



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

***Carrera de Biología***

**“Evaluación del efecto cardiotoxico de las Casiopeinas Cas III-Ea, Cas III-ia, Cas II-gly por el aumento de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de cardiomiocitos aislados de rata”.**

**TESIS**

**Que para obtener el título de**

**Bióloga**

**Presenta:**

**Vilchis Hernández Haide Anais**

**Directora de tesis: Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera.**  
Instituto Nacional de Pediatría

**Asesor interno: Dra. Álvarez Barrera Lucila**



**Ciudad de México, noviembre 2020.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



*Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera y la asesoría de la Dra. Álvarez Barrera Lucila, en el Instituto Nacional de Pediatría, Torre de investigación, 2do piso, Laboratorio de nutrición experimental, Insurgente Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Del. Coyoacán, C.P. 04530 México, CDMX.*

*Responsable del laboratorio Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera.*

*Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo de: INP 048/ 2019.*



## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.



### Carrera de Biología.

El título de la tesis que se presenta es: **“Evaluación del efecto cardiotoxico de las Casiopeinas Cas III-Ea, Cas III-ia, Cas II-gly por el aumento de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de cardiomiocitos aislados de rata”.**

#### Jurado asignado:

**Presidente** Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

**Vocal** Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera

**Secretario** Dra. Lucila Álvarez Barrera

Alvarez Barrera Lucila.

**Suplente** Dr. Luis Sánchez Sánchez

**Suplente** Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Juan José Rodríguez Mercado.



*La vida te golpeará mil veces, te enseñará que habrá personas con mil rostros, personas que llegarán para quedarse y otros que se marcharán sin aviso, aunque no lo quieras, la vida también te enseñará que algunos cambios eran necesarios y el tiempo te mostrará que tomaste la decisión correcta, pero lo más importante que puedes hacer en la vida es quererte, quererte mucho... porque te vas a necesitar.*

*-Sam Chevalier*

*Algún día estarás justo donde quieres estar, tarde o temprano vas a estar orgulloso de ti, te lo aseguro.*

## *Agradecimientos.*

En especial **a mis padres** por el gran amor que nos tienen, por todo su sacrificio, sus esfuerzos me han dado las oportunidades suficientes para corregir y dirigir mi vida, su dedicación y disciplina me han dado la fortaleza necesaria para jamás rendirme, para luchar por lo que quiero por más obstáculos que se me presenten en la vida, me ayudan a superarme y a exigirme más día con día, han superado tanto que son mi más grande orgullo y ejemplo, espero que me alcance la vida para compensarles todo lo que han pasado, jamás olviden que los amo y que son lo más importante en mi vida.

**A mi hermana (Jocelyn)** por todo su amor y cariño, por ser mi cómplice, sin saberlo me impulsas a ser mejor, te amo, eres el más grande regalo que me pudo haber dado la vida.

Y muy especialmente a la **Dra. Karla** y a la **Dra. Lucy** por haber creído en mí, cuando ni yo lo hacía, vieron un potencial en mí que desconocía y mejoré gracias a sus enseñanzas, no pensé crecer tanto y obtener tanta confianza y todo se los debo a ustedes. Gracias.

Al **Dr. Juan** por siempre ser un ejemplo, por su confianza, conocimiento, apoyo y cariño, en verdad el laboratorio no sería el mismo sin usted. Gracias.

A mis más grandes maestros de vida, me han enseñado tanto, no tengo palabras que los describan, no hubiese llegado tan lejos sin ustedes, son mi ejemplo, marcaron mi rumbo. Gracias: **Profesor Marco, Profesor Cano, Profesora Elizabeth Estañón.**

A mis más grandes amigos, que me han hecho tan feliz y han apoyado tanto: **Ana, Imelda, Isabel, Vanessa, Memo, Jonathan, Loreley, Luz, Itzel, Edwin, Joana, Iveth.** No tienen idea de cuanto agradezco el haberlos conocido, marcaron gran parte de mi vida.

A los que ya no están, que dieron y aportaron tanto en mi vida, sin ellos no sería quien soy: Francisco (**Paquito**), Alejandra (**Pinkyky**), **mamá de Ana.** Siempre los recordare.

## Índice

1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	8
2.1. Cáncer.....	8
2.2. Problemática del cáncer.....	8
2.3. Tratamientos actuales contra el cáncer.....	10
2.3.1. Radioterapia.....	11
2.3.2. Quimioterapia.....	11
2.4. Corazón.....	17
2.5. Mitocondria.....	19
2.6. Casiopeinas como nueva estrategia terapéutica.....	21
2.6.1. Cardiotoxicidad por Casiopeinas.....	25
2.7. Cardiomiocitos como modelo de estudio.....	26
3. Justificación.....	27
4. Hipótesis del trabajo.....	28
5. Objetivos.....	28
5.1. General.....	28
5.2. Particulares.....	28
6. Material y método.....	29
6.1. Animales.....	29
6.2. Preparación de soluciones para el aislamiento de cardiomiocitos.....	29
6.3. Aislamiento de los cardiomiocitos ventriculares de corazones de rata.....	30
6.4. Determinación del rendimiento celular y viabilidad celular de acuerdo a su morfología..	31
6.5. Incubación con la sonda MitoSOX Red y exposición a los tratamientos para evaluar la producción de ERO mitocondrial en cardiomiocitos aislados.....	32
6.6. Evaluación de la formación de ERO mitocondrial <i>in situ</i> .....	34
6.7. Cambios en la viabilidad con respecto al tiempo.....	34
6.8. Análisis estadístico.....	34
7. Resultados.....	36
7.1. Producción de ERO mitocondrial con y sin la sonda MitoSOX Red.....	36
7.2. Producción de ERO mitocondrial en cardiomiocitos aislados por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones.....	38

7.3. Formación de ERO mitocondrial <i>in situ</i> por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones.....	42
7.4. Efecto en la viabilidad por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones en cardiomiocitos aislados de rata. ....	46
8. Discusión.....	53
8.1. Producción de ERO mitocondrial con y sin la sonda MitoSOX Red. ....	53
8.2. Producción de ERO mitocondrial en cardiomiocitos aislados por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones.....	54
8.3. Formación de ERO mitocondrial ( <i>in situ</i> ) por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones mediante microscopia de fluorescencia. ....	55
8.4. Efecto en la viabilidad por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones en cardiomiocitos aislados de rata. ....	56
9. Conclusiones y comentarios.....	58
10. Referencias. ....	59



## 1. Resumen.

Dos de las principales causas de muerte a nivel mundial son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (OMS, 2018). Estas pueden estar relacionadas teniendo en cuenta que los sobrevivientes de cáncer tienen un mayor riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca debido al tipo de quimioterapia utilizada (Yeh et al., 2004).

En la actualidad la cardiotoxicidad por quimioterapia se considera la principal debilidad de este tratamiento, ya que afecta fuertemente la calidad de vida y supervivencia de los pacientes con cáncer, independientemente del pronóstico oncológico. Es por esto que el desarrollo farmacológico ha tomado un auge en pro de mejorar las tasas de sobrevida y remisión.

De ahí que los fármacos a base de cobre “Casiopeinas” (Cas) podrían ser una alternativa menos tóxica y con mayor eficacia terapéutica. Sin embargo, estudios anteriores han reportado que la administración de las Cas, alteran las funciones mitocondriales y ocasionan cardiotoxicidad dependiente de la dosis por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto que tienen las Cas III-Ea, III-ia y II-gly sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en mitocondrias de cardiomiocitos aislados de rata y su impacto sobre la viabilidad celular.

Para este estudio se aislaron cardiomiocitos ventriculares de corazones de rata y se incubaron con la sonda MitoSOX Red, posteriormente las células se expusieron a concentraciones 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, por cada Cas (Cas III-Ea, Cas III-ia, Cas II-gly). Después de los tratamientos se realizó una cinética de producción de fluorescencia para evaluar la velocidad de producción de ERO mitocondrial, y un análisis por microscopia de fluorescencia para evaluar la formación de ERO mitocondrial *in situ* (producción total de ERO mitocondriales). También se evaluó la viabilidad de los cardiomiocitos a diferentes intervalos de tiempo.

Los resultados obtenidos mostraron que Cas III-Ea es la más cardiotóxica, ya que todas sus concentraciones disminuyen el porcentaje de viabilidad final e incrementan significativamente la producción total de ERO mitocondriales. Cas III-ia también mostró un aumento significativo en la producción total de ERO mitocondriales en todas las concentraciones, no obstante, solo se ven cambios significativos en el porcentaje de viabilidad final con las concentraciones 10  $\mu$ M y 30  $\mu$ M. Cas II-gly mostró un aumento significativo en la producción total de ERO mitocondriales a concentraciones 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M, aunque no mostró cambios significativos en el porcentaje de viabilidad final. Y al comparar sus efectos con el fármaco de referencia (DOX) se observa que las Cas tienen menos efectos sobre el porcentaje de viabilidad final y la producción total de ERO mitocondriales.

## 2. Introducción.

### 2.1. Cáncer.

El cáncer se caracteriza por el crecimiento anormal de las células de nuestro organismo. Es una enfermedad en la que se producen alteraciones en el ADN que ocasionan daños en los genes que controlan la proliferación y la apoptosis celular, provocando que la célula pierda la capacidad de autorregular su división. Estas alteraciones en el ADN son mutaciones en los nucleótidos de los ácidos nucleicos producidos por errores de las propias enzimas del organismo al copiar el ADN durante la división celular, al reparar daños o por exposición a agentes carcinógenos. Las mutaciones del ADN deben perpetuarse en la célula una vez producidas e ir acumulándose en posteriores divisiones para que aparezca el fenotipo canceroso en la célula. Los cambios genéticos que contribuyen a que aparezca la enfermedad afectan a tres tipos de genes: los proto-oncogenes que influyen en el crecimiento y división celular, los genes supresores de tumores y los genes reparadores del ADN (Barrett y Anderson, 1993; Minamoto *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2007; El-Azem de Haro, 2013; Quiralte, 2019).

Los factores responsables del desarrollo del cáncer se clasifican como exógenos y endógenos (Oliveira *et al.*, 2007). El primer grupo incluye hábitos nutricionales (conservación y preparación de alimentos), estilo de vida, agentes físicos (radiación ionizante y no ionizante), compuestos químicos (naturales y sintéticos; como colorantes azoicos, las aflatoxinas, asbestos, el benceno, el radón, etc.) y agentes biológicos (*Helicobacter pylori*, virus linfotrópico de células T Humanas I y II, virus del papiloma humano, virus de la hepatitis B y C, virus Epstein-Barr, poliomavirus de células de Merkel, parásitos como *Schistosoma haematobium*, *Clonorchis sinensis* y *Opisthorchis vivarium*, factores de crecimiento, etc.) (Pitot y Dragan, 1991; Barrett y Anderson, 1993; Farmer, 1994; Oliveira *et al.*, 2007; Katzung 2019).

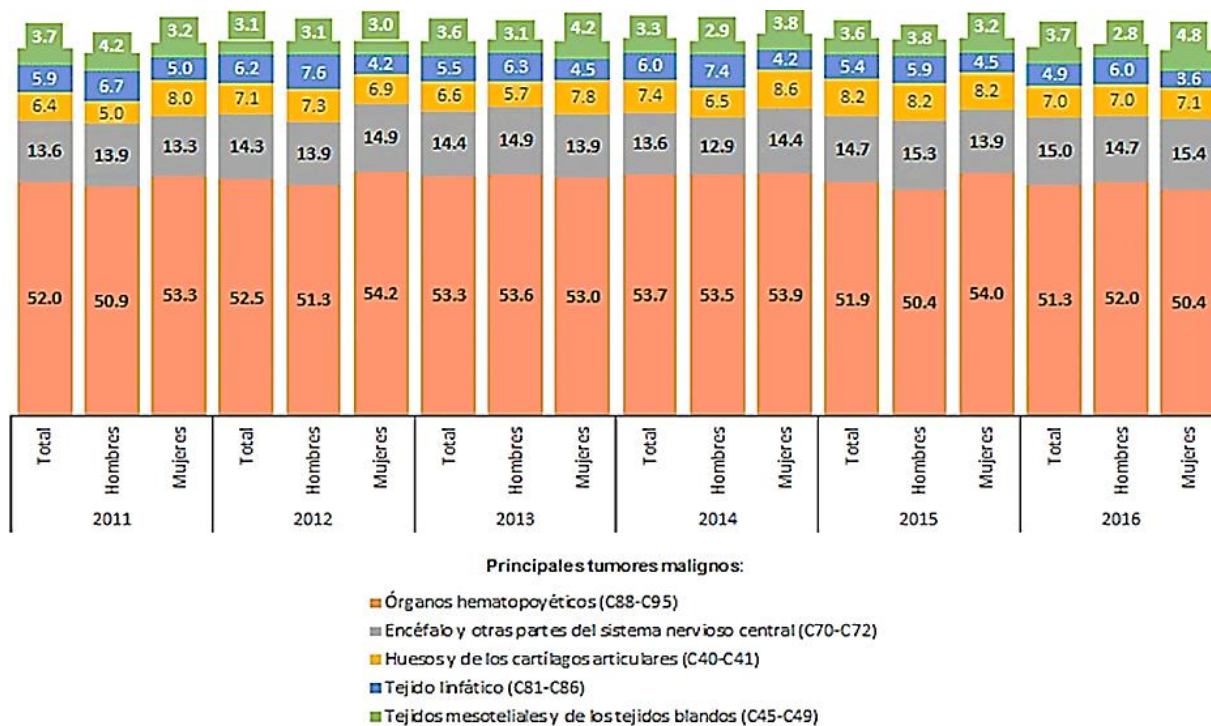
Hábitos de vida poco saludables como: consumo excesivo de alcohol, inhalación de tabaco y productos relacionados, la ingestión de ciertos alimentos y su contaminación por micotoxinas, son responsables de una mayor incidencia de ciertos tipos de neoplasias en varios grupos de población (Gomes-Carneiro *et al.*, 1997; Alberts *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2007). Los factores endógenos incluyen el daño al sistema inmune, inflamación crónica, predisposición genética, edad, balance endocrino y afección fisiológica (Weisburger, 1999; Minamoto *et al.*, 2000; Ohshima *et al.*, 2003, 2005; Oliveira *et al.*, 2007).

### 2.2. Problemática del cáncer.

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial; en 2015 se calcula que provocó 8.8 millones de defunciones, y se identifican cinco tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos: cáncer pulmonar (1,69 millones de muertes), cáncer hepático (788 000 defunciones), cáncer colorrectal (774 000 muertes), cáncer gástrico (754 000 defunciones) y de mama (571 000 muertes) (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018).

En México el cáncer es la tercera causa de muerte, fallecen por esta enfermedad 14 de cada 100 mexicanos y la expectativa de vida de quienes la padecen es de alrededor de 63 años (Secretaría de Salud, 2017).

Con información proveniente de estadísticas vitales, hay evidencia que en México durante el periodo de 2011 a 2016, aproximadamente 50% de las muertes observadas por tumores malignos en la población de 0 a 17 años se deben a cáncer de órganos hematopoyéticos (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2018).



**Figura 1.** Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 0 a 17 años según sexo. Serie anual de 2011 a 2016. Tomada de INEGI, 2018.

El cáncer de encéfalo y otras partes del sistema nervioso central ocupa el segundo lugar entre las cinco principales causas de mortalidad por neoplasias malignas en la población de 0 a 17 años. El tercer lugar lo ocupan los tumores malignos de huesos y cartílagos articulares, seguidos de los del tejido linfático, mientras que los tumores malignos de tejidos mesoteliales y de los tejidos blandos, están en el quinto lugar entre las principales causas de mortalidad por tumores malignos en la población de 0 a 17 años. De manera general, dos de cada 100 000 personas de 0 a 17 años fallecen por un tumor en órganos hematopoyéticos (INEGI, 2018).

Si bien el cáncer no es muy común en adultos jóvenes, existen varios tipos que pueden desarrollarse en ese periodo de la vida y su tratamiento representa un reto. A diferencia de los cánceres en la infancia y adolescencia, que están mayormente influenciados por cambios celulares en el ADN que ocurren durante el desarrollo embrionario o los primeros años de vida, o de los cánceres que aparecen en adultos mayores que están fuertemente

influenciados por los estilos de vida, los cánceres que se presentan en adultos jóvenes son una mezcla, de forma tal que en los jóvenes menores de 25 años son más comunes las leucemias (uno de los tipos de cáncer de órganos hematopoyéticos) y los linfomas (una de las formas del cáncer de tejido linfático y afines), mientras que entre los de 26 a 29 años se observan cánceres cervicales, de mama y colon, cuya tendencia se incrementa con la edad (American Cancer Society, 2018).

### 2.3. Tratamientos actuales contra el cáncer.

La meta final de todo régimen anticancerígeno es eliminar todas las células neoplásicas y producir la curación; algo que no se logra en muchos casos, una de las razones radica en que algunos agentes matan a células en general y no solo a células cancerosas.

En los últimos 50 años, la quimioterapia y la radioterapia se han convertido en dos de los pilares del tratamiento de varios tipos de cáncer. Su uso ha permitido un aumento en la supervivencia de los pacientes con cáncer; no obstante, la frecuencia de su uso para lograr remisión, las dosis y su mecanismo de acción pueden generar efectos secundarios en los pacientes. Uno de los efectos secundarios más preocupantes generados por la quimioterapia y la radioterapia es la cardiotoxicidad (Velásquez *et al.*, 2016).

La cardiotoxicidad es un término general usado para describir una toxicidad que afecta al corazón de forma directa o indirecta; de forma directa mediante un daño a la estructura del corazón e indirecta a través de los estados trombogénicos y las alteraciones hemodinámicas del flujo sanguíneo (Florescu *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista clínico la cardiotoxicidad se puede presentar de forma temprana durante el tratamiento, o hasta 40 años después de finalizada la terapia (Jiji *et al.*, 2012). Entendiendo la variable tiempo, el daño miocárdico se clasifica en:

1. Agudo (se desarrolla desde el inicio del tratamiento hasta dos semanas después de terminado) o subagudo (se presentan hasta ocho meses posteriores al inicio de la terapia): se caracterizan por la presencia de alteraciones de la repolarización ventricular o en el intervalo QT (es la medida del tiempo entre el comienzo de la onda Q y el final de la onda T en el electrocardiograma), arritmias supraventriculares, arritmias ventriculares, eventos coronarios agudos, pericarditis, miocarditis, isquemia vaso espástica, enfermedades tromboembólicas (Parma *et al.*, 2013; Jiménez-Cotes *et al.*, 2015; Velásquez *et al.*, 2016).

2. Crónico (la toxicidad aparece posterior a un año de completar la terapia, a su vez la cardiotoxicidad crónica se divide en dos estados; durante el primer año se denomina temprana y las que ocurren años después a la finalización de la terapia se denominan tardías): se caracteriza por manifestar hipertensión arterial, síndrome coronario agudo, cardiomiopatías, insuficiencia cardiaca sistólica o diastólica, falla cardiaca (Parma *et al.*, 2013; Jiménez-Cotes *et al.*, 2015; Velásquez *et al.*, 2016).

### 2.3.1. Radioterapia.

La radioterapia es un tratamiento del cáncer que usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores. Se recomienda básicamente para ciertos tipos de cáncer de presentación localizada. Consiste en la utilización de radiaciones ionizantes (Marín, 2001; Instituto Nacional del Cáncer [INC], 2018).

La radiación impide el crecimiento y división de las células e incluso llega a la destrucción de las mismas; cuando se irradia una parte del organismo se producirá una destrucción de células tanto tumorales como sanas. Las células tumorales crecen y se dividen más rápido que las células sanas, por lo que son más radiosensibles y no son capaces de reparar las lesiones producidas por la radiación y por tanto mueren en mayor cantidad que las células normales (Verdú *et al.*, 2002).

Los efectos de la radiación en el tejido adyacente dependen de la cantidad total de radiación, la dosis por tratamiento, la técnica de administración y el tipo de tejido (Lee y Mallik, 2005).

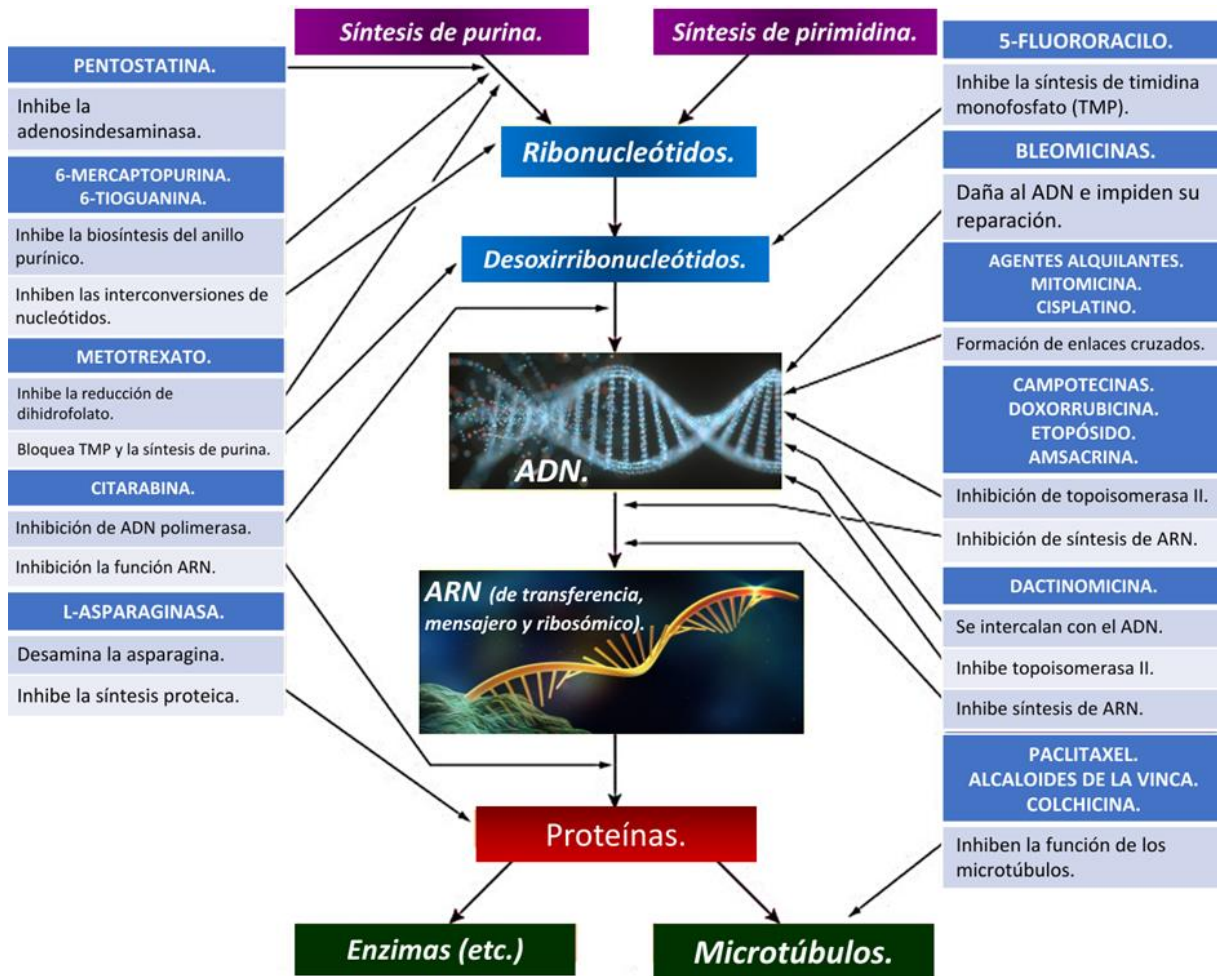
El corazón se incluyó típicamente en el campo de la irradiación durante la radiación en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, la irradiación de la mama izquierda y otras neoplasias malignas mediastínicas. A pesar de esto fue hasta 1960, que se reconoció la asociación entre la radioterapia previa al tórax y las diversas formas de enfermedades cardíacas (Tewart *et al.*, 1968; Fajardo *et al.*, 1973).

El espectro de efectos cardiotóxicos de la radioterapia es extenso y puede afectar a todas las estructuras del corazón (Eldabaje *et al.*, 2015). Dosis torácicas superiores a 30 Gray (Gy) se asocian a efectos dañinos sobre el sistema cardiovascular, los cuales pueden aparecer muy tardíamente en la evolución de estos enfermos, incluso décadas después de recibida la radioterapia (Stewart *et al.*, 1995). Pericarditis crónica se describe en 3% a 20 años y 12% a 30 años luego de irradiación superior a 35 Gy (Mulrooney *et al.*, 2009). También se describen procesos fibróticos, tanto del endocardio como del aparato valvular que pueden causar valvulopatías (Ong *et al.*, 2013), daño microvascular coronario (Veinot y Edwards, 1996) y mayor incidencia de enfermedad aterosclerótica, afectando típicamente los segmentos proximales del árbol coronario (Heidenreich *et al.*, 2007).

Por ejemplo, sobrevivientes de linfoma no Hodgkin tienen un incremento de 4-6 veces en el riesgo de desarrollar cardiopatía coronaria, comparado con la población general y en mujeres asintomáticas sometidas a radioterapia torácica hasta 50% presentan nuevos defectos de perfusión (Yusuf *et al.*, 2011).

### 2.3.2. Quimioterapia.

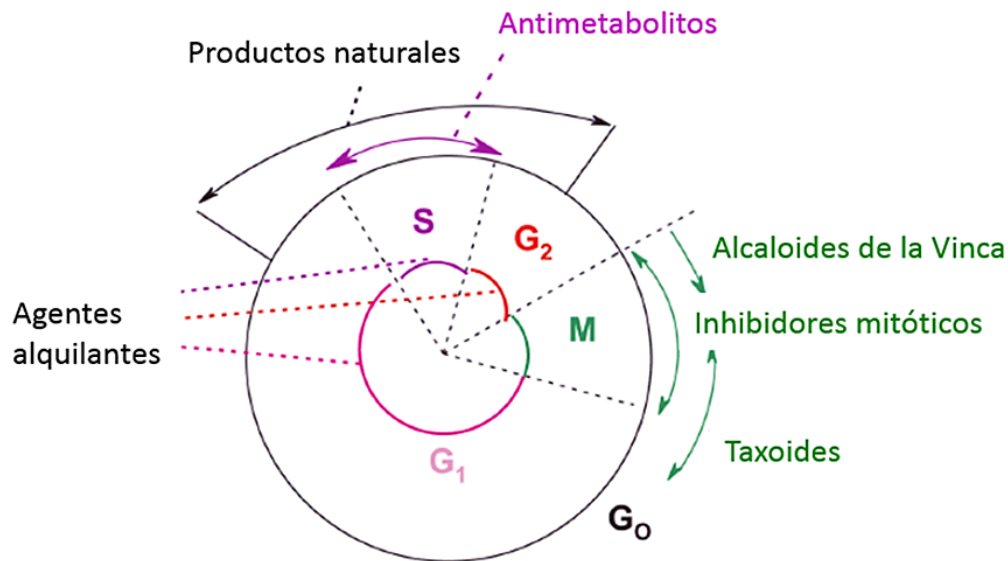
En la quimioterapia se emplean sustancias que se caracterizan por impedir el desarrollo, crecimiento y proliferación de las células cancerígenas o tumorales, dentro de ellos existen diferentes mecanismos de acción **Figura 2** y dependiendo de la parte del ciclo celular en la que actúan se pueden clasificar en:



**Figura 2.** Resumen de algunos mecanismos de acción de diferentes tipos de antineoplásicos. Tomado y modificado de Goodman y Gilman, 2007.

1. No específicos para el ciclo celular. Son agentes tóxicos que actúan durante cualquiera de las fases del ciclo de división ( $G_1$ , S,  $G_2$  o M). Cisplatino, Carboplatino etc. (Marín, 2001; López, 2012).
2. Específicos para el ciclo celular. Son agentes citotóxicos que actúan en solo una de las fases del ciclo de división **Figura 3** (López, 2012). El incremento en las dosis no produce una mayor respuesta, pero puede mejorar su efectividad por expansión prolongada: L-Asparaginasa, Antimetabolitos, Alcaloides de vinca, etc. (Marín, 2001).





**Figura 3.** Ciclo celular que muestra las etapas donde algunos antineoplásicos actúan. Tomado y modificado de Almeida *et al.*, 2005.

También se encuentran divididos en otros dos grupos, los que afectan al ácido desoxirribonucleico (ADN) y los que no lo afectan. En el grupo de los que afectan al ADN, encontramos como ejemplo a la ciclofosfamida y en el grupo de los que no afectan al ADN encontramos como ejemplo a la vinblastina (López, 2012).

Algunos ejemplos de agentes antineoplásicos son los siguientes:

- Agentes alquilantes: clorambucil, ciclofosfamida, busulfan, fosfamida, mecloretamina, melfalán.
- Antibióticos antraciclínicos: doxorubicina, daunorrubicina.
- Otros antibióticos: dactinomicina, mitomicina, mitoxantrona.
- Nitrosoureas: carmustina, lomustina, estreptozocina.
- Misceláneos: carboplatino, cisplatino, dacarbacina.
- Antimitóticos: paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina.

Y estos pueden ser administrados solos o en combinación durante periodos de tiempo cortos o de forma continua en función a la sensibilidad del tipo de tumor y tratando de evitar los efectos tóxicos sobre órganos muy sensibles, como la medula ósea, el epitelio intestinal, los riñones, corazón o el sistema nervioso (Kierszenbaum, 2008; INC, 2017). Generalmente, las combinaciones funcionan mejor que los medicamentos únicos porque eliminan por diferentes vías a la mayoría de células cancerosas (Sánchez, 2018).

No obstante, el uso de fármacos en un tratamiento sistemático para neoplasias malignas no se documentó sino hasta 1865, cuando Lissauer administraba arseinato de potasio a pacientes leucémicos y observaba efectos positivos. Años después en 1898, Paul Ehrlich descubrió la arsfenamina, primer agente alquilante ocupado como quimioterapéutico a partir de 1940 (Marín, 2001).

En el año 1962 como resultado de un programa público de identificación de nuevos compuestos antitumorales desarrollado en Estados Unidos se encontró que el extracto del árbol japonés *Taxus brevifolia*, tenía actividad antitumoral en diferentes tipos de tumores. A pesar de ello fue hasta 1992 que la Food and Drug Administration (FDA) aprobó el uso del Taxol contra el cáncer de ovario y en el año de 1994 se aprobó su uso contra el cáncer de mama (Manzanera, 2012).

El primer fármaco anticancerígeno con un metal fue descubierto por Barnett Rosenberg en el año de 1969, Rosenberg reportó la actividad citostática de un compuesto sintético de origen inorgánico, este compuesto fue el *cis*-diclorodiaminoplatino (II), conocido clínicamente como cisplatino. En el año de 1978 el cisplatino fue aprobado para el tratamiento de cáncer de ovario y testicular por la FDA. El Carboplatino, considerado como la segunda generación de fármacos anticancerígenos basados en platino fue introducido en la práctica clínica en el año 1981. Y en el 2002, el Oxaliplatino también fue aprobado para su uso clínico como agente para quimioterapias (Marín, 2001; Manzanera, 2012; López *et al.*, 2013).

El cisplatino y el carboplatino son fármacos con mecanismos de acción y actividad antitumoral similares, aunque difieren en el perfil toxicológico. Al activarse intracelularmente, quedan libres dos valencias del ion platino, que forman dos enlaces estables con componentes del ADN. El resultado es la alteración de la configuración tridimensional del ADN, la producción de errores de transcripción y la imposibilidad de que las cadenas se separen para la replicación. El cisplatino tiene una toxicidad variada e importante.

Es el fármaco antineoplásico más nefrotóxico; se demuestra en el incremento de creatinina y de urea. Las lesiones renales consisten en esclerosis glomerular, fibrosis y necrosis tubular, lo que origina hipomagnesemia, hipocalcemia e hiponatremia. La toxicidad neurológica se manifiesta por ototoxicidad (toxicidad auditiva), con la aparición de tinnitus e hipoacusia en el intervalo de las frecuencias altas, así como neuropatía periférica. La toxicidad medular se manifiesta con neuropatía, trombopenia y anemia moderada. El carboplatino podría ser una alternativa para los pacientes con deterioro progresivo de la función renal ya que es diez veces más soluble que el cisplatino, por lo que se elimina más fácilmente por el riñón, sin embargo, presenta mielotoxicidad grave y el oxaliplatino presenta toxicidad neurológica (Benedi y Gomez, 2006; Velázquez 2018).

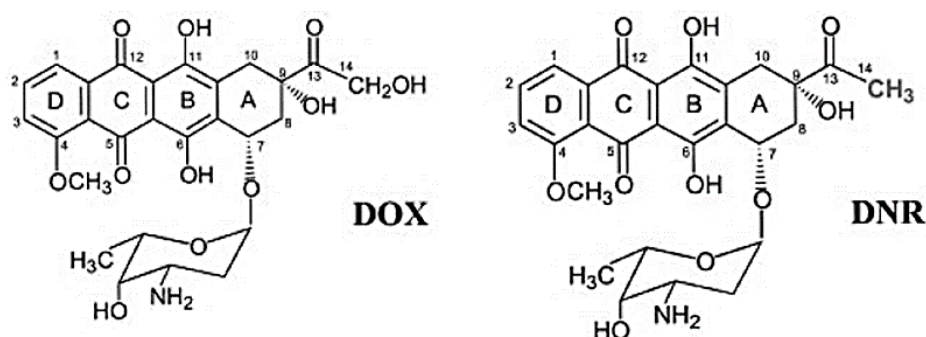
#### 2.3.2.1. Doxorubicina.

Las antraciclinas (daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina e idarubicina) son un grupo importante de fármacos antineoplásicos usados ampliamente en el tratamiento de tumores sólidos, linfomas y leucemias. Estos fármacos pertenecen a la clase de antibióticos antineoplásicos que interfieren con la replicación celular al actuar sobre el ADN a diferentes niveles, mostrando efectos en cada fase del ciclo celular (Duran, 2011).



Las primeras antraciclinas se aislaron del *Streptomyces peucetius* productor de pigmento a principios de la década de 1960 y se denominaron doxorubicina y daunorrubicina (Minotti *et al.*, 2004).

La doxorubicina (DOX) y daunorrubicina (DNR) son las antraciclinas más usadas, la única diferencia entre la estructura molecular de ambas es la cadena lateral que en la DOX termina con un alcohol primario, mientras que en la DNR termina en un metil **Figura 4**. Esta diferencia tiene una consecuencia importante en su espectro de acción. De hecho, la DOX se usa para el tratamiento del cáncer de mama, tumores sólidos de la infancia, sarcomas de tejidos blandos, y linfomas agresivos, mientras que la DNR muestra actividad en leucemias mieloblásticas o linfoblásticas agudas (Minotti *et al.*, 2004; Duran, 2011).



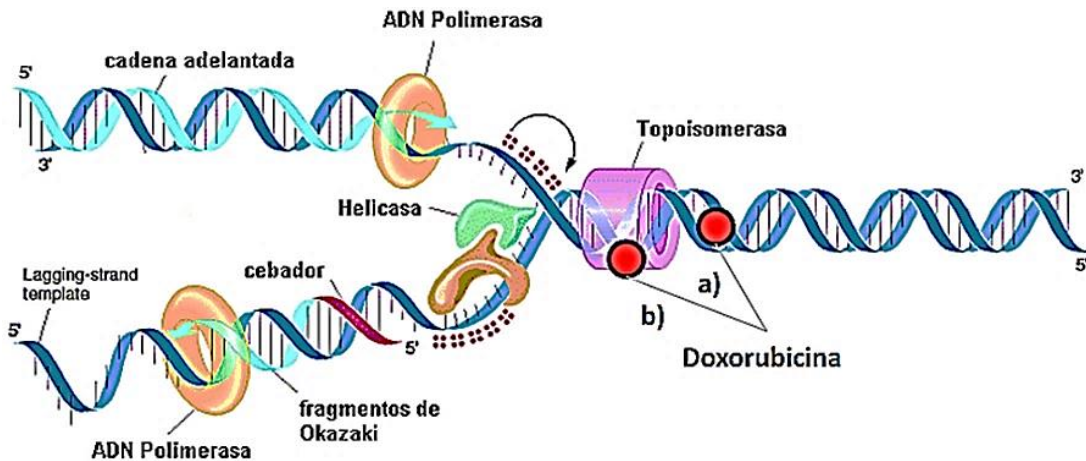
**Figura 4.** Estructuras de doxorubicina (DOX), daunorrubicina (DNR). Tomada de Minotti *et al.*, 2004.

#### 2.3.2.1.1. Mecanismos de acción (acción citotóxica).

Realmente, existe cierta controversia en relación al mecanismo de acción de la DOX. No hay un único mecanismo de acción:

1. La DOX bloquea la síntesis de ARN y ADN. Las células en fase S son más sensibles a este agente debido a que en esta fase se sintetiza el ADN de la célula hija y cuando la DOX se une, la célula no puede continuar el ciclo celular ni dividirse.

Destaca su capacidad para intercalarse entre los pares de bases adyacentes de ADN y fijarse con intensidad diversa. Esta acción modifica las propiedades del ADN, pero por sí misma no es suficiente para ejercer su acción letal. Una de las acciones que actualmente se considera crítica es la inhibición de la topoisomerasa II (topo II). La actividad funcional de esta enzima es necesaria para la replicación de ADN, transcripción, recombinación y remodelación de la cromatina; enzima encargada de enrollar o desenrollar el ADN (El-Azem de Haro, 2013). DOX se fija al complejo binario ADN-topo II formando un complejo ternario, de gran estabilidad que facilita la rotura irreversible tanto de cadenas sencillas como de cadenas dobles de ADN; evita la acción de desenrollar la doble hélice de ADN, esto lleva al paro del ciclo celular en las fases G1 y G2 y conlleva a una muerte celular programada al no poder replicar el material genético (El-Azem de Haro, 2013; Rebollo, 2016).



**Figura 5.** Mecanismos de acción de la DOX a) La DOX se une a las hebras de ADN evitando la acción de la topoisomerasa, que no será capaz de desenrollar la doble hélice ante la presencia de la DOX, b) La DOX también es capaz de actuar directamente sobre la topoisomerasa e inhibirla. Tomada de El Azem de Haro, 2013.

2. Unión a la membrana celular, lo que altera su fluidez normal y el transporte de iones (Katzung 2019). La DOX tiene gran afinidad por un fosfolípido muy presente en la membrana interna, la cardiolipina, con la que forma complejos, acumulándose de esta manera en la mitocondria, además provoca un posible colapso de la actividad de la cadena de transporte electrónico mitocondrial; evita la síntesis y correcta función de los complejos de la cadena de transporte de electrones (Marcillat *et al.*, 1989; Duran, 2011; El Azem de Haro, 2013).

3. Producción de radicales libres de oxígeno y semiquinónicos, vía reacción de reducción enzimática. Las antraciclinas son capaces de sufrir reducción de uno y dos electrones a compuestos reactivos capaces de causar daño al ADN, y membranas celulares. Una reducción de un electrón de DNR o DOX lleva a la formación del radical libre semiquinona correspondiente. En presencia de oxígeno, este radical libre rápidamente dona su electrón al oxígeno y genera un anión superóxido ( $O_2^-$ ). Aunque este no es tóxico por sí mismo, puede reaccionar originando peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), oxidante importante en las células y radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ). Los radicales hidroxilo son extremadamente reactivos y su generación inmediatamente adyacente al ADN hace poco probable que los antioxidantes sean efectivos. Esto explica la falla de los antioxidantes para prevenir cardiotoxicidad (Muraoka y Miura, 2003; Minotti *et al.*, 2004; Duran, 2011). Estas especies reactivas de oxígeno (ERO) causan la peroxidación de los lípidos de membrana y otros componentes celulares e inhiben la respiración celular, por daño a los componentes de la cadena de fosforilación oxidativa y a la membrana de la mitocondria (Duran, 2011; Rebollo, 2016).

El resultado final de esto, como consecuencia de las interacciones y daños que producen las ERO con el entorno, será la apoptosis de la célula por varios mecanismos posibles; hay tres vías para ello (Desregulación de la proteína p53, Desregulación de la concentración de calcio, Desregulación de los factores de transcripción) (Zhang *et al.*, 2009; El Azem de Haro, 2013).

### 2.3.2.1.2. Toxicidad inducida por antraciclinas.

Las antraciclinas solo son administradas intravenosamente e intravesicalmente y se metabolizan en el hígado. El ritmo de la eliminación de estos fármacos, y por lo tanto su toxicidad, son rara vez limitados por la función hepática (Duran, 2011; Rebollo, 2016). Tienen un rango de toxicidad que incluye a la mielosupresión, mucositis, y pérdida de cabello, pero la mayor importancia se da al daño cardiaco. (Duran, 2011; Rebollo, 2016; Katzung 2019).

Por lo que los oncólogos que prescriben antraciclinas deben poner constantemente en la balanza su efecto anticáncer contra el riesgo de daño cardiaco. En los niños el problema es aún más importante debido a que tendrán largo tiempo de sobrevivida una vez que el cáncer sea curado. La cardiotoxicidad asociada a antraciclinas en sobrevivientes de cáncer infantil se caracteriza por una reducción de la masa y del grosor de la pared ventricular izquierda, que indica una disminución del músculo cardiaco. La reducción de la masa cardiaca aumenta la poscarga, que resulta en disminución de la contractilidad ventricular izquierda. Estos cambios llevan al desarrollo de cardiomiopatía (Duran, 2011).

### 2.4. Corazón.

El corazón es un órgano de bombeo constituido, anatómicamente por dos unidades, cada una de las cuales se encuentra integrada por una aurícula y un ventrículo. La mitad derecha del corazón bombea sangre hacia los pulmones, donde ocurre la depuración de bióxido de carbono y la captación de oxígeno, mientras que la parte izquierda bombea sangre hacia los tejidos periféricos, dotándolos de oxígeno y removiendo el bióxido de carbono que permanentemente producen (Mendoza-Medellín y Torres-Velazquez, 2002). Los ventrículos y las aurículas están compuestos por tejidos musculares especializados para la actividad mecánica y su coordinación por señalización eléctrica (Kerckhoffs, 2010).

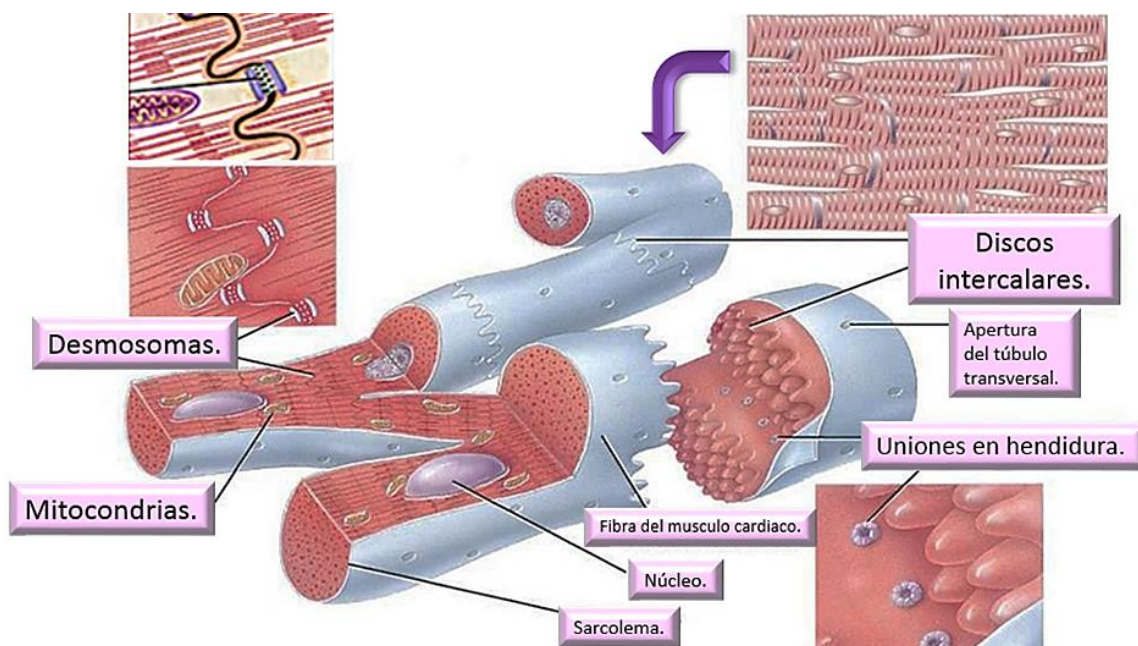
A nivel celular, los componentes principales del corazón postnatal son los cardiomiocitos, los fibroblastos cardiacos o cardiofibroblastos, las células endoteliales y las células vasculares de músculo liso. En un corazón adulto normal los cardiomiocitos ocupan la mayoría del volumen tisular; aunque constituyen aproximadamente del 30-35% del número total de células. Las células no musculares constituyen aproximadamente del 65-70% restante, entre los cuales los cardiofibroblastos representan la vasta mayoría (Nag, 1980; Kerckhoffs, 2010). El espacio entre los cardiomiocitos está ocupado por la matriz extracelular, formada por proteínas estructurales, de las que las más importantes son la colágena tipo I y III. Las fibras de colágena forman una red que se organiza en distintos componentes: el endomisio, que rodea a cada cardiomiocito y lo une a los vasos adyacentes, el perimisio que rodea a grupos de cardiomiocitos y se conecta con el epimisio que discurre a lo largo de la superficie endocárdica y epicárdica. Esta disposición de la matriz extracelular, que se une al esqueleto fibroso, mantiene la arquitectura cardíaca durante el proceso de contracción-relajación y previene el deslizamiento y el sobre estiramiento de los cardiomiocitos (Tresguerres *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Cardiomiocitos aislados de rata. Tomada de Nippert *et al.*, 2017.

Los cardiomiocitos son las células musculares especializadas del corazón que se encargan de la contracción; Su función principal es la generación de fuerza que causa la contracción mecánica de la célula y el tejido. Al igual que en otras células musculares estriadas, la fuerza se genera por las interacciones moleculares de los filamentos de actina y miosina, que se ensamblan en los llamados sarcómeros (Kerckhoffs, 2010). La actividad cardíaca requiere un elevado y continuo aporte de energía, por lo cual, a diferencia del músculo esquelético presenta permanentemente un metabolismo aerobio; esto explica que las mitocondrias representen aproximadamente la mitad del volumen cardíaco (Nelson y Cox, 2000).

Las mitocondrias ocupan una gran proporción de cada miocito. Normalmente, se concentran en las partes de la célula que contribuyen activamente al metabolismo energético. Por ello, en los miocitos se encuentran encajadas entre las miofibrillas, presumiblemente, para suministrar rápidamente la energía (Heredia, 2002).



**Figura 7.** Estructura de la célula del músculo cardíaco. Tomada y editada de <http://163.178.103.176/Tema3C/Grupos/Saladin/ASCf.html>.



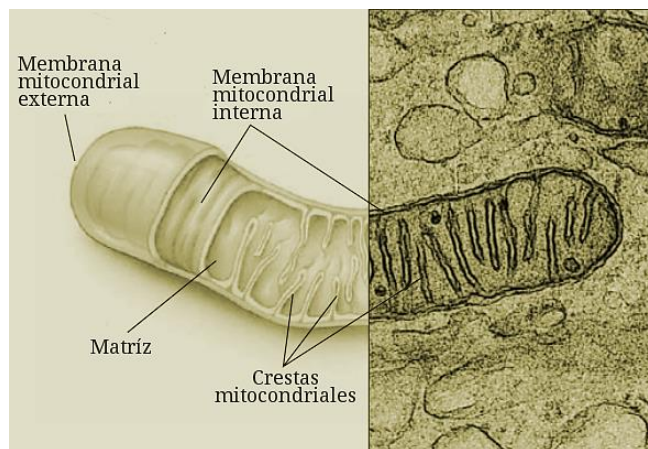
## 2.5. Mitocondria.

Las mitocondrias son una parte integral de la compleja citoarquitectura de los cardiomiocitos adultos (Sánchez, 2015). Las mitocondrias ocupan el 20-30% del volumen celular de un cardiomiocito, destacando su papel crítico en la alta demanda de energía en el corazón (Marín, 2013).

Estructuralmente, la mitocondria está formada por una membrana externa (MEM), una membrana interna (MIM), matriz y el espacio intermembrana (Sánchez, 2015).

La matriz mitocondrial contiene ribosomas para síntesis proteica y ADN, que codifican algunas de las subunidades de los complejos de la cadena de fosforilación oxidativa. Contiene, además, las enzimas para la betaoxidación de ácidos grasos y casi todas las enzimas para el ciclo de Krebs (excepto el succinato deshidrogenasa, que está unida a la membrana como parte de la cadena respiratoria [complejo II]) (Regueira *et al.*, 2009).

La MIM se caracteriza morfológicamente por presentar unas invaginaciones (crestas) con multitud de complejos enzimáticos y proteínas que regulan el paso de metabolitos. Esta membrana resulta especialmente impermeable a iones, debido a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina y a la gran cantidad de bombas y transportadores específicos como el translocador de nucleótidos de adenina (ANT). Por el contrario, la MEM carece de crestas, por lo que en condiciones fisiológicas su permeabilidad es menos selectiva gracias a la presencia de una proteína denominada porina o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), que permite el paso de iones y metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6,000 Da (Luna *et al.*, 2013).



**Figura 8.** Representación esquemática de una mitocondria. Tomada de <https://temas-selectos-de-ciencias.blogspot.com/p/fosforilacion-oxidativa.html>.

El papel principal de las mitocondrias es el de abastecer de energía a la célula ya que en su interior tiene lugar la fosforilación oxidativa donde se genera un gran poder reductor. Esto se lleva a cabo mediante una serie de complejos enzimáticos: I, II, III y IV que forman la cadena transportadora de electrones. Estos complejos generan un gradiente electroquímico sobre la membrana interna mitocondrial mediante el paso de protones

hacia el espacio intermembranal. Este gradiente es convertido en energía por la enzima ATP sintasa (o complejo V) en forma de moléculas de ATP (adenosín trifosfato). Los electrones son llevados de los complejos I y II al complejo III por la coenzima Q, y del complejo III al complejo IV por el citocromo C (Luna *et al.*, 2013).

Como producto de la fosforilación oxidativa, en la mitocondria se producen ERO. Éstas se generan por el filtrado de electrones al oxígeno molecular que, por la adición de un único electrón forma anión superóxido ( $O_2^-$ ) el cual puede ser rápidamente dismutado por la superóxido dismutasa (SOD) hacia la formación de  $H_2O_2$  y  $O_2$ , este último puede ser reutilizado para generar nuevamente anión superóxido ( $O_2^-$ ), y el  $H_2O_2$  producido por la dismutación del anión superóxido puede generar al radical  $OH^\cdot$ ; la formación de este radical a nivel celular se da por varios mecanismos, uno de ellos es por la presencia de metales de transición. El radical  $OH^\cdot$  es considerado una de las especies oxidantes más dañinas por su vida media corta y alta reactividad, suele actuar en los sitios cercanos donde se produce; es capaz de dañar el ADN, proteínas, lípidos, glúcidos y otras estructuras celulares (Corrales y Muñoz, 2012; Macedo, 2012; El-Azem de Haro, 2013; Sánchez, 2015).

En mitocondrias aisladas, el superóxido se puede generar en varios sitios en los complejos I y III, en las deshidrogenasas de glicerol 3-fosfato, 2-oxaglutarato y piruvato y, probablemente, también en el complejo II. Sin embargo, los principales productores son complejo I y el III de la cadena transportadora de electrones (Macedo, 2012). Del  $O_2$  consumido, un 0.2 – 2% es convertido en  $O_2^-$ . Esto convierte a la mitocondria en la mayor fuente de ERO intracelularmente (Sánchez, 2015).

Las ERO también se generan en otros orgánulos celulares como los peroxisomas. Normalmente no se genera gran cantidad de anión superóxido que pueda liberarse al citosol y dañar otras estructuras, pero cuando se producen situaciones de desequilibrio enzimático en las que fallen los mecanismos antioxidantes que evitan la formación de anión superóxido o radical hidroxilo, éstos pueden liberarse al exterior del peroxisoma. Las células fagocíticas como los neutrófilos también son productoras de ERO bajo situaciones de inflamación con un fin defensivo (El-Azem de Haro, 2013).

Las ERO regulan varios procesos celulares, en el caso de mamíferos son la secreción y acción de la insulina, la producción de hormonas de crecimiento, citocinas (comunicación entre células), la unión de la proteína G a sus receptores, factores de transcripción, regulación de los transportadores y canales de iones por citar algunos (Bartozs, 2009).

Para nivelar y contrarrestar el efecto nocivo del exceso de producción de estos radicales libres, el organismo cuenta con mecanismos como la defensa antioxidante que intercepta las ERO evitando con ello la generación de nuevos radicales libres. Un desbalance ocasionado ya sea por producción excesiva de radicales libres o por reducción en la capacidad antioxidante, provoca la situación conocida como estrés oxidante (Sánchez, 2015).

Sies, define al estrés oxidante como “una alteración en el equilibrio pro-oxidante/antioxidante, favoreciendo a los primeros y provocando un daño potencial” (Sies, 1997). Este daño es conocido como daño oxidante a quien Whiteman y Halliwell lo definen como “el daño biomolecular causado por el ataque de ERO sobre los componentes de los organismos vivos” (Halliwell y Whiteman, 2004).

El estrés oxidante se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas, y cáncer (Finkel y Holbrook, 2000).

## 2.6. Casiopeinas como nueva estrategia terapéutica.

Entre los compuestos usados en quimioterapia están los elementos de coordinación, estos pueden ser un complejo neutro o un compuesto iónico, el ion generalmente es un metal rodeado de otros átomos o moléculas orgánicas (Desoize y Madoulet, 2002).

Los compuestos que han llamado la atención son aquellos que presentan un centro metálico, los cuales incluyen plata (Ag), hierro (Fe), rutenio (Ru), galio (Ga), oro (Au), platino (Pt) y **cobre (Cu)**, por mencionar algunos (Cermeño, 2007).

El cobre (Cu) es un metal de transición ( $[Ar] 4s^1 3d^{10}$ ) que es esencial en los sistemas biológicos incluyendo el humano, sus propiedades químicas le permiten la participación en procesos fundamentales que involucran transferencia de electrones asociada a enzimas oxidantes, por ejemplo, la hemocianina, citocromo oxidasa y superóxido dismutasa (Cermeño, 2007; Tello, 2011).

El Cu se encuentra presente en una gran cantidad de alimentos cotidianos, como el hígado, riñón, mollejas, carnes, cereales integrales, frutas secas y legumbres (López, 2012). Dentro de las células la concentración de Cu no excede de  $10^{-15}$  M. Otros estudios adicionales han establecido que el Cu es importante durante el crecimiento de los niños, interviene en mecanismos de defensa, fuerza en los huesos, maduración de las células rojas y blancas, transporte de hierro, metabolismo del colesterol, metabolismo de la glucosa, contractibilidad del miocardio y desarrollo del cerebro, facilita la síntesis del colágeno y la elastina necesarios para el buen estado de los vasos sanguíneos, los cartílagos, los pulmones y la piel (Cermeño, 2007).

De ahí que el interés por desarrollar complejos de Cu (II) con fines terapéuticos, se fundamenta en la baja toxicidad de este metal hacia las células normales. Adicional a esto al ser un metal esencial se espera que su toxicidad sea menor que los complejos de platino (Bravo *et al.*, 2002; Velázquez 2018). Por tal motivo desde 1975 un grupo de investigadores pertenecientes a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, encabezados por la Dra. Lena Ruiz Azuara inicio el desarrollo de una serie de compuestos de coordinación con posible actividad antineoplásica, a los que nombro Casiopeinas (Ruiz-Ramírez *et al.*, 1995; Hernández, 2008).

Las Casiopeinas (Cas) presentan en su estructura química un centro metálico ocupado por un ion de Cu (II) el cual tiene coordinado un ligante bidentado tipo diimina (N-N) y un ligante secundario que puede ser un  $\alpha$ -aminoacido (N-O) o un donador tipo O-O (acetilacetato o salicialdehidato), con fórmula general  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$  o  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$  (Ruiz-Ramírez *et al.*, 1995; Márquez *et al.*, 2000; Alemón-Medina *et al.*, 2007).

Las Cas son análogos al cisplatino y fueron diseñadas para reaccionar con el ADN y se ha visto que tienen particular afinidad por la Adenina. Se piensa que una vez asociadas al ADN, la eventual reducción del Cu originaría ERO como los radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) **Figura 9**; las ERO pueden reaccionar con diferentes macromoléculas como los ácidos nucleicos o bien, otras estructuras celulares como el citosol o las mitocondrias, causando daño oxidativo dentro de la célula, que se observa como una alta frecuencia de Micronúcleos (MN), Aberraciones Cromosómicas (AC) y de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs) así como la muerte celular (Bravo *et al.*, 2002; Cancino, 2008; Alemón-Medina *et al.*, 2007; Álvarez-Barrera *et al.*, 2016; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2017).



**Figura 9.** Reacciones de oxidación-reducción involucradas en la generación de ERO. Reacciones Fenton/Haber Weiss. En presencia del ion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) o de agentes reductores tales como el ácido ascórbico o GSH (glutación), el  $\text{Cu}^{2+}$  puede ser reducido a  $\text{Cu}^+$ , el cual es capaz de catalizar la formación de radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) a partir de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Tomada de Hernández, 2008.

Las Cas presentan actividad citotóxica (Alemón-Medina *et al.*, 2007; Tello, 2011; Rodríguez *et al.*, 2017) y citostática en diferentes tejidos (Cermeño, 2007), así como efecto antineoplásico tanto *in vivo* como *in vitro* (Gracia-Mora *et al.*, 2001; Trejo-Solís *et al.*, 2005; Alemón-Medina *et al.*, 2011). Además, algunas parecen inducir distinto grado de muerte celular (citotoxicidad), así como fragmentación del genoma (clastogenicidad) en Linfocitos (Roldan y Cancino, 2006) y células Hela (Alemón-Medina *et al.*, 2007).

Se han estudiado algunas de las características de las Cas que posiblemente contribuyen a su actividad como compuestos antineoplásicos, algunas de las principales son:

- La utilización de aminoácidos como ligandos (N-O) facilita la interacción de la molécula con la cadena de ADN. Se han observado distintos grados de interacción con el material genético dependiendo del tipo de aminoácido empleado (Sugimori *et al.*, 1997).



- El tipo y cantidad de sustituyentes presentes en el ligando bidentado tipo diimina (N-N) influyen en la actividad antineoplásica que el compuesto presentará. Se ha observado que la presencia del tercer anillo aromático en el ligante bidentado influye en la actividad del compuesto (Bravo-Gómez *et al.*, 2009).
- Las Cas poseen actividad citotóxica, citostática y antitumoral asociada al aumento de ERO, producen una disminución en las concentraciones de glutatión intracelular (Alemón-Medina *et al.*, 2007).
- Una de las principales hipótesis que se maneja del posible mecanismo de acción es que la estructura plana de las Cas permite su interacción con el ADN mediante interacciones  $\pi$ - $\pi$  (Hernández, 2008).

Actualmente se han sintetizado más de 100 Cas (Dávila, 2017), algunas de las cuales se muestran en el **Cuadro 1** (López, 2012). Se ha observado que las Cas presentan diferentes grados de actividad y selectividad dependiendo del tipo de complejo, siendo las familias I, II y III las de mayor potencial antineoplásico (López, 2012). Dentro de la familia II, destaca la Cas II-gly y en la familia III destacan las Cas III-Ea y III-ia, como los compuestos más prometedores para combatir el cáncer.

En cuanto a las características particulares de la Cas II-gly se tiene que su fórmula general es [Acua (4,7-dimetil-1, 10-fenantrolina) (glicina) Cu (II) nitrato], su peso molecular es de 425.89 g/mol. Su coeficiente de extinción en agua es de 49.23, si la concentración está expresada en moles por litro y de 0.12, si la concentración esta expresada en gramos por litro. En solución salina (Cloruro de Sodio) precipita. En solución dextrosada permanece estable durante una semana según lo demuestran los espectros de luz. En solución de Ringer se mantiene estable por el tiempo de 3 semanas. No es soluble en metanol, al disolverla en buffer de fosfatos (0.2 M) está reacciona con los componentes del disolvente ya que se forma una suspensión en forma de película blanca. Es estable en condiciones de oscuridad y refrigeración por lo menos durante 21 días y se degrada muy fácilmente cuando se expone a la luz (Romero *et al.*, 1996, 1998; Cermeño, 2007).

En el grupo de la familia III de las Cas, se encuentra la Cas III-Ea su fórmula es, [Acua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (acetilacetato) Cu (II)nitrato] (Silva-Platas *et al.*, 2018), su peso molecular es de 450.94 g/mol, es soluble en agua, solución salina, solución glucosa y presenta un color azul intenso (López, 2012). En estudios *in vitro* muestra una buena actividad antineoplásica en líneas de células tumorales humanas y leucocitos de personas sanas, superando incluso a los compuestos oxiplatino, carboplatino y cisplatino (Gracia-Mora *et al.*, 2001; Tovar *et al.*, 2006; Alemón-Medina *et al.*, 2007).

Para la Cas III-ia su fórmula es [Acua (4,4-dimetil-2,2'bipiridina) (acetilacetato) Cu (II) nitrato] (Silva-Platas *et al.*, 2018), su peso molecular es de 444.93 g/mol (Carvallo-Chaigneau *et al.*, 2008), es un polvo fino de color azul claro, el cual, es soluble en agua,

metanol y suero dextrosado pH= 7.4 y en condiciones ambientales. El compuesto se mostró estable durante 12 horas al ser evaluado en disolución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4 y 64 mM A 37° C). Al determinar el momento magnético del compuesto, se encontró que se trata de un compuesto paramagnético con un electrón desapareado, indicando que el estado de oxidación del Cu se encuentra como +2. La conductividad del compuesto corresponde a la de un electrolito 1:1, por lo que contiene una molécula de nitrato como contraión (Dávila, 2017).

**Cuadro 1.** Compuestos de Casiopeínas familias y formulas.

FAMILIA	FORMULA GENERAL	EJEMPLOS
I	[Cu (4,7-difenil-fenantrolina)( N-O )]NO <sub>3</sub>	Cas I gly, Cas I ser, Cas I ala
II	[Cu (4,7-dm difenil-fenantrolina)( N-O )]NO <sub>3</sub>	Cas II gly, Cas II ala, Cas IIser
III-a	[Cu (N-N) (Acac)]NO <sub>3</sub>	Cas III ia, Cas III Ea, Cas III 5a
III-s	[Cu (N-N)( salal )]NO <sub>3</sub>	Cas III Gs, Cas III Cs, Cas III As
IV	[Cu (4,4'-dimetil-bipiridina)( N-O )]NO <sub>3</sub>	Cas IV gly, Cas IV ser, Cas IV ala
V	[Cu (5-R- fenantrolina)( N-O )]NO <sub>3</sub>	Cas V NO <sub>2</sub> gly, Cas V NO <sub>2</sub> ser
VI	[Cu (5,6- dimetil- fenantrolina)( N-O )]NO <sub>3</sub>	Cas VI gly, Cas VI ser, Cas VI ala
VII	[Cu (1,10- fenantrolina)( N-O )]NO <sub>3</sub>	Cas VII gly, Cas VII ser, Cas VII ala
VIII	[Cu (3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)( N-O )]NO <sub>3</sub>	Cas VIII gly, Cas VIII ser, Cas VIII ala
IX	[Cu (2,2'-bipiridina)( N-O )]NO <sub>3</sub>	Cas IX gly, Cas IX ser, Cas IX ala

Acac: acetilacetato, salal: salicialdehidato. Tomado de (López, 2012).

### 2.6.1. Cardiotoxicidad por Casiopeinas.

En el 2001 Marín, caracteriza las lesiones a nivel celular mediante la utilización de la microscopía electrónica de transmisión, en ratones tratados con dosis cercanas a la dosis letal media de Cas III (14 mg/Kg). Los ratones presentaron diferentes manifestaciones tóxicas cardiovasculares y nerviosas, los principales signos que presentaron dentro de las primeras 24 horas fueron taquicardia, ataxia, midriasis por mencionar algunas. En la necropsia se observaron lesiones macroscópicas como isquemia periférica, pericarditis serosa, también congestión general y esplenomegalia. En las lesiones microscópicas se observó degeneración de fibras musculares cardíacas, congestión epicárdica. A nivel celular se encontraron lesiones y alteraciones en núcleos y organelos. Siendo la mitocondria uno de los organelos más afectados principalmente en las células de hígado, del músculo cardíaco y del riñón, en donde se observó principalmente dilatación de crestas, gigantismo y pérdida total o parcial de sus membranas.

Marín-Hernández en el 2003, evaluó el efecto de las Cas sobre el metabolismo energético, tanto en mitocondrias sanas de hígado de rata como en mitocondrias de células tumorales (hepatoma ascítico AS-30D) y en células intactas, demostró que Cas II-gly interactúa con la mitocondria tanto de forma aislada como en la célula intacta, con efectos en diferentes sitios que ocasionan la inhibición de la fosforilación oxidativa, en particular inhibe a la enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa a concentraciones menores de 10 nmoles/mg de proteína y disminuye los niveles de ATP.

Hernández-Esquivel *et al.* en 2006, empleando la rata como modelo de prueba, al evaluar la relación de la cardiotoxicidad con la inhibición del metabolismo energético, reportan que las Cas son menos tóxicas que la Adriamicina en corazones aislados y perfundidos con ácidos grasos como sustratos oxidables y en los experimentos con animales completos; fueron menos tóxicas después de 10 minutos de administración de fármaco antineoplásico mostrando que el efecto de la Cas II-gly (5  $\mu$ M) y Cas III-ia (10  $\mu$ M) es reversible hasta un 80%, mientras que DOX (0.8  $\mu$ M) no permite recuperación.

En otro estudio donde se evaluó la toxicidad aguda por Cas III-ia y Cas II-gly vía intravenosa en un modelo canino, se demostró que las Cas inducen arritmias cardíacas (es decir, bradicardia, bloqueo cardíaco y arritmias ventriculares) y disfunción sistólica como efectos tóxicos agudos (Leal-García *et al.*, 2007).

Silva-Platas *et al.* en el 2016 al evaluar el impacto potencial de las Cas en la energía mitocondrial cardíaca, así como los mecanismos moleculares subyacentes a la cardiotoxicidad inducida por Cas (en mitocondrias cardíacas aisladas y cardiomiocitos), encontraron que las Cas aumentan la tasa de respiración del estado 4, reducen el contenido de ATP (Cas III-Ea y II-gly) y en los cardiomiocitos reducen el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ); 4  $\mu$ M de Cas III-Ea. Lo que sugiere que Cas actúa como desacoplante mitocondrial. También reportaron una disminución en la capacidad de retención de  $Ca^{2+}$  en las mitocondrias, una disminución de la actividad mitocondrial de la aconitasa y un aumento

en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cas III-ia; 52 μM y Cas III-Ea; 47 μM) aunque este aumento no mostro efectos en la peroxidación lipídica.

Por otra parte, Silva-Platas *et al.* en el 2018, al emplear a la rata como modelo de prueba para evaluar la cardiotoxicidad aguda por Cas III-Ea, III-ia, II-gly, en tejido cardiaco ex vivo y cardiomiocitos aislados, encontraron que las Cas disminuyen el metabolismo cardiaco (1-10 μM de Cas) y la contractibilidad (Cas perfundidas durante 60 min a una concentración 5 μM), reducen los niveles de ATP y el potencial de membrana mitocondrial (en corazón completo y a nivel mitocondrial), así como la actividad mitocondrial de la aconitasa (con Cas III-ia en corazones aislados), la capacidad de retención de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial. Y aumentan la apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), además las Cas estimulan la activación de las caspasas 3, 7 y 9.

Pese a lo anterior cabe destacar que los nuevos agentes quimioterapéuticos como las Cas han mostrado una actividad antitumoral más potente que DOX (Ruiz-Azuara y Bravo-Gómez, 2010). Por ejemplo, la reducción del volumen de tumores subcutáneos en ratones desnudos lograda por Cas III-ia fue del 81% (Carvalho-Chaigneau *et al.*, 2008), mientras que la de DOX fue del 20% (Watanabe *et al.*, 1997).

## 2.7. Cardiomiocitos como modelo de estudio.

Los cardiomiocitos adultos son ampliamente aceptados como un buen modelo para la fisiología y fisiopatología celular cardíaca, así como para la intervención farmacéutica. El aislamiento y el cultivo de cardiomiocitos funcionales en gran cantidad y calidad benefician drásticamente la investigación cardiovascular y proporcionan una herramienta importante para la investigación de la transducción de señalización celular y el desarrollo de fármacos (Li, 2014).

Las técnicas para el aislamiento de los cardiomiocitos han sido difíciles de establecer, porque el músculo cardíaco está firmemente conectado entre sí por los discos intercalares y la red de la matriz extracelular y estas conexiones son difíciles de romper sin dañar las células. En general, los cardiomiocitos ventriculares pueden aislarse de los corazones de diversas especies de mamíferos (rata, ratón, hámster, etc.), aunque el corazón de la rata sigue siendo el modelo más usado para el aislamiento de los cardiomiocitos ventriculares por dos razones. Primero, el tamaño del corazón se adapta fácilmente a los sistemas de perfusión comercialmente disponibles, es más o menos fácil de manejar, el animal en sí no es costoso y el aislamiento normalmente da números de células razonables que pueden usarse dentro del día siguiente. Segundo, la rata es el modelo animal más utilizado en biología cardíaca (Schlüter y Piper, 2005).

### 3. Justificación.

Con la mejoría del índice de curación del cáncer, el riesgo de daño cardíaco a mediano y largo plazo producido por las quimioterapias se encuentra entre los efectos adversos más serios y frecuentes. El daño cardíaco afecta fuertemente la calidad de vida y supervivencia de los pacientes oncológicos.

Es por esta razón que es de gran importancia identificar agentes quimioterapéuticos con mínimos efectos colaterales y amplia actividad antitumoral. De ahí que los fármacos a base de Cu (Casiopeinas) podrían ser una alternativa menos tóxica y con mayor eficacia terapéutica. Ya que se ha visto que al compararlas con otros antineoplásicos de uso regular como el cisplatino o DOX, muestran mayor eficacia, tienen un tiempo de eliminación más corto, presentan menor toxicidad para los tejidos normales y su costo de producción es considerablemente inferior.

Sin embargo, se ha reportado en diversos estudios que la administración de las Cas III-Ea, III-ia, II-gly alteran funciones a nivel mitocondrial e induce cardiotoxicidad reversible en corazones aislados. Es por esto que resulta de gran interés estudiar a los cardiomiocitos como modelo de prueba ya que se puede obtener un estudio más a fondo sobre las repercusiones en el tejido cardíaco.

De ahí, que la importancia de este estudio sea conocer el efecto que tienen las Cas sobre la producción de ERO mitocondrial en cardiomiocitos aislados de rata como posible mecanismo de cardiotoxicidad.

## 4. Hipótesis del trabajo.

Se ha demostrado que la administración de las Cas en modelos experimentales (*in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*) alteran las funciones mitocondriales y ocasionan cardiotoxicidad, por lo cual si se administran diferentes concentraciones de Cas se incrementará la producción de ERO en las mitocondrias de los cardiomiocitos aislados de rata lo que llevará a una disminución en la viabilidad celular.

## 5. Objetivos.

### 5.1. General.

Evaluar el efecto de las Cas III-Ea, III-ia, II-gly, sobre la producción de ERO mitocondrial en cardiomiocitos aislados de rata y su impacto sobre la viabilidad celular.

### 5.2. Particulares.

- I. Evaluar los niveles de ERO mitocondrial producidos por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones en cardiomiocitos aislados de rata incubados con la sonda MitoSOX Red.
- II. Determinar el efecto que tiene el tratamiento a diferentes concentraciones de Cas III-Ea, III-ia y II-gly sobre la viabilidad de los cardiomiocitos aislados de rata.
- III. Comparar los efectos tóxicos de las Cas III-Ea, III-ia y II-gly con el fármaco de referencia DOX en cardiomiocitos aislados de rata.

## 6. Material y método.

### 6.1. Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* con un peso aproximado de 250 a 350 g. Alojados en cajas de plástico, con cama de viruta de madera, con libre suministro de agua y alimento, con periodos de luz/obscuridad (12:12), 20-30 % de humedad y 20-23° C.

### 6.2. Preparación de soluciones para el aislamiento de cardiomiocitos.

- Solución Tyrode 10x; Solución madre o stock a una concentración diez veces más concentrada.

Se llevaron a cabo los cálculos pertinentes para obtener la cantidad de mg, g o ml necesarios para preparar alícuotas de 20 ml diez veces más concentrada a la concentración manejada en la extracción de cardiomiocitos, una vez obtenidos, se procedió a prepararla. Se agregó cada uno de los reactivos descritos del **Cuadro 2** en agua Milli-Q; esta se mantuvo en agitación constante, posteriormente se ajustó a pH 7.4 con NaOH 2 M. No se le agregó el MgCl<sub>2</sub> a la alícuota 10x; se agregó a la solución 1x (solución de uso, para la extracción de cardiomiocitos) el día del sacrificio del animal para que no se precipitará el medio. Las alícuotas se mantuvieron a una temperatura de 4° C hasta el día del sacrificio un máximo de 30 días.

**Cuadro 2.** Concentración y contenido de la solución Tyrode.

Reactivos	mM	PM g/mol	Concentración 1x g/20 ml	Concentración 10x g/20 ml
NaCl	130	58.44	0.151 g	1.519 g
Ácido Láctico	1	90.08	0.0018 g	0.018 g
KCl	5.4	74.56	0.0080 g	0.080 g
C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	3	110.04	0.0066 g	0.066 g
HEPES	25	238.3	0.119 g	1.191 g
MgCl <sub>2</sub>	1	95.22	0.00190 g	0.019 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0.33	119.98	0.000910 g	0.00910 g
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	22	180.15	0.079 g	0.79 g

- Solución Tyrode 1x; solución de uso, para la extracción de cardiomiocitos.

Para esta solución fue necesario descongelar una alícuota de 20 ml 10x, a la cual se le agregó los 19 mg de MgCl<sub>2</sub> y se aforó a 200 ml con agua Milli-Q, se oxígeno por 30 minutos y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 2 M.

A partir de la solución 1x se prepararon las siguientes soluciones de trabajo el día del sacrificio del animal:

- Solución Tyrode con EGTA-HEPES (**solución de lavado**): 100 ml Solución Tyrode 1x +100 µL de EGTA-HEPES a una concentración 0.5 M.

Nota: Solución EGTA-HEPES 0.5 M: 9.5 g EGTA (etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter) - ácido N, N, N', N' -tetraacético; fórmula  $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$ ) + 5.9 g HEPES (ácido 4- (2-hidroxiethyl) -1-piperazinetanosulfónico; fórmula  $C_8H_{18}N_2O_4S$ ) en 50 ml de agua Milli-Q. Ajustado a pH 7.4.

- Solución Tyrode con colagenasa tipo II (**solución uno**): 30 ml de Solución Tyrode 1x + 21 mg de colagenasa tipo II + 15  $\mu$ L de  $CaCl_2$  100 mM.
- Rampa de calcio:
  - a) Composición de **solución dos**: 15 ml Solución Tyrode 1x + 150 mg de BSA (albúmina de suero bovino) + 12.5  $\mu$ L de  $CaCl_2$  100 mM.
  - b) Composición de **solución tres a seis**: 10 ml Solución Tyrode 1x + 60 mg de BSA + 25  $\mu$ L de  $CaCl_2$  100 mM.

### 6.3. Aislamiento de los cardiomiocitos ventriculares de corazones de rata.

Los animales fueron anestesiados con 100 mg/kg de pentobarbital por vía intraperitoneal y se les inyectó heparina (103 U/kg) por la misma vía. La heparina se administró para evitar la trombosis sanguínea.

En el momento en el que no hubo reflejo pedal. Se procedió a abrir la caja torácica para remover el corazón, cortando el tejido conectivo y el corazón se recibió con la solución EGTA-HEPES (**solución de lavado**) en frío (para detenerlo y evitar el preacondicionamiento isquémico), rápidamente se canuló la aorta, conectándola a un sistema de perfusión tipo Langendorff y se perfundió con **solución de lavado** (solución EGTA-HEPES); previamente oxigenada por 30 minutos a una temperatura de 37 °C, en el momento en que la solución de lavado no presento sangre, se cambió a la solución de colagenasa tipo dos (**solución uno**), la perfusión con colagenasa se dejó hasta que la textura del corazón y la velocidad de goteo cambio; con un mínimo de perfusión con colagenasa de 8 minutos.

El corazón se retiró del sistema de perfusión tipo Langendorff y se recibió en una caja de Petri que contenía una solución con: 5 ml de **solución dos** y 2 ml de **solución uno**.

Dentro de esta solución se cortaron los ventrículos de la aurícula y la aorta, los ventrículos se cortaron y disgregaron para obtener los cardiomiocitos, la suspensión celular obtenida se filtró en una malla para separar el tejido de la suspensión celular, realizando varios lavados del tejido con la solución que contenía: 5 ml de **solución uno** y 2 ml de **solución dos**.

La suspensión celular se centrifugó a 500 rpm por dos minutos, pasado este tiempo se retiró el sobrenadante y el botón celular se conservó y se lavó con la **solución tres**, a partir de este lavado dejamos en reposo la suspensión celular para que se sedimenten los cardiomiocitos **Figura 10**, retiramos sobrenadante y lavamos el botón celular con solución cuatro, volvemos a dejar sedimentar y retiramos sobrenadante, lavamos con **solución cinco** y dejamos sedimentar a los cardiomiocitos, realizamos un último lavado con **solución seis**.

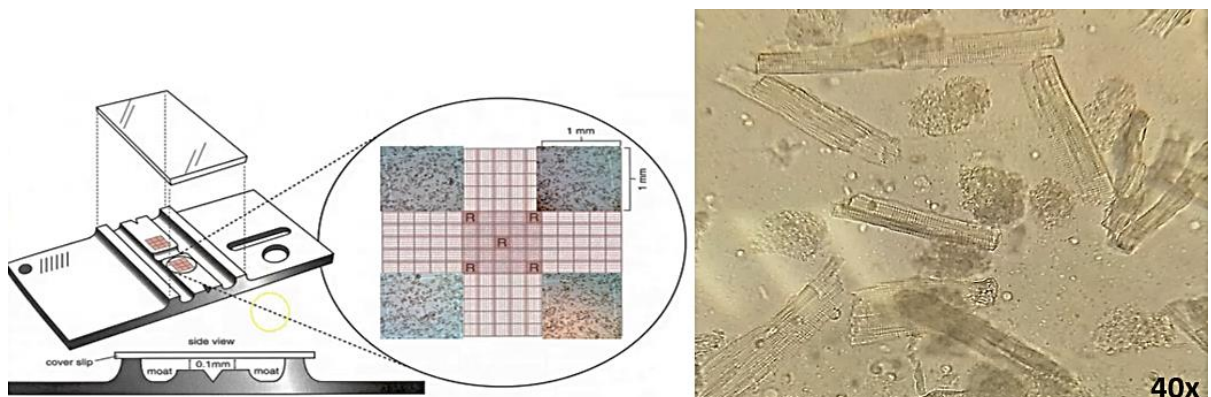




**Figura 10.** Suspensión celular.

#### 6.4. Determinación del rendimiento celular y viabilidad celular de acuerdo a su morfología.

Al terminar los lavados, se conservó 5 ml de suspensión celular, la cual fue resuspendida, para tomar de 10  $\mu\text{L}$  de la muestra, los cuales se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo celular **Figura 11**. En el conteo solo se tomó en cuenta células viables (células en forma de bastón con clara forma alargada y estriación definidas, membrana celular lisa y regular).



**Figura 11.** Cámara de Neubauer con muestra de suspensión celular. Tomado y modificado de <https://www.youtube.com/watch?v=Xth6q4LYwQQ>

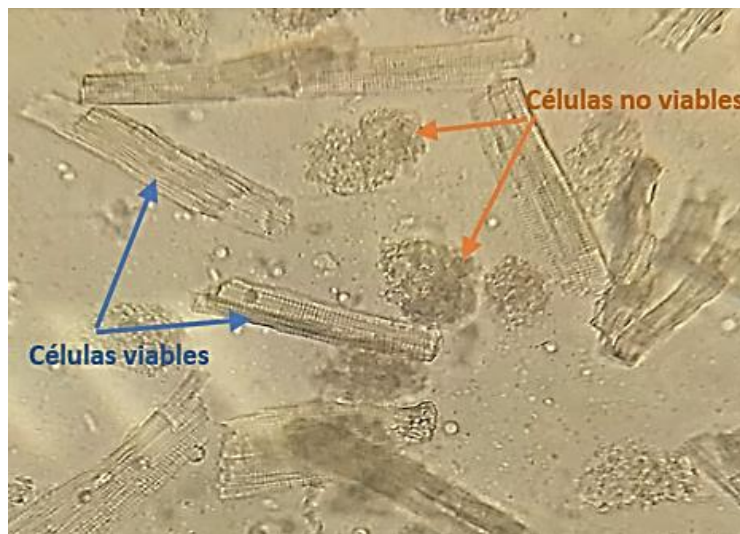
El cálculo se realizó de la siguiente forma: contando los cardiomiocitos viables de los 4 cuadrantes este número se dividió en 4, el resultado se multiplica por 10 000 lo cual nos dio el número de células por mililitro de suspensión celular. A partir de este conteo separamos las células necesarias para nuestro control negativo; células sin MitoSOX.

Viabilidad celular de acuerdo a su morfología.

Al igual que para la evaluación de número de células por mililitro se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de suspensión celular homogeneizada y se realizó el conteo en un portaobjetos. Las células se clasificarán de la siguiente forma (Pivet, 2010; Bautista, 2017):

- Viables: Células en forma de bastón con clara forma alargada con estriado de sarcómeras definidas, membrana celular lisa y regular.
- No viables: Células de forma redonda sin estrías claras y contractura aparente

Cálculo del porcentaje de viabilidad: células vivas/ células totales= dato obtenido por 100



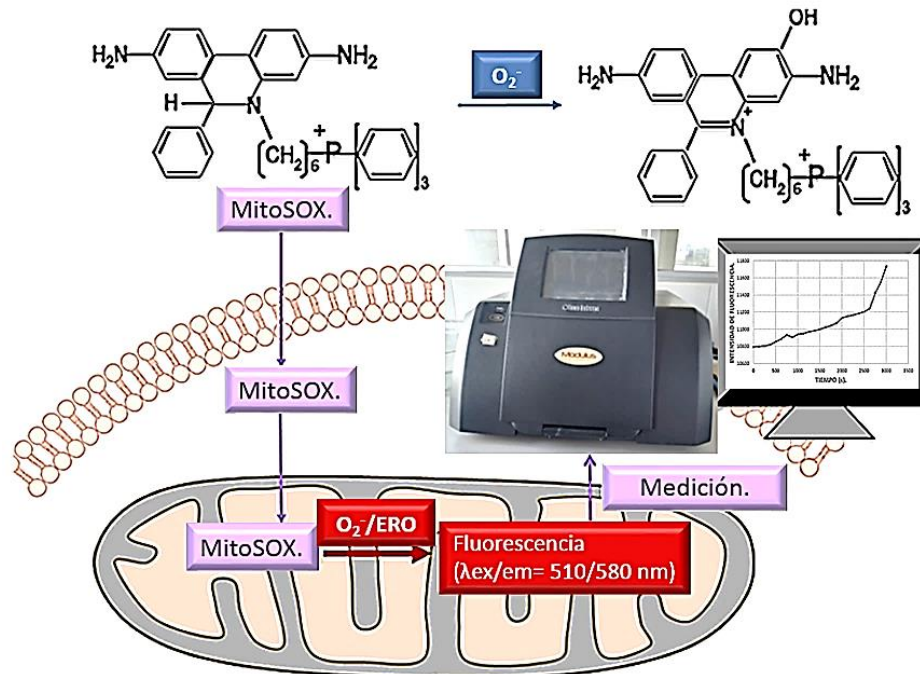
**Figura 12.** Cardiomiocitos aislados de rata macho de la cepa Wistar (Micrografía a 40X). Células viables en forma de bastón con clara forma alargada con estriado de sarcómeras, membrana celular lisa y regular. Células no viables de forma redonda, sin estrías claras (Pivet, 2010).

### 6.5. Incubación con la sonda MitoSOX Red y exposición a los tratamientos para evaluar la producción de ERO mitocondrial en cardiomiocitos aislados.

A partir del primer conteo separamos las células necesarias para nuestro control negativo; células sin MitoSOX Red.

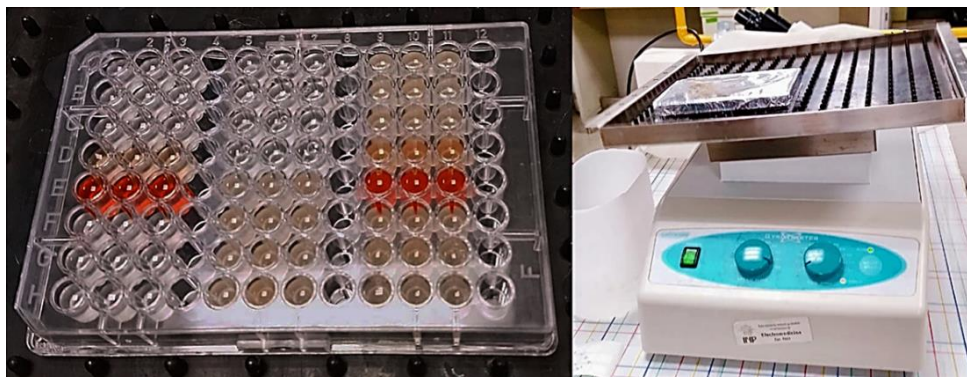
El resto se incubó a oscuridad por 15 minutos con MitoSOX Red; MitoSOX Red es un colorante fluorógeno para la detección altamente selectiva de superóxido en las mitocondrias de células vivas. Se dirige rápida y selectivamente a la mitocondria. Una vez en la mitocondria, el reactivo MitoSOX™ Red se oxida por superóxido y exhibe fluorescencia roja **Figura 13.**

Pasado este tiempo se retiró el sobrenadante y el botón se lavó con **solución 6** dejando un total de 5 ml de suspensión celular para realizar el cálculo de viabilidad celular y el número de células por mililitro. A partir de este segundo conteo se realizó el cálculo para colocar en una microplaca 5000 células por pozo, tanto para las células sin MitoSOX Red (control) como las incubadas con MitoSOX Red **Figura 14.**



**Figura 13.** Ilustración esquemática de la acción del MitoSOX para detectar ERO. La carga positiva de MitoSOX es responsable de su acumulación intra-mitocondrial. Tomada y editada de Kauffman et al., 2016.

Las células se expusieron a concentraciones 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , por cada Cas (Cas III-Ea, Cas III-ia, Cas II-gly); se mantuvo la microplaca a 10 minutos en movimiento y oscuridad. También se manejaron concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  de CCCP (carbonil-cianuro-m-clorofenilhitrazona), 100  $\mu\text{M}$  de Rotenona, y 20  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  de DOX como controles positivos en la producción de ERO mitocondrial; para estos tratamientos se mantuvo la microplaca 5 minutos en movimiento y oscuridad **Figura 14**. Cada concentración se manejó por triplicado. Y se repitió seis veces ( $n=6$ ).



**Figura 14.** Exposición de los cardiomiocitos aislados por los diferentes tratamientos.

Al terminar los periodos de tiempo indicados se realizó una cinética de producción de fluorescencia (25 lecturas cada dos minutos en el espectrofluorómetro) para evaluar la capacidad de producción de ERO mitocondrial por cada tratamiento.

### 6.6. Evaluación de la formación de ERO mitocondrial *in situ*.

Para esta evaluación se realizó el cálculo para colocar en una microplaca 5000 células por pozo; células previamente incubadas con la sonda MitoSOX Red. Cada concentración se manejó por triplicado como en la cinética de producción de fluorescencia. Las células se expusieron con concentraciones 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , por cada Cas (Cas III-Ea, Cas III-ia, Cas II-gly); se mantuvo la microplaca a 10 minutos en movimiento y oscuridad. Manejamos concentraciones 100  $\mu\text{M}$  de CCCP, 100  $\mu\text{M}$  de Rotenona, 20  $\mu\text{M}$  de DOX y 600  $\mu\text{M}$  de DOX como controles positivos en la formación de ERO mitocondrial; se mantuvo la microplaca a 5 minutos en movimiento y oscuridad. Pasando el tiempo de exposición se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de un pozo de cada concentración para las preparaciones laminares. Por cada concentración se registraron 10 cardiomiocitos ( $n= 10$ ) con el microscopio de fluorescencia Olympus. La fluorescencia emitida por cada cardiomiocito se evaluó con el programa ImageJ; software digital de procesamiento de imágenes científicas multidimensionales.

### 6.7. Cambios en la viabilidad con respecto al tiempo.

Para esta evaluación todas las células se incubaron con MitoSOX Red, a partir de esta suspensión celular se calculó el número de células por mililitro y viabilidad inicial, con los resultados obtenidos se hizo el cálculo para colocar en cada tubo Eppendorf 100 000 células, para cada concentración y reactivo; el volumen final fue de un mililitro, este volumen se completó con **solución 6**. La exposición a los tratamientos fue la misma que se realizó en la obtención de la cinética de producción de fluorescencia. Se manejo control negativo (células con MitoSOX Red), controles positivos (100  $\mu\text{M}$  de CCCP, 100  $\mu\text{M}$  de Rotenona, 20  $\mu\text{M}$  de DOX y 600  $\mu\text{M}$  de DOX), y nuestro fármaco Cas III-Ea, III-ia, II-gly (10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  por cada Cas). El porcentaje de viabilidad se calculó por 80 minutos, evaluando la viabilidad a diferentes intervalos de tiempo:

Control negativo y tratamientos con Cas en intervalos de tiempo de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 minutos. Por concentración y reactivo.

Controles positivos en intervalos de tiempo de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 minutos. Por concentración y reactivo.

Los experimentos se repitieron seis veces ( $n=6$ ) por cada grupo de tratamiento.

### 6.8. Análisis estadístico.

Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Para comprobar si existe alguna diferencia significativa para cada grupo tratado contra el grupo sin tratamiento se realizó la prueba *t de Student*. Para la comparación de más de dos grupos se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett utilizando GraphPad Prism 5 (V.5.01; La Jolla, CA, EE. UU.). El valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.





Figura 15. Diagrama del procedimiento.

## 7. Resultados.

### 7.1. Producción de ERO mitocondrial con y sin la sonda MitoSOX Red.

Es importante estudiar los cambios con base a un determinado periodo de tiempo para comprender las alteraciones producidas por los tratamientos. Para verificar que la sonda MitoSOX Red en efecto determina la presencia y producción de ERO en las mitocondrias de cardiomiocitos aislados, se analizaron células con y sin la sonda MitoSOX Red por medio de una cinética de producción de fluorescencia en un periodo de 50 minutos (25 lecturas) en el espectrofluorómetro **Figura 16-17**. Este tiempo se eligió ya que se observa una respuesta significativa en la fluorescencia. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada grupo de tratamiento y se repitieron seis veces (n=6). En el **Cuadro 3** se muestran los resultados de la capacidad de producción de ERO mitocondrial por la exposición a los diferentes tratamientos (a los 50 minutos) tanto de las células no incubadas como las incubadas con la sonda MitoSOX Red, donde se observa un aumento significativo en la producción de ERO mitocondrial en todos los tratamientos con la sonda MitoSOX Red.

**Cuadro 3.** Producción de ERO mitocondrial con y sin la sonda MitoSOX Red.

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración μM.</b>	<b>RFU/Tiempo (sin la sonda MitoSOX Red).</b>	<b>RFU/Tiempo (con la sonda MitoSOX Red).</b>
<b>Solo células (control basal).</b>	0	-0.0003 ± 0.00019	0.0047 ± 0.0010*
<b>Rotenona (C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>).</b>	100	-0.0004 ± 0.00009	0.0195 ± 0.0017**
<b>CCCP (carbonil-cianuro-m clorofenilhitrazona).</b>	100	-0.0005 ± 0.00015	0.0177 ± 0.0015**
<b>Doxorrubicina.</b>	20	-0.0725 ± 0.01736	0.0814 ± 0.0052**
	600	-0.1075 ± 0.06493	0.2376 ± 0.0054**
<b>Casiopeína III-Ea.</b>	10	0.0001 ± 0.00076	0.0064 ± 0.0011**
	30	-0.0003 ± 0.00038	0.0038 ± 0.0011**
	80	-0.0004 ± 0.00037	0.0040 ± 0.0009**
	100	-0.0006 ± 0.00051	0.0044 ± 0.0011**
<b>Casiopeína III-ia.</b>	10	-0.0004 ± 0.00045	0.0080 ± 0.0017**
	30	-0.0005 ± 0.00044	0.0052 ± 0.0017**
	80	-0.0003 ± 0.00081	0.0059 ± 0.0018**
	100	-0.0007 ± 0.00020	0.0077 ± 0.0010**
<b>Casiopeína II-gly.</b>	10	-0.0002 ± 0.00028	0.0066 ± 0.0014**
	30	-0.0003 ± 0.00013	0.0032 ± 0.0013**
	80	-0.0005 ± 0.00018	0.0035 ± 0.0012**
	100	-0.0004 ± 0.00037	0.0046 ± 0.0017**

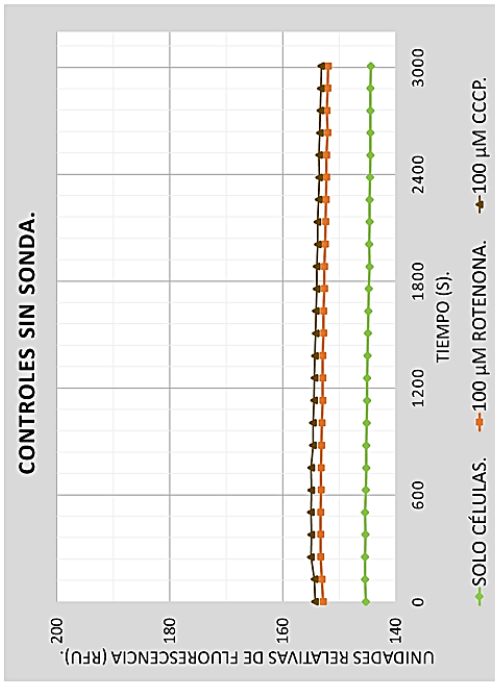
Datos expresados por la media ± desviación estándar. Seis repeticiones por cada concentración de cada tratamiento.

\*p<0.05 comparado con los tratamientos (RFU/Tiempo) sin la sonda MitoSOX Red utilizando la prueba *t* de Student.

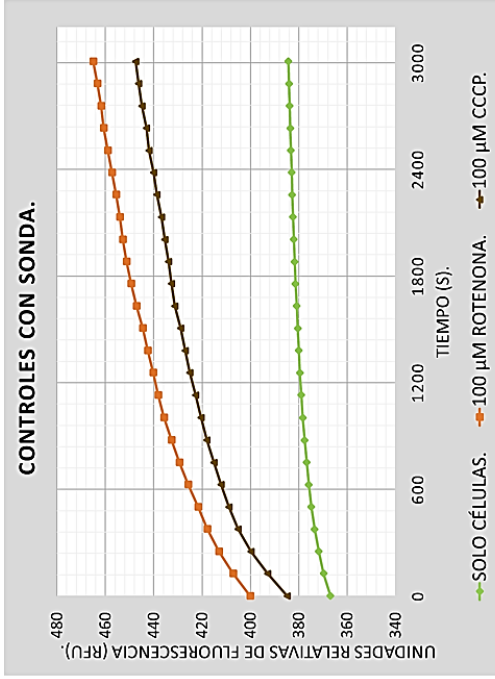
\*p<0.05 comparado con el control basal (RFU/Tiempo; con la sonda MitoSOX Red) utilizando ANOVA-Dunnett.

\*p<0.05 comparado con Doxorrubicina 20 μM (RFU/Tiempo; con la sonda MitoSOX Red) utilizando ANOVA-Dunnett.

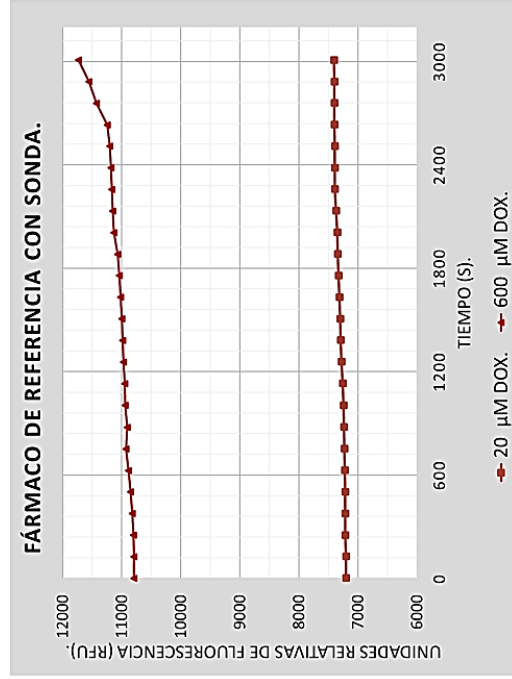
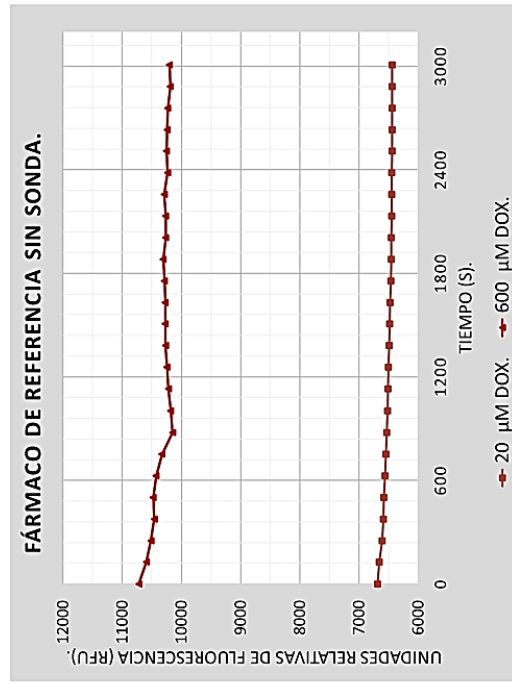
### Células sin sonda MitoSOX Red.



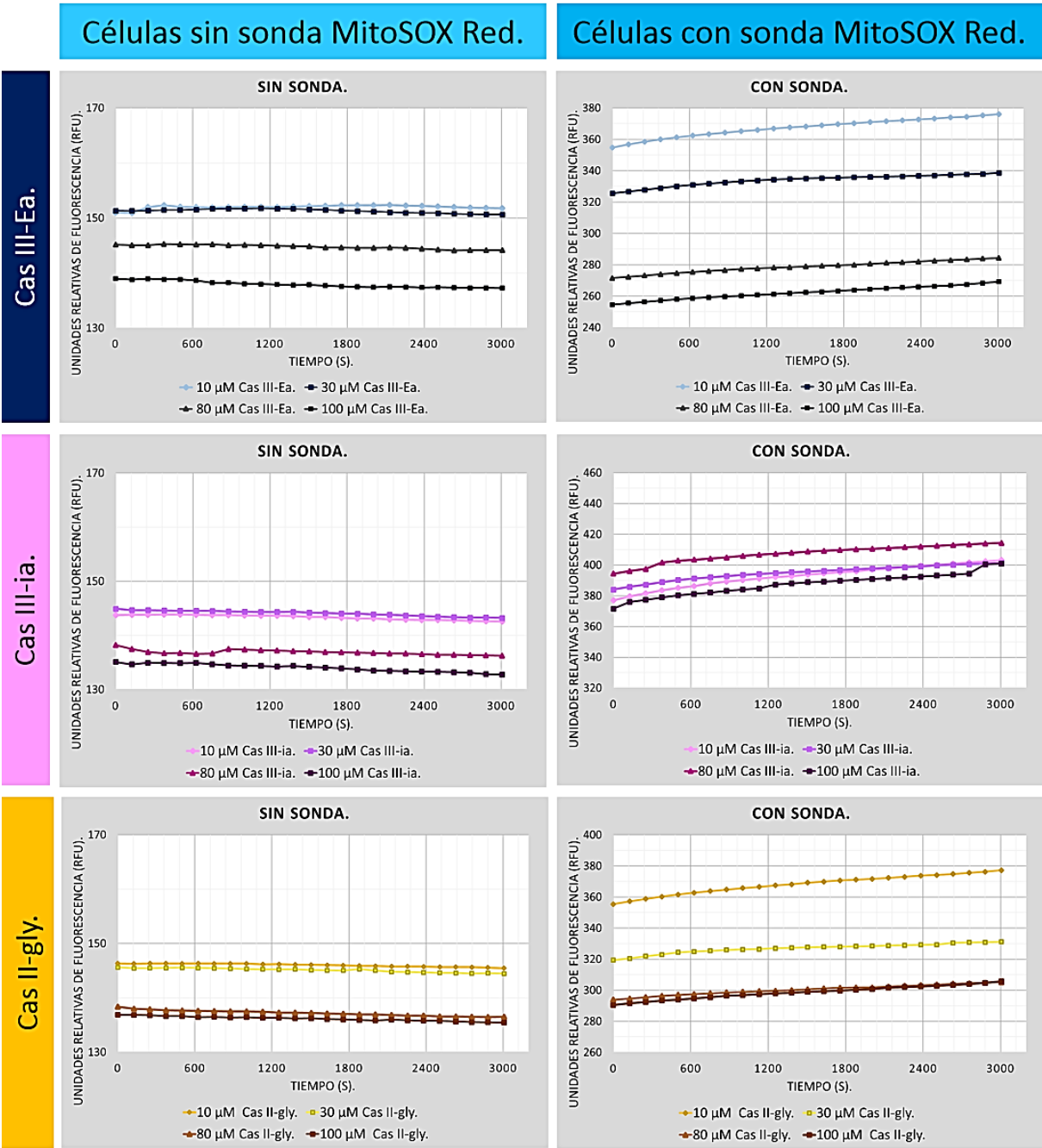
### Células con sonda MitoSOX Red.



### Doxorrubicina.



**Figura 16.** Cinética de producción de fluorescencia con y sin la sonda MitoSOX Red. En un periodo de 50 minutos (25 lecturas). Los datos están presentados por la media de seis repeticiones (n=6) para cada tratamiento.



**Figura 17.** Cinética de producción de fluorescencia con y sin la sonda MitoSOX Red. En un periodo de 50 minutos (25 lecturas). Los datos están presentados por la media de seis repeticiones (n=6) para cada tratamiento.

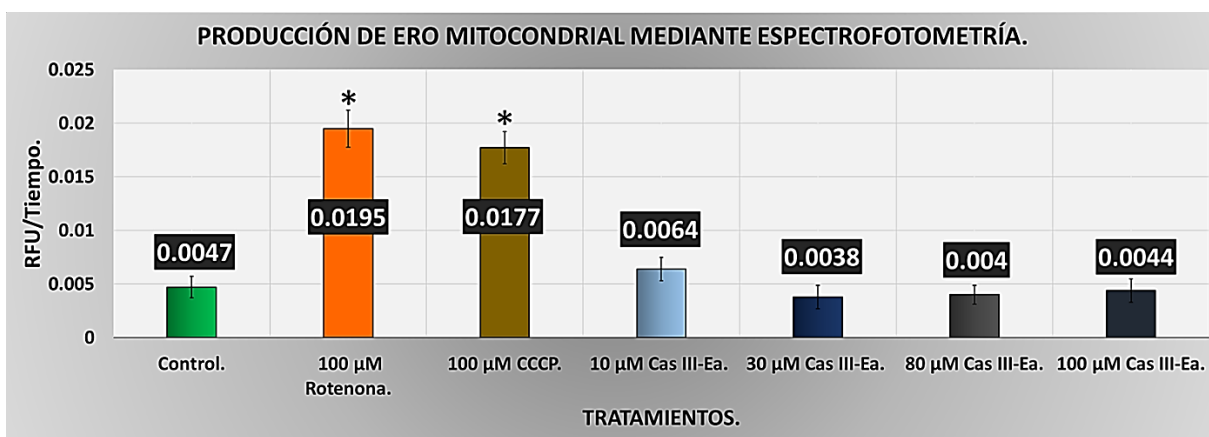
**7.2. Producción de ERO mitocondrial en cardiomiocitos aislados por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones.**

A partir de los datos obtenidos por la cinética de producción de fluorescencia (cardiomiocitos incubados con la sonda MitoSOX Red) se realizó el análisis estadístico para determinar el efecto que tienen los tratamientos sobre la producción de ERO mitocondrial.

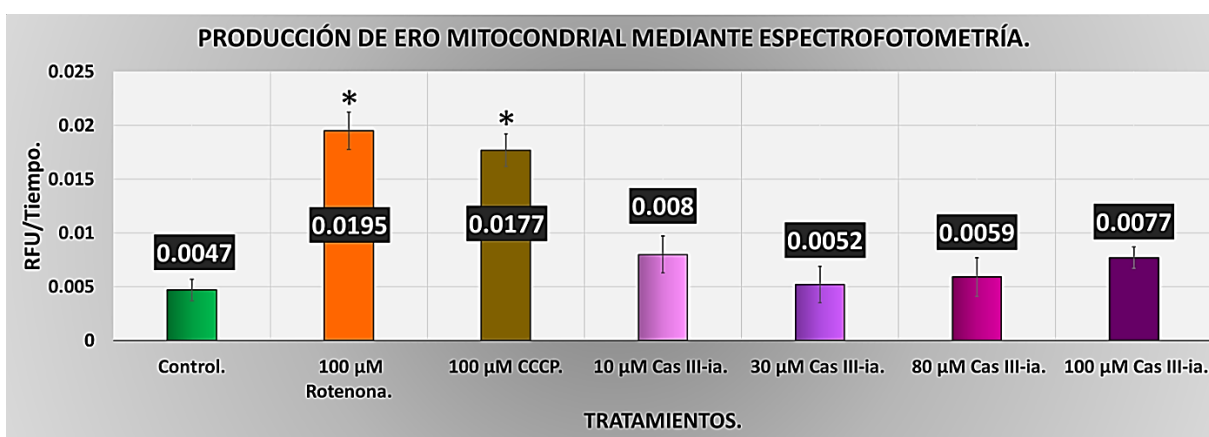


Los resultados de la producción de ERO mitocondrial a los 50 minutos se presentan en el **Cuadro 3**, donde se observa que los tratamientos con 100  $\mu\text{M}$  de CCCP, 100  $\mu\text{M}$  de Rotenona, 20  $\mu\text{M}$  y 600  $\mu\text{M}$  de DOX incrementaron la producción de ERO mitocondrial de forma estadísticamente significativa con respecto al control basal de la producción de ERO mitocondrial. En los tratamientos con Cas no se observó un incremento en la producción de ERO mitocondrial de forma estadísticamente significativa con respecto al control basal **Figura 18-20**.

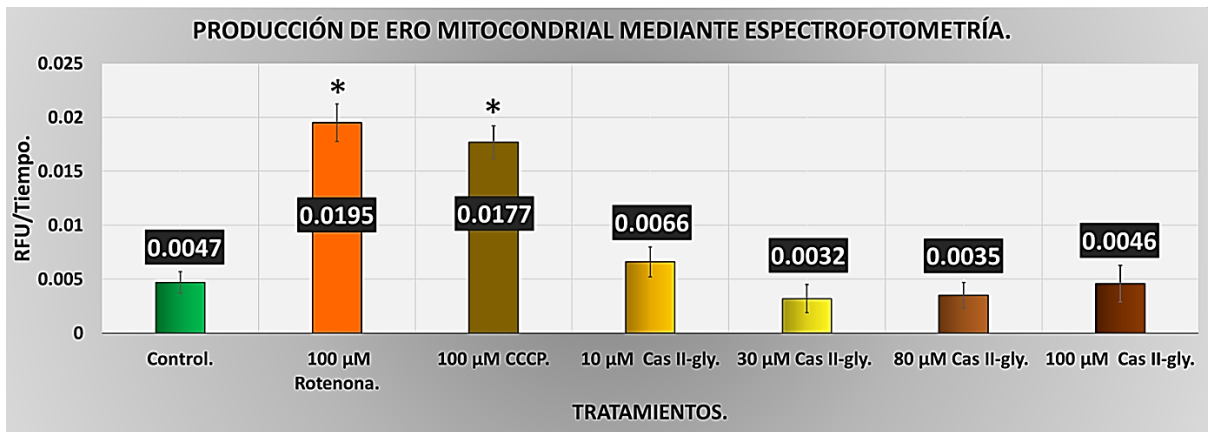
Y al comparar los efectos entre el fármaco de referencia 20  $\mu\text{M}$  de DOX y los diferentes tratamientos con Cas se puede observar que hay diferencias estadísticamente significativas en la producción de ERO mitocondrial **Figura 21-23**.



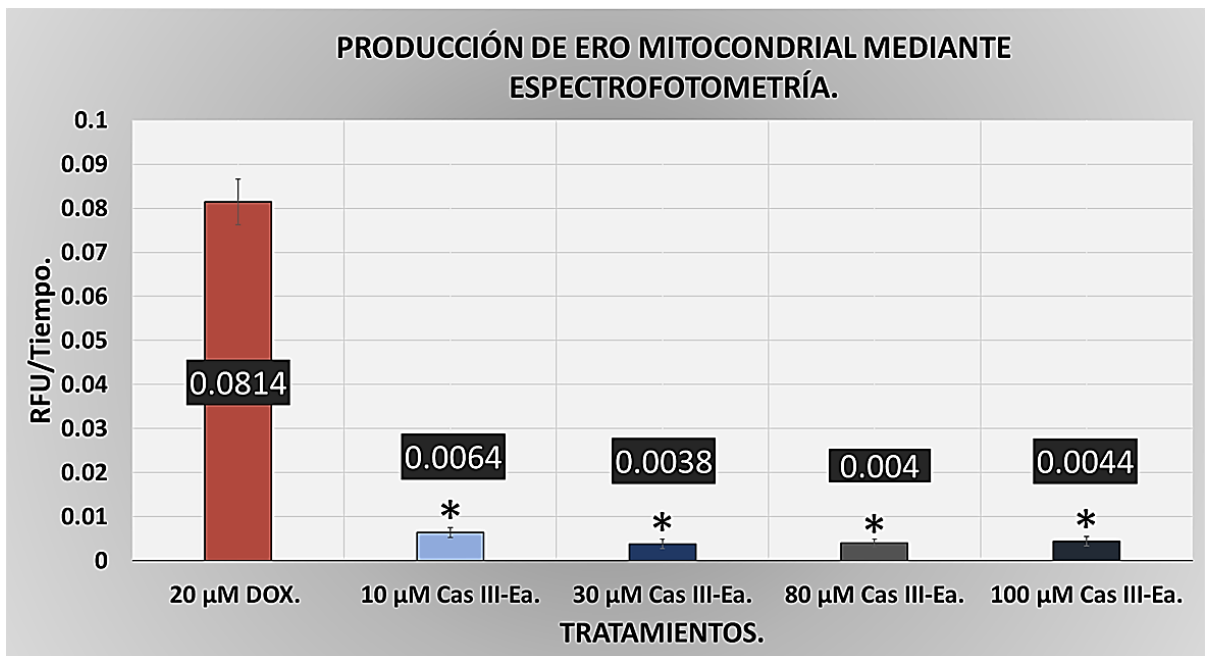
**Figura 18.** Producción de ERO mitocondrial por los tratamientos con 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  de Cas III-Ea. Los datos están representados por la media  $\pm$  desviación estándar de las seis repeticiones (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett).



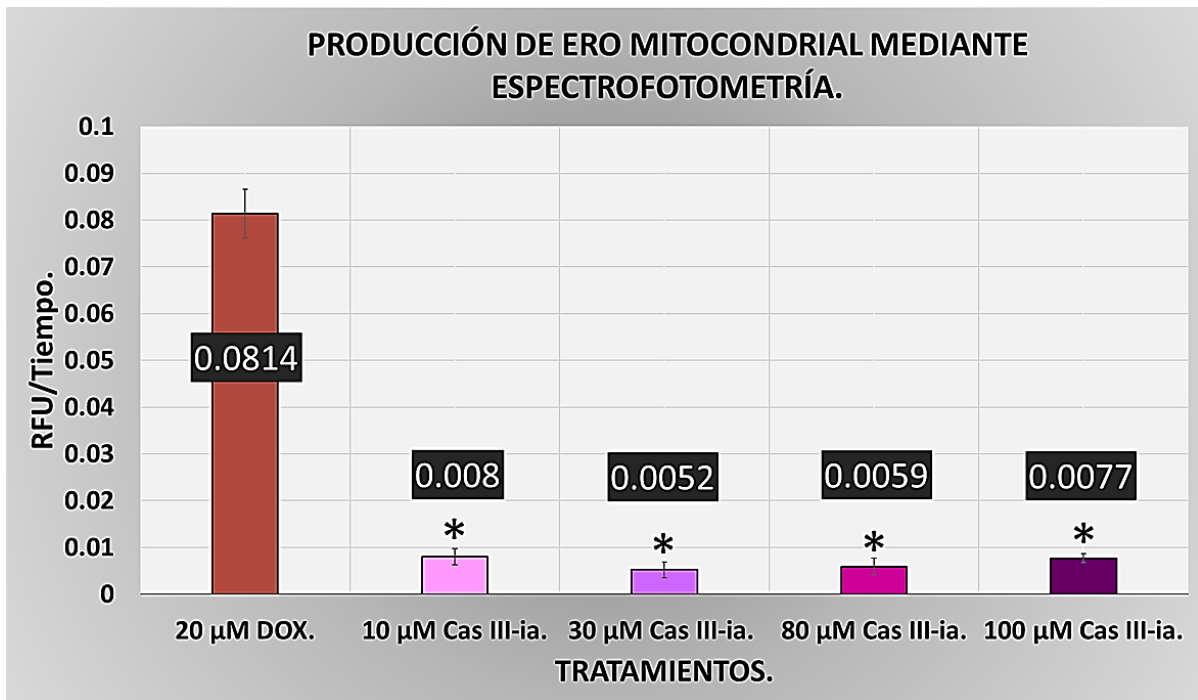
**Figura 19.** Producción de ERO mitocondrial por los tratamientos con 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  de Cas III-ia. Los datos están representados por la media  $\pm$  desviación estándar de las seis repeticiones (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett).



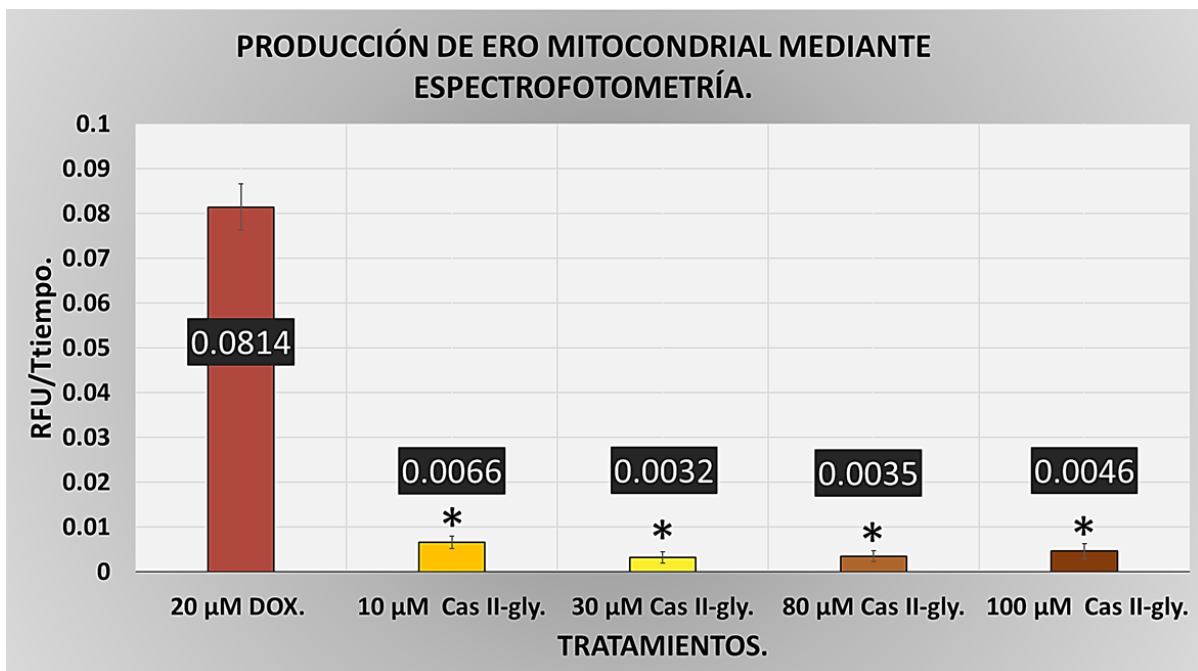
**Figura 20.** Producción de ERO mitocondrial por los tratamientos con 10 μM, 30 μM, 80 μM, 100 μM de Cas II-gly. Los datos están representados por la media ± desviación estándar de las seis repeticiones (\*p<0.05 respecto al control, ANOVA-Dunnett).



**Figura 21.** Producción de ERO mitocondrial por los tratamientos con 10 μM, 30 μM, 80 μM, 100 μM de Cas III-Ea. Los datos están representados por la media ± desviación estándar de las seis repeticiones (\*p<0.05 respecto al grupo 20 μM DOX, ANOVA-Dunnett).



**Figura 22.** Producción de ERO mitocondrial por los tratamientos con 10 μM, 30 μM, 80 μM, 100 μM de Cas III-ia. Los datos están representados por la media ± desviación estándar de las seis repeticiones (\* $p < 0.05$  respecto al grupo 20 μM DOX, ANOVA-Dunnett).



**Figura 23.** Producción de ERO mitocondrial por los tratamientos con 10 μM, 30 μM, 80 μM, 100 μM de Cas II-gly. Los datos están representados por la media ± desviación estándar de las seis repeticiones (\* $p < 0.05$  respecto al grupo 20 μM DOX, ANOVA-Dunnett).

### 7.3. Formación de ERO mitocondrial *in situ* por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones.

La fluorescencia puede detectarse mediante espectrofotometría de fluorescencia y visualizarse mediante microscopía de fluorescencia (imágenes de fluorescencia), o citometría de flujo. Las imágenes basadas en microscopía de fluorescencia permiten la visualización *in situ* de la formación de ERO en células o tejidos.

Los resultados de la intensidad de fluorescencia emitida por los diferentes tratamientos se presentan en el **Cuadro 4** como densidad óptica media por unidad de área (DO/A). Y en las **Figura 24-27**, se muestran imágenes representativas por cada tratamiento.

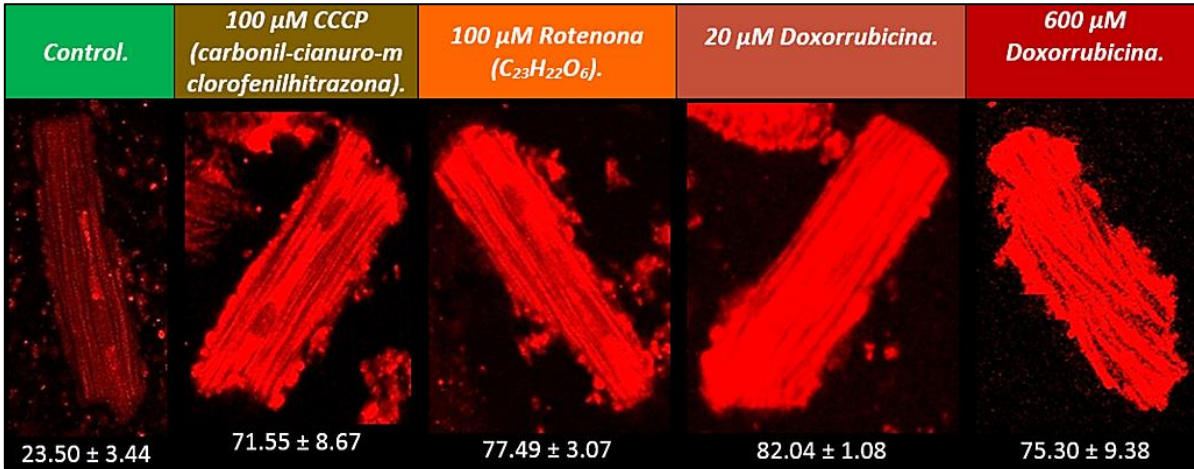
En la **Figura 29-30**, se observa que la intensidad de fluorescencia aumentó significativamente en todas las concentraciones con Cas III-Ea y Cas III-ia con respecto al control, en el tratamiento con Cas II-gly solo las concentraciones 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M aumentan la intensidad de fluorescencia de forma significativa con respecto al control **Figura 31**. Y al comparar los efectos entre el fármaco de referencia 20  $\mu$ M DOX y los diferentes tratamientos con Cas se puede observar que solo la concentración de 100  $\mu$ M de Cas III-Ea presenta una intensidad de fluorescencia similar a DOX **Figura 29**.

**Cuadro 4.** Formación de ERO mitocondrial (*in situ*) en cardiomiocitos aislados determinados por la intensidad de fluorescencia de la sonda MitoSOX Red después de los tratamientos.

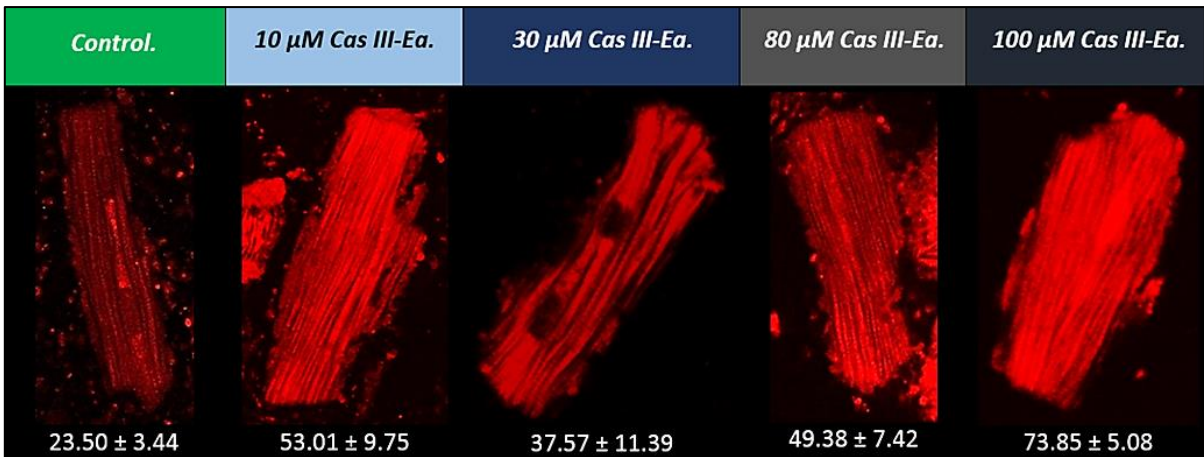
<b>Tratamiento.</b>	<b>Concentración <math>\mu</math>M.</b>	<b>Repetición (n).</b>	<b>Fluorescencia (DO/A)</b>
<b>Solo células (Control).</b>	0	10	23.50 $\pm$ 3.44
<b>Rotenona (C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>).</b>	100	10	77.49 $\pm$ 3.07*
<b>CCCP (carbonil-cianuro- m clorofenilhitrazona).</b>	100	10	71.55 $\pm$ 8.67*
<b>Doxorrubicina.</b>	20	10	82.04 $\pm$ 1.08*
	600	10	75.30 $\pm$ 9.38*
<b>Casiopéina III-Ea.</b>	10	10	53.01 $\pm$ 9.75*
	30	10	37.57 $\pm$ 11.39*
	80	10	49.38 $\pm$ 7.42*
	100	10	73.85 $\pm$ 5.08*
<b>Casiopéina III-ia.</b>	10	10	56.95 $\pm$ 7.62*
	30	10	42.08 $\pm$ 5.78*
	80	10	54.08 $\pm$ 6.99*
	100	10	69.40 $\pm$ 6.60*
<b>Casiopéina II-gly.</b>	10	10	52.96 $\pm$ 5.14*
	30	10	20.02 $\pm$ 5.22
	80	10	14.38 $\pm$ 1.03
	100	10	40.75 $\pm$ 7.14*

Datos expresados por la media  $\pm$  desviación estándar. Diez repeticiones por cada concentración de cada tratamiento.

\*p<0.05 comparado con el control utilizando ANOVA-Dunnett.

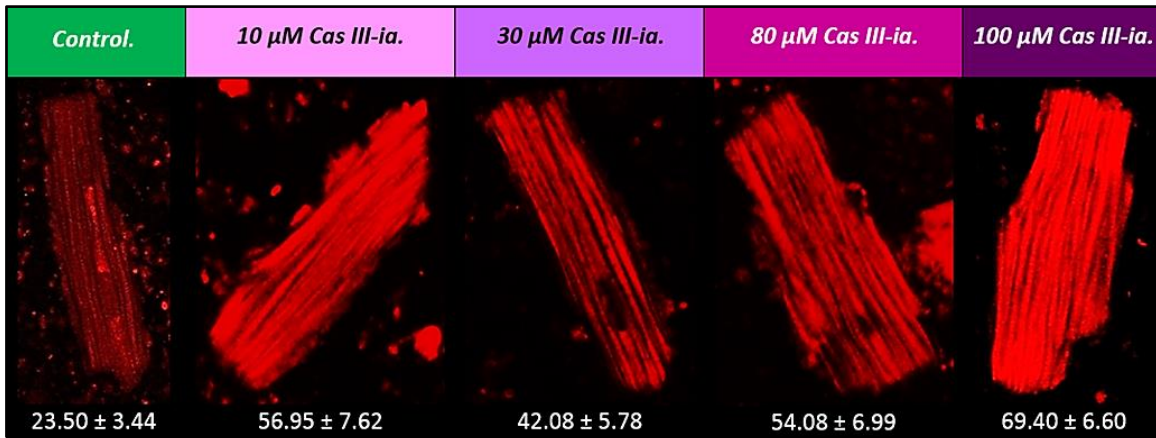


**Figura 24.** Micrografía a 60x de cardiomiocitos aislados de rata. Formación de ERO mitocondrial (*in situ*) después de los diferentes tratamientos. Los datos están representados por la media  $\pm$  desviación estándar de diez cardiomiocitos (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett).

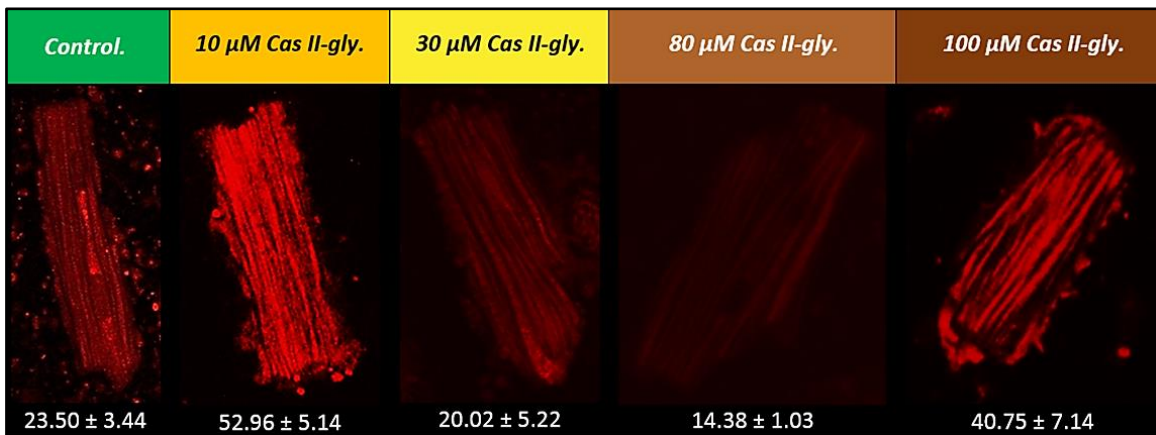


**Figura 25.** Micrografía a 60x de cardiomiocitos aislados de rata. Formación de ERO mitocondrial (*in situ*) después de los tratamientos con Cas III-Ea. Los datos están representados por la media  $\pm$  desviación estándar de diez cardiomiocitos (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett).

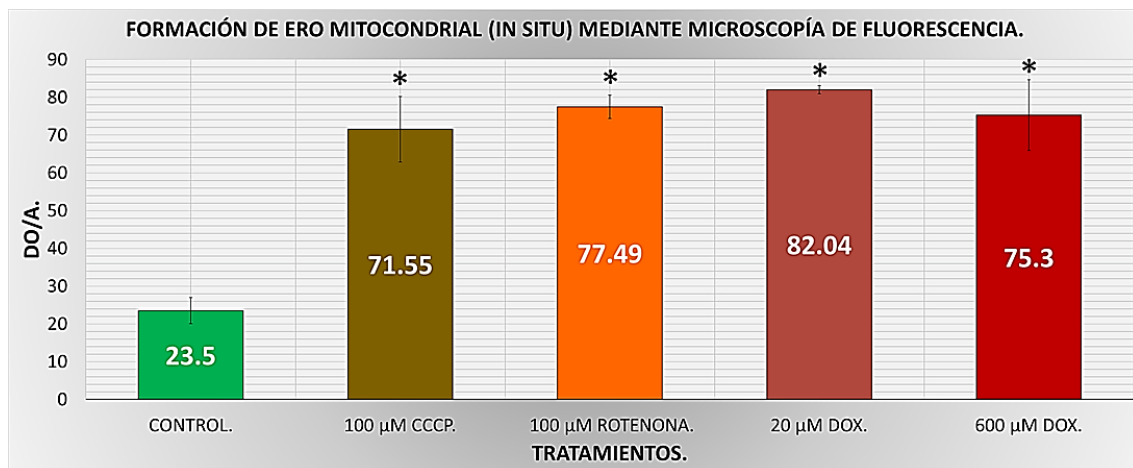




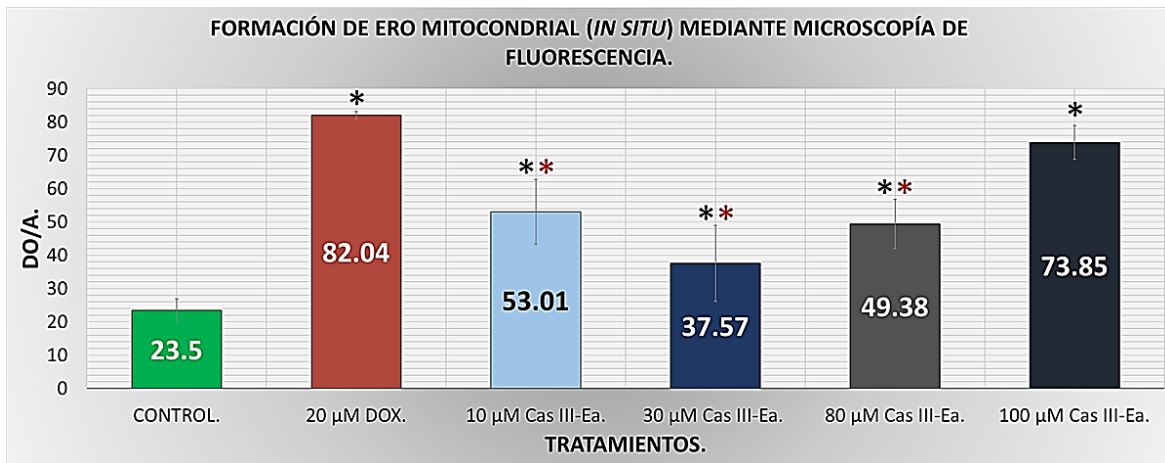
**Figura 26.** Micrografía a 60x de cardiomiocitos aislados de rata. Formación de ERO mitocondrial (*in situ*) después de los tratamientos con Cas III-ia. Los datos están representados por la media  $\pm$  desviación estándar de diez cardiomiocitos (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett).



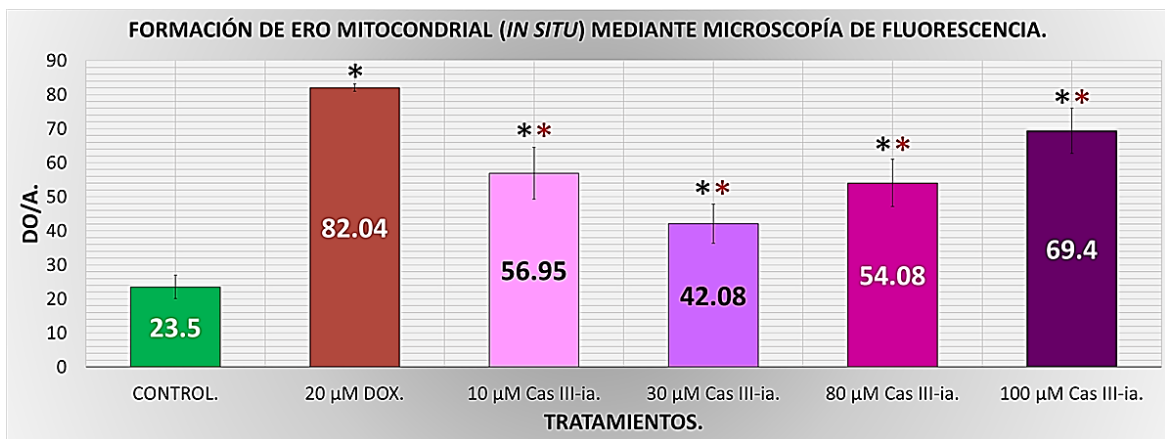
**Figura 27.** Micrografía a 60x de cardiomiocitos aislados de rata. Formación de ERO mitocondrial (*in situ*) después de los tratamientos con Cas II-gly. Los datos están representados por la media  $\pm$  desviación estándar de diez cardiomiocitos (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett).



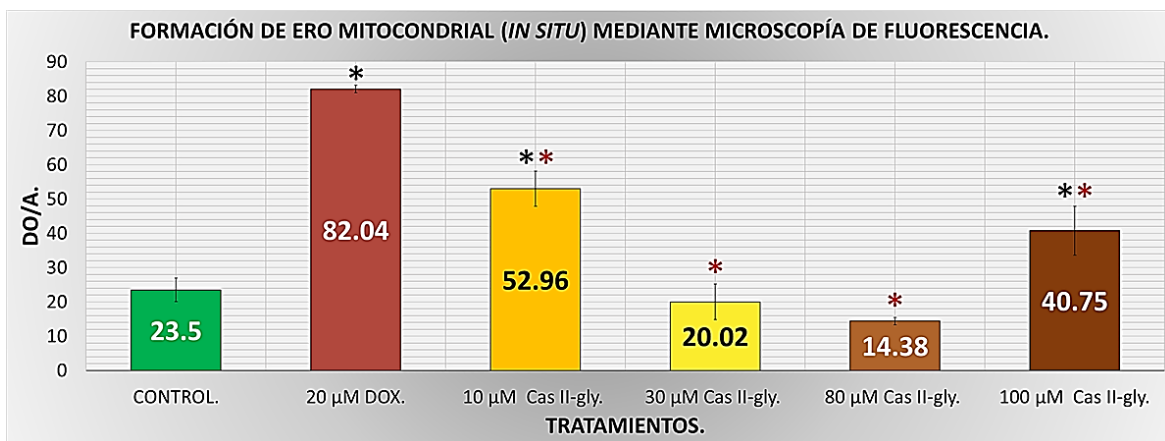
**Figura 28.** Formación de ERO mitocondrial (*in situ*) después de los tratamientos. Los datos están representados por la media  $\pm$  desviación estándar de diez cardiomiocitos (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett).



**Figura 29.** Formación de ERO mitocondrial (*in situ*) después de los tratamientos con Cas III-Ea. Los datos están representados por la media  $\pm$  desviación estándar de diez cardiomiocitos (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett; \*\* $p < 0.05$  respecto a 20  $\mu$ M DOX, ANOVA-Dunnett).



**Figura 30.** Formación de ERO mitocondrial (*in situ*) después de los tratamientos con Cas III-ia. Los datos están representados por la media  $\pm$  desviación estándar de diez cardiomiocitos (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett; \*\* $p < 0.05$  respecto a 20  $\mu$ M DOX, ANOVA-Dunnett).



**Figura 31.** Formación de ERO mitocondrial (*in situ*) después de los tratamientos con Cas II-gly. Los datos están representados por la media  $\pm$  desviación estándar de diez cardiomiocitos (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett; \*\* $p < 0.05$  respecto a 20  $\mu$ M DOX, ANOVA-Dunnett).



#### 7.4. Efecto en la viabilidad por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones en cardiomiocitos aislados de rata.

Para estudiar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la viabilidad en los cardiomiocitos aislados de rata, se evaluó la viabilidad después de diferentes intervalos de tiempo **32-35**, y se repitieron seis veces ( $n=6$ ) por cada grupo de tratamiento. Los resultados se presentan en el **Cuadro 5-8 6-9**.

En el **Cuadro 6 7** se muestran las medias del porcentaje de viabilidad para los tratamientos con Cas III-Ea, donde se observa que se redujo significativamente la viabilidad con las concentraciones 10  $\mu\text{M}$  y 80  $\mu\text{M}$  a partir de los 5 minutos, para las concentraciones 30  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  se redujo significativamente la viabilidad, a los 10 minutos y 30 minutos respectivamente **Figura 33**.

Para los tratamientos con Cas III-ia, los resultados se muestran en el **Cuadro 7 8**, donde se observa que el porcentaje de viabilidad se redujo significativamente a los 30 minutos con la concentración 30  $\mu\text{M}$ , y a los 40 minutos con la concentración 10  $\mu\text{M}$  **Figura 34**.

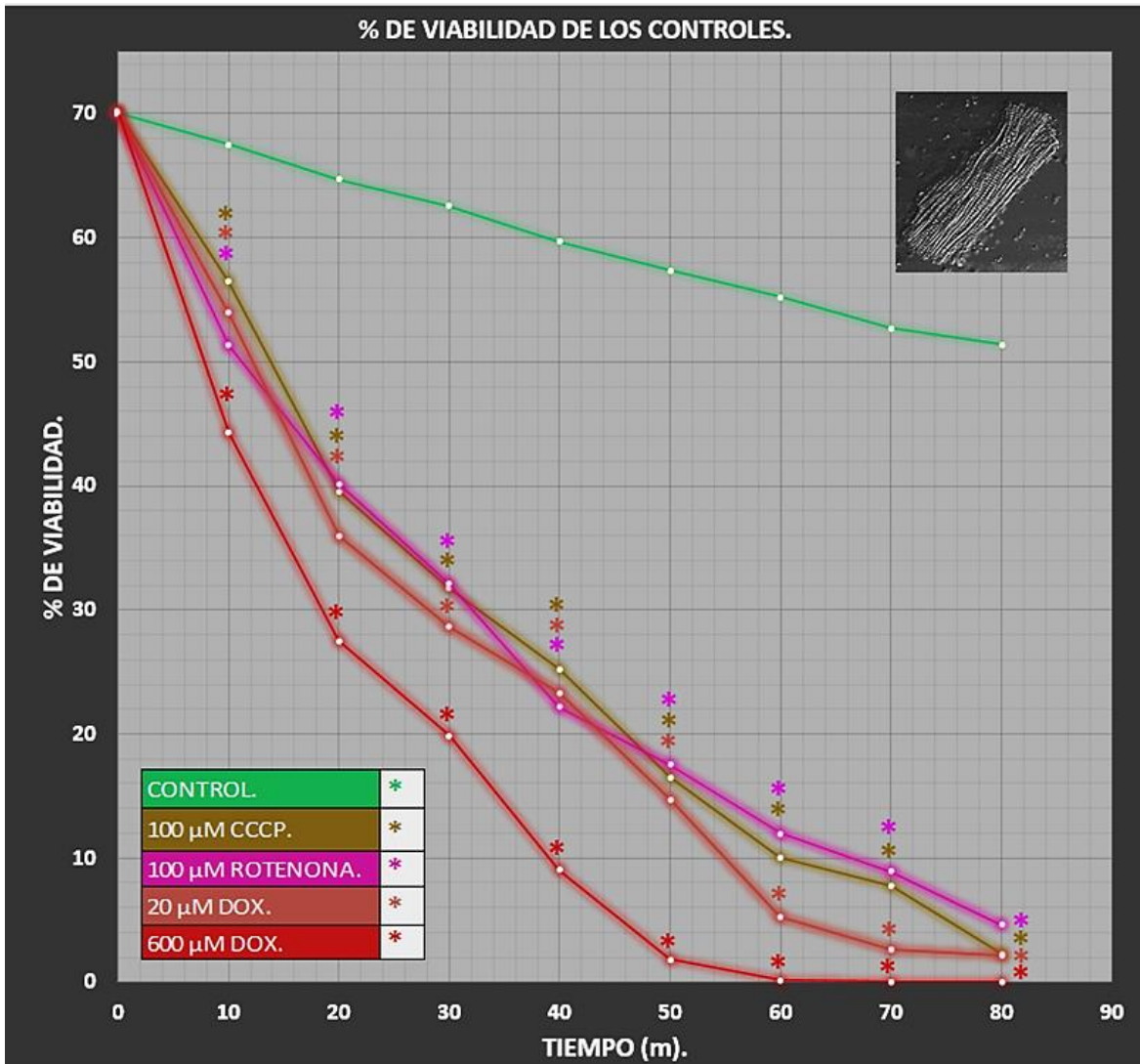
Los resultados de las medias del porcentaje de viabilidad de los tratamientos con Cas II-gly se presentan en el **Cuadro 8 9**, donde se observa que el porcentaje de viabilidad no disminuye de forma estadísticamente significativa en todas las concentraciones con respecto al control **Figura 35**.

En la **Figura 36-39** se muestran las medias del porcentaje de viabilidad final de los diferentes tratamientos. Se puede observar que la disminución en el porcentaje de viabilidad final en el tratamiento con Cas III-Ea resulta estadísticamente significativo para todas las concentraciones con respecto al control **Figura 37**.

En el tratamiento con Cas III-ia disminuyó el porcentaje de viabilidad final de forma estadísticamente significativa en las concentraciones 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$  con respecto al control **Figura 38**.

Para el tratamiento con Cas II-gly se puede observar que la disminución del porcentaje de viabilidad final no resulta estadísticamente significativa en todas las concentraciones con respecto al control **Figura 39**.

Al comparar los efectos de las Cas con el fármaco de referencia 20  $\mu\text{M}$  DOX se puede observar que hay diferencias estadísticamente significativas sobre la viabilidad final de los cardiomiocitos aislados de rata en todos los tratamientos **Figura 37-39**.



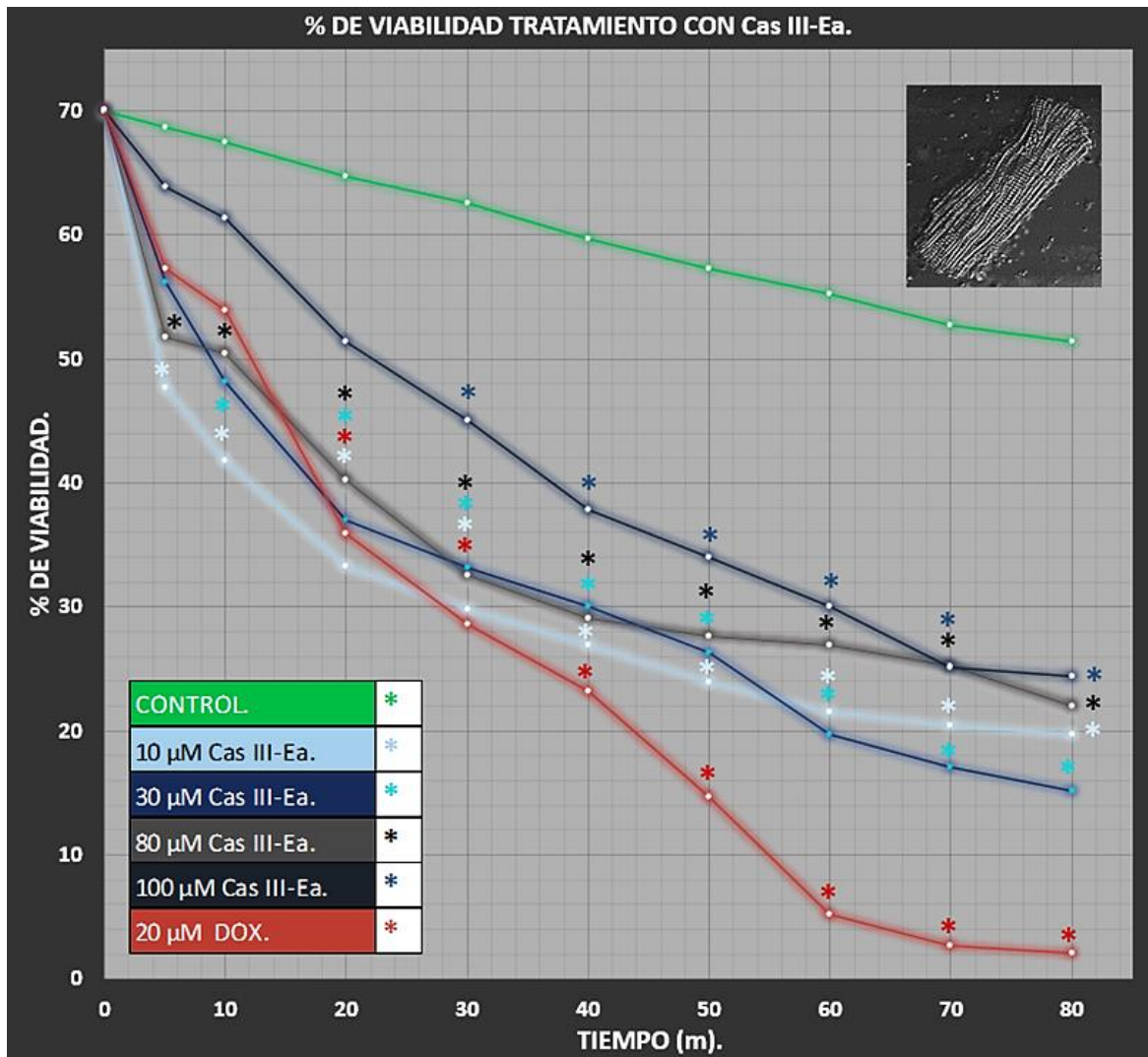
**Figura 32.** Cambios en el % viabilidad de cardiomiocitos aislados de rata. Los datos están representados por la media de seis repeticiones para cada tratamiento (\*p<0.05 respecto al control, ANOVA-Dunnett).

**Cuadro 5.** Porcentaje de viabilidad de cardiomiocitos aislados de rata a diferentes intervalos de tiempo (Controles).

Tratamiento.	Porcentaje de viabilidad a diferentes intervalos de tiempo (minutos).									
	0	5	10	20	30	40	50	60	70	80
Solo células (control).	70 ± 0.5	68.6 ± 1	67.5 ± 1	64.6 ± 3	62.5 ± 3	59.6 ± 4	57.3 ± 6	55.2 ± 6	52.6 ± 6	51.3 ± 6
100 μM CCCP.	70.1 ± 0.5	-----	56.5 ± 4*	39.4 ± 1*	31.7 ± 3*	25.1 ± 2*	16.4 ± 4*	10 ± 5*	7.8 ± 4*	2.2 ± 3*
100 μM Rotenona.	70 ± 0.5	-----	51.3 ± 6*	40.1 ± 7*	32 ± 5*	22.1 ± 5*	17.5 ± 6*	11.9 ± 6*	8.9 ± 5*	4.6 ± 4*
20 μM DOX.	70 ± 0.6	-----	53.9 ± 7*	35.9 ± 11*	28.6 ± 9*	23.2 ± 8*	14.7 ± 6*	5.2 ± 4*	2.6 ± 3*	2.1 ± 2*
600 μM DOX.	70.1 ± 0.6	-----	44.2 ± 8*	27.4 ± 7*	19.8 ± 5*	9 ± 6*	1.8 ± 2*	0.1 ± 0.3*	0 ± 0*	0 ± 0*

Datos expresados por la media ± desviación estándar. Seis repeticiones para cada tratamiento.

\*p<0.05 comparado con el control utilizando ANOVA-Dunnett.



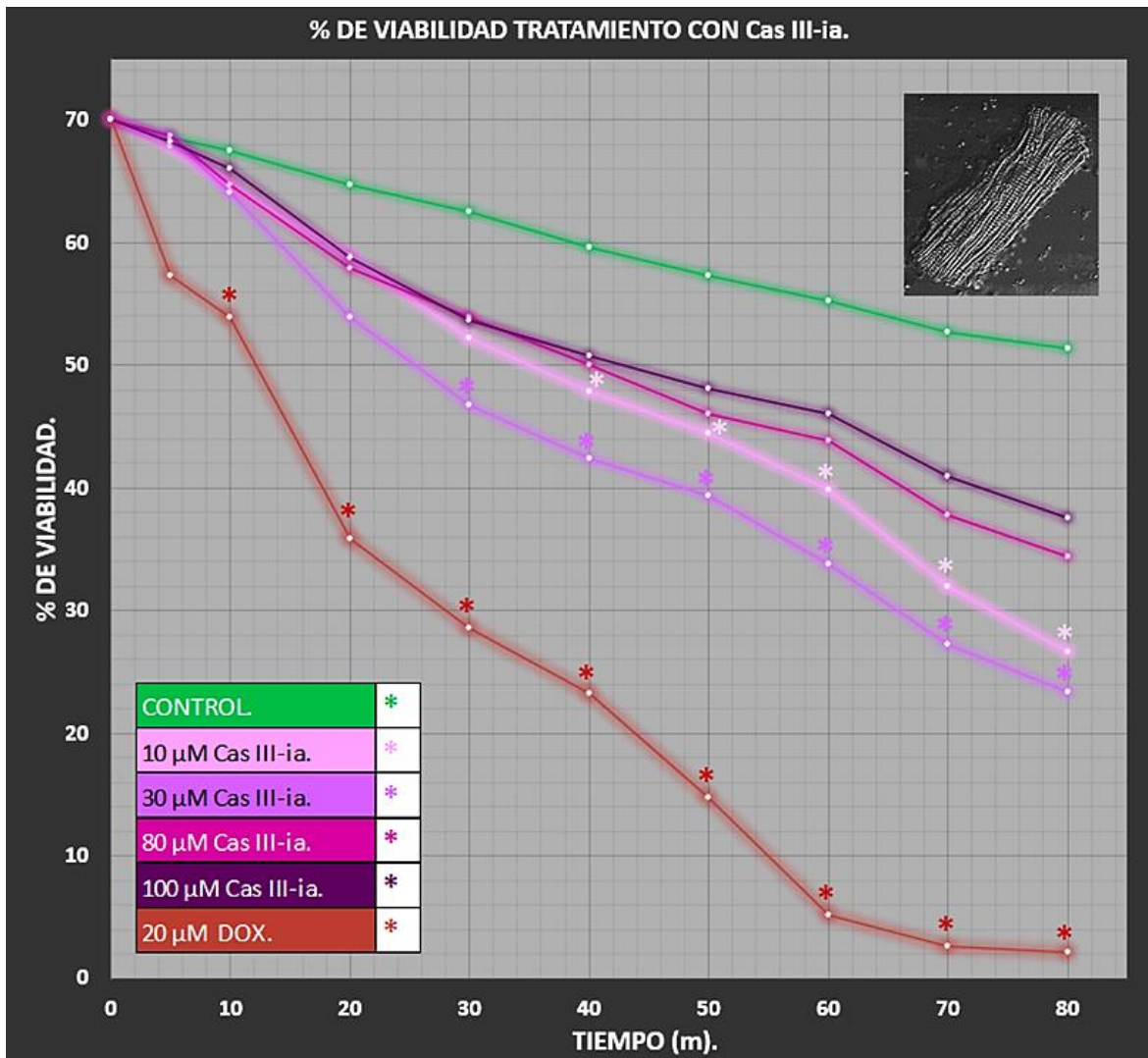
**Figura 33.** Cambios en el % viabilidad de cardiomiocitos aislados de rata con Cas III-Ea. Los datos están representados por la media de seis repeticiones por cada concentración (\*p<0.05 respecto al control, ANOVA-Dunnett).

**Cuadro 6.** Porcentaje de viabilidad de cardiomiocitos aislados de rata con Cas III-Ea a diferentes intervalos de tiempo.

Tratamiento.	Porcentaje de viabilidad a diferentes intervalos de tiempo (minutos).										
	0	5	10	20	30	40	50	60	70	80	
Solo células (control).	70 ± 0.5	68.6 ± 1	67. ± 1	64.6 ± 3	62.5 ± 3	59.6 ± 4	57.3 ± 6	55.2 ± 6	52.6 ± 6	51.3 ± 6	
20 μM DOX.	70 ± 0.6	-----	53.9 ± 7	35.9 ± 11*	28.6 ± 9*	23.2 ± 8*	14.7 ± 6*	5.2 ± 4*	2.6 ± 3*	2.1 ± 2*	
10 μM Cas III-Ea.	70 ± 0.6	47.6 ± 11*	41.7 ± 8*	33.2 ± 10*	29.8 ± 7*	26.9 ± 5*	23.9 ± 5*	21.4 ± 5*	20.4 ± 5*	19.7 ± 5*	
30 μM Cas III-Ea.	70 ± 0.6	56.2 ± 7	48.2 ± 4*	37 ± 10*	33.1 ± 9*	30 ± 6*	26.3 ± 6*	19.7 ± 3*	17 ± 3*	15.2 ± 2*	
80 μM Cas III-Ea.	70 ± 0.6	51.7 ± 14*	50.4 ± 14*	40.2 ± 20*	32.6 ± 15*	29.1 ± 16*	27.6 ± 14*	26.9 ± 12*	25.1 ± 11*	22 ± 9*	
100 μM Cas III-Ea.	70 ± 0.6	63.8 ± 4	61. ± 5	51.3 ± 10	45 ± 11*	37.8 ± 13*	34 ± 11*	30 ± 11*	25 ± 9*	24.4 ± 9*	

Datos expresados por la media ± desviación estándar. Seis repeticiones para cada tratamiento.

\*p<0.05 comparado con el control utilizando ANOVA-Dunnett.



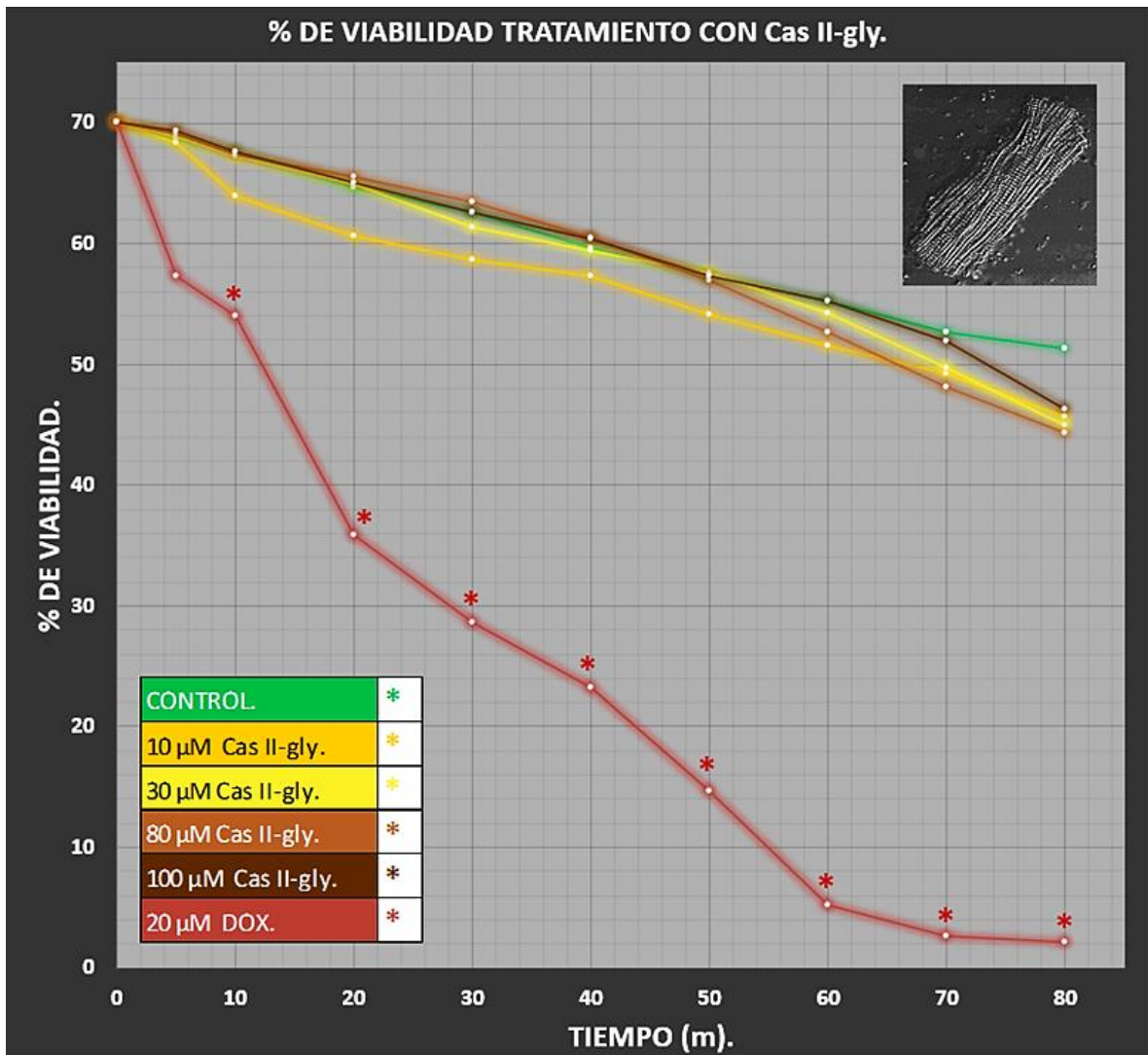
**Figura 34.** Cambios en el % viabilidad de cardiomiocitos aislados de rata con Cas III-ia. Los datos están representados por la media de seis repeticiones por cada concentración (\*p<0.05 respecto al control, ANOVA-Dunnett).

**Cuadro 7.** Porcentaje de viabilidad de cardiomiocitos aislados de rata con Cas III-ia a diferentes intervalos de tiempo.

Tratamiento.	Porcentaje de viabilidad a diferentes intervalos de tiempo (minutos).										
	0	5	10	20	30	40	50	60	70	80	
Solo células (control).	70 ± 0.5	68.6 ± 1	67.5 ± 1	64.6 ± 3	62.5 ± 3	59.6 ± 4	57.3 ± 6	55.2 ± 6	52.6 ± 6	51.3 ± 6	
20 μM DOX.	70 ± 0.6	-----	53.9 ± 7*	35.9 ± 11*	28.6 ± 9*	23.2 ± 8*	14.7 ± 6*	5.2 ± 4*	2.6 ± 3*	2.1 ± 2*	
10 μM Cas III-ia.	70 ± 0.5	67.8 ± 1	64.6 ± 1	58.9 ± 4	52.2 ± 6	47.9 ± 6*	44.4 ± 6*	39.8 ± 2*	32 ± 3*	26.6 ± 2*	
30 μM Cas III-ia.	70 ± 0.5	68.6 ± 0.8	64 ± 2	53.9 ± 6	46.7 ± 8*	42.4 ± 8*	39.3 ± 7*	33.7 ± 7*	27.2 ± 6*	23.3 ± 5*	
80 μM Cas III-ia.	70 ± 0.5	68.6 ± 0.7	64.7 ± 2	57.8 ± 3	53.8 ± 3	50 ± 3	46 ± 5	43.8 ± 5	37.7 ± 3	34.4 ± 4	
100 μM Cas III-ia.	70 ± 0.5	68.2 ± 0.9	66 ± 2	58.7 ± 5	53.6 ± 5	50.8 ± 5	48.1 ± 7	46 ± 8	41 ± 5	37.5 ± 5	

Datos expresados por la media ± desviación estándar. Seis repeticiones para cada tratamiento.  
\*p<0.05 comparado con el control utilizando ANOVA-Dunnett.



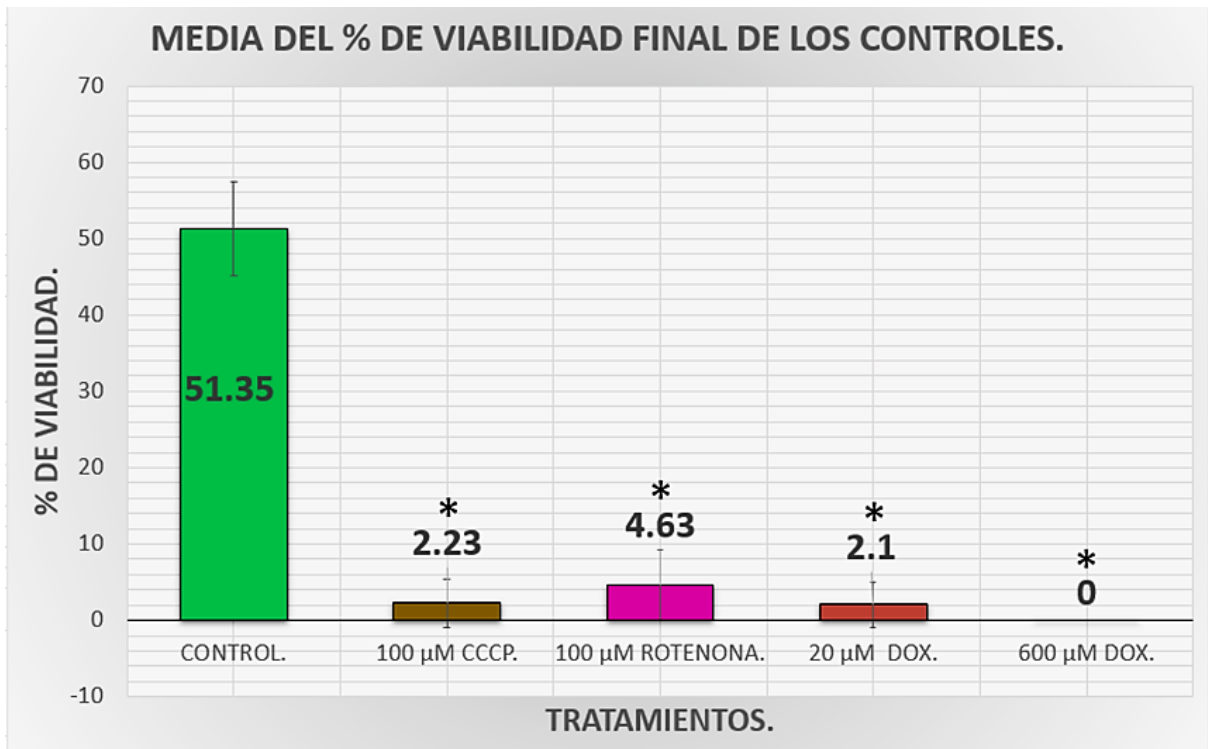


**Figura 35.** Cambios en el % viabilidad de cardiomiocitos aislados de rata con Cas II-gly. Los datos están representados por la media de seis repeticiones por cada concentración (\*p<0.05 respecto al control, ANOVA-Dunnett).

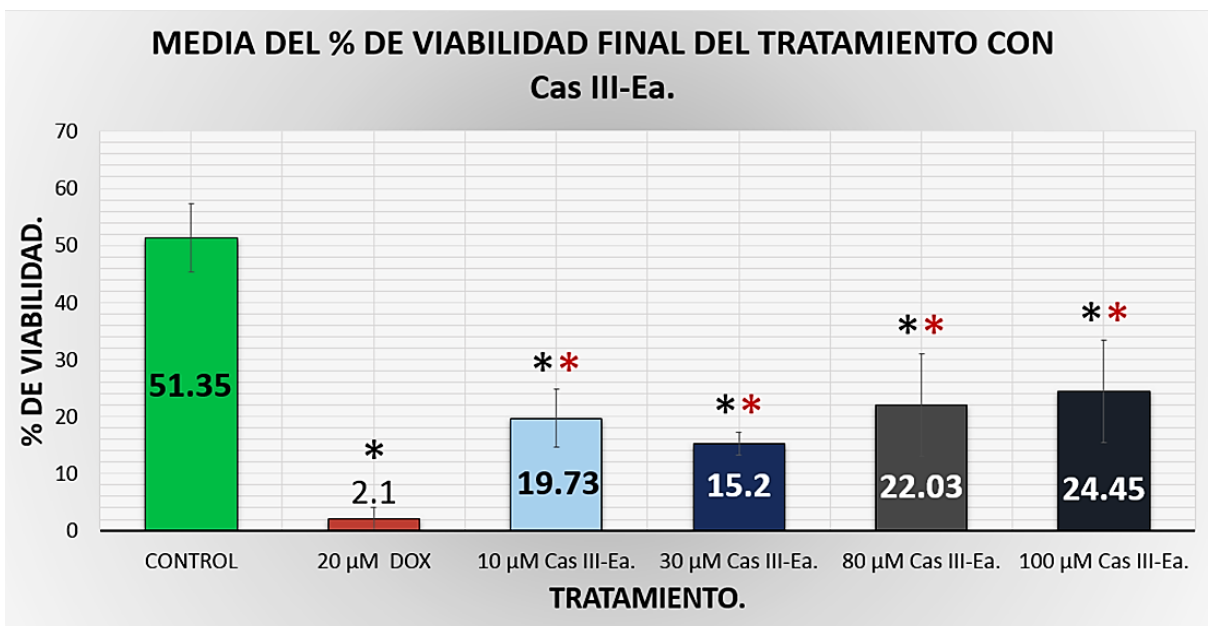
**Cuadro 8.** Porcentaje de viabilidad de cardiomiocitos aislados de rata con Cas II-gly a diferentes intervalos de tiempo.

Tratamiento.	Porcentaje de viabilidad a diferentes intervalos de tiempo (minutos).										
	0	5	10	20	30	40	50	60	70	80	
Solo células (control).	70 ± 0.5	68.6 ± 1	67.5 ± 1	64.6 ± 3	62.5 ± 3	59.6 ± 4	57.3 ± 6	55.2 ± 6	52.6 ± 6	51.3 ± 6	
20 μM DOX.	70 ± 0.6	-----	53.9 ± 7*	35.9 ± 11*	28.6 ± 9*	23.2 ± 8*	14.7 ± 6*	5.2 ± 4*	2.6 ± 3*	2.1 ± 2*	
10 μM Cas II-gly.	70.1 ± 0.6	68.3 ± 2	63.9 ± 4	60.6 ± 3	58.6 ± 3	57.2 ± 2	54.1 ± 3	51.5 ± 2	49.2 ± 2	45.7 ± 2	
30 μM Cas II-gly.	70.1 ± 0.6	68.8 ± 0.8	67.2 ± 1	64.9 ± 1	61.3 ± 2	59.3 ± 2	57.6 ± 1	54.2 ± 2	49.7 ± 3	44.9 ± 3	
80 μM Cas II-gly.	70.1 ± 0.6	69 ± 1	67.4 ± 1	65.5 ± 3	63.4 ± 3	60.4 ± 4	56.9 ± 5	52.7 ± 5	48.1 ± 7	44.3 ± 5	
100 μM Cas II-gly.	70.1 ± 0.6	69.2 ± 0.4	67.6 ± 0.9	65 ± 1	62.6 ± 2	60.3 ± 1	57.3 ± 2	55.1 ± 3	51.9 ± 3	46.2 ± 6	

Datos expresados por la media ± desviación estándar. Seis repeticiones para cada tratamiento.  
\*p<0.05 comparado con el control utilizando ANOVA-Dunnett.

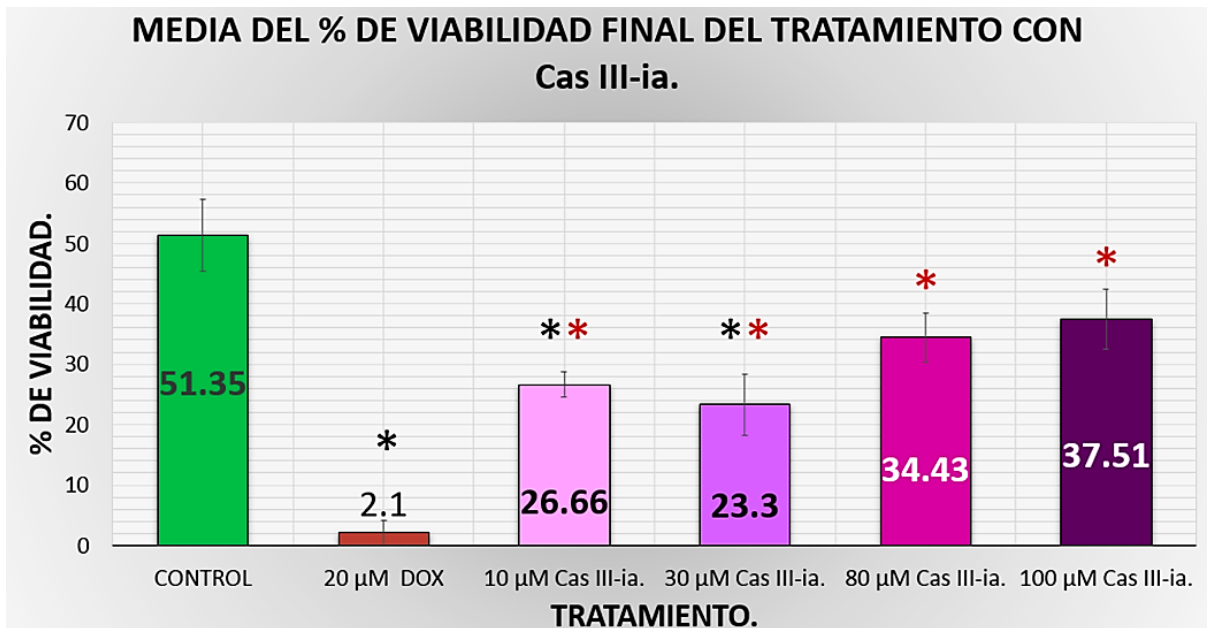


**Figura 36.** Media del % de viabilidad final de los tratamientos con 100 μM CCCP, 100 μM Rotenona, 20 μM DOX y 600 μM DOX (\*p<0.05 respecto al control, ANOVA-Dunnett).

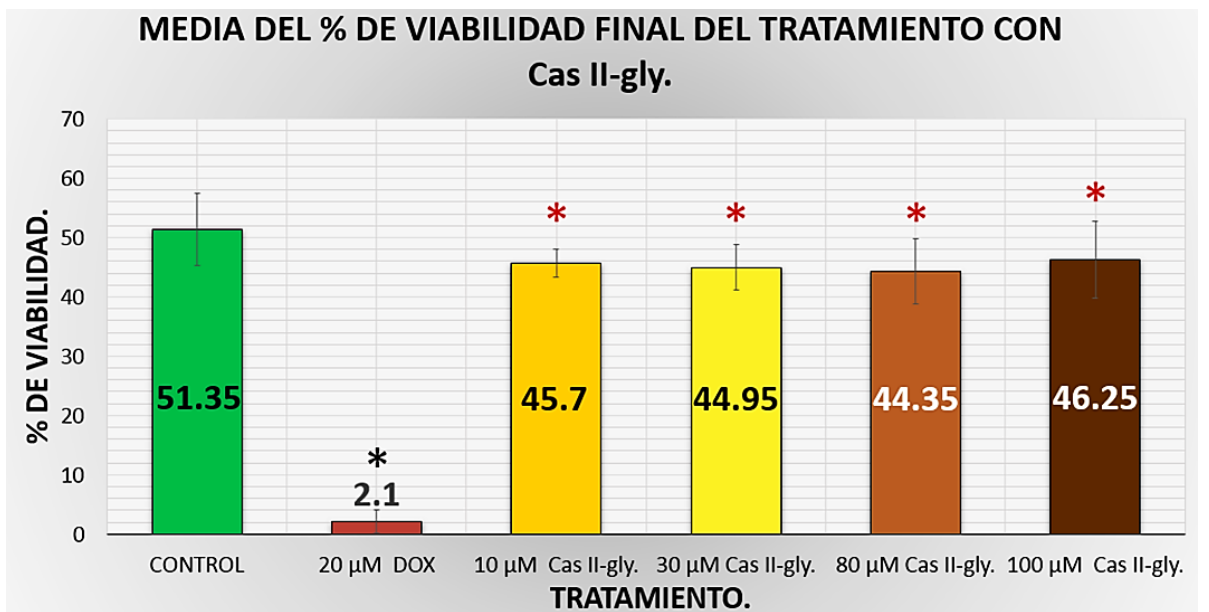


**Figura 37.** Media del % de viabilidad final de los tratamientos con 10 μM, 30 μM, 80 μM, 100 μM de Cas III-Ea (\*p<0.05 respecto al control, ANOVA-Dunnett; \*\*p<0.05 respecto a 20 μM DOX, ANOVA-Dunnett).





**Figura 38.** Media del % de viabilidad final de los tratamientos con 10 µM, 30 µM, 80 µM, 100 µM de Cas III-ia (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett; \* $p < 0.05$  respecto a 20 µM DOX, ANOVA-Dunnett).



**Figura 39.** Media del % de viabilidad final de los tratamientos con 10 µM, 30 µM, 80 µM, 100 µM de Cas II-gly (\* $p < 0.05$  respecto al control, ANOVA-Dunnett; \* $p < 0.05$  respecto a 20 µM DOX, ANOVA-Dunnett).

## 8. Discusión.

Dos de las principales causas de muerte a nivel mundial son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (OMS, 2018). Estas pueden estar estrechamente relacionadas teniendo en cuenta que los sobrevivientes de cáncer tienen un mayor riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca debido al tipo de quimioterapia utilizada (Yeh *et al.*, 2004).

Actualmente se utilizan más de 100 fármacos antineoplásicos, que pueden ser administrados solos o en combinación. Entre ellos destaca la DOX que es un fármaco antineoplásico altamente efectivo y está presente en la mayoría de los cócteles quimioterapéuticos, pero su uso clínico se ve limitado por su incidencia de cardiotoxicidad (Yeh *et al.*, 2004; Duran, 2011; Velásquez *et al.*, 2016; Silva-Platas *et al.*, 2018).

En las últimas décadas se han descrito varios mecanismos subyacentes a la cardiotoxicidad inducida por DOX; sin embargo, el aumento al estrés oxidante ha ganado apoyo como la causa principal de la cardiotoxicidad inducida por DOX (Danz *et al.*, 2009; Ludke *et al.* 2017).

### 8.1. Producción de ERO mitocondrial con y sin la sonda MitoSOX Red.

El corazón es especialmente susceptible al daño oxidante por ser un tejido de gran demanda energética y por su alto contenido de mitocondrias en los cardiomiocitos, aunado a esto el corazón posee una menor capacidad antioxidante en comparación con otros órganos como el hígado; caracterizada por una expresión 150 veces menor de catalasa y 4 veces menor de SOD (Martínez-Abundis *et al.*, 2005; Gómez-Quiroz, 2008; Marín, 2013; Marotte y Zeni, 2013; Candas y Li, 2014).

La elevada cantidad de mitocondrias sirve como diana de la DOX ya que esta antraciclina tiende a acumularse en la membrana interna mitocondrial, lo que genera una sobreproducción de ERO (El-Azem de Haro, 2013), además la DOX es capaz de inducir una disminución de la actividad del glutatión peroxidasa (Danz *et al.*, 2009; El-Azem de Haro, 2013). Es por ello que esta investigación estuvo enfocada a evaluar la producción de ERO mitocondriales en cardiomiocitos aislados, en el presente estudio se incubaron y estimularon células con y sin la sonda MitoSOX Red.

Los ensayos basados en MitoSOX Red se utilizan ampliamente para detectar ERO mitocondriales, especialmente  $O_2^-$ . Esta sonda es un colorante fluorógeno que se dirige dentro de las mitocondrias y produce fluorescencia roja cuando se oxida con  $O_2^-$  (Kauffman *et al.*, 2016). Los resultados de este trabajo muestran un aumento de la fluorescencia debido a la oxidación de la sonda por la presencia de ERO con respecto al control (células sin sonda). Estos datos coinciden con los obtenidos por Gallardo en el 2014 donde aplicó la misma concentración de la sonda (5  $\mu$ M) en células primarias del miocardio ventricular de rata, procedentes de tejido embrionario donde se observó que la sonda MitoSOX detectó alta cantidad de  $O_2^-$ . En base a lo anterior podemos decir que el aumento en la fluorescencia es debido a la oxidación de la sonda por presencia de ERO a nivel mitocondrial.

## 8.2. Producción de ERO mitocondrial en cardiomiocitos aislados por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones.

Durante las últimas tres décadas, se han desarrollado una serie de ensayos y técnicas para detectar y cuantificar la formación de ERO mitocondriales.

Independientemente de los instrumentos utilizados, las técnicas implican el uso de un haz de luz (ultravioleta o luz visible) que excita las moléculas fluorescentes y hace que emitan luz de menor energía. Para detectar ERO mediante métodos basados en fluorescencia, se incubó una sonda de detección basada en fluorescencia (sonda MitoSOX Red) con el sistema generador de ERO (p. Ej., Enzimas, células, tejidos) y se detecta la fluorescencia del producto de reacción para determinar las cantidades relativas de ERO (Kauffman *et al.*, 2016).

Con la finalidad de conocer los efectos que tienen las Cas III-Ea, III-ia y II-gly, sobre la producción de ERO mitocondrial en este trabajo se incubaron los cardiomiocitos aislados con la sonda MitoSOX Red y se expusieron a diferentes concentraciones de Cas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas en la producción ERO mitocondrial (velocidad de producción) en los grupos tratados con Cas III-Ea, III-ia y II-gly, en todas las concentraciones con respecto al control **Figura 18-20**. Estos datos coinciden con los obtenidos por Silva-Platas *et al.*, en el 2018 donde trataron a células intactas de corazón con concentraciones 4 o 20  $\mu\text{M}$  de Cas III-Ea, en el cual encontraron que no hubo cambios significativos en la producción de anión superóxido.

Y al comparar los resultados con el fármaco de referencia (20  $\mu\text{M}$  de DOX) y los diferentes tratamientos con Cas (III-Ea, III-ia y II-gly) se puede observar que hay menor producción de ERO mitocondrial en todas las concentraciones estudiadas, como se aprecia en la **Figura 21-23**.

Estos datos se relacionan con lo reportado por Hernández-Esquivel *et al.* en el 2006 donde empleando a la rata como modelo de prueba para evaluar la cardiotoxicidad de las Cas III-ia y II-gly, encontraron que las Cas son menos cardiotóxicas que la DOX, lo cual podría deberse a una fuerte unión a la albúmina; La albúmina es una proteína que se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, representando aproximadamente el 50% del total proteico de dicha fuente, siendo entonces la principal proteína de la sangre. Su principal función fisiológica es mantener la presión osmótica y el pH sanguíneo, además transporta una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos incluyendo ácidos grasos, metales, aminoácidos, esteroides y drogas (López *et al.*, 2013).

Además, se cuenta con otros reportes como el realizado por Fuentes-Noriega *et al.*, en el 2002, donde se encontró que arriba del 80% de las concentraciones de Cas III-i se unían a proteínas en el plasma de ratas Wistar.

Por lo tanto, parece que las Cas son un grupo de fármacos antineoplásicos con menos efectos tóxicos que los fármacos probados como la DOX, ya que en el presente estudio se observó que la producción de ERO mitocondrial es diez veces menor en todas las concentraciones de Cas al compararlas con el fármaco de referencia 20  $\mu\text{M}$  de DOX.

### 8.3. Formación de ERO mitocondrial (*in situ*) por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones mediante microscopía de fluorescencia.

Para corroborar que la fluorescencia detectada por el espectrofluorómetro provenía de la oxidación de la sonda dentro de las mitocondrias de los cardiomiocitos aislados se determinó la formación de ERO mitocondriales mediante imágenes tomadas por el microscopio de fluorescencia Olympus (diez cardiomiocitos por tratamiento); Las imágenes basadas en microscopía de fluorescencia permiten la visualización *in situ* de la formación de ERO en células o tejidos.

En esta evaluación se observó que el tratamiento con Cas III-Ea y Cas III-ia incrementó significativamente la formación de ERO mitocondrial (producción de ERO mitocondrial acumulada) en todas las concentraciones con respecto al control **Figura 29-30**, estos datos coinciden con los obtenidos por Silva-Platas *et al.*, en el 2016 donde aplicaron Cas III-Ea (47  $\mu\text{M}$ ) y Cas III-ia (52  $\mu\text{M}$ ) en mitocondrias cardíacas, observando que las Cas III aumenta la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en un 81% con Cas III-ia y un 72% con Cas III-Ea, no obstante este aumento no mostró efecto en la peroxidación lipídica al compararlos con los controles, este efecto también fue observado de manera *ex vivo* por Silva-Platas *et al.*, en el 2018, donde reportan que no hubo aumento en la peroxidación lipídica por el tratamiento con Cas III-Ea, Cas III-ia y Cas II-gly.

Con respecto a Cas II-gly en el presente estudio se observó que Cas II-gly actúa como un posible inhibidor de la fosforilación oxidativa en las concentraciones 30  $\mu\text{M}$  y 80  $\mu\text{M}$  ya que se ve cierta disminución en la formación de ERO mitocondrial con respecto al control (control basal) **Figura 27 y 31**, estos datos se relacionan con los obtenidos por Marín-Hernández en el 2003 donde reporta que Cas II-gly afecta la actividad mitocondrial a nivel de la fosforilación oxidativa, observando que las Cas inhiben la fosforilación oxidativa y los niveles de ATP en células tumorales.

Y lo reportado por Hernández-Esquivel *et al.* en el 2006 donde al perfundir Cas III-ia y Cas II-gly en corazones aislados de rata observaron que Cas II-gly reduce el contenido de ATP e inhibe el consumo de oxígeno durante la perfusión, así mismo disminuye el trabajo cardíaco, lo que indica un efecto inhibitorio en la producción de ATP mitocondrial.

No obstante en el presente estudio se observó un aumento significativo en la formación de ERO mitocondriales en las concentraciones 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de Cas II-gly con respecto al control **Figura 31**, aunque este aumento en la formación de ERO mitocondrial es menor que el producido por las mismas concentraciones de Cas III-Ea y Cas III-ia, estos resultados coinciden con lo reportado por Silva-Platas *et al.*, en el 2016 donde observa que la

producción de ERO mitocondrial por Cas II-gly (212  $\mu\text{M}$ ) es inferior al compararla con Cas III-Ea (47  $\mu\text{M}$ ) y Cas III-ia (52  $\mu\text{M}$ ), en base a lo anterior podríamos deducir que Cas II gly tiene un mayor efecto inhibitorio que desacoplante sobre la mitocondria.

Por otra parte al comparar los resultados de la formación de ERO mitocondrial con el fármaco de referencia (20  $\mu\text{M}$  de DOX), se puede apreciar que la formación de ERO mitocondrial por Cas III-ia y Cas II-gly en todas las concentraciones empleadas es menor que las producidas por DOX **Figura 30-31**, aunque la concentración 100  $\mu\text{M}$  de Cas III-Ea muestra una formación similar a DOX **Figura 29**, esto podría confirmar lo reportado por Silva-Platas *et al.*, en el 2018 donde observan que Cas III-Ea es la Cas más cardiotóxica; ya que desacopla la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo que puede acelerar la formación de ERO.

Los efectos observados en la formación de ERO mitocondrial en los tratamientos con Cas III-Ea y Cas III-ia podrían deberse al ligando de acetilacetato reactivo, este puede contribuir al potencial de reducción del centro de cobre y ser un factor decisivo en la formación de ERO mitocondrial (Silva-Platas *et al.*, 2018).

Por lo cual cabe mencionar que los tratamientos Cas III-Ea y Cas III-ia presentan mayor formación de ERO mitocondrial en cardiomiocitos aislados de rata.

#### 8.4. Efecto en la viabilidad por los tratamientos con Cas III-Ea, III-ia y II-gly a diferentes concentraciones en cardiomiocitos aislados de rata.

Varios fármacos antineoplásicos han reportado cardiotoxicidad como un efecto secundario (cardiomiopatía e insuficiencia cardíaca, isquemia miocárdica, arritmias, hipertensión y tromboembolismo). La aparición de estos eventos cardíacos varía, y puede ocurrir de forma aguda o retrasarse hasta 20 años después de la finalización de la quimioterapia (Silva-Platas *et al.*, 2016).

Por lo que en los niños el problema es aún más grave ya que tendrán largo tiempo de sobrevida una vez que el cáncer sea curado. Es por ello que, la investigación sobre los efectos cardiotóxicos inducidos por fármacos antineoplásicos, específicamente la muerte de cardiomiocitos y el desarrollo de insuficiencia cardíaca son indispensables para prevenir la pérdida prematura de células cardíacas en pacientes sometidos a estos tratamientos.

Para determinar el efecto que tienen las Casiopeinas sobre la viabilidad evaluamos la viabilidad conforme al tiempo. La detección de la viabilidad celular es un importante biomarcador en toxicología y se emplea durante la evaluación de los efectos tóxicos provocados por sustancias químicas, drogas así para el estudio de nuevos compuestos (Guzmán, 2015).

Es este estudio el tratamiento con Cas III-Ea reduce significativamente el porcentaje de viabilidad final en todas las concentraciones probadas **Figura 37**, destacando cambios significativos en el porcentaje de viabilidad en los primeros cinco minutos de tratamiento

para las concentraciones 10  $\mu\text{M}$  y 80  $\mu\text{M}$  **Figura 33**. Este efecto podría explicar lo observado por Marín en el 2001 donde reporta que la administración de Cas III tiene como consecuencia manifestaciones tóxicas cardiovasculares en los primeros cinco minutos de la administración del fármaco (21 de 36 ratones evaluados).

Para el tratamiento con Cas III-ia se observa una reducción significativa en el porcentaje de viabilidad final en las concentraciones 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$  **Figura 38**, estos cambios se pueden apreciar a los 40 y 30 minutos respectivamente **Figura 34**.

La disminución en el porcentaje de viabilidad final por los tratamientos con Cas III-Ea y Cas III-ia podría deberse a que hay una disminución en las defensas antioxidantes por la acumulación de ERO mitocondriales **Figura 29-30** lo que promovería el agotamiento del glutatión dentro de las mitocondrias, como se ha visto con el cisplatino (Martins *et al.*, 2008; Alemón-Medina *et al.*, 2011) y la DOX (Danz *et al.*, 2009; El-Azem de Haro, 2013).

El glutatión es parte importante de las defensas antioxidantes, es capaz de eliminar radicales libres y es un indicador altamente sensible de la funcionalidad y viabilidad celular (Pastore *et al.*, 2003). La forma en que el glutatión interactúa con los metales es extremadamente significativa en la toxicidad de un metal y se refleja directamente en la concentración intracelular de glutatión (Alemón-Medina *et al.*, 2011).

Kachadourian *et al.* en el 2010 reportaron que Cas II-gly disminuye los niveles intracelulares de glutatión en las células H157 y A549 del cáncer de pulmón humano, también sugieren que Cas II-gly utiliza al glutatión como fuente de electrones para catalizar la reacciones tipo Fenton. Posteriormente en el 2011 Alemón-Medina *et al.* encontraron que Cas II gly es capaz de inducir agotamiento de los niveles de glutatión en células de melanoma murino B16, por el aumento en la producción de radicales libres (por reacciones tipo Fenton).

Sin embargo, este efecto no se ve reflejado en el porcentaje de viabilidad final en los tratamientos con Cas II-gly **Figura 39**, esto podría deberse a que las concentraciones manejadas en este estudio no producen un aumento significativo en la velocidad de producción de ERO mitocondrial en los cardiomiocitos aislados **Figura 20**.

Por lo que la cardiotoxicidad reportada anteriormente por Cas II-gly, podría deberse al deterioro de la energía celular, que compromete la capacidad de los cardiomiocitos para generar ciclos adecuados de contracción-relajación (Silva-Platas *et al.*, 2018). Ya que nuestros resultados sugieren que Cas II-gly actúa como un posible inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Además, cabe destacar que el efecto que tienen las Cas sobre el porcentaje de viabilidad final es 10 veces menor para el tratamiento con Cas III-Ea, 15 veces menor para el tratamiento con Cas III-ia y 20 veces menor para el tratamiento con Cas II-gly al compararlo con el fármaco de referencia (20  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina), es decir las Cas muestran menor cardiotoxicidad que la doxorubicina **Figura 37-39**.



## 9. Conclusiones y comentarios.

- Las Cas (especialmente las Cas III) aumentan la producción total de ERO mitocondriales en cardiomiocitos aislados.
- La Cas III-Ea demuestra ser la más cardiotoxica, ya que todas sus concentraciones disminuyen el porcentaje de viabilidad final.
- La Cas III-ia también disminuye el porcentaje de viabilidad final en las concentraciones 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ .
- Las Cas muestran menor cardiotoxicidad que la DOX ya que su velocidad de producción de ERO mitocondrial es inferior y el efecto que tienen sobre la viabilidad es menor, por lo que las Cas podrían ser una alternativa menos tóxica y con mayor eficacia terapéutica.
- Nuestros resultados contribuyen a tomar mejores decisiones en la administración de las Cas para la conservación de la integridad física y salud del paciente.
- Nuestro trabajo se podría complementar con un experimento con cortes histológicos del ventrículo izquierdo ya que las características histopatológicas de la cardiotoxicidad por antraciclina se encuentran predominantemente en este o en el tabique interventricular.

## 10. Referencias.

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Alemón-Medina, R., Bravo-Gómez, M. E., Gracia-Mora, M. I., Ruiz-Azuara, L. (2011). Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína IIgly and cisplatin in murine melanoma B16 cells. *Toxicol In Vitro*, 25(4), 868-873. doi:10.1016/j.tiv.2011.02.007
- Alemón-Medina, R., Breña-Valle, M., Muñoz-Sánchez, J. L., Gracia-Mora, M. I., Ruiz-Azuara, L. (2007). Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas). *Cancer Chemother Pharmacol*, 60(2), 219-228. doi:10.1007/s00280-006-0364-9
- Almeida, V., Leitão, A., Reina, L., Montanari, C., Donnici, C., Lopes, M. (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, 28(1), 118-129. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>
- Álvarez-Barrera, L., Rodríguez, J. J., López-Chaparro, M., Altamirano-Lozano, M. (2016). Genotoxicity of Casiopeina III-Ea in mouse bone marrow cells. *Drug and chemical toxicology*, 40(3), 1-6. doi:10.1080/01480545.2016.1229787
- American Cancer Society, (2018). *Cancers That Develop in Young Adults*. Revisado el 25 de diciembre 2018 en: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-in-young-adults/cancers-in-young-adults.html>
- Barrett, J. C. (1993). Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect*, 100, 9–20. <https://doi.org/10.1289/ehp.931009>
- Bartozs, G. (2009). Reactive oxygen species: Destroyers or mesengers? *Biochem Pharmacol*, 77(8), 1303-1315. doi: 10.1016/j.bcp.2008.11.009
- Benedi, J., Gómez, R. M. (2006). Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional*. 20(2), 60-64. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-13084621>
- Bravo, M., Tovar, A., Ruiz, M., Ruiz, L., Moreno, R. (2002). Diseño y síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas. *Memorias del primer congreso en Casiopeínas* Pág. 1-7.
- Bravo-Gómez, M., García-Ramos, J. C., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L. (2009). Anti proliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glycinato)]NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopeínas

- (R)). Journal of inorganic biochemistry, 103(2), 299-309. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2008.10.006.
- Cancino, D. (2008). Evaluación de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas inducidos por un compuesto de cobre (Casiopeina III-I-a) en linfocitos humanos in vitro [Tesis de licenciatura. Fes Zaragoza UNAM]. <http://132.248.9.195/ptd2009/febrero/0639463/Index.html>
  - Candas, D. y Li, J. J. (2014). MnSOD in Oxidativa Stress Response-Potential Regulation via Mitochondrial Protein Influx. Antioxidants y redox signaling, 20(10), 1599-1617. doi: 10.1089 / ars.2013.5305
  - Carvallo-Chaigneau, F., Trejo-Solís, C., Gómez-Ruiz, C., Rodríguez-Aguilera, E., Macías-Rosales, L., Cortés-Barberena, E., Cedillo-Peláez, C., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L., Madrid-Marina, V., Constantino-Casas, F. (2008). Casiopeina III-ia induce apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. Biometals, 21(1), 17-28. doi:10.1007/s10534-007-9089-4
  - Cermeño, J. R. (2007). Estudio del efecto genotóxico inducido in vivo por la Casiopeína ii-gly y por la casiopeína iii-ia [Tesis de licenciatura. Fes Zaragoza UNAM]. <http://132.248.9.195/pd2007/0622484/Index.html>
  - Corrales, L. y Muñoz, A. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Nova, 10(18), 213-225. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S179424702012000200009&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S179424702012000200009&script=sci_abstract&tlng=es)
  - Dávila, S. G. (2017). Evaluación de las interacciones farmacológicas entre la Casiopeína III ia y fármacos antitumorales en diferentes líneas tumorales [Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias. Facultad de química UNAM]. <http://132.248.9.195/ptd2017/octubre/0766503/Index.html>
  - De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Müller, A., Ruiz-Ramirez, L., Howarth, J. A., Dobrota, M. (2003). Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. Toxicology, 194(1-2),103-113. doi:10.1016/j.tox.2003.08.009
  - De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Kass, G. E., Kelland, L. R., Orr, R. M., 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),1-5. doi:10.1016/s0887-2333(99)00082-x
  - Desoize, B. y Madoulet, C. (2002). Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. Crit Rev. Oncol. Hematol, 42(3), 317-325. doi:10.1016/s1040-8428(01)00219-0

- Doroshow, J. H. (1983). Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res*, 43(2), 460–472. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/43/2/460.full.pdf>
- Doroshow, J. H. y Davies, K. J. (1986). Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem*, 261(7), 3068–3074. <https://www.jbc.org/content/261/7/3068.full.pdf>
- Duran, V. R. (2011). Prevalencia y características de complicaciones cardiovasculares asociadas al tratamiento con quimioterapia y radioterapia en niños con cáncer en el centenario hospital hidalgo [Trabajo para obtener el título de especialista en pediatría. Universidad Autónoma de Aguascalientes]. <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/783/346966.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- El Azem de Haro, N. (2013). Efecto del hidroxitirosol sobre la cardiotoxicidad producida por doxorubicina [Tesis Univ. Granada. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Universidad de Granada]. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/26375/21693547.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Eldabaje, R., Le, D. L., Huang, W., Yang, L. X. (2015). Radiation-associated Cardiac Injury. *Anticancer Res*, 35(5), 2487-92. <http://ar.iijournals.org/content/35/5/2487.full.pdf+html>
- Fajardo, L. F., Stewart, J. R. (1973). Pathogenesis of radiation-induced myocardial fibrosis. *Lab Invest*, 29(2), 244–257. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4724850/>
- Farmer, P. B. (1994). Carcinogen adducts: use in diagnosis and risk assessment. *Clin Chem*, 40(7), 1438–1443. <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.7.1438>
- Finkel, T. y Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Florescu, M., Cinteza, M., Vinereanu, D. (2013). Chemotherapy-induced Cardiotoxicity. *Maedica*, 8(1), 59-67. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749765/pdf/maed-08-59.pdf>
- Fuentes-Noriega, I., Ruiz-Ramírez, L., Tovar-Tovar, A., Gracia-Mora, I. (2002). Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeina III (R) in rat plasma. *Journal of chromatography B*, 772(1), 115–121. doi:10.1016/s1570-0232(02)00064-8
- Gaetke, L. M. y Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2), 147-163. doi: 10.1016 / s0300-483x (03) 00159-8

- Gomes-Carneiro, M. R., Ribeiro-Pinto, L. F., Paumgartten, F. J. R. (1997). Environmental risk factors for gastric cancer: the toxicologist's standpoint. *Cad Saúde*, 13 (1), 27–38. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1997000500004>
- Gómez-Quiroz, L. (2008). Superóxido dismutasa. ResearchGate, 1-14. [https://www.researchgate.net/publication/272181809\\_Superoxido\\_dismutasa](https://www.researchgate.net/publication/272181809_Superoxido_dismutasa)
- Goodman y Gilman (2007). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Mc Graw Hill Interamericana.
- Goormaghtigh, E., Huart, P., Praet, M., Brasseur, R., Ruyschaert, J. M. (1990). Structure of the adriamycin-cardiolipin complex: Role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem*, 35(2-3), 247-57. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(90\)80012-V](https://doi.org/10.1016/0301-4622(90)80012-V)
- Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramirez, L., Gomez-Ruiz, C., Tinoco-Mendez, M., Marquez-Quiñones, A., Romero-De Lira, L., Marin-Hernandez, A., Macias-Rosales, L. y Bravo-Gomez, M. E. (2001). Knights move in the periodic table, from Koper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeínas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel. *Metal Based Drugs*, 8(1), 19-28. doi: 10.1155 / MBD.2001.19
- Guzman, B. A. (2016). Efecto del resveratrol sobre la expresión de genes que participan en la respuesta al estrés oxidativo y de la bomba de calcio SERCA2 en cardiomiocitos de rata [Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias bioquímicas. UNAM].
- Halliwell, B. y Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231-255. doi: 10.1038 / sj.bjp.0705776
- Heidenreich, P. A., Schnittger, I., Strauss, H. W. (2007). Screening for coronary artery disease after mediastinal irradiation for Hodgkin's disease. *J Clin Onc*, 25 (1): 43-9. doi: 10.1200 / JCO.2006.07.0805
- Heredia, O. (2002). Mecanismos implicados en el efecto cardiaco del neuropéptido Y [Memoria para optar el grado de doctor. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/4568/1/T25937.pdf>
- Hernandez, A. L. (2008). Evaluación de actividad antineoplásica de dos Casiopeínas usando el modelo de xenotransplante (Ratón Desnudo) [Tesis para obtener el título de QFB. Facultad de Química UNAM]. <http://132.248.9.195/ptd2009/enero/0638106/Index.html>
- Hernandez-Esquivel, L., Marin-Hernandez, A., Pavon, N., Carvajal, K., y Moreno-Sanchez, R. (2006). Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs Casiopeínas

is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212 (1), 79–88. doi:10.1016/j.taap.2005.06.023

- Huang, R., Wallqvist, A. y Covell, D. G. (2005). Anticancer metal compounds in NCI's tumor screening database: putative mode action. *Biochem Pharmacol*, 69(7), 1009-1039. doi: 10.1016 / j.bcp.2005.01.001.
- I.N.C. Instituto Nacional del Cáncer (2015). Quimioterapia para tratar el cáncer. Revisado 19 de Marzo 2020 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia>
- I.N.C. Instituto Nacional del Cáncer (2017). Tipos de tratamiento. Revisado 6 de Noviembre 2018 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
- I.N.C. Instituto Nacional del Cáncer (2018). Radioterapia para tratar el cáncer. Revisado el 23 de enero 2019 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>
- I.N.E.G.I Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2018). Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Revisado el 4 de Noviembre 2018 en [http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018\\_Nal.pdf](http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf)
- Jiji, R. S., Kramer, C. M., Salerno, M. (2012). Non-invasive imaging and monitoring cardiotoxicity of cancer therapeutic drugs. *J Nucl Cardiol*, 19 (2), 337-88. doi: 10.1007 / s12350-012-9512-2.
- Jiménez-Cotes, E., Martínez, W., González, D. (2015). Biomarcadores en la detección temprana de cardiotoxicidad inducida por quimioterapia; estado actual. *Archivos de Medicina (Manizales)*, 15(1), 126-137. doi:10.30554/archmed.15.1.266.2015
- Kachadourian, R., Brechbuhl, H., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., Day, B. (2010). Casiopeina IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*, 268 (3), 176-183. doi: 10.1016 / j.tox.2009.12.010
- Katzung, B. G. (2019). *Farmacología Básica y Clínica*. Mc Graw Hill.
- Kauffman, M., Kauffman, M., Traore, K., Zhu, H., Trush, M., Jia, Z. y Li, Y. (2016). MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive Oxygen Species*, 2(5), 361–370. doi:10.20455/ros.2016.865
- Kerckhoffs, R. (2010). *Patient-Specific modeling of the cardiovascular system*. Springer.
- Kierszenbaum, L. A. (2008). *Histología y biología celular*. Elsevier.



- Leal-García, M., García-Ortuño, L., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., Luna-Delvillar, J., Sumano, H. (2007). Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of casiopeínas in anaesthetized dogs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 101(3),151-158. doi:10.1111/j.1742-7843.2007.00038.x
- Lee, P. J. y Mallik, R. (2005). Cardiovascular effects of radiation therapy: practical approach to radiation therapy-induced heart disease. *Cardiol Rev*, 13(2), 80-86. doi:10.1097/01.crd.0000131188.41589.c5
- Li, D., Wu, J., Bai, Y., Zhao, X., Liu, L. (2014). Isolation and culture of Adult Mouse Cardiomyocytes for Cell Signaling and in vitro Cardiac Hypertrophy. *J Vis Exp*, 87, 1-8. doi:10.3791/51357
- López, J. M., Ensuncho, A. E., Robles, J. (2013). Estudio Teórico de la Reactividad Química y Biológica de Cisplatino y algunos Derivados con Actividad Anticancerosa. *Información tecnológica*, 24(3), 3-14. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642013000300002>
- López, M. (2012). Evaluación de la genotoxicidad de la Casiopeína III-Ea, utilizando como sistema de prueba el intercambio de cromátidas hermanas en médula ósea de ratón CD-1 in vivo [Tesis para obtener el título de Bióloga. FES Zaragoza UNAM]. <http://132.248.9.195/ptd2013/Presenciales/0691265/Index.html>
- López, R., Gonzalez, U., Menendez, C., Perez, P. (2013). Análisis comparativo de técnicas usadas en la extracción y purificación de la albumina sérica bovina. Congreso Nacional de Estudiantes de Bioquímica, Biotecnología y Biología Molecular. Universidad Nacional de San Luis. [https://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=&id=46899&congresos=yes&detalles=yes&congr\\_id=2249696](https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=46899&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=2249696)
- Ludke, A., Akolkasr, G., Ayyappan, P., Sharma, A. K., Singal, P. K. (2017). Time course of changes in oxidative stress and stress-induced proteins in cardiomyocytes exposed to doxorubicin and prevention by vitamicin C. *PloS ONE*, 12(7), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179452>
- Luna, O. P., El-hafidi, M., Martínez, R. M. (2013). La función mitocondrial y la cardioproteccion. *Rev Mex Anest*, 36(4), 294-305. <https://www.medigraphic.com/pdfs/rma/cma-2013/cma134g.pdf>
- Macedo, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces Cerevisiae*. *Rev Esp Cienc Quim Biol*, 15(2), 97-103. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2012000200003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2012000200003)
- Marín, J. (2001). Caracterización ultraestructural de lesiones en ratones inducidas por la aplicación de Casiopeína III [Tesis para obtener el grado de Maestro en

Ciencias de la producción y de la salud animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM]. [https://repositorio.unam.mx/contenidos/caracterizacion-ultraestructural-de-lesiones-en-ratones-inducidas-por-la-aplicacion-de-casiopeina-iii-101492?c=48JMPL&d=false&q=:\\*.\\*&i=1&v=1&t=search\\_0&as=0](https://repositorio.unam.mx/contenidos/caracterizacion-ultraestructural-de-lesiones-en-ratones-inducidas-por-la-aplicacion-de-casiopeina-iii-101492?c=48JMPL&d=false&q=:*.*&i=1&v=1&t=search_0&as=0)

- Marín, J., Akhmedov, A., Moe, G. W. (2013). Introduction to Mitochondria in the Heart. *Mitochondria and Their Role in Cardiovascular Disease*, 1, 3–9. doi: 10.1007 / 978-1-4614-4599-9
- Marín-Hernández, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L., Moreno-Sánchez, R. (2003). Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol*, 65(12), 1979-1989. doi:10.1016/s0006-2952(03)00212-0
- Marotte, C. y Zeni, S. (2013). Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas. *Acta Bioquim Clin Latinoam*, 47(4), 661-674. <https://www.redalyc.org/pdf/535/53530579004.pdf>
- Márquez, A., Romero, L. y Marín, A. (2000). Evaluación antineoplásica in vitro de nuevos fármacos (Casiopeinas) empleando líneas tumorales humanas y murinas. 4ª Jornada de trabajo de Casiopeinas. Facultad de química, UNAM, Instituto Nacional de Cancerología. p 4.
- Martínez-Abundis, E., Sánchez-Rodríguez, M. A., El Hafidi-Bentlakder, M. (2005). Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. *Bioquímica*, 30(3), 82-89. <https://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2005/bq053d.pdf>
- Martins, N. M., Santos, N. A., Bianchi, M. L., Santos, A. C. (2008). Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J Appl Toxicol*, 28(3), 337–344. doi:10.1002/jat.1284
- Mendoza-Medellín, A., Torres-Velazquez, G. (2002). Metabolismo energético del corazón normal e infartado. *Ciencia Ergo Sum*, 9(3), 282-91. <https://www.redalyc.org/pdf/104/10490308.pdf>
- Minamoto, T., Mai, M. y Ronai, Z. (2000). K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers-a review. *Cancer Detect Prev*, 24(1), 1–12.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56(2) 185–229. doi:10.1124/pr.56.2.6

- Mulrooney, D., Yeazel, M., Kawashima, T., Mertens, A. C., Mitby, P., Stovall, M., Donaldson, S. S., Green, D. M., Sklar, C. A., Robison, L. L., Leisenring, W. M. (2009). Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *BMJ*, 339, 1-11. doi: 10.1136 / bmj.b4606.
- Muraoka, S., Miura, T. (2003). Free radicals mediate cardiac toxicity induced by adriamycin. *Yakugaku Zasshi*, 123(10), 855–66. doi: 10.1002/chin.200406290.
- Nag, A. C. (1980). Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*, 28 (109), 41-61.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., Lehninger A. L. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers.
- Nippert, F., Schreckenber, R. y Schlüter, K. D. (2017). Isolation and Cultivation of Adult Rat Cardiomyocytes. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 128, 1-10. <https://doi.org/10.3791/56634>
- O.M.S. Organización Mundial de la Salud (2018). Cáncer. Revisado el 4 de Noviembre 2018 en <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Ohshima, H., Tatemichi, M. y Sawa, T. (2003). Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*, 417(1), 3–11. doi: 10.1016/s0003-9861(03)00283-2
- Ohshima, H., Tazawa, H., Sylla, B. y Sawa, T. (2005). Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *Mutat Res*, 591(1-2), 110–122. doi: 10.1016 / j.mrfmmm.2005.03.030
- Oliveira, P. A., Colaco, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-la-Cruz, L. F., Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Ciênc*, 79(4), 593-616. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652007000400004>
- Ong, D. S., Aertker, R. A., Clark, A. N., Kiefer, T., Hughes, G. C., Harrison, J. K. (2013). Radiation-associated valvular heart disease. *J Válvula cardíaca Dis*, 22(6), 883-92.
- Parma, G., Lluberas, N., Castillo, C., Ormaechea, G., (2013). Quimioterápicos y Cardiotoxicidad: un enfoque actual y práctico para el clínico de una disciplina en pleno desarrollo. *Archivos de Medicina Interna*, 35(2): 38-47. <http://www.scielo.edu.uy/pdf/ami/v35n2/v35n2a03.pdf>
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 333(1), 19–39. doi: 10.1016 / s0009-8981 (03) 00200-6

- Pitot, H. C. and Dragan, Y. P. (1991). Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J*, 5(9), 2280–2286.
- Pivet, D. (2010). Modulación del calcio intracelular por insulina en el cardiomiocito de rata adulta [Tesis para obtener el título de química farmacéutica. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas, Universidad de Chile]. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/105342>
- Quintanar, M. A. y Calderón, J. V. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *REB*, 28(3), 89-101. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2009/reb093d.pdf>
- Quiralte, P. M. (2019). Antitumorales inhibidores de la timidilato sintasa [Trabajo fin de grado. Facultad de farmacia universidad complutense]. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL%20QUIRALTE%20PULIDO.pdf>
- Rebollo, M. N. (2016). Nuevas estrategias en la administración y liberación de doxorubicina [Trabajo fin de grado. Universidad de Sevilla Facultad de Farmacia, Sevilla]. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/50472/Rebollo%20Moro,%20Nerea.pdf>
- Regueira, T., Andresen, M., Djafarzadeh, S. (2009). Disfunción mitocondrial en sepsis, impacto y posible papel regulador del factor inducible por hipoxia (HIF -1). *Med intensiva*, 33(8), 385-392. <http://scielo.isciii.es/pdf/medinte/v33n8/revision.pdf>
- Rivera, M. (1999). Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) de la Casiopeina III E en Rata y Ratón por vía Intravenosa e Intraperitoneal [Tesis de Licenciatura Médico Veterinario Zootecnista, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria]. <http://132.248.9.195/pd1999/277628/Index.html>
- Rodríguez-Mercado, J. J., Florín-Ramírez, D., Álvarez-Barrera, L. y Altamirano-Lozano, M. A. (2017). In vitro DNA damage by Casiopeina II-gly in human blood cells. *Drug Chem Toxicol*, 40(2), 164-170. doi: 10.1080/01480545.2016.1190738
- Roldan, E. y Cancino, D. (2006). Evaluación de los efectos genotóxico y clastógeno de la Casiopeina III-ia en linfocitos humanos in vitro. 2do Congreso Nacional de Química Medica.
- Romero, L. C, Márquez, A., Gracia, I., Müller, G., Ruiz, L. (1996). Estadio de la estabilidad de las Casiopeinas II y III en soluciones fisiológicamente compatibles. 2ª Jornada de trabajo en Casiopeinas, Facultad de química, UNAM. A.5. p 20-22.

- Romero, L. C., Márquez, A., Gracia, I., Müller, G., Ruiz, L. (1998). Estabilidad de las Casiopeinas II y III en soluciones fisiológicamente compatibles. 3ª Jornada de trabajo en Casiopeinas, Facultad de química, UNAM. A.2. p 4-7.
- Ruiz-Azuara, L. y Bravo-Gómez, M. E. (2010). Copper compounds in cancer chemotherapy. *Curr Med Chem*, 17(31), 3606–3615. doi: 10.2174 / 092986710793213751
- Ruiz-Ramirez, L., De La Rosa, Y. O., Gracia-Mora, I. y Mendoza, A. (1995). Casiopeinas, metal based- drugs, a new class of antineoplastic and genotoxic compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 59(2-3), 206.
- Sánchez, C. (2018). Efecto antiproliferativo y proapoptótico de las Casiopeinas III-Ea y III-La en dos líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello [Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista. Facultad de odontología, UNAM]. <http://132.248.9.195/ptd2018/octubre/0781770/Index.html>
- Sánchez, J. (2015). Mecanismo protector antioxidante de tiorredoxina 1 (Trx1) en el miocardio de ratones sépticos [Tesis para obtener el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Biología Molecular]. <https://docplayer.es/12223063-Mecanismo-protector-antioxidante-de-tiorredoxina-1-trx1-en-el-miocardio-de-ratones-septicos.html>
- Sarvazyan, N. (1996). Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes. *Am. J. Physiol*, 271(5 Pt 2), 2079–2085. doi: 10.1152 / ajpheart.1996.271.5.H2079
- Schlame, M., Rua, D., Greenberg, M. L. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res*, 39(3), 257-88. doi: 10.1016/s0163-7827(00)00005-9
- Schlüter, K. D., Piper, H. M. (2005). Isolation and Culture of Adult Ventricular Cardiomyocytes. *Practical Methods in Cardiovascular Research*, 557–567. doi:10.1007/3-540-26574-0\_28
- Secretaria de Salud (2017). Cáncer, tercera causa de muerte en México. Revisado 05 de febrero de 2019 en <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
- Siegel, R., Miller, K., Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin*, 68(1), 7–30. doi: 10.3322 / caac.21442
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82(2), 291-295. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024
- Silva-Platas, C., Guerrero-Beltrán, C. E., Carrancá, M., Castillo, E. C., Bernal-Ramirez, J., Oropeza-Almazan, Y., Gonzalez, L. N., Rojo, R., Martinez L. E., Valiente-Banuet, J.,

- Ruiz-Azuara, L., Bravo-Gomez, M. E., Garcia, N., Carvajal, K., Garcia-Rivas, G. (2016). Antineoplastic copper coordinated complexes (Casiopeinas) uncouple oxidative phosphorylation and induce mitochondrial permeability transition in cardiac mitochondria and cardiomyocytes. *J Bioenerg Biomembr*, 48(1), 43-54. doi:10.1007/s10863-015-9640-x
- Silva-Platas, C., Villegas, C. A., Oropeza-Almazán, Y., Carrancá, M., Torres-Quintanilla, A., Lozano, O., Valero-Elizondo, J., Castillo, E. C., Bernal-Ramírez, J., Fernández-Sada, E., Vega, L. F., Treviño-Saldaña, N., Chapoy-Villanueva, H., Ruiz-Azuara, L., Hernández-Brenes, C., Elizondo-Montemayor, L., Guerrero-Beltrán, C. E., Carvajal, K., Bravo-Gómez, M. E., & García-Rivas, G. (2018). Ex Vivo Cardiotoxicity of Antineoplastic Casiopeinas Is Mediated through Energetic Dysfunction and Triggered Mitochondrial-Dependent Apoptosis. *Oxid med cell longev*, 2018(8949450). <https://doi.org/10.1155/2018/8949450>
  - Stewart, J. R., Fajardo, L. F., Gillette, S. M., Constine, L. S. Radiation injury to the heart. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 31 (5), 1205-11. doi: 10.1016/0360-3016(94)00656-6.
  - Sugimori, T., Masuda, H., Ohata, N., Koiwai, K., Odani, A. y Yamauchi, O. (1997). Structural Dependence of Aromatic Ring Stacking and Related Weak Interactions in Ternary Amino Acid–Copper(II) Complexes and Its Biological Implication. *Inorganic Chemistry*, 36(4), 576–583. doi:10.1021/ic9608556
  - Tello, M. (2011). Evaluación de micronúcleos y aberraciones cromosómicas inducidos por un nuevo compuesto de coordinación de cobre (casiopeina III-I-a) en linfocitos humanos durante G1/S [Tesis Licenciatura. Fes Zaragoza UNAM. México].
  - Tewart, J. R., Fajardo, L. F., Cohn, K. E. (1968). Experimental radiation-induced heart disease in rabbits. *Radiology*, 91(4), 814–817. doi: 10.1148/91.4.814
  - Tovar, S., Gracia, I., Ruiz, L. (2006). Evaluación antineoplásica de dos compuestos de coordinación mediante el empleo de modelos *in vitro*. En 2º congreso nacional de química médica. México DF.
  - Trejo C, Valencia G, Zuñiga S, Rodriguez A, Osorio L, Sanchez L, Gracia I, Marquez L, Sanchez A, Moreno M E, Cruz A, Bravo M E, Ruiz L, Rodriguez S, Sotelo J., 2005. Cas II gly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms neoplasia 7: 563-74.
  - Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Luvia, S. T., Gracia-Mora, I., Marquez-Rosado, L., Sánchez, A., Moreno-García, M. E., Cruz, A., Bravo-Gómez, M. E., Ruiz-Ramírez, L., Rodríguez-Enriquez, S. y Sotelo, J. (2005). Cas II gly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-



dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 7(6), 563–574. <https://doi.org/10.1593/neo.04607>

- Tresguerres, J., Ariznavarreta, C., Cachofeiro, V., Cardinali, D., Escrich, E., Gil, P., Lahera, V., Mora, F., Romano, M., Tamargo, J. (2005). *Fisiología humana*. Mc Graw-Hill Internamericana.
- Veinot, J. P., Edwards, W.D. (1996). Pathology of radiation-induced heart disease: a surgical and autopsy study of 27 cases. *Hum Pathol*, 27 (8), 766-73. doi: 10.1016/s0046-8177(96)90447-5
- Velásquez, C. A., Gonzales, M., Berrouet, M. C. y Jaramillo, N. (2016). Cardiotoxicidad inducida por la quimioterapia desde las bases moleculares hasta la perspectiva clínica. *Rev Colomb Cardiol*, 23(2), 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2015.10.002>
- Velázquez, G. L. (2018). Cisplatino y análogos visión actual y perspectiva del futuro; [Trabajo fin de grado. Universidad de Sevilla]. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/82359/TFG.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vértiz, G., García-Ortuño, L. E., Bernal, J. P., Bravo-Gómez, M. E., Lounejeva, E., Huerta, A. y Ruiz-Azuara, L. (2012). Pharmacokinetics and hematotoxicity of a novel copper-based anticancer agent: Casiopeina III-Ea, after a single intravenous dose in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 28(1), 78–87. doi:10.1111/j.1472-8206.2012.01075.x
- Wallace, K. B. (2003). Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol. Toxicol*, 93(3), 105–115. doi: 10.1034/j.1600-0773.2003.930301.x
- Watanabe, T., Tsuruo, T., Naito, M. y Kokubu, N. (1997). Regression of established tumors expressing P-glycoprotein by combinations of adriamycin, cyclosporin derivatives, and MRK-16 antibodies. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(7), 512–518. <https://doi.org/10.1093/jnci/89.7.512>
- Weisburger, J. (1999). Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. *Mutat Res*, 437(2), 105–112. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00077-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00077-0)
- Yeh, E., Tong, A., Lenihan, D., Yusuf, S., Swafford, J., Champion, C., Durand, J., Gibbs, H., Zafarmand, A., Ewer, M. (2004). Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Diagnosis, Pathogenesis, and Management. *Circulation*, 109(25), 3122- 3131. doi: 10.1161/01.CIR.0000133187.74800.B9.
- Zhang, Y. W., Shi, J., Li, Y. J., Wei, L. (2009). Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 57(6), 435-445. doi:10.1007/s00005-009-0051-8