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 horas para permitir la adherencia y estabilización de las mismas. Al siguiente día se agregaron los compuestos LQM preparados en medio de cultivo partiendo de una solución madre a 20 mM en DMSO para obtener distintas concentraciones finales (12.5, 25, 50 y 100 µM) y se dejaron transcurrir 24 h de tratamiento. Después de ese tiempo, las células se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se agregaron 100 µl de DMEM con sales de tetrazolio disueltas a una concentración final de 0.25 mg/ml. Luego de la incubación por 4 h el medio fue retirado cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se agregó dimetil sulfóxido (DMSO) para diluir el formazán formado. La Densidad Óptica (D.O.) fue leída a 570 nm en un espectrofotómetro ELx808 de Bio-Tek (Mosmann, 1983). Los porcentajes de viabilidad se calcularon de acuerdo a la fórmula: % de viabilidad= (D.O. células tratadas x 100) / D.O. de las células control. Los promedios de porcentaje de viabilidad se utilizaron para calcular la Concentración Inhibitoria del 50% de células (IC₅₀) mediante una regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0.

7.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (REDUCCIÓN DE DPPH)

El método de DPPH es una manera rápida, fácil y económica de evaluar la capacidad antioxidante (atrapador de radicales libres o donador de hidrógeno) de diversos compuestos, extractos o alimentos, entre otros. Este método involucra el uso del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) que puede ser reducido en presencia de atrapadores de radicales libres, cambiando su color original violeta a amarillo (Kedare and Singh 2011). En esta prueba se evaluaron por separado tres concentraciones de cada uno de los compuestos de la serie LQM (1, 10 y 100 μM) disueltos en etanol a partir de una solución stock 20 mM en DMSO. El control negativo fue únicamente la solución de DPPH y como controles positivos se utilizaron los fármacos antioxidantes quercetina y - tocoferol. Las diferentes diluciones se colocaron por triplicado en placas de 96 pozos y se les adicionó una solución de DPPH 100 μM , se mantuvieron en agitación constante durante 30 min y en obscuridad. Transcurrida la incubación, la absorbancia se midió a 515 nm en un lector de placas ELx808 de Bio-Tek. El porcentaje de reducción del DPPH fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de reducción del DPPH} = 100 - [(\text{abs de la muestra} / \text{abs del control}) \times 100]$$

7.4 ENSAYO DE LIPOPEROXIDACIÓN, SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOPARBITÚRICO (TBARS)

Esta prueba es utilizada para detectar productos de oxidación, principalmente malondialdehído (MDA) y compuestos similares a éste que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA). Los componentes que reaccionan con el TBA son referidos como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, de ahí que la prueba sea conocida como TBARS. Aunque el ensayo no es específico para el MDA, es ampliamente utilizado como un índice confiable de la oxidación de lípidos (Cathcart et al. 1991).

7.4.1 Homogeneizado de cerebro de rata

El sustrato susceptible de peroxidación fue un homogeneizado de cerebro de rata. Para prepararlo se utilizaron ratas Wistar macho (200-250 g) proporcionados por el Instituto de Fisiología celular (UNAM). Los animales se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en ciclos

de 12/12 h luz/obscuridad, con acceso libre a comida y agua. El sacrificio de los mismos se realizó con CO₂ de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Para cada experimento se extrajo rápidamente un cerebro completo de rata y se homogeneizó en solución salina (PBS) para tener un homogeneizado 1/10 (peso/volumen) que fue centrifugado a 3400 rpm durante 10 min. El precipitado se descartó y el sobrenadante fue utilizado para los experimentos cuantificando su concentración de proteína con el método del reactivo de Folin-Ciocalteu y ajustándolo a 2.66 mg de proteína/ml con PBS.

7.4.2 Peroxidación lipídica inducida con algunos heterocíclicos de la serie LQM300

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un baño con hielo. Se depositó la cantidad suficiente para tener 1 mg/ml de proteína del homogeneizado de cerebro de rata, 50 µl de PBS (pH 7.4, 9.5 mM) y 50 µl de EDTA 20 mM en tubos de 1.5 ml. A continuación, se añadieron 25 µl de cada uno de los compuestos a las diferentes concentraciones (1-100 µM) diluidos en DMSO. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 3 h en un agitador de placas (Lab Line Mod. 4265) en agitación constante a 1.5 rpm. Adicionalmente se realizaron experimentos control para evaluar la peroxidación de lípidos en presencia de (i) el cerebro sólo (sin LQM402), (ii) 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) dihidroclorido (AAPH 20 mM) y (iii) sulfato ferroso (FeSO₄ 10 µM), este último sólo se incubó durante 1 h.

7.4.3 Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para la cuantificación de TBARS se preparó una solución 0.5% de TBA en NaOH 0.05 N y 30% de ácido tricloroacético en proporción 1:1. Se adicionaron 500 µl a cada uno de los tubos incubados en la sección anterior y éstos se colocaron en hielo durante 10 min, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min y finalmente se calentaron a 95°C durante 30 min. Una vez que se alcanzó la temperatura ambiente, se separaron 200 µl de la solución para colocarla en microplacas de 96 pozos y analizar el contenido de TBARS mediante densidad óptica a 540 nm usando un lector de placas ELx808 de Bio-Tek. Las concentraciones de TBARS se calcularon por interpolación en una curva experimental estándar determinada para tetrametoxipropano (TMP).

7.5 ENSAYO DE MUTAGENICIDAD *In vitro*: PRUEBA DE AMES

El propósito del ensayo de mutación bacteriana inversa (bacterial reverse mutation assay) es evaluar la genotoxicidad de compuestos químicos midiendo su habilidad para inducir mutaciones reversibles a nivel de una simple base en el ADN. Se utilizaron las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 (*hisD3502*, *rfa uvrB* pKm101) que detecta mutaciones por corrimiento de formato, TA100 (*hisG46*, *rfa uvrB* pKm101) que detecta mutaciones por sustitución de pares de bases y TA102 (*hisG428*, *rfa*, pQ1, pKm101) que detecta daño al ADN inducido por especies reactivas de oxígeno (Maron y Ames, 1983).

Este ensayo de mutagenicidad puede realizarse de dos formas o métodos: Incorporación e incubación. En el primero, que fue el que se utilizó en este trabajo, el agente de prueba se incorpora a la placa con agar junto con el cultivo de bacterias sin una incubación previa de 30 min a 37°C, que sólo se realiza cuando se emplea el segundo método. Se utilizaron 0.5 ml de solución salina o de una mezcla S9 obtenida de hígado de rata Wistar macho tratada con Aroclor 1254 (Analab Inc., UK) que funciona como un xenobiótico activador, 0.1 ml de cultivo de bacterias *S. typhimurium* de las diferentes cepas ($1 - 2 \times 10^9$ UFC/ml) y las distintas concentraciones de los compuestos (50, 100 y 200 µM/placa) en 2 ml de agar suave. Inmediatamente, la mezcla se depositó en placas de agar Vogel-Bonner con requerimientos mínimos de histidina y se incubaron por 48 h a 37°C. Después del tiempo de incubación, se contó la cantidad de colonias en cada placa. La pequeña cantidad de histidina permite a las bacterias crecer por un tiempo inicial y tener la oportunidad posterior de mutar. Cuando la histidina se agota, sobreviven sólo las bacterias que han mutado para tener la capacidad de producir su propia histidina. La mutagenicidad del compuesto es proporcional al número de colonias observadas (Ames *et al.*, 1973).

7.6 ENSAYO DE MUTAGENICIDAD *In vivo*: MICRONÚCLEOS

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que se forman espontáneamente o por causa de agentes externos. Después de la telofase, los cromosomas normales y fragmentos que posean telómeros originan los núcleos de las células hijas. Sin embargo, los elementos rezagados por acción de mutágenos, sean fragmentos o cromosomas completos, quedan incluidos en el citoplasma de las células

hijas y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios más pequeños que el núcleo principal y de ahí el nombre de micronúcleos.

Para llevar a cabo este ensayo, se formaron grupos de 5 ratones macho de la cepa CD1 para la evaluación de cada concentración del complejo LQM402 (5, 10 y 15 mg/kg de peso) y se les administró el compuesto disuelto en agua estéril vía intraperitoneal en una dosis aguda. Se obtuvieron muestras sanguíneas realizando un pequeño corte de la punta de la cola a los tiempos 0 (antes de la administración del complejo) y a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la administración del mismo. Con la gota de sangre se realizaron frotis en portaobjetos, se dejaron secar a temperatura ambiente, se fijaron con Etanol absoluto y posteriormente se tiñeron con una solución de colorante Giemsa (Sigma-Aldrich) preparada en amortiguador de fosfatos. Los frotis fueron entonces observados al microscopio óptico para determinar la presencia o ausencia de micronúcleos. El conteo de eritrocitos policromáticos con micronúcleos (EPCMN) se realizó observando la cantidad de campos necesarios para contar 1000 eritrocitos policromáticos (EPC) y entre ellos, encontrar los que tuvieran micronúcleos. Para calcular el índice de EPC/ENC, se observaron los campos necesarios para contar un total de 2000 eritrocitos, y de ellos se cuantificaron los eritrocitos policromáticos y los eritrocitos normocromáticos (ENC). La presencia de un mayor número de EPCMN en los frotis de ratones tratados comparados con los de los ratones control indicaría que el compuesto probado es genotóxico (Schmid 1975).

7.7 DETERMINACIÓN DE ANEXINA V EMPLEANDO CITOMETRÍA DE FLUJO

Cuando una célula entra en el proceso de muerte celular programada, los primeros cambios detectables aparecen en la membrana. Entre los fosfolípidos que conforman la bicapa membranal, se ha identificado a la fosfatidil serina como indicador de apoptosis temprana ya que, al ocurrir una pérdida en la integridad de la membrana lipídica, este fosfolípido cambia su posición normal en la cara interna de la membrana hacia la cara externa. Por otra parte, la proteína dependiente de calcio, Anexina V, tiene una gran afinidad por la fosfatidilserina, por lo que se utiliza acoplada a un fluorocromo para detectarla mediante citometría de flujo y tener una medida cuantitativa del porcentaje de células en apoptosis en una suspensión de células después de la exposición a algún

tratamiento (Vermes et al. 1995).

Para determinar el porcentaje de células en apoptosis después de tratamiento con el complejo LQM402, se sembraron células HeLa a una densidad de 5×10^5 y se permitió la adhesión y estabilización por un periodo de 24 h. Las células se trataron con LQM402 a la concentración obtenida como valor de IC_{50} en la prueba de citotoxicidad para esta línea celular (74.74 μ M) y durante diferentes tiempos de incubación (6, 12 y 24 h). Al término de los tratamientos las células fueron colectadas, lavadas y fijadas con paraformaldehído al 4%. Se resuspendieron en 500 μ l del amortiguador de unión, 5 μ l de anexina V, 5 μ l de Ioduro de propidio (provistos en el kit de detección de Apoptosis) y se dejaron incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad según lo indicado en el instructivo del Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit de Biovision®. Las suspensiones celulares fueron analizadas con un citómetro de flujo FACScan de Beckton Dickinson.

7.8 DETECCIÓN DE CASPASAS POR INMUNOANÁLISIS (WESTERN BLOT)

Esta es una técnica analítica que se usa para detectar la presencia y abundancia de proteínas de interés en una muestra de homogeneizado de tejido o extractos celulares. Se emplea la electroforesis en gel para separar proteínas nativas o desnaturalizadas de acuerdo a la longitud o estructura tridimensional del polipéptido. Las proteínas son transferidas a una membrana en donde pueden ser reconocidas por anticuerpos específicos.

Partiendo de cultivos celulares semiconfluentes de células HeLa (ya que son la línea celular mas sensibles a la apoptosis se decidió usar esta línea celular) a los que se les trató con el compuesto LQM402 a la dosis obtenida como IC_{50} , se obtuvieron extractos totales realizando una lisis celular con solución de lisis (Tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 120 mM, NP-40 (IGEPAL) 0.5%, NaF 100 mM, $NaVO_5$ 200 μ M, PMSF 1 mM, aprotinina 2-10 μ g/ml, y leupeptina 10 μ g/ml). A los extractos de células tumorales se le cuantificó el contenido de proteína total con reactivo de Bradford y se les adicionó el amortiguador de carga Laemmli 2X (Sigma-Aldrich). Los extractos fueron calentados en baño María hirviendo durante 5 min antes de cargar en el gel. Utilizando en promedio 30 μ g de proteína/ml, los extractos se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) con un gel concentrador al 4%, a 80 V hasta que se observó la salida del

frente (aproximadamente 2 h). Posteriormente, las proteínas en los geles fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa durante 1.5 h. Se retiraron las membranas de la cámara de transferencia y se les bloquearon los sitios inespecíficos con leche descremada en polvo preparada al 5% en TBS/Tween 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos primarios de ratón, anti-caspasas -3, -7, -8 y -9 o anti-citocromo C (1:200) diluïdos en TBS/Tween con albúmina al 1% durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche en refrigeración. Un anticuerpo contra Actina fue utilizado para detectar la presencia de esta proteína como control de carga). Al término de la incubación se lavaron las membranas con TBS-Tween y se trataron durante 45 min con anticuerpos secundarios acoplados a *HRP* (Horse Radish Peroxidase) diluïdos 1:3000 en TBS/Tween con albúmina al 1% (todos los anticuerpos empleados fueron de Santa Cruz Biotechnology). La quimioluminiscencia se obtuvo al incubar las membranas con solución reveladora (Kit Supersignal de Thermo Scientific) y las bandas fueron visualizadas con películas de autorradiografía (Kodak) (Schneppenhein *et al.*, 1991).

7.9 MODELO *In vivo*, INDUCCIÓN DE TUMORES

Uno de los grandes retos que enfrentan los investigadores en el desarrollo de nuevos fármacos es la búsqueda de estrategias para evaluar la actividad biológica de sus productos. Posterior a los estudios *in vitro*, estudios *in vivo* se vuelven una necesidad para tener un parámetro preclínico del efecto del producto. Los modelos en animales son muy buenos como experimentos predictivos de actividad similar en seres humanos. Desde hace más de 30 años, los modelos xenográficos de tumores inducidos en roedores se volvieron de uso común y lo siguen siendo a la fecha. Se puede decir que cada fármaco antitumoral que ha sido aprobado para su uso en seres humanos, ha sido evaluado usando estos modelos (Kerbel, 2003).

Para el modelo de inducción de tumores de CaCu, se utilizaron ratones de fondo original CD1-Foxn1/nu homocigóticos (hembras) provenientes del Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Estos ratones tienen una mutación que les hace carecer de timo y por lo tanto ser inmunosuprimidos. Como consecuencia de la mutación no tienen la presencia de pelo común sino una velloidad reducida por lo que también se les conoce como desnudos y por lo cual durante el texto se les hace referencia con cualquiera de

estos términos de forma indistinta (atímicos, inmunosuprimidos o desnudos). Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), México en cajas metabólicas con filtro y aserrín estéril. El agua y alimento *ad libitum* también fueron esterilizados y las condiciones de mantenimiento se mantuvieron iguales a las mencionadas anteriormente para las otras pruebas que involucraron animales.

La inducción del tumor se realizó mediante la inyección subcutánea dorso-lateral de 0.1 ml de una suspensión celular (1×10^6 células HeLa) en PBS y permitiendo el desarrollo inicial del tumor durante 7 días.

7.10 EVALUACIÓN DEL COMPLEJO DE COBRE LQM402 EN EL MODELO *In vivo*

El modelo de inducción de tumores fue realizado de acuerdo a Schlie-Guzman y colaboradores, quienes consideraron el valor obtenido de IC_{50} para sus compuestos, aislados de *Annona diversifolia* en ensayos con células HeLa y SW-480 como una dosis 1x y partiendo de ella, evaluaron dosis hasta de 500x en ratones atímicos con tumor inducido con células HeLa o SW-480 (Schlie-Guzman et al. 2009). En el caso de nuestro compuesto, por tratarse de origen sintético y considerando su composición metálica, el valor de IC_{50} no fue considerado como una dosis aceptable para ser evaluada.

Es importante mencionar que, aunque no se realizaron las pruebas necesarias en ratones Nu/Nu para determinar una LD_{50} , estas fueron realizadas en ratones CD1 antes de llevar a cabo la prueba de micronúcleos. En esa prueba de toxicidad se determinó que la LD_{50} para el complejo LQM402 a 24 h se encuentra por arriba de 15 g/kg y considerando que el fármaco control positivo *cis*-Platino ha sido administrado a dosis menores de 15 mg/kg de peso, se decidió utilizar valores cercanos a éste.

Dado que 1/10 de nuestra IC_{50} obtenida en células HeLa corresponde a 8.11 mg/kg de peso, ésta fue establecida como la dosis más alta a evaluar, la mitad de ella (4 mg/kg de peso) fue nuestra dosis intermedia, y la décima parte (0.81 mg/kg de peso) fue la que se manejó como dosis pequeña.

Al día 8 después de la inoculación de células, se inició la administración de 10 dosis iguales con intervalo de un día sin administración del complejo de cobre LQM402 por vía intraperitoneal durante 20 días a nuestros distintos grupos experimentales (n=10) que se describen a continuación.

El **grupo testigo** consistió de ratones sanos sin inducción de tumor ni tratamiento, el **grupo control negativo** consistió de ratones a los que se les administró la suspensión celular pero ningún tratamiento, el **grupo vehículo** fue aquel en donde se administró la suspensión celular y el tratamiento fue sólo con la administración del vehículo sin el compuesto. Se manejó también un **grupo control positivo** en donde el tratamiento se realizó con el fármaco antitumoral *cis*-Platino administrado en cinco dosis de 6 mg/Kg. Se realizó el seguimiento de la medida externa del tumor y al finalizar el tratamiento con los compuestos se sacrificó a los ratones por sedación en cámara de CO₂ y se procedió a la extracción de la masa tumoral para su posterior análisis. Las muestras de tumores suficientemente grandes se dividieron para conservar una sección en formaldehído al 10% en PBS pH 7.4 para estudios histológicos y la otra región se conservó en RNA later[®] (Sigma-Aldrich) para la obtención de ARNm y evaluación de la expresión de genes. Adicionalmente se conservaron muestras de hígado, bazo, riñón y aparato reproductor en formaldehído 10% para estudios histopatológicos.

7.11 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES ASOCIADOS A TUMOR PRODUCIDA POR EL COMPUESTO LQM402 EN TUMORES INDUCIDOS EN RATONES

De acuerdo al dogma central de la biología, la información del ADN de los diferentes genes es codificada a proteínas, y para que esto ocurra es imprescindible la participación intermedia del ARNm, por lo que su extracción y aislamiento se han convertido en herramientas básicas para estudiar a nivel genético lo que ocurre en las células durante numerosos procesos constitutivos, patologías y diversos tratamientos (Krebs et al. 2009). Por otro lado, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una novedosa técnica análoga al proceso de replicación del ADN que tiene lugar en las células y que ha alcanzado un importante auge en los últimos años. La PCR es un método sensible y específico para la detección y monitoreo de genes particulares de un organismo o aquellos involucrados en un proceso y/o etapa específicos (Reyes-López et al. 2010).

La introducción de colorantes fluorescentes y nuevos equipos ha permitido el desarrollo de la PCR cuantitativa o cinética. Ésta mide la acumulación de productos de PCR durante la fase exponencial de la reacción y antes de que la amplificación se vuelva

vulnerable, por ejemplo, cuando los reactivos ya están limitados (Chen and Janes 2002).

7.11.1 Extracción de ARNm con el método basado en formol-cloroformo

Por separado, se pesaron fragmentos de tumor (30 mg) de los animales de cada grupo experimental y se maceraron en mortero utilizando N₂ líquido. El macerado se colectó en tubos de 1.5 ml y se homogenizó con 1 ml de TRIzol[®] reagent (Invitrogen). Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se adicionaron 0.2 ml de cloroformo a cada tubo y se agitaron en vórtex durante 15 seg. Se dejaron incubar por 2-3 min y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa fue recuperada en tubos nuevos, se agregaron 0.5 ml de isopropanol, se mezcló suavemente por inversión y se dejó incubar durante 10 min a temperatura ambiente para precipitar el ARNm. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 75% en agua DEPC y centrifugando a 7,500 rpm por 5 min a 4°C. Después de decantar el isopropanol, la pastilla se dejó secar durante 10-15 min invirtiendo los tubos sobre papel absorbente. La pastilla de ARNm se resuspendió en 30 µl de agua ultrapura (MilliQ) estéril tratada con DEPC y se incubó a 55°C por 10 min (Chomczynski and Mackey 1995). De cada tubo con ARNm se tomó una alícuota de 1 µl para su cuantificación a 260 y 280 nm y se almacenaron en congelación (-20°C) hasta su uso. De manera complementaria se prepararon geles de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ARNm cargando 3-5 µl por muestra y 2 µl de SYBR Green. La electroforesis se corrió a 100 V por 30 minutos y se visualizaron las bandas en un fotodocumentador Kodak modelo Gel Logic 440.

7.11.2 Síntesis de cADN (RT-PCR)

Antes de amplificar el material genético de nuestras muestras, fue necesario sintetizar una copia complementaria de ADN (cADN) partiendo del ARNm obtenido previamente. Para ello, se seleccionaron las muestras con ARNm de buena calidad (por lo menos 3 de cada grupo experimental) y se utilizó la cantidad necesaria de cada muestra para tener 2 µg de ARNm (1-5 µl) el cual se colocó en un tubo estéril con 0.5 µl de Random primer (oligo dT 5 µM) y agua estéril necesaria para completar 15 µl y se incubó a 70°C por 5 min. Inmediatamente se colocaron los tubos en hielo mientras se preparó la

siguiente mezcla de reacción: 5 μ l de amortiguador M-MLV 5x, 1.25 μ l de dNtp's 10 mM, ARN_{sin} (inhibidor de RNasa) 40 U/ μ l, 1 μ l de MMLV RT (transcriptasa reversa) 200 U/ μ l y agua estéril suficiente para completar un volumen final de 25 μ l por muestra (todos los reactivos utilizados para estas técnicas fueron de la marca Promega). A cada tubo de la primera incubación se le adicionaron 25 μ l de la mezcla de reacción y se incubaron a 37°C por una hora adicional. Los cADN obtenidos se conservaron a -20°C hasta su uso.

7.11.3 Diseño de oligonucleótidos de genes de interés

En este trabajo nos interesó estudiar la expresión diferencial de algunos genes asociados a cáncer, en particular el gen supresor de tumores p53, un gen ampliamente conocido como marcador de proliferación tumoral, Ki67; dos genes reportados como marcadores de CaCu IL-6 y MMP-10; dos genes involucrados en adhesión y metástasis, MMP-9 e Integrina α 8; y dos genes asociados a angiogenesis, VEGF y Plexina B. Por lo que se seleccionaron oligonucleótidos iniciadores sentido y antisentido que nos generaran productos de aproximadamente 200 bases utilizando las secuencias completas de tales genes en formato FASTA de la base de datos de NCBI e integrándolas al programa en línea Primer 3. En este programa se indicó generar los oligos con tamaño de 19 a 22 bases, una Tm entre 58 y 62°C, y un porcentaje de guanina-citocina entre 50 y 60% (Tabla 2). Los oligos seleccionados se sometieron a un análisis con el analizador de oligonucleótidos de Integrated ADN Technologies para confirmar un porcentaje de G-C cercano a 50%, que las temperaturas de fusión fueran similares, asegurarnos una reducida capacidad de formar autodímeros o enlaces internos, así como que tuvieran una fuerza de enlace débil (Δ G cercana a -3 kcal/mol). Una vez seleccionadas las secuencias, los oligonucleótidos se sintetizaron en la compañía Alpha ADN (Montreal, Quebec) de donde se recibieron liofilizados. Para el uso de los oligonucleótidos, se prepararon soluciones de cada uno de ellos a una concentración final de 5 μ M.

Tabla 2. Genes analizados en este estudio. Características de cada uno de los oligonucleótidos de genes de los que se analizó la expresión en tejido tumoral obtenido de ratones inmunosuprimidos con y sin tratamiento.

Gen	Primer	Longitud	Tm (°C)	Tamaño del producto (pb)	Ruta metabólica
Actina α	TCCCTGGAAAAGAGCTACGA	20	55.4		Gen constitutivo
Antisentido	TGCTGTTGTAGGTGGTCTCG	20	56.9	233	
Ki67	AAGCCCTCCAGCTCCTAGTC	20	58.5		Proliferación celular
Antisentido	TCCGAAGCACCCTTCTTCT	20	56.2	222	
IL-6	GCAGAAAAGGTGGGTGTGT	20	56		Marcador tumoral
Antisentido	GCAGAAGAGAGCCAACCAAC	20	56.3	202	
VEGF-C	GCTTTTGTACCCCTCAACCA	20	55.3		Angiogénesis
Antisentido	GCACTGGAAGCACAAGATCA	20	55.5	235	
Integrina $\alpha 8$	CTAAGCCAGGGATGGATGAA	20	54.2		Adhesión celular y metástasis
Antisentido	ACCCATGCTGTTTTGTAGCC	20	55.9	241	
P53	CTGTGACTTGCACGGTCAGT	20	57.6		Supresor tumoral
Antisentido	AGGGTGTGATGGGATGGATA	20	55.2	232	
GAPDH	GCCTCACTCCTTTTGCAGAC	20	56.3		Gen constitutivo
Antisentido	TTCTAGACGGCAGGTCAGGT	20	57.8	243	
MMP-10	GAGGGCAGAGCACTTACGAC	20	57.8		Marcador tumoral
Antisentido	CCTGGGCCATCAAAGAGTA	20	54.6	232	
MMP-9	GACCTCCTTCTCTGGCTCT	20	58.2		Adhesión celular y metástasis
Antisentido	CACCAAAGTGGATGACGATG	20	53.8	173	
Plexin B	AAGAGGAGAGTCCAGGCACA	20	57.9		Angiogénesis
Antisentido	GAGCAGCAATAGCCATGTCA	20	55.4	181	

7.11.4 Amplificación del cADN mediante PCR convencional (Punto final)

Para estandarizar las condiciones óptimas de cada par de oligonucleótidos se realizó un gradiente de temperaturas con la técnica de PCR punto final, mezclando en un microtubo de 0.2 ml, 5 μ l de amortiguador 5X Go Taq, 0.5 μ l de dNtp's 10 mM, 0.2 μ l de Taq polimerasa 5 U/ μ l (todos de Promega), 1 μ l de oligonucleótido sentido, 1 μ l de oligonucleótido antisentido (ambos a 5 μ M), 1 μ l de cADN y 11.3 μ l de agua estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C por 10 min para desnaturalización; 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a 55-61°C y 30 seg a 72°C para alineamiento y 72°C por 5 min para elongación en un termociclador *i-cycler* de BIO-RAD.

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis a 100 V por 30 min en un gel de agarosa 2% y visualizados mediante luz UV en un fotodocumentador Kodak modelo Gel Logic 440.

7.11.5 Amplificación del cADN mediante PCR en tiempo real (Cuantitativa)

Una vez estandarizadas las temperaturas ideales de amplificación para cada gen, se realizó la amplificación de los genes de interés en cada una de las muestras de cADN obtenidos de tumores inducidos en ratón y tratados o no con el complejo LQM402. Se realizó PCR en tiempo real utilizando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) de Fermentas. En microtubos de 0.2 ml se mezclaron 10 µl de Master Mix 2X, 1 µl de oligonucleótido sentido, 1 µl de oligonucleótido antisentido (ambos a 5 µM), 1 µl de cADN y 17 µl de agua estéril libre de nucleasas provista en el kit. Se inició el programa de amplificación en un equipo Sequence Detection System ABI PRISM® 7900HT a 95°C por 10 min y 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 58°C por 1 min. Se obtuvieron las gráficas de amplificación y se registraron los valores de Ct. Empleando el método $2^{-[\delta][\delta]Ct}$, se calcularon los niveles de expresión relativa de cada gen en los tumores inducidos en ratones que recibieron los diferentes tratamientos (Reyes-López et al. 2010).

$$[\delta][\delta]Ct = [\delta]Ct \text{ muestra} - [\delta]Ct \text{ referencia}$$

Donde

$[\delta]Ct \text{ muestra}$ = Valor Ct de cualquier muestra normalizada a un gen constitutivo endógeno

$[\delta]Ct \text{ referencia}$ = Valor Ct del control o calibrador normalizado también con respecto a un gen constitutivo endógeno

7.12 PREPARACIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS DE ÓRGANOS DE RATÓN

Al momento del sacrificio de los ratones con tumor inducido, se colectaron muestras de hígado, bazo, riñón, aparato reproductor y tumor de tamaños no mayores de 1 cm³ a los que se les retiró el exceso de sangre con PBS. Los órganos y/o fragmentos de ellos fueron mantenidos en formaldehído al 10% en PBS pH 7.4 para su fijación hasta el momento de su preparación histológica.

Las muestras preservadas se deshidrataron mediante inmersión en una serie de alcohol etílico a diferentes porcentajes de concentración (desde 25% hasta grado absoluto), se diafanizaron en xilol y se realizó una inclusión en parafina sintética (pastillas Histosec de Merck) con punto de fusión de 56 – 58 °C incluyendo en un mismo bloque todos los órganos colectados.

Se realizaron cortes de 4 – 7 μm en un micótomo de deslizamiento tipo Minot que fueron extendidos en un baño de flotación mantenido a una temperatura entre 40 – 45 °C y recogidos directamente en portaobjetos. De este paso, algunas laminillas se guardaron para protegerlas del polvo para ser utilizadas posteriormente en la técnica de TUNEL *in situ*, mientras que otras siguieron el procedimiento de tinción con hematoxilina-eosina para el estudio histopatológico.

7.12.1 Tinción de cortes histológicos de órganos de ratón con Hematoxilina-Eosina (H&E)

Para proceder a la coloración con H&E fue necesario desparafinar los cortes a 65°C por 15 min y con dos cambios de xilol por 3 min, para posteriormente rehidratar los tejidos en baños decrecientes de etanol (absoluto, 95 y 70%) por 3 min cada uno y enjuagar con dos baños de agua común por 5 min cada uno. Los tejidos se colorearon con una solución de hematoxilina alumínica de Harris durante 10 min y se realizaron dos lavados con agua destilada por 1 minuto cada uno. Para eliminar el exceso de colorante, se utilizó una solución de alcohol ácido y se realizó un último enjuague de 2 minutos con agua corriente. Para virar la hematoxilina a un color azul, se utilizó una solución de bicarbonato de sodio al 2% durante 5 min, se lavó con agua corriente por 5 min y finalmente con dos baños de agua destilada.

La coloración con una solución alcohólica de eosina se realizó durante 5 min y se enjuagó el exceso con dos lavados con agua destilada por 1 min cada uno y se realizó un último enjuague de 2 minutos con agua corriente. Se realizó una deshidratación rápida sumergiendo las laminillas con los tejidos en alcohol etílico de diferentes grados (50, 70, 90 y 100%) durante un minuto cada uno y se aclararon con 2 baños de xilol, de 1 y 2 min, respectivamente. Concluido el proceso, se realizó el montaje de las laminillas con medio de montaje Tissue-Tek® Glas 6419 colocando 200 μl del medio de montaje y cubriendo

con cubreobjetos perfectamente limpios y libres de polvo cuidando que no queden burbujas de aire entre el tejido y el cubreobjetos. Las laminillas con medio de montaje se dejaron secar perfectamente durante mínimo 24 h para posteriormente visualizarlas al microscopio óptico (Lee G 1968).

7.12.2 Técnica de TUNEL *In situ* para tejidos fijados

Para conocer si hubo fragmentación de ADN en los tumores inducidos en ratones atímicos tratados con el complejo de cobre, se realizó la técnica de TUNEL utilizando el kit *In Situ Cell Death Detection*, AP, versión 11.0 de Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. Se desparafinaron las laminillas colocándolas en una estufa a 65 - 70°C por 15 min y posteriormente realizando dos lavados con xilol y alcohol etílico absoluto durante 15 y 5 min, respectivamente. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se mantuvieron protegidas del polvo hasta el momento de realizar la técnica de TUNEL, para la cual se utilizaron jarras Coplin estériles para sumergir y rehidratar las laminillas en agua destilada estéril y amortiguador de fosfatos (pH 7.4) estéril. La permeabilización se realizó con Tritón X100 al 0.01% en PBS estéril por 3 min y Proteinasa K 0.5 µg/ml durante 15 min. Después de un par de lavados con agua estilada y etanol absoluto, los tejidos fueron fijados con ácido acético al 20% por 20 seg y nuevamente lavados con agua estilada, etanol absoluto y amortiguador de fosfatos. El control positivo fue tratado con una solución de ADNasa I recombinante 3 U/ml (en Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, BSA 1 mg/ml) por 10 min a temperatura ambiente en agitación suave y posteriormente a este control y al resto de las muestras en laminillas se les adicionaron 50 µl de solución de reacción de TUNEL (25µl de Enzyme solution y 225 µl de Label Solution incluidas en el kit). Se incubaron las laminillas durante 60 min a 37°C en cámara húmeda oscura, se enjuagaron con PBS por 5 min y se utilizó el medio de montaje Vectashield neutro de Vector Labs para visualizar en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 en un rango de 515-565 nm (verde).

8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 ENSAYOS REALIZADOS A COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS DE LA SERIE LQM300

8.1.1 Efecto de los compuestos LQM300 en la viabilidad de células de cáncer cérvico-uterino

Los compuestos LQM 302, 335, 338 y 340 fueron evaluados a tres distintas concentraciones en cultivos de las líneas celulares de CaCu con diferentes características: HeLa, SiHa, Ca Ski y C-33 A, así como en fibroblastos (FB) humanos como control de células no tumorales. Después de 24 h de incubación, la mayoría de los compuestos causaron cambios en la viabilidad de las líneas celulares. Las células que fueron incubadas únicamente con medio que contenía el vehículo (DMSO 1%) se consideró como el control del 100% de viabilidad.

En la línea celular HeLa, el compuesto que mostró mayor citotoxicidad fue el LQM338, pues causó que la viabilidad celular disminuyera a menos del 10% desde la concentración de 25 μ M y alcanzando una viabilidad de 4.19% a la concentración de 100 μ M incluso siendo este compuesto más efectivo que el fármaco de referencia *cis*-Platino, el cual disminuyó la viabilidad de esta línea hasta 15.38 a la concentración de 100 μ M. El resto de los compuestos heterocíclicos tuvieron una actividad menor sobre esta línea celular, pues ninguno de ellos alcanzó a reducir la viabilidad celular a valores por debajo del 60% aún a la concentración más alta evaluada (Figura 14). La línea celular HeLa, al ser prácticamente la primer línea celular establecida, ha sido una de las más utilizadas en diversos tipos de estudio, por lo que se ha distribuido a todas partes del mundo en infinidad de laboratorios. Esto ha hecho pensar que esta línea ha perdido ciertas características originales y se ha vuelto de cierta manera resistente (Masters 2002), pero con los resultados obtenidos en el resto de las líneas celulares se puede decir que los efectos citotóxicos observados se deben más a las características de los compuestos evaluados que a la resistencia celular, ya que que observamos un efecto citotóxico selectivo por parte del compuesto LQM338. Este compuesto posee dos grupos piperidínicos, y de los compuestos evaluados es el único con 3 hidroxilos en lugar de 2, lo

cual podría estar incrementando su solubilidad y polaridad, dándole posiblemente mayor reactividad.

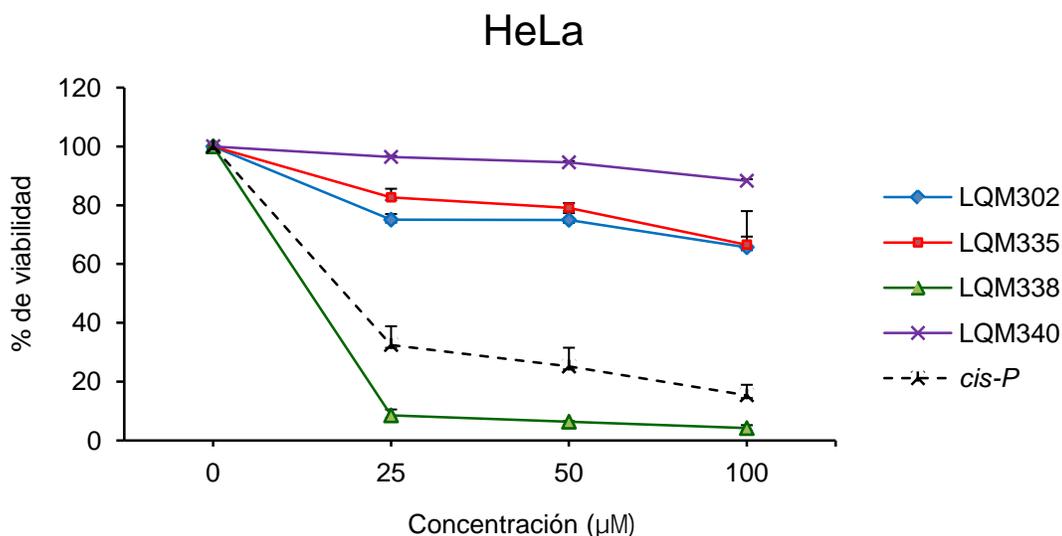


Figura 14. Efecto de 4 compuestos heterocíclicos en la viabilidad de células HeLa a 24 h de exposición y evaluado con la técnica de MTT. *cis*-Platino (*cis-P*) se utilizó como fármaco de referencia. Se muestra el promedio y error estándar de 3 experimentos independientes.

Para la línea celular SiHa, también el compuesto LQM338 mostró ser el más citotóxico produciendo una viabilidad celular de hasta el 5.87% a la concentración más alta que se evaluó (100 μM). A diferencia de la línea celular HeLa, este compuesto no inició su efecto citotóxico desde los 25 μM , sino que a partir de 50 μM fue cuando su efecto se diferenció del resto de los compuestos, los cuales mostraron una citotoxicidad estadísticamente similar a dicha concentración (Figura 15). En esta línea celular, LQM338 también superó la citotoxicidad del *cis*-Platino, el cual redujo la viabilidad celular a un 48.79% a la concentración de 100 μM . Por lo que podemos decir que el compuesto LQM338 tiene un efecto más potente que el *cis*-Platino en esta línea celular.

Por su parte, el compuesto LQM335 incrementó su potencial para reducir la viabilidad celular después de la concentración de 25 μM , pero aún así, apenas la reduce a un 60.52 a 100 μM , siendo el compuesto que le sigue al *cis*-Platino en citotoxicidad sobre la línea celular SiHa y con un porcentaje de viabilidad celular similar al que el compuesto LQM302 mostró para esta línea celular (64.97%), mientras que el compuesto LQM340

mostró ser el menos citotóxico, tanto para las células HeLa (Figura 14) como para las células SiHa (Figura 15).

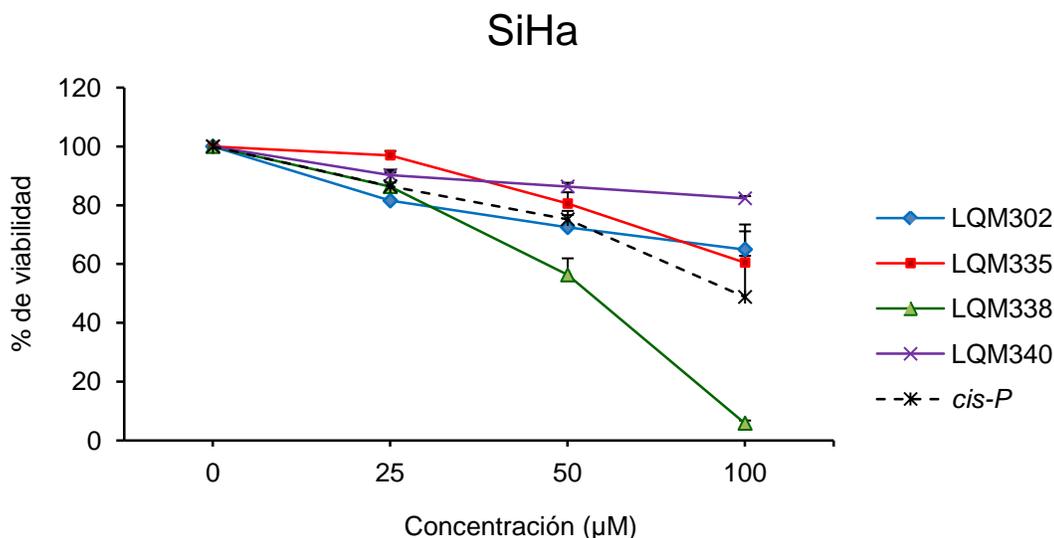


Figura 15. Efecto de 4 compuestos heterocíclicos en la viabilidad de células SiHa a 24 h de exposición y evaluado con la técnica de MTT. *cis*-Platino (*cis*-P) se utilizó como fármaco de referencia. Se muestra el promedio y error estándar de 3 experimentos independientes.

Con respecto a la línea celular CaSki, el compuesto que mostró mayor citotoxicidad fue nuevamente el LQM338, pero en esta línea su efecto fue menor que en HeLa y SiHa, ya que el porcentaje de viabilidad celular obtenido fue de 31% a la concentración de 100 μM comparado con la actividad en las líneas celulares anteriores, donde la viabilidad es menor de 10%. En esta línea, también el compuesto LQM335 mostró una actividad importante y cercana a la del LQM338, con un porcentaje de viabilidad celular de 38.23%, con un incremento en su efecto de manera relevante a partir de la concentración de 50 μM en ambos casos. Los dos compuestos piperidínicos (LQM335 y LQM338) mostraron ser más citotóxicos que el fármaco de referencia *cis*-Platino para la línea celular Ca Ski, el cual produjo una viabilidad celular de 51.67% a la concentración de 100 μM. El compuesto que le siguió en citotoxicidad al *cis*-Platino, y no por mucha diferencia, fue LQM302 con un porcentaje de viabilidad celular de 54.6%. Y nuevamente observamos que el compuesto LQM340 tuvo muy poco efecto sobre la viabilidad de las células SiHa, pues sólo la redujo a un 97.44% (Figura 16).

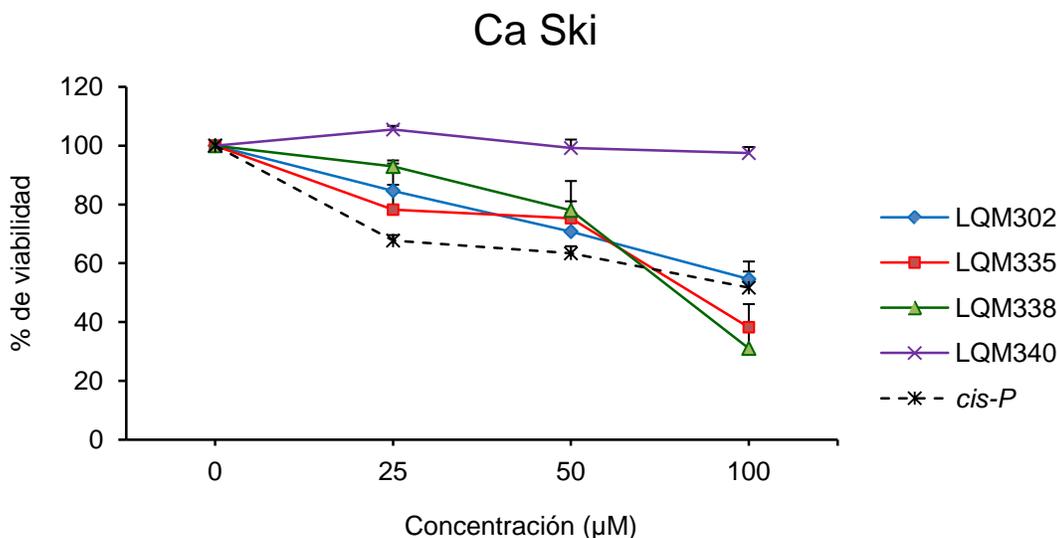


Figura 16. Efecto de 4 compuestos heterocíclicos en la viabilidad de células Ca Ski a 24 h de exposición y evaluado con la técnica de MTT. *cis*-Platino (*cis*-P) se utilizó como fármaco de referencia. Se muestra el promedio y error estándar de 3 experimentos independientes.

En la línea celular C-33 A, el compuesto LQM338 fue prácticamente letal a la concentración de 100 µM, pues la viabilidad celular llegó a 0.87%. En esta línea celular, el efecto citotóxico de LQM338 fue notorio desde la concentración de 25 µM (30.39% de viabilidad), pero se puede sugerir que el efecto ocurre desde concentraciones menores. Ninguno de los otros compuestos mostró una reducción de la viabilidad similar a la ocasionada por el compuesto LQM338 en esta línea celular, pero nuevamente el compuesto que siguió en actividad fue el LQM335 con un porcentaje de viabilidad de 29.79% a 100 µM, aún por debajo del efecto del *cis*-Platino (48.2% a esa misma concentración). LQM340 y LQM302 mostraron valores de viabilidad de 57.88 y 70.95%, respectivamente; por lo tanto, LQM302 fue el compuesto menos citotóxico en esta línea celular (Figura 17).

Los compuestos LQM335 y LQM338 contienen piperidinas, esto sugiere que la presencia de estos grupos en nuestros compuestos les confiere un mayor efecto citotóxico en las líneas celulares evaluadas, que la presencia de grupos morfolínicos. La mayoría de estudios realizados con moléculas de estos tipos son en derivados u otros compuestos que incluyen piperidinas y morfolinas en su estructura, pero no como familia química

principal. Además, el tipo de células tumorales en que se han realizado estos estudios son de origen diverso, siendo las células de cáncer de ovario las más parecidas o cercanas a las que hemos evaluado en este trabajo.

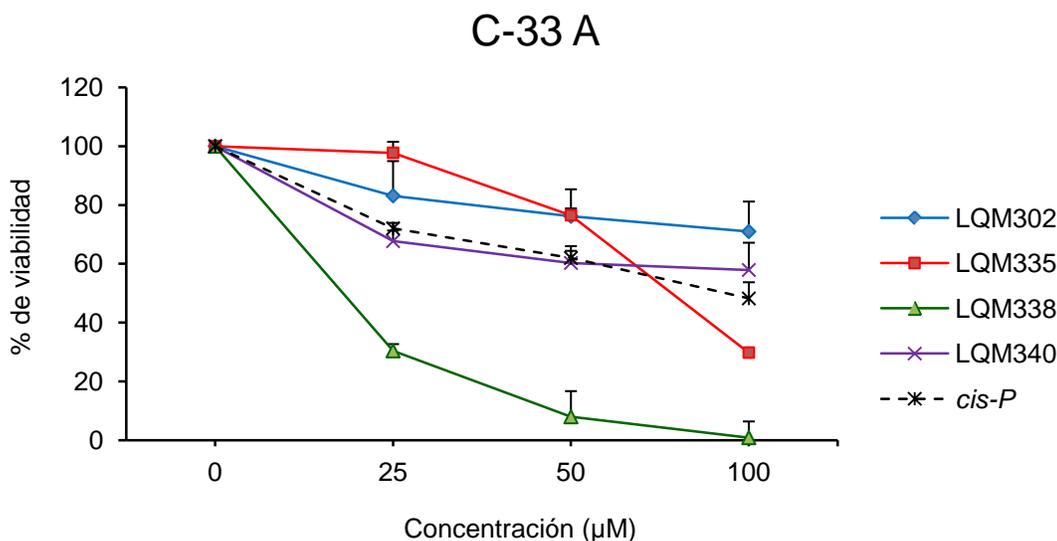


Figura 17. Efecto de 4 compuestos heterocíclicos en la viabilidad de células C-33 A a 24 h de exposición y evaluado con la técnica de MTT. *cis*-Platino (*cis*-P) se utilizó como fármaco de referencia. Se muestra el promedio y error estándar de 3 experimentos independientes.

Para HeLa, SiHa, Ca Ski y C-33 A, LQM335 mostró valores de viabilidad de 66.58, 60.52, 38.23 y 29.79%, respectivamente. Sin embargo, este compuesto fue altamente citotóxico para las células no tumorales (FB), en las que la viabilidad fue de 95.33% a 25 μM, 8.91% a 50 μM y hasta 5.16% a la concentración más alta (100 μM) superando también el efecto del *cis*-Platino en estos cultivos no tumorales. Ninguno de los otros compuestos mostró reducir la viabilidad de los FB a niveles tan bajos de viabilidad, ya que el resto de ellos no mostraron viabilidades menores a 65% (Figura 18). Esto es un resultado no favorable para el compuesto LQM335 ya que se pretende tener compuestos con alto potencial citotóxico para las células tumorales, pero que sea poco selectivo y citotóxico para las células sanas. Clínicamente esto es una desventaja que reduce o podría descartar totalmente la posibilidad del uso de este compuesto en seres humanos, aunque es importante realizar estudios adicionales que confirmen su toxicidad.

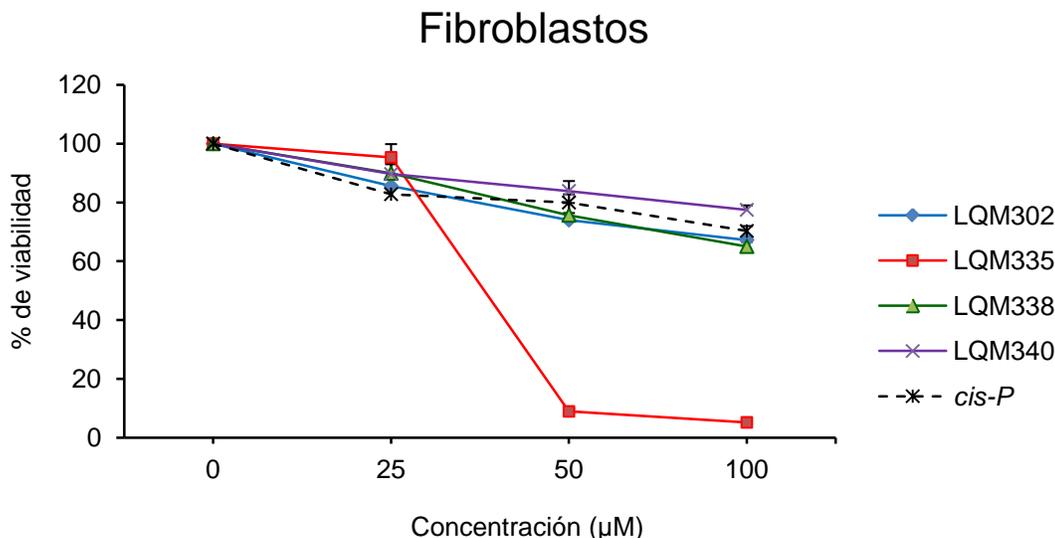


Figura 18. Efecto de 4 compuestos heterocíclicos en la viabilidad de Fibroblastos no tumorales a 24 h de exposición y evaluado con la técnica de MTT. *cis*-Platino (*cis*-P) se utilizó como fármaco de referencia. Se muestra el promedio y error estándar de 3 experimentos independientes.

En cuanto a la concentración necesaria para inhibir al 50% de las células (IC_{50}), el compuesto LQM338 es el que requiere la menor concentración para inhibir a las líneas celulares HeLa (5.34 μ M), C-33 A (14.72 μ M) y SiHa (49 μ M) principalmente. En el caso de HeLa, el valor de IC_{50} para LQM402 fue 3.5 veces menor que lo necesario de *cis*-Platino para tener el mismo efecto (19 μ M), mientras que los otros compuestos tuvieron valores teóricos de IC_{50} por arriba de la concentración más alta evaluada (100 μ M) en esta línea celular. A excepción de los compuestos LQM338 en HeLa, C-33 A y SiHa, así como LQM335 en FB, el *cis*-Platino tuvo valores de IC_{50} menores a los obtenidos para el resto de los compuestos y líneas celulares tumorales confirmando su efectividad como fármaco antineoplásico (Tabla 3).

Tener una elevada IC_{50} para las células no tumorales implica una relativa ventaja en cualquier compuesto para el que se pretende un uso farmacológico. En nuestro estudio pudimos observar que el *cis*-Platino afecta en menor grado a las células no tumorales comparado con su potencial citotóxico en las células tumorales lo que también sucedió para nuestros compuestos, con excepción del LQM335 (Tabla 3).

Tabla 3. IC₅₀ del efecto citotóxico de los compuestos LQM300 que se evaluaron. Concentraciones de los 4 compuestos heterocíclicos y el fármaco de referencia *cis*-Platino que son necesarias para inhibir al 50% de las diferentes células expuestas a ellos durante 24 h.

Línea celular	IC ₅₀ (μM)				
	LQM302	LQM335	LQM338	LQM340	<i>cis</i> -Platino
HeLa	>100	>100	2.62	>100	18.9
SiHa	>100	>100	49.0	>100	69.92
Ca Ski	>100	>100	91.76	>100	66.6
C-33 A	>100	72	0.015	80.73	64.98
Fibroblastos	>100	56	>100	>100	>100

Promedios de al menos tres experimentos independientes, cada uno por triplicado.

Por mencionar algunos ejemplos de estudios de compuestos con grupos piperidínicos con actividad citotóxica, Kasparkova (Kasparkova et al. 2003a) reportó la sustitución de uno de los grupos amino por una piperidina en el *trans*-platino (Figura 19) formando compuestos *trans*-[PtCl₂(NH₃)(pip)], los cuales causaron mayor toxicidad en líneas celulares de ovario sensibles y resistentes a *cis*-Platino (A2780/A2780cisR, 41M/41McisR y CH1/CH1cisR) que el *trans*-Platino, pasando de valores de IC₅₀ mayores de 200 μM a valores menores de 30 μM en las líneas celulares sensibles a *cis*-Platino y menores de 150 μM en las resistentes (Kasparkova et al. 2003a).

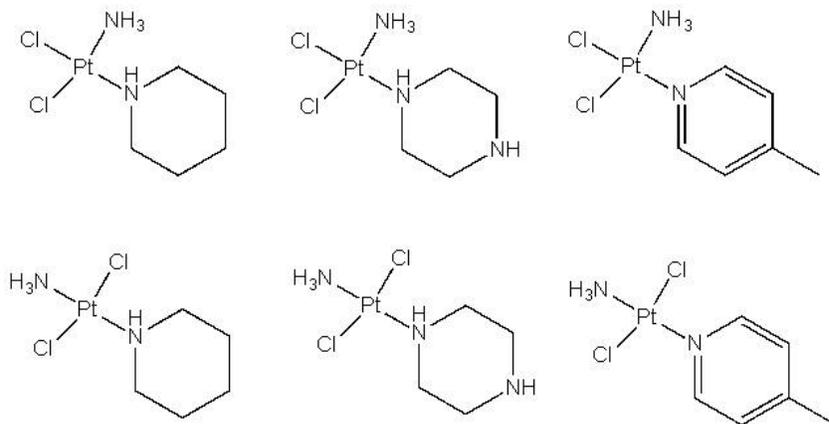


Figura 19. Estructuras de complejos de Platino evaluados por Kasparkova et al. 2003a.

Najajreh y colaboradores (Najajreh et al. 2006) también sintetizaron compuestos derivados del *trans*-Platino, donde algunos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(NH₃)(pip-

pip)]•HCl fueron más potentes que el *cis*-Platino como citotóxicos en las mismas líneas celulares de cáncer de ovario sensibles y resistentes a *cis*-Platino usadas en el trabajo de Kasparkova (Figura 20). Los valores de IC₅₀ que ellos obtuvieron se encontraron entre 15 y 48 μM, mientras que los de *cis*-Platino estuvieron entre 23 y 107 μM (Najajreh et al. 2006).

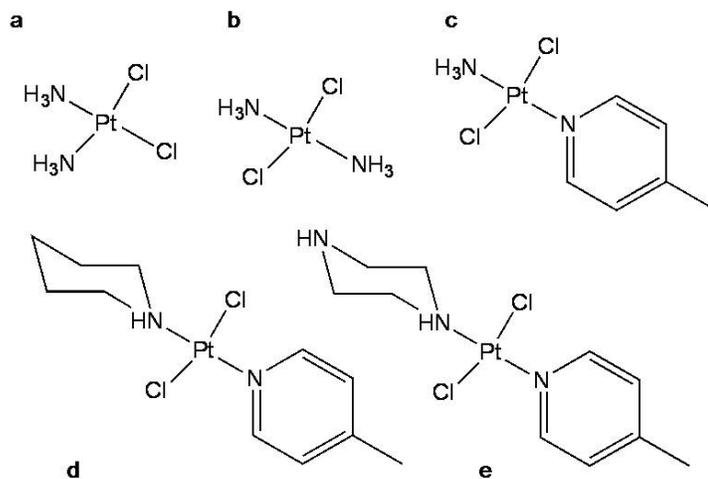


Figura 20. *trans*-Platino (b) y algunos derivados (c-e).

Tanto el *trans*platino como los derivados sintetizados por los grupos de Kasparkova y Najajreh incluyen una piperidina en su estructura, además del metal platino, mientras que nuestros compuestos contienen dos piperidinas y no incluyen éste, ni algún otro metal. Podemos decir entonces que la actividad citotóxica no está relacionada exclusivamente con este metal sino con la estereoisomería de los compuestos pues se ha establecido que *trans*-Platino es un compuesto clínicamente inefectivo (Kasparkova et al. 2003b), mientras que el *cis*-Platino es uno de los mejores agentes quimioterapéuticos (Figura 21) (Casares et al. 2012).

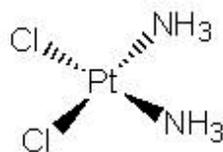


Figura 21. Estructura del *cis*-Platino.

Por otro lado, Pors y colaboradores en 2006 sintetizaron algunas cloroalquilaminoantraquinonas basándose en el uso de bloques de pirrolidin y piperidinil (Figura 22). Varios de sus compuestos mostraron ser potentes citotoxinas contra las células de cáncer de ovario A2780 de tipo silvestre y aquellas resistentes a doxorubicina A2780AD, así como resistentes a *cis*-Platino A2780/cp70 con valores de IC_{50} menores o iguales a 40 nM. Los autores sugieren que la actividad de estos compuestos se debe a la capacidad alquilante de la antraquinona planar aromática común en todas las estructuras. En particular, sus compuestos A (S-pirrolidinil) y B (que contiene una molécula racémica de piperidinil-N-cloroetil) inducen la formación de cruzamientos intercatenarios en el ADN (Pors et al. 2006).

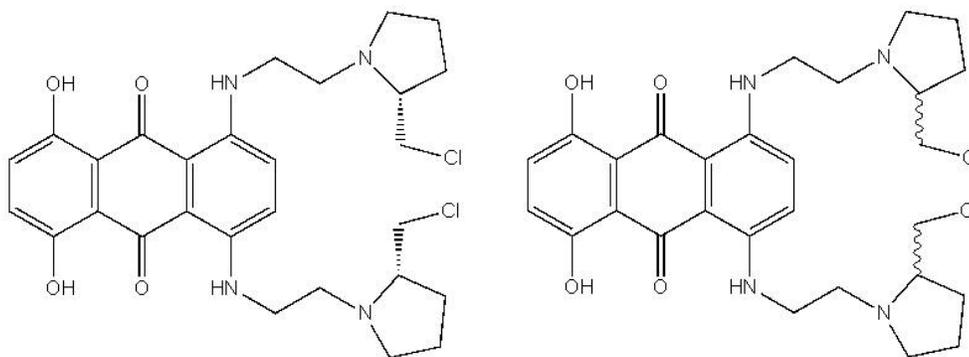


Figura 22. Estructuras de las cloroalquilaminoantraquinonas más citotóxicas evaluadas por Pors et al. 2006.

Comparando nuestros compuestos con las cloroalquilaminoantraquinonas del grupo de Pors, todos tienen dos piperidinas, pero A y B (Figura 22) incluyen además dos átomos de cloro. Los halógenos se han caracterizado por incrementar la actividad biológica en varios compuestos y son muy utilizados en la industria química y alimentaria. Es muy importante su posición como sustituyentes químicos, pero también es conocido que su presencia puede tornar en tóxicas a algunas moléculas (Tiekink and Zukerman-Schpector 2012). En el trabajo de Pors no se evaluó el efecto de sus compuestos sobre células no tumorales para las cuales podría ser citotóxico, pero en el efecto que inducen al ADN, viene implícito su posible carácter mutagénico. Con nuestros resultados pudimos observar que aún sin presencia de algún halógeno, nuestro compuesto LQM338 mostró una actividad citotóxica importante.

Retomando la actividad de nuestro par de compuestos morfolínicos, LQM302 indujo una toxicidad similar en todas las líneas tumorales y en los FB no tumorales, con valores entre 60 y 70% de viabilidad a la concentración de 100 μM (Figuras 14-18). La línea celular más sensible a esta morfolina fue Ca Ski, con una viabilidad de 54.6% e IC_{50} de 123.6 μM , con lo que se puede decir que LQM302 fue selectivo contra esta línea celular, pero requiere concentraciones relativamente altas para inhibir el 50% de células C-33 A y fibroblastos normales (371.2 y 280.5 μM , respectivamente, Tabla 3).

La morfolina LQM340 fue el compuesto menos citotóxico contra las líneas celulares de CaCu HeLa y SiHa (88.31 y 82.33% de viabilidad a 100 μM e IC_{50} de 528.7 y 388.7 μM , respectivamente) y prácticamente inocuo para las células Ca Ski (97.44% de viabilidad a la concentración más alta e IC_{50} mayor a 1 mM). LQM340 fue selectivo contra la línea C-33 A (57.88% de viabilidad a 100 μM e IC_{50} de 8.73 μM) y ligeramente citotóxico para los fibroblastos a la máxima concentración evaluada (77.47% de viabilidad e IC_{50} de 282.9 μM) (Figuras 14-17 y Tabla 3).

Para comparar con otros compuestos que incluyen grupos morfolínicos en su estructura, encontramos diversas referencias en las que pudimos observar que hay coincidencia en que el mecanismo de acción que utilizan es la inhibición de la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). Al igual que con moléculas que contienen grupos piperidínicos, la mayoría de evaluaciones de citotoxicidad de compuestos que llevan grupos morfolínicos se han realizado en varios tipos de células tumorales y no precisamente de cáncer cérvico-uterino. Un trabajo en que se emplearon células HeLa fue el realizado por Ovadekova y colaboradores en 2005. Considerando que las quinazolininas son compuestos biológicamente activos y que han demostrado potencial antitumoral actuando contra diversos blancos terapéuticos, el grupo de Ovadekova evaluó la actividad citotóxica de algunos derivados de quinazolina, de los cuales, el compuesto 3-(5-Nitro-2-tienil)-9-cloro-5-morfolin-4-il[1,2,4]triazolo[4,3-c] quinazolina (NTCHMTQ) (Figura 23) fue el más efectivo sobre las células HeLa (IC_{50} = 8.85 μM a 24 h, 13.99 a 48 h y 6.43 a 72 h, (Jantova et al. 2006). Concentraciones micromolares de este compuesto indujeron cambios morfológicos y necrosis en dichas células, pero no encontraron daño al ADN (Ovadekova et al. 2005).

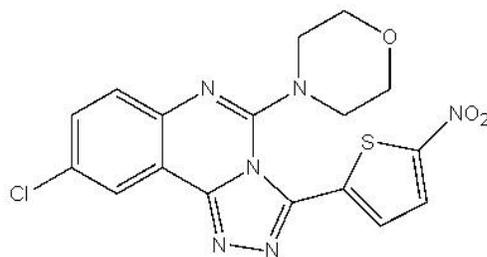


Figura 23. Estructura del 3-(5-Nitro-2-tienil)-9-cloro-5-morfolin-4-il[1,2,4]triazolo[4,3-c]quinazolina (NTCHMTQ).

Esta quinazolina se ha probado también en células de leucemia murina L1210 y en fibroblastos de embrión murino NIH-3T3 resultando citotóxica en esas líneas celulares ($IC_{50} = 3.67$ y $6.81 \mu M$, respectivamente, a 24 h de incubación) e induciendo fragmentación de ADN, cambios morfológicos y la expresión de caspasa-3, lo que sugiere muerte celular por apoptosis (Jantova et al. 2006). Comparado con nuestras morfolininas, la presencia de S, Cl y NO_2 en NTCHMTQ probablemente le otorgan mayor reactividad a esta molécula, ya que ninguno de nuestros compuestos morfolinínicos tuvo valores de IC_{50} semejantes.

Niwa y colaboradores sintetizaron el compuesto 2-[bencil(fenil)-amino]etil-1,4-dihidro-2,6-dimetil-5-(5,5-dimetil-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il)-1-(2-morfolinoetil)-4-(3-nitrofenil)-3-piridincarboxilato (PAK-200, Figura 24) y lo evaluaron en células humanas de carcinoma epidermal KB y las líneas mutantes derivadas resistentes a multifármacos KB-8-5 y KB-C2, determinando que es capaz de revertir la resistencia a Adriamicina (Niwa et al. 1992).

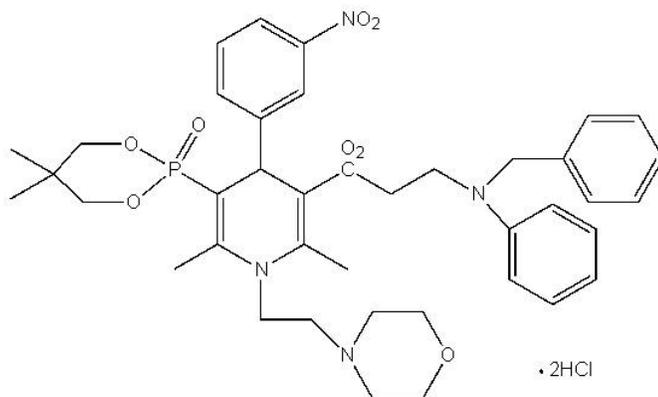


Figura 24. Estructura del compuesto 2-[bencil(fenil)-amino]etil 1,4-dihidro-2,6-dimetil-5-(5,5-dimetil-2-oxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il)-1-(2-morfolinoetil)-4-(3-nitrofenil)-3-piridincarboxilato (PAK-200).

A 5 μM , PAK-200 combinado con Adriamicina incrementa el efecto citotóxico de este fármaco en las células KB-3-1, KB-8-5 y en dos líneas celulares de carcinoma colorectal (COK-28LN y COK-36LN). Esta misma combinación también logró suprimir totalmente el crecimiento de tumores inducidos con KB-3-1 en ratones desnudos y parcialmente los inducidos con KB-8-5 (Niwa et al. 1992). Nuevamente observamos la presencia del grupo nitro en esta molécula, que además de contener tanto una morfolina como una piperidina, también contiene más sustituyentes y/o regiones que pueden interactuar con otras moléculas y por tanto inducir efectos biológicos en una célula.

Rewcastle y colaboradores, utilizando estudios de relación estructura-actividad, sintetizaron y evaluaron análogos del inhibidor de PI3K, ZSTK474 (Figura 25). Algunos de sus compuestos tuvieron mayor potencia que ZSTK474 contra las tres enzimas de esta vía de señalización y otras mutantes de las isoformas p110. Los análogos se evaluaron en células NZBS obtenidas de un paciente con meduloblastoma que contenían la forma silvestre del gen p110 α y en células NZOV9 obtenidas de carcinoma de ovario y que expresan una enzima mutante de p110 α . Los valores de IC_{50} que obtuvieron fueron tan bajos como 0.01 μM . La mayoría de las IC_{50} de nuestros compuestos son, por mucho, más altas; pero la de LQM338 en células C-33 A es comparable a este valor (0.015 μM). Algunos de los compuestos de Rewcastle no sólo contienen morfolininas, sino también una molécula de piperidina. En general e independientemente de los sustituyentes (R), todos sus compuestos fueron citotóxicos contra las dos líneas celulares que evaluaron. La actividad inhibidora de PI3K varía de acuerdo a R, en donde el difluorometil fue relevante para reducir la IC_{50} necesaria para inhibir la fosforilación de PI3K y sus isoformas (Rewcastle et al. 2011).

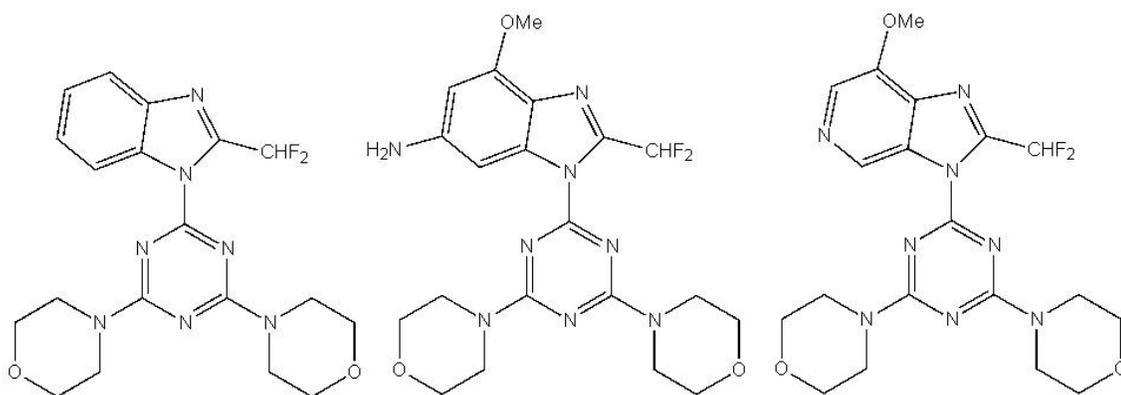


Figura 25. Estructura de algunos compuestos derivados del inhibidor de PI3K (ZSTK474).

Otro compuesto que incluye morfolina y también es inhibidor de PI3K es el NVP-BKM120 (Figura 26), una 2,6-dimorfolina pirimidina evaluada por Maira y colaboradores. Este compuesto inhibió todas las isoformas de PI3K clase I y disminuyó los niveles de una proteína muy importante en la vía de PI3K, la proteína quinasa B (Akt) en algunos modelos y líneas tumorales. La evaluación de su citotoxicidad se realizó en un panel de 353 líneas celulares tumorales inhibiendo la proliferación principalmente de aquellas que contenían mutaciones en el gen PIK3CA (Maira et al. 2012).

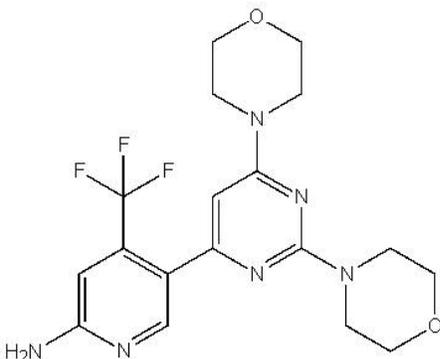


Figura 26. Estructura del inhibidor de PI3K (NVP-BKM120).

NVP-BKM120 mostró una potente actividad antiproliferativa y proapoptótica en células tumorales e inhibió el crecimiento tumoral en modelos *in vivo*. NVP-BKM120 inhibe a PI3K α uniéndose al dominio lípido quinasa del ATP con puentes de hidrógeno formados por el oxígeno del grupo 2-morfolina y el nitrógeno exocíclico en la posición 6 del sustituyente piridil y afectando la V_{max} y la K_m del ATP (Maira et al. 2012). Con esto podemos decir que las morfolinás también podrían estar jugando un papel importante en la actividad citotóxica de nuestros compuestos, pues tanto los oxígenos como los nitrógenos de éstas pueden actuar como aceptores de puentes de hidrógeno para unirse con moléculas blanco como el ATP, alterando sus actividades enzimáticas y por consiguiente, perturbando procesos celulares.

8.1.2 Efecto antioxidante de los compuestos LQM300

La presencia de especies pro-oxidantes conduce a mutaciones asociadas a la progresión de un proceso tumoral, por lo que se recomienda el consumo de antioxidantes

para la prevención no sólo del cáncer sino de otras patologías (Sánchez and Mendoza 2003). En el caso de tumores ya establecidos, el consumo y/o administración de antioxidantes puede también contrarrestar los daños subsecuentes generados por la elevada producción de EROs en las células cancerosas (Nicco et al. 2005). Por otro lado, muchos compuestos heterocíclicos, como los flavonoides, son ampliamente reconocidos por su actividad antioxidante; sin embargo, a concentraciones elevadas pueden ser citotóxicos causando daño mitocondrial y muerte celular por la vía intrínseca de la apoptosis (Marozienne et al. 2012).

La información anterior nos llevó a querer conocer el potencial antioxidante de los cuatro compuestos heterocíclicos, por lo que estos fueron evaluados a concentraciones de 1, 10 y 100 μM como reductores del radical libre DPPH en un ensayo preliminar, en donde se observó que el compuesto LQM302 mostró muy baja actividad como reductor. Posteriormente, se evaluó el resto de los compuestos en rangos más estrechos de concentración, obteniendo las respectivas curvas de reducción del DPPH. Los fármacos de referencia utilizados fueron quercetina y α -tocoferol, ampliamente conocidos por su potencial antioxidante. Con excepción de la morfolina LQM302 que presentó un porcentaje de inhibición del DPPH de 7.01 a la concentración máxima evaluada ($100 \mu\text{M}$), los compuestos heterocíclicos evaluados mostraron potencial como antioxidantes en forma dependiente de la concentración, ya que fueron capaces de reducir al radical DPPH desde concentraciones cercanas a 10 μM y alcanzar valores de inhibición de este radical mayores de 70% a 100 μM en un comportamiento semejante al de los fármacos de referencia (Figura 27).

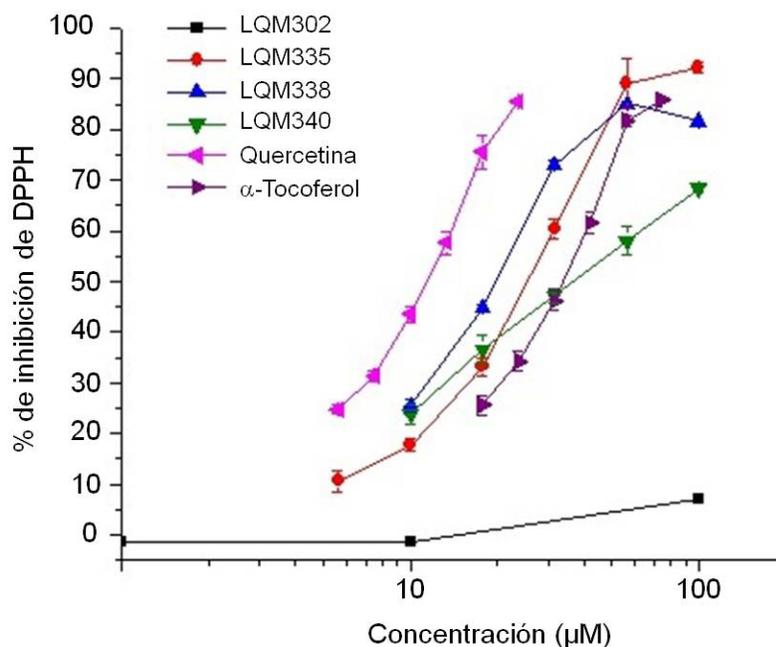


Figura 27. Capacidad antioxidante de cuatro heterocíclicos de la serie LQM300 evaluada como porcentaje de inhibición de DPPH. Promedios y error estándar de 3 - 4 experimentos independientes, cada uno por triplicado. Los fármacos de referencia fueron Quercetina y α -Tocoferol.

El compuesto que le siguió al LQM302 en incremento de actividad fue la piperidina LQM340, aunque comparado con la morfolina LQM302, mostró una importante inhibición del DPPH alcanzando el 75.01% de inhibición a la concentración de $100 \mu\text{M}$. De los heterocíclicos, siguieron en actividad la morfolina LQM335 y la piperidina LQM338, ambas mostraron un efecto inhibidor del DPPH que superó al del α -Tocoferol desde la primer concentración evaluada ($10 \mu\text{M}$) en el sentido de que este fármaco requirió mayores concentraciones para alcanzar el mismo porcentaje de inhibición del DPPH. A la concentración de $56.23 \mu\text{M}$, LQM335, LQM338 y α -Tocoferol presentaron valores similares de inhibición del DPPH (89.17, 85.21 y 81.76%, respectivamente) por lo que podemos decir que nuestros compuestos superaron el efecto antioxidante del fármaco de referencia α -Tocoferol.

Tabla 4. IC₅₀ de los compuestos heterocíclicos y los fármacos de referencia Quercetina y α -Tocoferol para reducir el radical DPPH.

Compuesto	IC ₅₀ (μ M)
LQM302	> 100
LQM335	24.20 \pm 0.63
LQM338	19.44 \pm 0.40
LQM340	38.61 \pm 3.31
Quercetina	10.89 \pm 0.47
α -Tocoferol	31.74 \pm 1.04

Promedios y error estándar de 3 - 4 experimentos independientes.

El fármaco de referencia Quercetina fue el que mostró el mayor efecto antioxidante al alcanzar una reducción del 85.53% del DPPH a 23.7 μ M y, por consiguiente, tuvo la IC₅₀ más baja, seguida por nuestros compuestos LQM338 y LQM335 (Tabla 4).

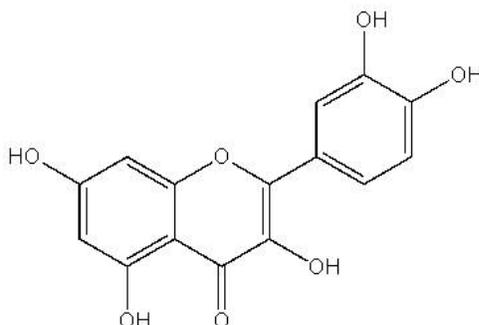


Figura 28. Estructura de la Quercetina.

La Quercetina, o 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona (Figura 28) es un flavonoide presente en una amplia variedad de frutas y vegetales. Se le han atribuido diversas propiedades como antialérgico, antiproliferativo, pro-apoptótico, atenuante de hipertrofia cardíaca, gastroprotector, hipotensivo, antiviral, antidepresivo, antiinflamatorio y antioxidante. Numerosos estudios se han enfocado a este potencial antioxidante y los efectos protectores que implica (Kelly 2011).

Por su parte, el α -Tocoferol o vitamina E (Figura 29) se encuentra abundantemente en nueces, semillas, aceites vegetales, hojas de verduras y en algunas frutas. Además de sus propiedades antioxidantes, se le ha implicado en la función inmunológica, señalización

celular, regulación de expresión genética y otros procesos metabólicos (Brigelius-Flohe and Traber 1999, Traber and Atkinson 2007).

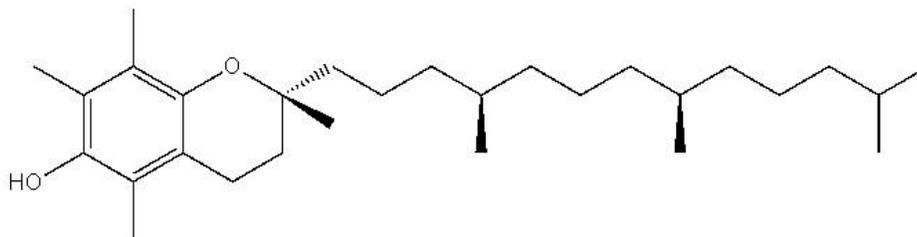


Figura 29. Estructura del α -Tocoferol.

Ambos fármacos son de origen vegetal y ampliamente conocidos por sus propiedades antioxidantes aunque poseen estructuras muy diferentes. Quercetina, con su gran número de sustituyentes hidroxilos, puede fácilmente donar hidrógenos y reducir los radicales libres, lo que podría estar influyendo en su mayor actividad para reducir el DPPH. α -Tocoferol, aunque tiene un hidroxilo, son grupos metilo los que constituyen la mayoría de sus sustituyentes; estos también pueden fungir como donadores de hidrógenos y del número de ellos depende su actividad antioxidante, pero otra ventaja importante de esta molécula es su capacidad de penetrar en las membranas biológicas debido a la cadena lateral lipofílica (Traber and Atkinson 2007).

Con respecto a estos fármacos de referencia, nuestros heterocíclicos tienen más parecido con la Quercetina que con el α -Tocoferol, principalmente porque carecen de la cadena alifática. Si consideramos el número de grupos hidroxilo, concuerda que nuestra piperidina LQM338 tiene el mayor número de hidroxilos y también fue el compuesto que mostró un mayor efecto antioxidante. Sin embargo, con los tres compuestos restantes no se sigue el mismo patrón, pues aunque todos poseen dos grupos hidroxilo en su estructura, LQM335 tuvo una importante actividad antioxidante, mientras que LQM302 careció de tal actividad, por lo que podemos considerar que la posición o arreglo espacial tienen gran influencia.

Con respecto a compuestos que contienen piperidinas y mostraron actividad antioxidante evaluada con la técnica del DPPH, se encontraron referencias de algunas moléculas presentes en organismos como plantas e insectos, así como de origen sintético, por lo que se menciona un ejemplo de cada uno de ellos.

Las especies arbóreas *Senna* y *Cassia* son conocidas por tener un amplio espectro farmacológico y uso en medicina tradicional, especialmente en enfermedades asociadas a la inflamación, por lo que se han evaluado algunos compuestos aislados de ellas. Las piperidinas (+)-2-Metil-3-feruloil-6-(dodecil-11'-ona)piperidina (1), (-)-espectralina (2) y (-)-3- O-acetilespectralina (3) aisladas de extracto metanólico de *Senna spectabilis* por Viegas y colaboradores en el 2007 fueron evaluadas para conocer sus propiedades antioxidantes (Figura 30). En la prueba de DPPH, las dos últimas piperidinas mostraron una actividad débil como atraparoras de radicales libres, mientras que (1) mostró una mayor actividad (40% de inhibición a 126 μM) que fue atribuida a la molécula de feruloil (Viegas et al. 2007). En este trabajo la molécula de referencia fue Rutina, con un porcentaje de inhibición de 92% a 98.27 μM que es menor actividad con respecto a nuestros fármacos de referencia Quercetina y α -Tocoferol los cuales fueron capaces de alcanzar esos niveles de inhibición del DPPH a concentraciones más bajas. De igual forma, nuestros compuestos piperidínicos superan en actividad a las piperidinas evaluadas por Viegas y colaboradores, ya que nuestra máxima concentración evaluada fue 100 μM y los porcentajes de inhibición a esa concentración fueron mayores de 65% de inhibición.

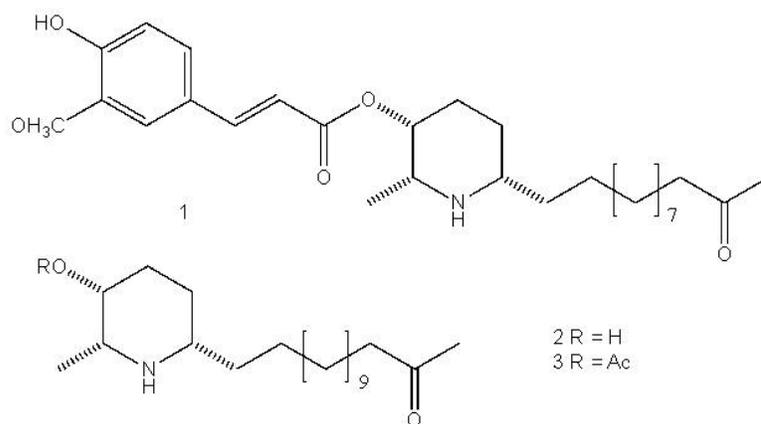


Figura 30. Estructuras de las piperidinas (+)-3-O-feruloicasina (1), (-)-espectralina (2) y (-)-3-O-acetilespectralina (3).

En la medicina tradicional de China y Corea, el ciempiés *Scolopendra subspinipes* ha sido utilizado para el tratamiento de enfermedades tan diversas como espasmos, convulsiones infantiles, difteria y tetanos. En la búsqueda de sustancias biológicas contra la oxidación de lipoproteínas a partir de insectos, los extractos metanólicos de *S.*

subspinipes mostraron potente actividad antioxidante; por lo que Yoon y colaboradores en 2006 evaluaron la actividad antioxidante de los compuestos 3,8-dihidroxiquinolina (1) 2,4-di-*tert*butilfenol (2) y 2,8-dihidroxi-3,4-dimetoxiquinolina (3) (Figura 31) mediante diversos métodos, entre ellos la reducción del radical DPPH. Incubando el radical DPPH durante 35 min con 100 μ M de sus compuestos, los compuestos 2 y 3 presentaron una inhibición de 25 y 7% respectivamente, mientras que el compuesto 1 mostró una inhibición del 64%. Comparando entre sí los compuestos 1 y 3, notamos nuevamente que la presencia de dos grupos aromáticos OH en el compuesto 1 le dio mayor actividad que un grupo metoxi en el compuesto 3 (Yoon et al. 2006). Esto refuerza la idea de que el mayor número de grupos OH en nuestro compuesto LQM338 fue lo que le confirió mayor actividad como reductor del DPPH.

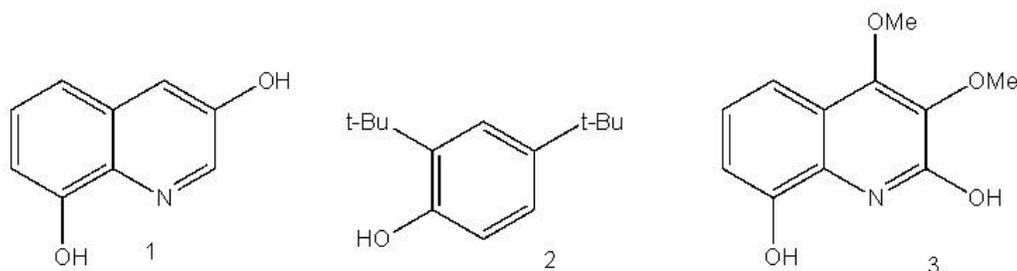


Figura 31. Estructura de los compuestos 3,8-dihidroxiquinolina (1), 2,4-di-*tert*-butilfenol (2) y 2,8-dihidroxi-3,4-dimetoxiquinolina (3) obtenidos de extracto metanólico de *S. subspinipes*.

Debido a la relevancia que tiene el estrés oxidativo en diversas patologías, no sólo se buscan productos naturales con actividad antioxidante sino que también se tiene interés en la síntesis de nuevos compuestos con esta actividad. Diversos metabolitos secundarios obtenidos del género *Piper*, entre ellos la piperina como el más relevante, han demostrado poseer propiedades antipirética, analgésica, insecticida, antiinflamatoria, antitumoral y antidepresiva, por lo que Prashanth y colaboradores sintetizaron un trans-isómero y otros análogos del producto natural 1-[1-oxo-3(3,4-metilenedioxi-5-metoxifenil)-2Z-propenil] piperidina (Figura 32) obtenido de raíces de *Piper nigrum* y les evaluaron la actividad antimicrobiana, antioxidante y antidepresiva. En la prueba del DPPH, todos sus compuestos (8a-8j) fueron capaces de reducir a este radical y los autores reconocen la importancia de los grupos hidroxilos en los compuestos con mayor actividad antioxidante (8b y 8c) (Prashanth et al. 2012).

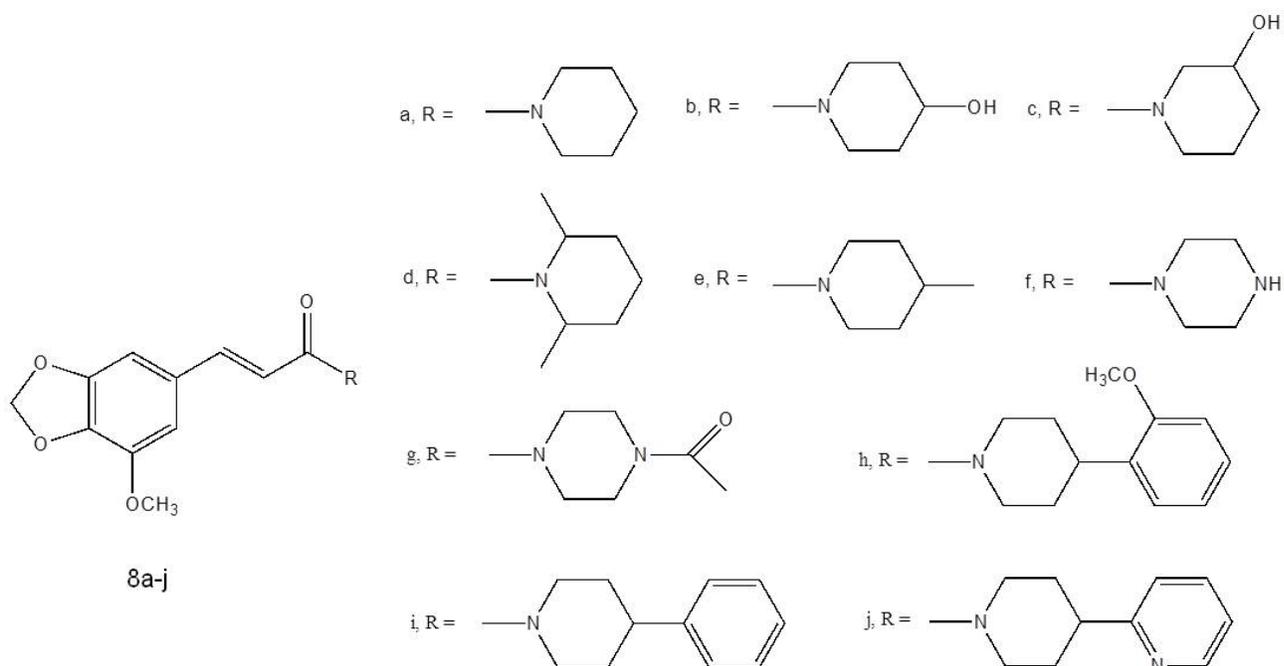


Figura 32. Derivados del 1-[1-oxo-3(3,4-metilenedioxi-5-metoxifenil)-2Z-propenil] piperidina.

El número de referencias de compuestos que contienen grupos morfólinicos y que mostraron actividad antioxidante evaluada con la técnica de DPPH es menor con respecto a los encontrados para piperidinas, pero entre ellos encontramos a las tiomorfolidas, que son estructuras de importancia en química medicinal por su actividad biológica contra infecciones bacterianas, anti-ulcerativas, fungicidas y herbicidas, además de su uso para la síntesis de heterocíclicos. Utilizando estas estructuras, el grupo de Bandgar sintetizó una serie de tiomorfolinas (Figura 33) a las que se les evaluó, entre otras pruebas, su actividad antioxidante con la prueba de DPPH. De sus compuestos, las estructuras 4a, 4c, 4d y 4f-4h fueron las que presentaron actividad para reducir al radical libre DPPH con porcentajes de inhibición entre 21 y 36%, pero sin llegar a los niveles alcanzados por su compuesto de referencia butilhidroxianisol (BHA), que fue de 72.34% (Bandgar et al. 2010).

Las estructuras de este grupo de investigación no difieren por mucho de las nuestras, aunque es ampliamente conocido que un solo átomo y/o posición puede ser relevante para cambiar radicalmente la actividad. La diferencia más notoria es la presencia de azufre, que en este caso podemos notar que no tuvo relevancia en la actividad antioxidante puesto que nuestros compuestos son más activos y no cuentan con la

presencia de este átomo. Los grupos metil y metoxi tampoco incrementaron de manera importante la actividad para reducir al DPPH, mientras que su compuesto 4g, que contiene un grupo OH, fue el que tuvo mayor actividad antioxidante.

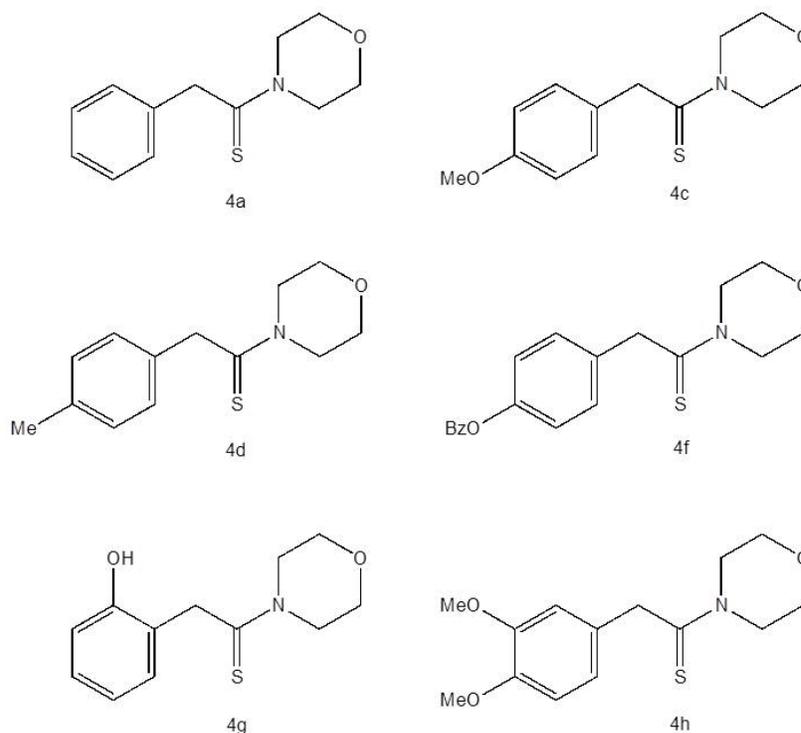


Figura 33. Estructuras de algunas tiomorfolinas sintéticas con actividad antioxidante.

Existen reportes de otras morfolinas con actividad antioxidante pero evaluada mediante técnicas diferentes a la reducción del DPPH. Así, podemos mencionar la síntesis de la 2-bifenilmorfolina y sus derivados por Chrysselis con el objetivo de obtener moléculas que combinaran actividad antioxidante e hipocolesterolémica (Chrysselis et al. 2000).

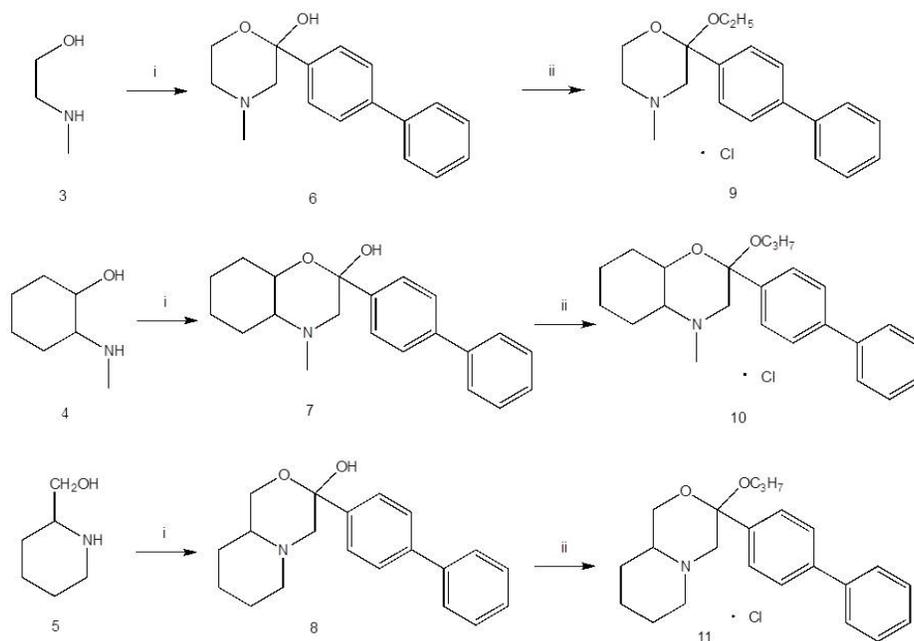


Figura 34. Estructuras de algunos derivados de morfolinás.

La actividad antioxidante de estas morfolinás la evaluaron mediante la determinación espectrofotométrica de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico formadas por la incubación de estos compuestos con una fracción microsomal hepática de rata inactivada con calor (Figura 34). Sus compuestos del 6 al 11 inhibieron casi completamente la reacción de peroxidación de la fracción microsomal inducida con FeSO_4 $10 \mu\text{M}$ a una concentración de 1mM , mientras que los compuestos 6 y 10 tuvieron un 96 y 78% de inhibición a 0.5mM , respectivamente. Su compuesto más activo como antioxidante fue el 7 con una IC_{50} de $250 \mu\text{M}$. Los autores también mencionan que es conocido que el carácter lipofílico de las moléculas antioxidantes es un factor importante para la protección contra la oxidación y en su estudio encontraron que su compuesto más lipofílico (2) fue el menos antioxidante, mientras que los menos lipofílicos (6-8) fueron mejores inhibidores de la peroxidación (Chrysselis et al. 2000).

En 2004, Tavridou y Manolopoulos evaluaron las propiedades antioxidantes mediante TBARS y DPPH de las 2-bifenilmorfolinás 2-(4-bifenil)-4-metil-octahidro-1,4-benzoxazin-2-ol, hidrobromuro (EP2306) y 2-(4-bifenil)-2-(3-nitro-oxipropoxi)-4-metilmorfolina, hidrobromuro (EP2302) de la serie reportada previamente por Chrysselis y colaboradores. Su evaluación de TBARS se realizó en conejos hiperlipidémicos, los cuales

redujeron sus niveles de TBARS después del tratamiento por 4 semanas con 10 mg/kg de EP2306. En sus experimentos con DPPH no observaron efecto reductor dependiente del tiempo con ninguno de los compuestos a concentraciones entre 50 μ M y 1 mM, mientras que su compuesto de referencia (vitamina E) mostró una reducción de 66% ~~a 20~~. Durante el estrés oxidativo, la oxidación de lipoproteínas de baja densidad involucra la acción de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, con sus resultados, los autores consideraron que sus compuestos no actúan a través de la actividad de atrapadores de radicales libres, por lo que la protección de peroxidación debe atribuirse a otro mecanismo, pero que el potencial para actuar como antioxidantes en conejos hiperlipidémicos sugiere que pueden ser beneficiosos para reducir aterosclerosis *in vivo* (Tavridou and Manolopoulos 2004).

En este trabajo, nosotros también evaluamos la actividad antioxidante de los heterocíclicos de la serie 300s en la prueba de TBARS. En nuestro caso, la inducción de peroxidación también se realizó con FeSO_4 10 μ M, pero nuestra fuente lípida fue un homogeneizado de cerebro de rata. En la Figura 35 se observa que nuestros compuestos LQM302 y LQM340 fueron los que tuvieron menor efecto inhibitor de la peroxidación lipídica (22.87 y 22.80% de inhibición a la concentración de ~~100~~, respectivamente). Aunque este dato nos indica que el compuesto LQM302 puede tener una capacidad débil para inhibir la peroxidación, podemos decir que su efecto es semejante al resultado que este mismo compuesto tuvo en la reducción del DPPH, lo cual confirma su efecto antioxidante débil. Por su parte, la piperidina LQM340 mostró un buen resultado como reductor del radical DPPH, pero su efecto para inhibir la lipoperoxidación fue bajo.

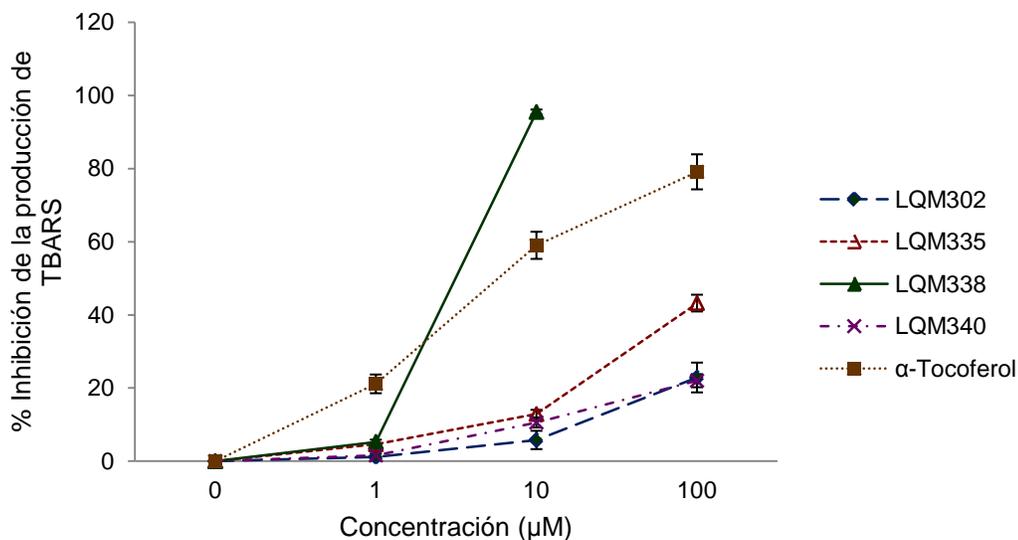


Figura 35. Efecto de los heterocíclicos de la serie LQM300 en la inhibición de peroxidación lipídica inducida con FeSO_4 10 μM en homogeneizado de cerebro de rata. α -Tocoferol se utilizó como fármaco de referencia. Promedios y error estándar de 3 experimentos independientes.

No obstante los ensayos de DPPH y TBARS son ampliamente utilizados para evaluar el efecto antioxidante, con el primero podemos determinar principalmente la capacidad de un compuesto o sustancia para atrapar radicales libres, mientras que el segundo más bien estima la peroxidación de lípidos en membranas y sistemas biológicos, además de que nos indica si la sustancia de prueba es capaz de proteger o inhibir dicha peroxidación (Prakash et al.), por lo que es completamente válido que un compuesto pueda ser un buen atrapador o reductor de radicales libres *in vitro*, pero no tener efecto en otro tipo de sistemas como es el caso del LQM340. El compuesto LQM335 tuvo muy buena actividad en la prueba de DPPH y moderada para inhibir la peroxidación (43.21% a 100 μM), mientras que LQM338 fue el compuesto con mayor actividad, pues inhibió el 95.46% de la peroxidación apenas a 10 μM (en TBARS) e igualmente fue uno de los más efectivos para reducir el DPPH, superando en ambos casos la actividad del fármaco de referencia α -Tocoferol. Esto coloca al compuesto LQM338 como nuestro compuesto con mejor actividad biológica tanto como citotóxico, antioxidante e inhibidor de lipoperoxidación (Figura 35).

Entre otros compuestos piperidínicos, los nitróxidos de piperidina tales como el Tempo (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil), Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-

oxil) y Tempamina son radicales cíclicos estables y permeables en las células y han mostrado actividad antineoplásica, participación en el ciclo de óxido-reducción y propiedades pro-oxidativas (Wasserman et al. 2007), por lo que consideramos importante compararlos con nuestras piperidinas. En el estudio de Czepas y colaboradores (2008), se evaluó la actividad protectora de los nitroxidos de piperidina Tempamina (4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) y Tempace (4-acetamido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) sobre la peroxidación lipídica inducida con doxorubicina cuantificando la presencia de TBARS en lisado de fibroblastos B16 tratados con 20-200 μM de estos compuestos durante 1 h y en combinación con doxorubicina (μM) por 2 h. Los compuestos de referencia Tempo y Tempol, así como Tempace, no mostraron influencia por sí solos en el nivel de TBARS en las células y sólo Tempamina causó una disminución en los niveles de TBARS a la concentración de $50 \mu\text{M}$. Doxorubicina 10 μM indujo un 20% de incremento en los niveles de TBARS con respecto al control, el cual fue inhibido significativamente cuando este fármaco fue aplicado en combinación con los nitroxidos de piperidina. El efecto protector de los nitroxidos fue dependiente de la concentración, siendo Tempo y Tempace los más efectivos como antioxidantes en el rango entre 40 y 200 μM (Czepas et al. 2008) (Figura 36).

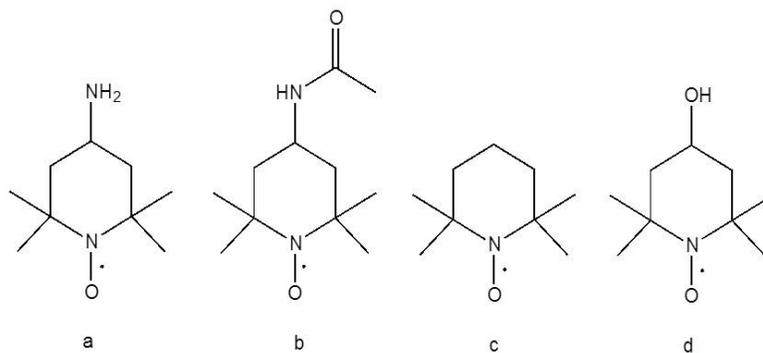


Figura 36. Estructuras de los nitroxidos de piperidina (a) Tempamina, (b) Tempace, (c) Tempo y (d) Tempol.

Comparando con nuestra evaluación, los nitroxidos de piperidina inhibieron entre 20 y 40% la peroxidación inducida con doxorubicina en los lisados celulares aún a concentraciones de hasta 200 μM , valores que son similares a la inhibición que la mayoría de nuestros compuestos tuvieron en la peroxidación inducida con FeSO_4 en homogeneizado de cerebro de rata, y ningún nitroxido obtuvo valores semejantes al de

nuestro compuesto más efectivo (LQM338) que inhibió casi el 100% de peroxidación a la concentración de 10 μ M. Cabe mencionar que estos autores también utilizaron el sulfato en todas sus muestras para poder obtener cantidades cuantificables y posteriormente adicionaron la doxorubicina para aumentar la peroxidación y que si bien la fuente de lípidos es distinta, se pueden considerar como sistemas homólogos a diferente nivel celular. En el trabajo de Czepas y colaboradores, los sustituyentes en la posición 4 de sus nitroxidos son los responsables de cambios en la carga molecular, lipofilicidad y permeabilidad, y por consiguiente, del comportamiento y efecto de ellos en las células. Particularmente, aquellos que poseen un grupo amino, hidroxilo o acetamida en dicha posición, son los que mostraron propiedades antioxidantes (Czepas et al. 2008).

Estructuralmente, los nitroxidos son más sencillos que nuestros heterocíclicos puesto que los primeros sólo contienen una piperidina, mientras que nuestros compuestos poseen 2 y además tienen sustituyentes que son más estables que los grupos hidroxilo en los nuestros, lo que reduce la posibilidad de ceder electrones para contrarrestar el efecto oxidativo y los hace menos efectivos que nuestros heterocíclicos para inhibir la peroxidación lipídica.

8.1.3 Evaluación de la genotoxicidad de los compuestos LQM300

En todo el mundo, el descubrimiento o creación de un nuevo agente terapéutico no se queda en las investigaciones de laboratorio *in vitro* e *in vivo* si es que se pretende comercializar, sino que requiere de pruebas en animales superiores o pacientes terminales y aprobaciones legales para que esto ocurra. La agencia gubernamental “Food and Drug Administration” (FDA) es responsable de cuidar la salud pública de los Estados Unidos mediante el control de la seguridad y eficacia de fármacos, productos biológicos, material médico, alimentos, cosméticos y aparatos que emiten cualquier tipo de radiación utilizados en seres humanos y animales, por lo cual se considera la agencia con el mayor grado de seguridad. Teniendo en cuenta que el mercado de los Estados Unidos es el primero en el mundo, la FDA concentra un gran número de recursos en regular la comercialización de productos y sus estándares se aplican en muchos otros países. La evaluación de la toxicidad es uno de los principales estándares que cualquier producto de uso o consumo humano debe cubrir (Food and Drug Administration 2010), por lo que en este trabajo se

utilizó el método de incorporación de la prueba de Ames para conocer el potencial genotóxico de nuestros heterocíclicos LQM302, LQM335, LQM338 y LQM 340 sobre tres cepas de *S. typhimurium*, a las concentraciones de 50, 100 y 200 μM /placa con y sin la adición de un activador metabólico (mezcla S9). En los resultados de la prueba de Ames, un producto se considera como mutágeno cuando el número de colonias formado después de la incubación de las bacterias con dicho producto es dos veces mayor o más que el número de colonias que revirtieron espontáneamente su mutación en las placas sin tratamiento (Maron and Ames 1983).

En la Tabla 5 podemos observar que ninguno de los compuestos LQM evaluados superó el doble del número de colonias revertantes formadas con el vehículo DMSO, ni siquiera incluso cuando las bacterias se incubaron con los compuestos y el activador S9, lo que indica que nuestros heterocíclicos no son mutagénicos.

A pesar de que las pruebas de toxicidad son muy importantes para que un posible fármaco pueda ser usado de forma segura, la mayoría de artículos publicados sobre compuestos con actividad biológica carecen de información sobre su efecto tóxico en los mismos sistemas empleados u otros. Para comparar el efecto genotóxico de nuestros heterocíclicos con compuestos similares encontramos que Gallez y colaboradores (1992) reportaron que tres de seis radicales piperidinoxil fueron mutagénicos contra *S. typhimurium* de la cepa TA100 a concentraciones de 50 mM o mayores y que esta cepa fue la más sensible a tales compuestos con respecto a las cepas TA98 y TA102. Esta mutagenicidad fue asociada a la naturaleza de radicales libres de los compuestos que evaluaron y a la resistencia que tienen a ser reducidos (Gallez et al. 1992). Aquí es importante resaltar la diferencia en las concentraciones que estos autores usaron comparadas con las que utilizamos en este trabajo, pues nuestra máxima concentración evaluada fue de 200 μM y el grupo de Gallez utilizó 50 mM como concentración mínima evaluada, esto es 1000 veces mayor a nuestra menor concentración evaluada, a la cual probablemente los nitroxidos de Gallez tendrían un efecto distinto, y aunque el efecto mutagénico de compuestos tipo piperidinoxil puede atribuirse a sus propiedades pro-oxidantes, hasta los mejores fármacos han demostrado ser tóxicos a dosis elevadas.

Tabla 5. Efecto mutagénico de los compuestos heterocíclicos LQM300 en tres cepas de *Salmonella typhimurium*.

Cepa	Compuesto	Concentración ($\mu\text{M}/\text{caja}$)	Número de colonias (Promedio \pm Desviación estándar)					
			TA 98		TA 100		TA 102	
			S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
	DMSO		21.67 \pm 2.48	29.33 \pm 6.89	200 \pm 20.27	242.1 \pm 28.6	245.2 \pm 37.6	376.2 \pm 17.6
	LQM302	50	26.5 \pm 4.88	31.66 \pm 5.92	128.8 \pm 21.4	152.8 \pm 13.5	266.4 \pm 20	316 \pm 62.97
		100	27.83 \pm 10.34	33.5 \pm 8.36	144.3 \pm 17.1	139.8 \pm 15	284.7 \pm 27.7	332.8 \pm 66.3
		200	21.33 \pm 3.93	31.66 \pm 4.59	156.6 \pm 22.9	139.5 \pm 28.1	286.6 \pm 65	336.8 \pm 69.4
	LQM335	50	33.33 \pm 9.52	31.3 \pm 10.46	131 \pm 24.69	140.8 \pm 27.1	318 \pm 81.21	335.2 \pm 62
		100	26.83 \pm 2.48	35 \pm 8.64	147 \pm 13.82	131.1 \pm 16.8	331.2 \pm 87.2	358.3 \pm 81.4
		200	26.2 \pm 10.035	31.83 \pm 4.53	149.3 \pm 23.1	132.1 \pm 25.3	295.3 \pm 70.8	323.2 \pm 79.7
	LQM338	50	22.16 \pm 3.81	25 \pm 3.68	202 \pm 59.46	254 \pm 71.3	274.7 \pm 44.1	432.8 \pm 20.1
		100	21.66 \pm 6.97	22.5 \pm 3.88	195.5 \pm 33.6	232.3 \pm 55.2	273.6 \pm 33.1	445.6 \pm 15.8
		200	23.66 \pm 4.22	25.5 \pm 4.63	195.8 \pm 34.8	214 \pm 63.24	224.3 \pm 45.7	415.2 \pm 14.9
	LQM 340	50	22.66 \pm 6.53	28.83 \pm 5.15	239.16 \pm \pm 59	206.8 \pm 48.6	316.1 \pm 54.8	490.4 \pm 18.3
		100	28.66 \pm 5.98	21.5 \pm 4.37	210.1 \pm 67.2	249.5 \pm 90.7	236.7 \pm 38.9	459.3 \pm 17.2
		200	25.66 \pm 7.36	30.33 \pm 7.76	192.8 \pm 52.2	243 \pm 106.5	285.8 \pm 30.3	463.5 \pm 24.2
	AP	50 μg	77.33 \pm 18.14					
	2AA	10 μg	2919 \pm 425.9					1253 \pm 44.9
	NMNG	10 μg	8033.6 \pm 535					
	CF	500 μg	507 \pm 22.87					
	MIT C	10 ng	1891 \pm 154.6					

Promedios de 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado \pm error estándar. Ácido piclónico (AP), 2-aminoantraceno (2AA), N-metil-N'-nitro-N-Nitrosoguanidina (NMNG), Ciclofosfamida (CF) y Mitomicina C (Mit C) fueron utilizados como controles positivos.

Posteriormente, en el 2008 se reportó el estudio del papel que juega el nitróxido de piperidina Tempol sobre la genotoxicidad inducida por cadmio y cromo en linfocitos humanos, los cuales utilizaron por su conocida toxicidad asociada a la generación de estrés oxidativo. Con base en los antecedentes de que el Tempol es capaz de detoxificar especies reactivas de oxígeno y actuar de manera semejante a la enzima antioxidante natural superóxido dismutasa, Lewinska y colaboradores evaluaron la presencia de micronúcleos en infocitos en cultivo que fueron expuestos a 5, 10 y 35 μM durante 72 h de los metales mencionados y encontraron que, por sí solos, ambos metales incrementan de 3 a 6 veces el número de micronúcleos en los linfocitos, mientras que cuando la incubación se realizó simultáneamente con el Tempol (Figura 36), éste redujo la cantidad de micronúcleos inducidos por los metales (Lewinska et al. 2008). Los datos de estos trabajos nos demuestran que compuestos que incluyen un grupo piperidina como los nitróxidos o nuestros heterocíclicos pueden tener una actividad eficiente para proteger los efectos genotóxicos inducidos por metales, pero que a altas concentraciones pueden causar efectos adversos, por lo que sería importante conocer los efectos si se utilizan por largos periodos de tiempo o si tienen la capacidad de acumularse *in vivo*.

Con respecto a las morfolininas, el grupo de Matulenko en el 2005 publicó la identificación de un análogo de piridopirimidina que es un potente inhibidor no nucleósido de la adenosin quinasa. Su homólogo contiene un sistema de anillos sustituido con una 7-piridilmorfolina como elemento estructural. Este grupo de investigación reporta los efectos farmacológicos de este y otros heterocíclicos de seis miembros, en donde la mayoría de los compuestos no presentaron actividad mutagénica con la prueba de Ames en las cepas TA98, TA100, TA1535 y TA1538 incluso con la adición del activador metabólico S9. La presencia de un nitrógeno adicional y la posición de éste resultaron relevantes para la toxicidad en esta prueba, pues en la posición 3´ se evita la actividad mutagénica, mientras que cuando se encuentra en la posición 2´ se presenta una mutagenicidad (Matulenko et al. 2005) (Figura 37) que no mostraron nuestros heterocíclicos y que coincide con que la carencia de un nitrógeno adicional.

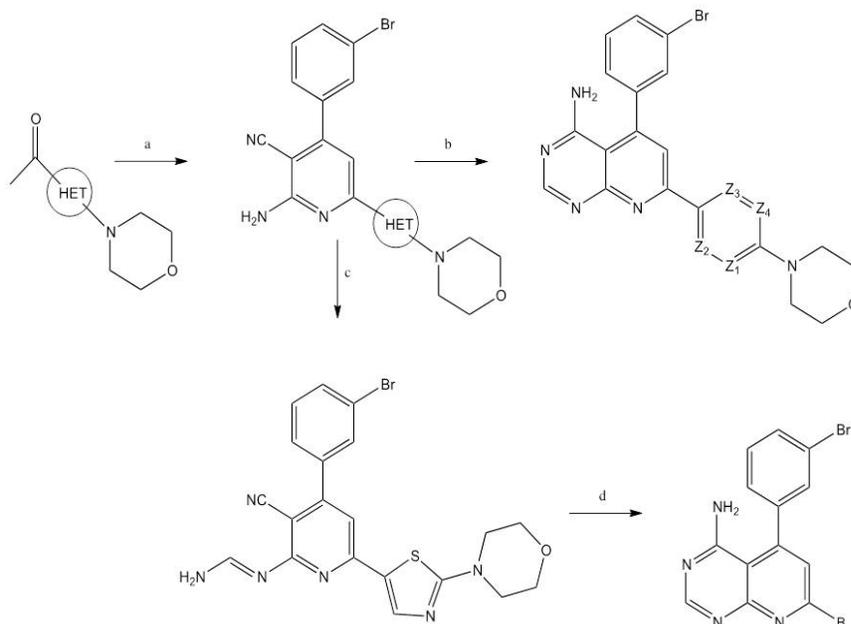


Figura 37. Secuencia de síntesis de los compuestos morfolínicos evaluados por Matulenko et al. 2005.

Durante la búsqueda de referencias de morfolinas con actividad antioxidante, se encontraron diversos artículos que utilizan al compuesto 3-morfolinosidnonimina (SIN-1) sólo como inductor de oxidación para posteriormente evaluar el efecto de otras moléculas (Figura 38). El reporte de Scarpato y colaboradores evalúa la genotoxicidad de los generadores de radicales libres AAPH y SIN-1, de los cuales, este último es ampliamente conocido por su capacidad de generar óxido nítrico y anión superóxido en soluciones acuosas para producir posteriormente al ión peroxinitrito, y este a su vez, está involucrado en diversas patologías inflamatorias. En el trabajo de Scarpato, la genotoxicidad de este compuesto se evaluó mediante la determinación de micronúcleos con citometría de flujo en células endoteliales HMEC-1 tratadas con SIN-1 durante 24 h a concentraciones entre 2.5 a 150 μM y se encontró que este compuesto induce una formación de micronúcleos 2 a 3 veces mayor que el valor control coincidiendo con el incremento de células en fase G1 del ciclo celular y fragmentación del ADN en las células HMEC-1 y sugiriendo apoptosis (Scarpato et al. 2011). La actividad genotóxica que presentó SIN-1 tiene cierta semejanza con la de los compuestos morfolínicos de Matulenko y ésta podría asociarse a la presencia del nitrógeno en posición 2. Otras de las características de SIN-1 es su permeabilidad en las células sin causar daño en las membranas y la dependencia de la enzima superóxido

dismutasa local para la formación de óxido nítrico de libre difusión intracelular, lo que hace que su actividad varíe de acuerdo al tipo celular.

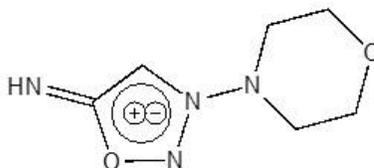


Figura 38. Estructura del donador de óxido nítrico 3-morfolinimidnonimina (SIN-1).

En el trabajo de Sacarpato, el daño que SIN-1 induce al ADN, determinado con la formación de micronúcleos, se encuentra más relacionado al comportamiento de esta molécula en soluciones acuosas (producción de H_2O_2), que a su capacidad de modificar ácidos nucleicos cuando el peroxinitrito reacciona con 2'-deoxirribosa y deoxinucleótidos para formar malondialdehído reportado en otros estudios (Yermilov et al. 1996). Lo cual es un efecto contrario al de nuestros heterocíclicos que fueron capaces de inhibir la formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (malondialdehído y derivados).

De nuestros compuestos de la serie LQM300, al único que se le evaluó actividad genotóxica determinando la formación de micronúcleos fue a la morfolina LQM335, pues aunque no resultó genotóxico en la prueba de Ames, consideramos importante determinar su posible genotoxicidad con otro método debido a la citotoxicidad que mostró en las células sanas (fibroblastos), los resultados se muestran en la Figura 39.

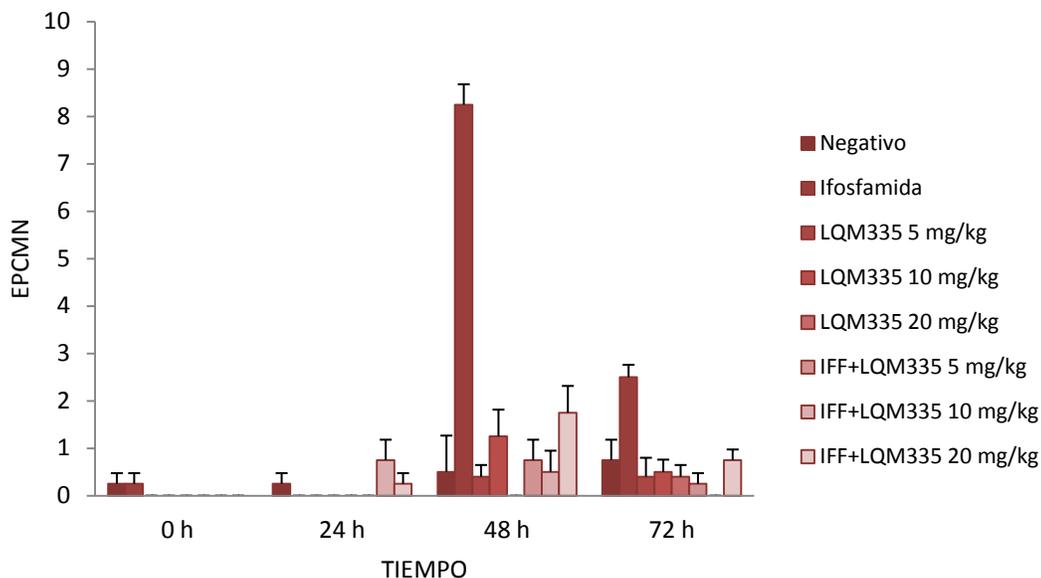


Figura 39. Efecto del compuesto LQM335 a diferentes concentraciones en la formación de micronúcleos en sangre periférica de ratones CD-1. Los controles negativo y positivo fueron DMSO 1% e Ifosfamida (IFF) 60 mg/kg, respectivamente. El compuesto se evaluó también en combinación con el control positivo Ifosfamida. Se muestra el promedio y error estándar de 5 animales por grupo experimental.

La Figura 39 muestra el promedio del número de eritrocitos policromáticos con micronúcleos (EPCMN) que se encontraron por cada 1000 eritrocitos policromáticos (EPC) en frotis de muestras sanguíneas de ratones a los que se les administraron diferentes dosis del compuesto LQM335. El grupo negativo, y en general todas las dosis usadas del compuesto, presentaron un promedio menor a 3 EPCMN por cada 1000 EPC, valor considerado normal para ratones de la cepa utilizada (Salamone and Mavournin 1994), y que indica que el compuesto no tuvo un efecto genotóxico a las dosis usadas, ya que además no hubo diferencia significativa en las tres dosis del compuesto LQM335 a los diferentes tiempos con respecto al valor de EPCMN encontrado antes de administrar el compuesto (tiempo 0). Sin embargo, sí hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con el efecto del compuesto usado como control positivo, Ifosfamida (IFF), en el incremento de EPCMN a las 48 h, ya que alcanzó valores de 8.25 y posteriormente alcanzó nuevamente niveles cercanos a los normales a las 72 h, en donde ya se tiene un promedio de 2.5.

En la Figura 39 se muestran también los resultados de la administración conjunta

de Ifosfamida con el compuesto LQM335 a las mismas diferentes dosis (reto=R), en donde observamos que no hubo incremento en la cantidad de EPCMN cuando la Ifosfamida se administró seguida del compuesto LQM335 comparado con la administración del fármaco solo. Esto significa que nuestro compuesto mostró un efecto inhibitorio sobre la formación de micronúcleos inducidos con la Ifosfamida, por lo que se puede decir que tiene un efecto antimutagénico.

La evaluación de micronúcleos mediante la tinción con Giemsa también nos permite cuantificar los EPC con respecto a un número determinado de eritrocitos normocromáticos y con esto determinar si hay un efecto citotóxico por parte del compuesto de prueba, ya que un aumento en el índice de EPC/ENC sugeriría un decremento en eritrocitos maduros que requirió de recuperación con nuevos eritrocitos (Figura 40).

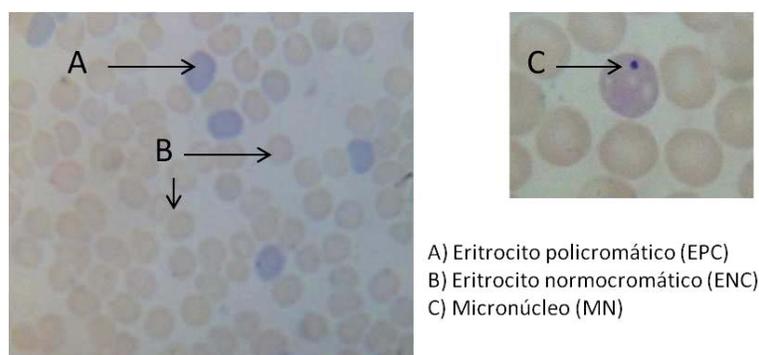


Figura 40. Frotis de sangre periférica de ratón CD-1 teñido con el colorante Giemsa. Se observa la diferencia entre los eritrocitos inmaduros (policromáticos), maduros (normocromáticos) e inmaduros (EPC) con presencia de micronúcleos.

En la Tabla 6 se muestran los índices de EPC/ENC encontrados a los diferentes tiempos después de administrar los tratamientos control negativo (DMSO 1%), control positivo (Ifosfamida 60 mg/kg) y el compuesto LQM335 (10,15 y 20 mg/kg de peso) solo o simultáneamente con el control positivo, donde podemos observar una tendencia general a disminuir el índice EPC/ENC. Este valor disminuyó un 33.33% a las 24 h después de que se administró la Ifosfamida y un 50% a las 48 y 72 h con respecto a los valores del grupo negativo demostrando un posible efecto citostático de este compuesto sobre las células sanguíneas.

Tabla 6. Índice de EPC/ENC en sangre periférica de ratones tratados con LQM335

Grupo Exp	0 h	24 h	48 h	72 h
Negativo	0.07	0.06	0.05	0.05
Ifosfamida	0.06	0.04	0.03	0.03
LQM335 5 mg/kg	0.07	0.05	0.04	0.05
LQM335 10 mg/kg	0.07	0.05	0.05	0.04
LQM335 20 mg/kg	0.06	0.05	0.05	0.04
R1: IFF+ LQM335 5 mg/kg	0.06	0.04	0.05	0.04
R2: IFF+ LQM335 10 mg/kg	0.06	0.03	0.03	0.04
R3: IFF+ LQM335 20 mg/kg	0.04	0.04	0.03	0.03

El índice fue calculado con el número promedio de EPC encontrados en cada 2000 ENC. Se analizaron al menos 3 laminillas por cada animal, n=5.

El compuesto LQM335 también mostró un efecto citostático en las tres concentraciones evaluadas, aunque menor que el ocasionado con ifosfamida, ya que los valores de disminución de EPC/ENC fueron entre 28.57 y 33.33%. La misma tendencia ocurrió con Ifosfamida (Figura 41) y LQM335 en conjunto, lo cual sugiere que todos los tratamientos provocan cierta obstrucción en la generación de células sanguíneas, o bien, que la sola manipulación de los organismos genere un estrés capaz de modificar el balance de eritrocitos maduros con respecto a nuevos eritrocitos emergidos de la médula ósea, ya que el efecto se presentó también en el grupo negativo haciendo que estadísticamente no existieran diferencias significativas entre los grupos experimentales.

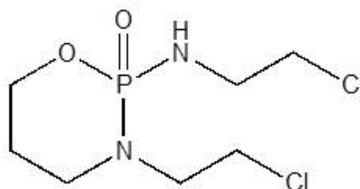


Figura 41. Estructura del fármaco de referencia Ifosfamida.

Entre los fármacos antitumorales, la Ifosfamida es un agente alquilante no específico para el ciclo celular, que entre sus efectos secundarios puede provocar una disminución grave en el número de células sanguíneas, lo cual lo hace un buen control positivo para esta parte adicional del ensayo de micronúcleos. Además, la Ifosfamida, al

igual que la ciclofosfamida, se considera un fármaco mutagénico que debe utilizarse con precaución debido a su capacidad de inducir la formación de micronúcleos en pacientes de cáncer que lo reciben por periodos mayores a 42 días (Tates et al. 1994). Se ha reportado que después de la administración de este compuesto, los metabolitos activos de la lfosfamida alquilan o se unen a muchas estructuras moleculares intracelulares, incluyendo ácidos nucleicos, por lo que su acción citotóxica se debe principalmente tanto al enlace cruzado de cadenas de ADN y ARN, como a la inhibición de la síntesis de proteínas (Filaxis 1999). Estructuralmente, nuestros heterocíclicos no tienen parecido o relación con la lfosfamida, por lo que el tipo de interacción con moléculas biológicas es diferente y de manera importante, no tienen el efecto genotóxico que la lfosfamida fue capaz de inducir en los ratones en nuestro estudio y probablemente tampoco tengan los diversos efectos tóxicos que la lfosfamida provoca en pacientes de cáncer que son tratados con este fármaco, lo que puede considerarse ventajoso para nuestros heterocíclicos.

Hasta este punto, podemos concluir que la amplia variedad de compuestos heterocíclicos ofrece un gran potencial y diversidad de actividades biológicas. A excepción del compuesto LQM302, nuestros compuestos heterocíclicos demostraron ese potencial: LQM338 como un potente citotóxico contra células tumorales de CaCu y LQM335, 340 y 338 como antioxidantes.

A continuación se describen los resultados de las mismas pruebas en el complejo de cobre LQM402, que se consideró aparte de los compuestos anteriores por tratarse de un compuesto coordinado, ya que es el único complejo metálico que se evaluó y que además se seleccionó para la segunda y tercer etapa de estudio: A nivel molecular y en el modelo murino, respectivamente. Esta selección se realizó tanto por su selectividad contra células tumorales como por la importancia y auge que recientemente han obtenido los complejos de cobre como potenciales compuestos antitumorales.

8.2 ENSAYOS In vitro REALIZADOS AL COMPLEJO DE COBRE(II) LQM402

8.2.1 Efecto del complejo de cobre LQM402 en la viabilidad de células de cáncer cérvico-uterino

Se evaluó el efecto del complejo de cobre en cuatro diferentes líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino: HeLa, SiHa, Ca Ski y C-33 A, así como en cultivo primario de fibroblastos humanos no tumorales. De manera general se observó que las concentraciones por debajo de 50 μM no ocasionaron una importante mortalidad de las células, ya que en todas las líneas celulares, la viabilidad a esta concentración mostró valores mayores al 70%. Sin embargo, la concentración 100 μM nos permitió definir que la línea celular HeLa fue la más sensible al compuesto, seguida por la línea celular Ca Ski con valores de viabilidad de 19.75 y 36.62%, respectivamente. C-33 A y SiHa fueron menos afectadas, pues los valores de viabilidad a la concentración más alta evaluada fueron de 51.44 y 57.75%, respectivamente. Las células no tumorales, fibroblastos, resultaron las menos sensibles al complejo LQM402, con un porcentaje de viabilidad de 66.56% a la concentración de 100 μM (Figura 42).

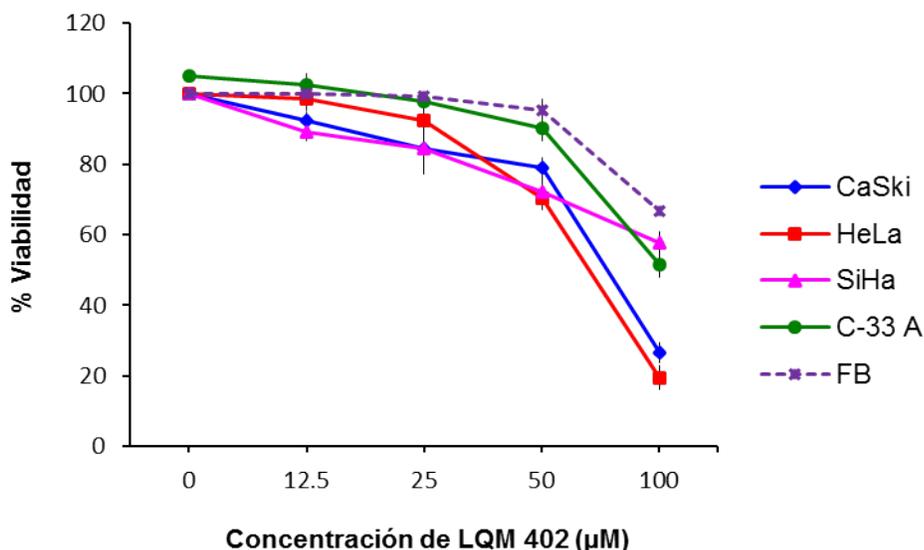


Figura 42. Efecto citotóxico del complejo LQM402 en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino. Porcentaje de viabilidad de células tratadas con diferentes concentraciones del complejo durante 24 h y determinado con la técnica de MTT. Promedios de al menos 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado y error estándar.

Las IC₅₀ obtenidas confirmaron que las células HeLa y Ca Ski fueron las más sensibles al complejo LQM402, ya que mostraron los valores más bajos. Las células SiHa, C-33 A y Fibroblastos tuvieron valores semejantes y cercanos a 200 µM. El compuesto utilizado como control positivo (*cis*-Platino) mostró valores de IC₅₀ menores a los obtenidos por nuestro compuesto en las células tumorales, pero semejante en lo que respecta a las células no tumorales (Fibroblastos).

Tabla 7. IC₅₀ del efecto citotóxico del complejo LQM402 en células de CaCu.

Línea celular	IC ₅₀ (µM) ± Error estándar	
	LQM402	<i>cis</i> -Platino
HeLa	74.74 ± 3.34	18.9 ± 0.99
Ca Ski	88.53 ± 2.64	66.6 ± 8.5
SiHa	>100	69.92 ± 1.25
C-33 A	>100	64.98 ± 6.88
Fibroblastos	>100	>100

Concentraciones del LQM402 necesarias para inhibir al 50% de células de CaCu y fibroblastos normales en 24 h. Promedios y errores estándar de al menos tres experimentos independientes, cada uno por triplicado.

En esta investigación se reportan las primeras observaciones del efecto del complejo de cobre LQM402 en células tumorales, y aunque tanto el *cis*-Platino como otros complejos de cobre mencionados en los antecedentes se han reportado como intercalantes en el ADN, nosotros no hemos realizado pruebas que nos conduzcan a determinar este fenómeno. Para el caso de *cis*-Platino, su unión al ADN es un mecanismo de acción detallado, ya que este compuesto fue aceptado por la Administración de fármacos y alimentos de E.U.A. desde 1978 (Figura 43).

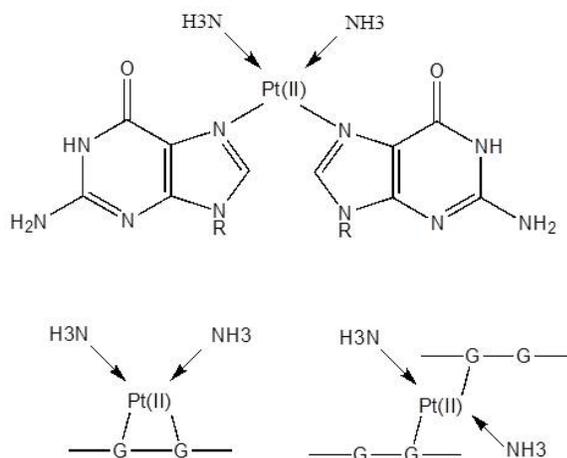


Figura 43. Tipos de unión del *cis*-Platino en las bases nitrogenadas del ADN.

Los valores de IC_{50} del complejo LQM402 fueron significativamente más bajos para las células HeLa y Ca Ski ($<100 \mu M$, $p < 0.05$) que para las otras líneas celulares ($>100 \mu M$; Tabla 7), lo que sugiere posibles diferencias en la permeabilidad de la membrana de las líneas celulares o en el metabolismo del complejo de cobre (II). Son pocos los reportes que mencionan diferencias en la membrana (receptores por ejemplo) y/o permeabilidad entre diversos tipos celulares (dada por poros o canales), y menos aún entre células de un mismo tipo como lo son las líneas que hemos utilizado en este trabajo (todas de cáncer cervical, epiteliales y adherentes). Estas diferencias entre líneas celulares al parecer no están relacionadas con sensibilidad al complejo de cobre LQM402.

La actividad citotóxica de nuestro compuesto concuerda con reportes que describen los efectos citotóxicos de complejos de cobre, ya sea introducidos en células HeLa por nanopartículas (Harris et al. 2011), o por su efecto directo sobre las células. En el estudio de Harris y colaboradores (2011), la introducción de moléculas con cobre en células HeLa mediante el uso de nanopartículas demostró un importante efecto citotóxico comparado con el uso de nanopartículas vacías (Figura 44). Además, estas nanopartículas pudieron ser eficientemente cargadas con diferentes concentraciones del complejo, lo cual se demostró con el efecto concentración-respuesta mostrado en los porcentajes de viabilidad de las células HeLa.

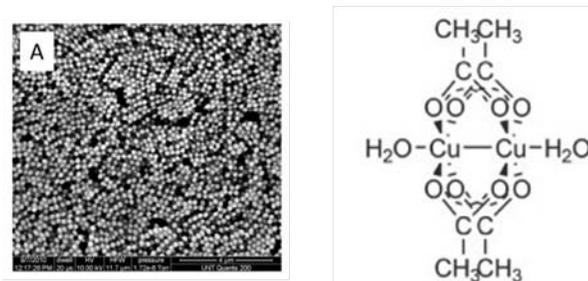


Figura 44. Microscopía electrónica de nanopartículas y estructura del compuesto dinuclear $\text{Cu}_2(\text{OAc})_4(\text{H}_2\text{O})_2$.

Como se mencionó previamente, las Casiopeínas[®] conforman un gran grupo de complejos de cobre que fueron sintetizados con base en que la incorporación de un metal esencial puede reducir la toxicidad, fungir como quelante para favorecer la configuración *cis* alrededor del ión metálico y tener diferentes grados de hidrofobicidad. Estos compuestos han sido evaluados por diversos autores, sobre diversas líneas celulares tumorales humanas y murinas y con variadas metodologías. El estudio de algunas Casiopeínas[®] evaluadas con ensayo de sulforrodamina B en las mismas líneas utilizadas en nuestro estudio dió como resultado que estos complejos pueden incluso ser más efectivos que el *cis*-Platino, con valores de IC_{50} en niveles nanomolares a las 24 h de tratamiento (Gracia-Mora et al. 2001) Los autores de este estudio mencionan que la actividad antineoplásica de la Casiopeína III-I (Figura 45) resultó más selectiva contra las líneas de cáncer cervical que contra las otras líneas en las que se evaluaron previamente y que la presencia de glicina en sus moléculas favorece la citotoxicidad, pero que la actividad es menor contra las células altamente metastásicas de carcinoma de pulmón de Lewis y las de melanoma B16, lo cual es diferente a nuestros resultados, pues las células Ca Ski son de origen metastásico y fueron muy similares al complejo LQM402 en sensibilidad.

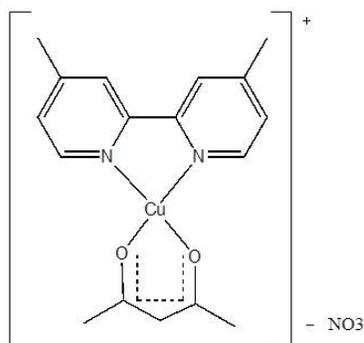


Figura 45. Estructura de la Casiopeína III-I.

Krishnamoorthy y colaboradores en 2012 sintetizaron complejos macrocíclicos de cobalto, cobre y níquel y demostraron su actividad intercaladora en el ADN (Figura 46). Los compuestos fueron citotóxicos en la línea celular HeLa y no en células normales NIH 3T3, y de ellos, el complejo de cobre mostró ser más activo que los de Co y Ni a las 48 h de exposición. Los autores utilizaron concentraciones similares a las nuestras (31 a 125 μM), pero adicionalmente utilizaron concentraciones de 200 hasta 1000 μM , y aun así no obtuvieron porcentajes totales de inhibición utilizando la técnica de MTT, pues la IC_{50} de su compuesto de cobre fue de 173 μM , mientras que la obtenida para *cis*-Platino fue de 16.4 μM . Podemos decir que este valor para el *cis*-Platino es semejante al que nosotros obtuvimos para la misma línea celular (18.9 μM), pero su valor para el complejo de cobre $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{PPh}_3)_3]$ es 2.3 veces superior al que nosotros obtuvimos para nuestro complejo LQM402 (Krishnamoorthy et al. 2012).

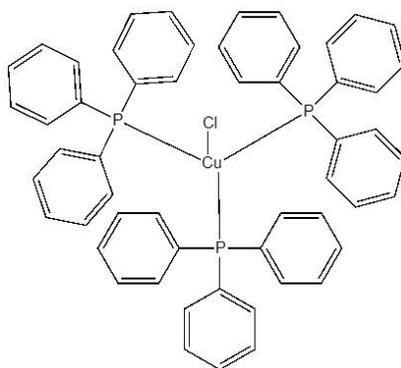


Figura 46. Estructura del complejo de cobre $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{PPh}_3)_3]$.

En la Figura 47 se muestran otros complejos de cobre que han mostrado ser

citotóxicos para las líneas celulares de diferentes tipos de cáncer como el de próstata, hígado y leucemia mieloide (Jia et al. 2010, Lakshmipraba et al. 2011), con lo que podemos establecer que la actividad y selectividad no se presentan estrictamente asociadas a la estructura.

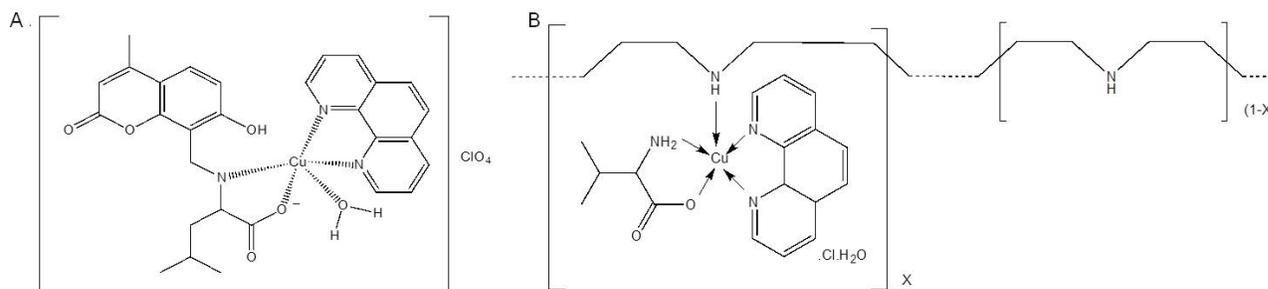


Figura 47. Estructuras de los complejos de cobre A) $[Cu(MCLH)phen(H_2O)] \cdot ClO_4$ y B) $[Cu(phe)(L-Val)BPEI]Cl \cdot H_2O$ evaluadas por Jia et al. 2010 y Lakshmipraba et al. 2011, respectivamente.

En nuestra investigación, los fibroblastos se utilizaron como un control de células no malignas humanas y se encontró que fueron menos afectadas por LQM402 que las células tumorales, lo que sugiere una ventaja para este complejo como un fármaco potencial selectivo contra el cáncer. Este resultado es comparable al obtenido en el estudio del complejo macrocíclico de cobre (II) que evaluó Fernández y colaboradores (2007) a concentraciones similares (1-100 μM) y por el mismo método en fibroblastos normales V79 de pulmón de hámster chino. Tal estudio informó tasas de supervivencia de células por encima de 80 % a 50 μM en un periodo de 24 h de incubación (Fernandes et al. 2007), mientras que con nuestro complejo los fibroblastos tuvieron un 95.14% de supervivencia a la misma concentración y tiempo de incubación. Por otra parte, en comparación con el fármaco antitumoral *cis*-Platino, LQM402 fue menos citotóxico contra células HeLa, pero el valor de la IC_{50} para los fibroblastos fue mayor que la de *cis*-Platino, lo que sugiere que LQM402 fue menos tóxico contra estas células normales (Tabla 7).

8.2.2 Alteración en la membrana de células HeLa inducida con el complejo LQM402

Como se describió previamente, el principal efecto que se busca al sintetizar y/o estudiar un nuevo compuesto con fines terapéuticos antineoplásicos, es la inhibición o muerte de células tumorales en una forma eficiente. Recientemente se ha sugerido que el

estudio de los cambios biofísicos y morfológicos de las células tratadas con algún agente de prueba puede ser una importante herramienta para evaluar la actividad antitumoral de dicho agente. Esto fue propuesto en parte porque muchos compuestos antitumorales afectan a los microtúbulos de las células y por lo tanto alteran sus funciones asociadas a este sistema como la adherencia y motilidad (Kim et al. 2012).

Cuando una célula entra en el proceso de muerte celular programada (apoptosis), los primeros cambios detectables aparecen en la membrana. Entre los fosfolípidos que conforman la bicapa membranal, se ha identificado a la fosfatidilserina (FS) como indicador de apoptosis temprana ya que, al perderse la integridad de la membrana lipídica, este fosfolípido cambia su posición normal en la cara interna de la membrana hacia la cara externa. Por otra parte, la proteína dependiente de calcio, Anexina V, tiene una gran afinidad por la fosfatidilserina, por lo que se utiliza acoplada a un fluorocromo para detectarla mediante citometría de flujo y tener una medida cuantitativa del porcentaje de células en apoptosis en una suspensión de células después de la exposición a algún tratamiento (van Engeland et al. 1998). Sin embargo, la idea de que la apoptosis era el único proceso de muerte con una activa participación de la célula ha sido reemplazada al encontrarse que esta participación ocurre también en otros procesos de muerte celular como catástrofe mitótica y más aún, al demostrar que varios de esos procesos pueden incluso compartir características o desplazarse de uno a otro (Abend 2003).

Mediante la prueba de detección de Anexina V, encontramos que el complejo de cobre LQM402 induce un incremento de células con FS expuesta a partir de las 6 h, después de adicionar el complejo a la caja de cultivo con células HeLa. Como controles negativos se mantuvo una caja con células a las que no se les dio ningún tratamiento y sólo fue mantenida con medio de cultivo y una más fue adicionada con 0.1% de DMSO, sustancia en la que se disolvió el compuesto y que no mostró un efecto significativamente diferente sobre las células respecto a aquellas mantenidas en medio. Comparado con estos controles, la exposición de células al compuesto LQM402 ocasionó un incremento dependiente del tiempo en la translocación de FS en la membrana de estas células. El complejo LQM402 induce la translocación de FS en células HeLa, lo cual se considera una característica de muerte celular apoptótica. Si fuera este el caso, LQM402 no induce necrosis de células HeLa de manera relevante, sino que su actividad letal contra ellas

podría deberse principalmente a apoptosis, ya que pudimos detectar a la mayoría de células en los cuadrantes que representan las fases temprana y tardía de este proceso (Figura 48).

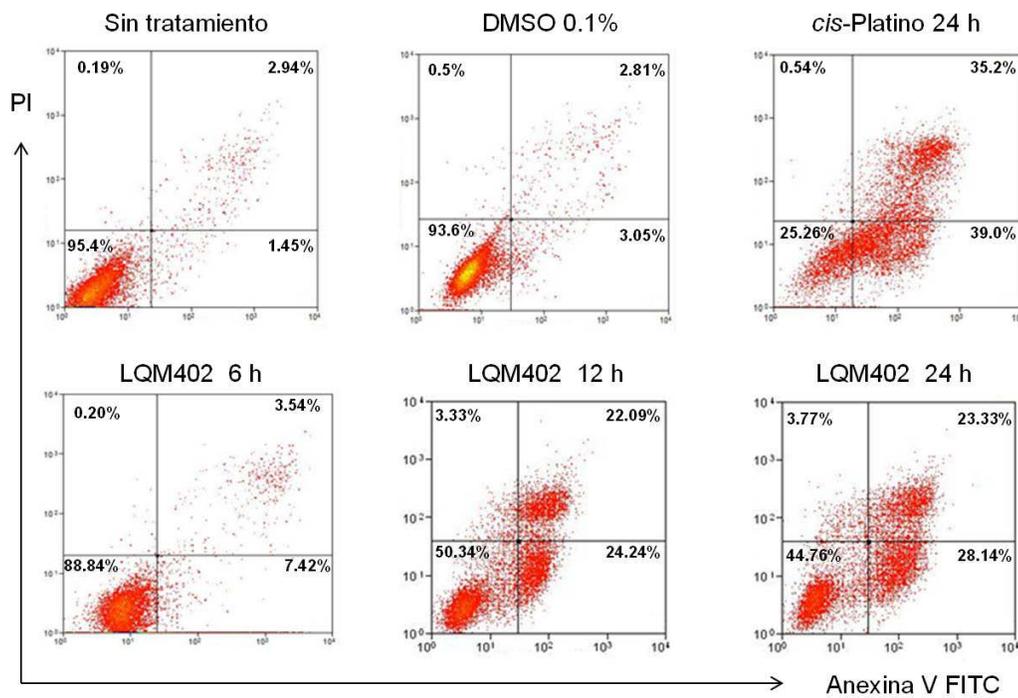


Figura 48. Efecto del complejo LQM402 sobre la translocación de fosfatidilserina en células HeLa.

En cada gráfica, el cuadrante inferior izquierdo representa las células vivas, el inferior derecho células en apoptosis temprana, superior derecho células en apoptosis tardía y superior izquierdo células en necrosis. *cis*-Platino se evaluó a 20 μ M y LQM402 a 74.74 μ M (valores de IC_{50} *in vitro*). Porcentajes de un total de 10,000 células.

La mayoría de fármacos contra el cáncer ejercen su efecto por inducción de apoptosis, que es el mecanismo de acción recomendada debido a la ausencia de respuesta inflamatoria que podría alterar el entorno y células adyacentes a las células involucradas (Kerr et al. 1994, Mizutani 2007). La apoptosis es un mecanismo importante de muerte celular que está implicada en muchos procesos fisiológicos relacionados con la homeostasis y es un regulador central de condiciones fisiopatológicas. Se ha reportado que las células cancerosas pueden desarrollar varios mecanismos con los cuales resistir la muerte celular apoptótica, por lo que la resistencia a la apoptosis se considera una característica del cáncer (Hanahan and Weinberg 2011, Ocker and Hopfner 2012). Dado que la mayoría de nuestras células tratadas estaban en apoptosis temprana, podemos decir que LQM402 tiene un potencial similar al de otros complejos de cobre para inducir la

apoptosis en las células HeLa en tiempos tempranos. Por ejemplo, células de carcinoma de ovario humano (CH1) y de leucemia murina (L1210) mostraron cambios morfológicos típicos de apoptosis en el citoplasma (contracción), en la cromatina (condensación) y en los núcleos (fragmentación del ADN) después del tratamiento con Casiopeína II (Figura 49) a las 24 h de tratamiento (De Vizcaya-Ruiz et al. 2000).

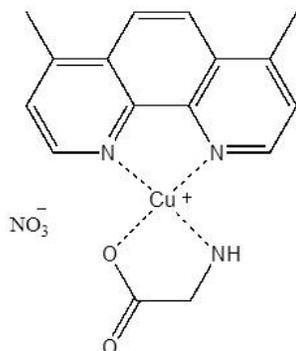


Figura 49. Estructura de la Casiopeína II.

Por otro lado, una base de Schiff de cobre(II) también indujo apoptosis en células MCF-7 a concentraciones de 20 μM o menos en un periodo de 48 h de incubación, determinado con citometría de flujo (Ma Z. Y. et al. 2012), mientras que un estudio del ciclo celular demostró que complejos de cobre bis (tiosemicarbazona) indujeron apoptosis y división del ADN en células de carcinoma colorectal HCT116 (Palanimuthu et al. 2013) (Figura 50). Estos y muchos otros estudios que fueron publicados en la última década confirman que los complejos de cobre son compuestos citotóxicos potenciales.

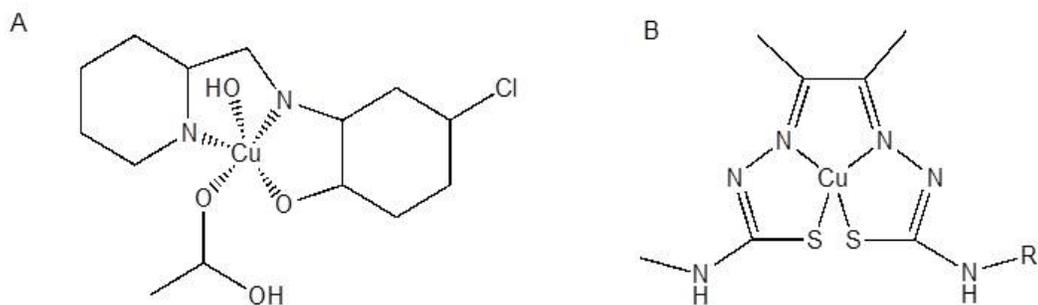


Figura 50. Estructura del complejo de Cu(II) $[\text{Cu}^{11}(5\text{-C1-pap})(\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})\cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ y formula general de bis(tiosemicarbazones) derivados de glioxal-bis(4-metil-4-fenyl-3-tiosemicarbazona) evaluados por Ma Z.Y. et al. 2012 y Palanimuthu et al. 2013.

8.2.3 Expresión de proteínas asociadas a apoptosis en células HeLa tratadas con el complejo LQM402

El Western blot o Inmunoblot es una técnica analítica que se usa para detectar la presencia y abundancia de proteínas de interés en una muestra de homogeneizado de tejido o extractos celulares. Se emplea la electroforesis en gel para separar proteínas nativas o desnaturalizadas de acuerdo al tamaño molecular o estructura tridimensional del polipéptido y las proteínas son transferidas a una membrana en donde pueden ser reconocidas por anticuerpos específicos. Para conocer si el complejo de cobre estaba induciendo la activación de otra característica de la muerte celular apoptótica, se decidió determinar la expresión de las caspasas más comúnmente reportadas en la bibliografía. Para esta prueba se obtuvieron extractos totales de células HeLa tratadas con el complejo LQM402 y para la detección de citocromo C se utilizaron extractos citoplásmicos obtenidos con el tratamiento con digitonina. De manera general, las caspasas que nos podrían dar una primer idea de que se estuviera activando la vía apoptótica extrínseca son la 8 y la 10 que están involucradas en la apoptosis activada por receptor (Walczak and Haas 2008), sin embargo, en nuestra evaluación no pudimos observar su activación. Por otra parte, la vía apoptótica intrínseca involucra un mecanismo más complejo de activación que requiere la formación de un complejo que consta de caspasa 9, citocromo C y la proteína Apaf-1 (Malet et al. 2006). Tanto las células control (sin tratamiento y con 0.1% de DMSO) como las que fueron expuestas al complejo de cobre no mostraron cambios en la expresión de la procaspasa-9 a través del tiempo de incubación con el compuesto. También se observó que en las células que no recibieron tratamiento, así como en las que fueron expuestas a 0.1% de DMSO, no hubo presencia de citocromo C (Cit C) en los extractos citoplásmicos. Sin embargo, con la exposición al complejo se observó la presencia de Citocromo C apareciendo su expresión de manera tiempo-dependiente, lo que sugiere que el complejo LQM402 indujo la salida de éste de la mitocondria. Este resultado indica daño mitocondrial, el cual ha sido frecuentemente asociado a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Caroppi et al. 2009).

En nuestras membranas tratadas con diferentes anticuerpos se pudo observar que el tratamiento con el complejo de cobre indujo una disminución en la expresión de la procaspasa-7 en forma dependiente del tiempo, lo cual indica una posible escisión del

zimógeno para originar los fragmentos activos que son capaces de impulsar el proceso apoptótico (Figura 51).

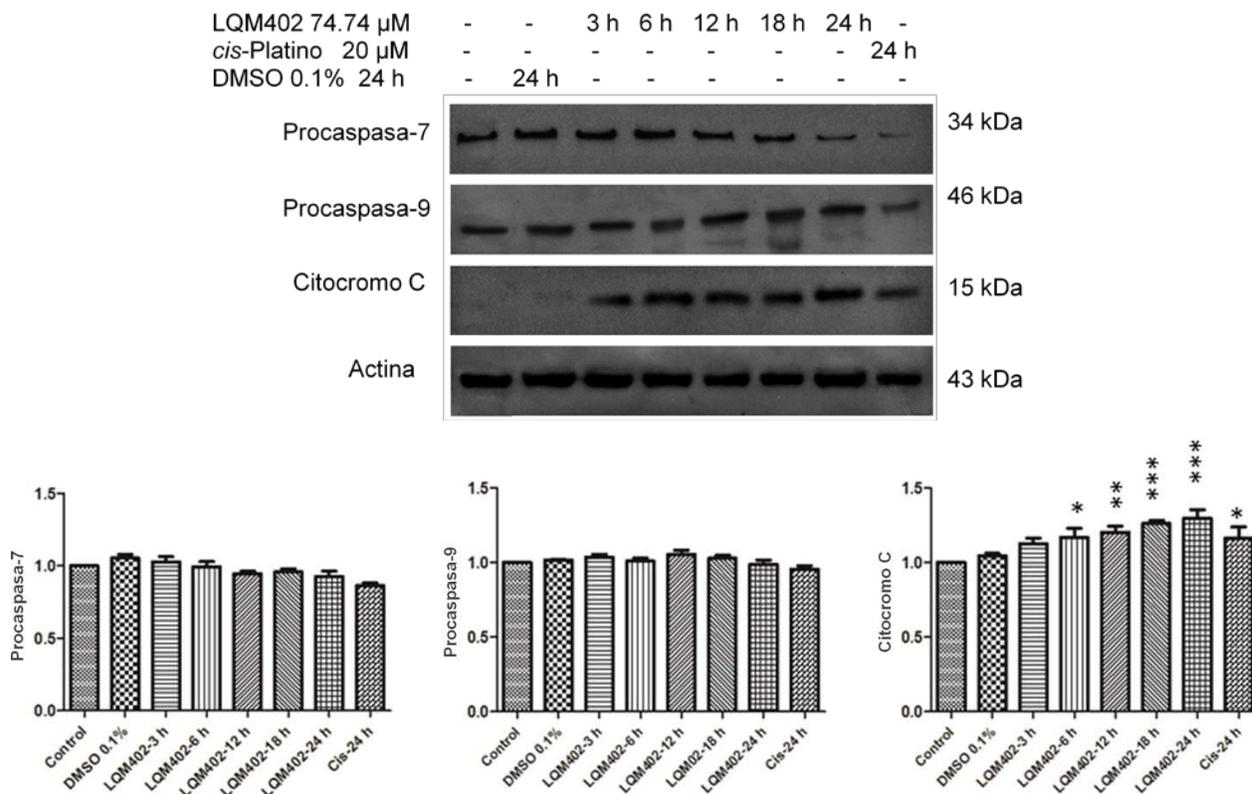


Figura 51. Efecto del complejo LQM402 en la expresión de proteínas asociadas a apoptosis en células HeLa expuestas a diferentes tiempos de tratamiento. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 con respecto al control, n=3.

Inicialmente, nuestros datos indican que la vía intrínseca podría estar implicada en la apoptosis inducida por LQM402, pero la posibilidad de otras rutas o tipos de muerte celular no deben ser descartados ya que se han observado en respuesta a diferentes complejos de Cu(II). Por ejemplo, el tioxiotriazol de cobre(II) (A0) evaluado por Tardito y colaboradores indujo la muerte celular, después de la activación de la caspasa-3, pero las células no mostraron las características conocidas de la apoptosis clásica dependiente de caspasas. Los autores informaron que en la muerte celular inducida por A0 participa el estrés del retículo endoplásmico y la muerte paraptótica (Tardito et al. 2009). En otro estudio, células de glioma C6 que fueron expuestas durante 24 h a concentraciones que van desde 11.23 hasta 22.4 μ M de [(4,4'-dimetil-2,2'bipiridina) (acetilacetato) de

cobre(II) nitrato] (CAS III-IA) sufrieron muerte celular apoptótica. Sin embargo, el tratamiento con 33.7 a 44.9 μM del mismo compuesto induce hallazgos ultraestructurales que sugieren que la muerte celular es por autofagia (Trejo-Solis et al. 2012). Estos resultados dan apertura a nuevos enfoques para evaluar diferentes mecanismos de acción para nuestro complejo de cobre o de otros compuestos diseñados a base de metales para la terapia contra el cáncer.

La caspasa 3 es, si no la más importante, una de las proteínas ejecutoras relevantes en el proceso apoptótico, pues tanto la vía extrínseca como la intrínseca de la apoptosis convergen en esta caspasa (Ying et al. 2011) para ejecutar varios de los procesos asociados a esta muerte celular programada como son la fragmentación del ADN y los cambios morfológicos observables con microscopía (Janicke et al. 1998). En nuestros resultados (Figura 52), mientras que 74.74 μM LQM402 no disminuyen la expresión de las procaspasas-3 y -9 con respecto al tiempo, la incubación de células HeLa con 20 μM de *cis*-Platino indujo la aparición de fragmentos de 17 y 20 KDa reconocidos por el anticuerpo anti-caspasa-3, lo cual indica su activación en las células HeLa tratadas con *cis*-Platino, pero no con el complejo LQM402. Este resultado concuerda con el reporte de Yim y colaboradores, quienes observaron la activación de diversas proteínas en células HeLa tratadas con *cis*-Platino, entre ellas las caspasas-3 y -9, Fas y el citocromo C (Yim et al. 2006), que si bien no se observó el fragmento correspondiente a la caspasa-9 activa, la disminución de la procaspasa-9 sugiere la activación de dicha enzima.

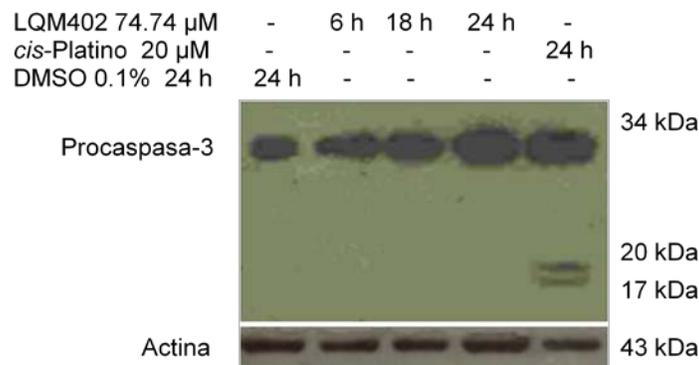


Figura 52. Efecto del complejo LQM402 en la expresión de caspasa-3 en células HeLa expuestas a diferentes tiempos de tratamiento.

Por otro lado, 50 μM de los complejos de isatin-diimina de cobre (II), bis-[(2-oxindol-3-il-imino)-1,3-diaminopropano-N, N', O, O'] cobre (II) perclorato de ([Cu (isapn)] (ClO₄)₂) y [bis-(2-oxindol-3-il-imino)-2-(2-aminoetil)piridina-N,] cobre (II) perclorato de N' ([Cu (isaepy)₂] (ClO₄)₂), también conocidas como Cu (isapn) y Cu (isaepy), respectivamente (Figura 53), indujeron la expresión de las formas activas de las caspasas 3 y 9 después de 24 y 48 h de tratamiento en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (Filomeni et al. 2007).

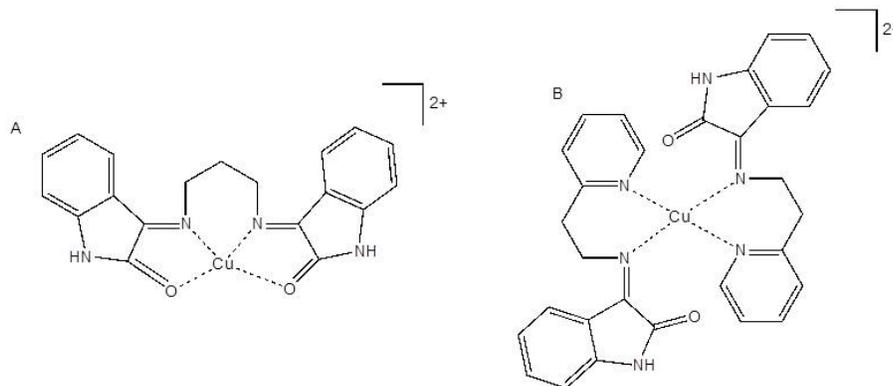


Figura 53. Estructuras de los complejos de cobre A) [Cu(isapn)]²⁺ y B) [Cu(isaepy)₂]²⁺ estudiados por Filomeni et al. 2007.

En otro estudio, 11.23 – 22.4 μM de Cas III-ia indujeron la liberación de citocromo C mitocondrial hacia el citoplasma en células de glioma de rata (Trejo-Solis et al. 2012). Este resultado también es similar a nuestros hallazgos en las células HeLa tratadas con LQM402, sin embargo, nuestros datos representan sólo investigaciones iniciales de la posible vía de muerte de células HeLa inducida por LQM402, por lo que se requieren estudios adicionales.

8.2.4 Actividad del complejo LQM402 sobre el radical libre DPPH

El método de DPPH es una manera rápida, fácil y económica de evaluar la capacidad antioxidante (atrapador de radicales libres o donador de hidrógeno) de diversos compuestos, extractos o alimentos, entre otros. En esta prueba, al incubar una solución de DPPH 100 μM con tres concentraciones de LQM402 (1, 10 y 100 μM), no se observaron cambios en la coloración de la solución que pudieran indicarnos una actividad antioxidante. Al leer las muestras en un espectrofotómetro, la concentración más alta

evaluada de nuestro complejo (100 μM) redujo al DPPH sólo en un valor cercano al 5%, lo que impidió obtener una concentración efectiva 50 (CE_{50}). Esta actividad fue muy baja comparando con los controles positivos α -tocoferol y quercetina, los cuales mostraron valores de reducción del DPPH de 85.79% a 74.13 μM y 85.53% a 23.71 μM , respectivamente. Por lo cual se puede decir que el complejo de cobre LQM402 no posee efecto antioxidante como atrapador de este tipo de radicales libres (datos no mostrados).

8.2.5 Actividad del complejo LQM402 sobre la inhibición y producción de TBARS

Al encontrar que el complejo LQM402 no fue capaz de reducir al DPPH, se utilizó la prueba de inhibición de TBARS como otra prueba para conocer su posible efecto antioxidante, ya que ambas pruebas implican distintas especies de radicales libres. Con nuestros resultados se observó que el complejo LQM402, a concentraciones entre 5 y 20 μM , no inhibe la producción de TBARS, pero por arriba de esta última concentración y sin llegar a 100 μM , LQM402 mostró porcentajes de inhibición entre 60 y 95% (Figura 54). Este cambio en su efecto se encuentra a una concentración cercana a 20 μM , que en la Figura 54 se denota como un rango muy estrecho de concentraciones en la que nuestro complejo cambia de actividad.

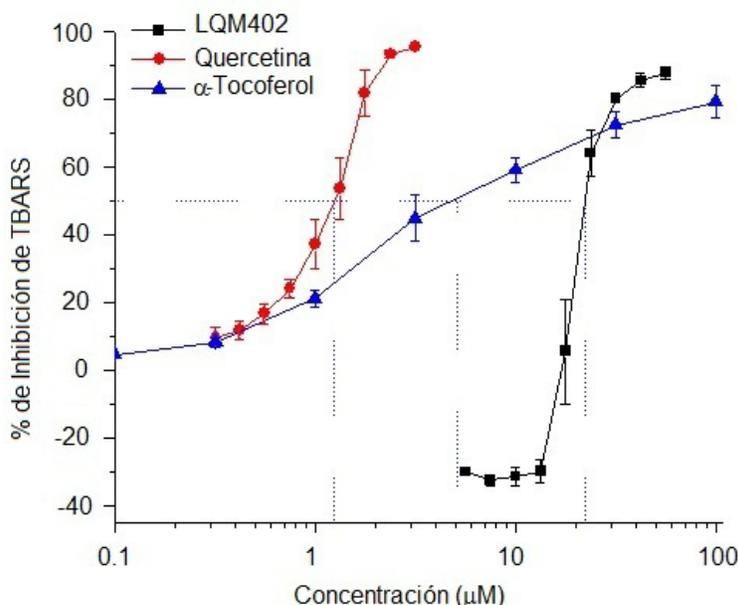


Figura 54. Efecto del LQM402 sobre la peroxidación lipídica inducida con FeSO_4 en homogeneizado de cerebro de rata.

Los controles positivos Quercetina y α -Tocoferol mostraron una inhibición de TBARS inducidas con 10 μ M de FeSO_4 dependiente de la concentración utilizada. Quercetina alcanza casi el 100% de inhibición antes de los 5 μ M, mientras que α -Tocoferol inhibe el 80% de TBARS a 100 μ M.

Los resultados anteriores nos indicaron que, aunque LQM402 puede tener actividad antioxidante, también puede mostrar el efecto contrario (pro-oxidante), por lo que se realizó la cuantificación de TBARS que induce por sí solo el complejo LQM402 (Figura 55). Con ello encontramos que efectivamente, el complejo es capaz de inducir peroxidación lipídica a concentraciones entre 5.62 y 17.78, superando incluso al fármaco de referencia 2,2'-azobis(2-metil-propionamida) dihidroclorido (AAPH 20 mM).

Este fenómeno de doble actividad que cambia en un rango estrecho de concentración se conoce actualmente como *hormesis*, el cual describe una respuesta biológica favorable, e incluso adaptativa, a dosis altas (y normalmente perjudiciales) del mismo agente. La *hormesis* puede constituir uno de los mecanismos que permiten a las células estresadas evitar la senectud y muerte celular, y por lo tanto, podría tener algún impacto en la patofisiología del envejecimiento y/o cáncer (Martins et al. 2011). Fármacos antioxidantes como Resveratrol (Calabrese et al. 2010), Quercetina y Ácido cafeico (Pietsch et al. 2011) han mostrado tener efecto hormético, y aunque se ha reportado que este efecto puede contribuir a la extensión del promedio de vida, puede aprovecharse para modular la proliferación de células tumorales al evaluar y dirigir las dosis apropiadas para el efecto deseado.

La máxima producción de TBARS, determinado por acción de nuestro complejo, fue a 10 μ M y esto fue semejante a lo obtenido con el control positivo sulfato ferroso (FeSO_4 10 μ M), por lo que consideramos que LQM402 posee un importante efecto pro-oxidante en un rango específico de concentraciones.

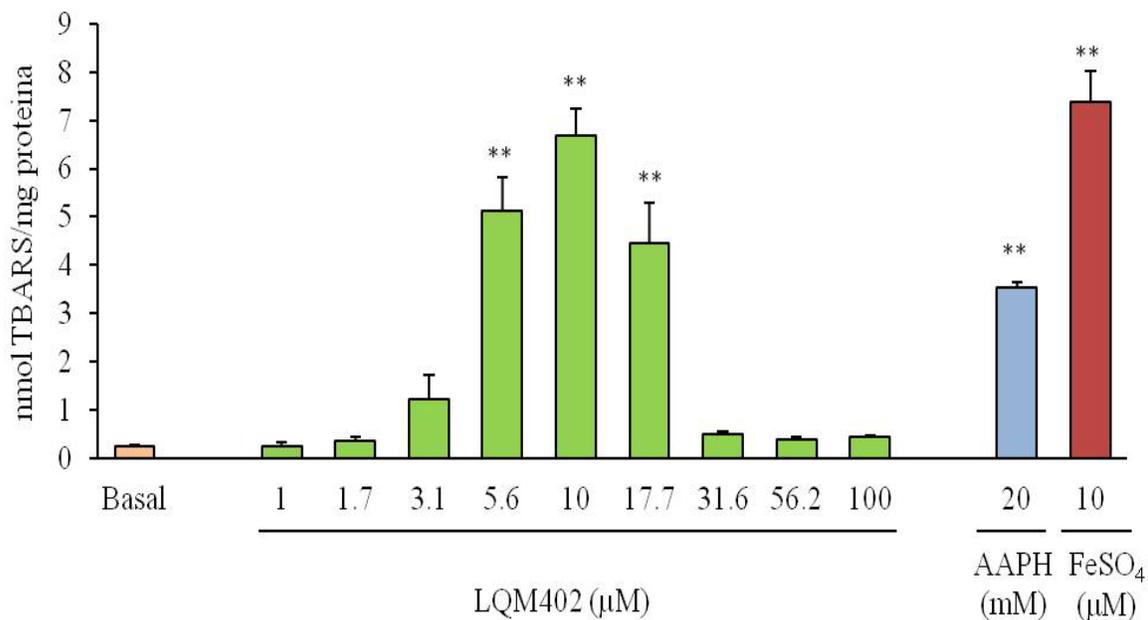


Figura 55. Concentración de TBARS inducida con diferentes concentraciones del complejo LQM402 en homogeneizado de cerebro de rata.

Estos resultados pueden correlacionarse con el efecto del LQM402 observado en los ensayos de citometría de flujo, donde la detección de anexina V indica que la membrana celular ha sido alterada y por tanto el fosfolípido FS se encuentra expuesto en la cara externa de la misma. Un compuesto pro-oxidante es capaz de inducir peroxidación de lípidos (Barrera 2012), por lo cual puede interaccionar y modificar los lípidos en membranas celulares y de organelos. Así, el hallazgo de citocromo C en extractos citoplásmicos de células HeLa tratadas con LQM402, también puede asociarse a esta capacidad de peroxidación lipídica, ya que como se mencionó anteriormente, el daño en la membrana mitocondrial induce la salida de citocromo C al citoplasma.

El complejo LQM402 pudo inhibir la actividad pro-oxidante de FeSO₄, pero no pudo actuar como atrapador del radical libre DPPH. Esto sugiere un mecanismo diferente de la actividad presentada por complejos macrocíclicos de cobre (II) que muestran actividad atrapadora de radicales libres con valores de CE₅₀ por debajo de 30.82 µM (Fernandes et al. 2007). En otros estudios, el fármaco anti-inflamatorio ácido mefenámico y los compuestos del ligando azo (E)-4-((1H-1,2,4-triazol-3-il) diazenil) benceno-1,3-diol y (E)-4-((5-mercapto-1,3,4-tiadiazol-2-il) diazenil) benceno-1,3-diol no ejercieron sus propiedades antioxidantes al formar complejos con Cu (II) (Gaber et al. 2013, Kovala-Demertzi et al.

2009), lo que revela que los ligandos también tienen participación en la actividad biológica además del metal al que están unidos. Y aunque en este trabajo no evaluamos la actividad biológica *per se* del ligando, tenemos el antecedente de que posee actividad antihipertensiva y antiarrítmica determinada en un modelo *in vivo* de ratas hipertensas (Velazquez et al. 2008).

Citotoxicidad y apoptosis se producen en respuesta a varias causas, entre ellas excesos de radicales libres u otros productos de la peroxidación lipídica (Barrera 2012). Como para la mayoría de los elementos esenciales, un desequilibrio en el cobre endógeno podría alterar el sistema redox en una célula y causar daños sistémicos y patologías (Wang T. and Guo 2006). Por otro lado, mientras que la quelación de cobre se puede utilizar como una terapia anti-angiogénica (Hancock et al. 2011, Lowndes and Harris 2004, 2005), los complejos de cobre tales como las Casiopeínas[®] pueden inducir la sobreproducción de ROS y conducir a la toxicidad mitocondrial (Serment-Guerrero et al. 2011). Estos datos sugieren que el complejo LQM402 es capaz de peroxidar lípidos y, por lo tanto, inducir procesos biológicos relacionados. Por lo tanto, la muerte celular inducida por el complejo LQM402 y la apoptosis en células HeLa podría ser debido a la peroxidación lipídica y/o a productos de la peroxidación de lípidos. Los metales Cu (II), Cr (II), Co (II), Pb (II) y Fe (II) juegan un papel importante en los procesos redox en los sistemas biológicos y algunos de ellos son inductores de la peroxidación lipídica por sus características oxidativas en la reacción de Fenton (Benedet and Shibamoto 2008); por lo tanto, no es inusual que los compuestos que incluyen estos metales muestran tales actividades. Algunas Casiopeínas[®] y otros complejos de cobre pueden generar especies reactivas de oxígeno (Serment-Guerrero et al. 2011, Trejo-Solis et al. 2012) y esta actividad se ha asumido como el principal modo de acción detrás de la citotoxicidad de los complejos de cobre (Kowol et al. 2012).

Cu (II) y otros metales de transición tales como Mn (II), Mn (III) y Fe (III) exhiben propiedades antioxidantes. Las actividades atrapadoras de radicales libres por parte de complejos macrocíclicos de cobre(II) se determinaron mediante el sistema xantina-xantina (Fernandes et al. 2007). Por lo tanto, ensayamos la capacidad de LQM402 para inhibir la peroxidación de los lípidos inducida por FeSO₄ en un intento de determinar si LQM402 tenía actividad antioxidante. Respecto a esto, se encontró que LQM402 tiene un efecto

aditivo en la producción de TBARS inducida por FeSO_4 a concentraciones de $5.62 \mu\text{M}$ a $13.34 \mu\text{M}$ en homogeneizado de cerebro de rata, sin embargo, LQM402 muestra actividad inhibitora en el intervalo de concentración de 23.71 a $56.20 \mu\text{M}$ (Fig. 54). En conjunto, nuestros resultados indican que LQM402 tiene ambas actividades: Inductora e inhibitora de la peroxidación lipídica.

8.2.6 Actividad genotóxica del complejo LQM402 con la prueba de Ames

Los fármacos con potencial anti-neoplásico y en general cualquier fármaco, deben ser lo menos tóxicos posible para las células sanas, por lo que evaluamos el efecto genotóxico del complejo de cobre LQM402 en mutantes de la bacteria *S. typhimurium* de las cepas TA98, TA100 y TA102. El compuesto se evaluó con o sin la adición del activador metabólico S9 debido a que muchos agentes cancerígenos lo son hasta después de pasar este proceso (Ames et al. 1975). La Figura 56 muestra las colonias revertantes a histidina (His+) de *S. typhimurium* a las 48 h de incubación con el vehículo DMSO o con diferentes concentraciones del complejo LQM402 (50, 100, y $200 \mu\text{M}$).

El complejo de cobre LQM402 no fue mutagénico en ninguna de las tres cepas utilizadas en comparación con todos los controles positivos (PA, NMNG, Mit C, 2AA, y CP) con o sin activador S9, las tasas de mutación inducida por los controles positivos fueron varias veces más altas (3-64) que la reversión espontánea del control (DMSO). Nuestros resultados indican que estas dosis de LQM402 no son mutagénicos para las cepas utilizadas con la prueba de Ames y son similares a los resultados obtenidos en un estudio de Ames de nuevos complejos de cobre (II) como la quinolinona con base de Schiff que fueron citotóxicos contra células de hepatocarcinoma humano (Hep-G2), pero no mutagénicos en las cepas de *S. typhimurium* TA98 y TA100 (Duff et al. 2012). Otros complejos de cobre evaluados por pruebas de Ames fueron $[\text{Cu}(\text{fendione})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{mal})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, que también fueron citotóxicos contra las líneas celulares Hep-G2 y de adenocarcinoma de riñón humano (A-498), pero no mutagénico en las cepas de *S. typhimurium* TA98 y TA102 (Deegan et al. 2006, Deegan et al. 2007). Estos resultados sugieren que algunos complejos de cobre pueden afectar con eficacia a las células cancerosas sin presentar actividad mutagénica.

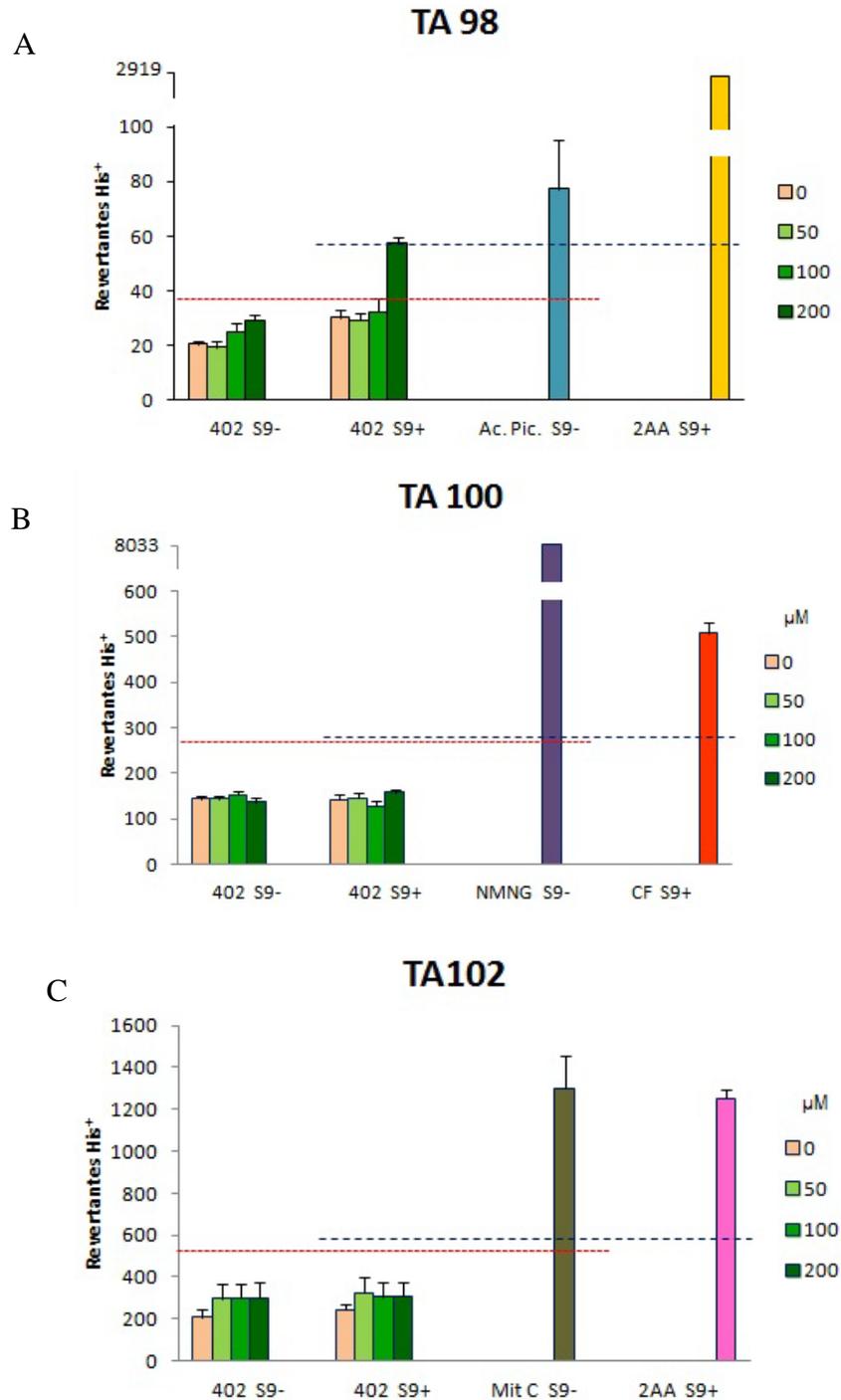


Figura 56. Actividad genotóxica del complejo LQM402 en la prueba de Ames. Se utilizaron las cepas *S. typhimurium* TA98 (A), TA100 (B) y TA102 (C). Controles positivos: Ácido picrolónico (AP), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NMNG), Mitomicina C (Mit C), 2-Aminoantraceno (2AA) y Ciclofosfamida (CF). El número de colonias revertantes a histidina (His^+) corresponde al promedio de tres experimentos por triplicado y error estándar. Las líneas punteadas representan el doble de revertantes espontáneas con (negro, S9+) o sin (rojo, S9-) el activador metabólico.

8.2.7 Actividad genotóxica del complejo LQM402 en sangre periférica de ratones CD1 (Ensayo de Micronúcleos)

Para evaluar la actividad genotóxica de LQM402 en un modelo *in vivo*, se evaluó el número de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPCE) encontrados en 1000 eritrocitos policromáticos (PCE), de acuerdo con criterios previamente publicados (Fenech, 2000). La capacidad de LQM402 para inducir MNPCE se muestra en la Figura 57, donde se observa que sólo los ratones tratados con el control positivo Mit C tuvieron aumentos estadísticamente significativos en los números de MNPCE a las 48 y 72 h con respecto a los ratones tratados con el vehículo (agua de alta pureza). Por lo general, es posible observar efectos mutagénicos iniciales de agentes inductores de micronúcleos a partir de las 24 h, la cantidad más alta de MN se presenta a las 48 h y el nivel disminuye a las 72 horas. Esto se observó con nuestro control positivo Mit C, pero no con el complejo de cobre LQM402.

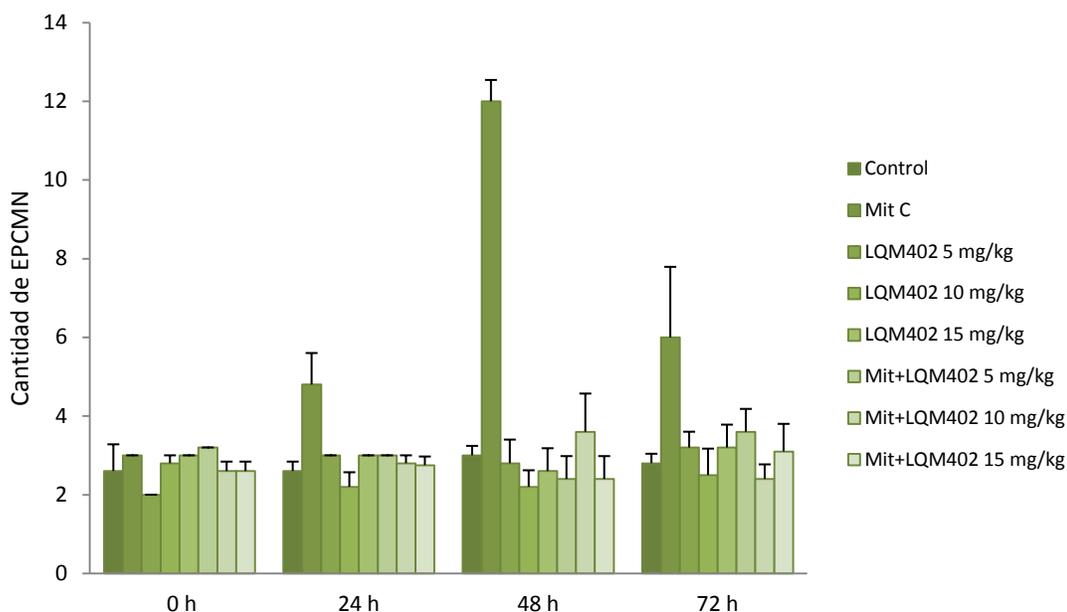


Figura 57. Efecto genotóxico del complejo LQM402 en sangre periférica de ratones CD1. Número de eritrocitos policromáticos con micronúcleos (EPCMN) encontrados en sangre de ratones tratados con diferentes concentraciones del complejo (cada una en una sola dosis) y obtenidos a 24, 48 y 72 h. Promedios de 5 ratones por tratamiento y error estándar.

La Figura 57 también muestra el efecto inhibitor de LQM402 en la formación de micronúcleos inducida con Mit C cuando el complejo de cobre se administró media hora

después de este fármaco de referencia. Todos los grupos tratados con LQM402 tuvieron un número similar de MNPCE tanto antes (0 h) como después del tratamiento (24, 48, y 72 h), con valores medios que van de 2 a 3.6 y no se observaron diferencias significativas entre los grupos o con respecto al control. Estos resultados demuestran que el complejo de cobre LQM402 tiene propiedades anti-mutagénicas.

Otra ventaja que nos da la prueba de micronúcleos, es que se puede obtener la relación de eritrocitos inmaduros policromáticos (EPC) encontrados con respecto a cierto número de eritrocitos maduros normocromáticos (ENC). Para ello se contaron 2000 eritrocitos totales y se obtuvieron las relaciones EPC/ENC mostradas en la Figura 58. Dicha figura nos muestra que a excepción de los animales tratados con Mitomicina C, el complejo LQM402 no indujo diferencias en la relación EPC/ENC al administrarlo solo en los ratones o junto con Mitomicina C. Un aumento en el valor de EPC/ENC es indicativo de que un compuesto de prueba está siendo citotóxico para las células sanguíneas y por lo tanto requiere que estos sean reestablecidos con células nuevas, que en este caso se observan como EPC. Esto podemos ejemplificarlo con el efecto que tuvo la Mit C a las 24 h y 48 h y cuyo efecto disminuyó a las 72 h, en donde ya se ve casi restablecida la relación EPC/ENC.

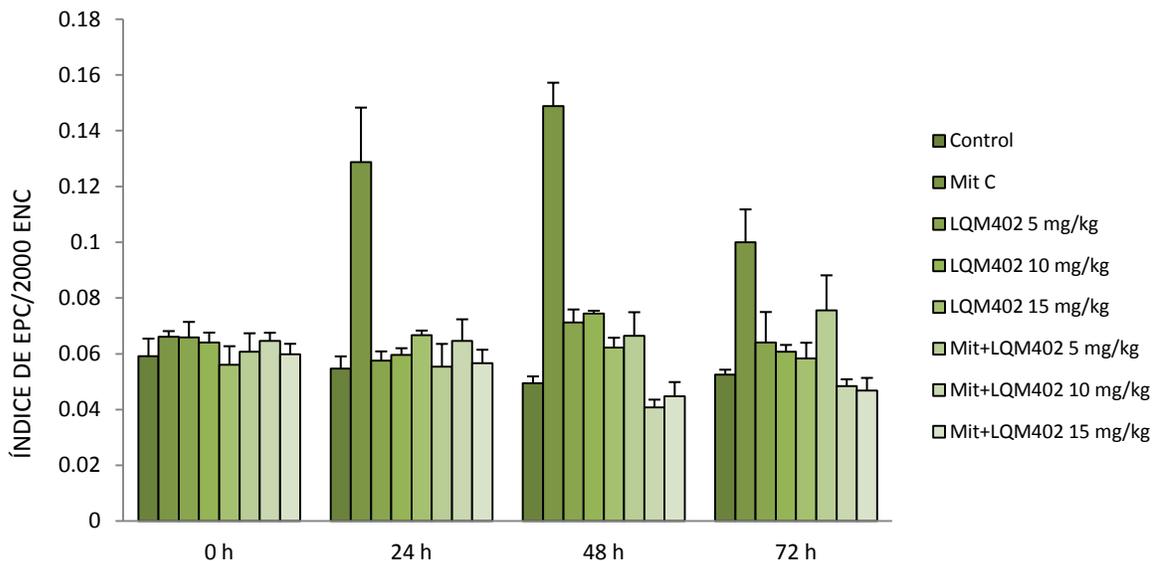


Figura 58. Índice de eritrocitos inmaduros policromáticos (EPC) respecto a 2000 eritrocitos maduros normocromáticos (ENC) en ratones CD1 tratados sólo con LQM402 a diferentes concentraciones o simultáneamente con Mitomicina C. Promedio de 5 ratones por cada grupo experimental y error estándar.

En general, hay pocos estudios de genotoxicidad de complejos de cobre que se hayan evaluado mediante el ensayo de micronúcleos. Una evaluación de micronúcleos inducidos por los complejos de cobre $\text{CuL}(\text{ClO}_4)_2$ y $\text{CuI}(\text{NO}_3)$ con el ligando macrocíclico 1,1'-bis-(bis-(6,6'-oxymetilenil-2, 2'-bipiridina) binaftilo (L) en cultivos de linfocitos humanos indicó genotoxicidad por la inducción de células micronucleadas a una dosis de 0.15 mg/kg durante 24 h y también citotoxicidad por una reducción en el número de células en esa misma dosis y tiempo (Beynek et al. 2007); no se observaron estos efectos con nuestro complejo de cobre, incluso a 33-100 veces dosis más altas. En los informes de las actividades genotóxicas de otros complejos de cobre, los investigadores utilizan comúnmente los ensayos de fragmentación de ADN. La mayoría de estos informes sugieren posibles efectos clastogénico o especies reactivas de oxígeno como los mecanismos para el efecto mutagénico de los complejos de cobre (Beynek et al. 2007, Serment-Guerrero et al. 2011, Szyba et al. 1992), sin embargo, debido a que nuestros resultados no mostraron actividad genotóxica de LQM402 en forma de aumento de micronúcleos en sangre periférica murina, no es probable que las concentraciones evaluadas indujeran división del ADN. Por lo tanto, la genotoxicidad y citotoxicidad de LQM402 podrían estar relacionados con un mecanismo de acción diferente al de otros compuestos de cobre que inducen la escisión de ADN.

8.3 ENSAYOS *In vivo* REALIZADOS CON EL COMPLEJO DE COBRE(II) LQM402

8.3.1 Establecimiento de tumores de cáncer cervical en ratones Nu/Nu

Al observar que el compuesto LQM402 fue citotóxico en las células de cáncer cervical, se decidió probar su potencial en un modelo *in vivo*. Para ello se procedió a realizar la inducción de tumores en ratones Nu/Nu atímicos utilizando las células que fueron más sensibles al complejo (HeLa).

La inoculación subcutánea dorso lateral de 1×10^6 células HeLa resuspendidas en medio de cultivo libre de suero fue suficiente para que a los 5-8 días después de la inoculación fuera detectable una pequeña protuberancia. En algunos casos, el tumor no fue medible en los primeros días. Tanto el comportamiento de los animales como su peso no mostraron cambios importantes desde el momento de la inoculación hasta el día de inicio de los diferentes tratamientos. Una vez establecido el tumor (Figura 59), el crecimiento de éste se observó de una forma exponencial.

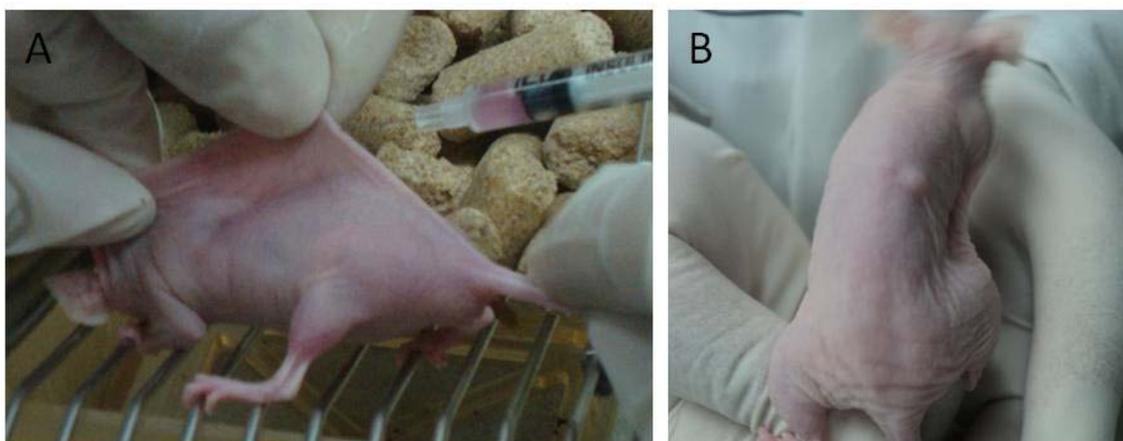


Figura 59. Estandarización del modelo xenográfico de CaCu. A) Inoculación de células de cáncer cervical humano en ratón desnudo Nu/Nu. B) Tumor xenográfico establecido con células HeLa en ratón Nu/Nu.

8.3.2 Evaluación del complejo LQM402 sobre el desarrollo de tumores

El tratamiento de los ratones desnudos con tumores inducidos dió inicio en el día 7 después de la inoculación con células HeLa (día 0), tiempo en el que el promedio general del tamaño de los tumores fue de $0.1 \pm 0.01 \text{ cm}^3$.

Como se puede apreciar en la Figura 60, el crecimiento del tumor inducido fue muy rápido en los ratones que sólo recibieron agua estéril como vehículo (donde se disolvió el complejo LQM402 antes de cada administración). Después de 20 días, el crecimiento de los tumores inducidos fue, en promedio de 0.84 cm^3 .



Figura 60. Desarrollo de tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu. Aspecto de los tumores inducidos con células HeLa a los A) 10, B) 13, C) 16 y D) 20 días después de la inoculación.

El crecimiento de los tumores inducidos en ratones que recibieron el complejo LQM402 también fue rápido y al parecer un poco discontinuo sobre todo en la dosis intermedia del compuesto (4.05 mg/kg). En la Figura 61 se puede apreciar que en los días 16 y 20 (las dos últimas barras de cada conjunto) el crecimiento de los tumores fue menor en las dos primeras dosis del complejo LQM402 (0.81 mg/kg y 4.0 mg/kg). Este mismo efecto se observó con la dosis más elevada de nuestro complejo (8.1 mg/kg), pero en este caso fue a partir de la medida del tumor en el día 13 del tratamiento (tercer barra en el conjunto de dicha dosis).

Comparando con el control tumor + vehículo, sólo se observó un efecto inhibitor del crecimiento con el complejo de cobre a las dosis baja (0.81 mg/kg) y alta (8.1 mg/kg) del

día 16 al 20 de tratamiento, esto es, un día después de que se les administró la dosis 10 del complejo y un día antes del sacrificio de los animales.

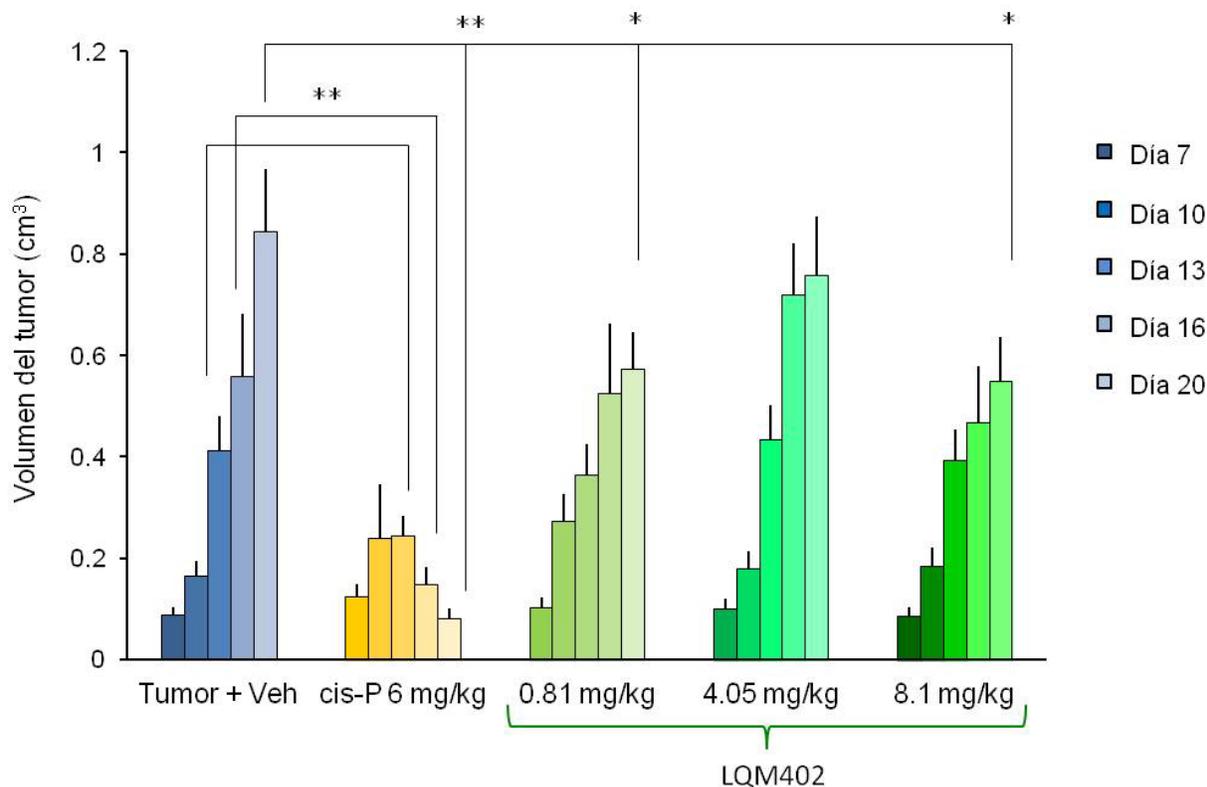


Figura 61. Efecto del complejo LQM402 sobre el desarrollo de tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu. *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$) comparado con el tumor + vehículo al mismo día de tratamiento, $n = 10$.

La dosis media del complejo de cobre (4.05 mg/kg) no mostró tener efecto significativamente distinto al grupo de animales tratados con agua estéril, mientras que el *cis*-Platino, en el grupo de animales tratados con este fármaco de referencia, mostró su efecto inhibitor del desarrollo tumoral a partir del día 13 de la inducción y correspondiente a sólo 6 días después de que se les administró la dosis única de 6 mg/kg. En los días siguientes, el tumor de los ratones tratados con *cis*-Platino no sólo dejó de crecer sino que tuvieron una disminución del tamaño llegando incluso a ser menor que aquel en el que se iniciaron las mediciones (Figura 62) y revirtió totalmente en un ratón de este grupo experimental.

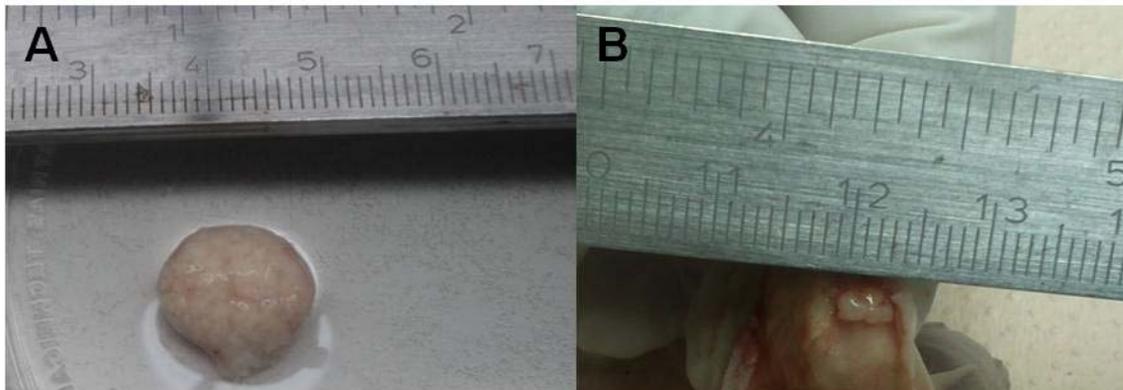


Figura 62. Tamaño y aspecto de tumores inducidos en ratones atímicos. Imágenes de un tumor de ratón que recibió el vehículo (A) y de uno que fue tratado con *cis*-Platino (B).

Actualmente es ampliamente conocida la eficacia del *cis*-Platino en el tratamiento antitumoral, pero en los primeros estudios realizados a nivel mundial con compuestos de platino en los que observaron su potencial para inhibir la división celular en bacterias, diversos investigadores quisieron conocer si los compuestos tenían el mismo efecto sobre células tumorales de mamíferos sin ser demasiado tóxicos para los animales. Así, con la síntesis de diversos compuestos de platino, los investigadores determinaron la dosis letal 50 ($DL_{50} = 13 \text{ mg/kg}$) e implantaron subcutáneamente tumores de sarcoma 180 en ratones. A los 10 días de la implantación, los tumores habían alcanzado 100 veces su tamaño inicial, pero pudieron ser reducidos con una administración única de 8 mg/kg de los compuestos de platino. Entre sus diversos compuestos, el *cis*-Platino fue el más efectivo tanto con la administración en el día 1 como en el día 8, después de la implantación de los tumores (Rosenberg et al. 1969). Nuestro modelo fue semejante a este segundo tipo de administración y pudimos obtener una efectividad similar por parte del *cis*-Platino a pesar de que los tumores inducidos son de distinto tipo.

En el modelo de Rosenberg y colaboradores se menciona la regresión total de los tumores en el día 36 y que los animales alcanzaron su tiempo de vida normal, además de que mantuvieron un efecto protector durante 11 meses contra la implantación del mismo tipo de tumor. En nuestra investigación se sacrificaron todos los animales al término del estudio, pero sería interesante conocer si el complejo de cobre pudiera revertir completamente el tumor a tiempos más largos y si el complejo no genera efectos

secundarios a largo plazo que pudieran impedir que los ratones alcanzaran su tiempo promedio de vida.

Aunque se han evaluado diversos complejos de cobre con actividad antitumoral *in vitro*, son menos los estudios de ellos en modelos *in vivo*. La casiopeina III-ia fue evaluada en un modelo *in vivo* con células tumorales de colon HCT-15 (1×10^6 células) transplantadas subcutáneamente a ratones desnudos que fueron tratados con 4 dosis (una cada 7 días) de 4 mg/kg de *cis*-Platino o con 6 dosis (una cada 4 días) de la casiopeina III-ia a las concentraciones de 3.0 o 6.0 mg/kg (Carvallo-Chaigneau et al. 2008). Carvallo-Chaigneau y colaboradores evaluaron el volumen relativo del tumor, días en duplicar el tamaño del tumor y el índice mitótico para conocer el efecto antitumoral de su compuesto. En sus resultados, los tumores tratados con la casiopeina III-ia crecieron más lento que los tumores del grupo control, los que mostraron un valor de 3.52 comparado con un volumen de 0.66 cm^3 en el grupo de casiopeina III-ia en la dosis de 6.0 mg/kg al día 21 de tratamiento. El grupo control necesitó 5.1 días para duplicar el tamaño del tumor, *cis*-Platino 5.4 y casiopeina III-ia 12.2 días en promedio. En cuanto al índice mitótico, los tumores de ratones tratados con casiopeina III-ia mostraron reducciones de 43.5 y 58% respectivamente en cada una de las dosis utilizadas, comparado con el índice mitótico en los tumores del grupo control. Con sus resultados, los autores sugieren que su compuesto tiene un efecto antitumoral a través de la inhibición de la proliferación. En nuestro estudio *in vitro* con el complejo de cobre LQM402, los resultados indican que existe también inhibición de la proliferación, lo que podría también relacionarse a la inhibición del crecimiento tumoral obtenido en los ratones.

Otros compuestos de cobre evaluados *in vivo*, son los complejos de cobre con el ligando Bis(tiosemicarbazona) sintetizados por Palanimuthu y colaboradores, los cuales se mencionaron previamente porque su actividad citotóxica es inducida por generación de especies reactivas de oxígeno. De estos compuestos, el Cu(GTSC) ha demostrado ser el más citotóxico en diversas líneas celulares como SiHa, MCF-7, PC-3 y HepG2, por lo que también se evaluó en un modelo *in vivo* de cáncer colorectal inducido al inyectar 5×10^6 células HCT116. El complejo Cu(GTSC) fue administrado diariamente durante 7 días por vía intraperitoneal. Los tumores del grupo control en el estudio de las Bis(tiosemicarbazonas) alcanzaron volúmenes cercanos a 0.6 cm^3 en el día 26 después

de la inoculación, mientras que los del grupo tratado con Cu(GTSC) apenas alcanzaron volúmenes de 0.1 cm^3 al día 23 y empezaron a disminuir su volumen en días posteriores (Palanimuthu et al. 2013), como lo vimos en nuestro estudio con el tratamiento con *cis*-Platino, pero no con nuestro complejo de cobre. En las dosis y el tiempo que duró nuestra evaluación del crecimiento tumoral, el LQM402 sólo mostró un efecto estadísticamente significativo para inhibir el crecimiento tumoral inducido con células HeLa comparado con los tumores del grupo control al día 20 después de la inoculación con células, por lo que no sabemos si después de ese tiempo la inhibición del crecimiento continúa o si puede existir una reversión de los tumores. Sin embargo, al igual que en la sección de estudios *in vitro*, en resultados posteriores se muestra que el LQM402 presenta actividad antitumoral detectada con otros ensayos.

8.3.3 Evaluación del complejo LQM402 sobre el peso de ratones con tumor inducido

Como dato necesario y complementario, es importante llevar un seguimiento del peso de los ratones en cualquier modelo experimental, sobre todo si éste implica la administración de un agente de prueba, ya que se considera que la pérdida de peso es un indicador de toxicidad (Carvallo-Chaigneau et al. 2008). Durante nuestro modelo de inducción de tumores y la evaluación del efecto del complejo de cobre LQM402 sobre el crecimiento tumoral, se registraron los pesos de los animales durante los días de tratamiento, los cuales se muestran en la Figura 63.

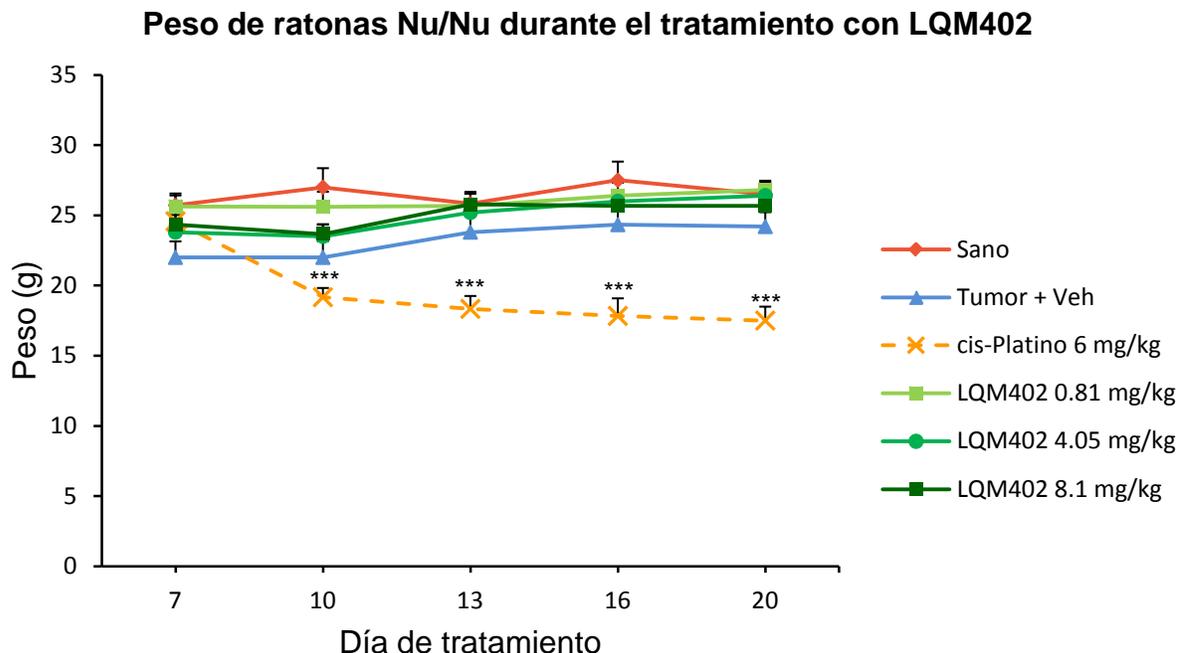


Figura 63. Seguimiento del peso de ratones Nu/Nu con tumor inducido y tratados con LQM402 o *cis*-Platino. ***($p \leq 0.001$), $n=10$.

El promedio general del peso de los ratones en el día que se inició la administración de los tratamientos fue de 24.34 ± 1.36 g, mismo que fue incrementando en el transcurso de los días hasta alcanzar un promedio de 25.9 ± 1.04 g. El único grupo que mostró diferencia significativa ($p < 0.001$) y que disminuyó drásticamente de peso con respecto al peso de ratones sanos en los primeros días, luego de la administración de la dosis única, fue el grupo del *cis*-Platino (Figuras 63 y 64), lo cual refleja la toxicidad de este compuesto que a pesar de ser altamente efectivo, tiene un uso limitado en la terapia antitumoral debido a sus efectos secundarios (Jiang et al. 2004). El peso de nuestros ratones tratados con LQM402 o con el vehículo no fue estadísticamente diferente al de los ratones sanos.

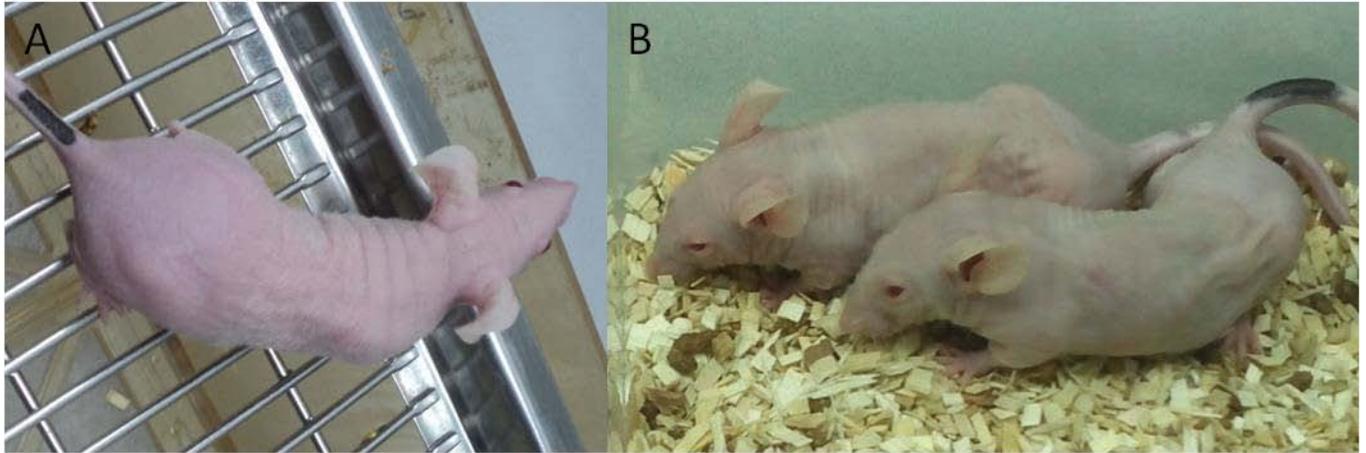


Figura 64. Apariencia de ratonas atímicas Nu/Nu al inicio (A) y final (B) del tratamiento con *cis*-Platino.

8.3.4 Evaluación del complejo LQM402 sobre la expresión de genes asociados a tumor en tejido tumoral de CaCu inducido en ratones Nu/Nu

El posible efecto del complejo de cobre LQM402 para modificar la expresión de genes fue evaluado mediante la técnica de PCR en tiempo real obteniendo ARN de los tumores inducidos en ratones Nu/Nu y posteriormente sintetizando ADN complementario (cADN) por RT-PCR. Se eligió al gen GAPDH como constitutivo debido a su presencia homogénea y ubicua en casi todos los tipos celulares y considerando la expresión de éste como la expresión basal; se obtuvo la expresión relativa de los genes estudiados utilizando el método Ct comparativo (δ Ct).

De manera general, se pudo observar que todos los genes evaluados en los tumores inducidos en ratones que sólo recibieron el vehículo (agua estéril) fueron sobreexpresados con respecto al gen constitutivo GAPDH y que el efecto del tratamiento de los tumores con el fármaco de referencia *cis*-Platino, así como con las distintas dosis del compuesto de prueba LQM402, sí ejercen un comportamiento diferencial en la expresión de los genes evaluados, al normalizarlos contra el resultado en los tumores de ratones tratados con el vehículo.

El gen p53 tiene una secuencia altamente conservada evolutivamente. Se ha aislado de peces, anfibios, aves y mamíferos y su homólogo en el nemátodo *C. elegans* ha sido ampliamente estudiado. Se ha reportado que la proteína producto de este gen se encuentra en mínimas cantidades en tejidos normales, pero que su expresión está

aumentada en un amplio número de tumores y líneas celulares tumorales, por lo que se considera que su regulación es afectada por cambios en el ambiente celular y acoplamiento con otras proteínas, además de su elevada asociación con mutaciones que originan cáncer (Lane and Benchimol 1990). El gen p53 se reporta como normal en las células de cáncer cervical HeLa, esto es, sin mutaciones. Sin embargo sí se describe que la expresión se encuentra disminuida en estas células. Para considerar que un compuesto es efectivo sobre el gen p53, se requeriría que lo exprese positivamente si está disminuido o que lo inhiba si está mutado, lo cual no es el caso de las células HeLa. En sí, la mayoría de células de cáncer cervical poseen el tipo silvestre del gen p53, pero en ocasiones sus funciones normales se encuentran alteradas debido a la presencia de la proteína E6 del virus del papiloma humano. En células tumorales con p53 mutado, se ha observado que *cis*-Platino induce apoptosis en células de cáncer cervical modificando al ADN y es capaz de revertir un p53 mutado para restaurarlo a su condición normal y que sea capaz de inducir muerte celular (Huang et al. 2004); además, *cis*-Platino puede también promover la expresión de proteínas que participan en la muerte celular (Yim et al. 2006). En la Figura 65 se observa que el *cis*-Platino indujo una expresión positiva de 0.88 del gen p53 con respecto a los tumores inducidos en ratones que sólo recibieron el vehículo. De igual manera, la dosis más alta de nuestro complejo (8.1 mg/kg) indujo casi la mitad de la sobreexpresión de este gen inducida con *cis*-Platino (0.436), mientras que las dosis baja e intermedia indujeron una expresión negativa.

Este resultado nos sugiere que el efecto del complejo LQM402 puede, a una concentración de 8.1 mg/kg, estar mostrando un efecto semejante al del *cis*-Platino a una dosis similar induciendo una expresión positiva del gen p53 como una respuesta a daño celular y en un esfuerzo de inducir muerte de las células alteradas, en este caso, las tumorales.

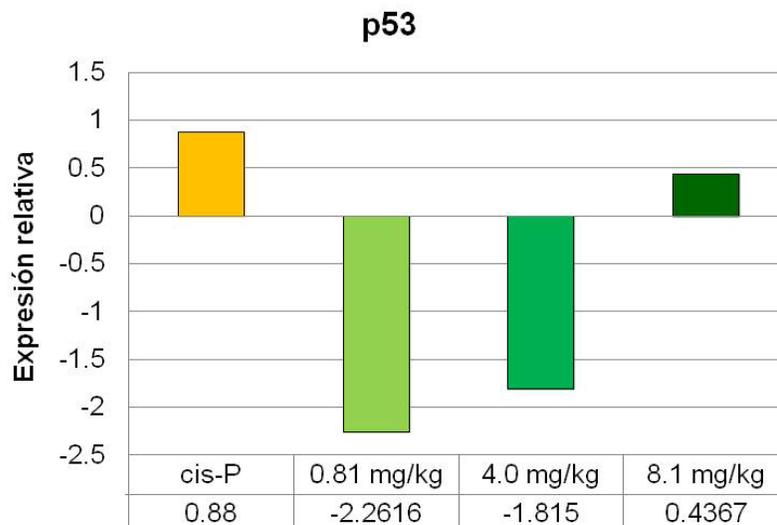


Figura 65. Expresión relativa del gen p53 en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con *cis*-Platino (amarillo) y con diferentes concentraciones del complejo LQM402 (verde).

La proteína Ki67 es ampliamente conocida y exclusivamente asociada a proliferación celular, por lo que se ha consolidado como marcador tumoral (Bullwinkel et al. 2006). Un estudio realizado para conocer el valor pronóstico de Ki67 y p53, revela que su presencia y la relación entre estas proteínas pueden ser de mucha significancia para revelar un mal pronóstico en pacientes con diversos estadios de cáncer cervical (Stoenescu et al. 2011). El estudio de este gen y su producto se ha vuelto de gran importancia tanto por su valor pronóstico como por la capacidad de indicar el potencial proliferativo de un tumor o el efecto inhibitor de un posible fármaco antitumoral.

La Figura 66 nos muestra que, con respecto a la expresión del gen de proliferación Ki67 en los ratones con tumor inducido que sólo recibieron el vehículo, tanto el tratamiento con *cis*-Platino como con las diferentes dosis del complejo LQM402 indujeron una expresión negativa de este gen, por lo que podemos decir que las diferentes dosis del compuesto LQM402 probablemente son capaces de inhibir la proliferación celular mediada por él, y que su expresión fue reduciéndose de manera inversamente proporcional a la dosis en los tumores de ratones tratados con el complejo, aunque la expresión en los tumores de ratones que recibieron el *cis*-Platino fue 2.76 veces menor que la expresión negativa inducida por el complejo de cobre.

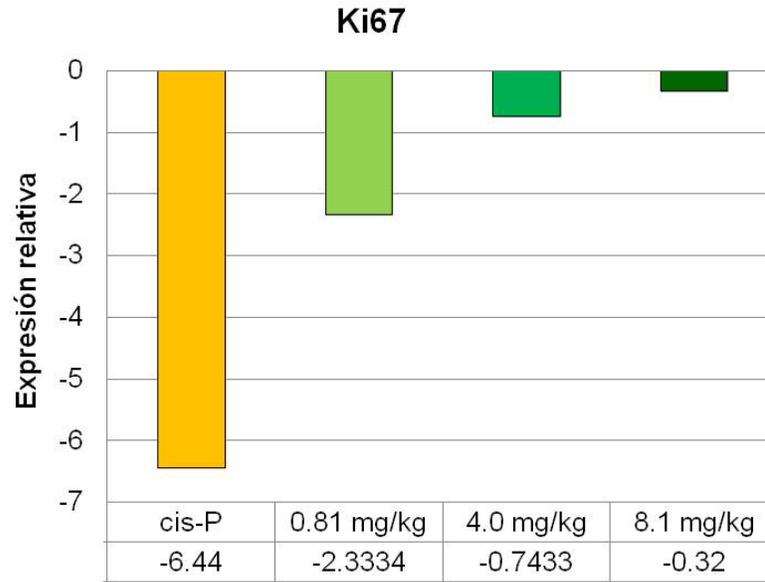


Figura 66. Expresión relativa del gen Ki67 en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con *cis*-Platino (amarillo) y con diferentes concentraciones del complejo LQM402 (verde).

Los tratamientos en nuestro estudio sí causaron un efecto sobre el gen que codifica para esta proteína, pues con respecto a la expresión en el tumor que sólo recibió el vehículo, todos los tratamientos disminuyeron la expresión del gen, siendo el *cis*-Platino el fármaco que confirma su efecto inhibitor de la proliferación. Sin embargo, el hecho de que el complejo de cobre no alcance los valores de expresión negativa de Ki67 inducidos con *cis*-Platino, correlaciona con el bajo efecto que se observó físicamente en el desarrollo tumoral, pero tampoco debe descartarse la posibilidad de que otros genes y proteínas puedan estar involucrados en la inhibición del crecimiento que el complejo de cobre tuvo sobre los tumores justo antes de sacrificar a los animales.

Los siguientes genes fueron evaluados en pares porque sus productos han sido reportados como involucrados en distintas rutas o procesos metabólicos tumorales. Tal es el caso de interleucina-6 (IL-6) y la metaloproteína de matriz-10 (MMP-10) que se han sugerido como marcadores de cáncer y específicamente de cáncer cérvico-uterino (Vazquez-Ortiz et al. 2005). En la Figura 67 se observa que el tratamiento con *cis*-Platino indujo la expresión positiva de IL-6 al igual que 8.1 mg/kg del complejo de cobre LQM402,

pero en un nivel 3.18 veces mayor, mientras que las dosis baja e intermedia del complejo indujeron la expresión negativa de este gen en niveles similares.

Los genes IL-6 y MMP-10, que se han reportado como marcadores de cáncer cervical, mostraron expresión diferencial en tumores de ratones tratados con *cis*-Platino o con el compuesto LQM402 en las diferentes dosis utilizadas. Sin embargo, es notable el efecto positivo causado por el fármaco de referencia *cis*-Platino sobre la expresión relativa. Vázquez-Ortiz y colaboradores reportan que las células sanas no expresan estos genes, mientras que en distintas líneas celulares, incluyendo HeLa y muestras de tejido tumoral, se ha encontrado la presencia de IL-6 y MMP-10.

El producto del gen IL-6 es una citocina pleiotrópica que funciona como mediador en reacciones inmunológicas, pero también como un factor de crecimiento. Se han encontrado cantidades abundantes de esta proteína en líneas celulares humanas derivadas de carcinoma de células escamosas y en adenocarcinomas de cuello uterino, aunque el potencial de expresión no corresponde con el número de receptores presentes en las mismas células (Takano et al. 1996). La presencia de IL-6 puede jugar un papel importante en la patogénesis del cáncer cérvico-uterino, ya que el incremento en su expresión se ha asociado con lesiones neoplásicas cervicales y a la vez como una citocina perteneciente también al linaje macrófago, con lo cual se puede correlacionar la expresión observada con la infiltración de macrófagos al tumor. Por otro lado, estudios *in vitro* sugieren que esta citocina puede modular la proliferación tumoral más en forma parácrina que autócrina (Tartour et al. 1994). De acuerdo a esto, tal vez la expresión relativa de IL-6 no coincida exactamente con la cantidad de la citocina que podríamos encontrar en el suero de los ratones ya que el efecto del *cis*-Platino y de la dosis alta del compuesto LQM402 estaría indicando un fenotipo tumoral más invasivo. Sin embargo, para IL-6, las dosis baja e intermedia del compuesto LQM402 no presentan el mismo efecto mostrado por la dosis alta y el *cis*-Platino, sugiriendo que una concentración baja del compuesto podría estar induciendo la reducción de IL-6 y por lo tanto, una de las características que identifican al tumor.

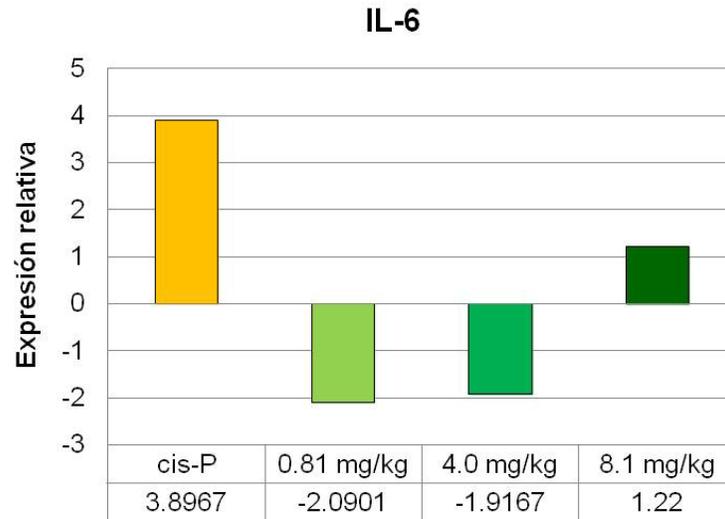


Figura 67. Expresión relativa del gen de IL-6 en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con *cis*-Platino (amarillo) y con diferentes concentraciones del complejo LQM402 (verde).

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) están involucradas en la degradación de componentes proteicos de la matriz extracelular y por lo tanto juegan un papel importante en la invasión y metástasis y su expresión está relacionada a la progresión de cánceres ginecológicos (endometrial, cervical o de ovario) (Schropfer et al. 2010). Vázquez-Ortiz y colaboradores reportaron por primera vez la expresión del gen MMP-10 relacionada con el cáncer cérvico-uterino debido a su presencia constante en diferentes líneas celulares de este tipo de cáncer y en muestras de biopsias de pacientes con la enfermedad (Vazquez-Ortiz et al. 2005) por lo que quisimos conocer su comportamiento en los tumores inducidos en ratones que fueron tratados en LQM402 y *cis*-Platino.

La expresión relativa de este otro gen marcador de CaCu (MMP-10) fue también positiva y mayor con el tratamiento de *cis*-Platino que con el tratamiento con el complejo de cobre. En la dosis de 0.81 mg/kg de LQM402 hubo una ligera expresión negativa en la expresión de este gen, la cual, como se observa en la Figura 68, fue incrementándose conforme se aumentó la concentración del complejo, pero sin llegar a los niveles de expresión alcanzados por *cis*-Platino (1.53 vs. 2.66, respectivamente).

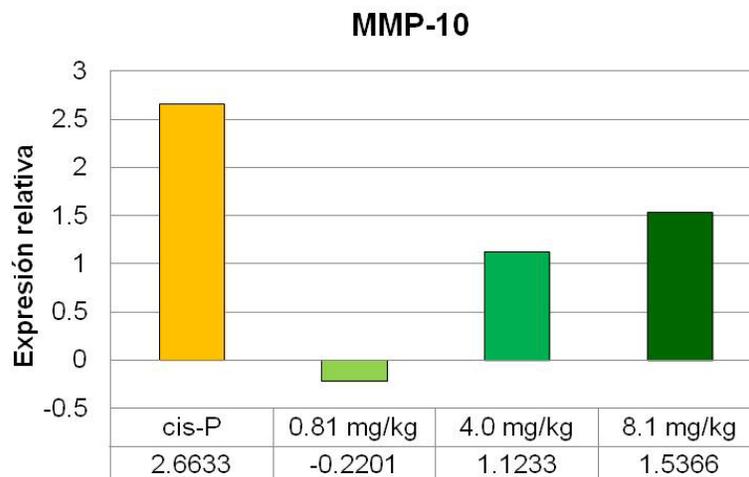


Figura 68. Expresión relativa del gen de MMP-10 en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con *cis*-Platino (amarillo) y con diferentes concentraciones del complejo LQM402 (verde).

Por su parte, las integrinas son una superfamilia de receptores transmembranales que forman heterodímeros no covalentes con la unión de sus unidades alfa o beta. Su importancia radica en su función estructural formando puentes entre componentes de la matriz extracelular y el citoesqueleto para mediar la transducción de señales que promueven la regulación de funciones celulares como adhesión, migración, proliferación, apoptosis y diferenciación, por lo que se ha considerado que su carencia está asociada a la disminución de la proliferación celular (Benoit et al. 2009).

Con respecto a estos genes involucrados en la adhesión tumoral y metástasis, el complejo de cobre LQM402 tuvo poco efecto sobre la expresión del gen de la integrina $\alpha 8$, la cual fue ligeramente expresada positivamente en la dosis más baja del complejo (0.81 mg/kg) y fue expresada negativamente en las siguientes dosis. El efecto del *cis*-Platino sobre el gen de integrina $\alpha 8$ fue relevante en las muestras de tumores de ratones tratados con este fármaco, pues la expresión positiva de este gen alcanzó niveles de 3.82 como se puede observar en la Figura 69. No se encontraron reportes del efecto de *cis*-Platino o complejos de cobre sobre este gen o su proteína, pero en nuestros resultados podemos ver claramente que el efecto de ambos compuestos es muy diferente, pues mientras *cis*-Platino induce la expresión positiva del gen, el complejo de cobre casi no tiene efecto sobre éste. Valdría la pena evaluar la proteína, producto de este gen, mediante otro

método como western blot para conocer si realmente esta integrina está formando parte de los tumores inducidos con células HeLa o más bien puede ser inducida con *cis*-Platino.

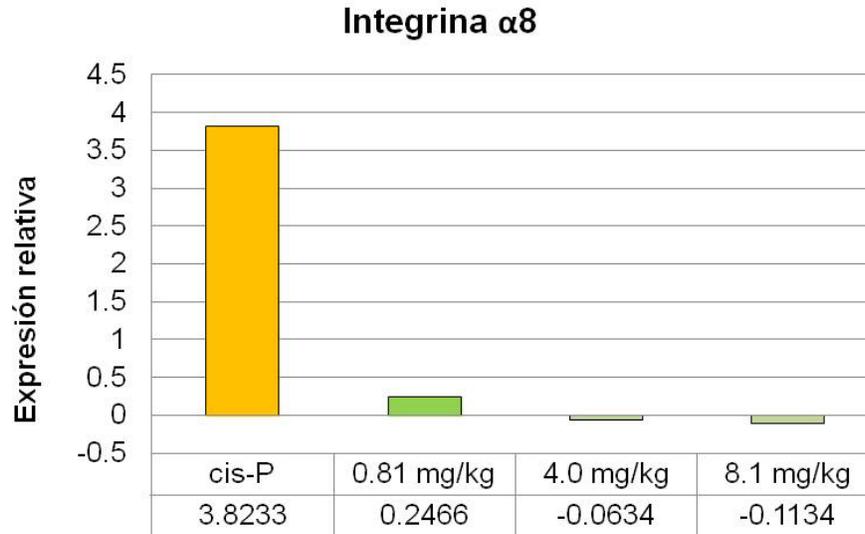


Figura 69. Expresión relativa del gen de Integrina $\alpha 8$ en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con *cis*-Platino (amarillo) y con diferentes concentraciones del complejo LQM402 (verde).

La secreción de metaloproteinasas de matriz por células cancerosas de cérvix y ovario tienen una participación importante en la invasión tumoral y metástasis ya que degradan diversos componentes de la matriz extracelular como colágeno, laminina, fibronectina, elastina y proteoglicanos. Debido a esta actividad en la tumorigénesis, se ha considerado como un posible blanco terapéutico, pues su bloqueo podría reducir la invasión y metástasis tumoral (Roomi et al. 2010). Se han identificado más de 20 MMP y entre ellas, la expresión de MMP-9 se ha encontrado que es activada o incrementada por proteínas oncogénicas en diversos tipos de cáncer como cáncer de mama, de próstata, de vejiga y de páncreas (Li et al. 2012). Por lo anterior, conocemos entonces que las células de CaCu pueden expresar estas proteínas y por ende, poseen el gen MMP-9. La expresión de este gen en nuestras células HeLa podría estar indicando que el tumor inducido tiene potencial invasivo que pudo ser inhibido tanto por el efecto del *cis*-Platino como por el del complejo de cobre. En el caso particular de este gen, las dosis de 0.81 y 4.0 mg/kg indujeron la menor expresión relativa del gen MMP-9, con lo que podemos decir

que estas dosis fueron más efectivas que 6 mg/kg de *cis*-Platino u 8.1 mg/kg de LQM402 para inducir la expresión negativa del gen. Pero de manera general, nuestro complejo tiene potencial para inhibir la agresividad tumoral mediada por MMP-9.

En la Figura 70 se observa que los tratamientos con *cis*-Platino y las diferentes dosis de LQM402, indujeron la expresión negativa del gen MMP-9. Tanto el *cis*-Platino como la dosis más alta del complejo tuvieron un efecto similar, con una expresión negativa que no fue más allá de -1, mientras que las dosis baja e intermedia tuvieron una expresión negativa cercana a -3. La tendencia en la expresión del gen MMP-9 fue dependiente de la concentración del complejo LQM402, siendo más negativa la expresión con la dosis baja y menos negativa con la dosis alta.

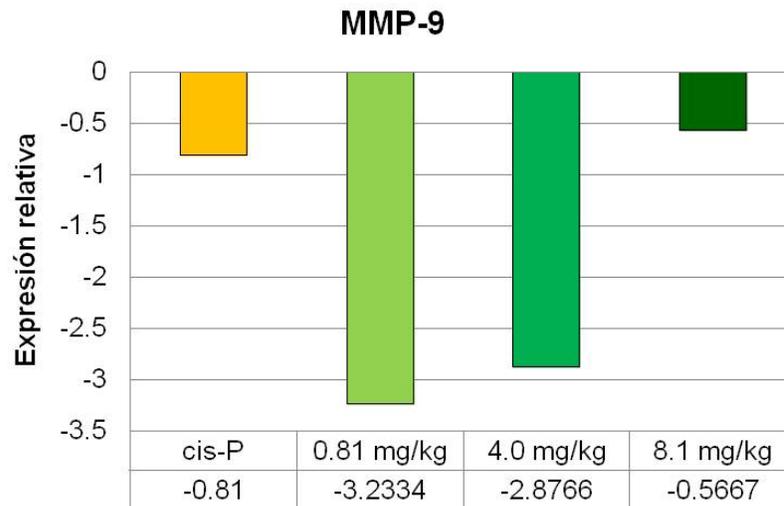


Figura 70. Expresión relativa del genMMP-9 en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con *cis*-Platino (amarillo) y con diferentes concentraciones del complejo LQM402 (verde).

Los miembros de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) estimulan la proliferación de células endoteliales vasculares y linfáticas a través de los receptores VEGFR-2 y VEGFR-3 en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Entre los diversos miembros de esta familia, el VEGF-C expresado en tejidos cancerosos tiene una correlación positiva con el riesgo de metástasis linfática en una gran variedad de tumores, entre ellos, cáncer cervical (Ma D. M. et al. 2011). Al igual que los tejidos normales, el tejido tumoral requiere la aportación de oxígeno y nutrientes, así como una vía para

eliminar desechos metabólicos y dióxido de carbono. Para ello se genera una nueva vasculatura asociada al tumor mediante el proceso de angiogénesis en donde los miembros de la familia VEGF son los principales actores (Hanahan and Weinberg 2011).

Durante el crecimiento de los tumores inducidos en nuestro estudio, se hizo notorio el tamaño de las venas dirigidas al tumor, por lo que sugerimos que en nuestro modelo de inducción de tumores no sólo hubo un claro establecimiento del tumor, sino que estos fueron capaces de promover la angiogénesis. Esto nos llevó a querer conocer si el complejo de cobre era capaz de tener un efecto inhibitor de este proceso y por ello evaluamos el efecto del LQM402 en la expresión del gen VEGF-C. En la Figura 71 se observa que sólo la dosis de 8.1 mg/kg administrada a los ratones indujo una expresión negativa de este gen, mientras que las otras dosis y el *cis*-Platino indujeron una expresión positiva. Este resultado se asemeja al reportado por Peng Dong y colaboradores, quienes encontraron incrementada la expresión de VEGF-C en ratones con tumores de pulmón tratados con *cis*-Platino (Dong et al. 2013). Tanto en nuestro estudio como en el reportado por Dong se confirma el potencial del *cis*-Platino para inhibir el crecimiento tumoral, pero con nuestros resultados podemos decir que este efecto probablemente no se está dando a través de la inhibición de la angiogénesis mediada por VEGF.

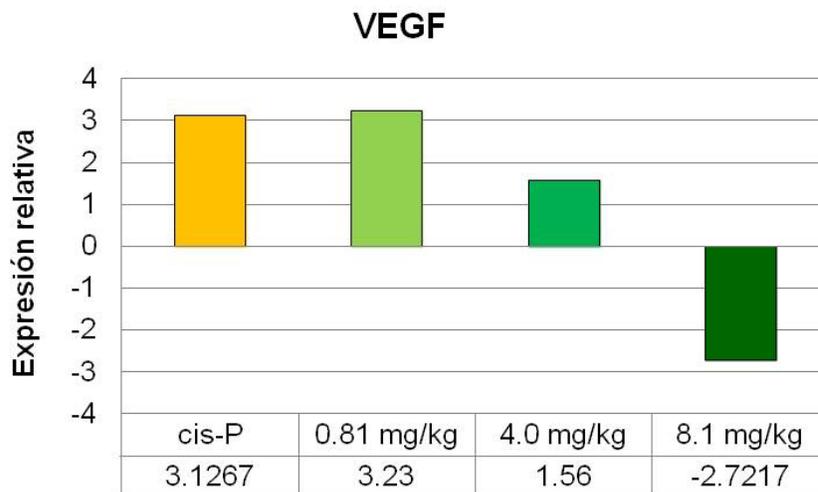


Figura 71. Expresión relativa del gen VEGF en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con *cis*-Platino (amarillo) y con diferentes concentraciones del complejo LQM402 (verde).

Considerando el avance en el desarrollo tumoral que pudimos observar en nuestro modelo *in vivo*, para nosotros era importante evaluar otro posible gen y/o producto asociado a la angiogénesis que pudiera ser afectado por LQM402, por lo que se evaluó la expresión diferencial del gen de plexina-B1, ya que la inhibición de algún gen, proteína o vía involucrada en este proceso le daría a nuestro complejo un importante valor farmacológico para inhibir o retrasar el desarrollo tumoral.

El término Plexina abarca una amplia familia de receptores transmembranales para semaforinas. Estas interacciones participan en procesos como extensión neuronal, crecimiento de axones y mantenimiento de redes neuronales, pero otros estudios han revelado que también se encuentran en la regulación de la respuesta inmune, sistema cardiovascular, esqueleto, crecimiento y metástasis tumoral. Se han obtenido resultados opuestos en diversos tipos de cáncer, pues mientras la pérdida de la expresión de plexina-B1 en cáncer de mama correlaciona con un fenotipo más agresivo, en carcinoma renal, su regulación negativa indujo la inhibición del crecimiento tumoral (Ye et al. 2010). Estudios clínicos han descubierto la participación y significancia de plexina-B1 en el cáncer humano. Por un lado, la expresión de este gen implica un papel supresor tumoral en la oncogénesis y por otro lado, su expresión en cáncer de ovario y mama está asociada con un alto grado de avance tumoral y metástasis hacia los nodos linfáticos (Ch'ng and Kumanogoh 2010), por lo que la función exacta de plexina-B1 en tumorigénesis y progresión del cáncer no está completamente clara.

En la Figura 72 se observa el efecto del *cis*-Platino y el complejo de cobre sobre la expresión del gen de plexina-B1. La expresión de este gen fue regulado negativamente por *cis*-Platino y en menor grado por las dosis baja e intermedia del complejo de cobre LQM402, aunque el efecto de la dosis de 8 mg/kg de LQM402 sobre los tumores fue apenas perceptible, éste presenta también expresión negativa, siendo entonces un efecto dosis-dependiente: A menor concentración fue más negativa la expresión del gen de plexina-B1.

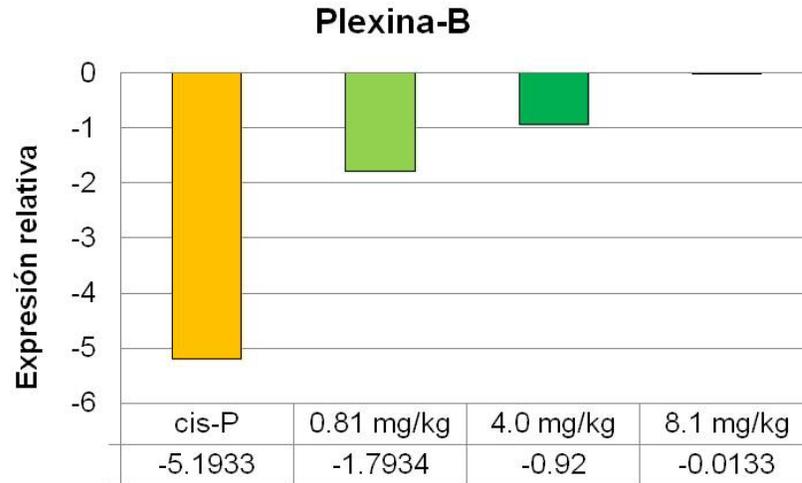


Figura 72. Expresión relativa del gen Plexina-B en tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu tratados con *cis*-Platino (amarillo) y con diferentes concentraciones del complejo LQM402 (verde).

Qiang y colaboradores encontraron mediante inmunohistoquímica, western blot y RT-PCR cuantitativa que plexina-B1 está sobreexpresada en tejido de cáncer cervical comparada con tejido de cérvix normal y que esta expresión está significativamente asociada con la metástasis e invasión tumoral promoviendo la proliferación, migración e invasión de células HeLa en ratones desnudos BALB/c. *In vitro*, la transfección de células con RNA de interferencia contra plexina-B1 causó reducción en la velocidad de migración celular tanto a un área sin células en caja de cultivo como en placas de invasión (Qiang et al. 2011).

La expresión negativa del gen de plexina-B1 que nosotros obtuvimos en nuestro estudio tiene cierta correlación con el efecto observado en los tumores inducidos, siendo más negativa la expresión en los tumores de ratones tratados con *cis*-Platino, que a la vez fueron los tumores que mostraron no sólo la inhibición del crecimiento sino una regresión. La expresión negativa del gen de plexina-B1 en los ratones tratados con el complejo LQM402 fue menor que la del *cis*-Platino, al igual que el efecto sobre el desarrollo tumoral. Sin embargo, nuestro complejo de cobre podría tener un efecto inhibitor de la angiogénesis más asociado a la inhibición del gen de plexina-B1, que a la inhibición del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF-C).

8.3.5 Evaluación de muerte celular con la técnica de TUNEL *in situ* promovida por el complejo LQM402 en tejido tumoral de CaCu inducido en ratones Nu/Nu

Los tumores obtenidos de los ratones utilizados en nuestro estudio fueron conservados y procesados para analizar la presencia de muerte celular por apoptosis utilizando el kit de Roche *In Situ* Cell Death Detection. Con la técnica de TUNEL, nucleótidos marcados con fluoresceína son incorporados a los extremos 3'OH libres que se generan por la fragmentación de ADN (característica de la apoptosis) mediante la enzima deoxinucleotidiltransferasa terminal. Un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina reconoce dichos nucleótidos marcados produciendo una reacción con sustrato que puede ser analizada bajo el microscopio de fluorescencia.

En la Figura 73 se muestran imágenes de la fluorescencia presentada en regiones representativas de los tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu que recibieron o no los distintos tratamientos. Como control negativo (A) se utilizaron cortes histológicos de tejido tumoral de ratones que no recibieron ningún tratamiento. Se realizó la técnica de TUNEL sobre dicho tejido montado sobre laminillas y por lo tanto, sólo se puede ver la fluorescencia de fondo o basal en la imagen correspondiente. El control positivo (B) fue igualmente tejido tumoral de ratón que sólo recibió agua como vehículo. Estos tejidos fueron procesados con la técnica histológica descrita en la metodología hasta la etapa de montaje en las laminillas. La rehidratación y permeabilización fueron parte de la técnica de TUNEL y el control positivo tuvo un tratamiento exclusivo de incubación con DNasa. En la Figura 73 B se observa que este tratamiento ocasionó que se produjera fluorescencia prácticamente en todo el tejido expuesto a la DNasa, confirmando el efecto de esta enzima para fragmentar el ADN de las células en cualquier estado de diferenciación. Por su parte, los tumores de ratonas tratadas con *cis*-Platino al parecer mostraron fluorescencia selectiva, pues se observaron pequeñas regiones de tejido que no presentaban fluorescencia, posiblemente fibroblastos o células aún diferenciadas. Este fenómeno se repitió, aunque de forma más notoria, en los tumores de las ratonas tratadas con el complejo de cobre LQM402, por lo que podemos decir que la inducción de muerte celular por fragmentación del ADN por parte del *cis*-Platino y LQM402 (y probablemente la mayoría de fármacos) no es uniforme en todo el tejido tumoral, sino que puede estar siendo selectivo en las células menos diferenciadas, o bien, que la distribución del

compuesto tampoco es igual en todo el tumor. Esto no es extraño puesto que cualquier vía que esté utilizando el complejo de cobre para infiltrarse en el tumor produciría este tipo de imágenes sobre todo a tiempos cortos después de su administración. Probablemente a tiempos más largos se podría observar una fluorescencia homogénea en todo el tumor, tanto por acción del complejo como por un efecto secundario que altere a las células vecinas.

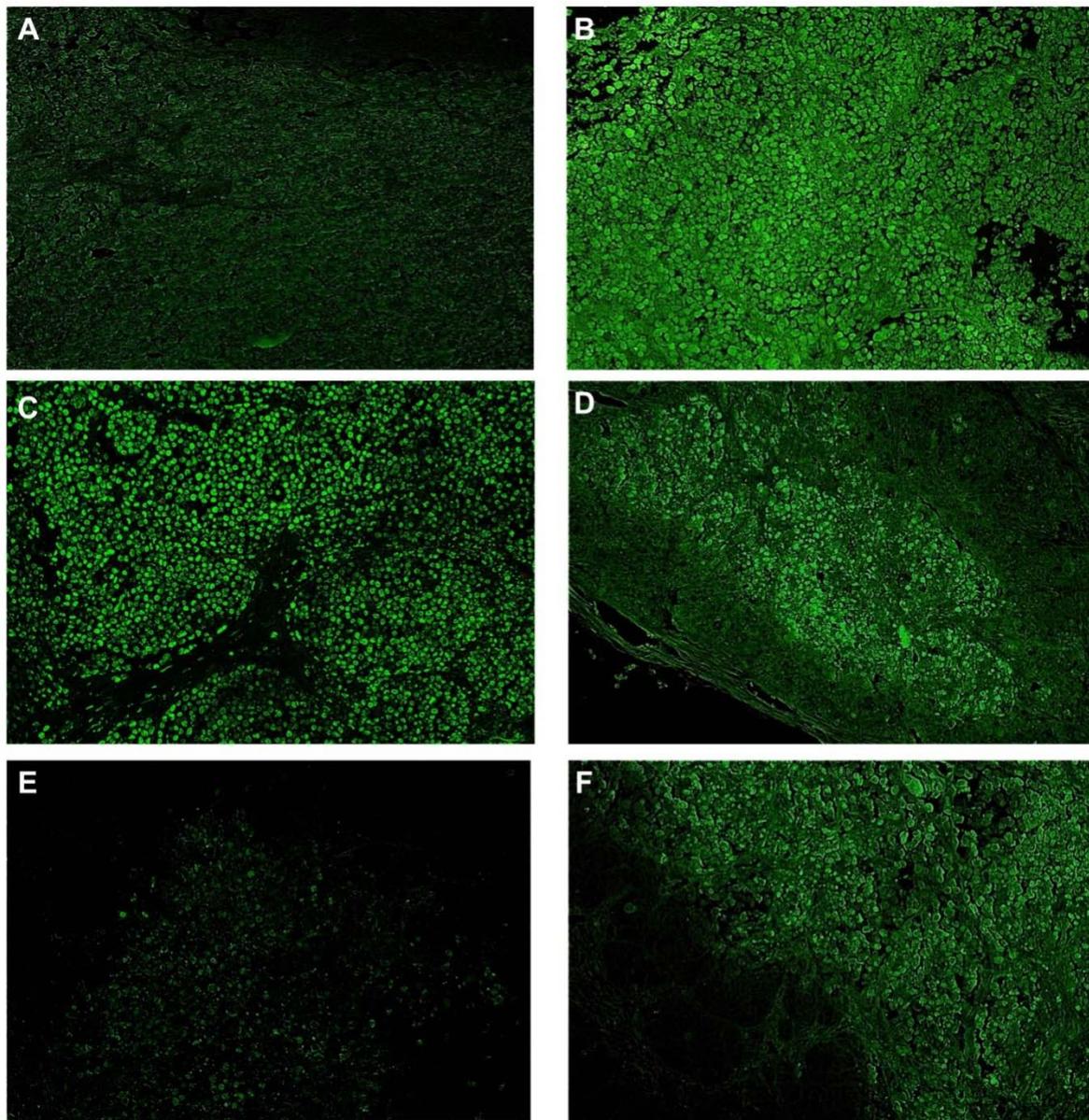


Figura 73. Apoptosis en tejido de tumores de CaCu inducidos en ratones Nu/Nu. A) Sin tratamiento, B) Sin tratamiento pero incubado con DNasa, C) tratado *cis*-Platino (6 mg/kg), D) Tratado con el complejo de cobre LQM402 a 0.81 mg/kg, E) LQM402 a 4.0 mg/kg o F) 8.1 mg/kg.

La evaluación de apoptosis con la técnica de TUNEL se realizó en los tumores de 3 ratonas de cada grupo experimental, comparando con el efecto del *cis*-Platino, los tumores de ratonas que recibieron las dosis de 0.81 y 8.1 mg/kg de LQM402 mostraron en general menos regiones que presentaran fluorescencia y el tamaño de dichas regiones fue variable en todos los tratamientos. Los tumores de ratonas que recibieron la dosis de 4.0 mg/kg mostraron pocas regiones con presencia de fluorescencia, lo cual coincide con el poco efecto que tuvo esta dosis para inhibir el desarrollo de los tumores.

Los estudios con la técnica de TUNEL reportados en bibliografía son en su mayoría realizados en células fijadas y pocos en tejido. En nuestra búsqueda bibliográfica encontramos al complejo de cobre con el ligando bis(tiosemicarbazona) Cu(GTSC) evaluado en un modelo xenográfico de cáncer colorectal en donde se evaluó el efecto en el crecimiento del tumor como se mencionó anteriormente, pero no evaluaron el efecto apoptótico del complejo en el tumor (Palanimuthu et al. 2013). Martin y colaboradores evaluaron otros aspectos del efecto *in vivo* del compuesto ^{64}Cu -DOTA-HB22.7 en un modelo xenográfico de linfoma no Hodgkin's encontrando que ^{64}Cu -DOTA-HB22.7 tiene potencial como compuesto radioinmunoterapéutico y que aunque es más efectivo administrado en forma intravenosa, su administración intraperitoneal y subcutánea pueden lograr efectos similares, la farmacocinética del compuesto en sangre, así como su bioacumulación sí tiene variaciones con respecto al tiempo dependientes de la vía de administración (Martin et al. 2009). Este último estudio, más que un estudio para comparar los efectos de nuestro compuesto, nos es útil para considerar que hay muchos otros fenómenos que podríamos estudiar con el LQM402. Por otro lado, entre las Casiopeínas[®], la casiopeína III-ia mostró inducción de apoptosis determinada en la periferia de tumores de colon inducidos con células HCT-15 donde la condensación de cromatina, separación de células picnóticas y formación de vesículas fueron contadas en campos observados al microscopio óptico a 40X de amplificación (Carvallo-Chaigneau et al. 2008), mientras que nuestro complejo de cobre mostró inducción de apoptosis aparentemente infiltrándose en el tumor de CaCu inducido con células HeLa evaluada con la técnica de TUNEL y visualizada en microscopio de fluorescencia.

Debido a que la muerte celular por apoptosis implica cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares, una sola prueba no es suficiente para concluir la presencia de

este tipo celular. Sin embargo, sólo en raras ocasiones se han descrito características morfológicas de la apoptosis sin la presencia consecuente de fragmentación de ADN nucleosomal. Nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* sólo pueden sugerirnos la posibilidad de que el complejo LQM402 esté induciendo muerte celular apoptótica pero, por el tipo de molécula estudiada y la amplia variedad de resultados obtenidos sería recomendable completar estudios de los tres tipos mencionados para poder tener un resultado concluyente. Además, también deben considerarse estudios posteriores que involucren marcadores o características de otros tipos de muerte celular, principalmente autofagia y pyroptosis.

8.3.6 Evaluación del efecto histopatológico del complejo LQM402 en ratones Nu/Nu con tumor inducido

Otro efecto que consideramos importante evaluar fue el efecto que el complejo de cobre pudiera tener sobre los diferentes órganos al ser administrado vía intraperitoneal como tratamiento para el tumor de CaCu inducido en las ratonas Nu/Nu. Para ello se analizaron cortes histológicos de hígado, bazo y riñón, los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina.

Una vez sacrificados los animales y que se procedió a extraer los órganos, se hizo una examinación física general en la que se observó que todas las ratonas mantuvieron un aspecto normal en ojos, coloración y textura de la piel en un tono rosado normal. En cuanto al comportamiento, la mayoría de los animales tratados tanto con *cis*-Platino como con el complejo de cobre LQM402 se mostraron menos activos que los animales del grupo testigo (sin inducción de tumor y sin tratamiento) y además de la notoria pérdida de peso de los ratones del grupo tratado con *cis*-Platino, estas ratonas estaban aún más pasivas y permanecían más tiempo reunidas en alguna esquina de sus cajas de mantenimiento.

A nivel macroscópico, la apariencia de los órganos fue normal en las ratonas de los grupos vehículo y tratadas con LQM402 comparada con aquella del grupo testigo (Figura 74), pero en el caso de ratonas tratadas con *cis*-Platino, sí se encontraron diferencias. Los riñones en las ratonas tratadas con *cis*-Platino tuvieron tamaño, apariencia general y coloración normal, pero en algunas ratonas se presentaron pequeñas secciones con puntos blanquecinos en alguno de sus riñones (Figura 74, B). Los bazos en los ratones del

grupo *cis*-Platino fueron ligeramente más pequeños que los del grupo testigo y vehículo, y en 4 de 6 ratonas, estos órganos presentaron secciones con una pérdida de coloración y sutilmente abultadas (Figura 74, C). En todos los grupos experimentales se observó diferencia de tamaño en algunos aparatos reproductores (Figura 74, D y E), pero no se realizó una medición y comparación estadística que pudiera indicarnos si existían realmente diferencias significativas entre cada grupo.

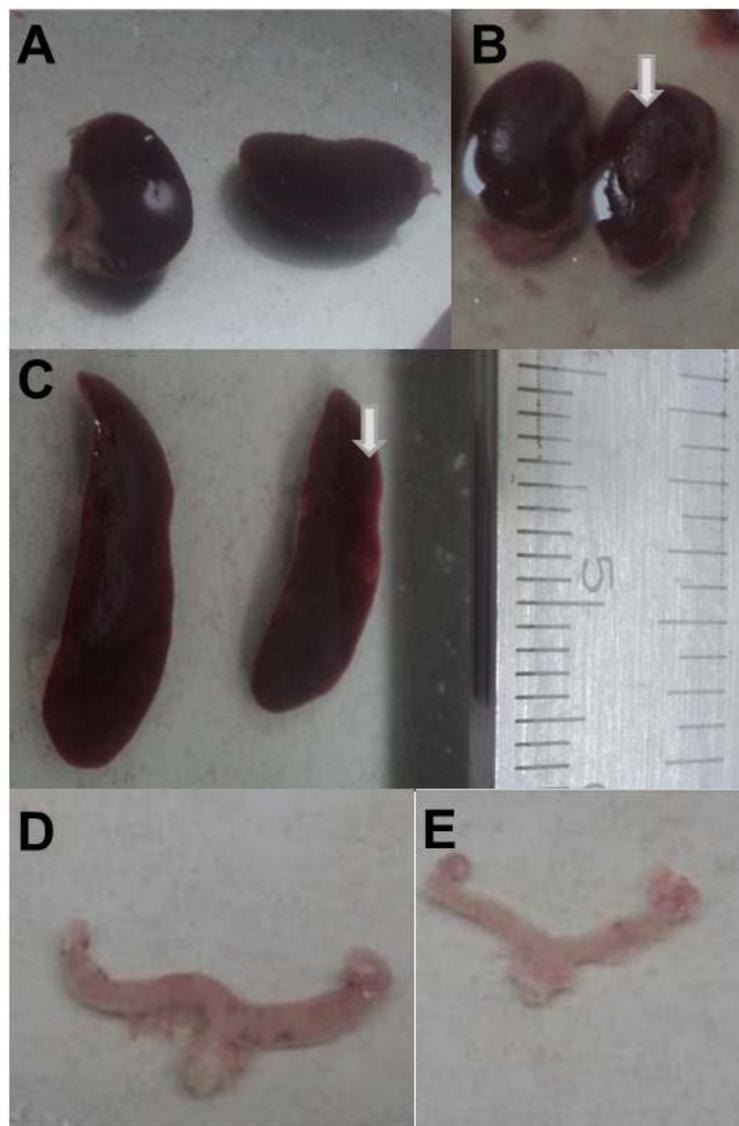


Figura 74. Diferencias macroscópicas entre algunos órganos de ratonas Nu/Nu con tumor inducido y tratadas o no con *cis*-Platino. A) Riñones de ratón del grupo tratado con el vehículo o con B) *cis*-Platino; C) Bazo de ratón tratado con el vehículo (izq.) o con *cis*-Platino (der.); D) Aparato reproductor de ratón tratado con el vehículo o E) con *cis*-Platino.

Es ampliamente conocido el efecto antitumoral del *cis*-Platino en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como cervical, ovárico, testicular, de cabeza y cuello o de células de pulmón no pequeñas. Desafortunadamente, los principales factores limitantes para su uso son la neurotoxicidad, ototoxicidad, hiperemetosis, vómito y nefrotoxicidad (Uehara et al. 2011). Por ello, en nuestro estudio comparamos el efecto del complejo de cobre LQM402 con el del *cis*-Platino, con respecto al daño histológico que pudiera tener al administrarlo en las ratonas, pues el hecho de observar algún tipo de daño y compararlo con su posible beneficio puede ser la pauta que defina el potencial del LQM402 como fármaco antitumoral, si este último compensa el primero, o sea, que los beneficios del complejo LQM402 sean mayores que los daños que éste pudiera causar o que esos daños puedan ser reversibles.

Al analizar cortes histológicos de algunos órganos de ratonas de los diferentes grupos experimentales, se pudo observar de manera general que las ratonas que recibieron el vehículo, así como las que recibieron 0.81 mg/kg de LQM402, no tuvieron cambios en el hígado comparado con las ratonas sanas (Figura 75).

Las diferencias en el tejido hepático, con respecto al de ratonas sanas, las presentaron los tejidos de ratonas tratadas con *cis*-Platino, 4.0 mg/kg de y 8.1 mg/kg de LQM402. La mayoría de ratonas en esos 3 grupos mostraron incremento en el tamaño de los hepatocitos, los capilares sinusoides fueron más evidentes y fue más común observar células de Kupffer. Las células de Kupffer son macrófagos que se depositan sobre el endotelio y en la luz del sinusoides y cuya función es fagocitar eritrocitos y eliminar toxinas, bacterias y virus transportados por la sangre (Geneser, 2008). El aumento en la presencia de estas células en nuestras muestras de tejido hepático bien podría ser una respuesta ante la entrada de los compuestos administrados.

El tratamiento con *cis*-Platino indujo la destrucción células hepáticas, por lo que se formaron anillos hialínicos alrededor de los núcleos y hubo una alteración en la estructura general (Figura 75), aunque macroscópicamente no se observaron alteraciones en los hígados de animales con tratamiento. Se ha reportado que el *cis*-Platino exhibe una amplia distribución celular pues se difunde rápidamente en hígado, riñón, intestino, bazo, glándulas suprarrenales, ovario y testículos. La acumulación de este fármaco en tales

órganos presenta ligeras diferencias, pero ni la distribución ni la acumulación son factores que necesariamente determinen su efecto biológico (Himmelstein et al. 1981, Sklar and Prochownik 1991).

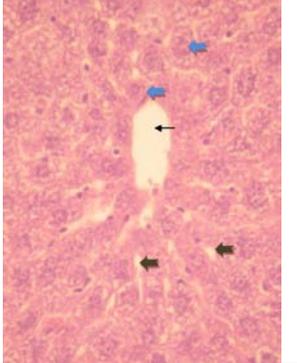
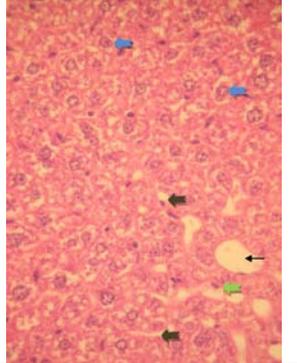
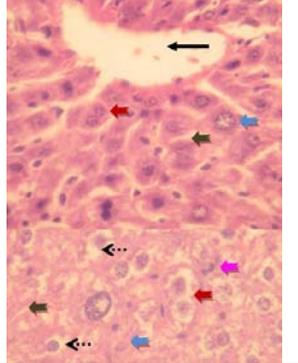
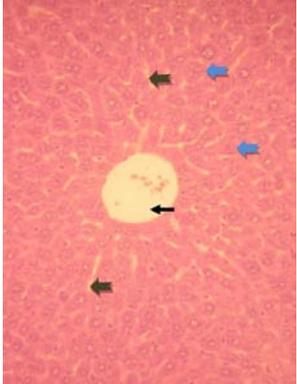
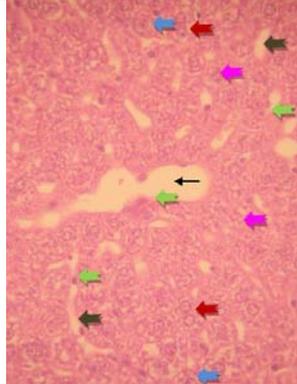
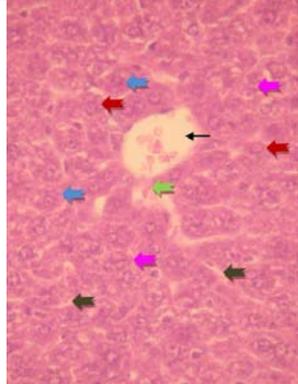
Simbología	Hígado		
	Testigo (Sano)	Vehículo	<i>cis</i> -Platino
Vena central ←			
Hepatocitos ←			
Capilares sinusoides ←			
Células de Kupfer ←			
	Morfología normal Estructuras celulares bien definidas, sin alteraciones morfológicas	Morfología normal Estructuras celulares bien definidas, sin alteraciones morfológicas	Morfología alterada Aumento en el tamaño celular y destrucción de hepatocitos. Sinusoides más evidentes
	LQM402 0.81 mg/kg	LQM402 4.0 mg/kg	LQM402 8.1 mg/kg
Células de mayor tamaño y binucleadas ←			
Hialinosis ←...			
Figura mitótica ←			
	Morfología normal Estructuras celulares bien definidas, sin alteraciones morfológicas	Hepatocitos con tamaño incrementado Sinusoides más evidentes Aumento de figuras mitóticas y células de Kupfer	Hepatocitos con tamaño incrementado Sinusoides más evidentes Aumento de figuras mitóticas

Figura 75. Análisis histopatológico del hígado de ratonas Nu/Nu con tumor inducido y tratadas con el complejo LQM402 y *cis*-Platino. Microfotografías tomadas a un aumento de 200x.

Particularmente en el hígado, el *cis*-Platino es rápidamente transformado en metabolitos no tóxicos y sólo el 10% del total administrado es eliminado por la bilis (Mistry et al. 1989) pero a dosis elevadas ha mostrado ser hepatotóxico, lo cual fue demostrado con la reducción de los niveles de las enzimas antioxidantes GSH, SOD y CAT en tejido hepático de embriones de pollo tratados con *cis*-Platino (Sudhakar et al. 2010). En nuestros resultados el efecto hepatotóxico del *cis*-Platino fue evidenciado con la mortalidad de algunos hepatocitos y el incremento en número y tamaño de los capilares sinusoides, mientras que el complejo LQM402 indujo un daño menor en este órgano sin inhibir la capacidad regenerativa del mismo. En este estudio no evaluamos si el cobre del complejo LQM402 puede quedar libre del ligante y comportarse de manera independiente, pero es conocido que este metal puede acumularse en algunos tejidos y que una sobrecarga en ratas puede inducir anomalías morfológicas y peroxidación lipídica en mitocondrias de los hepatocitos reduciendo los niveles de glutatión e incrementar las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Sokol et al. 1993). Nosotros observamos este efecto, evaluando la peroxidación que induce LQM402 en cerebro de rata, pero en estudios posteriores podría corroborarse si este efecto se lleva a cabo en el hígado de nuestras ratonas tratadas con el complejo o si LQM402 no es acumulado y por ello no observamos daño severo en el tejido hepático.

Otro órgano donde los compuestos químicos pueden fácilmente distribuirse y que refleja rápidamente algún tipo de daño es el bazo. Las secciones representativas de los efectos del complejo LQM402 y *cis*-Platino sobre este órgano en ratonas Nu/Nu con tumor inducido y tratadas con estos compuestos se observan en la Figura 76.

El bazo es un órgano que participa en la circulación sistémica y filtra la sangre para eliminar material extraño y eritrocitos decadentes. Es también un sitio de almacenamiento de hierro, eritrocitos y plaquetas y un sitio de hematopoyesis en fetos y roedores neonatos. Como el mayor órgano linfoide secundario, contiene alrededor de un cuarto de los linfocitos del cuerpo e inicia la respuesta inmune a antígenos de transmisión sanguínea. El bazo rara vez es el lugar primario en alguna enfermedad pero, cuando es afectado por algún daño sistémico en otro sitio, puede variar su tamaño (generalmente tiende a aumentar) (Cesta 2006). Nosotros observamos ligeras variaciones de tamaño en este

órgano obtenido de las ratonas con tumor inducido del grupo tratado con *cis*-Platino, en donde hubo una reducción con respecto al de las ratonas sanas (Figura 74). Este efecto fue reportado previamente en un estudio donde administraron dosis bajas de *cis*-Platino ($3.6 \text{ mg/m}^2/\text{día}$) en ratones Balb/C con ascitis aguda inducida con células de hepatoma H-22, resultando en bazos claramente más pequeños que los de ratones del grupo control tratados con solución salina ($12.63 \pm 0.15 \text{ mm}$ vs. $18.57 \pm 0.51 \text{ mm}$, respectivamente) (Wang Y. et al. 2010). Por su parte, Cheng y colaboradores en 2011 reportaron que el tratamiento con *cis*-Platino (3 mg/kg administrado cada 4 días durante 3 semanas solo o encapsulado en nanopartículas) en ratones Balb/C con tumor de ovario inducido no causó daños aparentes en este órgano (Cheng et al. 2011). En nuestras observaciones al microscopio fue notorio que los corpúsculos de Malpighi (pulpa blanca) en los bazos de ratonas tratadas con *cis*-Platino y LQM402 se encontraron de mayor tamaño con respecto a los observados en las ratonas sanas o aquellas con tumor pero que sólo recibieron agua como vehículo (Figura 76). La pulpa blanca está constituida de linfocitos, macrófagos y células del plasma, entre otros componentes, y es un sitio importante para el tráfico de estos tipos celulares (Cesta 2006). Probablemente, el aumento en el tamaño de estas zonas fue debido a la presencia de los compuestos extraños en la circulación y como una respuesta del órgano para filtrar y eliminar el compuesto administrado.

Los bazos de las ratonas de los grupos tratados con LQM402 no mostraron cambios macroscópicos evidentes con respecto al tamaño, pero microscópicamente, además del aumento en la proporción de la pulpa blanca, en algunos bazos se observó que la pulpa roja se hizo también muy evidente, hubo un incremento de megacariocitos y esteatosis en gota fina en algunas regiones (principalmente en la dosis de 8.1 mg/kg). Se ha descrito que el aumento en la pulpa roja puede deberse a hemolisis, por lo que consecuentemente existe filtración de células rojas dañadas a través del sistema retículo endotelial del bazo, así como un proceso hematopoyético para reponer la homeostasis celular (De Vizcaya-Ruiz et al. 2003). La presencia aumentada de megacariocitos también obedece a la producción de células sanguíneas, pues estos pueden aumentar en número durante el curso de ciertas enfermedades; y aunque se mencionan más frecuentemente en médula ósea, también se producen en hígado, riñón y bazo donde son capaces de producir todos los tipos de células sanguíneas en función de las señales que reciben

(Stevens 2011), por lo que podemos inferir que el aumento de megacariocitos observado en bazos de nuestras ratonas, puede estar relacionado con algún daño ocasionado por el complejo de cobre a la dosis más alta que utilizamos (8.1 mg/kg) y que esté requiriendo la reposición de células. Se ha reportado que el tratamiento con el complejo de cobre casiopeína-II (Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicina)-NO₃) administrado en una dosis única de 5 mg/kg y evaluado a las 12 h y 5 días después de la administración, causó reducción en la relación pulpa roja/pulpa blanca, incrementó en contenido de eritrocitos y toxicidad hemolítica. Estas características de daño fueron atribuidas a la generación de radicales libres y daño oxidativo en las membranas celulares como resultado de la reducción del cobre(II) y la posible disociación del complejo (De Vizcaya-Ruiz et al. 2003). Tomando en consideración nuestros resultados de que LQM402 puede ser un inductor de peroxidación lipídica, los efectos encontrados en el bazo de las ratonas tratadas con este complejo pueden tener similitud con los efectos causados por la casiopeína II. La esteatosis también está mejor descrita en hígado, pero es posible que ocurra en corazón, músculo, riñón y otros órganos. Esta condición se refiere a la acumulación anormal de grasa en el interior de células parenquimatosas y puede ser causada por anomalías en las rutas de eliminación de grasa (Stevens 2011), lo que coincide con las otras alteraciones que se presentaron en el bazo de nuestras ratonas tratadas con el complejo de cobre y considerándolo como órgano filtrante y efector de respuestas inmunes en ratones que carecen de timo.

Finalmente, una condición que puede estarnos confirmando que el complejo de cobre LQM402 a las dosis de 4.0 y 8.1 mg/kg, así como *cis*-Platino (6 mg/kg) inducen daño en el bazo y probablemente en otros sitios cuyos eritrocitos o células dañadas son transportadas por vías sanguíneas y desembocan en el bazo, es la presencia de hemosiderina (Figura 77). Estas estructuras pigmentadas de aspecto granular se forman por la descomposición de la hemoglobina y en forma natural se acumulan con la edad, pero también se presentan en condiciones patológicas (Geneser 2000).

Simbología	Bazo		
	Testigo (Sano)	Vehículo	<i>cis</i> -Platino
Vena ←			
Tabique conectivo ←			
Pulpa blanca ←	Morfología normal Estructuras celulares bien definidas, sin alteraciones morfológicas	Morfología normal Estructuras celulares bien definidas, sin alteraciones morfológicas	Morfología alterada Incremento de megacariocitos, pulpa blanca amplia y dispersa, cápsula delgada y trabeculaciones muy evidentes
Pulpa roja ←			
Cápsula ←			
	LQM402 0.81 mg/kg	LQM402 4.0 mg/kg	LQM402 8.1 mg/kg
Arteria ←...			
Arteriola ←			
Hemosiderina ←			
	Morfología alterada Pulpa blanca muy extendida Trabeculaciones muy evidentes Presencia de megacariocitos	Morfología alterada Pulpa blanca muy extendida y fragmentada Núcleos con diferentes tamaños Presencia de hemosiderina	Morfología alterada Pulpa blanca muy extendida Núcleos con diferentes tamaños Presencia de hemosiderina

Figura 76. Análisis histopatológico del bazo de ratonas Nu/Nu con tumor inducido y tratadas con el complejo LQM402 y *cis*-Platino. Microfotografías tomadas a un aumento de 200x.

Se ha demostrado que dosis bajas de *cis*-Platino en ratones ocasionan la deposición de hemosiderina en bazo (Wang Y. et al. 2010), lo cual fue confirmado en

nuestro tratamiento con este fármaco, pero que también se observó con LQM402 (Figura 77).

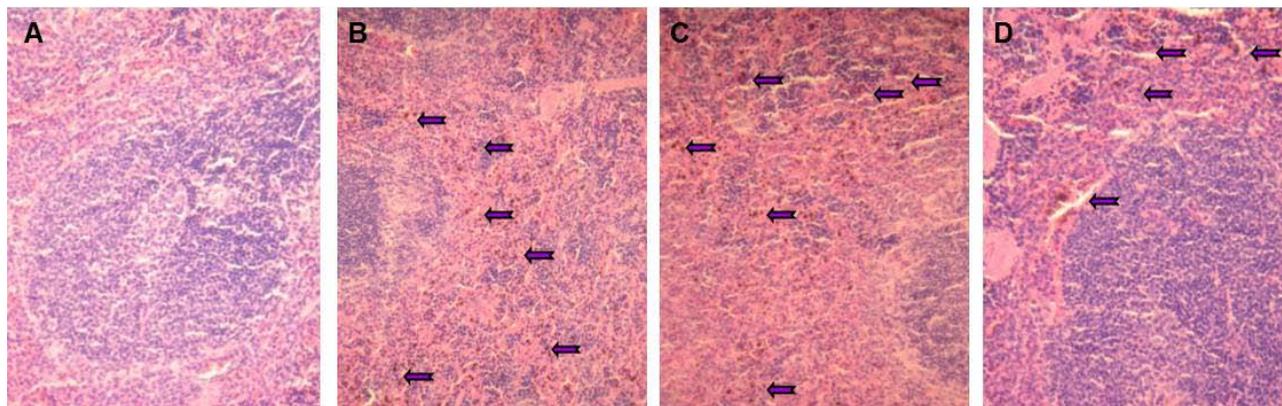


Figura 77. Depósitos de hemosiderina en bazo de ratonas Nu/Nu con tumor inducido. No hay depósitos de hemosiderina en los ratones tratados con el vehículo (A) pero sí después de los tratamientos con *cis*-Platino (B) y LQM402 las dosis de 4.0 mg/kg (C) y 8.1 mg/kg (D). Microfotografías tomadas a un aumento de 200x.

Wang y colaboradores indican que el tratamiento con *cis*-Platino daña los eritrocitos y por consiguiente es causante de anemia. Los eritrocitos dañados se acumulan en la pulpa roja del bazo ocasionando la excesiva liberación de hierro de la hemoglobina proveniente de eritrocitos fagocitados que fue almacenado como ferritina, posteriormente degradado parcialmente y finalmente depositado como hemosiderina. A su vez, esto nos indica que el aumento en la cantidad de megacariocitos encontrados en nuestros cortes de bazo puede deberse a la necesidad de macrófagos en este órgano para abastecer la degradación de los eritrocitos dañados que se requiere después de la administración de los compuestos, ya que los macrófagos juegan un papel relevante en el metabolismo del hierro reciclando este metal mediante la fagocitosis de eritrocitos dañados o senescentes (Wang Y. et al. 2010). Por tanto, podemos decir que las dosis de 4 y 8.1 mg/kg de LQM402 administrado cada 2 días en las ratonas con tumor inducido tienen un efecto similar al de *cis*-Platino en cuanto a la deposición de hemosiderina en bazo, lo que sugiere muerte de eritrocitos. Con este resultado podemos sugerir que la dosis de 0.81 mg/kg de peso fue más efectiva para el tratamiento de tumores de CaCu en el modelo xenográfico, ya que inhibe el desarrollo de los tumores después de la octava dosis sin generar daño histológico hepático o esplénico en los animales, y a la vez nos exhorta al análisis de esta dosis a tiempos más largos, así como a posibles modificaciones en la estructura del

complejo LQM402 para reducir la toxicidad observada a dosis de 4 y 8.1 mg/kg. Por otra parte, también surge la duda de si la hemosiderina es únicamente formada por hierro o si otros metales como el cobre de nuestro complejo pudiera estar ocasionando la formación de estos cuerpos.

Con respecto a los riñones, son órganos importantes del aparato urinario y realizan funciones diversas. En general, separan sustancias extrañas y la mayor parte de los productos de excreción metabólicos del organismo. Bajo su control se encuentran el equilibrio ácido-base y la concentración de la mayor parte de los componentes del organismo. En su función endócrina, secretan dos hormonas al torrente sanguíneo, la eritropoyetina, que estimula la formación de eritrocitos en la médula ósea; y la renina, que es importante en la regulación de la presión arterial. De manera general, los riñones se componen de un sistema filtrante y un sistema tubular. El primero formado por los glomérulos produce un ultrafiltrado del plasma sanguíneo que es modificado durante su paso a través del sistema tubular donde las células de los túbulos reabsorben selectivamente sustancias de la luz y secretan otras desde la sangre hacia los túbulos. El producto final de estos procesos es la orina (Geneser 2000).

Los riñones han sido objeto de estudio en la quimioterapia debido a que son los órganos en donde se ha notado que, por ejemplo, el *cis*-Platino causa un efecto tóxico frecuente y es la causa que limita el uso de este fármaco en la clínica (Wang Y. et al. 2010). La toxicidad ocasionada por *cis*-Platino se adjudica principalmente al daño de las células epiteliales del túbulo renal que puede manifestarse como una falla renal aguda o como una insuficiencia renal crónica (Blachley and Hill 1981). Aproximadamente 25 al 35% de los pacientes oncogénicos tratados con este fármaco, desarrollan nefrotoxicidad después de una sola dosis, lo que en muchas ocasiones obliga a una reducción en la dosis o a la interrupción del tratamiento (Ries and Klastersky 1986). Los efectos tóxicos *in vitro* del *cis*-Platino en células tubulares renales han sido demostrados en numerosos estudios (Blachley and Hill 1981). En estos modelos, el *cis*-Platino induce daños en el ADN (Leibbrandt et al. 1995, Loskotova and Brabec 1999), disfunción mitocondrial (Sugiyama et al. 1989), formación de especies reactivas de oxígeno (Casares et al. 2012, Matsushima et al. 1998), activación de caspasas (Kaushal et al. 2001) y muerte celular por necrosis o por apoptosis, dependiendo de la concentración del fármaco (Lieberthal et al. 1996). La

necrosis ha sido observada en secciones de tejido renal en pacientes con nefrotoxicidad por *cis*-Platino (Ries and Klastersky 1986), pero otros estudios sugieren que la apoptosis también juega un papel importante en el desarrollo de la falla renal aguda inducida por el *cis*-Platino (Lau 1999, Park et al. 2012). En el daño renal por isquemia aguda, el mecanismo inflamatorio también parece estar participando de manera importante en la patogénesis de este proceso (Burne et al. 2001, Sheridan and Bonventre 2000).

En nuestra comparación histológica del riñón se observó que el complejo de cobre indujo daños semejantes a los que ocasiona el *cis*-Platino (Figura 78). En general, los riñones de nuestras ratonas que sólo recibieron el vehículo (agua estéril) mostraron las estructuras bien definidas y semejantes a las de las ratonas sanas. Corpúsculos renales en donde se aprecian fácilmente los polos urinario y vascular. Se identificaron túbulos distales, proximales y colectores con el espacio luminal visible. Por su parte, tanto el tratamiento con *cis*-Platino como con el complejo de cobre ocasionaron la pérdida de estructura glomerular en donde el polo urinario no podía distinguirse claramente, algunos glomérulos perdieron espacio urinario, mientras que otros, en su mayoría, presentaron hialinización y en algunos animales esta zona se encontró muy ampliada también por la pérdida de túbulos. Los túbulos perdieron también parte de su morfología, pues la luz en muchos de ellos se observó estrecha tanto por un potencial efecto inflamatorio como por un posible proceso de esclerosis. En los casos de las dosis más altas del complejo LQM402 se observó una mayor pérdida de estructura tubular en donde algunos túbulos tuvieron una luz más amplia que lo normal, pero parcialmente cubierta por tejido. Generalmente en los túbulos distales se observa un mayor número de núcleos (células) y un haz pequeño y circular, mientras que los túbulos proximales muestran menor número de núcleos y un haz estrellado de mayor diámetro que el de los túbulos distales, pero en los riñones de ratonas que recibieron 4.0 y 8.1 mg/kg de peso de LQM402 se comenzaron a perder estas características que podrían ayudarnos a distinguir cada estructura. Se observaron pocos túbulos conectores, distinguibles por un mayor diámetro y definición de uniones celulares. Igualmente, en riñones de animales tratados con *cis*-Platino y en tratados con LQM402, se observó la presencia de eritrocitos en la luz de algunos túbulos y depósitos de origen desconocido.

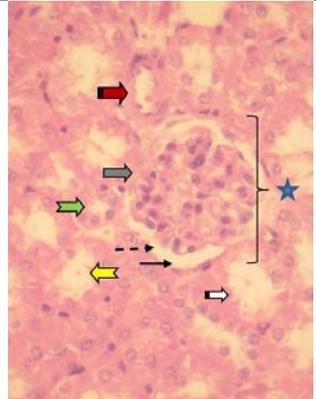
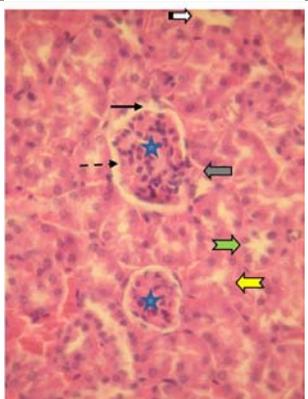
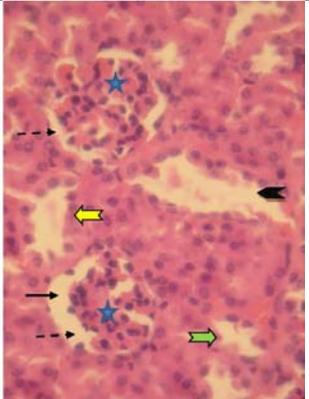
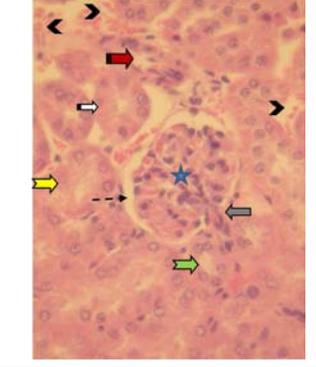
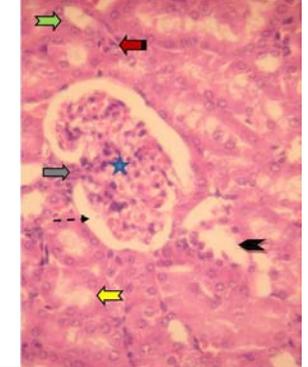
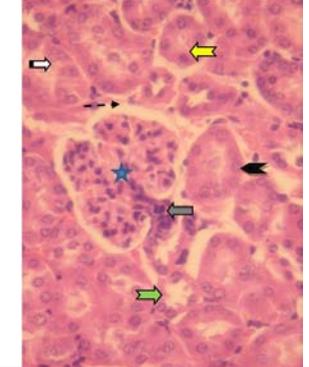
Simbología	Riñón		
	Testigo (Sano)	Vehículo	<i>cis</i> -Platino
Glomérulo o corpúsculo renal  Espacio urinario  Polo urinario  Polo vascular  Asa de Henle  Túbulo distal  Túbulo proximal  Túbulo colector  Túbulo con edema  Depósitos 	 Morfología Normal. Estructuras celulares bien definidas, sin alteraciones morfológicas	 Morfología Normal. Estructuras celulares bien definidas, sin alteraciones morfológicas	 Morfología alterada. Pérdida de estructura corpuscular y tubular, túbulos de diferentes tamaños a lo normal y algunos con edema
	LQM402 0.81 mg/kg	LQM402 4.0 mg/kg	LQM402 8.1 mg/kg
	 Morfología Alterada. Pérdida de morfología tubular y ligeramente también la corpuscular pues ya no se puede apreciar con exactitud el polo urinario. Presencia de depósitos	 Morfología Alterada. Pérdida de estructura corpuscular y tubular. Hialinización de corpúsculos, túbulos de diferentes tamaños a lo normal, algunos con edema y otros con aparente esclerosis	 Morfología Alterada. Pérdida de estructura corpuscular y tubular. Hialinización de corpúsculos, túbulos de diferentes tamaños a lo normal, algunos con edema y otros con aparente esclerosis

Figura 78. Análisis histopatológico del riñón de ratonas Nu/Nu con tumor inducido y tratadas con el complejo LQM402 y *cis*-Platino. Microfotografías tomadas a un aumento de 200x.

El daño renal inducido con *cis*-Platino que nosotros observamos histológicamente coincide con las características reportadas por Sakhno y colaboradores, quienes encontraron que *cis*-Platino induce reducción en el número de células funcionales y

distrofia renal con alteraciones en prácticamente todos los elementos celulares, distrofia de la región anatómica de los glomérulos y formación de amplios lúmenes tubulares (Sakhno et al. 2013). Como ya se ha mencionado anteriormente, *cis*-Platino induce apoptosis en células renales por lo que esto puede estar provocando la reducción en el número de éstas (Zhou et al. 1999) y por lo tanto de los grandes espacios que se observaron en los cortes de riñón de animales tratados con este fármaco (Figura 79). Por ello se propone que algo similar puede estar ocurriendo en los animales tratados con LQM402, sobretodo con las últimas dos dosis.

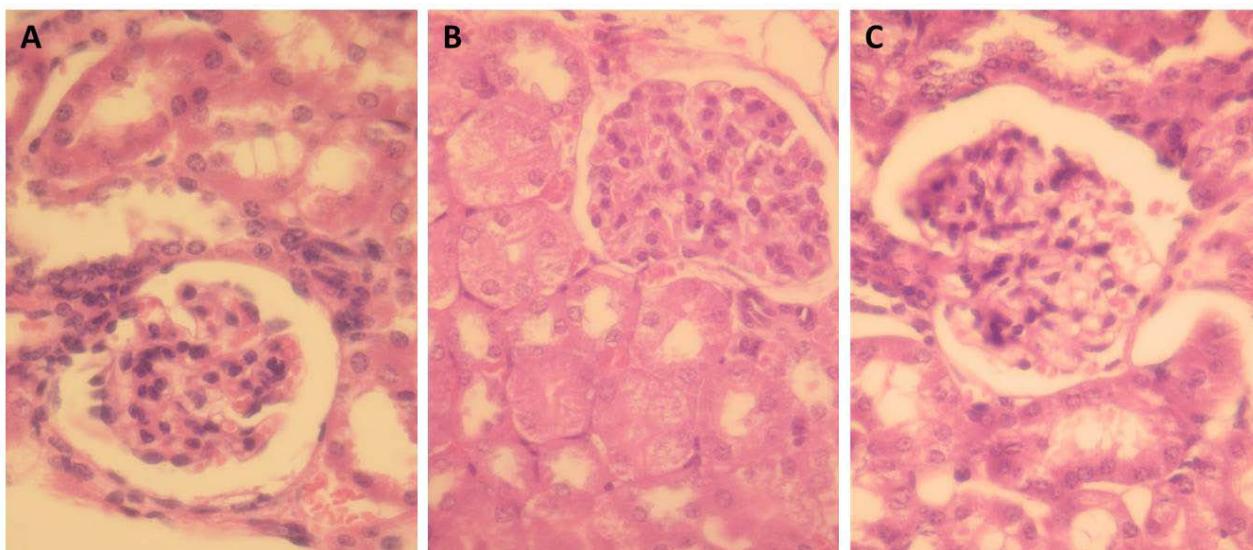


Figura 79. Morfología alterada de glomérulos y túbulos renales después del tratamiento con *cis*-Platino (A) y LQM402 a 4.0 mg/kg (B) y 8.1 mg/kg (C). Microfotografías tomadas a un aumento de 400x.

El daño de túbulos renales es reconocido como el principal factor patogénico en la nefrotoxicidad por *cis*-Platino debido a que este fármaco se acumula en grandes cantidades en estas células conduciendo a la lesión tubular y muerte de estas células. Sin embargo, es poco lo que se sabe sobre los mecanismos por los que las células que constituyen los túbulos asimilan el *cis*-Platino. Recientemente se ha sugerido que en este proceso interviene el sistema transportador de cationes orgánicos presente en la región basolateral de las células tubulares renales, específicamente el transportador OCT2. Por otro lado, el transportador de cobre Ctr1 también ha sido implicado en el transporte de

cis-Platino en células no renales, pues se ha encontrado que el bloqueo de esta proteína reduce en un 80% la acumulación del fármaco en levaduras y fibroblastos de ratón y que las células que sobreexpresan Ctr1, particularmente células renales, acumulan niveles significativos de *cis*-Platino (Pabla et al. 2009). Si Ctr1 es capaz de participar en el transporte y acumulación de una molécula metálica como lo es el *cis*-Platino, con mayor razón podemos pensar que esta proteína es capaz de transportar nuestro complejo de cobre LQM402 y, por tanto, ser también motivo de que LQM402 tenga un mayor efecto sobre las células tubulares del riñón. En estudios posteriores se podría estudiar la participación de Ctr1 en la entrada y posible acumulación de LQM402 en células renales.

9.0 CONCLUSIONES

9.1 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DE ALGUNOS COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS LQM300

- El compuesto piperidínico LQM338 fue el más citotóxico contra las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino HeLa, SiHa, Ca Ski y C-33 A, con valores de IC₅₀ de 2.62, 49.0, 91.76 y 0.015 μM, respectivamente. Incluso superando la citotoxicidad del fármaco de referencia *cis*-Platino (IC₅₀ desde 18.9 hasta 69.92 μM).
- Los heterocíclicos LQM302, LQM338 y LQM340 no fueron citotóxicos en fibroblastos humanos (células no tumorales).
- Con excepción del compuesto morfolínico LQM302, los heterocíclicos evaluados mostraron capacidad antioxidante como reductores del radical libre DPPH en una manera cercana o semejante al fármaco de referencia α-Tocoferol.
- El compuesto piperidínico LQM338 mostró importante actividad antioxidante al inhibir el 95.46% de la peroxidación lipídica inducida con FeSO₄ a la concentración de 10 μM, mientras que el resto de los heterocíclicos mostraron porcentajes de inhibición menores del 45% a la concentración de 100 μM.
- Ninguno de los 4 heterocíclicos fue mutagénico en las cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100 o TA102 en la evaluación como compuestos solos o con el activador S9 por el método de incorporación en la prueba de Ames.
- El compuesto morfolínico LQM335 no mostró actividad genotóxica como inductor de la formación de micronúcleos en sangre periférica al ser administrado en concentraciones agudas (5, 10 y 20 mg/kg) a ratones CD-1.

- El compuesto morfolínico LQM335 mostró actividad antigenotóxica inhibiendo la formación de micronúcleos en sangre periférica de ratones CD-1, al administrarlo en forma simultánea (5, 10 y 20 mg/kg) con el fármaco de referencia Ifosfamida (60 mg/kg).

9.2 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DEL COMPLEJO DE COBRE LQM402 *In vitro*

- Las líneas celulares más sensibles al complejo LQM402 fueron HeLa y Ca Ski, con valores de IC₅₀ de 74.74 y 88.53 μ M, respectivamente.
- El complejo de cobre LQM402 no fue citotóxico en fibroblastos humanos (células no tumorales).
- El complejo de cobre LQM402 induce cambios en la membrana de células HeLa a la concentración de 74.74 μ M, pues a partir de las 6 h de tratamiento fue posible detectar anexina V acoplada a FITC como indicador de la translocación de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana, alcanzando un máximo de 53% a las 24 h de tratamiento.
- El tratamiento de células HeLa con el complejo de cobre LQM402 posiblemente indujo la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, ya que se observó la disminución de la procaspasa-7 con respecto al tiempo de incubación con el complejo y hubo un incremento de citocromo C en el citoplasma, lo cual es indicativo de permeabilidad en la membrana mitocondrial externa.
- La proteína ejecutora caspasa-3 no pudo ser detectada en los extractos totales de células HeLa tratadas con 74.74 μ M del complejo LQM402, pero sí en las células tratadas con 20 μ M de *cis*-Platino, lo que nos hace sugerir que LQM402 podría estar induciendo una vía de muerte celular diferente a las tradicionales vías de apoptosis.

- El complejo de cobre LQM402 no presentó actividad antioxidante como atrapador del radical libre DPPH.
- El complejo de cobre LQM402 mostró un efecto dual en la inhibición de peroxidación lipídica inducida con FeSO_4 en homogeneizado de cerebro de rata, pues a concentraciones menores a $13.34 \mu\text{M}$ actúa sinérgicamente con el sulfato de hierro incrementando los niveles de TBARS y a concentraciones mayores de $23.71 \mu\text{M}$ inhibe la peroxidación inducida con FeSO_4 .
- *Per se*, el complejo de cobre LQM402 es capaz de inducir peroxidación lipídica en homogeneizado de cerebro de rata medida como producción de TBARS en un rango de concentraciones entre 5.6 y $17.7 \mu\text{M}$.
- El complejo de cobre LQM402 no fue genotóxico *in vitro* a las concentraciones de 50 , 100 y $200 \mu\text{M}/\text{caja}$ en las cepas TA98, TA100 y TA102 de *S. typhimurium*, tanto sin como con el activador metabólico S9.
- La administración por vía intraperitoneal de 5 , 10 o 15 mg/kg del complejo de cobre LQM402 a ratones CD1 no indujo la formación de eritrocitos policromáticos con micronúcleos (EPCMN) significativamente mayor que aquellos presentes en los ratones que sólo recibieron agua como vehículo, por lo que se puede decir que no fue genotóxico *in vivo*.
- Comparado con el fármaco de referencia Mitomicina C (60 mg/kg), el complejo de cobre LQM402 no indujo cambios en el índice de EPC/ENC en sangre periférica de ratones CD1 al administrarse vía intraperitoneal a las dosis de 5 , 10 y 15 mg/kg indicando que no es citotóxico contra células sanguíneas.

9.3 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DEL COMPLEJO DE COBRE LQM402 *In vivo*

- LQM402 fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral de CaCu en el modelo xenográfico a las dosis de 0.81 y 8.1 mg/kg, pero sin llegar a la reducción que produce el *cis*-Platino.
- LQM402 produjo una menor toxicidad que el *cis*-Platino en ratonas desnudas evaluada con la pérdida de peso.
- El complejo de cobre LQM402 fue capaz de inducir una expresión diferencial en los genes asociados a tumor p53, Ki67, IL-6, MMP-10, MMP-9, Integrina α 8, VEGF y Plexina B.
- LQM402 indujo fragmentación de ADN en tejido tumoral de CaCu evaluada con la técnica de TUNEL *in situ*, principalmente a las dosis de 0.81 y 8.1 mg/kg.
- A nivel histopatológico, el complejo de cobre LQM402 no induce daño en hígado y bazo, pero sí en túbulo renales principalmente a las dosis de 4.0 y 8.1 mg/kg.
- La dosis que resultó más efectiva para el tratamiento *in vivo* de tumores de CaCu en el modelo murino fue la de 0.81 mg/kg, ya que fue la dosis a la que se logró la inhibición del tumor al día 16 de tratamiento y la que produjo menor daño histopatológico.

10.0 PERSPECTIVAS

- Ya que los compuestos evaluados de la serie LQM300 (con excepción del LQM302) fueron capaces de reducir al radical DPPH y mostraron potencial como inhibidores de la producción de TBARS, puede considerarse realizar evaluaciones de estos compuestos en otros ensayos o incluso algún modelo *in vitro* como por ejemplo en células.
- Entre los compuestos evaluados de la serie LQM300, el compuesto piperidínico LQM335 mostró ser citotóxico contra los fibroblastos humanos no tumorales, lo cual podría descartar su uso farmacológico en humanos a pesar de haber funcionado como un buen antioxidante e inhibidor de la peroxidación lipídica. Aunque en las pruebas de Ames y micronúcleos este compuesto no mostró ser genotóxico, se sugiere su evaluación citotóxica en otros tipos de células sanas así como con técnicas adicionales que confirmen o descarten su toxicidad, pues es probable que su citotoxicidad sea selectiva para este tipo celular. En tal caso, LQM335 podría tener potencial para afectar otro tipo de células tumorales, por lo que sería importante evaluar su actividad citotóxica en células de fibrosarcoma.
- Químicamente, tanto los compuestos LQM300 como el LQM402 mostraron algunos problemas de solubilidad. En particular, a pesar de que LQM402 pudo disolverse tanto en DMSO como en agua de alta pureza, este compuesto mostró cambios rápidos en su coloración al estar disuelto en agua, lo cual sugiere oxidación. Por lo tanto, realizar modificaciones químicas que mejoren la solubilidad y estabilidad de los compuestos podría ayudar a optimizar su potencial biológico.
- La efectividad citotóxica mostrada por el compuesto LQM335 lo convierte en un excelente candidato para realizar otro proyecto de investigación en el que sea evaluado en ensayos de muerte celular en las líneas celulares en las que mostró selectividad y en el modelo *in vivo* como los estudios que se realizaron para el complejo de cobre LQM402.

- Los interesantes resultados relacionados con muerte celular que obtuvimos con el complejo de cobre LQM402 sugieren que este compuesto de coordinación puede estar induciendo apoptosis de tipo intrínseca al causar la liberación de citocromo C, disminución en la expresión de las caspasas 7 y 8 y translocación de fosfatidilserina. Sin embargo, estas pruebas no son contundentes, ya que se han reportado otros tipos de muerte celular (descritos brevemente en el marco teórico) en los que se presentan los mismos eventos tradicionalmente asociados a apoptosis. Por ello, es necesario el estudio más específico y a diferentes niveles de la muerte celular programada. Esto es, confirmar o descartar la participación de caspasas de cada una de las vías mediante el uso de inhibidores de estas proteínas.
- Una vez demostrada o descartada la participación de muerte celular apoptótica inducida por el complejo LQM402 en células HeLa, se propone que se evalúen marcadores asociados a otros tipo de muerte celular como anoikis y pyroptosis dado que es posible que no esté actuando un sólo mecanismo de muerte. Además, es importante considerar que otros complejos de cobre han demostrado citotoxicidad mediante estos tipos de muerte y que no se pudo confirmar rotundamente la activación de caspasa 3, en la cual convergen ambas vías de la apoptosis.
- Considerando que LQM402 no redujo al radical libre DPPH y que mostró un potencial pro-oxidante, es posible que la liberación de citocromo C esté relacionada a esta capacidad del complejo. Por ello se sugiere realizar estudios en donde se evalúe la capacidad de este complejo para inducir EROs, si estos son capaces de alterar el potencial de membrana mitocondrial y si la liberación de cit C es debida a este mecanismo.
- Diversos reportes de otros complejos de cobre mencionan la capacidad de ellos para inducir fragmentación de ADN. Por lo cual, estos estudios se vuelven necesarios para complementar nuestro estudio del complejo LQM402.

- Con respecto a nuestro estudio *in vivo*, si bien no observamos una reversión de los tumores inducidos como la ocasionada con el fármaco de referencia *cis*-Platino, observamos que el complejo de cobre LQM402 logró inhibir el crecimiento entre los días 13 y 16 de tratamiento. Por lo cual se propone la evaluación del efecto del LQM402 sobre el tamaño de tumores de CaCu en este mismo modelo de tumores inducidos, pero a tiempos más largos (siempre y cuando el proyecto sea aprobado por un comité de ética).
- Para confirmar la expresión diferencial de los genes asociados a tumor inducida con el complejo LQM402, se sugiere la evaluación de las proteínas producto de estos genes mediante técnicas como western blot e inmunohistoquímica. Esto a su vez nos indicaría si el efecto del compuesto se está llevando a cabo a nivel genómico o bien podría plantear si éste tiene algún efecto a nivel pos-traducciona.
- Aunque la información sobre las características y diferencias a nivel de membrana de las líneas celulares utilizadas en nuestro estudio es reducida, sería interesante investigar sobre la presencia de la proteína transportadora de cobre Ctr1 en las células HeLa para conocer si ésta tiene participación en la asimilación del complejo de cobre LQM402 como lo hace con el *cis*-Platino en células no renales. Así también como si se presenta el mismo fenómeno de expulsión de este último compuesto coordinado.
- Por último, para continuar avanzando en las pruebas necesarias que lleven en un futuro el complejo de cobre LQM402 a estudios clínicos, es importante llevar a cabo los estudios farmacológicos que esto implica, para lo cual deben realizarse pruebas de absorción, distribución y eliminación en un organismo (ratas principalmente) y de igual manera, determinar las dosis y vías de administración adecuadas para el máximo aprovechamiento del compuesto.

11.0 BIBLIOGRAFIA

- Abend M. 2003. Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *Int J Radiat Biol* 79: 927-941.
- Agorastos T, Miliaras D, Lambropoulos AF, Chrisafi S, Kotsis A, Manthos A, Bontis J. 2005. Detection and typing of human papillomavirus DNA in uterine cervixes with coexistent grade I and grade III intraepithelial neoplasia: biologic progression or independent lesions? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 121: 99-103.
- Almonte M, Murillo R, Sanchez GI, Jeronimo J, Salmeron J, Ferreccio C, Lazcano-Ponce E, Herrero R. 2010. [New paradigms and challenges in cervical cancer prevention and control in Latin America]. *Salud Publica Mex* 52: 544-559.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31: 347-364.
- Ansieau S, Hinkal G, Thomas C, Bastid J, Puisieux A. 2008. Early origin of cancer metastases: dissemination and evolution of premalignant cells. *Cell Cycle* 7: 3659-3663.
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50: 197-263.
- Arends MJ, Buckley CH, Wells M. 1998. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 51: 96-103.
- ATCC. 2013. <http://www.atcc.org/Products/Cells>
- Bais AG, Beckmann I, Ewing PC, Eijkemans MJ, Meijer CJ, Snijders PJ, Helmerhorst TJ. 2007. Cytokine release in HR-HPV(+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or carcinoma, compared with HR-HPV(-) controls. *Mediators Inflamm* 2007: 24147.
- Bandgar BP, Gawande SS, Warangkar SC, Totre JV. 2010. Silica-supported fluoroboric acid (HBF(4)-SiO(2)) catalyzed highly productive synthesis of thiomorpholides as activators of L-asparaginase as well as the antioxidant agent. *Bioorg Med Chem* 18: 3618-3624.
- Barrera G. 2012. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* 2012: 137289.
- Benedet JA, Shibamoto T. 2008. Role of Transition Metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in Lipid Peroxidation. *Food Chemistry Vol.107*, (July 2007): 165-168.
- Benoit YD, Lussier C, Ducharme PA, Sivret S, Schnapp LM, Basora N, Beaulieu JF. 2009. Integrin alpha8beta1 regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism. *Biol Cell* 101: 695-708.
- Beynek N, Ulucam G, Tuylu BA, Zeytinoglu H, Benkli K. 2007. Synthesis and characterization of a new macrocyclic ligand and its copper (II), cadmium (II), and lead (II) complexes: genotoxic activity of these complexes in cultured human lymphocytes. *Drug Chem Toxicol* 30: 399-410.
- Blachley JD, Hill JB. 1981. Renal and electrolyte disturbances associated with cisplatin. *Ann Intern Med* 95: 628-632.
- Boulsourani Z, Tangoulis V, Raptopoulou CP, Psycharis V, Dendrinou-Samara C. 2011. Ferromagnetic and antiferromagnetic copper(II) complexes: counterplay between zero-field effects of the quartet ground state and intermolecular interactions. *Dalton Trans* 40: 7946-7956.

- Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fassler R. 2002. Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* 109: 999-1006.
- Brigelius-Flohe R, Traber MG. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 13: 1145-1155.
- Bullwinkel J, Baron-Luhr B, Ludemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. 2006. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 206: 624-635.
- Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, Rabb H. 2001. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 108: 1283-1290.
- Calabrese EJ, Mattson MP, Calabrese V. 2010. Dose response biology: the case of resveratrol. *Hum Exp Toxicol* 29: 1034-1037.
- Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. 1998. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17: 1395-1413.
- Caroppi P, Sinibaldi F, Fiorucci L, Santucci R. 2009. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein. *Curr Med Chem* 16: 4058-4065.
- Carvalho-Chaigneau F, et al. 2008. Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals* 21: 17-28.
- Casares C, Ramirez-Camacho R, Trinidad A, Roldan A, Jorge E, Garcia-Berrocal JR. 2012. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269: 2455-2459.
- Cathcart MK, McNally AK, Chisolm GM. 1991. Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex. *J Lipid Res* 32: 63-70.
- Cesta MF. 2006. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol* 34: 455-465.
- Czepas J, Koceva-Chyla A, Gwozdziński K, Jozwiak Z. 2008. Different effectiveness of piperidine nitroxides against oxidative stress induced by doxorubicin and hydrogen peroxide. *Cell Biol Toxicol* 24: 101-112.
- Ch'ng ES, Kumanogoh A. 2010. Roles of Sema4D and Plexin-B1 in tumor progression. *Mol Cancer* 9: 251.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2: 563-572.
- Chen B-Y, Janes HW, eds. 2002. *PCR Cloning Protocols*. Second Edition ed. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Cheng L, Jin C, Lv W, Ding Q, Han X. 2011. Developing a highly stable PLGA-mPEG nanoparticle loaded with cisplatin for chemotherapy of ovarian cancer. *PLoS One* 6: e25433.
- Chomczynski P, Mackey K. 1995. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques* 19: 942-945.
- Chrysselis MC, Reka EA, Kourounakis PN. 2000. Hypocholesterolemic and hypolipidemic activity of some novel morpholine derivatives with antioxidant activity. *J Med Chem* 43: 609-612.

- De Vizcaya-Ruiz A, Rivero-Muller A, Ruiz-Ramirez L, Howarth JA, Dobrota M. 2003. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. *Toxicology* 194: 103-113.
- De Vizcaya-Ruiz A, Rivero-Muller A, Ruiz-Ramirez L, Kass GE, Kelland LR, Orr RM, Dobrota M. 2000. Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 14: 1-5.
- Dearden JC. 2003. In silico prediction of drug toxicity. *J Comput Aided Mol Des* 17: 119-127.
- Deegan C, Coyle B, McCann M, Devereux M, Egan DA. 2006. In vitro anti-tumour effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), $[\text{Cu}(\text{phendione})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Ag}(\text{phendione})_2]\text{ClO}_4$ using human epithelial cell lines. *Chem Biol Interact* 164: 115-125.
- Deegan C, McCann M, Devereux M, Coyle B, Egan DA. 2007. In vitro cancer chemotherapeutic activity of 1,10-phenanthroline (phen), $[\text{Ag}_2(\text{phen})_3(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Mn}(\text{phen})_2(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (malH₂=malonic acid) using human cancer cells. *Cancer Lett* 247: 224-233.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543-8567.
- Dong XP, Xiao TH, Dong H, Jiang N, Zhao XG. 2013. Endostar combined with Cisplatin inhibits tumor growth and lymphatic metastasis of lewis lung carcinoma xenografts in mice. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 3079-3083.
- Donnelly PS, et al. 2008. Selective intracellular release of copper and zinc ions from bis(thiosemicarbazonato) complexes reduces levels of Alzheimer disease amyloid-beta peptide. *J Biol Chem* 283: 4568-4577.
- Dua R, Shrivastava S, Sonwane SK, Srivasvastava SK. 2011. Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review. *Advances in Biological Research* 5: 120-144.
- Dubin M, Stoppani AO. 2000. [Programmed cell death and apoptosis. The role of mitochondria]. *Medicina (B Aires)* 60: 375-386.
- Duff B, Thangella VR, Creaven BS, Walsh M, Egan DA. 2012. Anti-cancer activity and mutagenic potential of novel copper(II) quinolinone Schiff base complexes in hepatocarcinoma cells. *Eur J Pharmacol* 689: 45-55.
- Enciclopedia-Universal. 2012. http://enciclopedia_universal.esacademic.com/
- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37: 719-727.
- Fernandes AS, Gaspar J, Cabral MF, Caneiras C, Guedes R, Rueff J, Castro M, Costa J, Oliveira NG. 2007. Macrocyclic copper(II) complexes: superoxide scavenging activity, structural studies and cytotoxicity evaluation. *J Inorg Biochem* 101: 849-858.
- Fielden MR, Matthews JB, Fertuck KC, Halgren RG, Zacharewski TR. 2002. In silico approaches to mechanistic and predictive toxicology: an introduction to bioinformatics for toxicologists. *Crit Rev Toxicol* 32: 67-112.
- Filaxis L. 1999. Ifosfamide in S.A. LF, ed. Buenos Aires, Argentina: Laboratorios Filaxis.
- Filomeni G, Cerchiaro G, Da Costa Ferreira AM, De Martino A, Pedersen JZ, Rotilio G, Ciriolo MR. 2007. Pro-apoptotic activity of novel Isatin-Schiff base copper(II) complexes depends on oxidative stress induction and organelle-selective damage. *J Biol Chem* 282: 12010-12021.
- Food and Drug Administration H. 2010. International Conference on Harmonisation; guidance on Q4B Evaluation and Recommendation of Pharmacopoeial texts for use in the

- International Conference on Harmonisation Regions; Annex 12 on Analytical Sieving General Chapter; availability. Notice. Fed Regist 75: 53873-53874.
- Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, Dou QP. 2010. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 16: 1813-1825.
- Frias González SE. 2007. Caracterización de la adhesión de células metastásicas humanas a cultivos endoteliales humanos activados por factores solubles derivados de células tumorales Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Fulda S, Debatin KM. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4798-4811.
- Gaber M, El-Sayed YS, El-Baradie KY, Fahmy RM. 2013. Complex formation, thermal behavior and stability competition between Cu(II) ion and Cu(0) nanoparticles with some new azo dyes. Antioxidant and in vitro cytotoxic activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 107C: 359-370.
- Gallez B, De Meester C, Debuyst R, Dejehet F, Dumont P. 1992. Mutagenicity of nitroxyl compounds: structure-activity relationships. *Toxicol Lett* 63: 35-45.
- Galluzzi L, et al. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19: 107-120.
- Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. 2007. Global Cancer Facts and Figures. Atlanta, GA. Report no.
- Geneser F. 2000. Histología. Mexico City: Médica Panamericana.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 55: 178-194.
- Gold MA, Tian C, Whitney CW, Rose PG, Lanciano R. 2008. Surgical versus radiographic determination of para-aortic lymph node metastases before chemoradiation for locally advanced cervical carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 112: 1954-1963.
- González-Merlo J, González Bosquet E, González Bosquet J, eds. 2003. GINECOLOGÍA: Elsevier.
- Gracia-Mora I, Ruiz-Ramirez L, Gomez-Ruiz C, Tinoco-Mendez M, Marquez-Quinones A, Lira LR, Marin-Hernandez A, Macias-Rosales L, Bravo-Gomez ME. 2001. Knight's Move in the Periodic Table, From Copper to Platinum, Novel Antitumor Mixed Chelate Copper Compounds, Casiopeinas, Evaluated by an in Vitro Human and Murine Cancer Cell Line Panel. *Met Based Drugs* 8: 19-28.
- Guo WJ, Ye SS, Cao N, Huang J, Gao J, Chen QY. 2010. ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper(II) complex. *Exp Toxicol Pathol* 62: 577-582.
- Gupta K, Zhang J. 2005. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J* 81: 236-242.
- Gupte A, Mumper RJ. 2009. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 35: 32-46.
- Hahn WC, Weinberg RA. 2002. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 331-341.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hancock CN, Stockwin LH, Han B, Divelbiss RD, Jun JH, Malhotra SV, Hollingshead MG, Newton DL. 2011. A copper chelate of thiosemicarbazone NSC 689534 induces

- oxidative/ER stress and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 50: 110-121.
- Harris AN, Hinojosa BR, Chavious MD, Petros RA. 2011. Beyond platinum: synthesis, characterization, and in vitro toxicity of Cu(II)-releasing polymer nanoparticles for potential use as a drug delivery vector. *Nanoscale Res Lett* 6: 445.
- Haverkos HW. 2004. Viruses, chemicals and co-carcinogenesis. *Oncogene* 23: 6492-6499.
- Haverkos HW. 2005. Multifactorial etiology of cervical cancer: a hypothesis. *MedGenMed* 7: 57.
- Himmelstein KJ, Patton TF, Belt RJ, Taylor S, Repta AJ, Sternson LA. 1981. Clinical kinetics on intact cisplatin and some related species. *Clin Pharmacol Ther* 29: 658-664.
- Hollosy F, Lorand T, Orfi L, Eros D, Keri G, Idei M. 2002. Relationship between lipophilicity and antitumor activity of molecule library of Mannich ketones determined by high-performance liquid chromatography, clogP calculation and cytotoxicity test. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 768: 361-368.
- Huang H, Huang SY, Chen TT, Chen JC, Chiou CL, Huang TM. 2004. Cisplatin restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV16 E6 containing SiHa cells. *J Cell Biochem* 91: 756-765.
- Iimura S, Uoto K, Ohsuki S, Chiba J, Yoshino T, Iwahana M, Jimbo T, Terasawa H, Soga T. 2001. Orally active docetaxel analogue: synthesis of 10-deoxy-10-C-morpholinoethyl docetaxel analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 407-410.
- Janicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG. 1998. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem* 273: 15540-15545.
- Jantova S, Letasiova S, Repicky A, Ovadekova R, Lakatos B. 2006. The effect of 3-(5-nitro-2-thienyl)-9-chloro-5-morpholin-4-yl[1,2,4]triazolo[4,3-c]quinazoline on cell growth, cell cycle, induction of DNA fragmentation, and activity of caspase 3 in murine leukemia L1210 cells and fibroblast NIH-3T3 cells. *Cell Biochem Funct* 24: 519-530.
- Jia L, Xu XM, Xu J, Chen LH, Jiang P, Cheng FX, Lu GN, Wang Q, Wu JC, Tang N. 2010. Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding studies of ternary copper(II) complexes with new coumarin derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 58: 1003-1008.
- Johnson JP. 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18: 345-357.
- Kakinuma T, Hwang ST. 2006. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 79: 639-651.
- Kasparkova J, Marini V, Najajreh Y, Gibson D, Brabec V. 2003a. DNA binding mode of the cis and trans geometries of new antitumor nonclassical platinum complexes containing piperidine, piperazine, or 4-picoline ligand in cell-free media. Relations to their activity in cancer cell lines. *Biochemistry* 42: 6321-6332.
- Kasparkova J, Novakova O, Marini V, Najajreh Y, Gibson D, Perez JM, Brabec V. 2003b. Activation of trans geometry in bifunctional mononuclear platinum complexes by a piperidine ligand. Mechanistic studies on antitumor action. *J Biol Chem* 278: 47516-47525.
- Kaushal GP, Kaushal V, Hong X, Shah SV. 2001. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 60: 1726-1736.
- Kedare SB, Singh RP. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 48: 412-422.

- Kelly GS. 2011. Quercetin. Monograph. *Altern Med Rev* 16: 172-194.
- Kerbel RS. 2000. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21: 505-515.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-2026.
- Kim KS, Cho CH, Park EK, Jung MH, Yoon KS, Park HK. 2012. AFM-detected apoptotic changes in morphology and biophysical property caused by paclitaxel in Ishikawa and HeLa cells. *PLoS One* 7: e30066.
- Kisseljov F, Sakharova O, Kondratjeva T. 2008. Cellular and molecular biological aspects of cervical intraepithelial neoplasia. *Int Rev Cell Mol Biol* 271: 35-95.
- Kotowicz B, Fuksiewicz M, Kowalska M, Jonska-Gmyrek J, Bidzinski M, Kaminska J. 2008. The value of tumor marker and cytokine analysis for the assessment of regional lymph node status in cervical cancer patients. *Int J Gynecol Cancer* 18: 1279-1284.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU. 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 347: 1645-1651.
- Kovala-Demertzi D, Hadjipavlou-Litina D, Staninska M, Primikiri A, Kotoglou C, Demertzis MA. 2009. Anti-oxidant, in vitro, in vivo anti-inflammatory activity and antiproliferative activity of mefenamic acid and its metal complexes with manganese(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II). *J Enzyme Inhib Med Chem* 24: 742-752.
- Kowol CR, Heffeter P, Miklos W, Gille L, Trondl R, Cappellacci L, Berger W, Keppler BK. 2012. Mechanisms underlying reductant-induced reactive oxygen species formation by anticancer copper(II) compounds. *J Biol Inorg Chem* 17: 409-423.
- Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST, eds. 2009. *Lewin's Genes X* 10th ed. United States of America: Jones and Bartlett Publishers.
- Krishnamoorthy P, Sathyadevi P, Butorac RR, Cowley AH, Bhuvanesh NS, Dharmaraj N. 2012. Copper(I) and nickel(II) complexes with 1:1 vs. 1:2 coordination of ferrocenyl hydrazone ligands: do the geometry and composition of complexes affect DNA binding/cleavage, protein binding, antioxidant and cytotoxic activities? *Dalton Trans* 41: 4423-4436.
- Kroemer G, et al. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16: 3-11.
- Laine AL, Passirani C. 2012. Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery. *Curr Opin Pharmacol* 12: 420-426.
- Lakshmipraba J, Arunachalam S, Gandi DA, Thirunalasundari T. 2011. Synthesis, nucleic acid binding and cytotoxicity of polyethyleneimine-copper(II) complexes containing 1,10-phenanthroline and L-valine. *Eur J Med Chem* 46: 3013-3021.
- Lane DP, Benchimol S. 1990. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 4: 1-8.
- Lang K, Entschladen F, Weidt C, Zaenker KS. 2006. Tumor immune escape mechanisms: impact of the neuroendocrine system. *Cancer Immunol Immunother* 55: 749-760.
- Lau AH. 1999. Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney Int* 56: 1295-1298.
- Lazcano-Ponce E, Palacio-Mejia LS, Allen-Leigh B, Yunes-Diaz E, Alonso P, Schiavon R, Hernandez-Avila M. 2008. Decreasing cervical cancer mortality in Mexico: effect of Papanicolaou coverage, birthrate, and the importance of diagnostic validity of cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 2808-2817.
- Lee EW, Seo J, Jeong M, Lee S, Song J. 2012. The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. *BMB Rep* 45: 496-508.

- Lee G, ed. 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third ed.: Luna American Registry Of Pathology, Ht, Ed
- Leibbrandt ME, Wolfgang GH, Metz AL, Ozobia AA, Haskins JR. 1995. Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat renal proximal tubule cells. *Kidney Int* 48: 761-770.
- Letasiova S, Jantova S, Milata V. 2006. [Cytotoxicity screening and mode of action of natural and synthetically prepared compounds usable in tumour chemotherapy]. *Ceska Slov Farm* 55: 99-109.
- Lewinska A, Wnuk M, Slota E, Bartosz G. 2008. The nitroxide antioxidant Tempol affects metal-induced cyto- and genotoxicity in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 649: 7-14.
- Li Y, Wu T, Zhang B, Yao Y, Yin G. 2012. Matrix metalloproteinase-9 is a prognostic marker for patients with cervical cancer. *Med Oncol* 29: 3394-3399.
- Lieberthal W, Triaca V, Levine J. 1996. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 270: F700-708.
- Loeb KR, Loeb LA. 2000. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21: 379-385.
- Loskotova H, Brabec V. 1999. DNA interactions of cisplatin tethered to the DNA minor groove binder distamycin. *Eur J Biochem* 266: 392-402.
- Lowndes SA, Harris AL. 2004. Copper chelation as an antiangiogenic therapy. *Oncol Res* 14: 529-539.
- Lowndes SA, Harris AL. 2005. The role of copper in tumour angiogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 299-310.
- Lu H, Ouyang W, Huang C. 2006. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 4: 221-233.
- Lukashev ME, Werb Z. 1998. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* 8: 437-441.
- Ma DM, Xu YP, Zhu L. 2011. Expression of vascular endothelial growth factor C correlates with a poor prognosis based on analysis of prognostic factors in patients with cervical carcinomas. *J Obstet Gynaecol Res* 37: 1519-1524.
- Ma ZY, Qiao X, Xie CZ, Shao J, Xu JY, Qiang ZY, Lou JS. 2012. Activities of a novel Schiff Base copper(II) complex on growth inhibition and apoptosis induction toward MCF-7 human breast cancer cells via mitochondrial pathway. *J Inorg Biochem* 117: 1-9.
- Maira SM, et al. 2012. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 11: 317-328.
- Malet G, et al. 2006. Small molecule inhibitors of Apaf-1-related caspase- 3/9 activation that control mitochondrial-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* 13: 1523-1532.
- Mantovani A, Sozzani S, Introna M. 1997. Endothelial activation by cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 832: 93-116.
- Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
- Marozienne A, Nemeikaite-Ceniene A, Vidziunaite R, Cenas N. 2012. Correlation between mammalian cell cytotoxicity of flavonoids and the redox potential of phenoxyl radical/phenol couple. *Acta Biochim Pol* 59: 299-305.
- Martin SM, O'Donnell RT, Kukis DL, Abbey CK, McKnight H, Sutcliffe JL, Tuscano JM. 2009. Imaging and pharmacokinetics of (64)Cu-DOTA-HB22.7 administered by intravenous, intraperitoneal, or subcutaneous injection to mice bearing non-Hodgkin's lymphoma xenografts. *Mol Imaging Biol* 11: 79-87.

- Martins I, Galluzzi L, Kroemer G. 2011. Hormesis, cell death and aging. *Aging (Albany NY)* 3: 821-828.
- Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C. 2009. Copper complexes as anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem* 9: 185-211.
- Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. 1998. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med* 131: 518-526.
- Matulenko MA, et al. 2005. 5-(3-Bromophenyl)-7-(6-morpholin-4-ylpyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-ylamine: structure-activity relationships of 7-substituted heteroaryl analogs as non-nucleoside adenosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 13: 3705-3720.
- Menzo S, Marinelli K, Bagnarelli P, Rolla S, Clementi M. 2007. Human papillomavirus infections: new perspectives for prevention and treatment. *New Microbiol* 30: 189-212.
- Miramontes P. 1992. Un modelo de autómatas celulares para la evolución de los ácidos nucleicos. UNAM, México, D.F.
- Mistry P, Lee C, McBrien DC. 1989. Intracellular metabolites of cisplatin in the rat kidney. *Cancer Chemother Pharmacol* 24: 73-79.
- Mizutani H. 2007. [Mechanism of DNA damage and apoptosis induced by anticancer drugs through generation of reactive oxygen species]. *Yakugaku Zasshi* 127: 1837-1842.
- Monnier-Benoit S, Dalstein V, Riethmuller D, Lalaoui N, Mougin C, Pretet JL. 2006. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *J Clin Virol* 35: 270-277.
- Murugkar A, Unnikrishnan B, Padhye S, Bhonde R, Teat S, Triantafillou E, Sinn E. 1999. Hormone anchored metal complexes. 1. Synthesis, structure, spectroscopy and in vitro antitumor activity of testosterone acetate thiosemicarbazone and its metal complexes. *Met Based Drugs* 6: 177-182.
- Najajreh Y, Khazanov E, Jawbry S, Ardeli-Tzaraf Y, Perez JM, Kasparkova J, Brabec V, Barenholz Y, Gibson D. 2006. Cationic nonsymmetric transplatinum complexes with piperidinopiperidine ligands. Preparation, characterization, in vitro cytotoxicity, in vivo toxicity, and anticancer efficacy studies. *J Med Chem* 49: 4665-4673.
- Nicco C, Laurent A, Chereau C, Weill B, Batteux F. 2005. Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomed Pharmacother* 59: 169-174.
- Niwa K, Yamada K, Furukawa T, Shudo N, Seto K, Matsumoto T, Takao S, Akiyama S, Shimazu H. 1992. Effect of a dihydropyridine analogue, 2-[benzyl(phenyl)amino]ethyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-5-(5,5-dimethyl-2-oxo-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-yl)-1-(2-morpholinoethyl)-4-(3-nitrophenyl)-3-pyridinecarboxylate on reversing in vivo resistance of tumor cells to adriamycin. *Cancer Res* 52: 3655-3660.
- Ocker M, Hopfner M. 2012. Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy. *Eur Surg Res* 48: 111-120.
- Ovadekova R, Jantova S, Theiszova M, Labuda J. 2005. Cytotoxicity and detection of damage to DNA by 3-(5-nitro-2-thienyl)-9-chloro-5-morpholin-4-yl[1,2,4]triazolo[4,3-c]quinazoline on human cancer cell line HeLa. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149: 455-459.
- Pabla N, Murphy RF, Liu K, Dong Z. 2009. The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F505-511.

- Pajusto M, Toivonen TH, Tarkkanen J, Jokitalo E, Mattila PS. 2005. Reactive oxygen species induce signals that lead to apoptotic DNA degradation in primary CD4+ T cells. *Apoptosis* 10: 1433-1443.
- Palanimuthu D, Shinde SV, Somasundaram K, Samuelson AG. 2013. In vitro and in vivo anticancer activity of copper bis(thiosemicarbazone) complexes. *J Med Chem* 56: 722-734.
- Park JW, Cho JW, Joo SY, Kim CS, Choi JS, Bae EH, Ma SK, Kim SH, Lee J, Kim SW. 2012. Paricalcitol prevents cisplatin-induced renal injury by suppressing apoptosis and proliferation. *Eur J Pharmacol* 683: 301-309.
- Patil BG, Havinale BR, Shallom JM, Chitnis MP. 1989. Syntheses and spectroscopic studies of potential antitumor copper(II) complexes with 5-phenylazo-3-methoxy salicylidene thiosemicarbazone and N4 substituted thiosemicarbazones. *J Inorg Biochem* 36: 107-113.
- Pietsch K, Saul N, Chakrabarti S, Sturzenbaum SR, Menzel R, Steinberg CE. 2011. Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology* 12: 329-347.
- Plantefaber LC, Hynes RO. 1989. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* 56: 281-290.
- Pors K, Shnyder SD, Teesdale-Spittle PH, Hartley JA, Zloh M, Searcey M, Patterson LH. 2006. Synthesis of DNA-directed pyrrolidinyl and piperidinyl confined alkylating chloroalkylaminoanthraquinones: potential for development of tumor-selective N-oxides. *J Med Chem* 49: 7013-7023.
- Prakash A, Rigelhof F, Miller E. Antioxidant Activity: Analytical Progress, Medallion labs.
- Prashanth MK, Revanasiddappa HD, Lokanatha Rai KM, Veeresh B. 2012. Synthesis, characterization, antidepressant and antioxidant activity of novel piperamides bearing piperidine and piperazine analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 7065-7070.
- Qiang R, et al. 2011. Plexin-B1 is a target of miR-214 in cervical cancer and promotes the growth and invasion of HeLa cells. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 632-641.
- Raman N, Jeyamurugan R, Senthilkumar R, Rajkapoor B, Franzblau SG. 2010. In vivo and in vitro evaluation of highly specific thiolate carrier group copper(II) and zinc(II) complexes on Ehrlich ascites carcinoma tumor model. *Eur J Med Chem* 45: 5438-5451.
- Rewcastle GW, et al. 2011. Synthesis and biological evaluation of novel analogues of the pan class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor 2-(difluoromethyl)-1-[4,6-di(4-morpholinyl)-1,3,5-triazin-2-yl]-1H-benzimidazole (ZSTK474). *J Med Chem* 54: 7105-7126.
- Reyes-López MÁL, Hernández-Mendoza J, Mayek-Pérez N, eds. 2010. *Fundamentos de la Biotecnología Genómica México*: Plaza y Valdés Editores.
- Ries F, Klastersky J. 1986. Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *Am J Kidney Dis* 8: 368-379.
- Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. 2010. In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. *Oncol Rep* 23: 605-614.
- Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. 1969. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222: 385-386.
- Ruiz-Azuara L, Bravo-Gomez ME. 2010. Copper compounds in cancer chemotherapy. *Curr Med Chem* 17: 3606-3615.
- Sainsbury M. 2002. *Heterocyclic chemistry*. Great Britain: Wiley-Interscience.

- Sakhno LA, Yurchenko OV, Maslenniy VN, Bardakhivskaya KI, Nikolaeva VV, Ivanyuk AA, Shevchuk OO, Korotich VG, Nikolaev VG. 2013. Enterosorption as a method to decrease the systemic toxicity of cisplatin. *Exp Oncol* 35: 45-52.
- Salamone MF, Mavournin KH. 1994. Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environ Mol Mutagen* 23: 239-273.
- Sánchez RM, Mendoza NV. 2003. Envejecimiento, Enfermedades Crónicas y Antioxidantes. México, D.F.: UNAM.
- Savarese A, Cognetti F. 2003. New drugs in the treatment of recurrent or metastatic cervical cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 48: 323-327.
- Scarpato R, Gambacciani C, Svezia B, Chimenti D, Turchi G. 2011. Cytotoxicity and genotoxicity studies of two free-radical generators (AAPH and SIN-1) in human microvascular endothelial cells (HMEC-1) and human peripheral lymphocytes. *Mutat Res* 722: 69-77.
- Schiffman M, Castle PE. 2005. The promise of global cervical-cancer prevention. *N Engl J Med* 353: 2101-2104.
- Schlie-Guzman MA, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Esquinca AR. 2009. In vitro and in vivo antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. *Phytother Res* 23: 1128-1133.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutat Res* 31: 9-15.
- Schropfer A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Feix S, Anacker J. 2010. Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines. *BMC Cancer* 10: 553.
- Serment-Guerrero J, Cano-Sanchez P, Reyes-Perez E, Velazquez-Garcia F, Bravo-Gomez ME, Ruiz-Azuara L. 2011. Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas. *Toxicol In Vitro* 25: 1376-1384.
- Sheetz MP, Felsenfeld D, Galbraith CG, Choquet D. 1999. Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp* 65: 233-243.
- Shepherd JH. 1996. Cervical and vulva cancer: changes in FIGO definitions of staging. *Br J Obstet Gynaecol* 103: 405-406.
- Sheridan AM, Bonventre JV. 2000. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9: 427-434.
- Shi Y. 2004. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* 117: 855-858.
- Sklar MD, Prochownik EV. 1991. Modulation of cis-platinum resistance in Friend erythroleukemia cells by c-myc. *Cancer Res* 51: 2118-2123.
- Smith JS, et al. 2002. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 94: 1604-1613.
- Sokol RJ, Devereaux MW, O'Brien K, Khandwala RA, Loehr JP. 1993. Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrome C oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology* 105: 178-187.
- Souhami R, Tobias J, eds. 2005. *Cancer and Its Management*. 5th ed.: Wiley-Blackwell.
- Steinbrook R. 2006. The potential of human papillomavirus vaccines. *N Engl J Med* 354: 1109-1112.
- Stevens AL, James; Scott , Ian. 2011. *Patología clínica*. Mexico City: El Manual Moderno.
- Stoenescu TM, Ivan LD, Stoenescu N, Azoicai D. 2011. [Assessment tumor markers by immunohistochemistry (Ki67, p53 and Bcl-2) on a cohort of patients with cervical cancer in various stages of evolution]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 115: 485-492.

- Sudhakar D, Krishna Kishore R, Parthasarathy PR. 2010. Portulaca oleracea L. extract ameliorates the cisplatin-induced toxicity in chick embryonic liver. *Indian J Biochem Biophys* 47: 185-189.
- Sugiyama S, Hayakawa M, Kato T, Hanaki Y, Shimizu K, Ozawa T. 1989. Adverse effects of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria: disturbances in glutathione peroxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 1121-1127.
- Suntornchashwej S, Chaichit N, Isobe M, Suwanborirux K. 2005. Hectochlorin and morpholine derivatives from the Thai sea hare, *Bursatella leachii*. *J Nat Prod* 68: 951-955.
- Szyba K, Golonka MC, Gasiowski K, Urban J. 1992. Mutagenic activity of copper(II) chromate and dichromate complexes with polypyridines. *Biometals* 5: 157-161.
- Takano H, et al. 1996. Interleukin-6 (IL-6) production in carcinoma of the cervix. *Arch Gynecol Obstet* 258: 25-33.
- Tardito S, Isella C, Medico E, Marchio L, Bevilacqua E, Hatzoglou M, Bussolati O, Franchi-Gazzola R. 2009. The thioxotriazole copper(II) complex A0 induces endoplasmic reticulum stress and paraptotic death in human cancer cells. *J Biol Chem* 284: 24306-24319.
- Tartour E, Gey A, Sastre-Garau X, Pannetier C, Mosseri V, Kourilsky P, Fridman WH. 1994. Analysis of interleukin 6 gene expression in cervical neoplasia using a quantitative polymerase chain reaction assay: evidence for enhanced interleukin 6 gene expression in invasive carcinoma. *Cancer Res* 54: 6243-6248.
- Tates AD, van Dam FJ, Natarajan AT, Zwinderman AH, Osanto S. 1994. Frequencies of HPRT mutants and micronuclei in lymphocytes of cancer patients under chemotherapy: a prospective study. *Mutat Res* 307: 293-306.
- Tavidou A, Manolopoulos VG. 2004. Antioxidant properties of two novel 2-biphenylmorpholine compounds (EP2306 and EP2302) in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 505: 213-221.
- Testa U. 2004. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia* 18: 1176-1199.
- Tiekink ERT, Zukerman-Schpector J, eds. 2012. *The Importance of Pi-Interactions in Crystal Engineering: Frontiers in Crystal Engineering United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd.*
- Traber MG, Atkinson J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 43: 4-15.
- Trejo-Solis C, Jimenez-Farfan D, Rodriguez-Enriquez S, Fernandez-Valverde F, Cruz-Salgado A, Ruiz-Azuara L, Sotelo J. 2012. Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and JNK activation. *BMC Cancer* 12: 156.
- Uehara T, Yamate J, Torii M, Maruyama T. 2011. Comparative nephrotoxicity of Cisplatin and nedaplatin: mechanisms and histopathological characteristics. *J Toxicol Pathol* 24: 87-94.
- van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31: 1-9.
- Varner JA, Cheresch DA. 1996. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 8: 724-730.
- Vazquez-Ortiz G, Pina-Sanchez P, Hidalgo A, Lazos M, Moreno J, Alvarado I, Cruz F, Hernandez DM, Perez-Plascencia C, Salcedo M. 2005. [Global expression analysis in uterine cervical cancer: metabolic pathways and altered genes]. *Rev Invest Clin* 57: 434-441.

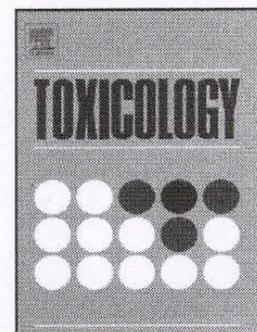
- Velazquez AM, Martinez L, Abrego V, Balboa MA, Torres LA, Camacho B, Diaz-Barriga S, Romero A, Lopez-Castanares R, Angeles E. 2008. Synthesis and antihypertensive effects of new methylthiomorpholinphenol derivatives. *Eur J Med Chem* 43: 486-500.
- Velázquez AM, et al. 2006. A novel one pot, solvent-free Mannich synthesis of methylpiperidinyl phenols, methylphenylmorpholinyl phenols and methylthiophenylmorpholinyl phenols using infrared light irradiation. *ARKIVOC* 2006: 150-161.
- Venkatesan AM, et al. 2010. Bis(morpholino-1,3,5-triazine) derivatives: potent adenosine 5'-triphosphate competitive phosphatidylinositol-3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors: discovery of compound 26 (PKI-587), a highly efficacious dual inhibitor. *J Med Chem* 53: 2636-2645.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51.
- Viegas C, Jr., Silva DH, Pivatto M, de Rezende A, Castro-Gamboa I, Bolzani VS, Nair MG. 2007. Lipoperoxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory piperidine alkaloids from *Cassia spectabilis* green fruits. *J Nat Prod* 70: 2026-2028.
- Walczak H, Haas TL. 2008. Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex. *Methods Mol Biol* 414: 221-239.
- Wang T, Guo Z. 2006. Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design. *Curr Med Chem* 13: 525-537.
- Wang Y, Juan LV, Ma X, Wang D, Ma H, Chang Y, Nie G, Jia L, Duan X, Liang XJ. 2010. Specific hemosiderin deposition in spleen induced by a low dose of cisplatin: altered iron metabolism and its implication as an acute hemosiderin formation model. *Curr Drug Metab* 11: 507-515.
- Wasserman V, Kizelsztejn P, Garbuzenko O, Kohen R, Ovadia H, Tabakman R, Barenholz Y. 2007. The antioxidant tempamine: in vitro antitumor and neuroprotective effects and optimization of liposomal encapsulation and release. *Langmuir* 23: 1937-1947.
- Whang JD, Lee JH. 1997. Molecular genetics of gynecologic cancer. *J Korean Med Sci* 12: 383-389.
- Williams GT. 1991. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65: 1097-1098.
- Yang X, Shi Q, Liu YN, Zhao G, Bastow KF, Lin JC, Yang SC, Yang PC, Lee KH. 2009. Antitumor agents 268. Design, synthesis, and mechanistic studies of new 9-substituted phenanthrene-based tylophorine analogues as potent cytotoxic agents. *J Med Chem* 52: 5262-5268.
- Ye S, et al. 2010. Plexin-B1 silencing inhibits ovarian cancer cell migration and invasion. *BMC Cancer* 10: 611.
- Yermilov V, Yoshie Y, Rubio J, Ohshima H. 1996. Effects of carbon dioxide/bicarbonate on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propenal mediated by peroxynitrite. *FEBS Lett* 399: 67-70.
- Yim EK, Lee KH, Kim CJ, Park JS. 2006. Analysis of differential protein expression by cisplatin treatment in cervical carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer* 16: 690-697.
- Ying J, Yang W, Xie CY, Ni QC, Pan XD, Dong JH, Liu ZM, Wang XS. 2011. Induction of caspase-3-dependent apoptosis in human leukemia HL-60 cells by delta-elemene. *Yakugaku Zasshi* 131: 1383-1394.
- Yokota J. 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21: 497-503.

- Yoon MA, Jeong TS, Park DS, Xu MZ, Oh HW, Song KB, Lee WS, Park HY. 2006. Antioxidant effects of quinoline alkaloids and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from *Scolopendra subspinipes*. *Biol Pharm Bull* 29: 735-739.
- Zentella A, Frías S, Galicia G, Ruíz E, Córdova E, Ventura JL, Ramírez JR, Castro N, Montes D, Ibarra-Sanchez Mde J. 2007. CÁNCER DE GLÁNDULA MAMARIA Y METÁSTASIS: UN CRECIENTE PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA EN MÉXICO. *Mensaje Bioquímico XXXI*: 172-195.
- Zhou H, Miyaji T, Kato A, Fujigaki Y, Sano K, Hishida A. 1999. Attenuation of cisplatin-induced acute renal failure is associated with less apoptotic cell death. *J Lab Clin Med* 134: 649-658.
- Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 8: 59-73.
- Zong WX, Thompson CB. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development* 20: 1-15.

Accepted Manuscript

Title: Cytotoxic, pro-apoptotic, pro-oxidant, and non-genotoxic activities of a novel copper(II) complex against human cervical cancer

Author: Susana E. Frias González Enrique Angeles Anguiano
Alberto Mendoza Herrera Daniel Escutia-Calzada Cynthia
Ordaz Pichardo



PII: S0300-483X(13)00237-0
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tox.2013.08.018>
Reference: TOX 51286

To appear in: *Toxicology*

Received date: 19-4-2013
Revised date: 8-8-2013
Accepted date: 28-8-2013

Please cite this article as: González, S.E.F., Anguiano, E.A., Herrera, A.M., Escutia-Calzada, D., Pichardo, C.O., Cytotoxic, pro-apoptotic, pro-oxidant, and non-genotoxic activities of a novel copper(II) complex against human cervical cancer, *Toxicology* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.08.018>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Cytotoxic, pro-apoptotic, pro-oxidant, and non-genotoxic activities of a novel copper(II) complex against human cervical cancer

Susana E. Frias González^a, Enrique Angeles Anguiano^b, Alberto Mendoza Herrera^c, Daniel Escutia-Calzada^a, and Cynthia Ordaz Pichardo^{a*}.

^a Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN, Guillermo Massieu Helguera 239, Fracc. La Escalera. Ticoman, D.F. 07320, México

^b Laboratorio de Química Medicinal, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM, Av. 1^o de Mayo s/n, Col. Sta. María Las Torres Cuautitlán Izcalli, Estado de México 54740, México

^c Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo, Centro de Biotecnología Genómica-IPN, Blvd. del Maestro s/n Esq. Elías Piña, Reynosa, Tamaulipas 88710, México

* Corresponding author.

Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

Address:

Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales I

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN

Guillermo Massieu Helguera 239, Fracc. La Escalera

Ticoman, D.F. 07320, México

Phone: +52-55 57296000, 55535

Fax: +52-55 57296000, 55561

Email: dra_cynthia@hotmail.com

Abstract

Cisplatin remains one of the most effective current chemotherapeutic agents; however, metal complexes synthesis has increased in order to produce new anti-neoplastic drugs with DNA binding and apoptotic activities in tumor cells and less toxicity for patients. In this study, we evaluated the cytotoxic activity of a novel copper(II) complex (LQM402) against cervical cancer cell lines and found that LQM402 exhibited selective cytotoxicity against HeLa and Ca Ski cells. FITC-annexin assay and DNA fragmentation indicated that apoptosis could be involved in HeLa cell death. Caspase 3/7 and cytochrome c analysis by immunoblotting suggest the intrinsic pathway. LQM402 is a lipid peroxidation inductor according to TBARS production. Additionally, the Ames and micronucleus tests demonstrated non-genotoxic activity for this compound in *Salmonella typhimurium* and CD1 mice, respectively. Therefore, LQM402 may be a promising and safe anti-cervical cancer compound.

Key words: Copper(II) complex, cervical cancer cells, cytotoxicity, genotoxicity, apoptosis.

1. Introduction

Cervical cancer (CeCa) is a common malignancy around the world. This disease is a public health problem in Latin America, where it causes approximately 32,000 deaths in women per year (Almonte et al., 2010). Because currently used anti-tumor drugs induce toxic side effects and resistance, it is necessary to research and synthesize new, effective products for the treatment of advanced tumors that induce fewer negative effects (Zou et al., 2005). Since the discovery of the standard anti-proliferative drug cisplatin, derivatives such as carboplatin, oxaliplatin, and other metal complexes have been synthesized and tested for antitumor activities *in vitro* (Chitambar and Purpi, 2010; Laine et al., 2012) and *in vivo* (Chen et al., 2007; Milacic et al., 2006). The participation of copper in the electron transfer reactions of many cellular processes and its function as a component of metalloproteinases and enzymes has been considered during the development of chemotherapeutic drugs (Marzano et al., 2009; Wang and Guo, 2006; Ruiz-Azuara and Bravo-Gomez, 2010).

Copper, like other trace metals, is essential to proteins that are involved in several biological processes, including respiration, metabolism, DNA synthesis, and oxidation-reduction reactions (Marzano et al., 2009). Copper deficiency or imbalance is associated with severe neurological disorders, including Alzheimer's, Parkinson's (Donnelly et al., 2008), Wilson's, and Menkes' diseases (Wang and Guo, 2006). The chemical characteristics of transition metals provide opportunities to develop novel metal-based anticancer drugs with different mechanisms of action; thus, complexes that contain copper or other metals represent a new generation of alternative antitumor agents (Ruiz-Azuara and Bravo-Gomez, 2010). Casiopeínas[®] are copper complexes that were designed on the basis of the antitumor activities of cisplatin and other series of metal compounds. These compounds were found to be several times more cytotoxic than cisplatin against some cervical cancer cell lines (Gracia-Mora et al., 2001). Various copper complexes are

also cytotoxic against other types of human cancer cells. A ternary copper(II) complex of amino-coumarins with phenanthroline inhibited the growth of PC3 human prostate cancer cells and HL-60 human myeloid leukemia cancer cells (Jia et al., 2010). Benzene-1,2-dithiol-modified, cisplatin-based copper(II) and zinc(II) complexes were also shown to be cytotoxic against human cancer cell lines, including HeLa (human cervical cancer), Hep2 (human laryngeal epithelial cancer), HepG2 (human liver cancer), and MCF-7 (human breast cancer cells) (Raman et al., 2010). Treatment with 10-deacetylbaicatin thiosemicarbazone alone only arrested the growth of viable MCF-7 breast cancer cells, while the addition of copper to the same compound induced notable cell lethality (Murugkar et al., 1999). In recent years, reports on cytotoxic copper complexes have shown that the mechanism of action is based on DNA intercalation and cleavage activity (Krishnamoorthy et al., 2011; Lakshmi praba et al., 2011) or apoptosis induction activity (Boulsourani et al., 2011; Tardito et al., 2009). In this paper, we evaluated the *in vitro* cytotoxic abilities of the copper(II) complex LQM402 against four human cervical cancer cell lines, of which HeLa and Ca Ski cells were the most sensitive. DNA ladder and TUNEL fragmentation assays showed that LQM402 induced DNA cleavage in HeLa cells in a time-dependent manner. We hypothesize that the cytotoxic effects are related to the pro-apoptotic activity of LQM402, as detected by annexin-FITC staining and the diminished expression of pro-caspases 3 and 7, as well as the presence of cytochrome c in cytosolic extracts. Moreover, LQM402 did not induce mutations in *Salmonella typhimurium* and CD1 mice.

2. Material and methods

2.1. Chemistry

The complex $(\mu_4\text{-Oxo})\text{tetra-}\mu_4\text{-acetate}\{4\text{-hydroxi-3,5-bis(morpholinomethyl)}\}\text{tetra copper(II)}$ (LQM402; Fig.1) was prepared in ethanol with 1.602 g of the ligand 2,6-

Bis(morpholinomethyl)phenol (Velazquez et al., 2008), 1.081 g Cu(II) acetate and 0.1 ml NH₄OH. The solution was stirred for 18 h at room temperature. The solvent was discarded and the precipitate was collected and crystallized (yield: 86%). The resulting green crystals displayed the following characteristics: formula, C₄₄H₇₂Cu₄O₁₄N₄; molecular weight, 1132 g/mol; and melting point, 198-200°C (unpublished data; in patent processing).

2.2. Culture of cell lines

Four human cervical carcinoma (CeCa) cell lines, HeLa, SiHa, Ca Ski, and C-33 A, and primary non-tumoral human fibroblasts (FB) were used. HeLa cells were kindly donated by Teresa Ramírez-Apan, M.Sc. from the Instituto de Química at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). SiHa, Ca Ski, and C-33 cell lines were kindly donated by Juan Carlos Gomora, Ph.D. from the Instituto de Fisiología at UNAM. The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone, Thermo Scientific, Logan, UT, USA) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Gibco, Carlsbad, CA, USA) in culture flasks at 37°C in a 5% humidified CO₂ incubator. Semi-confluent cells (70 - 80%) were removed with 0.1% trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), washed twice with phosphate-buffered saline solution (PBS) that contained 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄, 8 g NaCl, and 2.16 g Na₂HPO₄•7H₂O per liter, pH 7.4, centrifuged, and resuspended in media. Separately, 5 x 10³ FB, HeLa, or SiHa cells and 8 x 10³ Ca Ski or C-33 A cells were deposited 96-well microplates. The cells were incubated overnight before additional treatments.

2.3. Cell treatment and MTT assay

Cytotoxicity was determined with a standard MTT assay as described by Mosmann (1983). This assay is based on the reduction of yellow MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide) to formazan by mitochondrial succinate dehydrogenase in living cells. The resulting purple formazan crystals are dissolved in DMSO and subsequently the absorbance is measured and related to the absorbance value of formazan produced by untreated cells. The absorbance value of formazan is directly proportional to the number of viable cells (Cory et al., 1991). Briefly, CeCa cells that had been seeded into 96-well microplates were treated for 24 h with different concentrations of LQM402 compound (12.5 - 100 μ M). Cisplatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at the same concentrations was used as the positive control, and media plus 1% DMSO was used as the negative control. Additionally, HeLa cells were treated for 48 and 72 h. After treatment, the media was aspirated from the wells and replaced with medium containing MTT (1 mg/ml), and the cells were incubated for an additional 4 h at 37°C. After incubation and the removal of the MTT media, the formazan crystals were dissolved with DMSO and the plates were read in a microplate reader (ELx808, Bio-Tek, Winooski, VT, USA) at 570 nm. All treatments were performed at least three times in triplicate. Mean values were obtained and used to calculate the percent viability according to the formula:

$$\% \text{ viability} = (\text{mean O.D. treated cells} \times 100) / \text{mean O.D. control cells}.$$

The concentration values that caused a 50% cell growth inhibition (IC_{50}) were calculated from the dose-effect relationship of each cell line by non-linear regression with Prism 5.0 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

2.4. Phosphatidylserine detection by flow cytometry assay

The apoptotic activity of LQM402 was assessed by FITC-labeled annexin V binding and PI uptake with the Annexin-V FITC kit (BioVision, Milpitas, CA, USA). According to the manufacturer's instructions, 5×10^4 HeLa cells were seeded in DMEM media with 10% FBS and allowed to adhere for 24 h. On the following day, the media was replaced with media that

contained LQM402 at 74.74 μM (8.11 mg/ml) and the cells were incubated for an additional 6, 12, or 24 h. After the treatment, the cells were harvested, washed twice with PBS, suspended in 500 μl binding buffer plus 5 μl annexin V-FITC and 5 μl PI (provided with the kit). The tubes were gently stirred, kept in the dark on ice for 10 min, and analyzed on a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) (Vermes et al., 1995).

2.5. Cell Death detection by TUNEL assay

The HeLa cell death was detected using the *In Situ* Cell Death Detection kit, AP version 11.0 from Roche according to the manufacturer instructions with minimal modifications. Briefly, HeLa cells were seeded in coverslips inside 6 well plates and treated with 74.74 μM LQM402 for 24, 48, and 72 h. 1% DMSO and 20 μM cisplatin-treated cells (48 h) were the vehicle and positive control, respectively. After treatments, cells were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS pH7.4 and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate for 20 min at 2-8°C. After permeabilization, cells were washed twice with PBS and covered with 50 μl of the TUNEL reaction mixture and incubated at 37°C for 60 min in a humidified atmosphere in the dark. Finally, coverslips with cells were rinsed three times with PBS and placed on slides using the Vectashield[®] Mounting Media for fluorescence (Vector Labs) for their observation under a fluorescence microscope in the range of 515-565 nm (green).

2.6. Ladder assay (Detection of DNA fragmentation)

DNA isolation from HeLa cells treated with 74.74 μM for 24, 48, and 72 h was performed using the new DMSO-SDS-TE method according to Suman et al. 2012. Floating and attached cells seeded and treated in 100 mm petri dishes were collected and washed with PBS. 100 μl of DMSO was added directly to the cell pellet and mixed well followed by vortexing. 100 μl of SDS (2%

sodium dodecyl sulphate)-TE (Tris-EDTA) buffer (pH 7.4) was added followed by mixing and vortexing. The resulting solution was centrifuged at 13,000 rpm at 4°C and supernatant was collected in a new tube. 25 µl of the supernatant for each treatment was loaded on 1.5% agarose gel and running for 60 min at 100V. 1% DMSO and 20 µM cisplatin-treated cells (48 h) were the negative and positive control, respectively.

2.7. Western blotting analysis

The expression levels of caspases 3, 7, and 9 and cytochrome c were determined by immunoassays. Control and 74.74 µM LQM402-treated HeLa cells from different time points (3, 6, 12, 18, and 24 h) were washed twice with PBS and total or cytoplasmic extracts were obtained with RIPA buffer (0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 2.5% deoxycholic acid, 10% NP-40, 10 mM EDTA) or digitonin, respectively (all from Sigma-Aldrich) at pH 7.4, in the presence of a Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). All lysis reactions were performed on an ice bath. Total protein concentrations were determined according to the Bradford method (BioRad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of protein from each lysate (30 µg) were loaded and run on 12% SDS-polyacrylamide gels. The proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane that was blocked with 5% non-fat milk in 0.1% Tween 20-Tris buffered saline at pH 7.5. After washing, hybridization was performed overnight with primary antibodies against caspases 3, 7, and 9 and cytochrome c (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 4°C. Horseradish peroxidase-conjugated IgG secondary antibodies were also used (Santa Cruz Biotechnology), followed by detection with an enhanced chemiluminescence kit (Pierce, Rockford, IL, USA) and autoradiography developer film (Kodak, Rochester, NY, USA). Anti-β-actin was used to ensure equal loading of proteins on the gel (Montes-Sanchez et al., 2009).

2.8. Ames test

Mutagenicity tests are biological assays used to assess the mutagenic potential of chemical compounds (Hong et al., 2011). We performed the Ames test on the following set of histidine auxotrophic *Salmonella typhimurium* strains: TA100 (*hisG46*, *rfa uvrB* pKm101), which can detect base-pair substitution mutations; TA98 (*hisD3502*, *rfa uvrB* pKm101), which can detect frameshift mutations; and TA102 (*hisG428*, *rfa*, pQ1, pKm101), which can detect reactive ROS-induced DNA damage. The mutagenicity of LQM402 was evaluated in these three strains, with or without Arochlor 1254-induced rat liver homogenate (S9 mixture), with an incorporation method as described by Maron and Ames (1983). Three concentrations of LQM402 (50, 100, and 200 $\mu\text{M}/\text{plate}$) were used in the presence or absence of 500 μl of the S9 mixture. LQM402 was dissolved in DMSO at the indicated concentrations and mixed with 100 μl of bacteria culture ($1-2 \times 10^9$ CFU/ml) in 2 ml molten agar that was subsequently added to minimal agar of Vogel Bonner plates with 0.5 mM histidine/biotin. The plates were incubated for 48 h at 37°C and the histidine (His^+) revertant colonies that had formed were counted with a Fisher colony-counter. For a positive Ames test result, the tested chemical must induce twice as many His^+ revertants as are obtained by spontaneous reversion (Ames et al., 1975; Szyba et al., 1992). The positive controls used in this test were picrolonic acid (PA) at 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NMNG) at 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$, mitomycin C (Mit C) at 10 ng/plate, 2-Aminoanthracene (2AA) at 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$, and cyclophosphamide (CP) at 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$.

2.9. In vivo micronucleus test

Micronucleus tests detect undamaged chromosomes that were not pulled to the appropriate pole of the spindle due to a missing centromere and chromosomal fragments that were not

incorporated into daughter cell nuclei at mitosis (Schmid, 1975). For this test, we used CD1 male mice (25 - 30 g) that were obtained from Rismart, Mexico. Mice were maintained according to the Mexican office of regulations for the production, care, and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999) and the protocol approved by the Ethics Committee of the National School of Medicine and Homeopathy of Mexico (Registration No. ENMH-CB-010-2011). The mice were kept in an animal room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 5\%$ humidity, and under a 12 h: 12 h light-dark cycle. Mice were fed a standard diet (Purina, Cuautitlan, Mexico) and water *ad libitum*. Treatment groups consisted of five mice that were each subjected to one intraperitoneal injection. Mice in the control group (vehicle) received sterile water, mice in the positive control group received 60 mg/kg Mit C, and mice in the treatment groups received 5, 10, or 15 mg/kg LQM402 dissolved in sterile water. The same doses of LQM402 were also administered to mice that had received 60 mg/kg Mit C 30 min earlier with the objective of determining the anti-mutagenic potential of LQM402. Peripheral blood smears from the mouse tails were obtained before the treatments and at 24, 48, and 72 h after the treatments. The smears were stained with Giemsa solution (Sigma-Aldrich) in phosphate buffer solution (0.6 M, pH 6.8). To estimate the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE), 1000 polychromatic erythrocytes (PCE) were scored per smear (Díaz Barriga et al., 1999) and the ratio of PCE was estimated from 2000 erythrocytes. The values obtained from LQM402 or Mit C treated animals were compared to those obtained from control animals.

2.10. Lipid peroxidation induction

Evaluation of reactive species formation is frequently used to measure the antioxidant or pro-oxidant activities in several types of samples. Because the malondialdehyde and similar compounds produced via lipid peroxidation reactions with thiobarbituric acid, this test is named

thiobarbituric acid reactive species (TBARS) (Cathcart et al., 1991). For this assay, we used adult male Wistar rats (200 ± 50 g) that were provided by the Institute of Cellular Physiology-UNAM and maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $50 \pm 5\%$ humidity under a 12 h:12 h light-dark cycle. The rats were fed a standard diet and water *ad libitum*. For rat brain homogenate preparation, the animals were sacrificed with CO_2 according to the official protocols previously mentioned to avoid unnecessary pain. Whole brains were rapidly dissected and homogenized in PBS to produce a 1/10 (w/v) homogenate. The homogenate was subsequently centrifuged for 10 min at 3400 rpm. The protein content in brain supernatant solutions was measured with Folin and Ciocalteu's phenol reagent and the solutions were adjusted with PBS solution to 2.66 mg/ml protein (Dominguez et al., 2005).

All lipid peroxidation experiments were conducted in an ice bath. Briefly, 375 μl of brain supernatant solution and 50 μl of 20 μM EDTA were added to 1.5 ml tubes. Next, 25 μl of LQM402 dilutions in DMSO to different concentrations (1 – 100 μM) or DMSO only for control were added to the tubes. The samples were incubated at 37°C for 3 h with constant shaking. After the incubation, 500 μl of TBA solution (0.5% TBA in 0.05 N NaOH and 30% trichloroacetic acid at a 1:1 ratio) were added to each mixture and the samples were cooled on ice for 10 min, centrifuged at 10,000 rpm for 5 min, and incubated at 90°C for 30 min. After cooling at room temperature, the sample absorbances were measured at 540 nm in a microplate reader (ELx808, Bio-Tek, Winooski, VT). Additionally, control experiments to test the induction of lipid peroxidation were conducted in the presence of rat brain homogenate to give a basal reading or 20 mM 2,2'-azobis(2-mehtyl-propionamide) dihydrochloride (AAPH) or 10 μM ferrous sulfate (FeSO_4) to give positive control readings; the latter condition was incubated for 1 h.

2.11. Antioxidant assay

The scavenging activity of LQM402 was measured by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. DPPH is a stable free radical that can be reduced in the presence of free radical scavengers, upon which it converts from its original violet color to yellow (Waffo Teguo et al., 1998). Separately, three concentrations of LQM402 (1, 10, and 100 μM) that had been dissolved in ethanol from a 20 mM stock DMSO solution were allowed to react with the stable free radical DPPH (100 μM) for 30 min at room temperature in the dark. Each dilution was tested in triplicate. The reaction absorbances were measured at 515 nm with a microplate reader (ELx808, Bio-Tek, Winooski, VT). The percent radical scavenging activity (%RSA) for each sample was calculated in comparison with the DMSO-treated control group according to the following equation:

$$\% \text{ RSA} = 100 - [(\text{absorbance of test compound} / \text{absorbance of control}) \times 100]$$

2.12. Statistical analysis

Data were presented as the mean \pm standard error. For comparisons of treated groups against a control group, two-way ANOVA and Bonferroni post-tests were conducted for data analyses when applicable. Significance was set at $p < 0.05$, $p < 0.01$, or $p < 0.001$, depending on the experiment.

3. Results and discussion

3.1. LQM402 is cytotoxic against CeCa cells in a concentration-dependent manner

The anti-neoplastic drugs that are generally used to treat CeCa cause serious side effects and generate resistance, indicating a need for safe alternatives to treat this disease. Cis-diaminedichloroplatinum (II) (Cisplatin) is still one of the most effective current chemotherapeutic anti-tumor agents. In response, several metal complexes have been synthesized

with the intent to produce new anti-neoplastic compounds that include metals such as gallium, gold, nickel, copper, and zinc (Frezza et al., 2010; Laine and Passirani, 2012). Herein we tested the new copper(II) complex LQM402 against the HeLa, Ca Ski, SiHa, and C-33 A cervical cancer cell lines to determine the potential anti-tumor effects. Our data in Fig. 2 show differential concentration-dependent cytotoxic activities in the cell lines at 24 h. At the highest concentration (100 μ M), viability decreased as a function of the tumor cell line as follows: SiHa (57.75%), C-33 A (51.44%), Ca Ski (36.62%), and HeLa (19.45%); these data indicate that HeLa cells were the most sensitive to LQM402. In all of the cell lines, cytotoxic activity was not observed at LQM402 concentrations below 25 μ M; however, at concentrations ranging from 50 to 100 μ M, it caused a dramatic loss in viability of all CeCa cell lines except for the SiHa line. The LQM402 IC_{50} values were significantly lower for HeLa and Ca Ski cells (<100 μ M; $p < 0.05$) than the other cell lines (>100 μ M; Table 1), suggesting likely differences in membrane permeability or metabolism of the copper(II) complex among the cell lines. The cytotoxic activity of our compound is in agreement with reports describing the cytotoxic activities of copper complexes introduced into HeLa cells by nanoparticles delivery vectors (Harris et al., 2011), as well as Casiopeínas[®] evaluated by sulforhodamine b assay in the same CeCa cell lines used in our study (Gracia-Mora et al., 2001; Krishnamoorthy et al., 2011, 2012). Other tested copper complexes have showed being cytotoxic to cell lines from different types of cancer such as prostate, liver, and myeloid leukemia (Jia et al., 2009; Lakshmipraba et al., 2011; Hammud et al., 2008). In this study, fibroblasts were used as a non-malignant human control cells and were found to be less affected by LQM402 than tumor cells, suggesting an advantage for this complex as a potential selective anticancer drug. This result is comparable to those obtained in another study of macrocyclic copper(II) complexes that were evaluated at similar concentrations (1-100 μ M) and by the same method in normal V79 Chinese hamster lung fibroblasts; that study reported cell

survival rates above 80% at 50 μ M in a 24 h incubation, while our complex induced 95.14% survival at the same concentration and incubation time (Fernandes et al., 2007). On the other hand, compared with the antitumor drug cisplatin, LQM402 was less cytotoxic against HeLa cells; however, the IC₅₀ value of LQM402 for non-tumoral fibroblasts was higher than that of cisplatin, which suggests that LQM402 was less toxic against these normal cells (Table 1). Because of the selectivity of LQM402 for HeLa cells, we tested the cytotoxicity of copper complex in this cell line at 48 and 72 h and compared with cisplatin treatment at the same times. The obtained IC₅₀ values are showed in Table 2.

3.2. LQM402 induces phosphatidylserine residue externalization on HeLa cells

Most anticancer drugs exert their effect by apoptotic induction, which is the recommended action mechanism due to the lack of an inflammatory response (Mizutani, 2007; Kerr et al., 1994). Apoptosis is an important mechanism of cell death that is involved in many physiologic processes related to homeostasis and is a central regulator of pathophysiological conditions. Cancer cells have been reported to develop several mechanisms with which to resist apoptotic cell death, and resistance to apoptosis is considered a hallmark of cancer (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011; Ocker and Hopfner, 2012). To determine whether the inhibitory effects of LQM402 on HeLa cell viability resulted from apoptosis, we measured apoptotic processes by annexin V-FITC staining and propidium iodide (PI) accumulation, based on the early apoptotic phosphatidylserine residue flip from the inner to outer surface of the cytoplasmic membrane, and analyzed cell staining by flow cytometry (van Engeland et al., 1998; Vermes et al., 1995). Fig. 3 shows that a concentration of 74.74 μ M LQM402 was able to induce time-dependent apoptosis in HeLa cells, with frequencies of 10.96% and 51.44% apoptotic cells at 6 and 24 h, respectively, compared with 5.86% apoptotic cells at 24 h in cells treated with 0.1% DMSO-treated; this

finding was consistent with our previous IC_{50} data. At 12 h, nearly half of the LQM402-treated apoptotic HeLa cells were in early apoptosis, with the remainder in late apoptosis. At 24 h, 3.77% of the treated cells were labeled only by propidium iodide (necrosis) and the rest of cells were stained by both annexin V and PI (late apoptosis), which indicates that the cells have lost membrane integrity (Cai et al., 2002). Because most of the treated cells were in early apoptosis, we can say that LQM402 has a similar potential as other copper complexes to induce apoptosis in HeLa cells at early time points. For example, human ovarian carcinoma (CH1) and murine leukemia (L1210) cells exhibited typical morphological changes in the cytoplasm (shrinkage), chromatin (condensation), and nuclei (DNA fragmentation) after treatment with Casiopeína[®] II for 24 h (De Vizcaya-Ruis et al., 2000). A Schiff base copper(II) also induced apoptosis in MCF-7 cells at concentrations of 20 μ M or less in a 48 h incubation, as determined with flow cytometry (Ma et al., 2012), and a study of the cell cycle in HCT116 cells demonstrated that copper bis(thiosemicarbazone) complexes induced both apoptosis and DNA cleavage in those cells (Palanimuthu et al., 2013). These and many other studies that were published in the last decade confirm that copper complexes are potential cytotoxic compounds.

3.3. LQM402 induces DNA fragmentation in HeLa cells

It is known that programmed cell death or apoptosis is the most common form of cell death and that this process is associated with DNA cleavage (Kroemer et al. 2009). Therefore, to evaluate if the copper complex LQM402 was able to induce DNA cleavage, we perform TUNEL and DNA-ladder assays with LQM402-treated HeLa cells at the IC_{50} value obtained in these cells at 24 h (74.74 μ M) for 24, 48 and 72 h incubation times. In the TUNEL assay, we found DNA cleavage labeling in a time-dependent manner (Fig. 4). The amount of cell showing DNA cleavage induced by LQM402 at 72 h was similar that the induced by the positive control cisplatin;

however, it seems that the morphology or DNA fragmentation pattern observed in some LQM402-treated cells is different from the cisplatin-treated cells. The TUNEL reaction preferentially labels DNA strand breaks generated during apoptosis; nevertheless, DNA cleavage can be incomplete in some forms of cell death or may occur in random form in late stages of necrosis (Zong and Thompson 2006). In the DNA-ladder assay, we observed DNA degradation in LQM402-treated cells at all the times tested compared with the control cells generating DNA fragments approximately of 600 bp. Cisplatin treatment at 24 h induced similar DNA fragments at 48 h (600bp) as LQM402 treatment, meanwhile approximately 100, 600, and 400 bp fragments were generated (Fig. 5). Several copper complexes with different structural features have been shown to bind double-helical DNA and to promote double-strand DNA damage, this activity is mainly associated to their ability to induce or to generate free radicals (Liu et al. 1999).

3.4. Western blotting

Apoptosis and necrosis are the major types of cell death. Each is characterized by morphological and biochemical features and currently, genetics contribute to specifically define those processes (Kroemer et al., 2009; Ouyang et al., 2012). However, there are also less studied cell death mechanisms such as anoikis, cornification, entosis, mitotic catastrophe, necroptosis, netosis, parthanatos, and pyroptosis (Galluzzi et al., 2012) that are less commonly observed.

The apoptotic process depends on the activation of caspases that are involved in both the extrinsic and intrinsic pathways. To determine if LQM402 induced caspase activation, we obtained lysates from HeLa cultures that were treated with the complex at different time points and examined the expression of caspase-3, caspase-7, and caspase-9. The immunoblotting experiments showed the depletion of procaspase-3 in HeLa cells treated with 74.74 μ M LQM402 for 18 and 24 h, compared to control cells ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively), and similar results after

treatment with 20 μM cisplatin for 24 h ($p < 0.05$). Although a densitometric analysis did not show significant differences between the treatments, both procaspase-7 and procaspase-9 showed trends toward reduced expression, which suggested the formation of active forms of these zymogens; however, the active forms of these caspases were not detected in our assays.

Cytochrome c was detected in cytoplasmic lysates from HeLa cells treated with LQM402 for 6, 12, 18, and 24 h or with cisplatin for 24 h, but not in lysates from control (untreated) and 0.1% DMSO-treated cells (Fig. 6). Initially, our data indicate that the intrinsic pathway could be involved in LQM402-induced apoptosis, but the possibility of other routes or cell death types should not be dismissed because other cell death processes have been observed in response to different Cu(II) complexes. For instance, the thioxotriazole copper(II) complex (A0) studied by Tardito and coworkers induced cell death after caspase-3 activation, but the cells did not display the known characteristics of classic caspase-dependent apoptosis. The authors reported that A0-induced cell death involved endoplasmic reticulum stress and paraptotic death (Tardito et al., 2009). Furthermore, apoptotic cell death was reported in C6 glioma cells that were exposed for 24 h to concentrations of [(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(acetylacetonate) Copper(II) nitrate] (Cas III-ia) ranging from 11.23 to 22.4 μM . However, treatment with 33.7 – 44.9 μM of that compound induced ultrastructural findings that suggested autophagic cell death (Trejo-Solis et al., 2012). These results opened approaches to different mechanisms of action for new copper or other metal-based compounds designed for anticancer therapy.

On the other hand, while 74.74 μM LQM402 diminished the expression of procaspase-3 and procaspase-9 at 24 h, 50 μM of the Isatin-diimine copper(II) complexes bis-[(2-ox-indol-3-yl-imino)-1,3-diaminopropane-N,N',O,O']copper(II)perchlorate ([Cu(isapn)](ClO₄)₂) and [bis-(2-oxindol-3-yl-imino)-2-(2-aminoethyl)pyridine-N,N']copper(II) perchlorate([Cu(isaepy)₂](ClO₄)₂), also known as Cu(isapn) and Cu(isaepy), induced the

expression of the active forms of these caspases after 24 and 48 h of treatment in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line (Filomeni et al., 2007). Additionally, 11.23 – 22.4 μM of Cas III-ia induced mitochondrial cytochrome c liberation, which was found in the cytoplasm (Trejo-Solis et al., 2012). These results are similar to our findings in LQM402-treated HeLa cells; however, these data represent initial investigations into the pathway of LQM402-induced HeLa cell death and further studies are required.

3.5. LQM402 is a non-mutagenic agent in the Ames test

Because potential anti-neoplastic drugs should be non-toxic to non-malignant cells, we measured the genotoxic effects of LQM402 on histidine mutants of the *S. typhimurium* strains TA 98, TA 100, and TA 102. The compound was tested with or without the addition of the S9 activator because many carcinogenic agents must be activated (Ames et al., 1973). Table 3 shows the numbers of His⁺ revertants of *S. typhimurium* after at 48 h incubation with the DMSO vehicle control or different concentrations of LQM402. LQM402 was not mutagenic in any of the three tested strains at 50, 100, and 200 μM when compared to all of the employed positive controls (PA, NMNG, Mit C, 2AA, and CP) with or without S9 mixture, all of which induced mutation rates that were several times higher (3-64) than the control spontaneous reversion (DMSO; Table 2). Our results indicate that these doses of LQM402 are not mutagenic to the strains assayed by the Ames test and are similar to results obtained in an Ames study of novel copper(II) quinolinone Schiff base complexes that were cytotoxic against human hepatocarcinoma cells (Hep-G2) and non-mutagenic in the *S. typhimurium* strains TA98 and TA100 (Duff et al., 2012). Other copper complexes evaluated by Ames tests were $[\text{Cu}(\text{phendione})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, which were also cytotoxic against Hep-G2 and a human kidney adenocarcinoma (A-498) cell line but non-mutagenic in the *S. typhimurium* strains TA98 and

TA102 (Deegan et al., 2006, 2007). These results suggest that some copper complexes can effectively kill cancer cells without mutagenic activity.

3.6. LQM402 does not induce micronucleus formation in mice peripheral blood

To assess the genotoxic activity of LQM402 in an *in vivo* model, the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) was scored in 1000 polychromatic erythrocytes (PCE), according to previously published criteria (Fenech, 2000). The ability of LQM402 to induce MNPCE is shown in Fig. 7, where it is observed that only mice treated with the positive control Mit C had statistically significant increases in the numbers of MNPCE at 48 and 72 h with respect to the mice treated with the control (distilled water). It is usually possible to observe initial mutagenic effects from micronucleus-inducing agents at 24 h; the highest amount of MN is observed at 48 h, and the level decreases at 72 h. This was observed with our positive control Mit C, but not with LQM402. Fig. 7 also shows the inhibitory effect of LQM402 on Mit C-induced MNPCE when the copper complex was administered in addition to Mit C. All LQM402-treated groups had similar numbers of MNPCE both before (0 h) and after treatment (24, 48, and 72 h), with mean values ranging from 2 to 3.6, and no significant differences were observed among the groups or with respect to the control. These results could suggest that LQM402 has anti-mutagenic properties.

In the micronucleus test, an increase in the ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) with respect to normal chromatic erythrocytes (NCE) means that proliferative activity is stimulated, likely due to an early phase of cell depletion (Ecobichon, 1997). The LQM402-induced PCE/NCE ratios are expressed in Table 4. None of the concentrations and time points for LQM402 showed an increase in PCE/NCE, compared with the ratio exhibited for the control group. At 24 and 48 h after administration of Mit C, the ratio for PCE/NCE was significantly

different ($p < 0.05$) from the control ratio at the same times and at 72 h, the ratio decreased to almost the initial value (0 h). When LQM402 at 5 mg/kg (C1), 10 mg/kg (C2), and 15 mg/kg (C3) concentrations was administered 30 min after the administration of 60 mg/kg Mit C, it inhibited increases in the PCE/NCE ratio, indicating an anti-cytotoxic effect of LQM402 at the tested concentrations against Mit C-induced toxicity in murine blood cells. There are few studies of copper complex genotoxicity that were evaluated by the micronuclei assay. A micronuclei evaluation of the copper complexes $\text{CuL}(\text{ClO}_4)_2$ and $\text{CuL}(\text{NO}_3)$ for the macrocyclic ligand 1,1'-bis(bis-(6,6'-oxymethylenyl-2,2'-bipyridine) binaphthyl (L) in cultured human lymphocytes indicated genotoxicity by the induction of micronucleated cells at a dose of 0.15 mg/kg for 24 h and cytotoxicity by a reduction in cell number at that same dose and time (Beynek et al., 2007); these effects were not observed with our copper complex even at 33 to 100-fold higher doses. In reports of the genotoxic activities of other copper complexes, researchers commonly used DNA fragmentation assays. Most of these reports suggested possible clastogenic effects or reactive oxygen species as the mechanisms for the mutagenic effects of copper complexes (Beynek et al., 2007; Szyba et al., 1992; Serment-Guerrero et al., 2011).

3.7. LQM402 induces lipid peroxidation of rat brain homogenate

Cytotoxicity and apoptosis occur in response to several causes, including excesses of free radicals or other lipid peroxidation products (Barrera, 2012). As for most of the essential elements, an imbalance in endogenous copper could alter the redox system in a cell and cause systemic damages and pathologies (Wang and Guo, 2006). On the other hand, while copper chelation can be used as an anti-angiogenic therapy (Hancock et al., 2001; Lowndes and Harris, 2004; Lowndes et al., 2008), copper complexes such as casiopeínas® can induce the overproduction of ROS and lead to mitochondrial toxicity (Serment-Guerrero et al., 2011). In our Ames test of the TA102

strain, the number of His⁺ revertants induced by incubation with LQM402 was nearly double the number of spontaneous His⁺ revertants, which could indicate oxidative stress in the absence of genotoxicity. Therefore, to test the pro-oxidant effects of LQM402, we evaluated its ability to induce lipid peroxidation in a rat brain homogenate. We found that in a concentration range of 5.62-17.7 μ M, LQM402 induced significant increases in lipid peroxidation ($p < 0.01$) above the basal level; these increases were not observed at concentrations below 5.62 μ M or in the range of 31.62 μ M-100 μ M (Fig. 8). A LQM402 concentration of 10 μ M induced the maximum level of lipid peroxidation (6.7 nmol TBARS/mg proteins), which was higher than the level induced by the 20 mM AAPH positive control (3.7 nmol TBARS/mg protein) and similar to that induced by the 10 μ M FeSO₄ positive control (7.4 nmol TBARS/mg protein). These data suggest that LQM402 is able to peroxidize lipids and therefore to induce related biological processes. Thus, LQM402-induced cell death and apoptosis in HeLa cells could be due to lipid peroxidation and/or lipid peroxidation products. The metals Cu(II), Cr(II), Co(II), Pb(II), and Fe(II) play important roles in redox processes in biological systems and some of them are inductors of lipid peroxidation by the oxidative features of the Fenton reaction (Benedet and Shibamoto, 2008); thus, it is not unusual that metal-based compounds that include these metals have such activities. Some casiopeínas[®] and other copper complexes can generate reactive oxygen species (Trejo-Solis et al., 2012; Serment-Guerrero et al., 2011) and this activity has been assumed to be the major mode of action behind the cytotoxicity of copper complexes (Kowol et al., 2012). Cu(II) and other transition metals such as (Mn(II), Mn(III), and Fe(III)) display antioxidant properties. The superoxide scavenger activities of macrocyclic copper(II) complexes were determined by a xanthine-xanthine oxidase system (Fernandes et al., 2007). Thus, we assayed the capability of LQM402 to inhibit FeSO₄-induced lipid peroxidation in an attempt to determine whether LQM402 had antioxidant activity. LQM402 was found to have an additive effect on

FeSO₄-induced TBARS production at concentrations from 5.62 μM to 13.34 μM in rat brain homogenate; however, LQM402 displayed inhibitory activity in the concentration range of 23.71-56.23 μM (Fig. 9). Together, our results indicate that LQM402 has both inductive and inhibitory activities in lipid peroxidation.

3.8. LQM402 is not a scavenging agent for the DPPH radical

The DPPH radical scavenging assay was used as an additional test to measure the antioxidant activity of LQM402. We tested LQM402 at three concentrations, 1, 10, and 100 μM, in a 100 μM DPPH solution. The highest concentration of LQM402 achieved a maximum value of 5.18% reduction of the DPPH solution, from which we could not determine the effective concentration required to reduce 50% of the DPPH solution (EC₅₀). This activity was very low compared to the activities of known antioxidants such as α-tocopherol (85.79% DPPH reduction at 74.13 μM) or quercetin (85.53% at 23.71 μM). LQM402 could inhibit the pro-oxidant activity of FeSO₄ but could not act as a scavenger of the DPPH free radical. This finding implied a different potential mechanism from the superoxide scavenger activity presented by macrocyclic copper(II) complexes, which displayed EC₅₀ values of scavenging activity at concentrations below 30.82 μM (Fernandes et al., 2007). Nevertheless, in other studies, the inflammatory drug mefenamic acid and the compounds azo ligand (E)-4-((1H-1,2,4-triazol-3-yl)diazanyl)benzene-1,3-diol and (E)-4-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-yl)diazanyl)benzene-1,3-diol did not exert antioxidant properties when complexed with Cu(II) (Kovala-Demertzi et al., 2009; Gaber et al., 2013), which reveals roles for ligands besides the bonded metal.

4. Conclusion

This study demonstrated that the copper complex LQM402 is cytotoxic against CeCa cell lines, with selectivity for HeLa and Ca Ski cells, and it displays less cytotoxicity against normal fibroblasts. This compound induced the translocation of membrane phosphatidylserine in HeLa cells, a feature of apoptotic death, as detected by annexin V-FITC staining. Initially, the LQM402-induced cell death indicated the activation of the intrinsic apoptotic pathway as determined by the presence of cytochrome c in treated HeLa cell cytoplasmic extracts and by the decreased expression of pro-caspases 3 and 7. It is possible that the cytotoxic activity that led to apoptotic death in HeLa cells was due to the activity of LQM402 as a lipid peroxidation inductor and it also may be associated to the DNA degradation observed in TUNEL and DNA ladder assays. Although there are reports of copper complexes with antioxidant or reactive oxygen species inductor activities, the novel copper(II) complex LQM402 displayed both inhibitory and inductive effects on lipid peroxidation. Therefore, because LQM402 has no genotoxic activity, it might be used as a potential therapeutic agent against cervical cancer. Currently, our research is focused on the effects of this copper(II) complex on tumor growth in a nude mouse model of cervical cancer, as well as on the expression of genes related to cancer progression.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest concerning this manuscript.

Acknowledgements

We thank Antonio Nieto Camacho, M. Sc. and Iván Arias González, M. Sc. for technical assistance with the TBARS and DPPH, and DNA ladder assays, respectively. This project was financially supported by the Instituto Politécnico Nacional (IPN), Mexico (SIP Projects 20101395, 20110808, and 20121122). SEFG is student currently enrolled in the Doctoral

Program of Sciences in Biotechnology at ENMH-IPN and is a recipient of student fellowships from CONACyT (40069) and PIFI-IPN.

References

- Almonte, M., Murillo, R., Sanchez, G.I., Jeronimo, J., Salmeron, J., Ferreccio, C., Lazcano-Ponce, E. and Herrero, R. 2010. [New paradigms and challenges in cervical cancer prevention and control in Latin America]. *Salud Publica Mex* 52, 544-559.
- Ames, B.N., Lee, F.D. and Durston, W.E. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 782-786.
- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31, 347-364.
- Barrera, G. 2012. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* 2012, 137289.
- Benedet J.A., S.T. 2008. Role of transition metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in lipid peroxidation. *Food Chemistry* 107, 165-168.
- Beynek, N., Ulucam, G., Tuylu, B.A., Zeytinoglu, H. and Benkli, K. 2007. Synthesis and characterization of a new macrocyclic ligand and its copper (II), cadmium (II), and lead (II) complexes: genotoxic activity of these complexes in cultured human lymphocytes. *Drug Chem Toxicol* 30, 399-410.
- Boulsourani, Z., Geromichalos, G.D., Repana, K., Yiannaki, E., Psycharis, V., Raptopoulou, C.P., Hadjipavlou-Litina, D., Pontiki, E. and Dendrinou-Samara, C. 2011. Preparation and pharmacochemical evaluation of mixed ligand copper(II) complexes with triethanolamine and thiophenyl-2 saturated carboxylic acids. *J Inorg Biochem* 105, 839-849.
- Cai, J., Liu, M., Wang, Z. and Ju, Y. 2002. Apoptosis induced by dioscin in Hela cells. *Biol Pharm Bull* 25, 193-196.
- Cathcart, M.K., McNally, A.K. and Chisolm, G.M. 1991. Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex. *J Lipid Res* 32, 63-70.
- Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A. and Cory, J.G. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 3, 207-212.
- Chen, D., Frezza, M., Shakyra, R., Cui, Q.C., Milacic, V., Verani, C.N. and Dou, Q.P. 2007. Inhibition of the proteasome activity by gallium(III) complexes contributes to their anti prostate tumor effects. *Cancer Res* 67, 9258-9265.
- Chitambar, C.R. and Purpi, D.P. 2010. A novel gallium compound synergistically enhances bortezomib-induced apoptosis in mantle cell lymphoma cells. *Leuk Res* 34, 950-953.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Kass, G.E., Kelland, L.R., Orr, R.M. and Dobrota, M. 2000. Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 14, 1-5.
- Deegan, C., Coyle, B., McCann, M., Devereux, M. and Egan, D.A. 2006. In vitro anti-tumour effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), [Cu(phendione)₃](ClO₄)₂·4H₂O and [Ag(phendione)₂]ClO₄ using human epithelial cell lines. *Chem Biol Interact* 164, 115-125.
- Deegan, C., McCann, M., Devereux, M., Coyle, B. and Egan, D.A. 2007. In vitro cancer chemotherapeutic activity of 1,10-phenanthroline (phen), [Ag₂(phen)₃(mal)]₂·2H₂O, [Cu(phen)₂(mal)]₂·2H₂O and [Mn(phen)₂(mal)]₂·2H₂O (malH₂=malonic acid) using human cancer cells. *Cancer Lett* 247, 224-233.
- Diaz Barriga, S., Madrigal-Bujaidar, E. and Marquez, P. 1999. Inhibitory effect of nordihydroguaiaretic acid on the frequency of micronuclei induced by methyl methanesulfonate in vivo. *Mutat Res* 441, 53-58.
- Dominguez, M., Nieto, A., Marin, J.C., Keck, A.S., Jeffery, E. and Cespedes, C.L. 2005. Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *J Agric Food Chem* 53, 5889-5895.
- Donnelly, P.S., Caragounis, A., Du, T., Laughton, K.M., Volitakis, I., Cherny, R.A., Sharples, R.A., Hill, A.F., Li, Q.X., Masters, C.L., Barnham, K.J. and White, A.R. 2008. Selective intracellular release of copper and

zinc ions from bis(thiosemicarbazonato) complexes reduces levels of Alzheimer disease amyloid-beta peptide. *J Biol Chem* 283, 4568-4577.

Duff, B., Thangella, V.R., Creaven, B.S., Walsh, M. and Egan, D.A. 2012. Anti-cancer activity and mutagenic potential of novel copper(II) quinolinone Schiff base complexes in hepatocarcinoma cells. *Eur J Pharmacol* 689, 45-55.

Ecobichon, D.J. 1997. *The Basis of Toxicity Testing*, CRC Press.

Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455, 81-95.

Fernandes, A.S., Gaspar, J., Cabral, M.F., Caneiras, C., Guedes, R., Rueff, J., Castro, M., Costa, J. and Oliveira, N.G. 2007. Macrocyclic copper(II) complexes: superoxide scavenging activity, structural studies and cytotoxicity evaluation. *J Inorg Biochem* 101, 849-858.

Filomeni, G., Cerchiaro, G., Da Costa Ferreira, A.M., De Martino, A., Pedersen, J.Z., Rotilio, G. and Ciriolo, M.R. 2007. Pro-apoptotic activity of novel Isatin-Schiff base copper(II) complexes depends on oxidative stress induction and organelle-selective damage. *J Biol Chem* 282, 12010-12021.

Frezza, M., Hindo, S., Chen, D., Davenport, A., Schmitt, S., Tomco, D. and Dou, Q.P. 2010. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 16, 1813-1825.

Gaber, M., El-Sayed, Y.S., El-Baradie, K.Y. and Fahmy, R.M. 2013. Complex formation, thermal behavior and stability competition between Cu(II) ion and Cu(0) nanoparticles with some new azo dyes. Antioxidant and in vitro cytotoxic activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 107C, 359-370.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. and Kroemer, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107-120.

Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramirez, L., Gomez-Ruiz, C., Tinoco-Mendez, M., Marquez-Quinones, A., Lira, L.R., Marin-Hernandez, A., Macias-Rosales, L. and Bravo-Gomez, M.E. 2001. Knight's Move in the Periodic Table, From Copper to Platinum, Novel Antitumor Mixed Chelate Copper Compounds, Casiopeinas, Evaluated by an in Vitro Human and Murine Cancer Cell Line Panel. *Met Based Drugs* 8, 19-28.

Hammud, H.H., Nemer, G., Sawma, W., Touma, J., Barnabe, P., Bou-Mouglabey, Y., Ghannoum, A., El-Hajjar, J. and Usta, J. 2008. Copper-adenine complex, a compound, with multi-biochemical targets and potential anti-cancer effect. *Chem Biol Interact* 173, 84-96.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hancock, C.N., Stockwin, L.H., Han, B., Divilbiss, R.D., Jun, J.H., Malhotra, S.V., Hollingshead, M.G. and Newton, D.L. 2011. A copper chelate of thiosemicarbazone NSC 689534 induces oxidative/ER stress and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 50, 110-121.

Harris, A.N., Hinojosa, B.R., Chavious, M.D. and Petros, R.A. 2011. Beyond platinum: synthesis, characterization, and in vitro toxicity of Cu(II)-releasing polymer nanoparticles for potential use as a drug delivery vector. *Nanoscale Res Lett* 6, 445.

Hong, C.E., Cho, M.C., Jang, H.A. and Lyu, S.Y. 2011. Mutagenicity and anti-mutagenicity of *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*. *J Toxicol Sci* 36, 661-668.

Jia, L., Xu, X.M., Xu, J., Chen, L.H., Jiang, P., Cheng, F.X., Lu, G.N., Wang, Q., Wu, J.C. and Tang, N. 2010. Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding studies of ternary copper(II) complexes with new coumarin derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 58, 1003-1008.

Kerr, J.F., Winterford, C.M. and Harmon, B.V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.

Kovala-Demertzi, D., Hadjipavlou-Litina, D., Staninska, M., Primikiri, A., Kotoglou, C. and Demertzis, M.A. 2009. Anti-oxidant, in vitro, in vivo anti-inflammatory activity and antiproliferative activity of mefenamic

acid and its metal complexes with manganese(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II). *J Enzyme Inhib Med Chem* 24, 742-752.

Kowol, C.R., Heffeter, P., Miklos, W., Gille, L., Trondl, R., Cappellacci, L., Berger, W. and Keppler, B.K. 2012. Mechanisms underlying reductant-induced reactive oxygen species formation by anticancer copper(II) compounds. *J Biol Inorg Chem* 17, 409-423.

Krishnamoorthy, P., Sathyadevi, P., Butorac, R.R., Cowley, A.H., Bhuvanesh, N.S. and Dharmaraj, N. 2012. Copper(I) and nickel(II) complexes with 1:1 vs. 1:2 coordination of ferrocenyl hydrazone ligands: do the geometry and composition of complexes affect DNA binding/cleavage, protein binding, antioxidant and cytotoxic activities? *Dalton Trans* 41, 4423-4436.

Krishnamoorthy, P., Sathyadevi, P., Cowley, A.H., Butorac, R.R. and Dharmaraj, N. 2011. Evaluation of DNA binding, DNA cleavage, protein binding and in vitro cytotoxic activities of bivalent transition metal hydrazone complexes. *Eur J Med Chem* 46, 3376-3387.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. and Melino, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11.

Laine, A.L. and Passirani, C. 2012. Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery. *Curr Opin Pharmacol* 12, 420-426.

LakshmiPraba, J., Arunachalam, S., Gandhi, D.A. and Thirunalasundari, T. 2011. Synthesis, nucleic acid binding and cytotoxicity of polyethyleneimine-copper(II) complexes containing 1,10-phenanthroline and L-valine. *Eur J Med Chem* 46, 3013-3021.

Liu, C., Zhou, J., Li, Q., Wang, L., Liao, Z. and Xu, H. 1999. DNA damage by copper(II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities. *J Inorg Biochem* 75, 233-240.

Lowndes, S.A., Adams, A., Timms, A., Fisher, N., Smythe, J., Watt, S.M., Joel, S., Donate, F., Hayward, C., Reich, S., Middleton, M., Mazar, A. and Harris, A.L. 2008. Phase I study of copper-binding agent ATN-224 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 14, 7526-7534.

Lowndes, S.A. and Harris, A.L. 2004. Copper chelation as an antiangiogenic therapy. *Oncol Res* 14, 529-539.

Ma, Z.Y., Qiao, X., Xie, C.Z., Shao, J., Xu, J.Y., Qiang, Z.Y. and Lou, J.S. 2012. Activities of a novel Schiff Base copper(II) complex on growth inhibition and apoptosis induction toward MCF-7 human breast cancer cells via mitochondrial pathway. *J Inorg Biochem* 117, 1-9.

Maron, D.M. and Ames, B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113, 173-215.

Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F. and Santini, C. 2009. Copper complexes as anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem* 9, 185-211.

Milacic, V., Chen, D., Ronconi, L., Landis-Piwowar, K.R., Fregona, D. and Dou, Q.P. 2006. A novel anticancer gold(III) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20S proteasome and 26S proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts. *Cancer Res* 66, 10478-10486.

Mizutani, H. 2007. [Mechanism of DNA damage and apoptosis induced by anticancer drugs through generation of reactive oxygen species]. *Yakugaku Zasshi* 127, 1837-1842.

Montes-Sanchez, D., Ventura, J.L., Mitre, I., Frias, S., Michan, L., Espejel-Nunez, A., Vadillo-Ortega, F. and Zentella, A. 2009. Glycosylated VCAM-1 isoforms revealed in 2D western blots of HUVECs treated with tumoral soluble factors of breast cancer cells. *BMC Chem Biol* 9, 7.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

Murugkar, A., Unnikrishnan, B., Padhye, S., Bhonde, R., Teat, S., Triantafillou, E. and Sinn, E. 1999. Hormone anchored metal complexes. 1. Synthesis, structure, spectroscopy and in vitro antitumor activity of testosterone acetate thiosemicarbazone and its metal complexes. *Met Based Drugs* 6, 177-182.

Ocker, M. and Hopfner, M. 2012. Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy. *Eur Surg Res* 48, 111-120.

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B. and Bao, J.K. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 45, 487-498.

Palanimuthu, D., Shinde, S.V., Somasundaram, K. and Samuelson, A.G. 2013. In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Copper Bis(thiosemicarbazone) Complexes. *J Med Chem* 56, 722-734.

Raman, N., Jeyamurugan, R., Senthilkumar, R., Rajkapoor, B. and Franzblau, S.G. 2010. In vivo and in vitro evaluation of highly specific thiolate carrier group copper(II) and zinc(II) complexes on Ehrlich ascites carcinoma tumor model. *Eur J Med Chem* 45, 5438-5451.

Ruiz-Azuara, L. and Bravo-Gomez, M.E. 2010. Copper compounds in cancer chemotherapy. *Curr Med Chem* 17, 3606-3615.

Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat Res* 31, 9-15.

Serment-Guerrero, J., Cano-Sanchez, P., Reyes-Perez, E., Velazquez-Garcia, F., Bravo-Gomez, M.E. and Ruiz-Azuara, L. 2011. Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas. *Toxicol In Vitro* 25, 1376-1384.

Suman, S., Pandey, A. and Chandna, S. 2012. An improved non-enzymatic "DNA ladder assay" for more sensitive and early detection of apoptosis. *Cytotechnology* 64, 9-14.

Szyba, K., Golonka, M.C., Gasiorowski, K. and Urban, J. 1992. Mutagenic activity of copper(II) chromate and dichromate complexes with polypyridines. *Biometals* 5, 157-161.

Tardito, S., Isella, C., Medico, E., Marchio, L., Bevilacqua, E., Hatzoglou, M., Bussolati, O. and Franchi-Gazzola, R. 2009. The thioxotriazole copper(II) complex A0 induces endoplasmic reticulum stress and paraptotic death in human cancer cells. *J Biol Chem* 284, 24306-24319.

Trejo-Solis, C., Jimenez-Farfan, D., Rodriguez-Enriquez, S., Fernandez-Valverde, F., Cruz-Salgado, A., Ruiz-Azuara, L. and Sotelo, J. 2012. Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and JNK activation. *BMC Cancer* 12, 156.

van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. and Reutelingsperger, C.P. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9.

Velazquez, A.M., Martinez, L., Abrego, V., Balboa, M.A., Torres, L.A., Camacho, B., Diaz-Barriga, S., Romero, A., Lopez-Castanares, R. and Angeles, E. 2008. Synthesis and antihypertensive effects of new methylthiomorpholinphenol derivatives. *Eur J Med Chem* 43, 486-500.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39-51.

Waffo Teguo, P., Fauconneau, B., Deffieux, G., Huguet, F., Vercauteren, J. and Merillon, J.M. 1998. Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from vitis vinifera cell cultures. *J Nat Prod* 61, 655-657.

Wang, T. and Guo, Z. 2006. Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design. *Curr Med Chem* 13, 525-537.

Zou, D.M., Brewer, M., Garcia, F., Feugang, J.M., Wang, J., Zang, R., Liu, H. and Zou, C. 2005. Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutr J* 4, 25.

Zong, W.X. and Thompson, C.B. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Gene Dev* 20, 1-15.

Figure captions

Fig 1. Proposed structure for the novel copper(II) complex LQM402.

Fig 2. LQM402 inhibits the viability of cervical cancer cell lines. The cervical cancer (CeCa) cell lines HeLa, SiHa, Ca Ski, and C-33 A were treated with different concentrations of LQM402 for 24 h and analyzed by MTT assay. CeCa cell viability decreased in a concentration-dependent manner while normal fibroblasts (FB) were less affected. The graph shows the means and standard errors of at least three independent experiments, performed in triplicate. * ($p < 0.05$) and *** ($p < 0.001$) represents significant differences compared with control (vehicle-treated cells).

Fig 3. LQM402 promotes apoptosis. HeLa cells treated with 0.1% DMSO for 24 h or 74.74 μ M LQM402 for 6, 12, and 24 h were analyzed by flow cytometry to detect annexin V-FITC staining. The percentage of apoptotic cells increased in a time-dependent manner in LQM402-treated cells HeLa cells when compared to DMSO-treated cells. Graphs are representative of three independent experiments, each with 10,000 analyzed events.

Fig 4. LQM402 induces DNA fragmentation in a time-dependent manner. HeLa cells were treated with 74.74 μ M LQM402 for A) 24, B) 48, and C) 72 h and DNA strand breaks were labeled with fluorescein by TUNEL assay showing a time-dependent increase of cells in apoptosis. D) 1% DMSO and F) 20 μ M cisplatin for 48 h were used as negative and positive controls, respectively.

Fig 5. LQM402 treatment in HeLa cells induces DNA degradation. HeLa cells were treated with 74.74 μ M LQM402 at different time points and DNA was obtained with DMSO-SDS-TE method. All of the LQM402 treatments generated DNA fragments of approximately 600 bp as 20 μ M cisplatin did at 24 h. Only cisplatin treatment generated several size DNA fragments.

Fig 6. LQM402 induces changes in the expression of apoptosis-associated proteins. HeLa cells were treated with 74.74 μ M LQM402 at different time points and the lysates were analyzed by immunoblotting. Expression of pro-caspases 3 and 7 was diminished in a time-dependent

manner. Cytosolic cytochrome c levels increased in an incubation time-dependent manner. Representative blots from repeated experiments are shown.

Fig 7. LQM402 does not induce micronuclei formation. Three concentrations of LQM402 were administered intraperitoneally in single doses to CD1 mice. The numbers of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in 1000 counted polychromatic erythrocytes were analyzed at 0, 24, 48, and 72 h in Giemsa-stained tail blood smears. The same concentrations of LQM402 were also administered 30 min after the administration of 60 mg/kg Mit C. The genotoxic effect of Mit C was observed only when it was administered alone. The graph shows the means and standard errors of 5 mice per experimental group. Significant differences from the control are indicated by ** ($p < 0.01$) and * ($p < 0.05$). Pictures shows examples for the structures identified.

Fig 8. LQM402 is an inductor of lipid peroxidation. Rat brain homogenate (2 mg/ml protein) was incubated with LQM402 at several concentrations (1 – 100 μ M) at 37°C for 3 h. TBARS production was measured at 540 nm. Significant TBARS production, indicated by * ($p < 0.01$), was only observed at concentrations from 5.62 μ M to 17.78 μ M. At 10 μ M, LQM402 is a more potent inducer than AAPH (20 mM) and is similar to FeSO₄ (10 μ M). The graph shows the means and standard errors of three independent experiments.

Fig 9. LQM402 enhances and inhibits FeSO₄-induced TBARS production. Lipid peroxidation was induced in rat brain homogenate by 10 μ M FeSO₄ alone or simultaneously adding LQM402 at different concentrations (5.62 – 56.23 μ M). TBARS production was measured at 540 nm. TBARS induced by FeSO₄ was enhanced with 5.62-13.34 μ M LQM402 and was inhibited in a concentration-dependent manner at concentrations of 23.71 μ M and higher. The graph shows the mean and standard errors of three independent experiments. ## ($p < 0.01$) indicates significant difference of LQM402-treated groups compared to the basal level and ** ($p < 0.01$) represents significant differences compared with FeSO₄.

Table 1. Inhibitory concentration (IC₅₀) values obtained in cervical cancer cell lines for LQM402

Cell line	IC ₅₀ (μM) ± S.E.
HeLa	74.74 ± 3.34
Ca Ski	88.53 ± 2.64
SiHa	182.05 ± 16.65
C-33 A	192.55 ± 12.10
Fibroblast	199.47 ± 14.32

Each data is given as the mean and standard error (S.E.) of at least three independent experiments in triplicate. Cisplatin IC₅₀: HeLa 18.9 ± 0.99 μM, Ca Ski 66.6 ± 8.5 μM, SiHa 69.92 ± 1.25 μM, C-33 A 64.98 ± 6.88 μM, FB 185.23 ± 28.6 μM.

Table 2. Inhibitory concentration (IC₅₀) values obtained in HeLa for LQM402 and cisplatin at 48 and 72 h.

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	48 h	72 h
LQM402	53.90	39.61
Cisplatin	17.28	15.83

Each data is given as the mean of three independent experiments in triplicate.

Table 3. Mutagenic potency of LQM402 on *S. typhimurium* in the Ames test (plate incorporation assay) expressed as the number of His⁺ revertants ± standard error (S.E.)

Metabolic activation system	Test substance	Conc. $\mu\text{M}/\text{plate}$	His ⁺ revertants (Mean \pm S.E.)		
			TA98	TA100	TA102
Type culture strain			TA98	TA100	TA102
S9 (-)	DMSO	10 $\mu\text{l}/\text{plate}$	20.33 \pm 1.0	144.3 \pm 7.2	208.7 \pm 37
		200	29.16 \pm 2.0	136.1 \pm 9.6	302.1 \pm 73
	LQM402	100	25.00 \pm 3.3	152.5 \pm 9.4	299.3 \pm 68
		50	19.33 \pm 1.8	143.5 \pm 7.1	297.4 \pm 72
	PA	1.89 $\times 10^{-3}$	77.3 \pm 18.1	-	-
	NMNG	6.79 $\times 10^{-6}$	-	8033 \pm 535	-
	Mit C	2.99 $\times 10^{-8}$	-	-	1891 \pm 154
S9 (+)	DMSO	10 $\mu\text{l}/\text{plate}$	30.1 \pm 2.77	142.1 \pm 11	245.1 \pm 24
		200	27.6 \pm 2.21	158.6 \pm 7.0	307.2 \pm 64
	LQM402	100	32.3 \pm 5.04	129.0 \pm 9.1	306.0 \pm 67
		50	29.3 \pm 2.75	145.0 \pm 13	326.4 \pm 72
	2AA	5.17 $\times 10^{-6}$	2919 \pm 425	-	1253 \pm 44
	CP	0.0179	-	507 \pm 22.8	-

The results correspond to the mean of three independent experiments performed in triplicate and its standard deviation (S.D.). Arochlor 1254-induced rat liver homogenate (S9) was used as the metabolic activation system. PA: Picrolonic acid, NMNG: N-methyl-N⁷-nitro-N-nitrosoguanidine, Mit C: Mitomycin C, 2AA: 2-Aminoanthracene, and CP: Cyclophosphamide were used as positive for mutagenic drugs.

Table 4. Ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) with respect to 2000 normochromatic erythrocytes (NCE) induced by LQM402 in mice

TREATMENT	RATIO OF PCE/NCE			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Control ^a	0.06	0.05	0.05	0.05
Mit C 60 mg/kg	0.07	0.11*	0.12*	0.09
LQM402 5 mg/kg	0.07	0.06	0.06	0.06
LQM402 10 mg/kg	0.06	0.06	0.04	0.03
LQM402 15 mg/kg	0.06	0.07	0.04	0.06
Mit C + LQM402 5 mg/kg	0.06	0.06	0.07	0.08
Mit C + LQM402 10 mg/kg	0.06	0.06	0.04	0.05
Mit C + LQM402 15 mg/kg	0.06	0.06	0.04	0.05

^aDistilled water.

* Statistically significant difference with respect to control, $p < 0.05$

FIGURES

Figure 1.

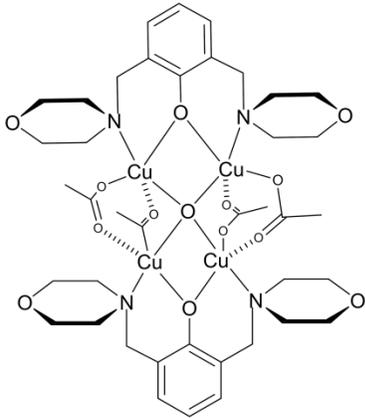


Figure 2.

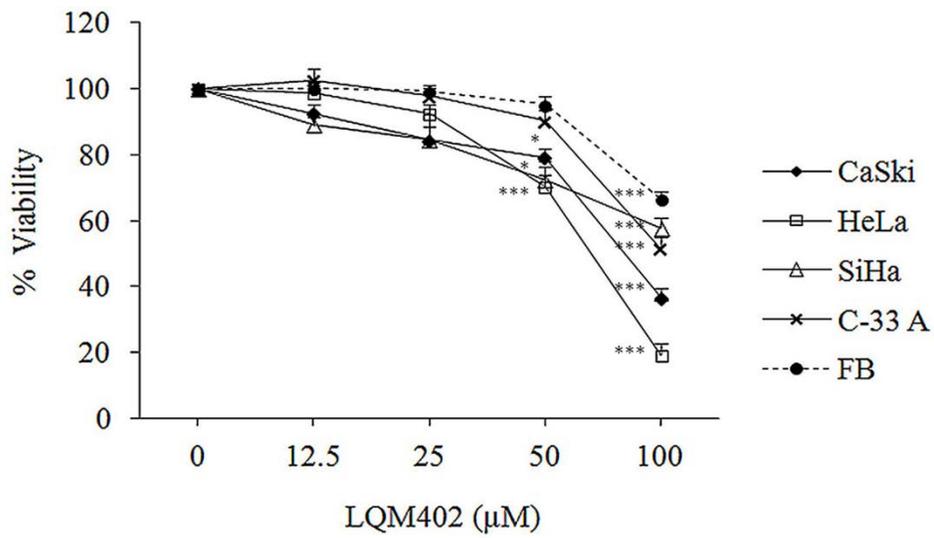


Figure 3.

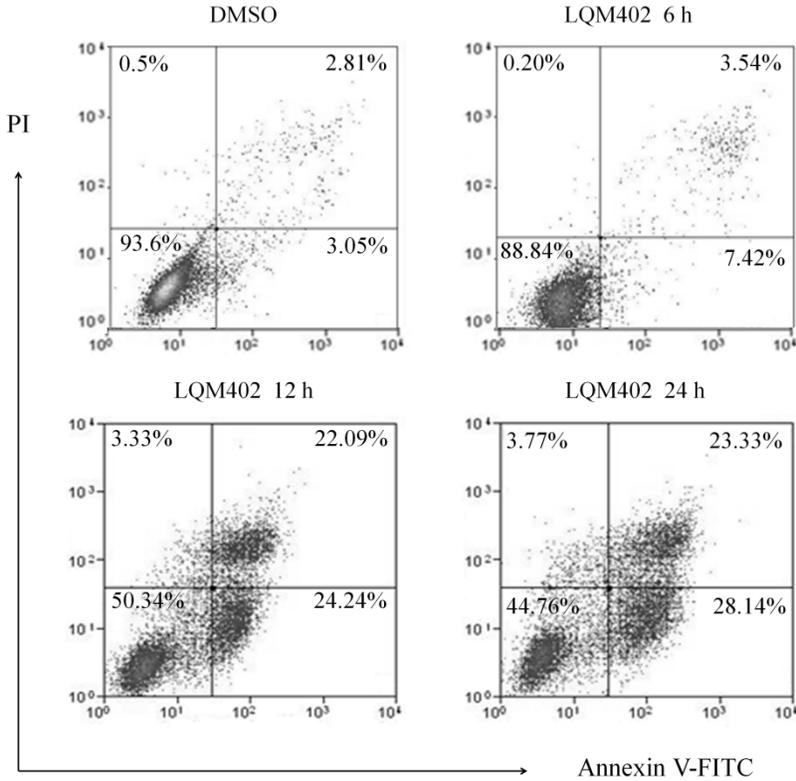


Figure 4.

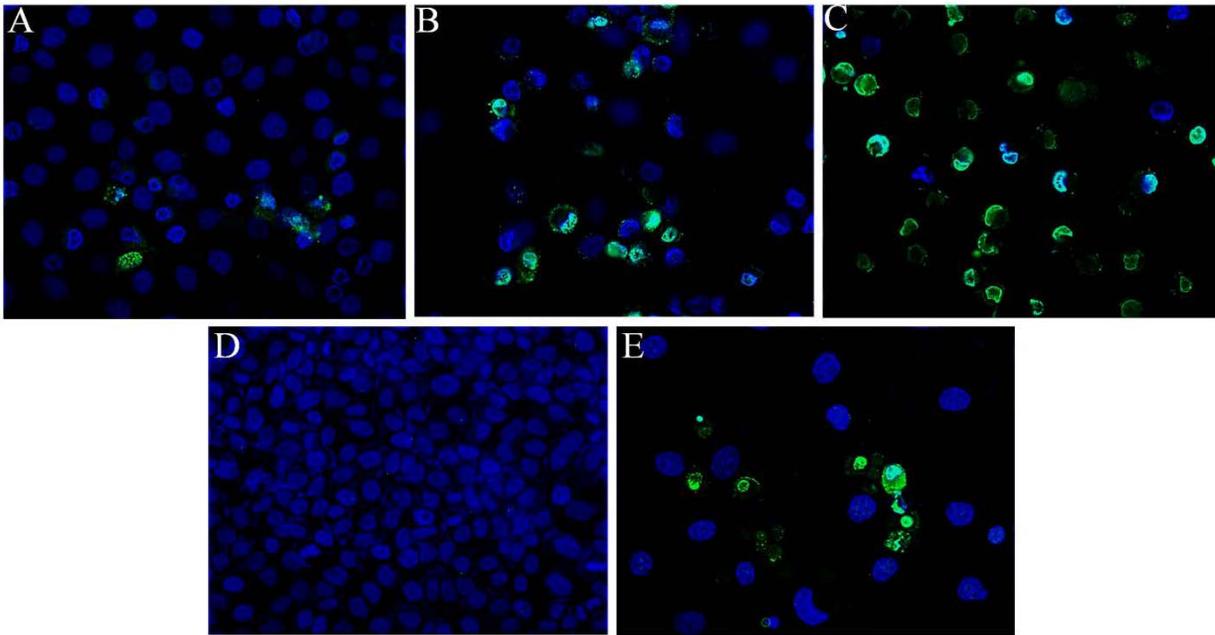


Figure 5.

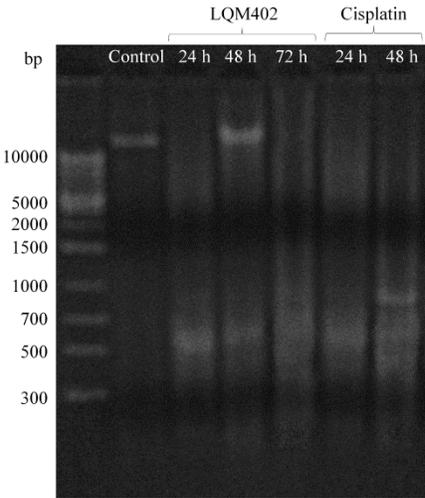


Figure 6.

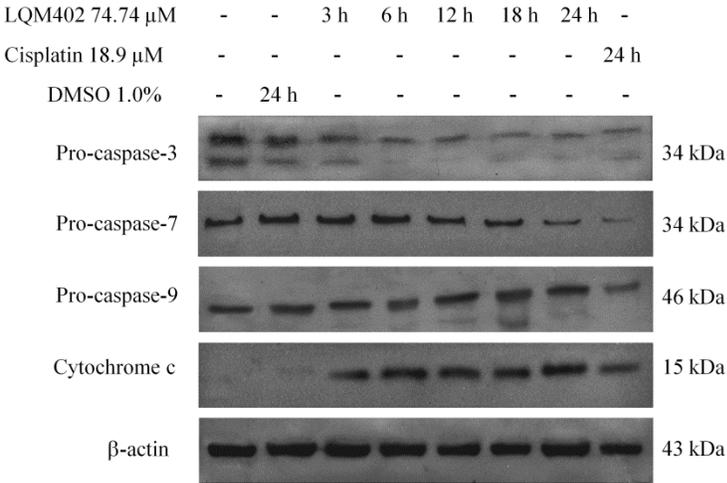


Figure 7.

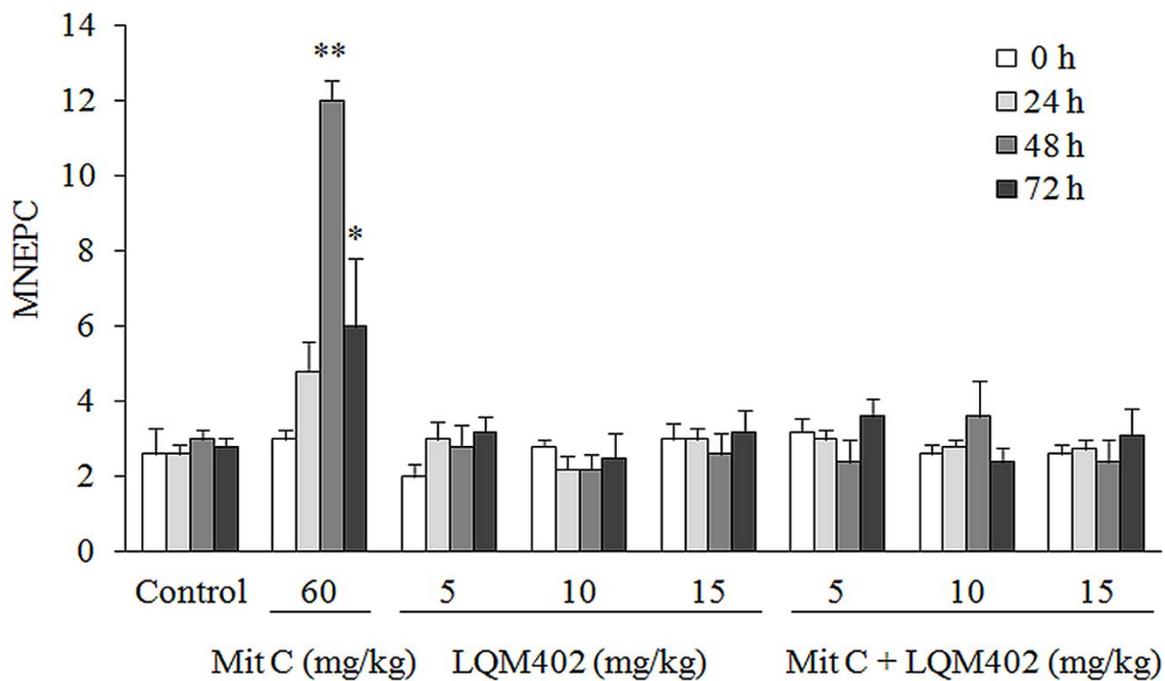


Figure 8.

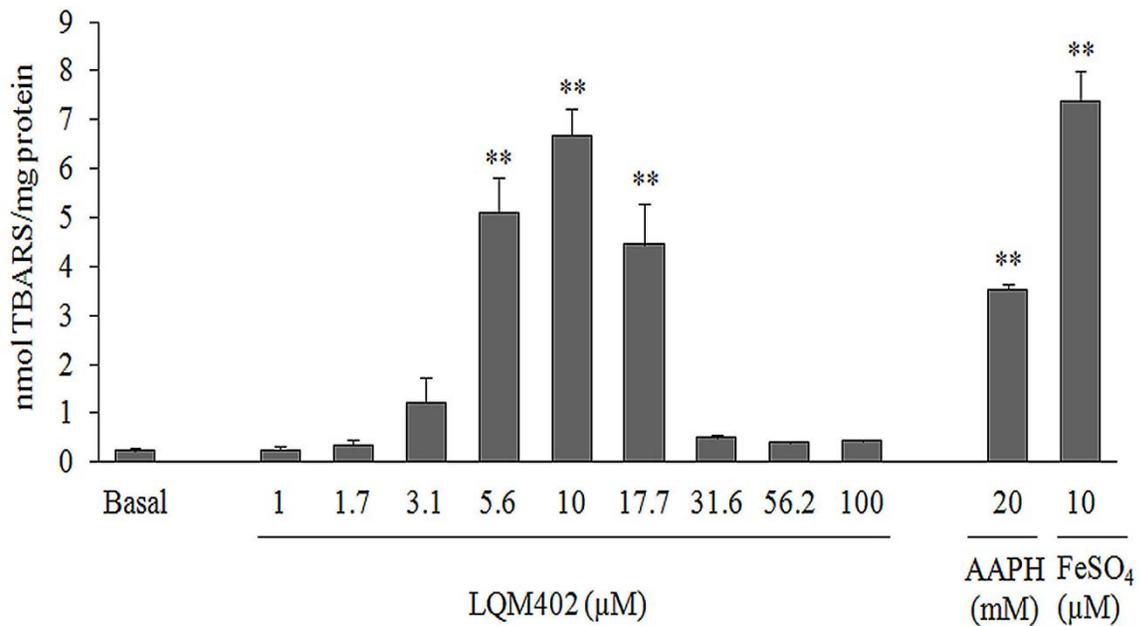


Figure 9.

