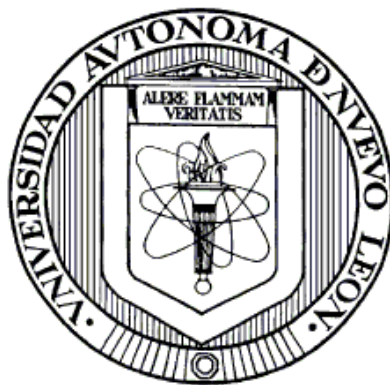


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS ORGANOMETÁLICOS
DEL TIPO CARBOXILATOS DE ESTAÑO (IV). EVALUACIÓN
DE SU EFECTO BYSTANDER IN VITRO.

Por

Q.F.B. MARGARITA ORTIZ MARTINEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación en
Farmacia

Mayo, 2012

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS ORGANOMETÁLICOS
DEL TIPO CARBOXILATOS DE ESTAÑO (IV). EVALUACIÓN
DE SU EFECTO *BYSTANDER IN VITRO*.

Revisión de la tesis:

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas

Dra. Omar González Santiago

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS ORGANOMETÁLICOS
DEL TIPO CARBOXILATOS DE ESTAÑO (IV). EVALUACIÓN
DE SU EFECTO *BYSTANDER IN VITRO*.

Aprobación de la tesis:

Presidente

Secretaria

1er. Vocal

Dra. María Teresa Garza González
Subdirectora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Margarita Ortiz Martínez

Fecha de Graduación: Mayo, 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Síntesis y caracterización de complejos organometálicos del tipo carboxilatos de estaño (IV). Evaluación de su efecto bystander in vitro.

Número de páginas: 109

Candidato para obtener el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia.

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método del Estudio: El presente trabajo de investigación consiste en la síntesis y posterior evaluación del efecto bystander producido por complejos organometálicos de estaño con un número de coordinación de 5, los cuales son sintetizados a partir de ligantes bidentados del tipo carboxilato. El efecto bystander se refiere a la respuesta biológica resultado de un evento que ocurre en una célula adyacente o cercana. Este efecto implica la existencia de un mecanismo capaz de amplificar bajas dosis, lo cual puede resultar en la producción de factores extracelulares que aumenten la tasa de muerte celular. Es por esto que la medición de este efecto permite tener una medida más cercana a la realidad del comportamiento del compuesto a probar. Compuestos que presenten un alto efecto bystander en las células de interés tienen mejores posibilidades de ser aplicados con éxito en quimioterapia, ya que se produciría un efecto mayor a menores dosis.

Contribuciones y Conclusiones: Se logró la síntesis de 4 complejos organometálicos de Estaño (IV) por el método propuesto en el planteamiento del proyecto, así mismo se aplicó con éxito un método alternativo de síntesis que no está reportado para ligantes similares a los empleados en este proyecto.

Se demostró que los complejos organometálicos sintetizados presentan una relevante actividad citotóxica, y que esta actividad es dependiente de la dosis hasta las 48 horas. Se observó la amplificación de la muerte celular por el efecto *bystander* en la línea celular adherente A-431 empleando dos metodologías reportadas en la literatura.

FIRMA DEL ASESOR: _____

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	iv
AGRADECIMIENTOS	
DEDICATORIA.....	¡Error! Marcador no definido.
TABLA DE CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
NOMENCLATURA	xi
Capítulo 1 Introducción	1
1.1 Origen del problema	1
1.1.1 Generalidades del cáncer	1
1.1.2 Evaluación de agentes antineoplásicos	2
1.1.3 Síntesis de nuevos fármacos antineoplásicos.....	5
1.1.4 Compuestos Organometálicos de Estaño	8
1.1.5 Estructura de los compuestos organometálicos.....	13
1.1.6 Efecto <i>bystander</i>	17
1.1.7 Evaluación de nuevos fármacos antineoplásicos	25
1.2 Antecedentes.....	29
1.2.1 Compuestos organometálicos de estaño	29
1.2.1 Efecto <i>bystander</i>	32
1.3 Hipótesis.....	35
1.4 Objetivo general	35
1.5 Objetivos particulares	35
Capítulo 2 Materiales y Métodos.....	36
2.1 Síntesis de los complejos organometálicos de estaño	36
2.1.1 Síntesis de los ligantes.....	36
2.1.2 Síntesis de los complejos.....	39
2.2 Caracterización de los complejos de estaño	45
2.3 Determinación de la citotoxicidad de los complejos	46
2.3.1 Líneas celulares	46
2.3.2 Preparación de soluciones	48
2.3.3 Ensayos preliminares de citotoxicidad	48

2.3.4 Ensayo para la determinación de la citotoxicidad	50
2.4 Evaluación del efecto <i>bystander</i>	52
2.4.1 Protocolo de co-cultivo usando membranas	52
2.4.2 Evaluación de muerte celular en proporciones de células tratadas vs células no tratadas	54
Capítulo 3 Resultados y Discusión.....	56
3.1 Síntesis de los complejos organometálicos de estaño	56
3.1.1 Síntesis de ligantes	56
3.1.2 Síntesis de complejos organometálicos de estaño	58
3.1.3 Síntesis alternativa de los complejos	60
3.2 Caracterización de los complejos	62
3.3 organometálicos de estaño.....	62
3.4 Ensayos preliminares de citotoxicidad.....	71
3.5 Determinación de la citotoxicidad	74
3.6 Evaluación del efecto <i>bystander</i>	80
3.6.1 Protocolo de co-cultivo	80
3.6.2 Células tratadas vs células no tratadas.....	82
Capítulo 4 Conclusiones	84
Bibliografía	85
APÉNDICE A	90
Lista de Material y Equipo	90
APÉNDICE B	93
Reactivos	93
APÉNDICE C	95
Resultados espectroscópicos.....	95
Resumen autobiográfico	110

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
3.1	Características de los ligantes sintetizados.	57
3.2	Características de los complejos de estaño.	59
3.3	Nomenclatura abreviada de los compuestos sintetizados.	60
3.4	Características de los complejos N-Me y N-Phe.	61
3.5	Valores de citotoxicidad obtenidos en las pruebas preliminares con células MOLT-4.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Mecanismos de acción propuestos para compuestos organometálicos. (Tomado de Gerasimchuk, y otros 2007)	10
1.2	Estructura general de las bases de Schiff.	13
1.3	Estructura general de los compuestos organometálicos de estaño (IV) trisustituídos basados en ligantes carboxilatos.	15
1.4	Uniones gap.	19
1.5	Efecto <i>bystander</i> aplicado a tratamiento farmacológico	23
1.6	Estructuras obtenidas para los complejos de tipo carboxilato bidentado simétrico.	29
1.7	Método de síntesis para complejos organometálicos de estaño.	30
1.8	Estructuras reportadas de complejos organometálicos de estaño.	31
2.1	Reactivos de partida para la formación de la base de Schiff.	36
2.2	Síntesis de los ligantes. A) Ligante con sustituyente protón; B) Ligante con sustituyente flúor; C) Ligante con sustituyente dietilamino.	37
2.3	Montaje para la reacción de formación de los complejos.	39
2.4	Síntesis de los complejos con sustituyente protón.	41
2.5	Síntesis de los complejos con sustituyente flúor.	41
2.6	Síntesis de los complejos con sustituyente dietilamino.	42
2.7	Síntesis alternativa de los complejos con sustituyente	44

	dietilamino.	
2.8	Esquema en el que se muestra el fundamento de la determinación de la lactato deshidrogenasa para evaluar la citotoxicidad.	51
2.9	Montaje de las canastillas para el co-cultivo.	53
2.10	Esquema de una placa de 24 pozos donde se muestra la forma en que se dispusieron las muestras.	54
3.1	Placa de TLC mostrando los ligantes.	56
3.2	Fotografía de los 3 ligantes sintetizados.	58
3.3	Fotografía de 4 de los complejos sintetizados disueltos.	58
3.4	Estructura del ligante con sustituyente protón.	63
3.5	Estructura del complejo H Phe.	64
3.6	Estructura del complejo H Me.	65
3.7	Estructura del ligante con sustituyente flúor.	65
3.8	Estructura del complejo F Phe.	66
3.9	Estructura del complejo F Me.	67
3.10	Estructura del ligante con sustituyente dietilamino.	68
3.11	Estructura del complejo N Phe.	69
3.12	Estructura del complejo N Me.	70
3.13	Gráfica de los valores de citotoxicidad celular para las pruebas preliminares.	72
3.14	Gráfica de los valores de viabilidad celular para los complejos probados.	73

3.15	Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células A-431 a las 24 h de incubación.	74
3.16	Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células A-431 a las 48 h de incubación.	75
3.17	Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células A-431 a las 72 h de incubación.	75
3.18	Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células MOLT-4 a las 24 h de incubación.	76
3.19	Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células MOLT-4 a las 48 h de incubación.	77
3.20	Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células MOLT-4 a las 48 h de incubación.	77
3.21	Placas para la determinación de citotoxicidad por el método del rojo neutro.	78
3.22	Placas para la determinación de citotoxicidad por el método fluorométrico.	79
3.23	Explicación gráfica del montaje de las canastillas en las placas de co-cultivo.	79
3.24	Fotografía del montaje de las canastillas en la placa.	80
3.25	Gráfica de los porcentajes de citotoxicidad obtenidos en el ensayo de co-cultivo.	81
3.26	Gráfica de los porcentajes de citotoxicidad obtenidos en el ensayo de proporciones.	82

NOMENCLATURA

Símbolo o abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
ADN	Acido desoxirribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
COE	Compuestos Organometálicos de Estaño
DL50	Dosis letal media
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
EB	Efecto <i>Bystander</i>
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
<i>et al</i>	Y otros (lat. <i>et alteri</i>)
IC50	Concentración inhibitoria media
LDH	Lactato deshidrogenasa
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minutos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
PBS	Solución buffer salino de fosfatos
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Segundos
SBF	Suero bovino fetal

UV

Ultravioleta

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Origen del problema

1.1.1 Generalidades del cáncer

Uno de los componentes más importantes del desarrollo en el ser humano es la proliferación celular. En un organismo adulto, el proceso de división y muerte celular se encuentran en equilibrio dando lugar a un estado estacionario, donde el número de células permanece relativamente constante. En el organismo no todas las subpoblaciones celulares se comportan de la misma manera, existen células que abandonan el ciclo celular para diferenciarse y su renovación es escasa o nula, como sucede con las neuronas, otras como las de la piel son de manera constante sustituidas pasando de un proceso de mitosis al otro. Un tercer grupo de células se encuentran en un estado quiescente, o periodo G_0 del cual pueden salir y volver a tomar parte del ciclo celular si fuese necesario, esto le ocurre a las células encargadas de restablecer los linajes hematopoyéticos, o las células hepáticas. Todos estos, constituyen ejemplos concretos del riguroso control al que se encuentra sometido el crecimiento celular, el cual responde siempre a las necesidades específicas del organismo. Si estos controles que regulan la multiplicación celular no funcionan de manera

adecuada, la célula comienza a crecer y a dividirse aunque no sea necesario. Cuando la descendencia de éstas hereda la tendencia a proliferar sin control, el resultado es un clon que se expande indefinidamente y se forma un tumor (27).

Las células neoplásicas son normalmente células altamente especializadas que han sufrido una regresión a una etapa más simple y primitiva, y que a diferencia de las células normales, se dividen continuamente, pero de manera ineficiente. Debido a que una alta proporción de estas están sometidas a una división activa, son más vulnerables a las drogas antineoplásicas. Sin embargo, tejidos normales con un alto índice mitótico (ejemplo: medula ósea, bazo, timo y epitelio intestinal) son también susceptibles a estas drogas. En muchos casos la selectividad de acción de estos agentes depende del hecho de que el tejido proliferativo normal tiene diferentes características fisiológicas o bioquímicas que afectan la acción de las drogas (19).

1.1.2 Evaluación de agentes antineoplásicos

Los cultivos celulares pueden ser usados para el tamizado de toxicidad por estimación de las funciones basales de las células o para probar funciones específicas de la célula. Las pruebas generales de toxicidad, dirigidas principalmente a la detección de actividad biológica de las sustancias a probar, se pueden llevar a cabo en varios tipos celulares. Las líneas celulares más utilizadas incluyen líneas de fibroblastos humanos y líneas celulares tumorales.

Un número de parámetros tales como las tinciones vitales y no vitales, liberación de enzimas citosólicas, crecimiento celular y la eficiencia de clonación son usados para medir toxicidad.

Los principales problemas en la interpretación de resultados obtenidos *in vitro* para identificar efectos celulares específicos se deben a lo siguiente:

- ≈ El efecto observado puede ser sobre una función especializada de la célula que de forma indirecta afecta la proliferación celular.
- ≈ El efecto puede afectar las condiciones de desarrollo de las células en cultivo, por ejemplo modificando la osmolaridad o composición del medio.
- ≈ El efecto de la sustancia a probar en un sistema celular puede ser afectado por las condiciones de incubación, problemas de solubilidad o estabilidad en el medio de cultivo.

La valoración de la significancia de los resultados de las pruebas *in vitro* en relación con la situación *in vivo* presenta otro problema aun mayor, ya que se ha observado en diversos estudios que la sensibilidad celular intrínseca es solamente un factor, y no necesariamente el más importante. Otros factores al día de hoy no pueden ser simulados *in vitro*.

El primer y más fácilmente observable efecto luego de la exposición de las células a un agente tóxico es la alteración morfológica y/o el cambio de la forma del cultivo en monocapa. Otro indicador de toxicidad es la alteración en el

crecimiento celular. El efecto de un agente en la capacidad de la célula para replicarse es usado como un índice de toxicidad; la concentración de la sustancia a la que un 50 % de las células no se multiplican es llamada dosis inhibitoria 50 (ID₅₀) (19).

La reproducción celular puede ser medida por varios parámetros tales como: el conteo de células y el contenido de ADN, contenido de proteínas o actividad enzimática. Otro índice directo de toxicidad es la medición de la viabilidad celular usando tintes vitales como el azul de tripano, que entra solamente a las células muertas o el rojo neutro que es tomado activamente por las células vivas. Un conteo de células vivas y muertas en comparación con el control provee un índice de letalidad del compuesto de prueba.

Otros indicadores de toxicidad a las funciones celulares basales involucran medir alteraciones bioquímicas o metabólicas. La actividad de la deshidrogenasa láctica en el medio de cultivo es usualmente medida como la conversión de NADH-NAD necesaria para convertir piruvato en lactato y se ha usado como un índice de daño en la membrana.

La toxicidad selectiva en tumores observada con algunos agentes quimioterapéuticos, depende más de factores farmacocinéticos y metabólicos en las células diana, que de la acción directa del agente (19). Debido a esto, en ensayos *in vitro* es muy difícil determinar si un tratamiento presenta selectividad por un tejido tumoral en particular.

Las propiedades fisicoquímicas del compuesto a probar determinan las condiciones de exposición y la concentración del agente en el medio de cultivo. El medio es usualmente una solución acuosa con la adición de suero sanguíneo. Solo los compuestos hidrofílicos pueden ser completamente solubilizados, de manera que las sustancias lipofílicas deben ser solubilizadas en algún solvente no acuoso previo a la administración por lo que es necesario llevar un control usando el solvente de acarreo, para establecer los efectos del mismo sobre el cultivo (19).

La línea celular utilizada debe seleccionarse en base a información biológica relevante, tales como la tasa de crecimiento, origen de las células. Además, es necesario considerar, si existe algún fármaco antineoplásico que tenga actividad contra ella. Se considera “actividad” a la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular al menos en un 50% a una dosis única de 50 µg/ml (33).

1.1.3 Síntesis de nuevos fármacos antineoplásicos

El descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos se ha convertido en un reto mayor para la industria farmacéutica, ya que el costo de innovación y desarrollo se ha incrementado dramáticamente en los últimos años (17).

El llamado para el descubrimiento de agentes para combatir el cáncer menos tóxicos, más selectivos y más efectivos se ha vuelto más urgente. Desde que la guerra contra el cáncer fue declarada cuatro décadas atrás, crecientes esfuerzos en el descubrimiento y desarrollo de fármacos anti cancerígenos por parte de científicos en todo el mundo han resultado en la aprobación de muchos productos para su tratamiento.

Además de las dificultades intrínsecas a la terapia farmacológica del cáncer, existe el hecho de que muchos fármacos comparten el mismo mecanismo de acción, y es por ello que la resistencia a multidrogas se ha vuelto un reto a vencer. El diseño de fármacos basado en la estructura y el mecanismo ha emergido como una nueva herramienta en la química medicinal y se está convirtiendo en la principal fuente del actual descubrimiento de nuevas moléculas con aplicación en la terapéutica. Este enfoque es también prometedor para proveer drogas de eficacia para el tratamiento del cáncer, que tengan mayor potencia y selectividad, y que generen menor toxicidad (37).

La elucidación del mecanismo por el cual los agentes antineoplásicos inducen apoptosis es de vital importancia para entender las bases de la resistencia a drogas y para optimizar las terapias (8). Los compuestos basados en metales gozaban de un amplio uso en los procedimientos terapéuticos antiguos, pero debido a su escasa selectividad y alta toxicidad fueron progresivamente abandonados en favor de compuestos orgánicos más seguros, ya sea sintéticos o aquellos aislados de fuentes naturales. En consecuencia, el número de

fármacos basados en metales ha decrecido y en la actualidad muy pocos siguen en uso. La exitosa aplicación de los complejos metálicos en el tratamiento de numerosas enfermedades humanas es un área en expansión en la investigación biomédica y de química inorgánica. El cáncer es el principal objetivo de esta incipiente área de estudio (25).

El descubrimiento, un poco al azar, de la actividad antiproliferativa del complejo de platino (cis-platino) en el año 1965 por Rosenberg, y la exitosa introducción de éste en el tratamiento del cáncer testicular renovó el interés en los fármacos basados en metales, particularmente complejos organometálicos como agentes antitumorales. Los ligandos orgánicos (con sus inherentes propiedades químicas y biológicas) crean una distribución espacial que puede optimizar la llegada del compuesto a su sitio de acción en la célula. De los miles de compuestos derivados de metales, alrededor de 30 han sido sintetizados a gran escala y probados. Algunos de ellos están ahora en la fase II y III de ensayos clínicos. La búsqueda de drogas alternativas al cis-platino y sus derivados, los cuales se siguen utilizando en más del 50% de regímenes de tratamiento para pacientes con cáncer, es prioritaria. A pesar de su tremendo éxito, los compuestos de platino presentan dos desventajas: son ineficientes una vez que el tumor ha generado resistencia y tienen severos efectos secundarios como la nefrotoxicidad. Como consecuencia de su particular estructura, el cisplatino ofrece muy pocas posibilidades de mejoramiento racional para incrementar su especificidad y por tanto disminuir sus efectos secundarios (47).

1.1.4 Compuestos Organometálicos de Estaño

La química organometálica ha evolucionado rápidamente en los últimos 50 años, principalmente en áreas relacionadas con la catálisis y los nuevos materiales. Las aplicaciones en biología y medicina apenas comienzan, pero el potencial de emocionantes descubrimientos es claro. En el campo de la quimioterapia del cáncer, el complejo de ciclopentadienil con titanio, dicloruro de titanoceno [Cp_2TiCl_2] se encuentra en ensayos clínicos y un derivado ferroceno del Tamoxifeno es un candidato para el tratamiento del cáncer de mama (55).

Los compuestos organometálicos se definen como complejos metálicos que contienen al menos un enlace covalente metal-carbono. Los organometálicos tienen una gran variedad estructural, una estereoquímica más diversa que la de los compuestos orgánicos y permite el diseño racional de ligandos para controlar su actividad. Además se obtienen compuestos estables, sin carga, relativamente lipofílicos (24).

El estaño es un metal que ya sea como tal o en sus aleaciones y sus compuestos químicos, tiene una asombrosa versatilidad. Entre sus aplicaciones se encuentran: la estabilización de policloruro de vinilo (PVC), producción de biocidas, desincrustantes, desinfectantes de superficies, fungicidas y bactericidas por mencionar algunas (55).

En 1852 la química organometálica del estaño se volvió un área de estudio. Pero fue hasta un siglo después que se formularon rutas de síntesis estándar

para preparar ciertos compuestos organometálicos de estaño (COE). Ahora en el siglo XXI es cuando se empiezan a buscar nuevas aplicaciones para este grupo de compuestos (39).

El estaño y sus sales inorgánicas son esencialmente no tóxicos, sin embargo las especies alquílicas tienen una bien conocida toxicidad. Los mecanismos de toxicidad de estos compuestos aun no están bien entendidos (29).

La citotoxicidad inducida por los COE se ha asociado a varios mecanismos: inhibición de la síntesis de macromoléculas, alteración del metabolismo energético de la mitocondria, reducción de la síntesis de ADN e interacción directa con la membrana celular provocando un incremento de la concentración de calcio. La promoción de daño oxidativo y al ADN se han detectado *in vivo* (3). La interacción de los compuestos orgánicos de estaño con el ADN es principalmente de dos tipos:

- ☞ Interacción electrostática, en la que los compuestos orgánicos de estaño interactúan con los fosfatos aniónicos del ADN.
- ☞ La intercalación, en la que los compuestos orgánicos de estaño se insertan en los pares de bases apiladas de ADN (25).

Los resultados de los estudios de actividad biológica de los compuestos organometálicos de estaño son prometedores pero hay un problema práctico que debe mencionarse: la solubilidad. La solubilidad en medio acuoso es crucial

para poder aplicarse como agentes terapéuticos. Aunque no se descarta que si se usan aditivos o formas nuevas de administración/liberación este problema pueda superarse. Un sustituyente polar puede incrementar la solubilidad de estos compuestos, se requieren estudios químicos y farmacológicos para descifrar una relación estructura-actividad con lo cual se pueda realizar el diseño racional de nuevos fármacos basados en estos compuestos (6).

Los COE son conocidos por producir efectos en varias líneas celulares tumorales, pero poco se sabe acerca de su mecanismo de acción, en la figura 1.1 se observa el mecanismo propuesto para algunos complejos de metales tales como el estaño, platino, etcétera (52).

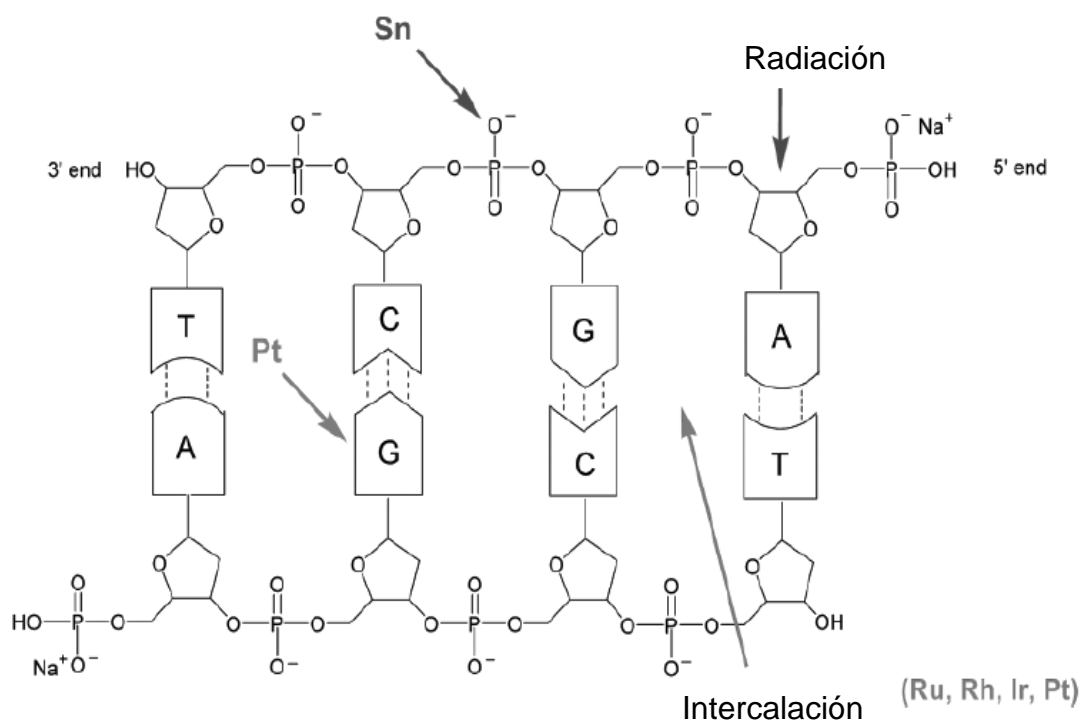


Figura 1.1. Mecanismos de acción propuestos para compuestos organometálicos. (Tomado de Gerasimchuk, y otros 2007)

La concepción equivocada de que los complejos organometálicos pierden estabilidad en las condiciones en las cuales los organismos se desarrollan, ha sido una de las razones por las que no se han considerado como apropiados candidatos para uso farmacéutico.

Los COE que son estables en el ambiente fisiológico se han desarrollado como, agentes antineoplásicos, radiofarmacéuticos para diagnóstico y terapia, así como biosensores. Los complejos organometálicos proveen una plataforma versátil para el diseño de fármacos. Los enlaces carbono-metal ejercen importantes efectos electrónicos y estéricos, que pueden ser usados para controlar su actividad biológica. Algunos COE son lo suficientemente inertes para actuar como andamios para diseñar compuestos que interactúen estereoespecíficamente con biomoléculas y puedan actuar por ejemplo; como inhibidores enzimáticos (40).

Ensayos *in vitro* de nuevos compuestos de coordinación, seguido por la selección de los compuestos con mejor actividad, sigue siendo la mejor manera de identificar potenciales candidatos para aplicaciones terapéuticas. En algunos COE que se han investigado, la porción activa se une a los grupos fosfato en el esqueleto del ADN, además se altera el metabolismo intracelular de fosfolípidos en el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (25).

En los COE estudiados no se ha observado la generación de fenómenos de resistencia, mostrando una ventaja con el cisplatino y sus análogos. Esto ha

generado un interés en estos compuestos, pero los estudios de estructura y actividad aun están en sus inicios (6).

Se ha determinado que la naturaleza del ligante no afecta la toxicidad a excepción de que él mismo sea tóxico. La habilidad para unirse al ADN depende del número de coordinación y la naturaleza de los grupos unidos al átomo de estaño. El fosfato del ADN usualmente actúa como sitio de anclaje. Con un número de coordinación de 5 el estaño forma un núcleo densamente positivo que es atraído por la carga negativa del fosfato.

La capacidad de los complejos para unirse al fosfato depende del acomodo espacial de los grupos alquílicos unidos directamente al estaño, además de su efecto sobre la nube electrónica. Se ha observado que este tipo de compuestos afectan también al aparato de Golgi y al retículo endoplásmico: inhibiendo la función del metabolismo de ceramidas, movilizando inositol trifosfato (IP_3) que a su vez es inducido por el calcio intracelular, y finalmente activando las señales que llevan a la síntesis de ADN. Por otra parte el uso de ligantes carboxilatos tiene relación con su estabilidad en medios acuosos (54).

Los carboxilatos orgánicos de estaño han sido uno de los grupos de compuestos antineoplásicos más extensivamente estudiados desde que fue observado que reducen significativamente el tamaño de los tumores cuando se prueban *in vivo*. Así mismo, los derivados trifenílicos de estaño han mostrado

una alta actividad citotóxica con diferentes líneas celulares de origen humano como se describe en la literatura (12).

1.1.5 Estructura de los compuestos organometálicos

Los COE son particularmente interesantes debido a que los grupos orgánicos unidos directamente al estaño permiten la modificación de la estructura y funcionalidad de la molécula (23).

Muchas bases de Schiff (fig. 1.2) son biológicamente activas y muestran una significativa actividad antimicrobiana y antitumoral, esta actividad que presentan por sí mismas las hace muy atractivas como ligandos para potenciar la actividad de los complejos organometálicos (48).

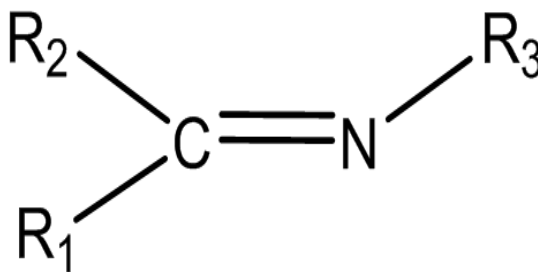


Figura 1.2. Estructura general de las bases de Schiff.

Las bases de Schiff juegan un importante rol como ligandos en la química de coordinación de metales aún un siglo después de su descubrimiento. Los químicos modernos continúan preparando bases de Schiff, y en la actualidad lo hacen como ligandos activos y bien diseñados. Las bases de Schiff y sus

complejos metálicos tienen una variedad de aplicaciones clínicas, analíticas, industriales y además juegan un rol importante en la síntesis y catálisis orgánica. La atención que se ha dado a los complejos de bases de Schiff con estaño (IV) es debida también a su potencial aplicación en química medicinal y biotecnología, aunada a su variedad estructural (47).

La reactividad química de los complejos puede elegirse en un balance, debe ser lo suficientemente inerte para llegar a su sitio de acción y minimizar su ataque a otras estructuras, pero obviamente se espera que actúe en cuanto se encuentre con su diana molecular. Para optimizar el diseño de fármacos y reducir los efectos secundarios, a veces es beneficioso disminuir la reactividad química, pero reteniendo la citotoxicidad (56).

Los compuestos organometálicos de estaño con números de coordinación mayores a cuatro siguen siendo extensivamente estudiados por su actividad biológica, su reactividad y su estereoquímica no rígida (34).

La unión del estaño con los grupos carboxílicos puede ser de forma terminal o puente como se muestra en la fig. 1.3. En la unidad R_3SnL , la función de L (ligante) juega un rol primordial en el transporte de la porción activa (R_3Sn) al sitio de acción (7).

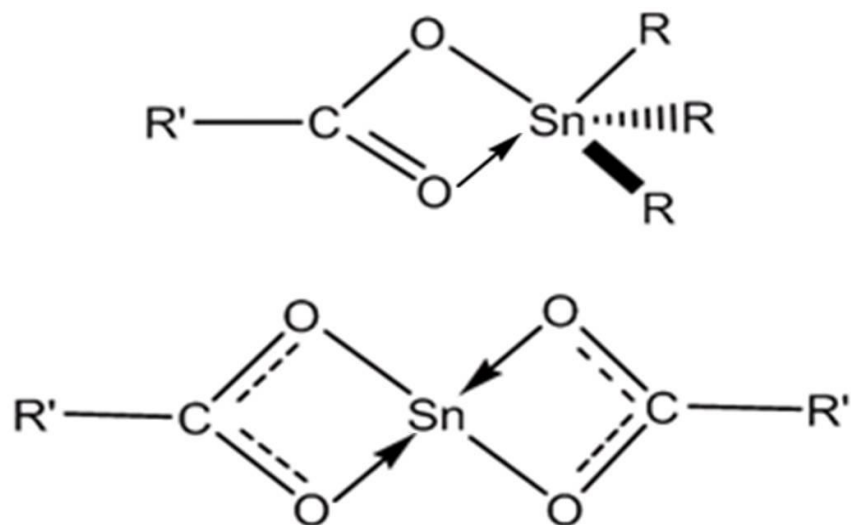


Figura 1.3. Estructura general de los compuestos organometálicos de estaño (IV) trisustituidos basados en ligantes carboxilatos.

Los carboxilatos trisustituidos de estaño $R'CO_2SnR_3$ son conocidos por adoptar una variedad de acomodos en estado sólido, y la preferencia por una coordinación 5 en derivados en los que la fracción orgánica no contiene un átomo adicional como donante potencial es bien conocida (12).

Diversos grupos de investigación han probado que los compuestos tributílicos de estaño inducen la apoptosis causando un flujo de Ca^{+2} extracelular y generando especies reactivas de oxígeno. Muchos compuestos organometálicos de estaño se han relacionado con toxicidad diferencial en varias líneas celulares humanas dependiendo de la longitud de la cadena alquílica.

Muchos estudios *in vitro* e *in vivo* con estos compuestos han reportado que tienen diferentes efectos tóxicos en diversas líneas celulares. Varios compuestos organometálicos de estaño reportados han mostrado efectos diferenciales en la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ . Los compuestos tributílicos, trietílicos y trimetílicos de estaño también han mostrado efectos sobre la calmodulina celular. Sin embargo, el mecanismo molecular para la toxicidad diferencial de estos compuestos no ha sido elucidado. La inhibición de la síntesis de macromoléculas y/o el metabolismo energético mitocondrial, la reducción de la síntesis de ADN, y la interacción directa con la membrana celular se ha implicado en la citotoxicidad inducida por compuestos organometálicos de estaño. Tanto la generación de especies reactivas de oxígeno como el incremento en la concentración de Ca^{+2} intracelular están reportados como los principales efectos de la apoptosis inducida por los compuestos organometálicos de estaño en varias líneas celulares (43).

Los complejos pentacoordinados presentan una actividad interesante y son muy versátiles estructuralmente, se ha observado que los compuestos trisustituidos muestran una mayor actividad que los disustituidos, este orden de actividad se observa en varios reportes. La actividad antitumoral de los COE se afecta considerablemente por su estructura de coordinación. La habilidad de los complejos para unirse al ADN depende de su número de coordinación y la naturaleza de los grupos unidos al estaño. La estructura tetraédrica en solución es la que presenta mayor actividad. Los grupos tetracoordinados tienen una fuerte tendencia a incrementar su coordinación y por lo tanto una mayor

capacidad de interactuar con grupos funcionales de proteínas y/o ácidos nucleicos presentes en el organismo (58).

Los compuestos organometálicos de estaño (IV) derivados de aminoácidos, cuyo enlace de coordinación se da entre el estaño y el oxígeno del carboxilato, muestran una importante actividad antitumoral y un potencial prometedor en muchos otros campos como la preservación de madera, química de polímeros, pesticidas, agentes bactericidas y agentes antiincrustantes, etc.

El conocimiento de uniones selectivas y específicas de especies organometálicas a sitios donadores en estructuras biológicas, y aun en moléculas pequeñas biológicamente relevantes, es muy importante para la elucidación del mecanismo de acción de estos compuestos en humanos (32).

De los reportes en la literatura se puede concluir que hay una relación directa entre la actividad biocida y el ambiente de coordinación del metal; y que el ligando aniónico también tiene relación con el grado de actividad de los compuestos organometálicos (49).

1.1.6 Efecto bystander

Es imperativo que cualquier estrategia terapéutica contra el cáncer posea la capacidad de afectar a las células neoplásicas no tratadas, ya que en un

tratamiento convencional las células a las cuales llega el fármaco pueden no ser suficientes para observar un efecto de importancia clínica. Uno de los objetivos principales de la quimioterapia oncológica es maximizar el efecto en las células tumorales y minimizar éste en las células normales (57).

El efecto *bystander* (EB) se refiere a la respuesta biológica de una célula como resultado de un evento en una célula adyacente o cercana. Dicho efecto depende de la comunicación intercelular y la consecuente amplificación del evento original. La evidencia sugiere que existen dos tipos diferentes de EB en las células de mamífero.

El EB implica la existencia de un mecanismo capaz de amplificar los efectos a una dosis baja, contradiciendo la presunción de la respuesta lineal a la dosis. Un fenómeno notable se ha observado en EB, donde la citotoxicidad se ha observado en células vecinas a las tratadas. Esto presenta una oportunidad terapéutica importante, ya que no todas las células tienen que ser alcanzadas por el fármaco. La inducción de la muerte celular se observó incluso cuando un muy bajo porcentaje de células son tratadas, lo cual es muy relevante en la terapéutica (14).

El fenómeno de efecto *bystander* se ha observado claramente en la terapia génica, y ha llevado a la intrigante posibilidad de que la citotoxicidad puede alcanzarse en células tumorales que no han sido tratadas. Los datos obtenidos han sugerido la participación de la comunicación intercelular mediada por uniones gap (fig. 1.4).

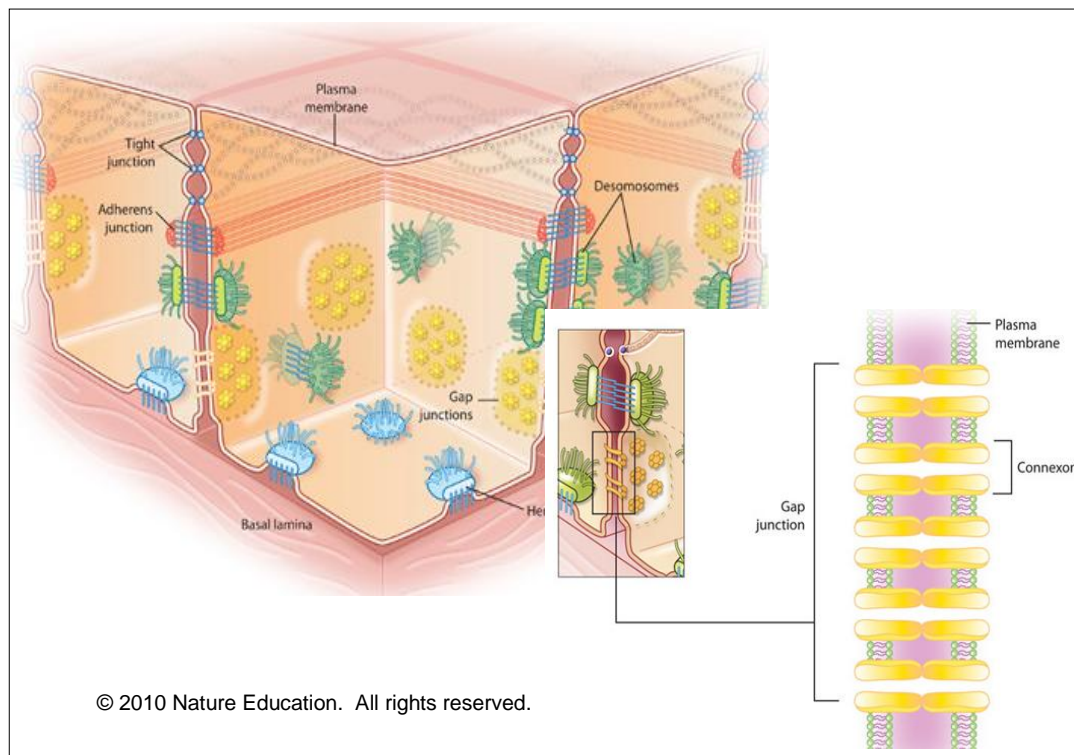


Figura 1.4. Uniones gap. (Como aparece en <http://www.nature.com>).

Se ha observado que cuando se aplica radiación a bajas dosis el EB puede tener un efecto protector, ya que genera señales a las células vecinas que les permiten generar tolerancia o resistencia (36). La aparición de anomalías genómicas y pérdida de la viabilidad en células distintas a las que son directamente tratadas con radiación ionizante es un proceso bien documentado

conocido como el efecto *bystander* inducido por radiación. Otros estudios reportan que las células en senescencia y con cáncer que no han sido sujetas a radiación ionizante o a otros tipos de estrés tienen la capacidad de afectar a otras células gracias a este efecto. Estos indicios sugieren que el EB es un fenómeno ampliamente extendido en el cual las células que están bajo algún estrés liberan sustancias que inducen daño en el ADN en células vecinas. Se ha encontrado que estas células contienen niveles elevados de histonas fosforiladas lo cual indica la presencia de daño a nivel de los ácidos nucleicos, llevando a una consecuente inestabilidad genómica y disminución de la viabilidad (44).

Los posibles mediadores del EB pueden ser citocinas relacionadas con la inflamación que se han encontrado a niveles elevados en el medio donde se tienen células cancerosas, dañadas y senescentes. Las especies reactivas de oxígeno, incluyendo el óxido nitroso también se han visto implicadas en la transmisión del EB.

Un punto importante es establecer si este efecto se presenta tanto *in vivo*, como ya se ha demostrado *in vitro*. En la radiobiología clásica existe el llamado efecto abscopal, donde la irradiación de un órgano resulta en el cambio en otro órgano no radiado. Este efecto puede sugerir la presencia de procesos similares al EB en el organismo completo. Se han reportado efectos similares al EB *in vivo* en tejidos vecinos a aquellos dañados o lesionados, niveles elevados de mediadores de inflamación, como las citocinas, quimiocinas y prostaglandinas, así como también la presencia de especies reactivas de oxígeno (44).

Los protocolos de terapia génica han sido limitados por la ineficiencia de los sistemas para llevar los genes terapéuticos a una mayor proporción de células, aun con inyecciones intratumorales. Este mismo efecto ocurre con los fármacos.

La muerte por el efecto *bystander* en los sistemas de terapia génica depende del contacto directo de las células tratadas y las células no tratadas, y no está mediado por factores solubles. La transferencia de metabolitos tóxicos a través de las uniones gap que unen a células vecinas se ha propuesto como un mecanismo para la muerte por el efecto *bystander*. Para investigar las bases de este efecto, es necesario estudiar la relación entre la comunicación intercelular mediada por las uniones gap y la amplificación de la muerte por *bystander*.

El mecanismo del EB puede incluir diversas posibilidades, sin embargo existe evidencia de que las uniones gap (comunicación intercelular mediada por ellas) son importantes en el desarrollo de este efecto. La evidencia además indica que las uniones gap permiten la difusión pasiva de metabolitos activos a las células vecinas, permitiendo que el efecto de la droga alcance a un número mayor de células.

Existen dos tipos bien diferenciados de efecto *bystander* y estos mismos han sido estudiados y bien documentados *in vitro*. El primero depende de la comunicación célula-célula, del contacto directo entre ellas y el segundo resulta de las sustancias que las células expuestas liberan al medio (fig. 1.5). El EB

también se ha demostrado en sistemas multicelulares en cultivo. La evidencia de la existencia de un EB independiente de las uniones gap puede ser un gran avance en el tratamiento de tumores porque estas uniones están usualmente afectadas durante la transformación tumoral (11).

La comunicación intercelular mediada por uniones gap es considerada fundamental en las interacciones célula - célula, dado que las uniones gap median la transferencia de iones, nucleótidos, y pequeñas moléculas regulatorias así como drogas o sus metabolitos a células adyacentes.

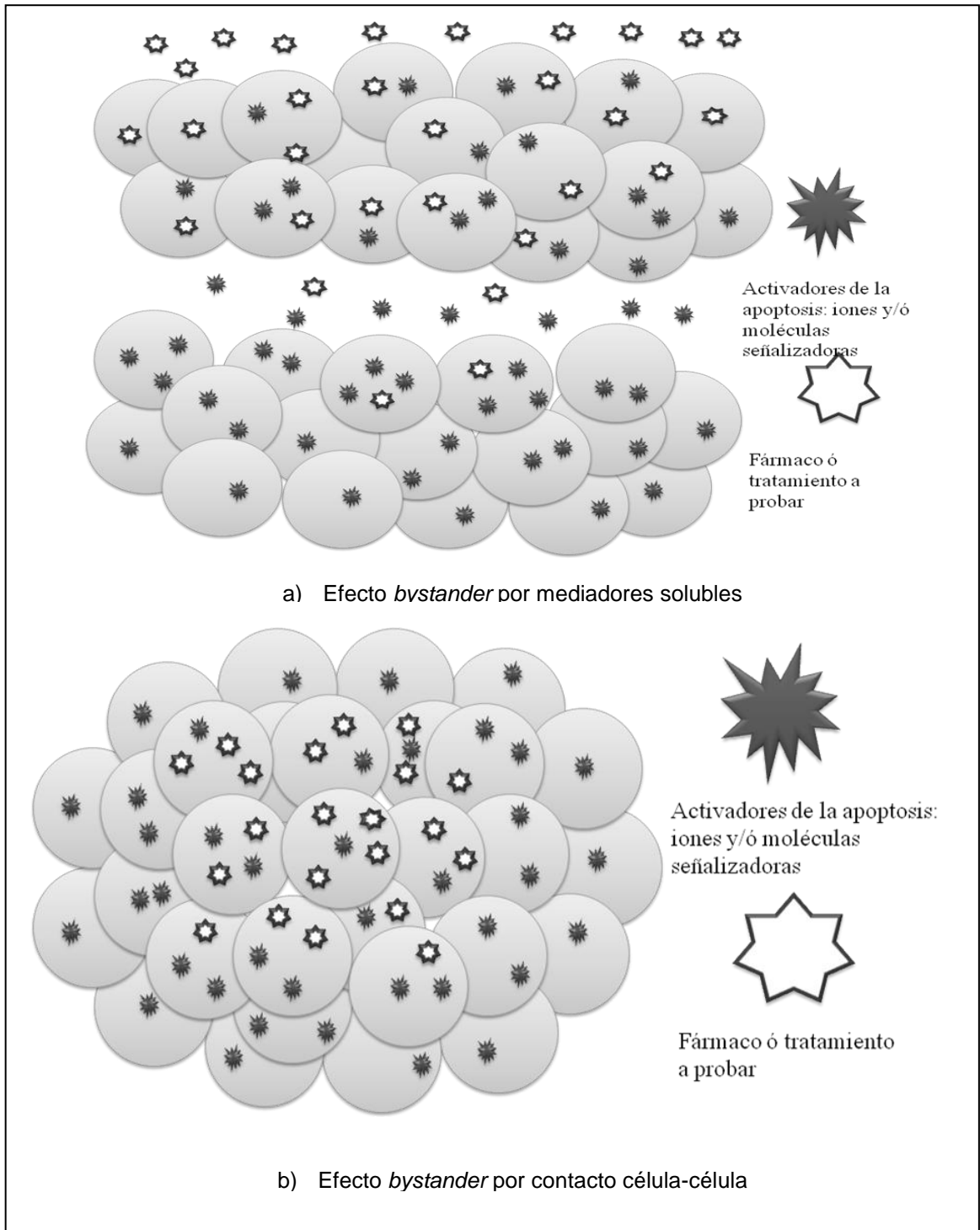


Figura 1.5. Efecto *bystander* aplicado a tratamiento farmacológico.

Se ha estudiado la posibilidad de incrementar uniones gap químicamente y ayudar así a la terapéutica del cáncer.

El primer intento de inducir el EB farmacológicamente fue demostrado usando ácido retinoico, este estudio se llevó a cabo dado que los retinoides activan la formación de uniones gap, pero se observó que existe un efecto independiente de estas uniones, es decir un EB independiente de la unión intercelular. La reducción de la supervivencia celular, como un mejoramiento del EB, parece adecuado para disminuir a la mitad la dosis letal 50 (14).

Se ha encontrado que la extensión del efecto *bystander* varía significativamente entre diferentes líneas celulares. Entender el mecanismo del efecto *bystander* es obviamente importante para el diseño de una estrategia terapéutica. El mecanismo *in vitro* del efecto *bystander* parece ser directo, *in vivo* podría ser más complejo, posiblemente involucra efectos en la vascularización del tumor o la respuesta inmune de células tumorales (21).

La presencia de un efecto *bystander* difusible, se observa independiente de la transferencia por contacto celular directo. Los metabolitos difundidos solo dañarían a las células circundantes a las que tomaron el medicamento.

Varios mecanismos pueden ser responsables del efecto *bystander in vivo*, y al menos dos de estos mecanismos se han probado en estudios de terapia génica. Los resultados apuntan en dos direcciones, la importancia de uniones gap y la captación de vesículas apoptóticas (59).

El efecto *bystander* mas estudiado es el asociado con la terapia génica (ganciclovir/*HSV-TK*) y al menos *in vitro*, este mecanismo aparentemente involucra una transferencia de metabolitos a través del contacto célula - célula, quizá a través de las uniones gap (57).

En los experimentos para la evaluación del efecto *bystander* es necesario tomar en cuenta la dosis de prueba, la cual no debe ser tan alta que elimine las células sin permitirles transmitir el mensaje, ni tan baja que permita fenómenos de tolerancia o resistencia (36).

También existe evidencia de que el EB puede ser responsable de la sobreexpresión de genes relacionados con la reparación del ADN y la apoptosis. En conclusión se ha encontrado evidencia de que el EB está presente en organismos completos y tejidos *in vivo*. La muerte por *bystander* es crítica para la erradicación de los tumores (11).

1.1.7 Evaluación de nuevos fármacos antineoplásicos

A pesar del éxito rotundo del cisplatino y otros agentes antitumorales basados en platino, la aplicación de otros agentes derivados de metales en la clínica ha sido excepcionalmente lenta. Ya que el ADN a menudo se ha propuesto como el blanco de estos agentes, hay un particular énfasis en aquellos que puedan interactuar con ácidos nucleicos. Se han estudiado los efectos de los COE en

células tumorales, está reportado que presentan una importante actividad biológica y menor toxicidad sistémica que los compuestos de platino. En general, la actividad biológica de estos compuestos es afectada por la estructura de la molécula y el número de coordinación del átomo de estaño (52).

Los complejos con número de coordinación de 4 tienen una fuerte tendencia a incrementar su coordinación a través de grupos con átomos oxígeno, azufre o nitrógeno, mientras que los compuestos con número de coordinación 5 no tienden a aumentar su coordinación, por lo cual estos últimos son preferidos para su aplicación terapéutica. La clase de compuestos organometálicos de estaño (IV) trisustituidos es significativamente más activa que otras clases debido a su valor de coeficiente de partición.

La actividad citotóxica *in vitro* de los COE es promisoria. De los valores de IC_{50} de los COE trisustituidos se concluye que el efecto citotóxico es estrictamente dependiente de la concentración (32).

La toxicidad de los complejos organometálicos de estaño ha sido reportada que presenta el siguiente orden $R_3Sn > R_2Sn > RSn$ y esta toxicidad se incrementa con la longitud de la cadena R, siendo los complejos alquílicos más tóxicos que los arílicos. Sin embargo, resultados más recientes contra algunas líneas celulares parecen apuntar a un necesario balance entre solubilidad y lipofilicidad para optimizar su eficacia (16).

1.1.7.1 Aplicaciones del efecto *bystander* en la terapéutica del cáncer

La mayor desventaja de la quimioterapia es la falta de toxicidad específica lo que lleva a importantes efectos secundarios e impide el continuar el tratamiento hasta reducir el tamaño del tumor. Un punto crítico de la estrategia de tratamiento del cáncer es la limitada eficacia de llegar a la totalidad de la masa tumoral, la habilidad de lograr que un metabolito tóxico difunda a las células no tratadas puede aligerar este problema. El efecto *bystander* es logrado por la difusión de un metabolito activo de las células dañadas hacia las células no tratadas que se localizan hacia el interior de la masa tumoral. Este efecto se ha observado tanto de forma dependiente como independiente de las uniones gap. Este efecto *bystander* se ha observado en muchos experimentos de terapia génica en cáncer, y se ha encontrado reducción de la masa tumoral aún cuando un pequeño porcentaje de la población haya sido directamente tratado.

El EB se ha estudiado en terapia génica y radiación pero es aplicable también a la evaluación de la terapia farmacológica. El presente trabajo de investigación consiste en la síntesis y posterior evaluación del efecto *bystander* de complejos organometálicos de estaño con un número de coordinación de cinco, los cuales son sintetizados a partir de ligantes bidentados del tipo carboxilato.

La medición del efecto *bystander* permite tener una medida más cercana a la realidad del comportamiento del compuesto a probar, ya que este evalúa la

respuesta biológica que se presenta como resultado de un evento que ocurre en una célula adyacente o cercana (36).

En los cultivos celulares en monocapa la captación del compuesto a prueba por cada una de las células es directa del medio todas las células están expuestas con una mayor área de contacto, alejándose del modelo real y por lo tanto impidiendo determinar si existe efecto *bystander* para una molécula potencialmente útil en quimioterapia. Para probar el efecto *bystander* de un compuesto es necesario utilizar protocolos de cultivo celular que permitan observar los efectos de la difusión y amplificación de señales presentes en los tumores *in vivo* y, poder así extrapolar su comportamiento al evaluar la citotoxicidad de un compuesto. Compuestos que presenten un alto efecto *bystander* en las células de interés tienen mejores posibilidades de ser aplicados con éxito en quimioterapia, ya que se produciría un efecto mayor a menores dosis.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Compuestos organometálicos de estaño

Los carboxilatos de estaño orgánicos han sido uno de los grupos de compuestos antineoplásicos más extensivamente estudiados desde que fue observado que reducen significativamente el tamaño de los tumores cuando se prueban *in vivo*. Gerasimchuk y colaboradores (2006), realizaron una revisión de varios trabajos de investigación sobre síntesis y evaluación de diversos complejos de estaño, presentándola como un estudio de relación estructura-actividad para los complejos de estaño (25).

En el 2007 Valla y colaboradores publicaron una revisión de los compuestos de estaño con potencial terapéutico, desde el punto de vista estructural considerando los complejos de tipo carboxílico bidentado simétrico con la estructura general presentada en la figura 1.6 (54).

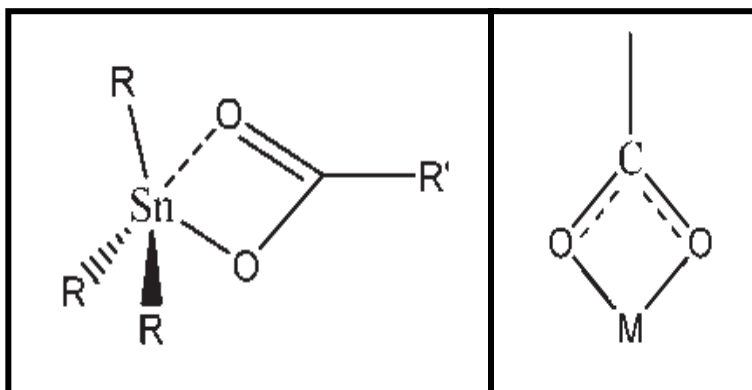


Figura 1.6. Estructuras obtenidas para los complejos de tipo carboxílico bidentado simétrico.

Camacho-Camacho y colaboradores (2008), concluyeron a partir de sus resultados y de lo reportado en investigaciones anteriores, que los derivados trifenílicos de estaño presentan una alta actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares tumorales de origen humano (12).

Ahmad y colaboradores (2008), observaron que los ésteres trisustituidos de estaño tienen una actividad biológica mayor a los disustituidos, esta relación se conserva en pruebas con bacterias, hongos y de citotoxicidad (2).

En 2008, Ramos-Organillo y colaboradores utilizan un método de síntesis modificado de Marcel Gielen para obtener complejos de estaño trisustituidos derivados de ligantes carboxilatos, en esta técnica utilizan trietilamina como base y un solvente orgánico no coordinante fig. 1.7 (42).

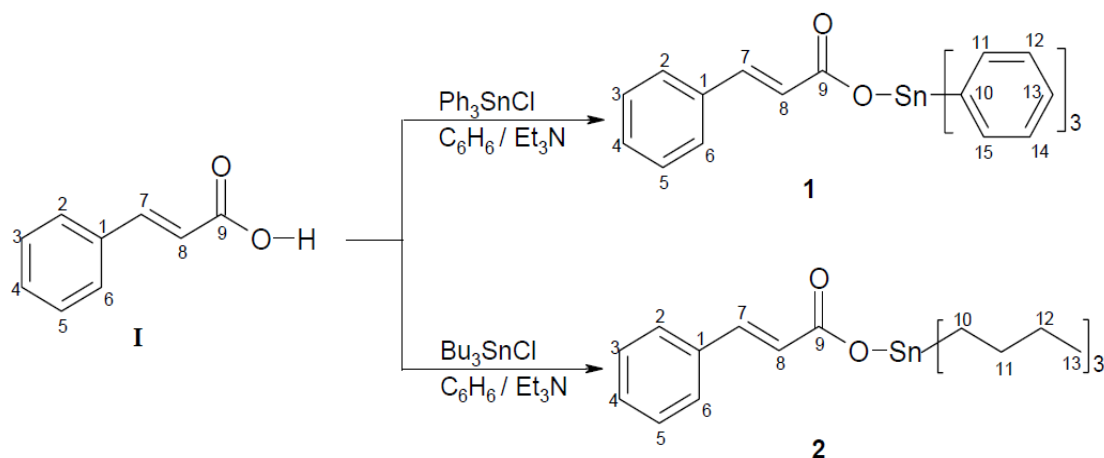


Figura 1.7. Método de síntesis para complejos organometálicos de estaño (modificado del método Gielen).

Alama y colaboradores (2009), reconocen diferentes mecanismos relacionados con compuestos organometálicos de estaño, como son la inhibición de la

síntesis de macromoléculas, alteración del metabolismo energético, reducción de la síntesis de ADN, algunos de los cuales se han demostrado *in vivo*; estos efectos han sido observados particularmente con complejos con número de coordinación cinco (3).

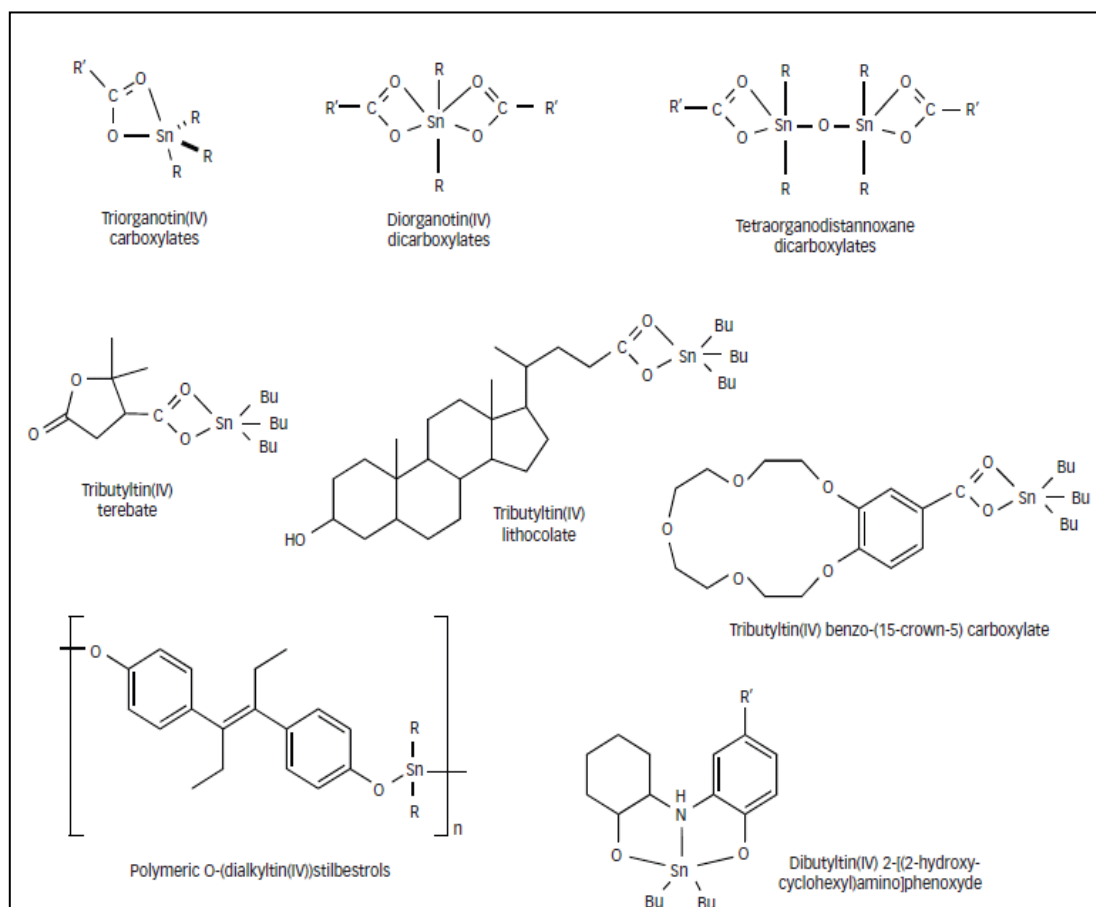


Figura 1.8. Estructuras reportadas de complejos organometálicos de estaño.

Pizarro, Habtemariam y Sadler (2010), discuten la concepción de que los complejos organometálicos pierden estabilidad en sistemas biológicos, proponiéndolos como una plataforma versátil para el diseño de fármacos, esto debido a que los enlaces carbono-metal ejercen importantes efectos electrónicos y estéricos, que pueden ser usados para modular su actividad biológica (40).

Estos antecedentes son de interés práctico dado que la literatura presenta evidencias de que complejos organometálicos de estaño (IV) de ligandos similares con los estudiados en este proyecto poseen una alta actividad biológica.

1.2.2 Efecto bystander

Toda estrategia terapéutica debe poseer la capacidad de afectar la proliferación de células tumorales, aun cuando éstas no sean alcanzadas en su totalidad por el gen (en terapia génica) o cualquier otro agente (fármacos, radiación, etcétera), lo cual se denomina efecto *bystander*, y por medio de éste se puede tener un efecto global mayor a una menor dosis. Lo anterior fue señalado por Wei y colaboradores en 1995 (57).

Los resultados de Fick y colaboradores (1995), muestran un mecanismo de muerte por *bystander* en células neoplásicas en co-cultivo. Proponen que el efecto *bystander* es una herramienta útil para el diseño y evaluación de una estrategia terapéutica (21).

Pope y colaboradores (1997) aportaron una definición descriptiva del efecto *bystander* y su aplicación en terapia contra el cáncer, reconocieron las implicaciones de las uniones gap en el efecto *bystander*, además de la presencia de un efecto a distancia producto de metabolitos tales como citocinas y otras moléculas señalizadoras (41).

Gómez-Treviño y colaboradores, en 2001 encontraron evidencias de la existencia de un efecto *bystander* independiente de uniones gap, lo que se llama un efecto a distancia, así mismo se confirma el efecto dependiente de uniones gap por microscopía electrónica (35). Este mismo grupo de investigación en 2003, estableció la metodología para la determinación porcentual del efecto *bystander* en células neoplásicas mediante proporciones de poblaciones (26).

Mitchel (2004), propuso una definición del efecto *bystander*, además de asociar los factores que intervienen en él, analizó la relación dosis-efecto, observando que para tratamientos radiológicos esta relación no es necesariamente lineal (36).

Redon y colaboradores (2010), encontraron indicios que sugieren que el efecto *bystander* es un fenómeno ampliamente extendido y que no sólo se presenta en células neoplásicas o dañadas, de hecho se mencionan reportes de efectos similares *in vivo* en tejidos funcionales sometidos a algún estímulo, este efecto puede ser inducido por fenómenos propios del metabolismo celular (44).

Los antecedentes antes mencionados y otros reportes revisados durante el planteamiento de este proyecto fundamentan el interés por sintetizar y evaluar COEs con potencial aplicación como agentes terapéuticos antineoplásicos.

En el caso particular de los compuestos sintetizados para este proyecto se buscó que contaran con una estructura tal que pudieran presentar los dos tipos

de interacción esperada con el ADN, como son la intercalación en la cadena y la unión con los fosfatos, sin descartar que su potencial actividad citotóxica ocurra por otro mecanismo. El diseño estructural de los compuestos que son el objeto de estudio de este proyecto de investigación, se llevó a cabo tomando en cuenta las estructuras ya reportadas en informes preliminares de análisis estructura-actividad para los COE. Luego de una revisión de los compuestos sintetizados por otros grupos de investigación, observando la modulación de la actividad al modificarse la estructura, se determinó la importancia de la presencia de grupos aromáticos, la trisustitución alquílica del estaño y el uso de ligantes de tipo carboxilato.

En base a lo cual se espera una actividad importante en los complejos sintetizados, considerando además de su actividad citotóxica intrínseca, su efecto *bystander*, aspecto clave para su postulación como agente quimioterapéutico.

1.3 Hipótesis

Los complejos organometálicos de estaño (IV) estudiados presentan un efecto *bystander* idóneo para postularse como nuevos fármacos antineoplásicos.

1.4 Objetivo general

Determinar el efecto *bystander* de compuestos de estaño (IV) como una medida de su potencial citotóxico.

1.5 Objetivos particulares

- ✓ Sintetizar y caracterizar ligantes con 3 sustituyentes de diferente polaridad.
- ✓ Sintetizar complejos de estaño (IV) a partir de los ligantes obtenidos.
- ✓ Caracterizar los complejos sintetizados por técnicas espectroscópicas.
- ✓ Evaluar el efecto citotóxico de los complejos de estaño (IV) en cultivo celular en monocapa.
- ✓ Determinación del efecto *bystander* de los complejos de estaño (IV) *in vitro*.

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Síntesis de los complejos organometálicos de estaño

2.1.1 Síntesis de los ligantes

Los ligantes sintetizados en este proyecto son bases de Schiff, con una porción carboxílica y diferentes sustituyentes en orientación *para* con respecto al doble enlace C=N, en los 3 casos la porción carboxílica proviene del ácido *p*-aminobenzóico (fig. 2.1).

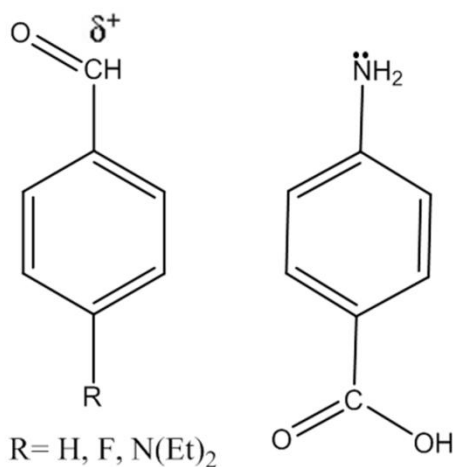


Figura 2.1. Reactivos de partida para la formación de la base de Schiff.

La reacción para la síntesis de los ligantes es una adición nucleofílica con una deshidratación consecutiva, lo cual conduce a la formación de un enlace C=N

(azometina) entre ambas porciones aromáticas. Las cantidades a utilizar se determinaron por relación estequiométrica. La síntesis se muestra en la fig. 2.2.

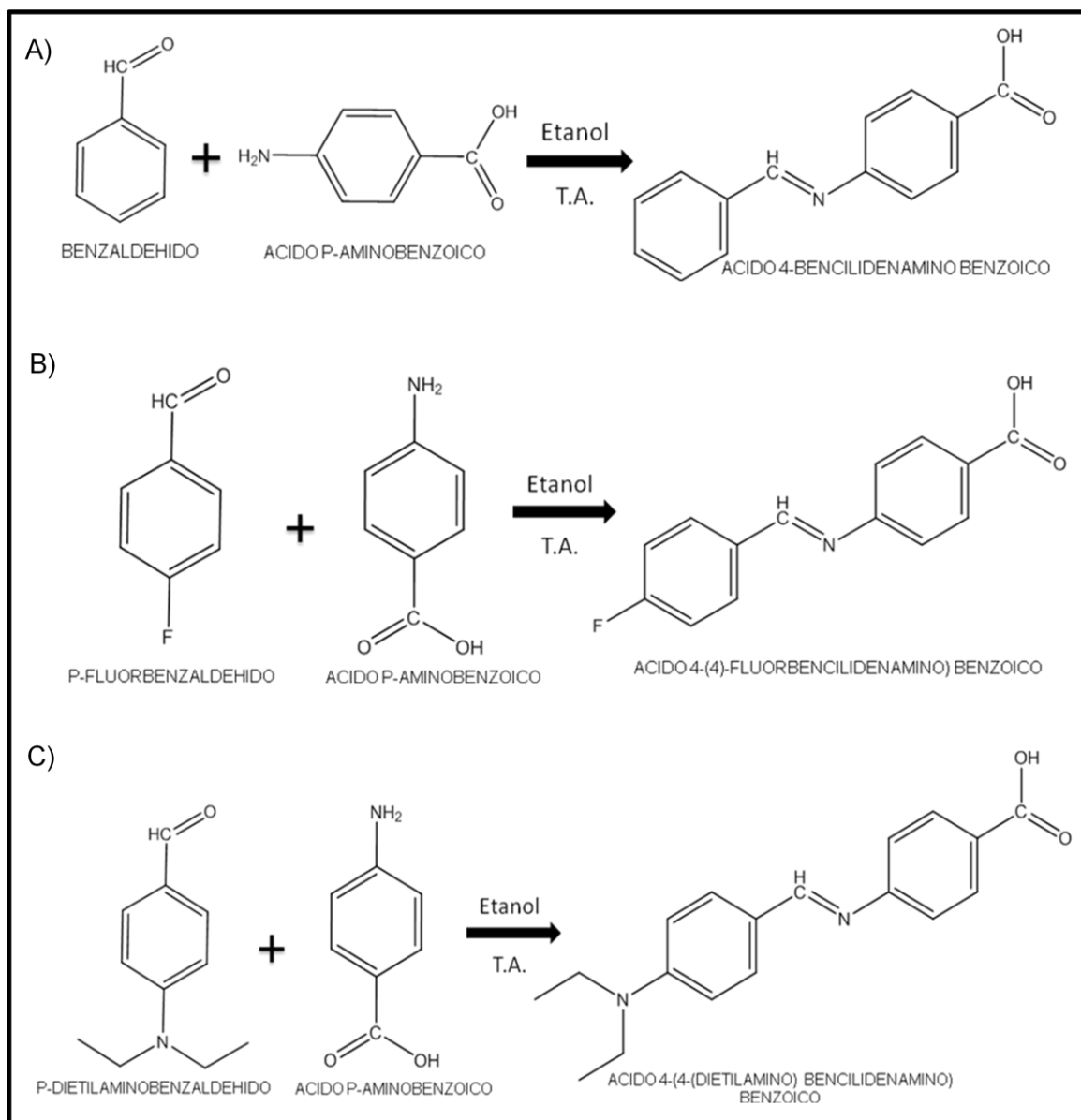


Figura 2.2. Síntesis de los ligandos. A) Ligante con sustituyente protón; B) Ligante con sustituyente flúor; C) Ligante con sustituyente dietilamino.

Para el ligante con sustituyente protón, los reactivos de partida fueron benzaldehído y ácido p-aminobenzóico ambos disueltos previamente en etanol. La reacción se llevó colocando ambos componentes en agitación constante a

temperatura ambiente hasta precipitación completa. El precipitado se filtró a vacío y se lavó con etanol frío.

Para obtener 1 g de ligante con sustituyente protón, se emplearon 0.6095 g de Ac. p-aminobenzóico y 0.45 mL de benzaldehído.

En el caso del ligante con sustituyente flúor, los reactivos de partida fueron p-fluorbenzaldehído y ácido p-aminobenzóico, ambos disueltos previamente en etanol. La reacción y separación del producto se realizó del mismo modo que en la preparación del ligante con sustituyente protón. Para obtener 1 g de ligante, se emplearon 0.5638 g de Ac. p-aminobenzóico y 0.44 mL de p-fluorbenzaldehído.

En el caso del ligante con sustituyente dietilamino, los reactivos de partida fueron p-dietilaminobenzaldehído y ácido p-aminobenzóico ambos disueltos previamente en etanol, se mezclaron ambos componentes y se dejaron en agitación constante a temperatura ambiente por 2 h, posteriormente se eliminó el solvente por rota-evaporación. Para obtener 1 g de ligante, se emplearon 0.4628 g de Ac. p-aminobenzóico y 0.598 g de p-dietilaminobenzaldehído.

Se determinó la pureza de los ligantes obtenidos mediante cromatografía en capa fina empleando como fase estacionaria silica gel soportado en placas de aluminio y como fase móvil hexano/acetato de etilo en proporción 9:1, después

del desarrollo de la cromatografía las placas se observaron bajo una lámpara UV.

2.1.2 Síntesis de los complejos

2.1.2.1 Síntesis por método derivado de Gielen

Los solventes utilizados fueron secados y purificados por los procedimientos estándar. Las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera seca, libre de oxígeno, saturada con nitrógeno empleando para esto una línea Shlenk (34).

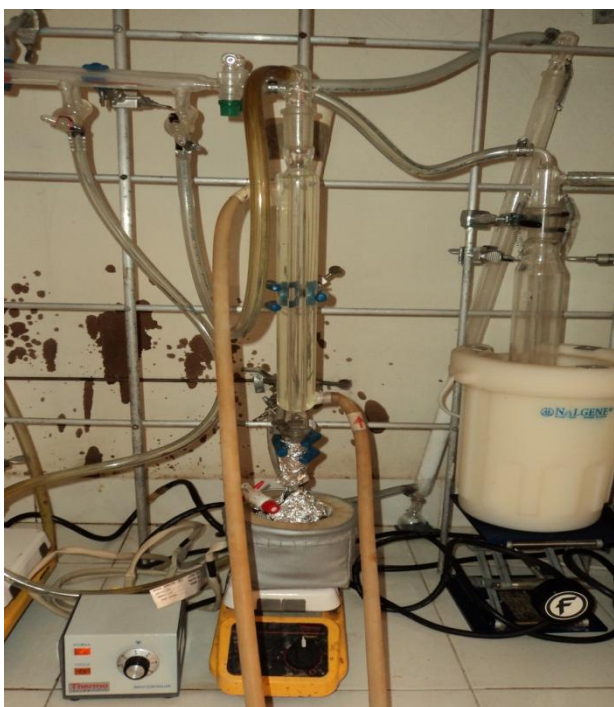


Figura 2.3. Montaje para la reacción de formación de los complejos.

Se realizó una modificación al método de Gielen reportado en la literatura (42) para llevar a cabo la reacción de formación de los complejos, en la figura 2.3 se muestra el montaje para reflujo que esta acoplado a la línea Schlenk con el

objetivo de conseguir y mantener las condiciones necesarias para el desarrollo de la reacción. Se determinó la cantidad de los reactivos a pesar mediante relación estequiométrica.

En un matraz Schlenk se pesó la cantidad necesaria de ligante, se le agregó tolueno seco, esta mezcla se llevó a una caja seca donde se pesó y se agregó el compuesto de estaño correspondiente según fuese sustituyente fenilo o metilo, y vía cánula se añadió trietilamina. El contenido del matraz se calentó a reflujo durante 18-20 horas. Posterior a lo cual la mezcla de reacción se filtró y se concentró a presión reducida. Después de la eliminación completa del disolvente, se obtuvo el producto como un sólido. La síntesis se resume en las figuras 2.4, 2.5 y 2.6; así mismo se explica detalladamente a continuación.

Para la obtención del complejo de trifenilestaño con sustituyente protón se añadieron 40mL de tolueno seco, posteriormente se agregaron 0.8564 g de cloruro de trifenilestaño ($(C_6H_5)_3SnCl$); a esta mezcla se le adicionaron 3.1 mL de trietilamina en un matraz Schlenk con 0.5 g de ligante con sustituyente H. Para la obtención del complejo de trimetilestaño con sustituyente protón se llevo a cabo el mismo procedimiento pero agregando 0.4101 g de cloruro de trimetilestaño ($(CH_3)_3SnCl$) y 2.9 mL de trietilamina.

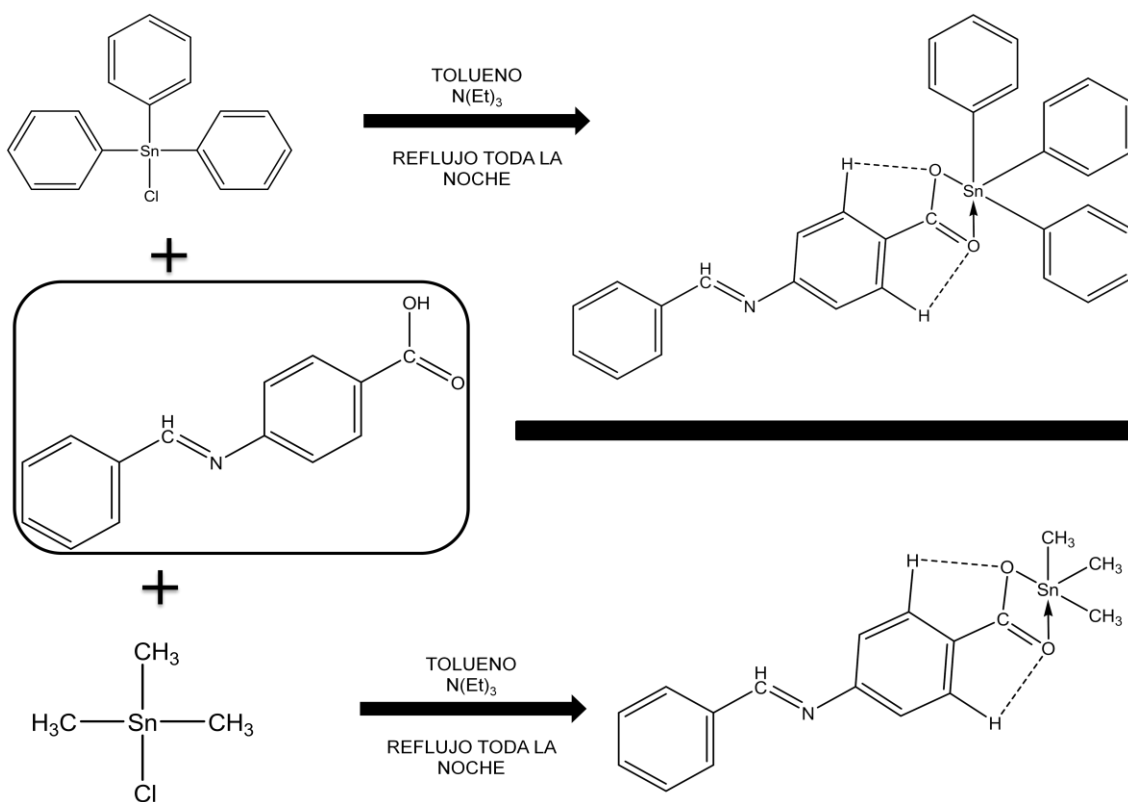


Figura 2.4. Síntesis de los complejos con sustituyente protón

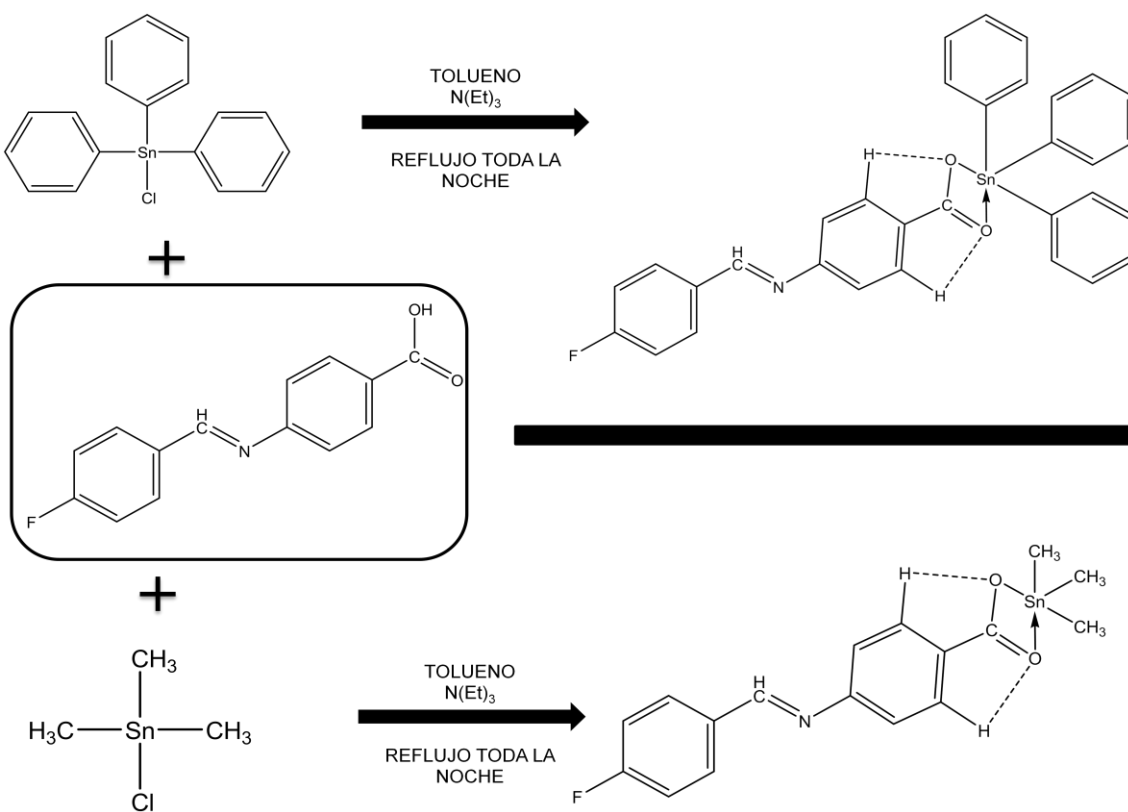


Figura 2.5. Síntesis de los complejos con sustituyente flúor.

A un matraz Schlenk conteniendo 0.5 g de ligante con sustituyente flúor se le adicionaron 40 mL de tolueno seco y 0.7930 g de cloruro de trifenilestaño, y posteriormente se le añadieron 2.9 mL de trietilamina para la obtención del complejo de trifenilestaño con sustituyente flúor. En el caso del complejo de trimetilestaño con sustituyente flúor se llevó a cabo el mismo procedimiento pero agregando 0.4101 g de cloruro de trimetilestaño ((CH₃)₃SnCl) y 2.9 mL de trietilamina.

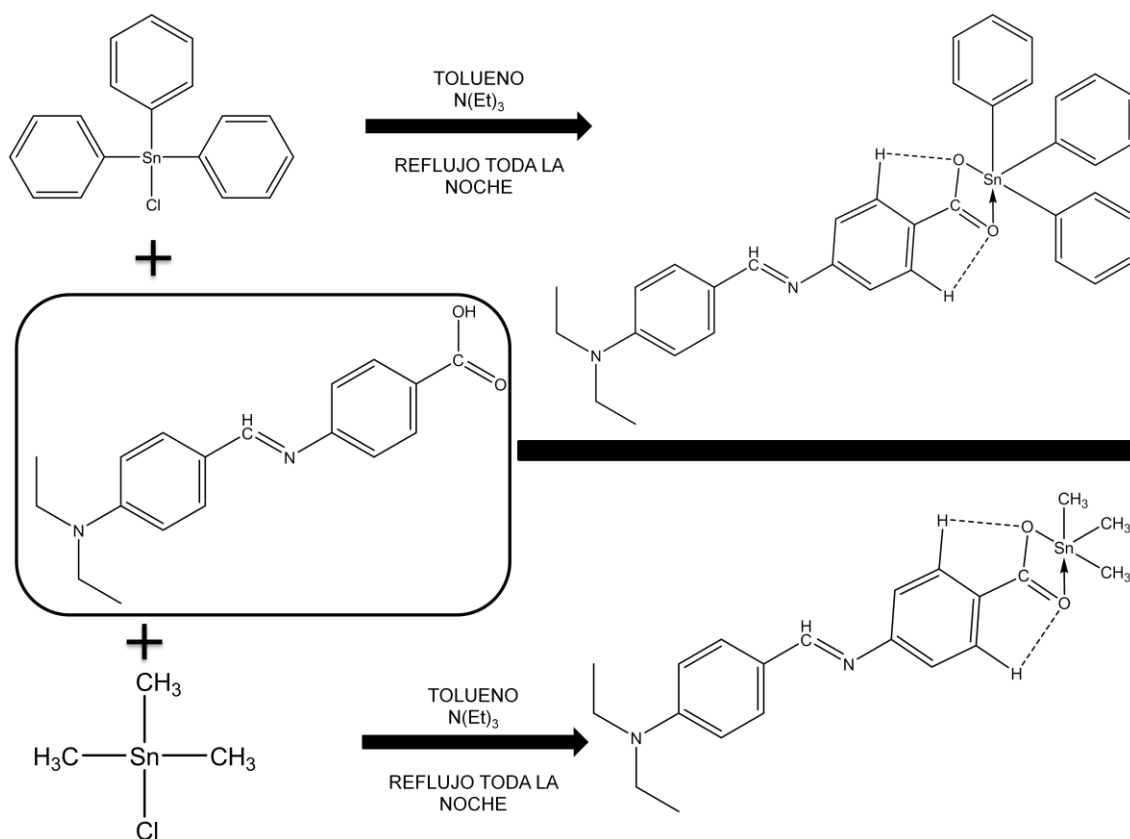


Figura 2.6. Síntesis de los complejos con sustituyente dietilamino.

Para la obtención del complejo de trifenilestaño con sustituyente dietilamino en un matraz Schlenk con 0.5 g de ligante con sustituyente dietilamino, se

añadieron 40mL de tolueno seco, posteriormente se agregaron 0.7833 g de cloruro de trifenilestaño ((C₆H₅)₃SnCl); a esta mezcla se le adicionaron 2.4 mL de trietilamina. Para la obtención del complejo de trimetilestaño con sustituyente dietilamino se realizó el mismo procedimiento pero se agregaron 0.3367 g de cloruro de trimetilestaño ((CH₃)₃SnCl) y 2.4 mL de trietilamina.

En todos los casos el contenido del matraz se calentó a reflujo durante 18-20 horas. La solución se filtró, los subproductos (mayoritariamente hidrócloruro de trietilamina) se retiraron junto al solvente, a partir del filtrado se purificó el producto como un sólido.

2.1.2.2 Síntesis alternativa de los complejos con sustituyente dietilamino

Se pesaron cantidades equimolares de ligante dietilamino y de hidróxido de potasio (KOH), se disolvieron en una mezcla 9:1 de metanol: agua. Al compuesto de estaño pesado en la misma proporción molar se le añadió metanol seco. Se mezclaron ambas porciones en atmósfera de nitrógeno y se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente hasta observar la formación de un precipitado. El sólido obtenido se filtró y posteriormente se lavó con solvente. La síntesis se muestra en la figura 2.7.

Para la obtención de 1 g de complejo de trimetilestaño con sustituyente dietilamino: en un matraz Schlenk con 0.4582 g de ligante con sustituyente dietilamino, se añadieron 20 mL de la mezcla metanol:agua, posteriormente se

agregaron 0.0867 g de hidróxido de potasio, una vez disueltos los componentes de esta mezcla, se le adicionaron vía cánula 10 mL de una solución conteniendo 0.5960 g de cloruro de trimetilestaño ((CH₃)₃SnCl) en metanol seco.

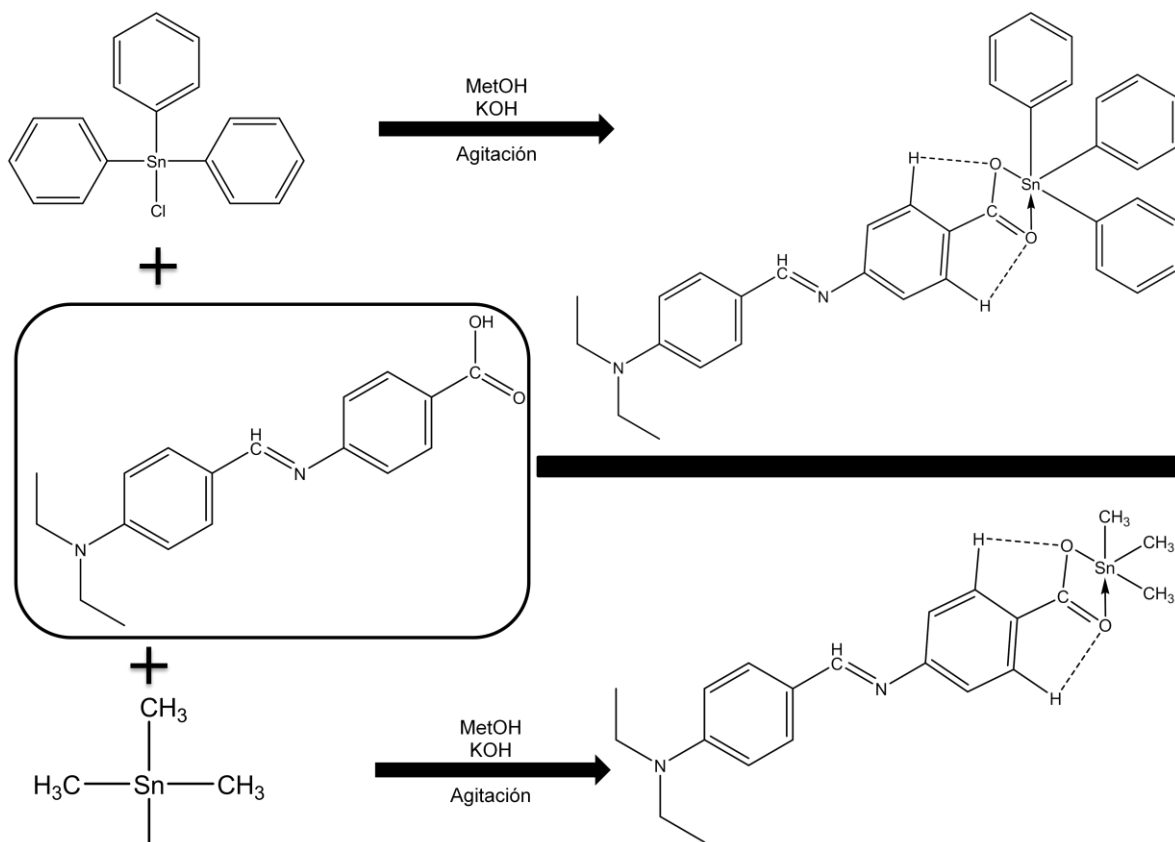


Figura 2.7. Síntesis alternativa de los complejos con sustituyente dietilamino.

Para la obtención de 1 g de complejo de trifenilestaño con sustituyente dietilamino: en un matraz Schlenk con 0.6435 g de ligante con sustituyente dietilamino, se añadieron 20 mL de la mezcla metanol:agua, posteriormente se agregaron 0.0818 g de hidróxido de potasio, una vez disueltos los componentes de esta mezcla, se le adicionaron vía cánula 10 mL de una solución conteniendo 0.4326 g de cloruro de trifenilestaño ((C₆H₅)₃SnCl) en metanol

seco. En ambos casos se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por 2 a 4 horas, en dicho lapso se observó la formación de un precipitado. Se filtró y el sólido obtenido se lavó con metanol seco, se purificó el producto como un sólido.

2.2 Caracterización de los complejos de estaño

La caracterización de los compuestos se realizó en dos etapas. La primera etapa consistió en comprobar la obtención de los ligantes, en primera instancia se determinó su punto de fusión y se realizó una cromatografía en capa fina para evaluar la pureza del producto como se mencionó en el apartado 2.1.1 correspondiente a la síntesis de ligantes, posteriormente se procedió a la confirmación estructural por técnicas espectroscópicas tales como RMN de ^1H y ^{13}C , espectrometría de masas e IR.

En la segunda etapa se verificó la formación del complejo, como primera evidencia se tomaron en cuenta aspectos físicos, solubilidad, punto de fusión y la ausencia de materia prima. Una vez que la evidencia presuntiva mostró la formación del producto, se confirmó la identidad de los complejos mediante técnicas espectroscópicas tales como RMN de ^1H y ^{13}C , espectrometría de masas e IR.

2.3 Determinación de la citotoxicidad de los complejos

Se evaluó la citotoxicidad que presentan los complejos sintetizados frente a dos líneas celulares como un índice de su actividad intrínseca.

Las técnicas empleadas para las determinaciones de viabilidad celular fueron, en el caso de la línea celular adherente la técnica del rojo neutro, mientras que en el caso de la línea celular en suspensión la técnica fluorométrica con el kit *CytoTox-ONE*, la descripción pormenorizada de las líneas celulares y técnicas mencionadas consta en los siguientes apartados.

2.3.1 Líneas celulares

En la etapa correspondiente a los bioensayos se utilizó la línea celular A-431, la cual pertenece a la colección de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Esta línea celular corresponde a la clasificación CRL1555 de la ATCC de *Homo sapiens*, son células con morfología epitelial aisladas de carcinoma epidermoide y de crecimiento adherente. Así mismo, se utilizó la línea celular MOLT-4, la cual también pertenece a la colección de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Esta línea celular corresponde a la clasificación CRL1582 de la ATCC de *Homo sapiens*, son células con morfología linfoblástica aisladas de leucemia linfoblástica aguda y de crecimiento en suspensión.

Las células fueron cultivadas en condiciones óptimas para su desarrollo, es decir; se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, en una estufa de humedad controlada y se les proporcionó además una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

Como medio de cultivo, en el caso de las A-431, se empleó el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) en una mezcla 1:1 con medio *Minimum Essential Media* (MEM); en el caso de las MOLT-4, se utilizó el medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI); en ambos casos se adicionó un suplemento de penicilina/estreptomicina (100 UI/ml/100 mg/ml) y suero bovino fetal (SBF) al 10%.

El mantenimiento de la línea celular de crecimiento adherente (A-431) se llevó a cabo mediante la preparación de subcultivos o pases, aplicando el método de tripsinización. Dicho método permite disgregar las células mediante la acción de tripsina/EDTA (0.25/0.02%) una vez que se alcanza la confluencia y obtener así nuevos subcultivos destinados a la propagación de la línea celular. Para conservar la línea celular se realizaron subcultivos o pases de las células MOLT-4, mediante dilución con medio fresco, alternando con ciclos de centrifugación para facilitar el lavado del paquete celular.

En ambos casos el cultivo se realizó utilizando material estéril desechable diseñado para cultivo celular.

2.3.2 Preparación de soluciones

Los compuestos fueron pesados y disueltos en cloruro de metileno (CH_2Cl_2) para obtener una concentración de 5000 ppm. De esta solución stock se hicieron diluciones con medio de cultivo (MEM o RPMI de acuerdo al ensayo a realizar) para tener las soluciones de trabajo en las concentraciones deseadas, estas soluciones se prepararon en la campana de flujo laminar bajo condiciones de asepsia. En el caso de los complejos de ligante F y H con sustituyentes fenilos, se prepararon suspensiones ya que son parcialmente solubles en solventes convencionales.

Las soluciones de trabajo se dispensaron en alícuotas, las cuales se guardaron en refrigeración hasta su uso, las soluciones stock se desecharon posterior a su uso ya que no son estables a temperatura ambiente.

2.3.3 Ensayos preliminares de citotoxicidad

Se realizaron pruebas preliminares de citotoxicidad para los ligantes en contraste con sus complejos. Para esto se utilizó la línea celular MOLT-4 (ATCC® CRL-1582). Se utilizaron placas de 96 pozos y se colocaron 5×10^4 células en un volumen de 100 μl por pozo. Se pusieron en contacto las células con los ligantes y sus respectivos complejos, en un rango de concentración de 0.5 ppm hasta 10 ppm en diluciones seriadas manteniendo fijo el volumen del pozo. Se incubaron por 48 horas, a las 24 y 48 horas de incubación en

condiciones óptimas para el desarrollo de las células, se realizó un recuento de células vivas íntegras al microscopio en cámara Neubauer, por exclusión del azul de tripano, la captación diferencial del colorante se debe a que las células íntegras no permiten el paso del colorante a través de su membrana, en contraste las células dañadas absorben el colorante. Estos ensayos se realizaron por duplicado.

Una vez determinada la actividad preliminar de los complejos se realizó un ensayo para determinar las concentraciones de prueba, para lo cual en placas de 24 pozos se colocaron 5×10^5 células A-431 (ATCC CRL-1555) en un volumen total de 500 μ l por pozo, se pusieron en contacto las células con los complejos trifenílicos con sustituyente flúor y protón. Se determinó la citotoxicidad por el ensayo del rojo neutro. Esta prueba es una medida de la toxicidad de un compuesto a corto o largo plazo, monitorea la integridad de membrana posterior al contacto de las células con el compuesto de prueba. El rojo neutro es captado por las células (específicamente por los lisosomas), posterior a lo cual se realiza un lavado y sólo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior.

Las concentraciones de prueba fueron diluciones seriadas de 0.78 ppm a 25 ppm, las cuales se ensayaron por duplicado. Se incubó por 24 horas en condiciones óptimas para el desarrollo de las células, se les retiró el medio a las células expuestas al tratamiento. Se lavaron con PBS 1X, se pusieron en

contacto con la solución de trabajo de rojo neutro. Después de un tiempo de incubación a temperatura ambiente se realizaron 3 lavados para eliminar el colorante no incorporado. El colorante incorporado se extrajo de las células con una solución de destinción y se evaluó por espectrofotometría a 560 nm (la técnica refiere 540 nm pero se adecuó al lector de placas, verificando el rango de absorción del rojo neutro en la literatura).

2.3.4 Ensayo para la determinación de la citotoxicidad

En este ensayo se empleó la línea celular A-431 (ATCC CRL-1555), y la línea celular MOLT-4 (ATCC® CRL-1582).

Para la determinación de citotoxicidad en las células A-431, se utilizó el ensayo del rojo neutro descrito en el apartado 2.3.3 referente a pruebas preliminares.

A partir de un cultivo confluyente de células A-431 se prepararon placas de 24 pozos por tripsinización. Se incubaron por 24 horas para asegurar la adherencia de las células al pocillo y se les cambió el medio por medio que contenía el compuesto de prueba a, 1, 2.5, 5 y 10 ppm. Se incubaron en condiciones óptimas para el desarrollo de las células. Las placas se prepararon por triplicado para realizar la determinación a las 24, 48 y 72 horas de incubación, se llevaron controles durante todo el procedimiento y cada concentración se ensayo por triplicado.

La determinación de citotoxicidad en las células MOLT-4 se llevó a cabo mediante una determinación fluorométrica empleando el kit CytoTox-ONE *Homogeneous Membrane Integrity Assay*. Este ensayo mide la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) que se libera a través de la membrana de las células dañadas. La LDH cataliza la oxidación del lactato a piruvato produciéndose NADH, el cual participa en la conversión de resazurina a resofurina en presencia de la diaforasa (figura 2.8). Este método a diferencia del rojo neutro permite la determinación de viabilidad en células en suspensión.

La resofurina producida es proporcional a la cantidad de LDH presente en el sobrenadante. Este compuesto se cuantifica mediante fluorimetría, ya que tiene una longitud de onda de excitación a 560 nm y una longitud de onda de emisión a 590 nm.

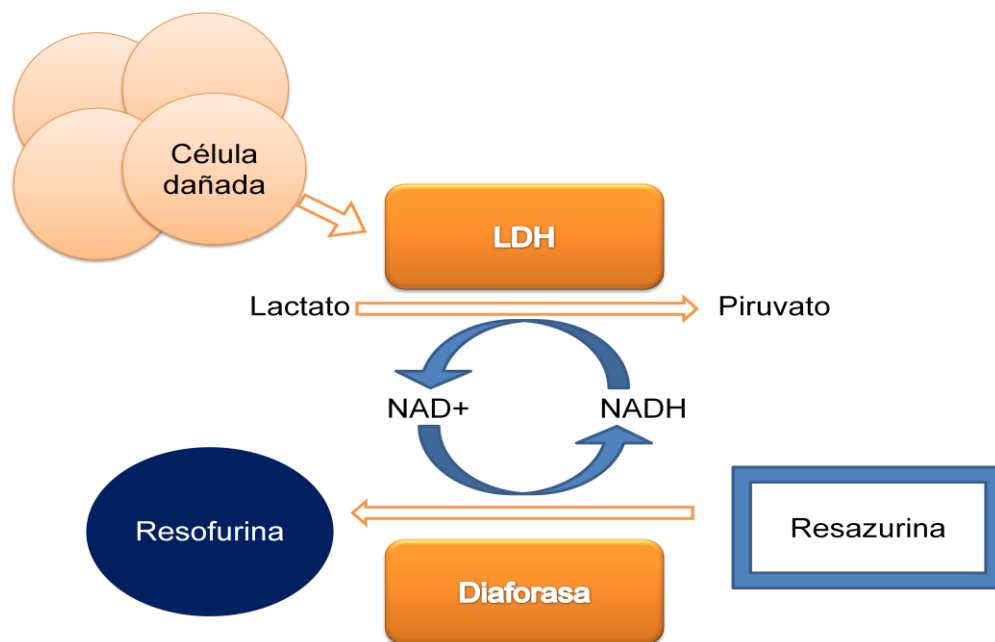


Figura 2.8. Esquema en el que se muestra el fundamento de la determinación de la lactato deshidrogenasa para evaluar la citotoxicidad.

Este ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos con 5×10^4 células MOLT-4 en un volumen total de 200 μl por pozo, a concentraciones de 1, 2.5, 5 y 10 ppm. Tomando muestras para la reacción de determinación de LDH a las 24, 48 y 72 horas.

2.4 Evaluación del efecto bystander

La medición del efecto *bystander* se basa en que un número contado de células son sometidas a un estímulo (el compuesto a probar) posteriormente se ponen en contacto con células no estimuladas y se observa el efecto global, en este caso muerte celular. Se cuantifica el número de células no tratadas que presentan el efecto, y el resultado se reporta como una relación entre ambas poblaciones celulares.

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto *bystander* por medio de 2 protocolos ya reportados en la literatura, el protocolo de co-cultivo y el de proporciones.

2.4.1 Protocolo de co-cultivo usando membranas

A partir de un cultivo confluyente de células A-431 se prepararon por tripsinización placas de 24 pozos con 500 μl de volumen final y canastillas de co-cultivo (membrana con poros de 1.0 micrómetro) con 5×10^4 células por pozo/canastilla según fue el caso, ver figura 2.9. Se incubaron por 24 horas

para asegurar la adherencia de las células. Posteriormente se les eliminó el medio a los pozos y a las canastillas, se lavaron las células con PBS 1x para retirar células muertas y restos celulares. En las canastillas se agregó medio con los compuestos de prueba a una concentración final de 50 ppm, colocando los 6 complejos por duplicado así como controles de crecimiento. Las canastillas se colocaron sobre los pocillos con medio fresco, se incubaron durante 5 horas en condiciones óptimas para el desarrollo de las células, después de lo cual se retiraron las canastillas con tratamiento de las placas de 24 pozos, la cual se dejó en incubación por 24 horas más. Las muestras se analizaron como se describió en la determinación de la citotoxicidad mediante la técnica de fluorescencia con el kit Cytotox ONE.

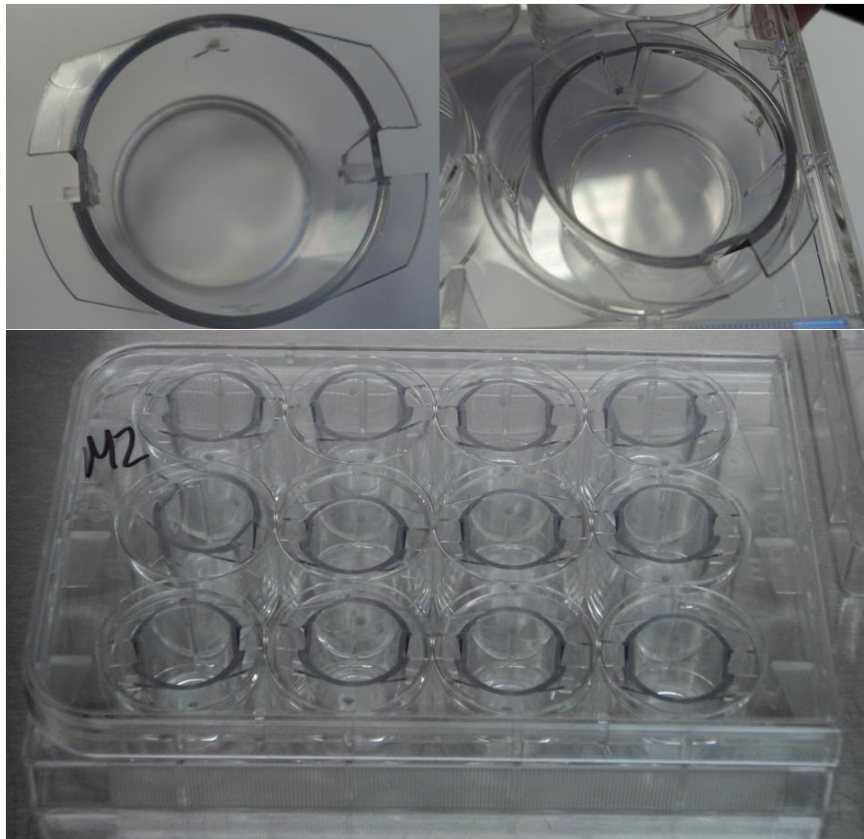


Figura 2.9. Montaje de las canastillas para el co-cultivo.

2.4.2 Evaluación de muerte celular en proporciones de células tratadas vs células no tratadas

Para preparar las mezclas de células tratadas y no tratadas en diferentes proporciones que se utilizaron en este ensayo se realizó lo siguiente. Se calculó la cantidad de células viables por pozo, lo que permitió saber la cantidad de células que era necesario adicionar para obtener proporciones de células tratadas vs no tratadas, de 1:0, 1:1, 1:5, 1:10 (fig. 2.10).

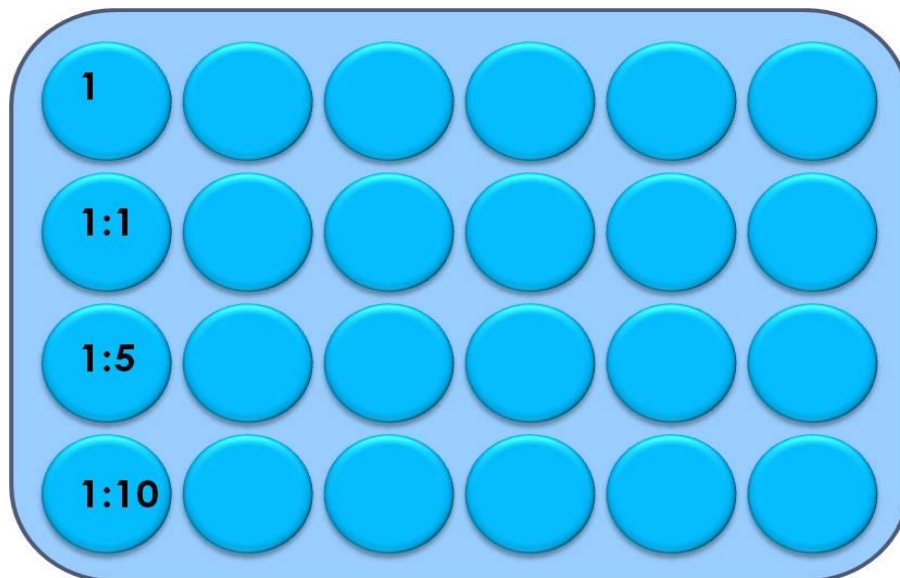


Figura 2.10. Esquema de una placa de 24 pozos donde se muestra la forma en que se dispusieron las muestras.

A partir de un cultivo confluyente de células A-431 se tripsinizó y se prepararon placas de 24 pozos. Se incubó por 24 horas en condiciones óptimas para el desarrollo de las células, después de este tiempo las células se expusieron a los compuestos de prueba a una concentración final de 25 ppm, colocando los 6 complejos por duplicado así como controles de crecimiento. Las placas se

incubaron por 5 horas, posterior a lo cual se les retiró el medio y se lavaron 2 veces con PBS 1X.

Se tripsinizó un pozo de los controles positivos de crecimiento para determinar la cantidad de células viables mediante el método de tinción con azul de tripano, descrito previamente en el apartado 2.3.3, que corresponde a pruebas preliminares. Una vez que se estableció la cantidad de células que permanecieron viables en el pozo utilizado como control, se procedió a determinar la cantidad de células sin tratar que debía adicionarse a los pozos de la placa tratada y obtener así las proporciones deseadas, se empleó un cultivo de células A-431. A partir de este cultivo (por tripsinización de las células) se preparó una suspensión en medio de cultivo (MEM/DMEM 1:1). Se realizó el conteo mediante el método descrito anteriormente.

A la placa tratada se le adicionó la cantidad de células necesarias para conseguir las proporciones mencionadas anteriormente. Se mantuvo por 48 horas en incubación y posteriormente se evaluó la muerte celular mediante el ensayo del rojo neutro, descrito en el apartado 2.

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis de los complejos organometálicos de estaño

3.1.1 Síntesis de ligantes

Se sintetizaron bases de Schiff para fungir como ligantes en la síntesis de los complejos de estaño, estos compuestos se sintetizaron con buen rendimiento, su apariencia se observa en la figura 3.2 y sus características generales se enlistan en la tabla 3.1.

Una vez sintetizados estos compuestos se realizó una cromatografía en capa fina con el propósito de determinar su pureza la cual es crucial para su aplicación en la subsecuente síntesis de los complejos que son el objetivo de este proyecto. Dos de las placas obtenidas se muestran en la fig. 3.1.

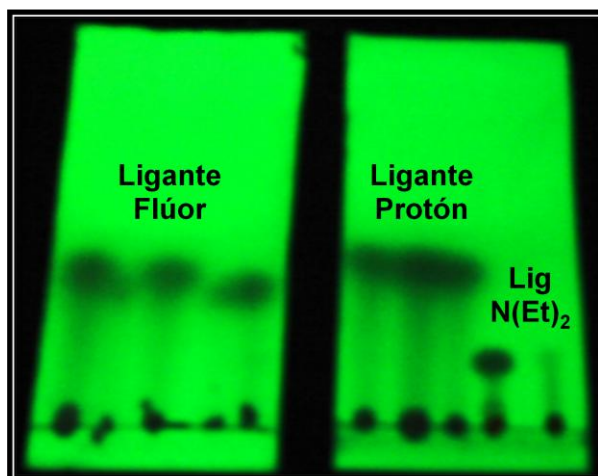


Figura 3.1. Placa de TLC mostrando los ligantes.

Tabla 3.1. Características de los ligantes sintetizados.

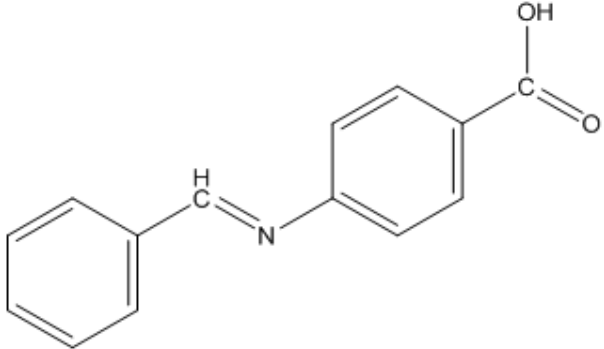
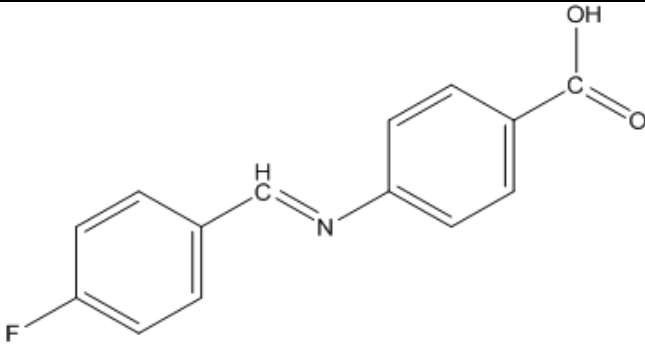
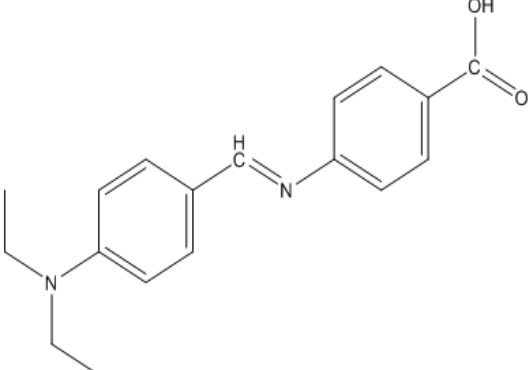
Ligante H	Acido (4-bencilidenamino) benzoico
Apariencia	Cristales blancos
Rendimiento	76.49%
Punto de fusión	194 °C
Estructura	
Ligante F	Acido 4-(4-fluorobencilidenamino) benzoico
Apariencia	Cristales blancos (con un ligero tinte verdoso)
Rendimiento	61.23%
Punto de fusión	176 °C
Estructura	
Ligante N(Et)₂	Acido 4-(4-dietilaminobencilidenamino) benzoico
Apariencia	Polvo color naranja intenso
Rendimiento	87.57%
Punto de fusión	238 °C
Estructura	



Figura 3.2. Fotografía de los 3 ligantes sintetizados.

3.1.2 Síntesis de complejos organometálicos de estaño

Los compuestos de estaño propuestos al inicio del proyecto se lograron sintetizar y purificar con un buen rendimiento, lo cual permitió la posterior evaluación de su potencial citotóxico. En la figura 3.3 es posible observar soluciones de los complejos sintetizados. Así mismo se mencionan sus parámetros generales en la tabla 3.2.

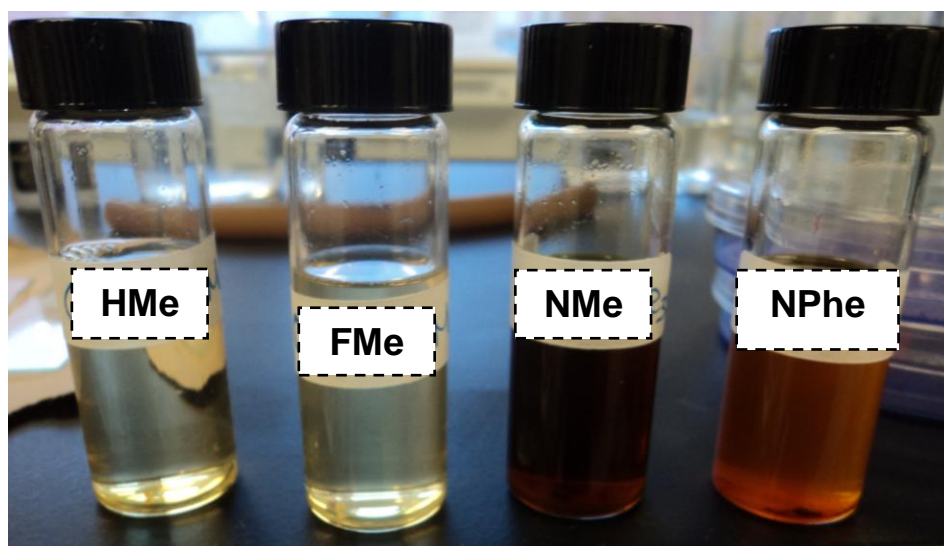


Figura 3.3. Fotografía de 4 de los complejos sintetizados disueltos.

Tabla 3.2. Características de los complejos de estaño.

(FENILOS)₃	
Complejo H	
Apariencia	Polvo quebradizo naranja
Rendimiento	55.5%
Punto de fusión	>400 °C
Estructura	
Complejo F	
Apariencia	Polvo naranja claro
Rendimiento	27.46%
Punto de fusión	>400 °C
Estructura	
(METILOS)₃	
Complejo H	
Apariencia	Polvo naranja claro
Rendimiento	34.56%
Punto de fusión	134 °C
Estructura	
Complejo F	
Apariencia	Polvo amarillo
Rendimiento	25.36%
Punto de fusión	155 °C
Estructura	

No se logró la formación de los complejos Nme y NPhe por el método derivado de Gielen descrito en la sección 2.1.2.1, por lo cual se procedió a modificar la síntesis en base a bibliografía más reciente.

Con el objetivo de facilitar el manejo óptimo de los datos y su posterior interpretación se usará una nomenclatura abreviada para referirse a los compuestos la cual se enlista en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Nomenclatura abreviada de los compuestos sintetizados

Clave	Compuesto
LigH	Ligante protón Acido (4-bencilidenamino) benzoico
LigF	Ligante flúor Acido 4-(4-fluorbencilidenamino) benzoico
LigN	Ligante dietilamino Acido 4-(4-dietilaminobencilidenamino) benzoico
HMe	Complejo de trimetilestaño con ligante protón
FMe	Complejo de trimetilestaño con ligante flúor
NMe	Complejo de trimetilestaño con ligante dietilamino
HPhe	Complejo de trifenilestaño con ligante protón
FPhe	Complejo de trifenilestaño con ligante flúor
NPhe	Complejo de trifenilestaño con ligante dietilamino

3.1.3 Síntesis alternativa de los complejos

La síntesis alternativa se basó en reportes de otros grupos de investigación en los cuales se tomaba en cuenta el carácter ácido de los ligantes carboxílicos para proponer las condiciones de la reacción de acomplejamiento, por lo cual se modificó la base débil (trietilamina) por una base fuerte (KOH), llevando a cabo la reacción en un solvente polar (metanol), debido a la diferencia de polaridad

del solvente con respecto al empleado en la reacción anterior , el subproducto permanece en la solución y el producto precipita. El sólido obtenido se sometió a las pruebas preliminares, en las cuales se comparó la apariencia física y el punto de fusión con respecto a los precursores, los datos obtenidos para estos sólidos se muestran en la tabla 3.4 (23).

Tabla 3.4 Características de los complejos N-Me y N-Phe.

COMPLEJO NPhe	
Apariencia	Sólido resinoso rojizo oscuro
Rendimiento	34.9%
Punto de fusión	160 °C
Estructura	
COMPLEJO NMe	
Apariencia	Sólido resinoso rojizo oscuro
Rendimiento	38.29%
Punto de fusión	150 °C
Estructura	

3.2 Caracterización de los complejos organometálicos de estaño

Con el objetivo de contrastar la caracterización de los ligantes con sus complejos se colocaron de manera consecutiva el ligante precursor con sus 2 variantes de producto, así mismo se utilizará la notación abreviada para referirse a los compuestos y facilitar el manejo de la información.

Los ligantes y complejos de estaño se caracterizaron por IR, RMN y/o espectrometría de masas. Los datos obtenidos por estas técnicas espectroscópicas se presentan y discuten a continuación. Así mismo en el apéndice C se presentan los espectros de las técnicas enunciadas anteriormente. Con el objetivo de ilustrar las señales se presentan las estructuras numeradas.

- **Ligante H**

RMN ^1H (270 MHz, DMSO-D6) δ : 7.32 (d, H5, Jorto = 8.4 Hz, 2H), 7.53* (dd, H2, Jorto= 8.4 Hz y Jorto=6.6 Hz, 2H), 7.55* (t, H1, Jorto=6.6 Hz, 1H), 7.95 (d, H3, Jorto=8.4 Hz, 2H), 8 (d, H6, Jorto=8.4Hz, 2H), 8.64 (s, H4, 1H), 12.87 (sa, H7,1H). Las señales marcadas con * se traslapan. RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-D6) δ : 121 (G), 128 (I), 128.9 (B), 129 (C), 130.6 (H), 131 (A), 135.7 (D), 155 (F), 162 (E), 167 (J). IR (cm $^{-1}$) ν : 1677.8 (s, C=O), 1592.37 (s, C=N), 1431.19 (s, C-H imino). EM (DIP 70eV): [M $^+$]: 225.05 (100%), [M $^+$]

– 45 (9%), [M+] – 77 (8%), [M+] – 104 (8%), [M+] – 147 (9%), [M+] – 148 (12%), [M+] – 149 (10%), [M+] – 160 (25%), [M+] – 174 (11%).

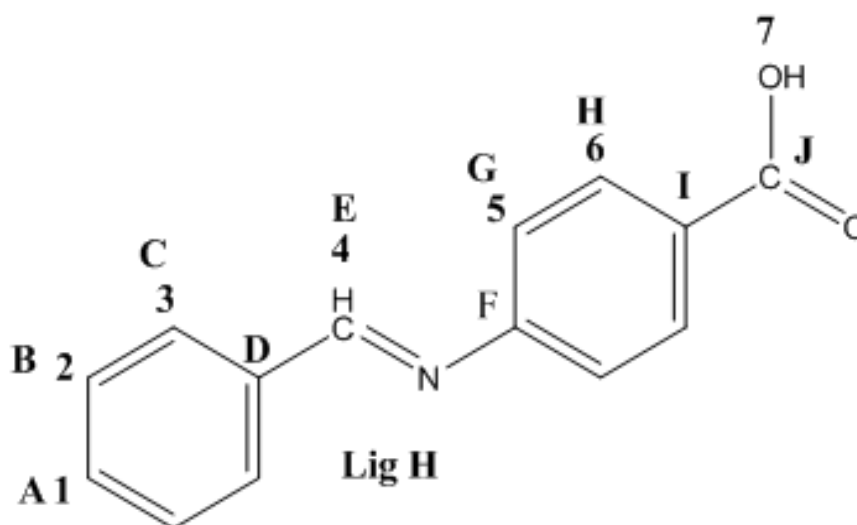


Figura 3.4. Estructura del ligante con sustituyente protón.

- **Complejo Hphe**

IR (cm⁻¹) ν : 1596.45 (s, C=O), 1512 (s, C=N), 1391.84 (s, C-H imino). EM (TOFMS): [M⁺]: 576 (7%), [M⁺] – 166 (24%), [M⁺] – 225 (100%), [M⁺] – 379 (78%), [M⁺] – 452 (13%), [M⁺] – 456 (98%). La pérdida de 225 es debido a la pérdida de –SnPhe₃. Un rasgo a considerar en el espectro de masas de este complejo es la huella isotópica del estaño, mostrando los 10 picos características en el ion molecular.

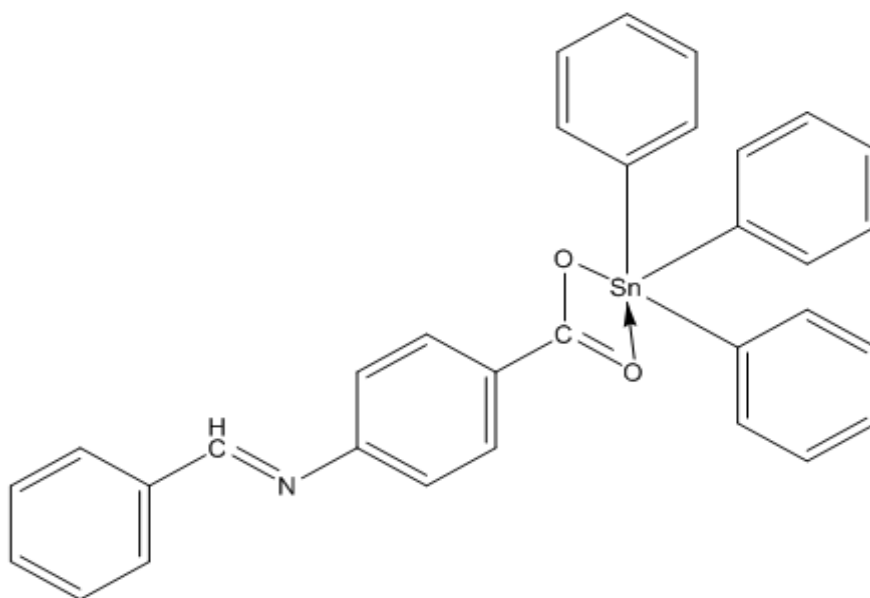


Figura 3.5. Estructura del complejo H Phe.

- **Complejo Hme**

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.545 (s, H7, presenta 2 dobletes con $J=48$ Hz que corresponden al acoplamiento con Sn, 9H), 6.55(d, H5, Jorto=6.4 Hz, 2H), 8.03 (d, H6, Jorto=6.4 Hz, 2H), 7.822 (m, H1, H2 Y H3, *, 5H), 8.673 (s, H4, 1H). Las señales marcada con * se traslapa y no se pudo determinar su constante de acoplamiento. RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : -2.278 (Sn- CH_3), 113.65 (G), 120.45 (I), 128.77 (B), 128.94 (C), 129.68 (A), 134.4 (D), 132.25 (H) 150.7 (F), 161.4 (CH=N), 192.64 (C=O). IR (cm^{-1}) u: 1594.97 (s, C=O), 1552.42 (s, C=N), 1355.29 (s, C-H imino).

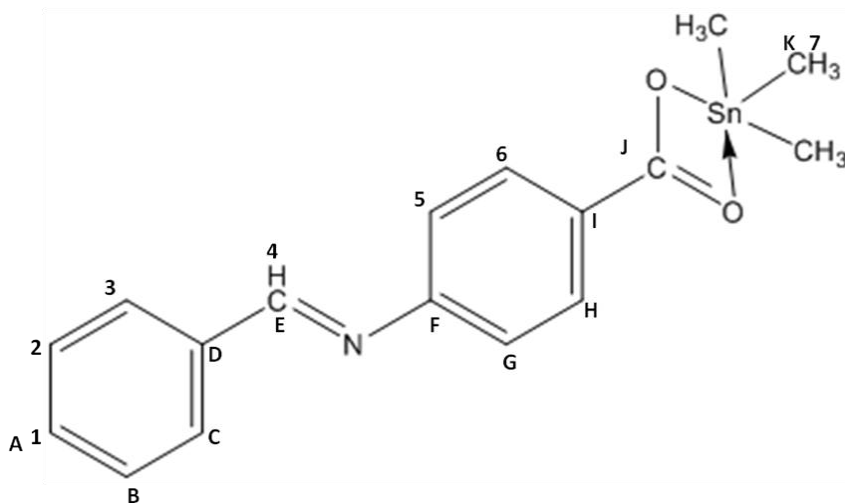


Figura 3.6. Estructura del complejo H Me

- **Ligante F**

EM (DIP 70eV): [M⁺]: 243 (100%), [M⁺] – 17 (3%), [M⁺] – 45 (3%), [M⁺] – 122 (6%), [M⁺] – 166 (1%), [M⁺] – 178 (9%).). IR (cm⁻¹) u: 1678.57 (s, C=O), 1584.33 (s, C=N), 1421.21 (s, C-H imino).

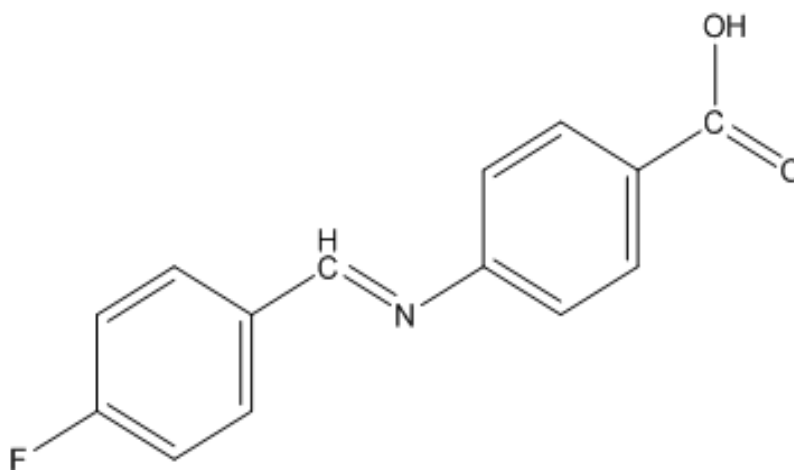


Figura 3.7. Estructura del ligante con sustituyente flúor.

- **Complejo Fphe**

IR (cm⁻¹) ν : 1600.93 (s, C=O), 1586.27 (s, C=N), 1512.76 (s, C-H imino). EM (TOFMS) : [M⁺]: 594 (1%), [M⁺] – 184 (30%), [M⁺] – 293 (100%), [M⁺] – 397 (57%), [M⁺] – 474 (65%), Un rasgo a considerar en el espectro de masas de este complejo es la huella isotópica del estaño, mostrando los 10 picos características en el ion molecular.

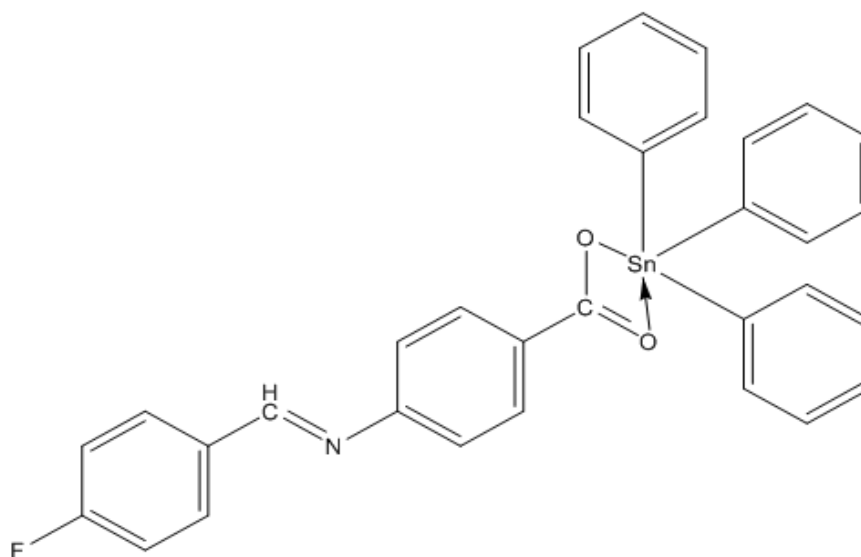


Figura 3.8. Estructura del complejo F Phe.

- **Complejo Fme**

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.556 (s, Sn(CH₃)₃), presenta un doblete con J=48 Hz que corresponde al acoplamiento con Sn, 9H), 7.8 (m, H1, H4, H2, H5, 8H), 9.889 (sa, H3, 1H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : -1.984 (Sn(CH₃)₃), 113.92 (B), 116.32 (G), 131.16 (I), 131.24 (C), 131.554 (H), 132.45 (D), 159.97 (F), 163 (E), 166 (A), 171.8 (C=O). IR (cm⁻¹) ν : 1588.33 (s, C=O), 1548.6 (s, C=N), 1358.67 (s, C-H imino). En el RMN de protón se

observa un multiplete en la zona de aromáticos por lo cual no se puede interpretar adecuadamente la multiplicidad de las señales ni sus acoplamientos exactos, esto se debe a la presencia del grupo fluor en el anillo y del grupo carbonilo unido a estaño.

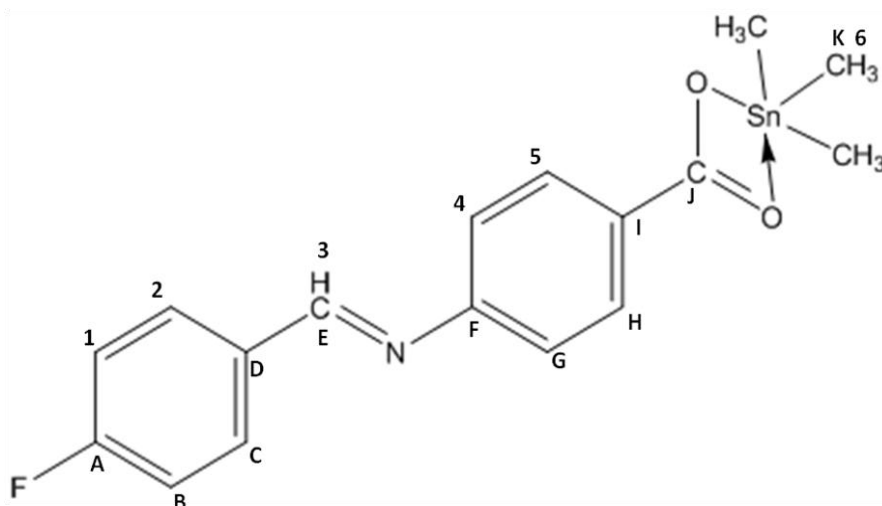


Figura 3.9. Estructura del complejo F Me.

- **Ligante N**

RMN ^1H (270 MHz, DMSO-D6) δ : 1.12 (t, CH₃, J= 6.8 Hz, 6H), 3.41 (c, CH₂, J= 6.9 Hz, 4H), 6.75 (d, J=8.9 Hz, 2H), 7.73 (d, ciclo 1, J= 8.7, 2H), 7.23 (d, J=8.4,2H), 7.94 (d, ciclo 2, J=8.4 Hz, 2H), 8.39 (s,CH=N, 1H), 12.7 (sa, -OH, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-D6) δ : 12.4 (A), 40.1 (B), 110.89 (D), 120.9 (E), 122.7 (F), 126.8 (C), 130.55 (I), 131.04 (J), 150.17 (H), 156.44 (K), 161.19 (G), 167.15 (L). IR (cm⁻¹) u: 1676.86 (s, C=O), 1579.6 (s, C=N), 1524.03 (s, C-H imino). EM (DIP 70Ev): [M⁺]: 296.2 (53%), [M⁺ – 14 (21%), [M⁺ – 15 (100%), [M⁺ – 45 (12%), [M⁺ – 61 (16%).

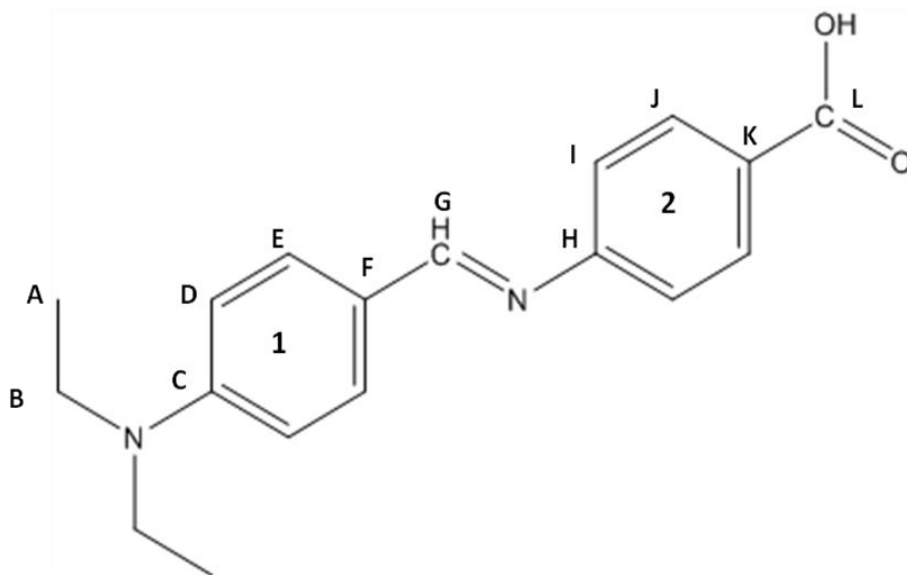


Figura 3.10. Estructura del ligante con sustituyente dietilamino.

- **Complejo Nphe**

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.140 (t, H1, $J_{\text{vecinal}} = 7.2$ Hz, 6H), 3.36 (c, H2, $J = 7.2$ Hz, 4H), 6.62, 7.67 (2d, H3 y H4, $J = 8.8$ Hz para cada uno, 4H), 7.1, 8.07 (2d, H6 y H7, $J = 8.8$ Hz para cada uno, 4H), 7.40 (d, H8, $J = 4$ Hz, 6H), 8.07 (d, H9, $J = 4.4$ Hz, 9H), 8.196 (sa, H5, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 12.7 (A), 44.7 (B), 110.72 (D), 113.87 (I), 120.9 (F), 124.71 (E), 128.54 (K), 128.84 (J), 129.07 (M), 130.26 (N), 131.31 (L), 132.11 (C), 132.54 (H), 152.42 (C=N), 190.27 (C=O). IR (cm^{-1}) ν : 1600.87 (s, C=O), 1575.45 (s, C=N), 1315.84 (s, C-H imino). En el RMN de protón se observan las señales propias de los fenilos enlazados directamente al estaño, es posible diferenciarlas de las señales propias de los anillos de la estructura central por sus constantes de acoplamiento y su integración.

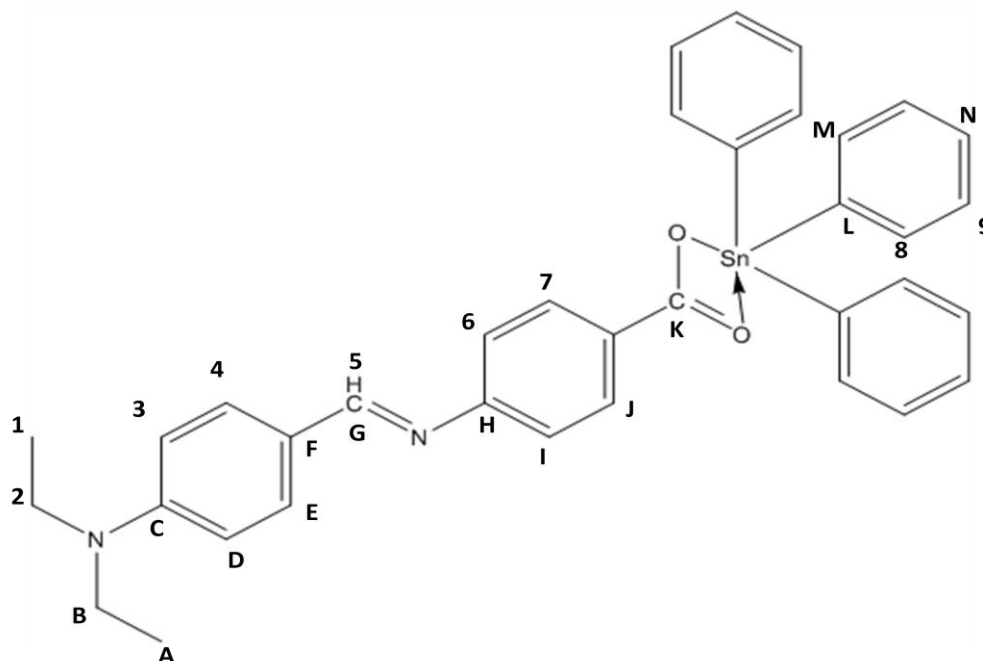


Figura 3.11. Estructura del complejo N Phe.

- **Complejo Nme**

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.630 (s, $\text{Sn}(\text{CH}_3)_3$), presenta un doblete con $J=28.4$ Hz que corresponde al acoplamiento con Sn, 9H), 1.21 (t, H1, $J_{\text{vecinal}}=7.2$ Hz, 6H), 3.4 (c, H2, $J=7.2$ Hz, 4H), 6.64, 7.74 (2d, H3 y H4, $J=8.8$ Hz para cada uno, 4H), 6.69, 8.06 (2d, H6 y H7, $J=8.8$ Hz para cada uno, 4H), 8.280 (sa, H5, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 12.5 (A), 44.6 (B), 110.52 (D), 110.97 (I), 113.72 (F), 120.64 (E), 131.05 (K), 131.36 (J), 132.2 (C), 150.38 (H), 161 (C=N), 190 (C=O). IR (cm^{-1}) ν : 1676.46 (s, C=O), 1579.68 (s, C=N), 1374.38 (s, C-H imino).

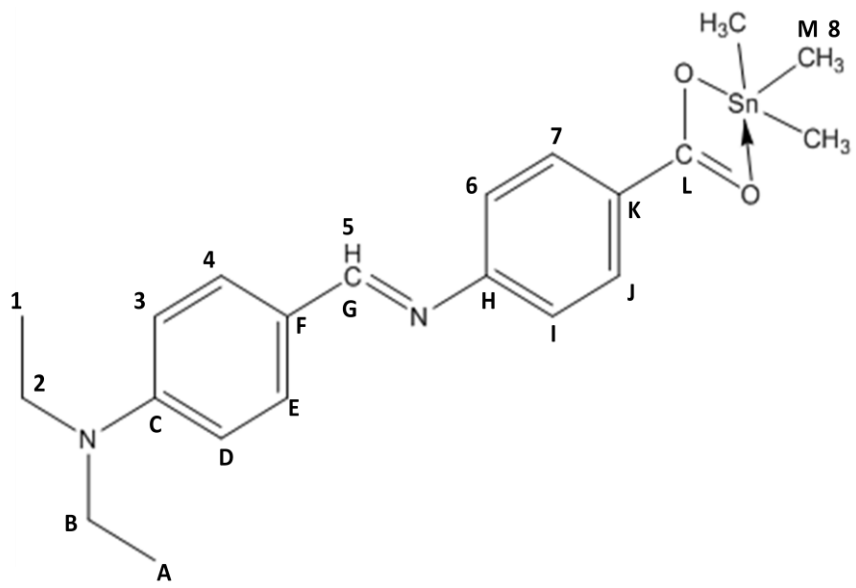


Figura 3.12. Estructura del complejo N Me.

Es importante señalar las bandas de absorción para los grupos funcionales en el IR para los complejos muestran desplazamiento hacia números de onda menores a su precursor (ligante), esto sugiere la presencia del enlace coordinado $O \rightarrow Sn$.

3.3 Ensayos preliminares de citotoxicidad

En los resultados de los ensayos preliminares de citotoxicidad realizados en células MOLT-4 de acuerdo a lo mencionado en la sección 2.3.3, se puede observar que los ligantes si presentan actividad pero es menor a la de sus respectivos complejos, por ejemplo se muestran los valores obtenidos para la concentración de prueba de 10 ppm en la tabla 3.5, los valores tanto para complejos como para ligantes fueron más altos de lo esperado esto se atribuye

a que en este ensayo no se corrigió con respecto al solvente de acarreo ya que solo quería establecerse la actividad diferencial de los complejos. Por esta misma razón no se tomaron en cuenta los valores del conteo a las 48 horas puesto que los niveles de citotoxicidad son tan altos que impedían comparar adecuadamente los ligantes con sus respectivos complejos.

Tabla 3.5. Valores de citotoxicidad obtenidos en las pruebas preliminares con células MOLT-4.

	Lig H	Lig F	Lig N	H Phe	F Phe
10 ppm	87.82%	89.74%	77.56%	96.15%	91.03%

La comparativa se realizó con los complejos que presentan baja solubilidad ya que se esperaba que fueran los menos activos de su serie. Los datos de citotoxicidad para los complejos puede observarse en forma gráfica en la figura 3.13, los cuales están reportados como porcentaje de citotoxicidad.

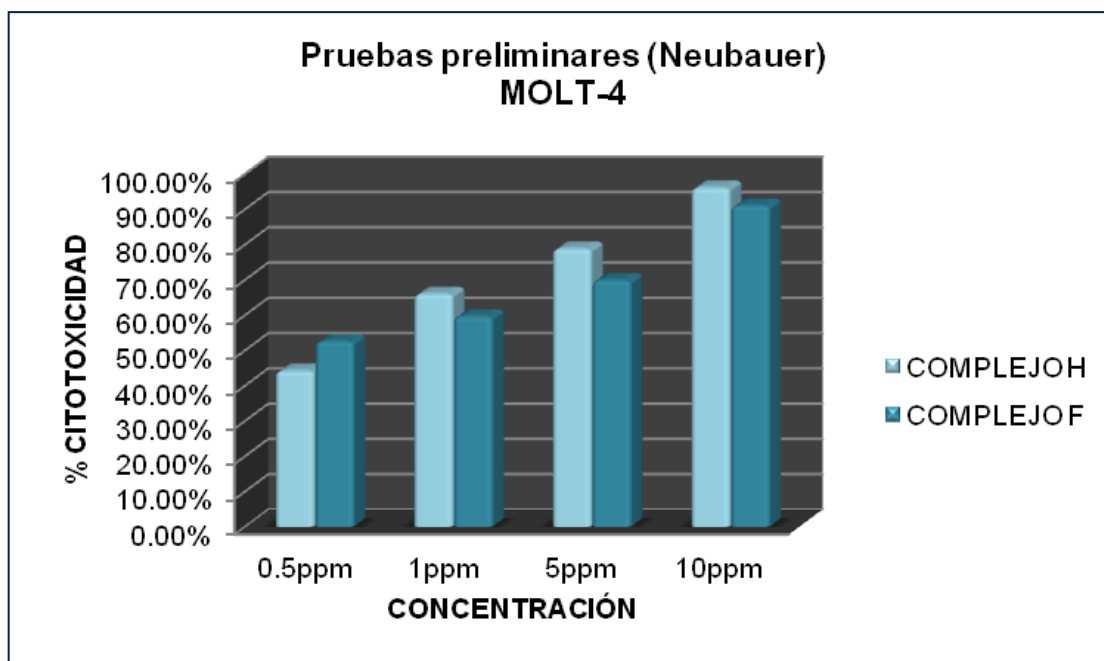


Figura 3.13. Gráfica de los valores de citotoxicidad celular para las pruebas preliminares.

Como parte de las pruebas preliminares se realizó un ensayo con el objetivo de determinar las concentraciones de prueba, para lo cual se emplearon diluciones seriadas en un rango de 0.78 ppm hasta 25 ppm, se evaluó la viabilidad celular en células A-431 por el método del rojo neutro como se menciona en el apartado 2.3.3, esta técnica se basa en una tinción diferencial de las células viables ya que solo éstas son capaces de captar el colorante rojo neutro.

En este ensayo se esperaba observar una actividad mayor al 50% de muerte en la concentración mayor, que fue de 25 ppm, lo cual se logró para los 2 complejos. En la figura 3.14 se pueden apreciar los resultados de este ensayo reportados como porcentaje de viabilidad celular.

Los datos obtenidos son relevantes considerando el artículo de Ekwall y colaboradores publicado en 1990 (19) en el cual se menciona que los compuestos sometidos a evaluación deben presentar valores cercanos a la DL_{50} en concentraciones menores o iguales a 50 ppm para que se consideren candidatos para una evaluación más profunda, en este caso este criterio se cumple para ambos complejos.

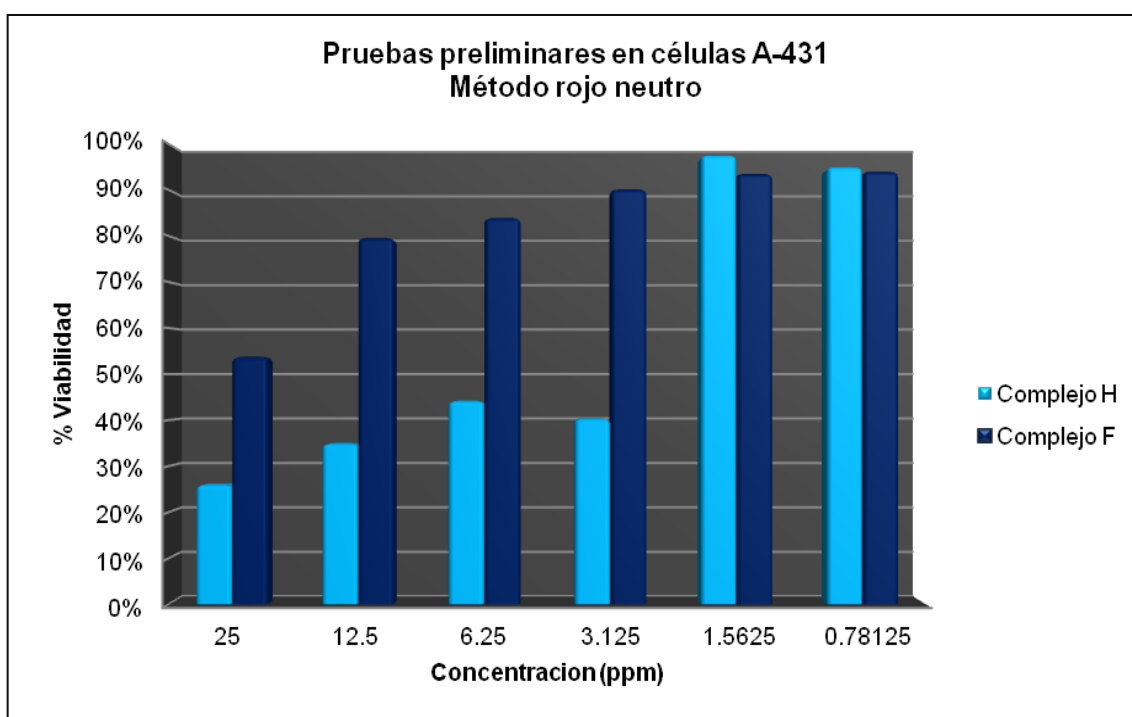


Figura 3.14. Gráfica de los valores de viabilidad celular para los complejos probados.

3.4 Determinación de la citotoxicidad

En las dos líneas celulares se observó un comportamiento dependiente de la dosis. El tratamiento de los datos fue posible considerando controles de crecimiento y controles para evaluar el efecto de los solventes. Se decidió usar

concentraciones bajas a las cuales se observara actividad, basándose en los resultados de las pruebas preliminares para los complejos Hphe y Fphe, esto con el propósito de observar la variabilidad del efecto de los diferentes complejos con respecto a la dosis con periodos de incubación de 24, 48 y 72 horas.

El método del rojo neutro se empleó para la determinación de la viabilidad en la línea celular A-431, de acuerdo a lo descrito en la sección 2.3.4 de la metodología, los datos obtenidos por esta técnica son porcentajes de viabilidad por lo cual se calculó su inverso para graficar los valores de porcentaje de citotoxicidad. Los resultados de citotoxicidad a las 24, 48 y 72 horas, se presentan en las figuras 3.15, 3.16 y 3.17 respectivamente.

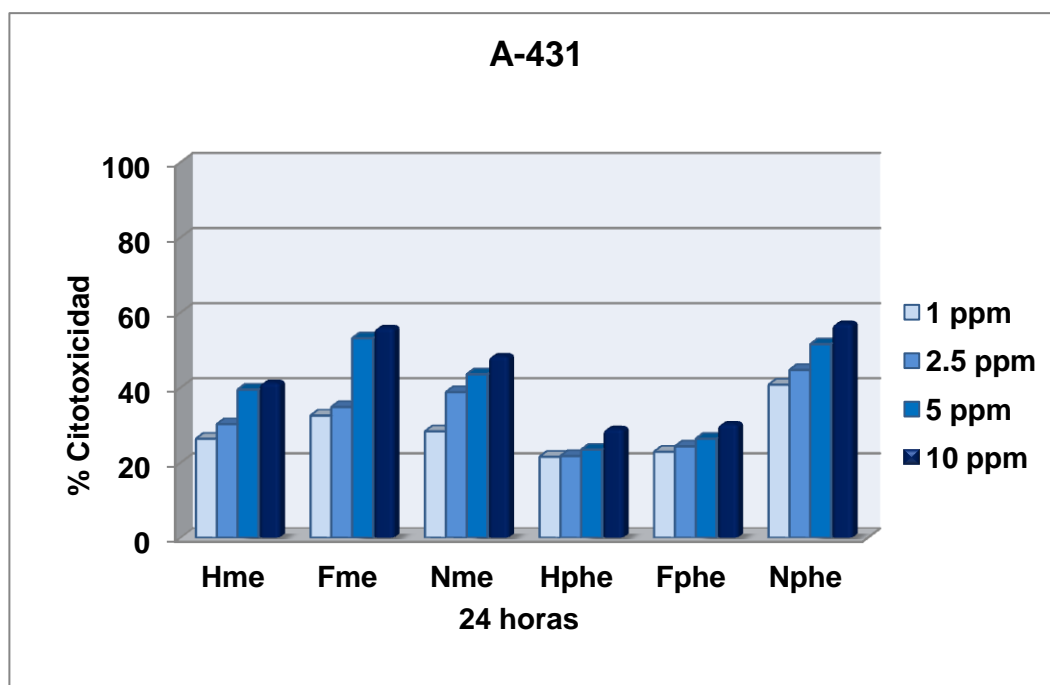


Figura 3.15. Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células A-431 a las 24 h de incubación.

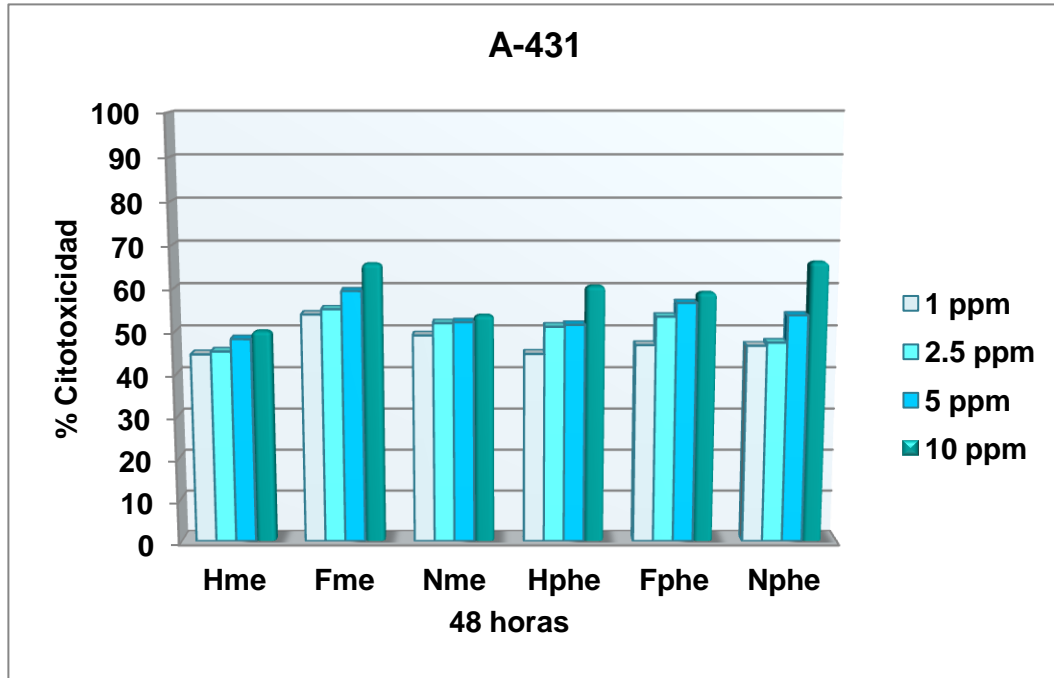


Figura 3.16. Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células A-431 a las 48 h de incubación.

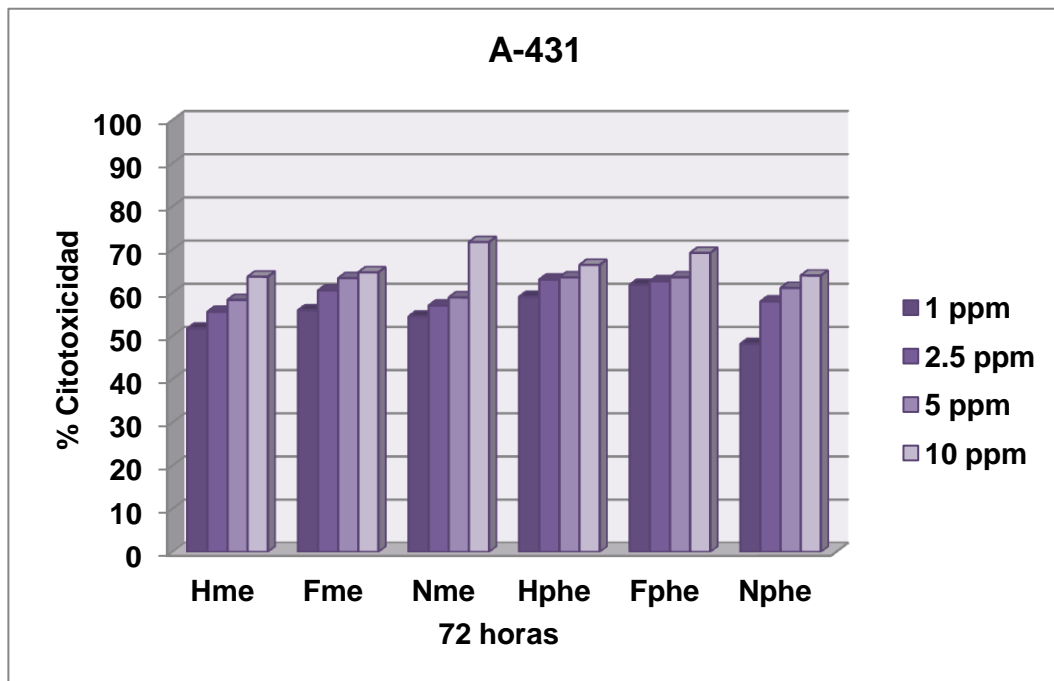


Figura 3.17. Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células A-431 a las 72 h de incubación.

La determinación de citotoxicidad de los complejos en la línea celular MOLT-4 se llevó a cabo por el método fluorométrico (con el kit *CytoTox-ONE*), de acuerdo a lo referido en la sección 2.3.4. Los resultados de citotoxicidad a las 24, 48 y 72 horas, se presentan en las figuras 3.18, 3.19 y 3.20 respectivamente.

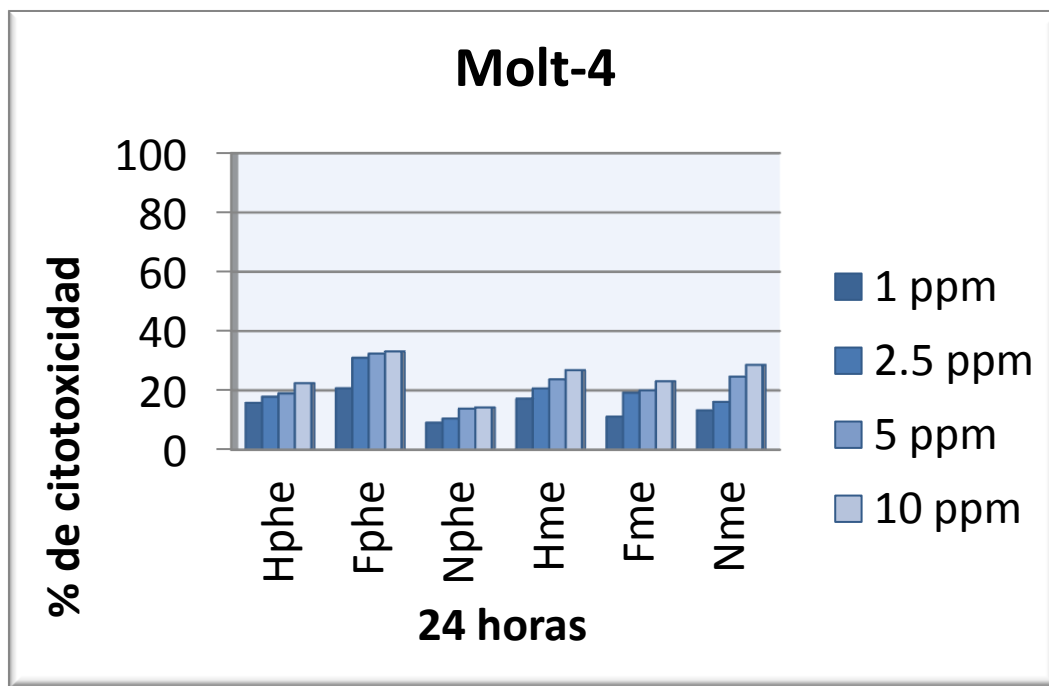


Figura 3.18. Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células MOLT-4 a las 24 h de incubación.

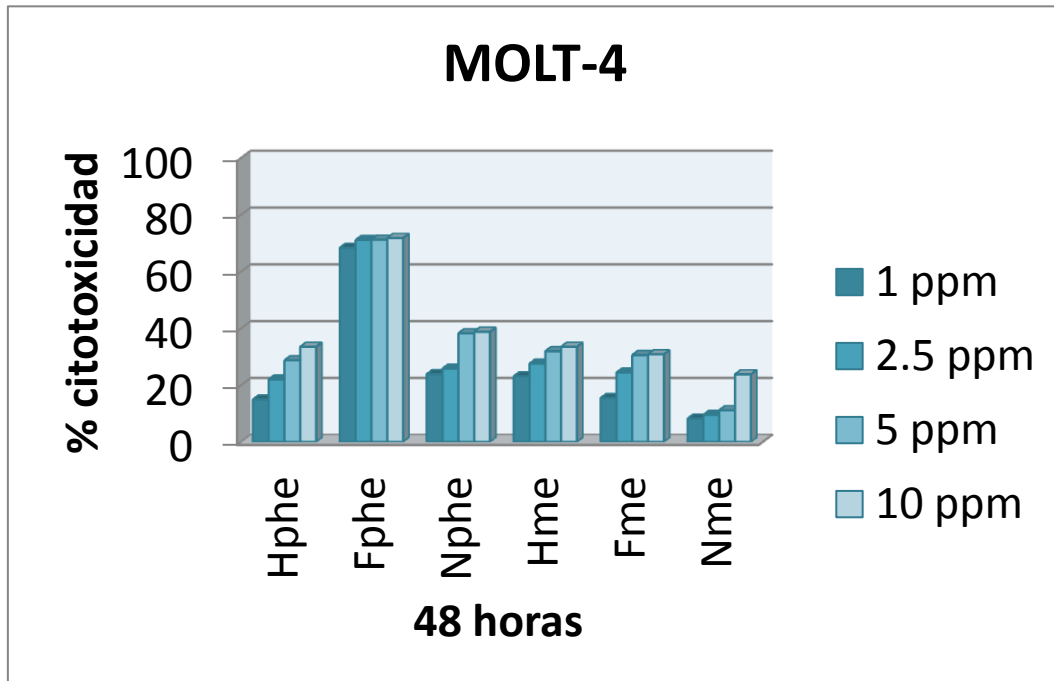


Figura 3.19. Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células MOLT-4 a las 48 h de incubación.

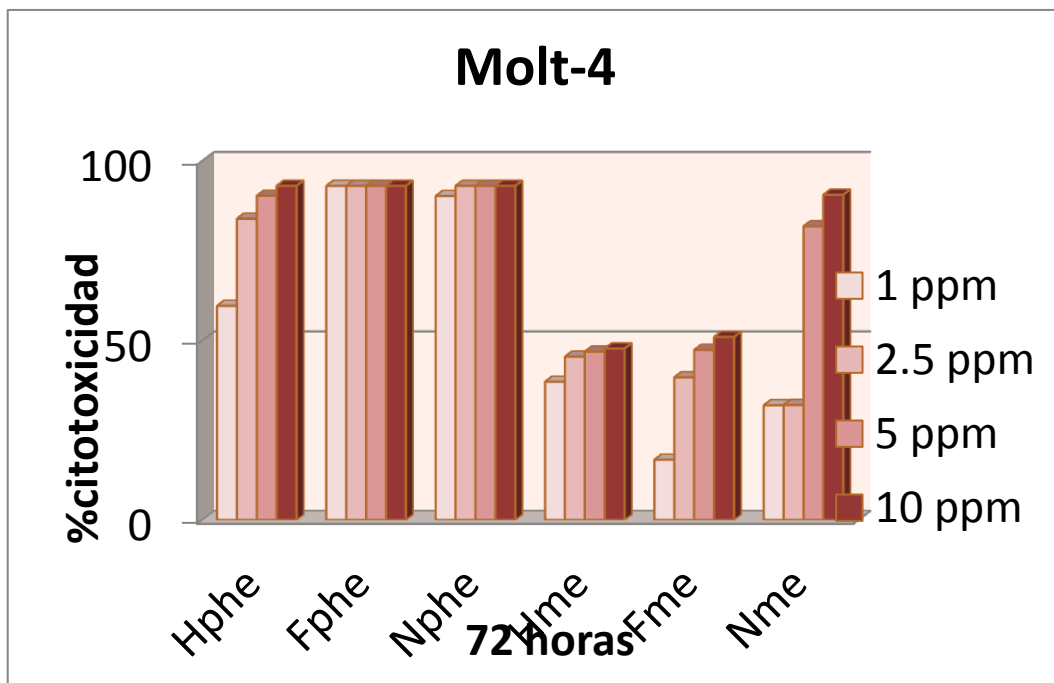


Figura 3.20. Gráfica de los valores de citotoxicidad de los complejos en células MOLT-4 a las 48 h de incubación.

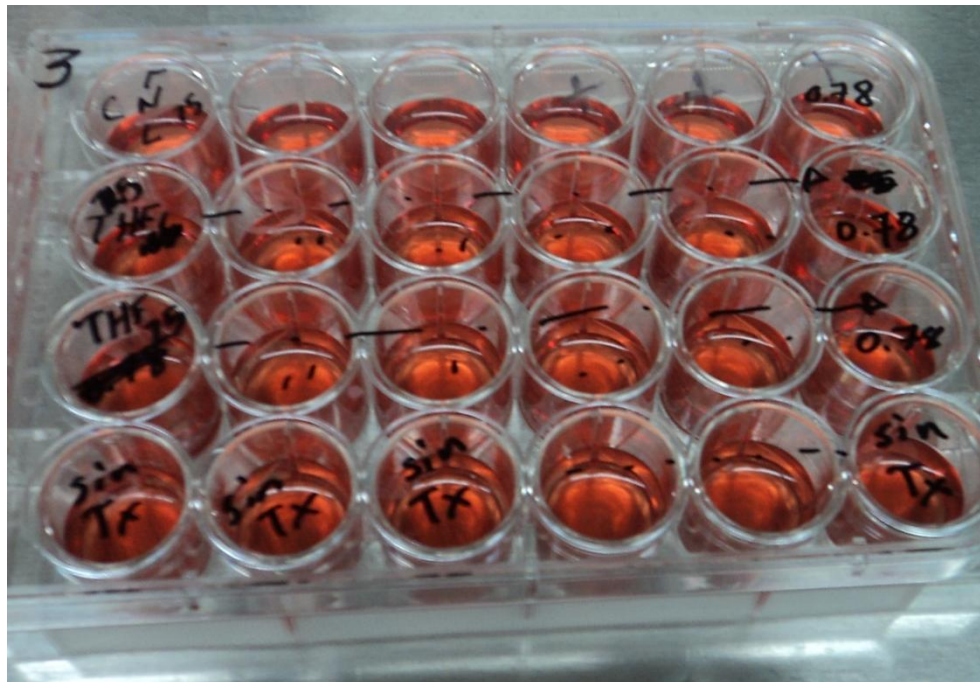


Figura 3.21. Placas para la determinación de citotoxicidad por el método del rojo neutro.

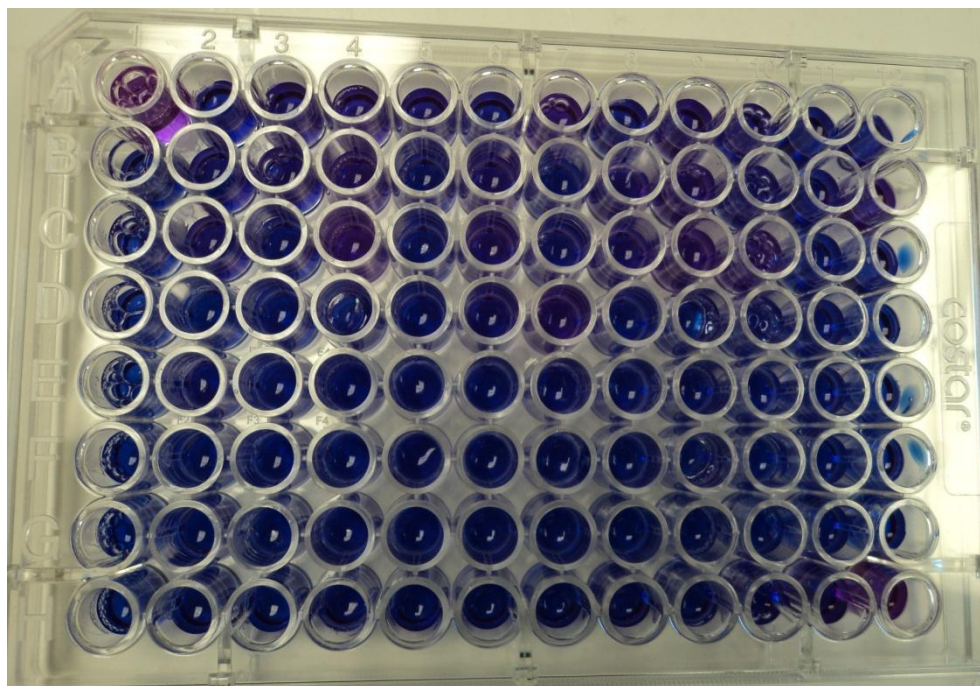


Figura 3.22. Placas para la determinación de citotoxicidad por el método fluorométrico.

3.5 Evaluación del efecto *bystander*

En la bibliografía consultada durante la realización del presente proyecto no se encontró ninguna referencia de ensayos encaminados a la evaluación del efecto *bystander in vitro* en compuestos organometálicos de estaño.

3.5.1 Protocolo de co-cultivo

El protocolo de co-cultivo tiene como objetivo determinar la citotoxicidad resultado del efecto *bystander* mediado por factores solubles, dado que las células que se someten a la determinación no son tratadas directamente sino que se ponen en contacto con la población celular tratada teniendo como barrera una membrana porosa como se señala en el apartado 2.4.1, con lo cual se permite que las células no tratadas capten las moléculas señalizadoras liberadas al medio por las células tratadas. Este sistema se puede visualizar en forma gráfica en la figura 3.23, así mismo se puede observar una fotografía en la figura 3.24.

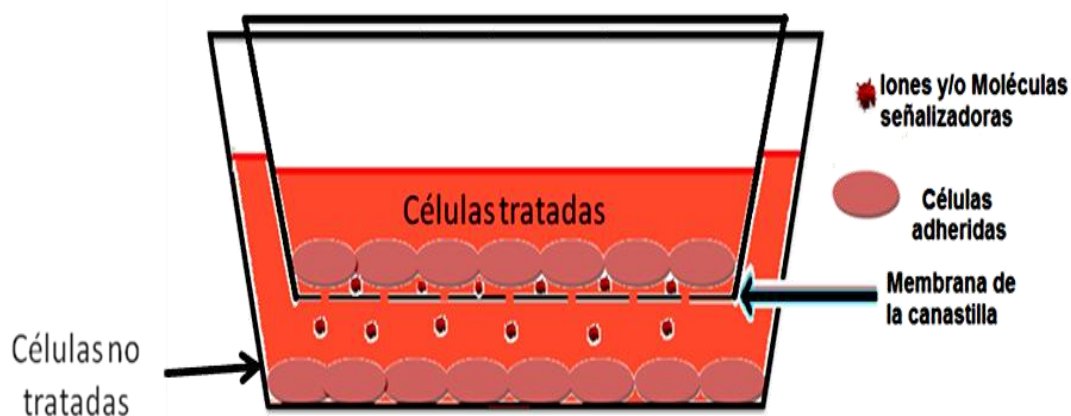


Figura 3.23. Explicación gráfica del montaje de las canastillas en las placas de co-cultivo.

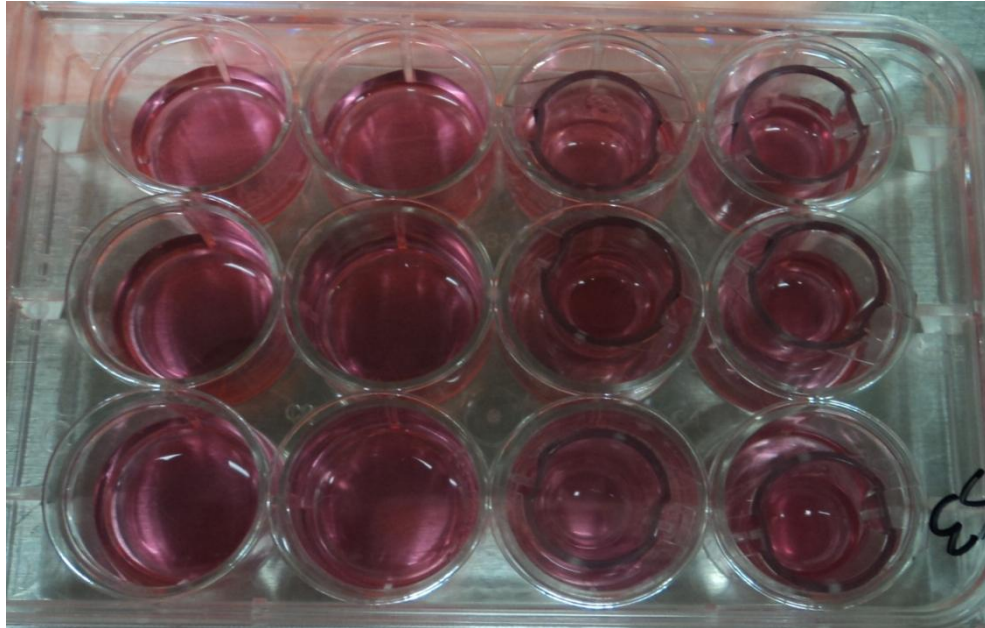


Figura 3.24. Fotografía del montaje de las canastillas en la placa.

Los datos de citotoxicidad obtenidos en este ensayo se reportan como porcentaje de citotoxicidad en la figura 3.25. En esta gráfica se puede observar que la muerte celular ocurre en las células que no han sido tratadas con respecto al control que se llevó en las mismas condiciones de co-cultivo.

El tratamiento inicial fue a 50 ppm en la canastilla, los resultados mostrados son del pocillo inferior. De estos resultados se puede concluir que los complejos sintetizados en el presente proyecto son capaces de generar un efecto *bystander* mediado por factores solubles.

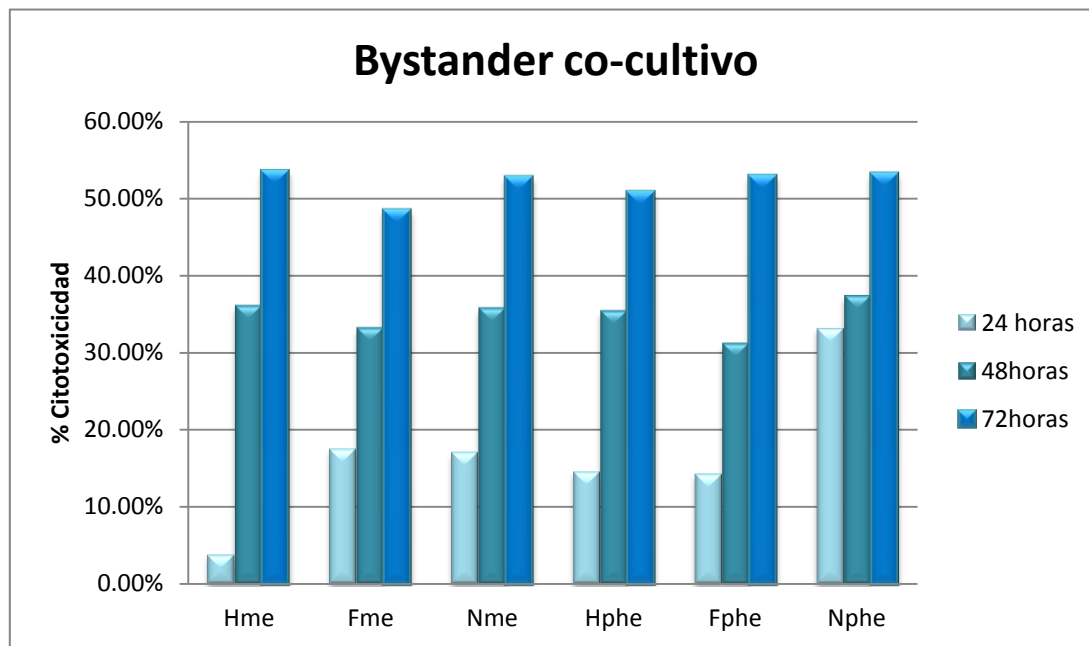


Figura 3.25. Gráfica de los porcentajes de citotoxicidad obtenidos en el ensayo de co-cultivo.

3.5.2 Células tratadas vs células no tratadas

En este ensayo el objetivo es medir la amplificación de la muerte celular por contacto célula-célula, en este caso se espera un aumento en los valores de citotoxicidad con respecto al control que tiene la misma proporción celular, lo cual nos indica la presencia del efecto *bystander* producido por los complejos organometálicos de estaño (IV) sintetizados. Es importante mencionar que en ninguna proporción se observaron porcentajes de citotoxicidad cercanos al control. El tratamiento a la población inicial fue de 25 ppm con un tiempo de contacto de 5 horas, los resultados se compararon contra el pocillo de 1: 0 de células tratadas vs no tratadas.

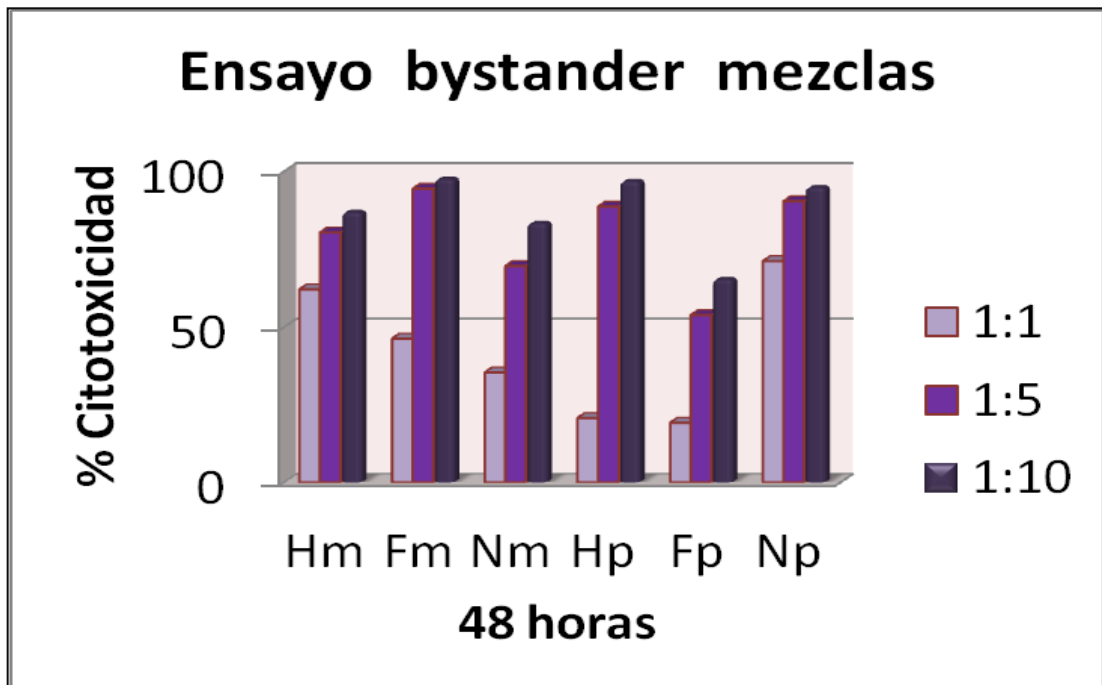


Figura 3.26. Gráfica de los porcentajes de citotoxicidad obtenidos en el ensayo de proporciones.

Capítulo 4

CONCLUSIONES

- ☞ Se logró la síntesis de los ligantes propuestos con buen rendimiento.
- ☞ Los métodos de síntesis empleados en el proyecto permitieron la formación de los complejos organometálicos de estaño con buen rendimiento para su posterior evaluación.
- ☞ Se probó que los complejos sintetizados presentan actividad citotóxica frente a las líneas celulares A-431 y MOLT-4, así mismo se observó que este efecto es dependiente de la dosis hasta las 48 h de incubación.
- ☞ Se demostró la generación del efecto *bystander* mediado por factores solubles (a distancia) y por contacto célula-célula como resultado del tratamiento con los complejos sintetizados a 50 y 25 ppm respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdellah, M. A., Hadjikakou, S. K., Hadjiliadis, N., Kubicki, M., Bakas, T., Kourkomelis, N., et al. Synthesis, Characterization, and Biological Studies of Organotin (IV) Derivatives with o- or p-hydroxibenzoic Acids. *Bioinorganic Chemistry and Applications* , 1-12. (2009).
2. Ahmad, M. S., Hussain, M., Hanif, M., Ali, S., Qayyum, M., & Mirza, B. Di- and Triorganotin (IV) Esters of 3,4-Methylenedioxyphenylpropenoic Acid: Synthesis, Spectroscopic Characterization and Biological Screening for Antimicrobial, Cytotoxic and Antitumor Activities. *Chemical Biology & Drug Design* , 71, 568-576. (2008).
3. Alama, A., Tasso, B., Novelli, F., & Sparatore, F. Novel Organotins as Antitumour Agents. *Drug Discovery* , 50-53. (2009).
4. Alkorta, I., Rozas, I., & Elguero, J. Non-conventional hydrogen bond. *Chemical Society Reviews* , 27, 163-170. (1998).
5. Al-Muaikel, N. S., Al-Diab, S. S., Al-Salamah, A. A., & Zaid, A. M. Synthesis and Characterization of Novel Organotin Monomers and Copolymers and Their Antibacterial Activity. *Journal of Applied Polymer Science* , 77, 740-745. (2000).
6. Appei, K. Organotin Compounds: Toxicokinetics Aspects. *Drug Metabolism Reviews* , 36, 763-786. (2004).
7. Ashfaq, M., Khan, M. I., Kaleem Baloch, M., & Malik, A. Biologically potent organotin (IV) complexes of 2-maleimidoacetic acid. *Journal of Organometallic Chemistry* , 689, 238-245. (2004).
8. Bartolomeo, S. D., Sano, F. D., Piacentini, M., & Spinedi, A. Apoptosis Induced by Doxorubicin in Neurotumor Cells Is Divorced from Drug Effects on Ceramide Accumulation and May Involve Cell Cycle-Dependent Caspase Activation. *Journal of Neurochemistry* , 75, 532-539. (2000).
9. Benson, C., Kaye, S., Workman, P., Garret, M., Walton, M., & de Bono, J. Clinical anticancer drug development: targeting the cyclin-dependent kinases. *British Journal of Cancer* , 92, 7-12. (2005).
10. Blagosklonny, M. V. Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells. *Oncogene* , 23, 2967-2975.
11. Brooks, A. L. (2004). Evidence for "bystander effect" in vivo. *Human & Experimental Toxicology* , 23, 67-70. (2004).
12. Camacho-Camacho, C., Rojas-Oviedo, I., Paz-Sandoval, M., Cardenas, J., Toscano, A., Gielen, M., et al. Synthesis, structural characterization and cytotoxic activity of organotin derivatives of indomethacin. *Applied Organometallic Chemistry* , 22, 171-176. (2008).
13. Caruso, F., Bol-Schoenmakers, M., & Penninks, A. H. Crystal and Molecular Structure and in Vitro Antiproliferative and Antitumor Activity of

- Two Organotin (IV) Carbohydrate Compounds. *Journal of Medical Chemistry* , 36, 1168-1174. (1993).
14. Carystinos, G. D., Katabi, M. M., Laird, D. W., Galipeau, J., Chan, H., Alaoui-Jamali, M. A., et al. Cyclic-AMP Induction of Gap Junctional Intercellular Communication Increases Bystander Effect in Suicide Gene Therapy. *Clinical Cancer Research* , 5, 61-68. (1999).
 15. Clarke, M. J., Zhu, F., & Frasca, D. R. Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals. *Chemical Reviews* , 99, 2511-2533. (1999).
 16. de Vos, D., Willem, R., Gielen, M., van Wingerden, K. E., & Nooter, K. The development of novel organotin anti-tumor drugs: structure and activity. *Metal-Based Drugs* , 5, 179-188. (1998).
 17. Di, L., Kerns, E. H., & Carter, G. T. Drug-Like Property Concepts in Pharmaceutical Design. *Current Pharmaceutical Design* , 15, 2184-2184. (2009).
 18. Dostal, L., Jambor, R., Rusicka, A., Cisarova, I., Holecek, J., Biesemans, M., et al. Organotin(IV) Derivatives of Some O,C,O-Chelating Ligands. Part 2. *Organometallics* , 26, 6312-6319. (2007).
 19. Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A., & Zucco, F. Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. In *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects* (pp. 75-97). John Wiley & Sons Ltd. (1990).
 20. Evrard, A., Cuq, P., Ciccolini, J., Vian, L., & Cano, J.-P. Increased cytotoxicity and bystander effect of 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase. *British Journal of Cancer* , 80, 1726-1733. (1999).
 21. Fick, J., Barker II, F. G., Dazin, P., Westphale, E. M., Beyer, E. C., & Israel, M. A. The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro. *Proceeding of the National Academy of Sciences of Unites States of America* , 92, 11071-11075. (1995).
 22. Fukuto, J. M., Newman, D. A., & Jensen, F. R. Stereochemistries and Mechanism of Reactions of Electrophiles with Organotin Compounds. *Organometallics* , 6, 415-420. (1986).
 23. Garcia-Zarracino, R., Höpfl, H., & Güizado-Rodriguez, M. Bis(tetraorganodistannoxanes) as Secondary Building Block Units (SBUs) for the Generation of Porous Materials- A Three-Dimensional Honeycomb Architecture Containing Adamantane-type Water Clusters. *Crystal Growth & Design* , 9, 1651-1654. (2009).
 24. Gasser, G., Ott, I., & Metzler-Nolte. Organometallic Anticancer Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* , 54, 3-25. (2010).
 25. Gerasimchuk, N., Maher, T., Durham, P., Domasevitch, K. V., Wilking, J., & Mokhir, A. Tin(IV) Cyanoximates: Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity. *Inorganic Chemistry* , 46, 7268-7284. (2007).
 26. Gomez Treviño, A., Castel, S., Lopez-Iglesias, C., Cortadellas, N., Comas-Riu, J., & Mercade, E. Effects of adenovirus-mediated SV5 fusogenic glycoprotein expression on tumor cells. *The Journal of Gene Medicine* , 5, 483-492. (2003).

27. Hernandez Menendez, M., & Rios Hernandez, M. d. Oncogenes y Cáncer. *Revista Cubana de Oncología* , 15 (2), 131-139. (1999).
28. Hoffman, R. M. In Vitro Drug Response Assay for Entry into the Rational Era Cancer Chemotherapy. *Human Cell* , 8 (4), 131-148. (1995).
29. Hoth, A., Johannisson, R., Syed Ali, S., Schulze, J., & Siegers, C.-P. Cytotoxicity of organotin compounds in different cultured cell lines. *Toxicology and Industrial Health* , 21, 131-136. (2005).
30. Jambor, R., Dostal, L., Rusicka, A., Cisarova, I., Brus, J., Holcapek, M., et al. Organotin (IV) Derivatives of Some O,C,O-Chelating Ligands. *Organometallics* , 21, 3996-4004. (2002).
31. Jamil, K., Wajid, R., Bakhtiar, M., & Danish, M. Biologically Active Organotin(IV) Schiff Base Complexes. *Journal of the Iranian Chemical Society* , 7, 495-499. (2010).
32. Katsoulakaou, E., Tiliakos, M., Papaefstathiou, G., Terzis, A., Raptopoulou, C., Geromichalos, G., et al. Diorganotin (IV) complexes of dipeptides containing the α -aminoisobutyryl residue (Aib): Preparation, structural, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of [(n-Bu)₂Sn(H-1L)](LH=H-Aib-L-LEu-OH, H-Aib-L-Ala-OH). *Journal of Inorganic Biochemistry* , 102, 1397-1405. (2008).
33. Mans, D. R., Da Rocha, A. B., & Schwartzmann, G. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. *Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds* , 5, 185-198. (2000).
34. Mehring, M., Schürmann, M., & Jurkschat, K. The First Rigid O, C, O-Pincer Ligan and Its Application for the Synthesis of Penta- and Hexacoordinate Organotin (IV) Compounds. *Organometallics* , 17, 1227-1236. (1997).
35. Mercade, E., Cascallo, M., Carrio, M., Calbo, J., Gomez Treviño, A., Fillat, C., et al. Treatment based on a combination of the CYP2B1/cyclophosphamide system and p53 delivery enhances tumour regression un human pancreatic cancer. *Annals of Oncology* , 12, 379-388. (2001).
36. Mitchel, R. The Bystander Effect: Recent Developments and Implications for Understanding the Dose Response. *Nonlinearity in Biology, Toxicology and Medicine* , 2, 173-183. (2004).
37. Nam, N.-H., & Parang, K. Current Target for Anticancer Drug Discovery. *Current Drug Targets* , 4, 159-179. (2003).
38. Nature. "<http://www.nature.com/scitable/topicpage/celladhesion-and-cell-communication-14050486>". Consultado el 1 de octubre de 2011.
39. Pettinari, C. Special Issue: Recent advances in Organotin Chemistry. *Journal of Organometallic Chemistry* , 691, 1435-1436. (2006).
40. Pizarro, A. M., Habtemariam, A., & Sadler, P. J. Activation Mechanisms for Organometallic Anticancer Complexes. *Topics in Organometallic Chemistry* , 32, 21-56. (2010).
41. Pope, I. M., Poston, G. J., & Kinsella, A. R. Review: The Role of the Bystander Effect in Suicide Gene Therapy. *European Journal of Cancer* , 33, 1005-1016. (1997).

42. Ramos-Organillo, Á., Guzman-Tiburcio, C. R., Flores-Bustamante, A. M., Peña-Hueso, A., Guerrero-Alvarez, J., & Flores-Parra, A. X-Ray and NMR study of tetra- and penta-coordinated stanoxanes derived from trans-cinnamic acid. *Arkivoc* , 101-114. (2008).
43. Ray, D., Das Sarma, K., & Antony, A. Differential Effects of Tri-n-Butylstannyl Benzoates on Induction of Apoptosis in K562 and MCF-7 Cells. *IUBMB Life* , 49, 519-525. (2000).
44. Redon, C. E., Dickey, J. S., Nakamura, A. J., Kareva, I. G., Naf, D., Newshean, S., et al. Tumors induce complex DNA damage un distant proliferative tissues in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 107, 17992-17997. (2010).
45. Sanchez-Viesca, F., Nicolas, I., & Berros, M. Formación y estructura secundaria del 2,3-bis-(3,4-dimetoxibenzoil) propionitrilo. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* , 7, 61-66. (2004).
46. Schwartz, P. S., Chen, C.-S., & Waxman, D. J. Enhanced Bystander Cytotoxicity of P450 Gene-directed Enzyme Prodrug Therapy by Expression of the Antiapoptotic Factor p35. *Cancer Research* , 62, 6928-6937. (2002).
47. Sedaghat, T., & Rahmani, M. Synthesis and Spectroscopic Investigations of New Schiff Base Complexes of Tin (IV). *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* , 183, 1161-1167. (2008).
48. Shah, F. A., Ali, S., & Shahzadi, S. Spectral and Biological Studies of Newly Synthesized Organotin(IV) Complexes of 4-(((E)-(2-Hydroxyphenyl)methylidene]amino]}methyl)cyclohexane Carboxylic Acid Schiff Base. *Journal of the Iranian Chemical Society* , 7, 59-68. (2010).
49. Shahzadi, S., Shahid, K., Ali, S., & Bakhtiar, M. Characterization and Antimicrobial Activity of Organotin (IV). *Turkish Journal of Chemistry* , 32, 333-353. (2008).
50. Shahzadi, S., Shahid, K., Mazhar, M., & Khan, K. Organotin (IV) Derivatives as Biocides: an Investigation of Structure by IR, Solution NMR, Electron Impact MS and Assessment of Structure Correlation with Biocidal Activity. *Journal of the Iranian Chemical Society* , 2, 277-288. (2005).
51. Stridh, H., Cotgreave, I., Muller, M., Orrenius, S., & Gigliotti, D. Organotin-Induced Caspase Activation and Apoptosis in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Chemical Research in Toxicology* , 14, 791-798. (2000).
52. Szorcsik, A., Nagy, L., Gyurcsik, B., Vankó, G., Krämer, R., Vértes, A., et al. Organotin (IV) complexes of polyhydroxyalkil carboxylic acids and some related ligands. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* (260), 459-469. (2004).
53. Szorcsik, A., Nagy, L., Pellerito, L., Yamaguchi, T., & Yoshida, K. Preparation and structural studies of organotin (IV) complexes formed with organic carboxylic acids. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* , 256, 3-10. (2003).
54. Valla, V., & Bakola-Christianopoulou, M. Chemical Aspects of Organotin Derivatives of Beta-diketones, Quinonoids, Steroids and Some Currently

- Used Drugs: A Review of the Literature with Emphasis on the Medicinal Potential of Organotin. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal Organic y Nano-Metal Chemistry* , 37, 507-525. (2007).
55. van der Kerk, G. Organotin Chemistry: Past, Present, and Future. In J. J. Zuckerman, *Organotin Compounds: New Chemistry and Applications* (pp. 1-25). Washington, DC. (1976).
56. Wang, F., Habtemariam, A., van der Geer, E. P., Fernandez, R., Melchart, M., Deeth, R. J., et al. Controlling ligand substitution reactions of organometallic complexes: Tuning cancer cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Science* , 102, 18269-18274. (2005).
57. Wei, M. X., Tamiya, T., Rhee, R. J., Breakefield, X. O., & Chiocca, A. Diffusible Cytotoxic Metabolites Contribute to the in Vitro Bystander Effect Associated with the Cyclophosphamide/Cytochrome P450 2B1 Cancer Gene Therapy Paradigm. *Clinical Cancer Research* , 1, 1171-1177. (1995).
58. Wu, X., Kang, W., Zhu, D., Zhu, C., & Liu, S. Synthesis, crystal structure and biological activities of two novel organotin(IV) complexes constructed from 12-(4-methylbenzoyl)-9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11-carboxylic acid. *Journal of Organometallic Chemistry* , 694, 2981-2986. (2009).
59. Zheng, X., Johansson, M., & Karlsson, A. Bystander Effects of Cancer Cell Lines Transduced with the Multisubstrate Deoxyribonucleoside Kinase of *Drosophila melanogaster* and Synergistic Enhancement by Hydroxyurea. *Molecular Pharmacology* , 60, 262-266. (2000).

APÉNDICE A

Lista de Material y Equipo

Agitadores magnéticos

Autoclave eléctrica (Tuttnauer 2540 M)

Balanza analítica (OHAUS)

Baño de temperatura con recirculación (SEV FC10)

Baño de temperatura (Baxter B6990)

Bomba de vacío (GAST, presión max. 4.08 bar/60PSI)

Caja de guantes (MBRAUN, LABMASTER 1309)

Cámara de conteo de Neubauer

Cámara fotográfica (SONY W310)

Campana de flujo laminar clase II (LABCONCO)

Cánula de acero inoxidable

Canastilla mod.3103 poro 1 micrómetro (Falcon)

Centrífuga refrigerada (eppendorf 5810 R)

Charolas para reactivos de 50 ml desechables (Costar, Corning)

Congelador -20 °C (LAB LINE Inst. Cool Lab)

Espectrofotómetro FT-IR (Perkin Elmer 1600)

Espectrómetro de RMN (Bruker Avance 400 MHz)

Estufa de secado (Lab Line, ThermoScientific 3513)

Frascos de cultivo de 25 cm² CORNING

Frascos para reactivo CORNING

Incubadora (Thermolyne 37900)

Incubadora con agitación (Barnstead/LAB-LINE-Max Q 5000)

Incubadora con control de CO₂ (SHEL LAB TC2323)

Jeringas desechables de 10ml

Lámpara UVP (UVGL-58)

Lector de placas (BIORAD 550)

Lector de placa GloMax® (PROMEGA)

Manta de calentamiento

Material de vidrio básico de laboratorio

Melt Temp (Electrothermal 1001D)

Microcentrífuga (eppendorf 5415 C)

Micropipetas eppendorf de 2.5, 20, 200 y 1000 µl

Microscopio óptico invertido (Van Guard 1291 CMI)

Minishaker (MSI IKA)

Pipeta multicanal de 250 µl (Transferpette)

Pipetas Pasteur

Pipetas serológicas desechables de 10 ml (Costar, Corning)

Pipeteador manual (Drummond Pipet-Aid XP)

Placas de 16 pozos (Nalge nunc)

Placas de 24 pozos de fondo plano con tapa (Costar, Corning)

Placas de 96 pozos blancas de fondo claro con tapa (Costar, Corning)

Placas de 96 pozos de fondo plano con tapa (Costar, Corning)

Placas de cultivo de 10 cm de diámetro (FALCON y CORNING)

Plancha de calentamiento con agitación (Barnstead/Thermolyne)

Puntas blancas, amarillas y azules para micropipetas

Refrigerador (LG GR-739 DTC)

Rotavapor (Buchi B491)

Tanque de nitrógeno líquido (CBS Cryosystems XC 20/20 Series)

Tubos de fondo cónico de 50 mL (FALCON y CORNING)

Tubos Eppendorf de 0.2, 1.5 y 2 mL

Tubos para centrifuga de 15 mL (CORNING)

Ultrasonido (Branson 2510)

Viales de 1.5 mL para crioconservación (nunc)

APÉNDICE B

Reactivos

Acetato de etilo (CTR reactivos)

Benzaldehído (Fluka)

Buffer de fosfatos 10X

CaCl₂ 100mM

Cloroformo (SIGMA-ALDRICH)

Cloruro de metileno (SIGMA-ALDRICH)

Cloruro de trifenilestaño (SIGMA-ALDRICH)

Cloruro de trimetilestaño (SIGMA-ALDRICH)

CO₂ gas

p-dietilaminobenzaldehído (Alfa Aesar)

Dimetil sulfóxido (SIGMA)

Etanol (DEQ)

Etanol 70%

p-fluorbenzaldehído (Fluka)

Hexano (Aldrich/ Karal)

Ioduro de propidio (Invitrogen)

Kit CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega)

KOH (Fermont)

Línea celular A-431

Línea celular MOLT-4

Medio DMEM (GIBCO)

Medio MEM (GIBCO)

Medio RPMI (GIBCO)

Metanol (DEQ)

Paraformaldehído (Fluka)

Penicilina/Estreptomicina 5000UI/ml/5000 mg/ml (GIBCO)

Sodio metálico estabilizado en queroseno (Karal)

Suero bovino fetal (GIBCO)

Tolueno (DEQ)

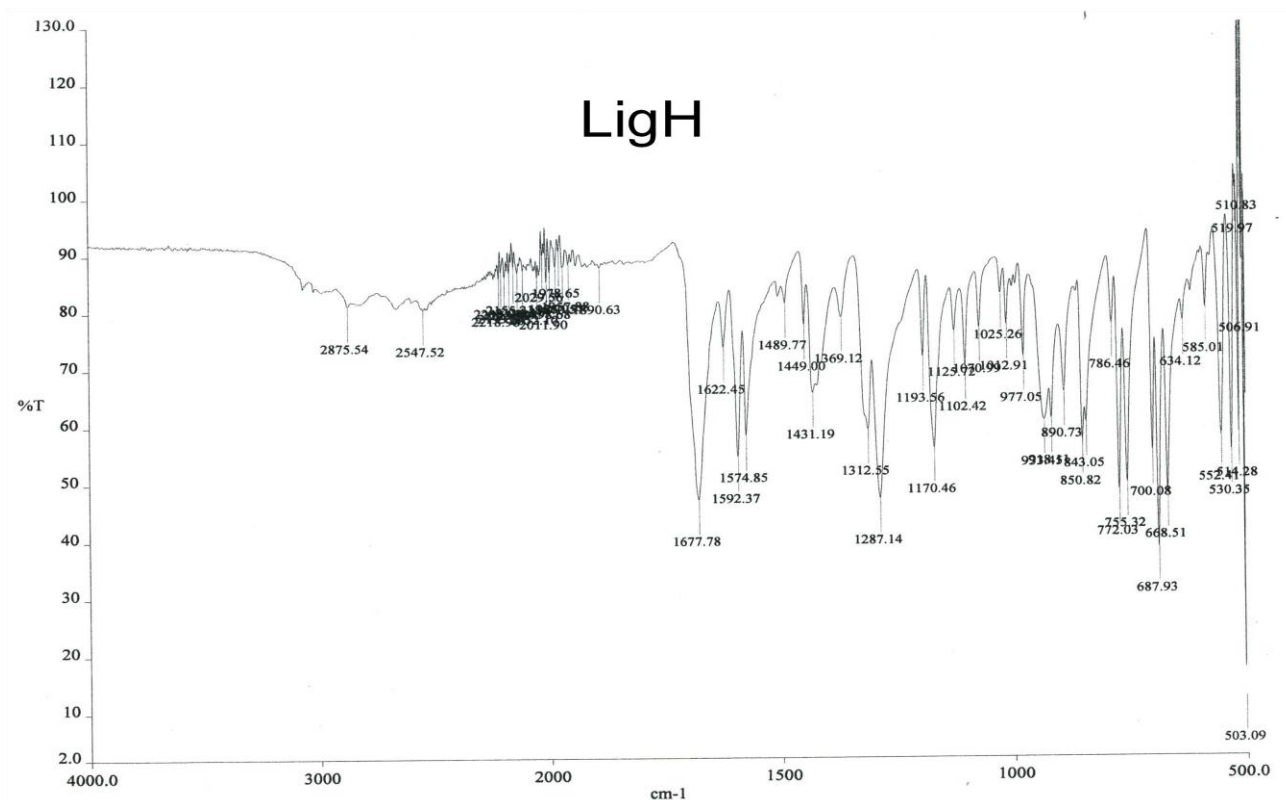
Tripsina/EDTA 0.25%/1mM (GIBCO)

APÉNDICE C

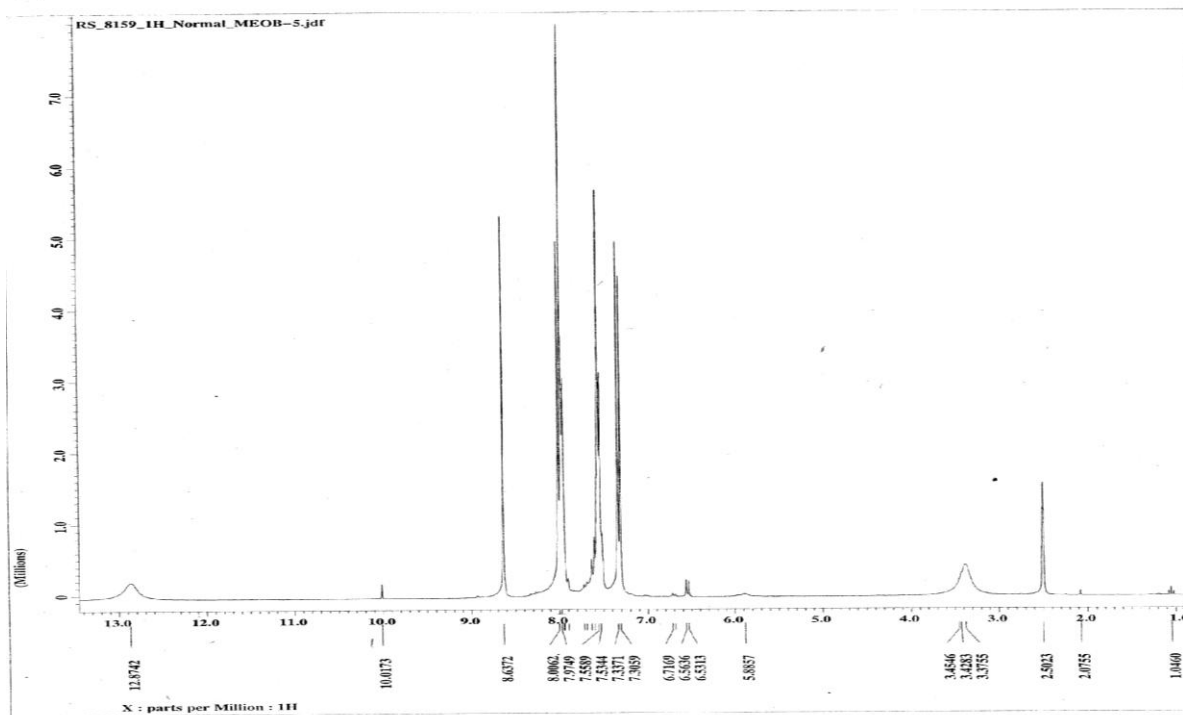
Resultados espectroscópicos

A continuación se presentan los espectros obtenidos para los compuestos sintetizados en el proyecto. Para cada compuesto se reportaran los espectros de IR, RMN y masas según corresponda.

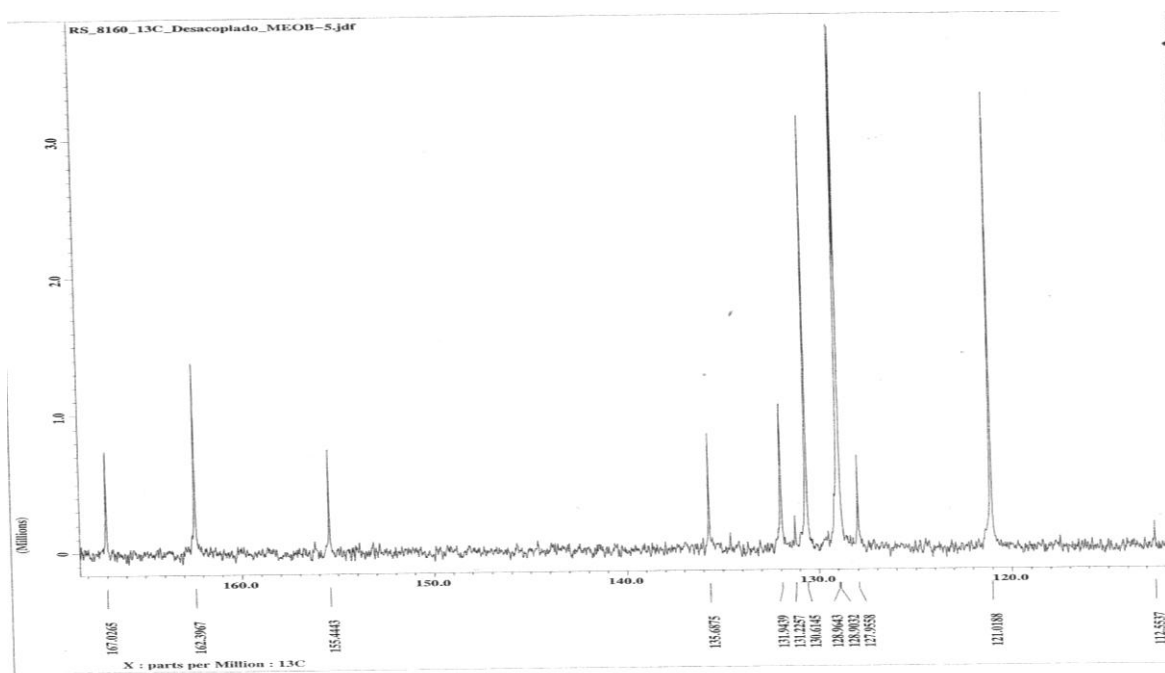
- Ligante protón
- Espectro de infrarrojo



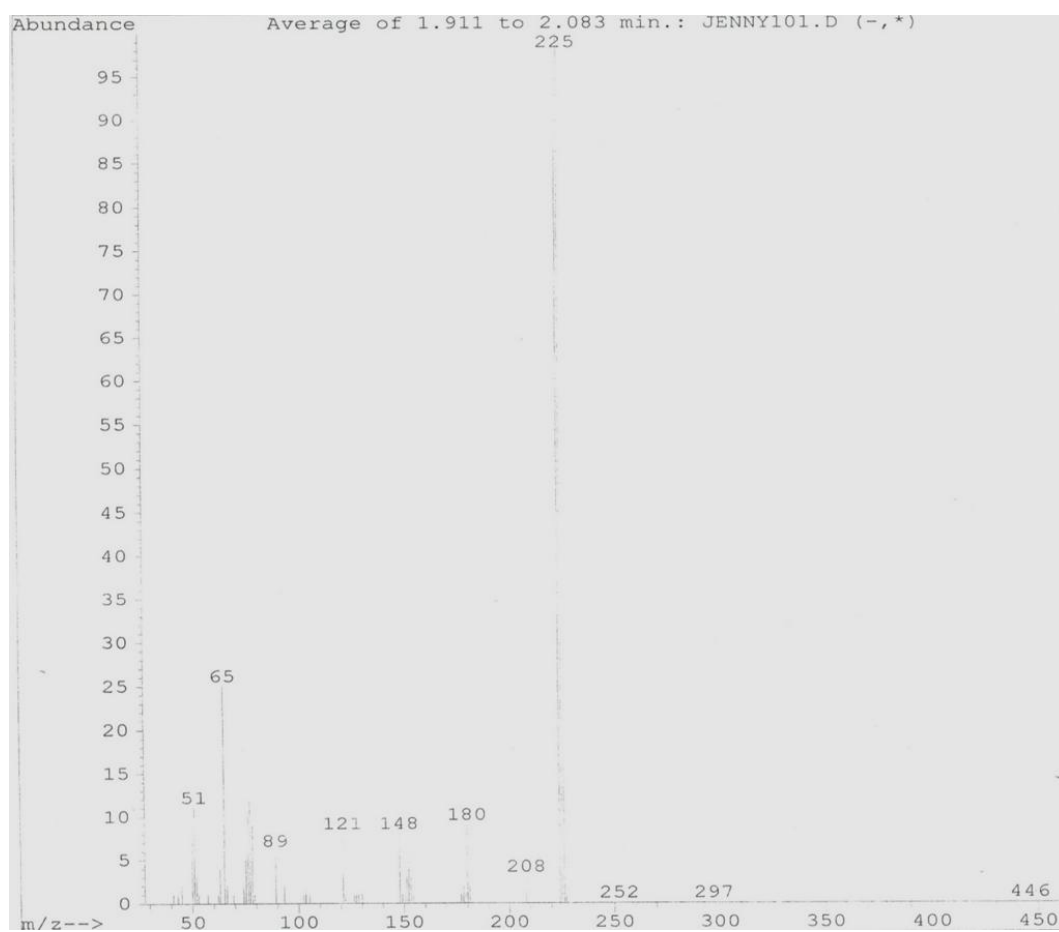
- Espectro de RMN ^1H



- Espectro de RMN ^{13}C

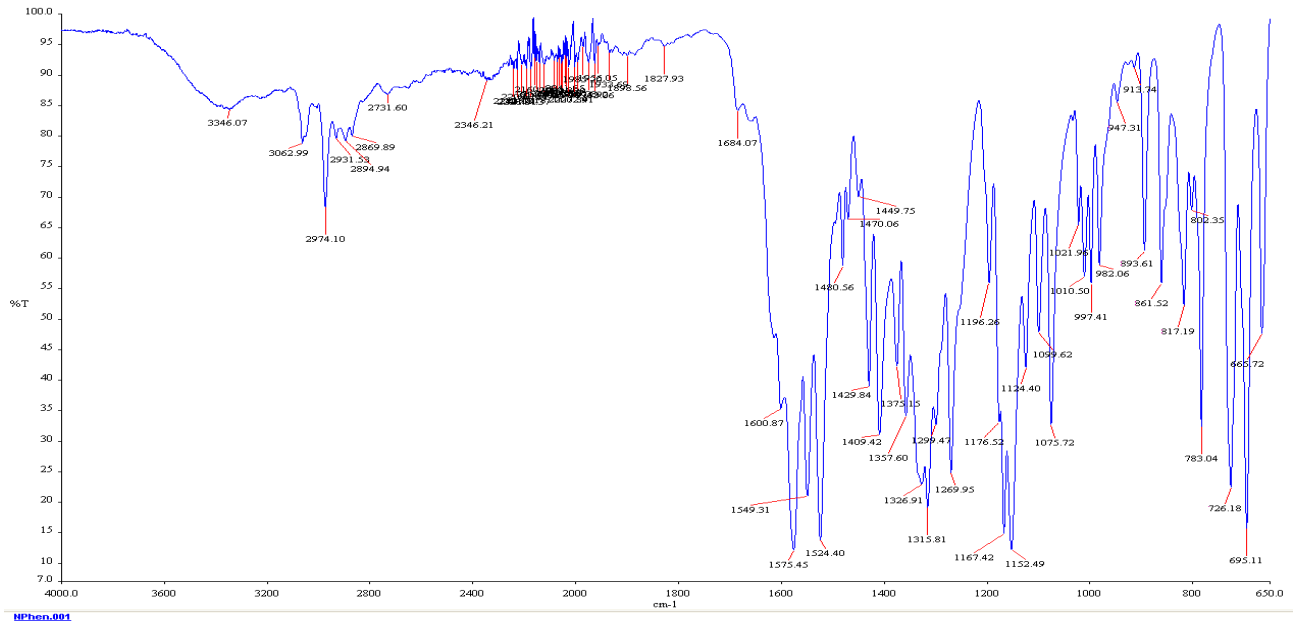


- Espectro de masas

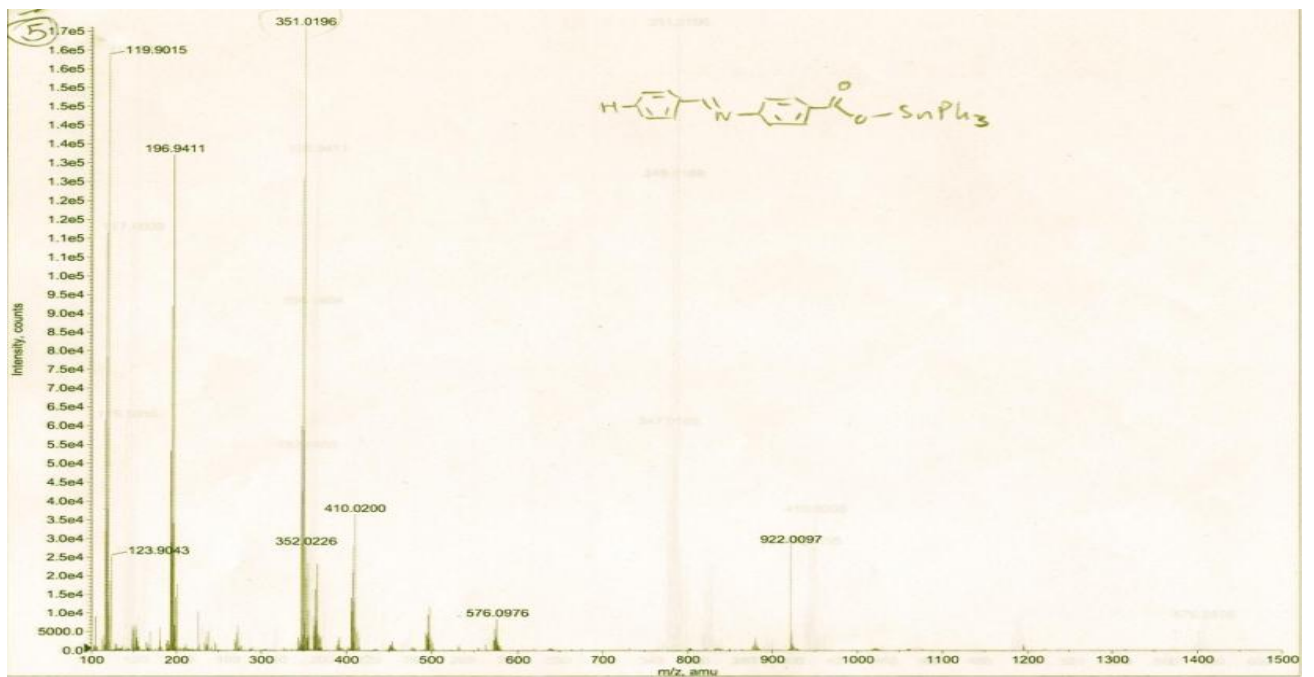


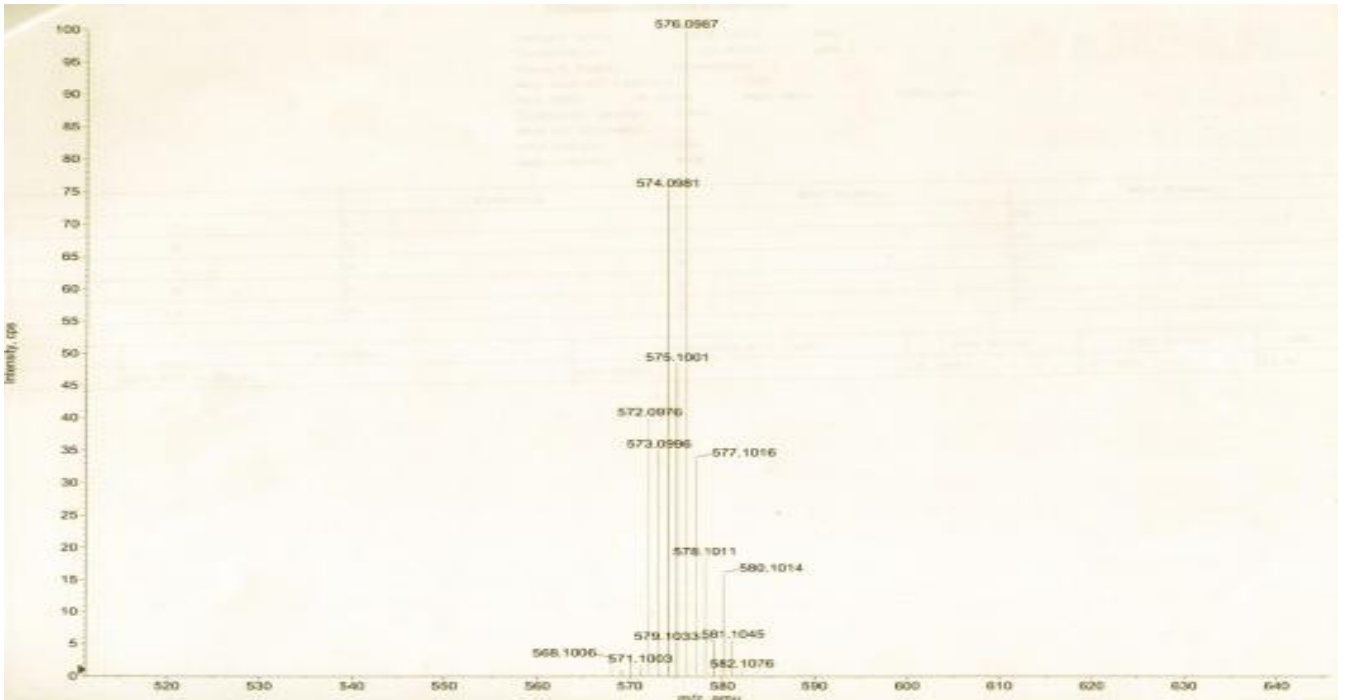
- Complejo H Phe

- Espectro infrarrojo

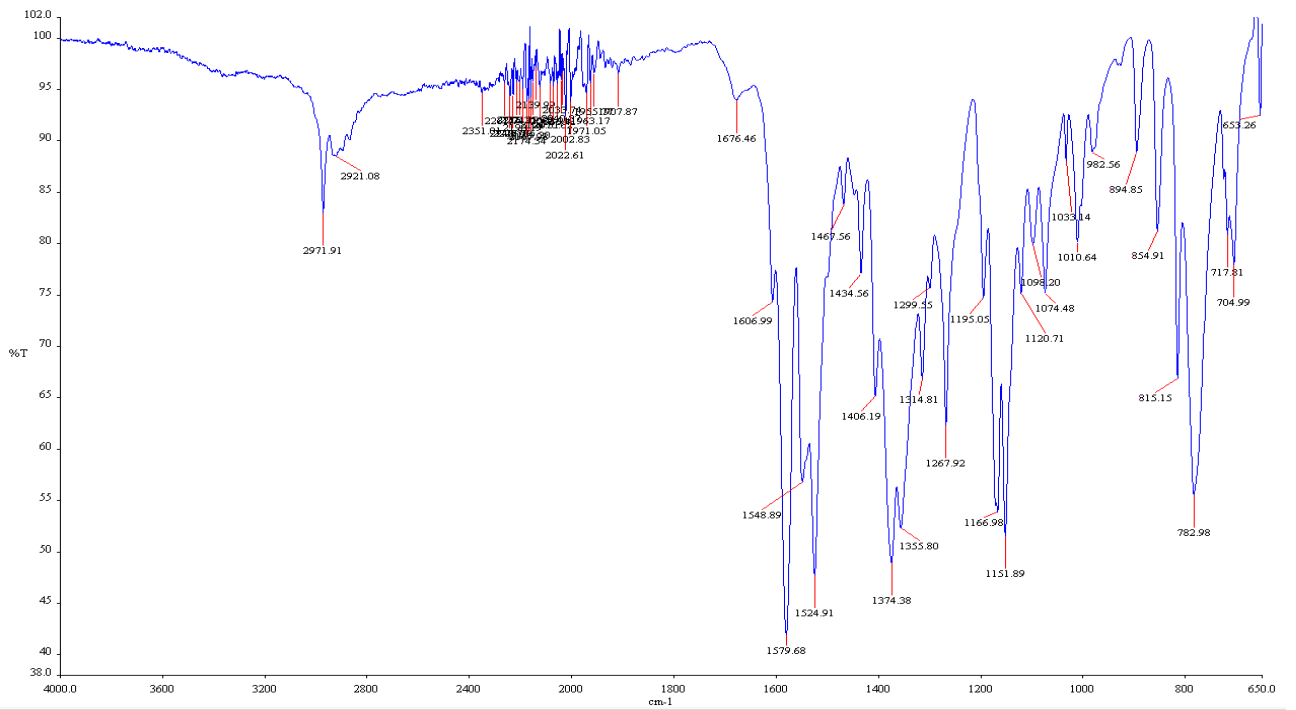


- Espectro de masas



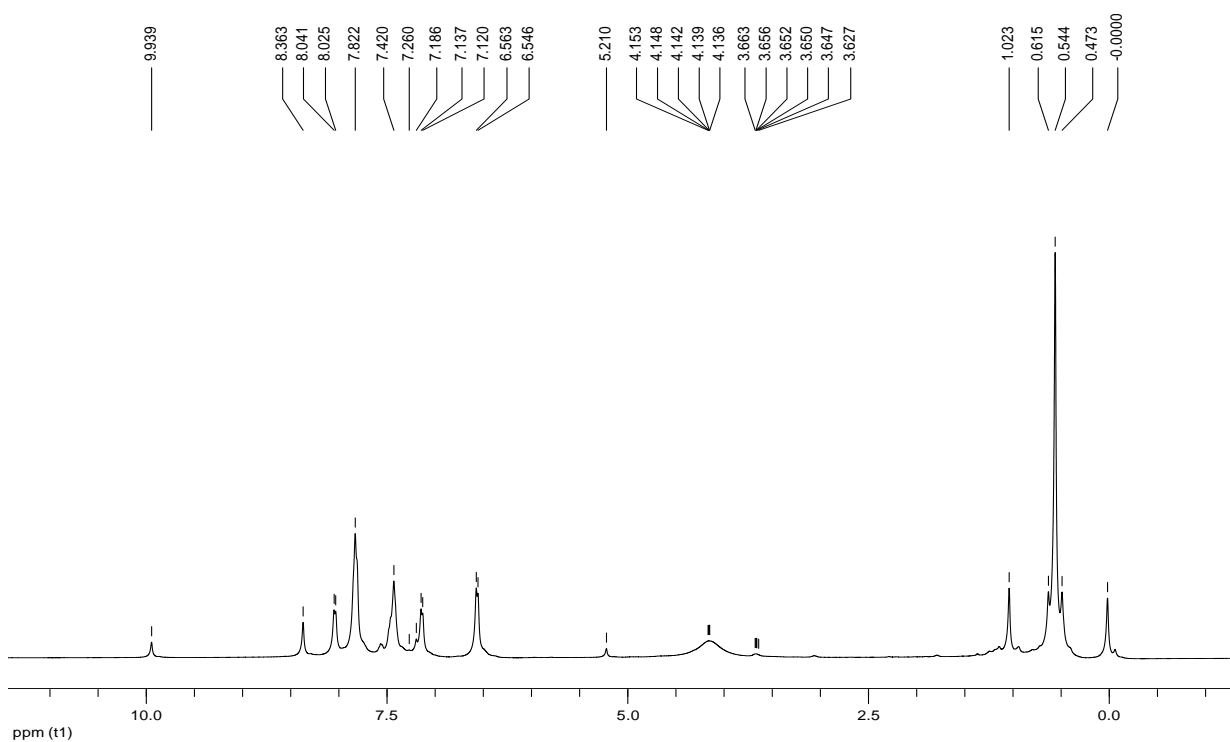


• Complejo H Me

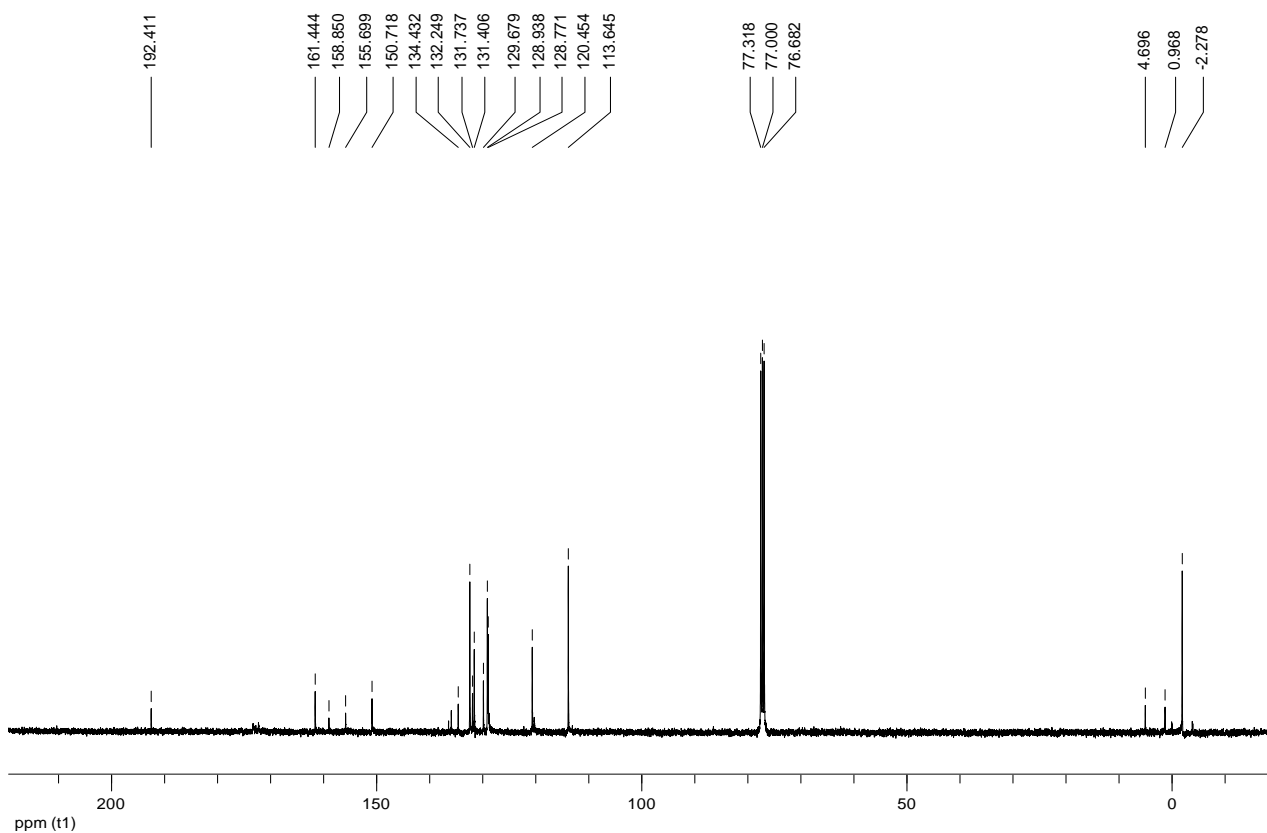


○ Espectro de infrarrojo

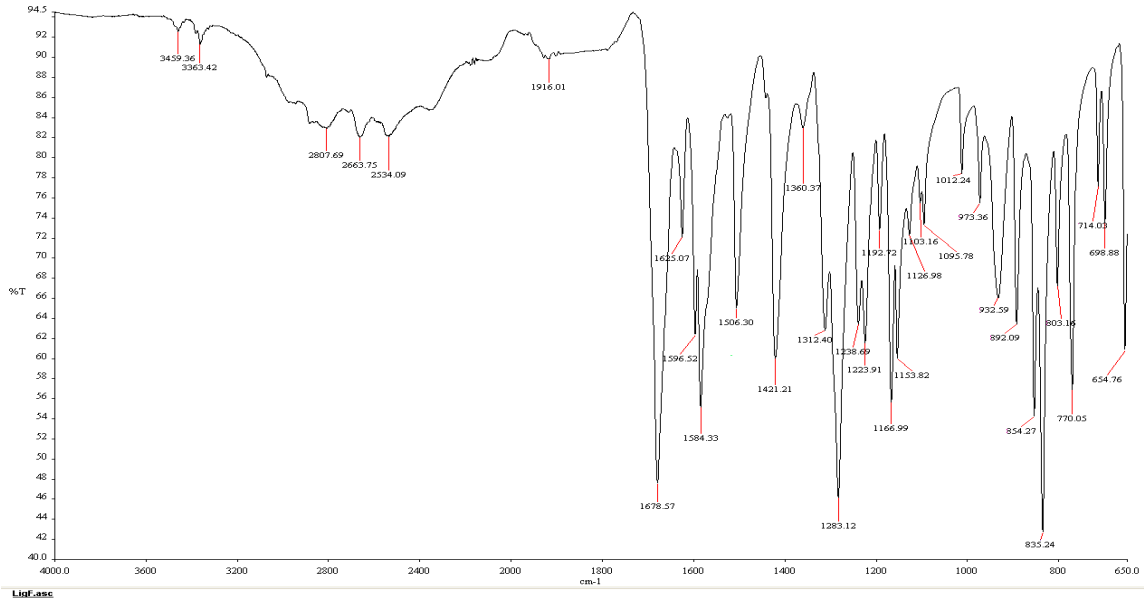
○ Espectro de ^1H



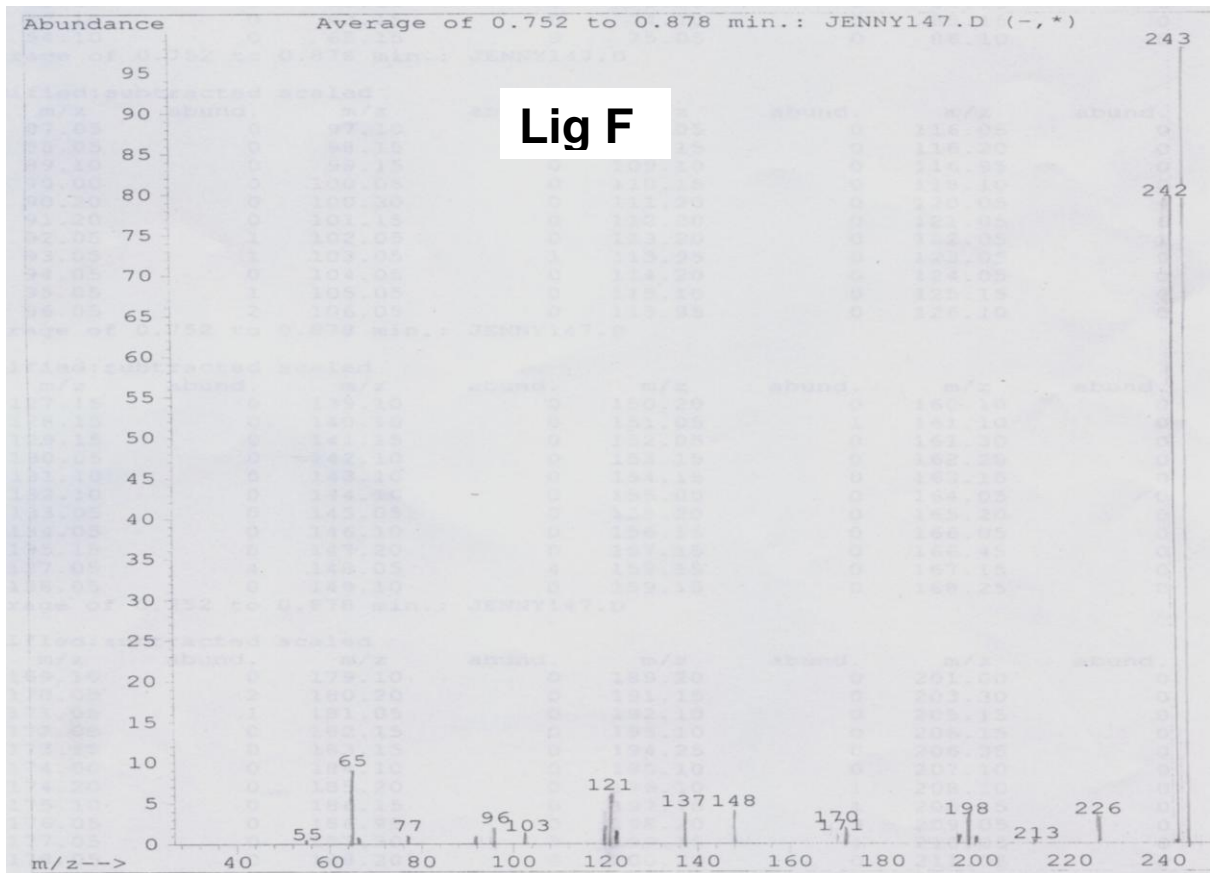
○ Espectro de ^{13}C



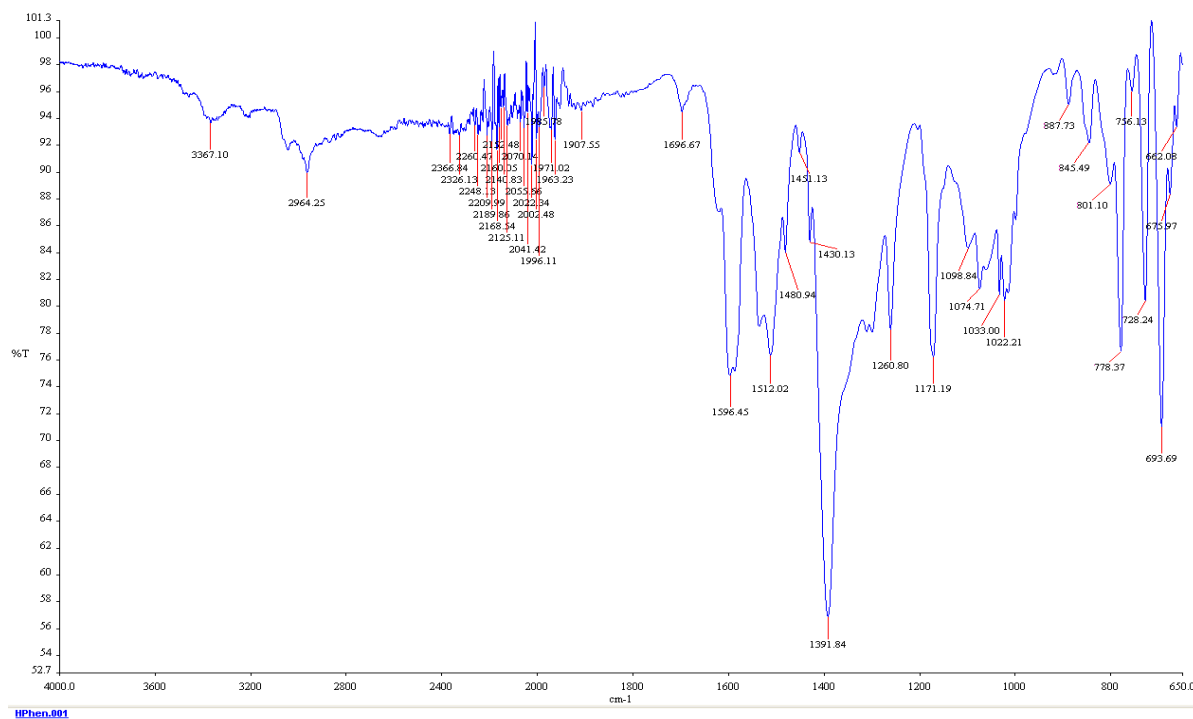
- **Ligante Flúor**
 - Espectro de infrarrojo



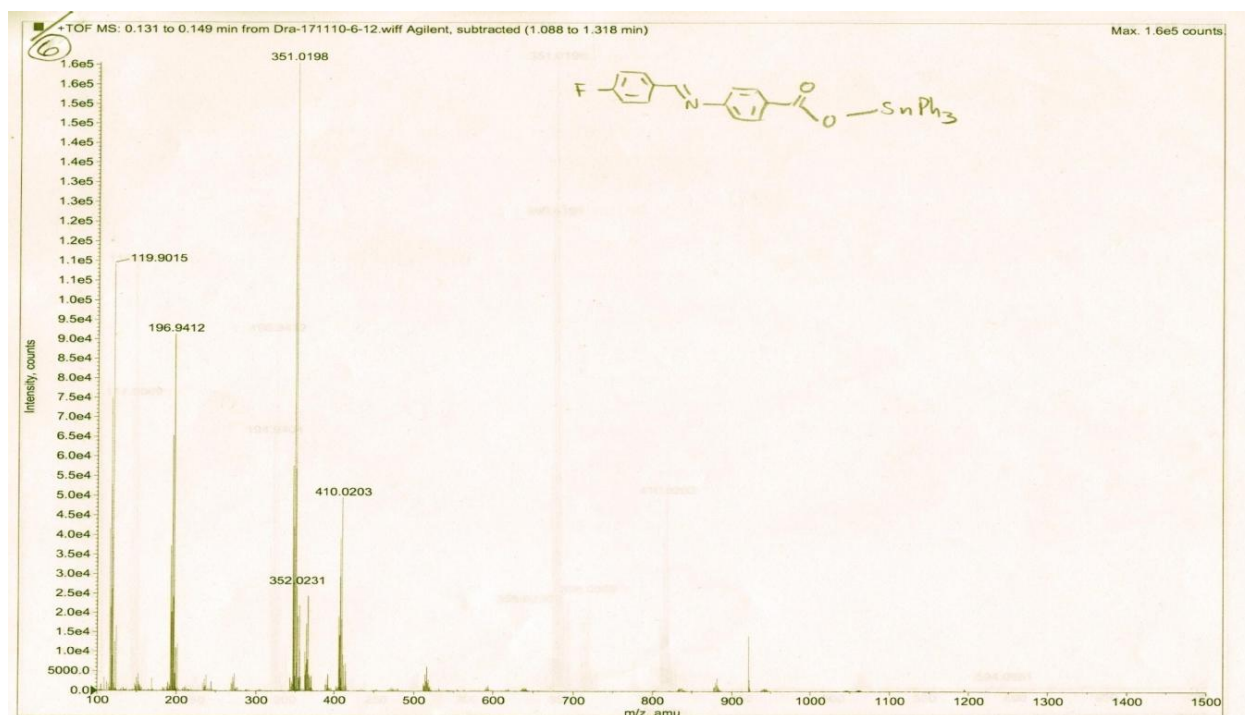
- Espectro de masas

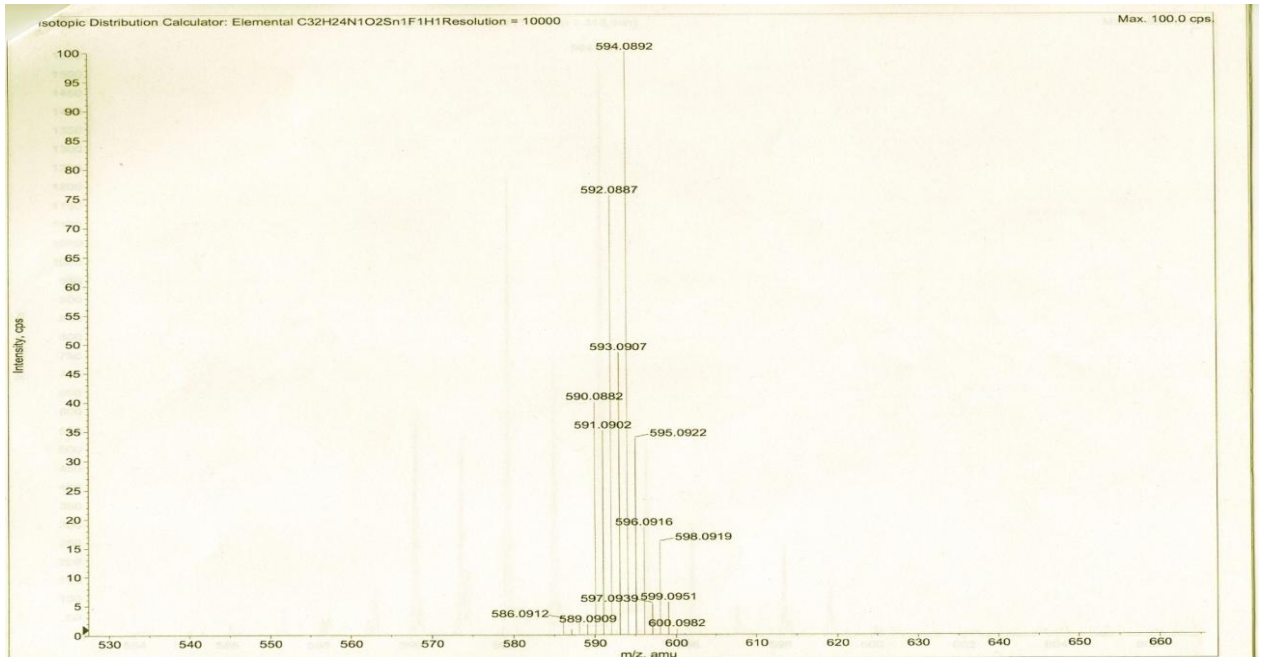


- Complejo F Phe
 - Espectro de infrarrojo

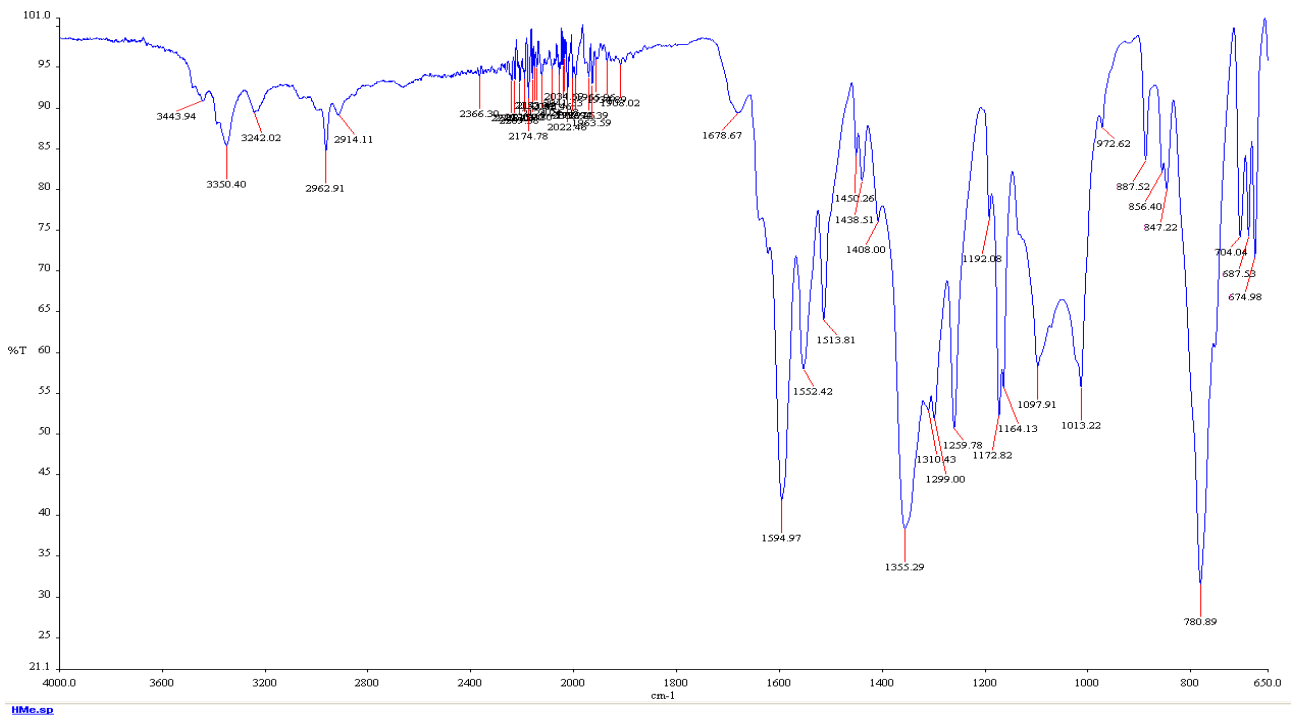


- Espectro de masas

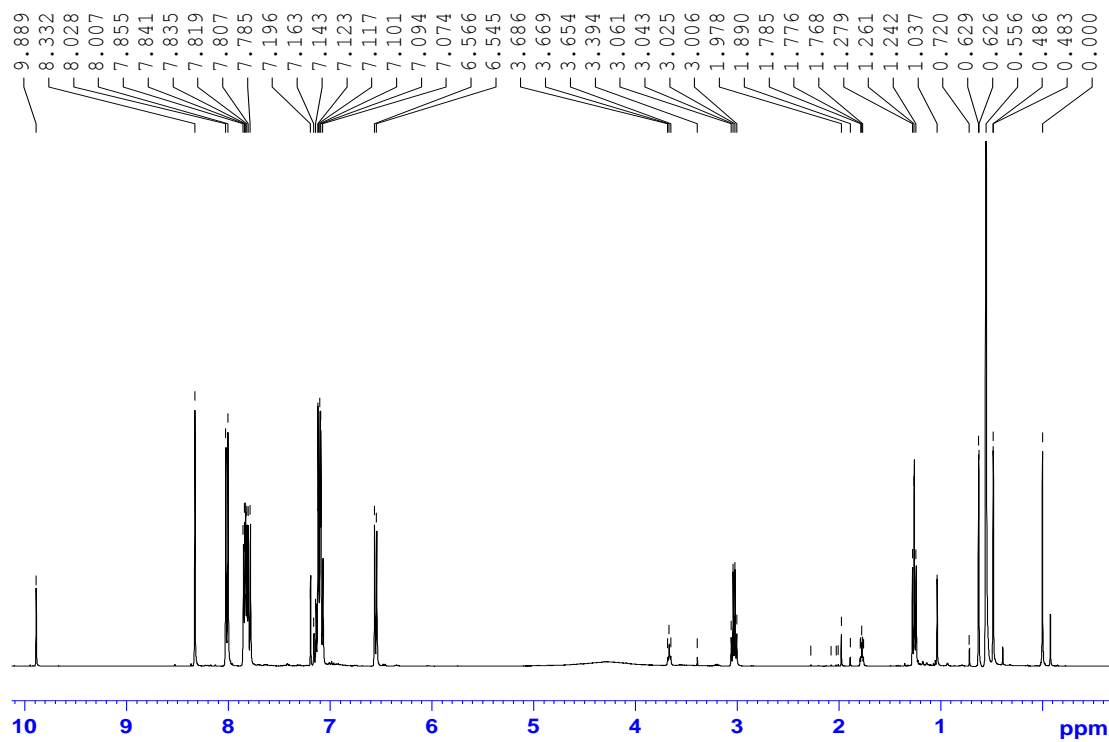




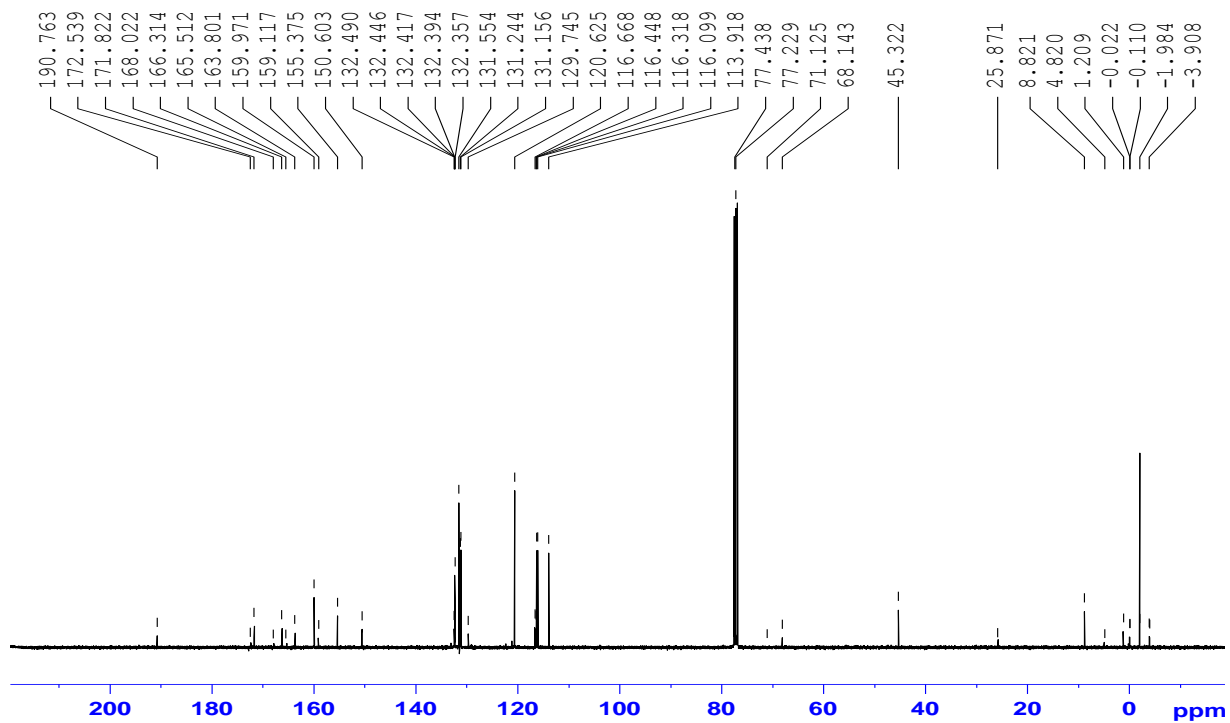
- **Complejo F Me**
 - Espectro de infrarrojo



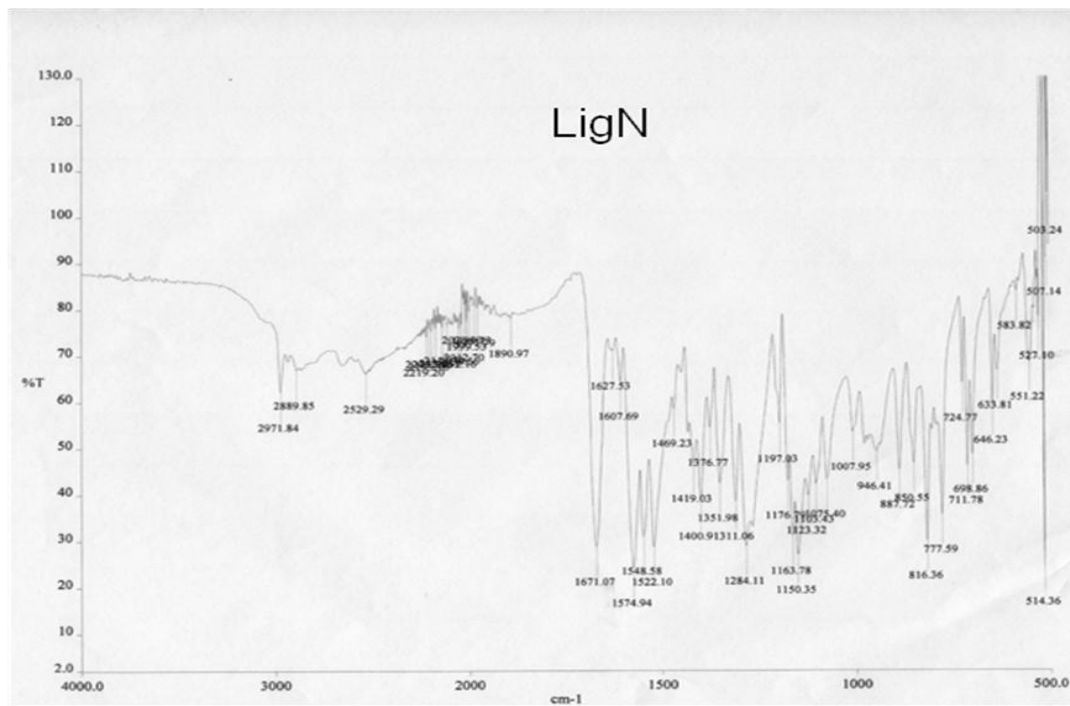
○ Espectro de RMM ^1H



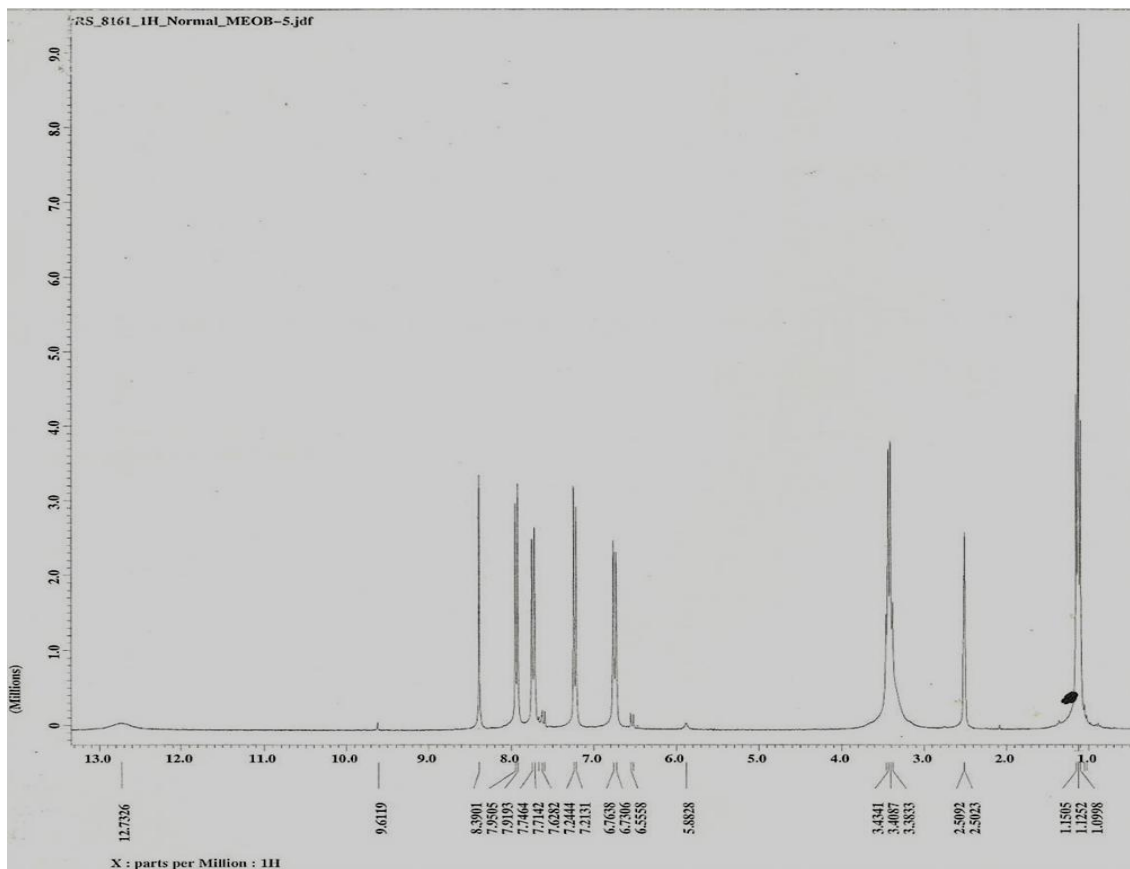
○ Espectro de RMN ^{13}C



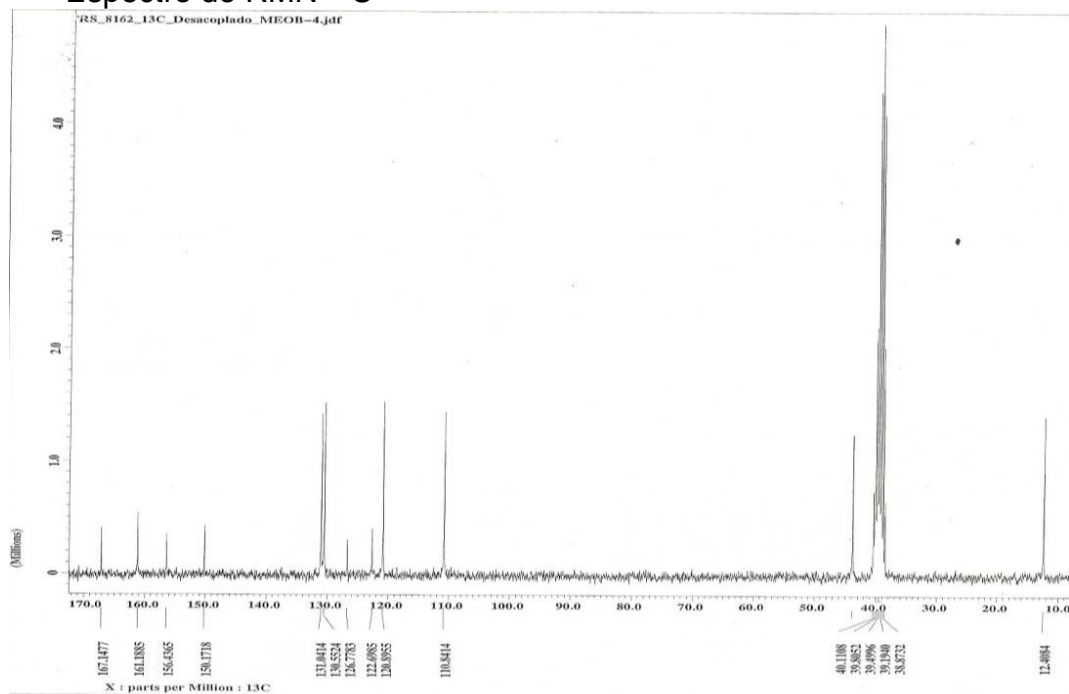
- **Ligante dietilamino**
 - Espectro de infrarrojo



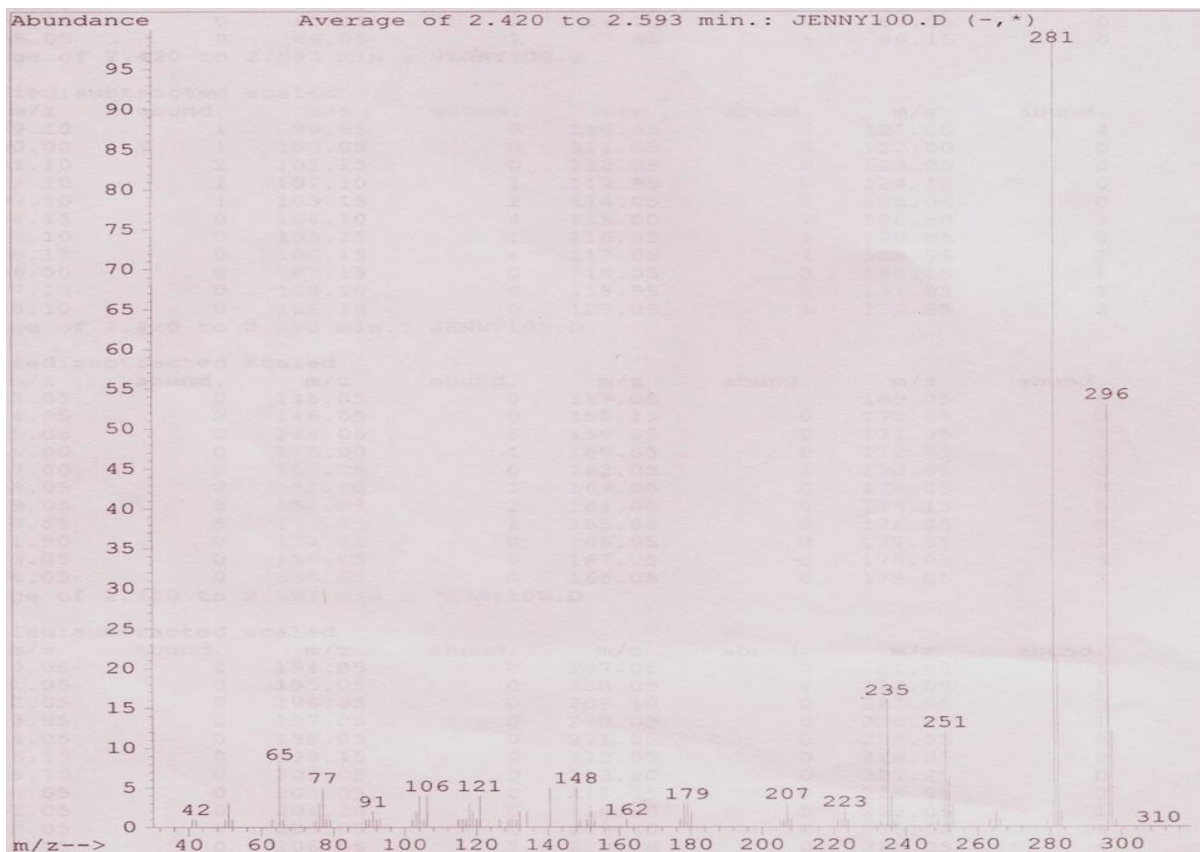
- Espectro de RMN ¹H



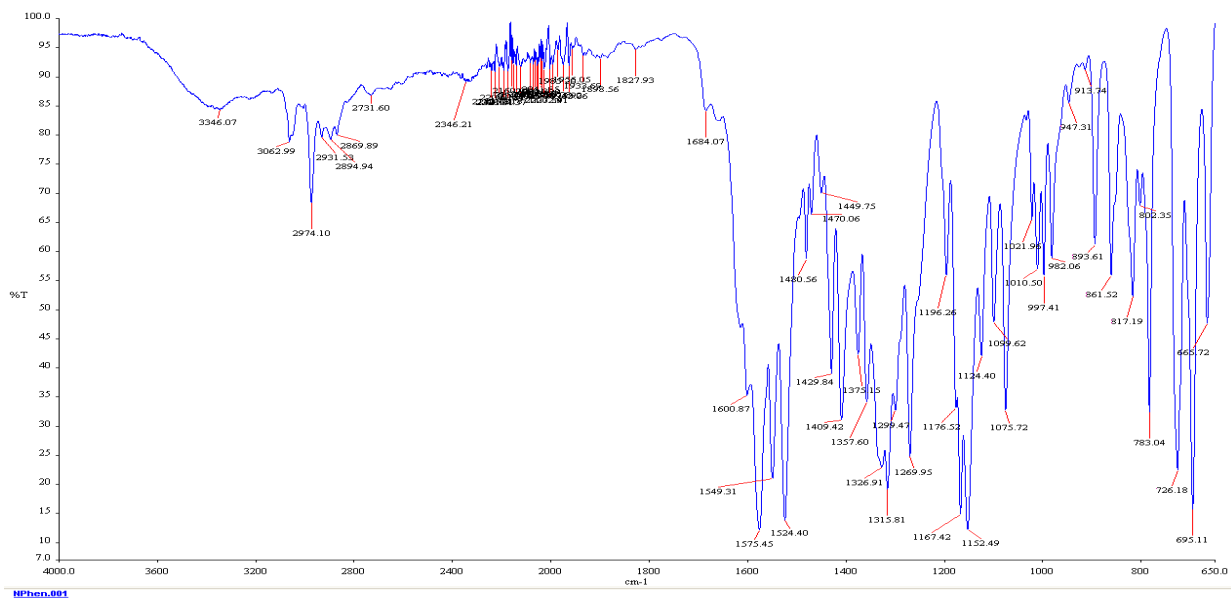
- Espectro de RMN ^{13}C



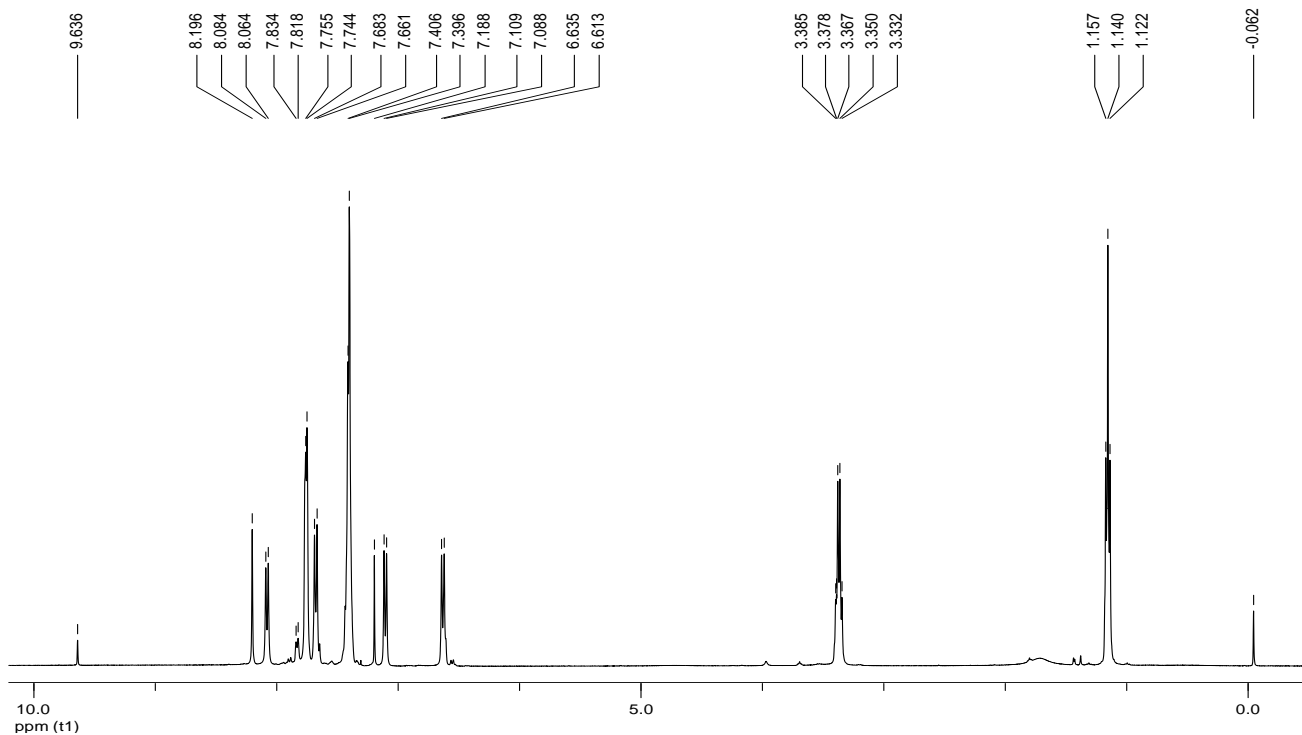
- Espectro de masas



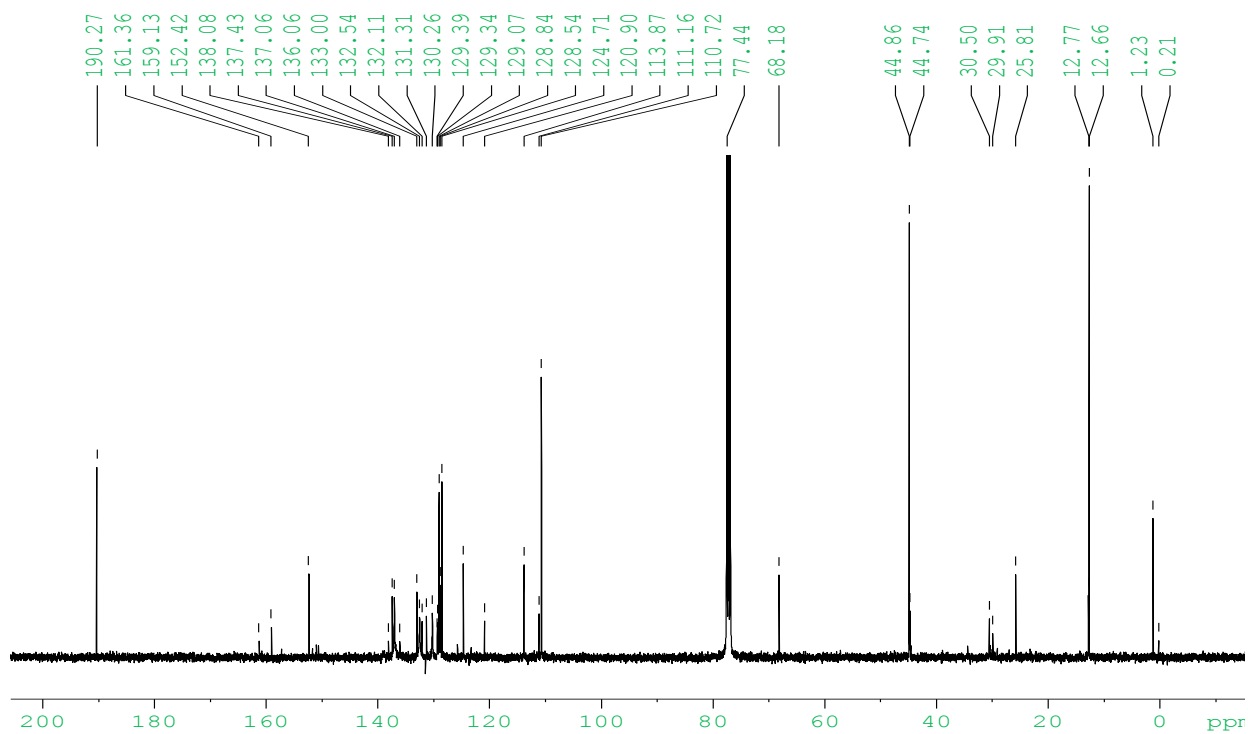
- Complejo Nphe
 - Espectro de infrarrojo



- Espectro RMN ^1H

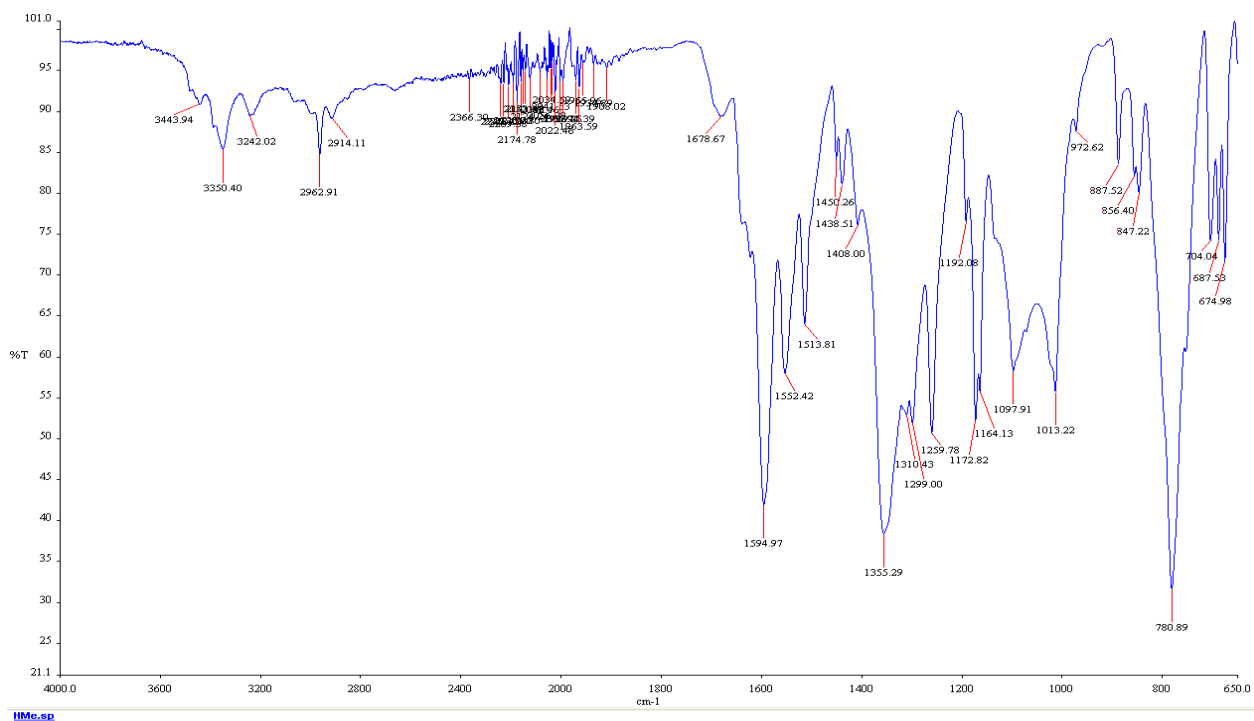


○ Espectro de RMN ¹³C

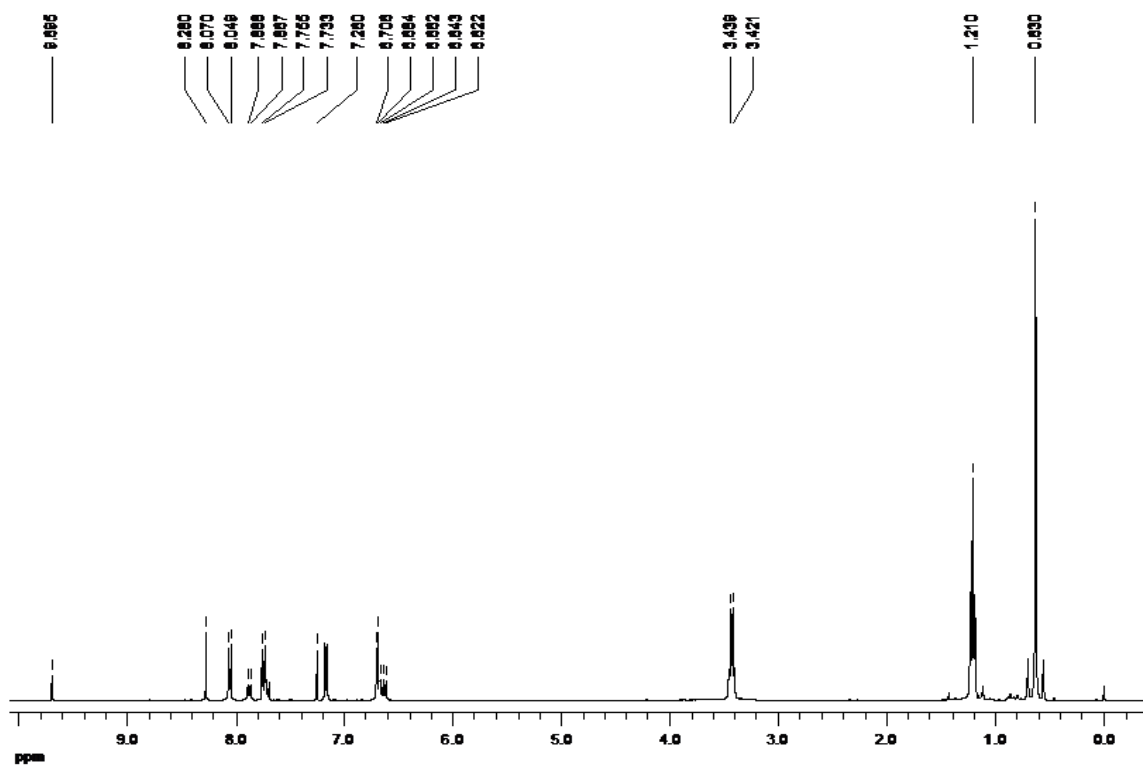


● Complejo Nme

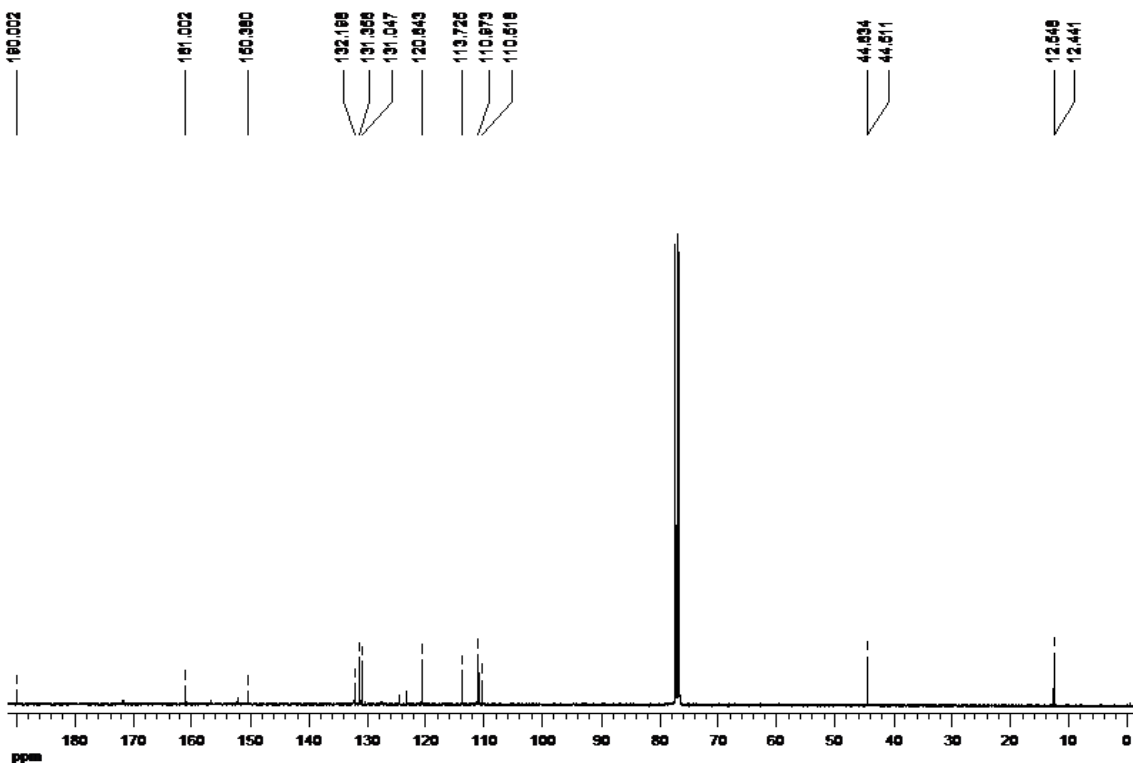
○ Espectro de infrarrojo



○ Espectro de RMN ^1H



○ Espectro de RMN ^{13}C



RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Margarita Ortiz Martinez

Candidato para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS ORGANOMETÁLICOS DEL TIPO CARBOXILATOS DE ESTAÑO (IV). EVALUACIÓN DE SU EFECTO *BYSTANDER IN VITRO*.

Campo de estudio: Farmacia.

Biografía:

Datos personales: Nacida en Monterrey Nuevo León México, el 24 de Agosto de 1987, hija de María de Jesús Martínez Aduato y José Guadalupe Ortiz Ibarra.

Educación:

Egresada de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

- Químico Farmacéutico Biólogo, 2009.

Experiencia profesional:

- Durante el 2010 maestra en la Preparatoria Pablo Livas, impartiendo Química Inorgánica y Orgánica.

