



Centro de Investigación y Estudios Avanzados del  
Instituto Politécnico Nacional

UNIDAD MONTERREY

“Efecto de dos compuestos orgánicos de estaño fluorescentes en  
un modelo *in vitro* de melanoma murino.”

Tesis que presenta

Ing. Jesús Abraham Serrano Mireles

Para obtener el grado de

Maestro en ciencias en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de la Tesis

Dr. Arturo Chávez Reyes

Apodaca, Nuevo León

Agosto, 2014

## **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. Arturo Chavéz Reyes por haberme dado la oportunidad y confianza de realizar este trabajo de tesis.

Muchas gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a lo largo de mis estudios de maestría.

Agradezco al Dr. Víctor Manuel Jiménez Pérez y a su grupo de investigación por haber proporcionado los compuestos orgánicos de estaño necesarios para la realización de este proyecto.

También me gustaría agradecer enormemente a mi familia y a mis amigos por todo el apoyo incondicional que me dieron durante estos 2 años.

## Contenido

Resumen .....	1
Abstract .....	2
Introducción .....	3
Compuestos orgánicos de estaño.....	3
Luminiscencia.....	3
Fluorescencia .....	5
Fluoróforo .....	5
Microscopía de fluorescencia.....	6
Antecedentes.....	7
Hipótesis .....	9
Objetivos.....	10
Objetivo general.....	10
Objetivos particulares.....	10
Materiales y Métodos.....	11
Materiales .....	11
Compuestos Organoestánicos.....	11
Cultivo celular .....	13
Medio de cultivo .....	13
Otros reactivos .....	14
Equipo utilizado .....	14
Métodos.....	14
Cultivo celular .....	14
Identificación de los compuestos que inducen una mejor fluorescencia.....	15
Ensayo de viabilidad azul Alamar. ....	16
Estudio dosis-respuesta.....	17
Análisis de datos obtenidos del ensayo de viabilidad Azul Alamar.....	17
Resultados .....	19
Selección de compuestos que se utilizarán como fluoróforos.....	19
Estudio dosis-respuesta.....	24
Efecto de los compuestos organoestánicos sobre la proliferación de las células B16F10 .....	27
Análisis de datos.....	29

Discusión.....	37
Conclusiones.....	40
Perspectivas.....	41
Bibliografía.....	42

## Resumen

Los compuestos orgánicos de estaño fueron descubiertos por el químico Edward Frankland a mediados del siglo XIX y desde esa época se han encontrado un gran número de aplicaciones para este tipo de compuestos químicos. Las primeras aplicaciones que se encontraron fue como estabilizadores de reacciones químicas y preservadores de madera, cuero, papel, entre otras. Existe una muy amplia variedad de estos compuestos organoestánicos y una gran cantidad de estos presentan propiedades antibacterianas, antimicóticas y recientemente, se ha presentado un gran auge en el estudio de compuestos orgánicos de estaño con actividad antitumorales. El grupo de investigación del Dr. Víctor Jiménez recientemente sintetizó algunos compuestos organoestánicos con capacidades luminiscentes. En el presente estudio se comprobó que estos compuestos pueden funcionar como marcadores fluorescentes y se observó el efecto de estos sobre la viabilidad de las células de melanoma murino utilizando ensayos de actividad metabólica e imágenes de microscopía confocal fluorescente. Se encontró que dos de los nueve compuestos con los que se trabajó producen una mejor tinción en las células a las concentraciones más altas utilizadas (10  $\mu\text{g/mL}$ ), pero muestran una gran toxicidad en el cultivo. Al disminuir la dosis dos órdenes de magnitud (0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) solamente uno de los compuestos organoestánicos sigue siendo capaz de teñir células en cultivo y además la viabilidad de las células aumenta hasta más del 95%. Además se discute sobre los posibles mecanismos por los cuales los compuestos se puedan internalizar a las células.

## **Abstract**

Organotin compounds were discovered by chemist Edward Frankland in the mid XIX century and since then a large number of applications have been found for this organic compounds. The first applications found were stabilizers of chemical reactions, treatment for wood, leather, paper, etc. There is a wide variety of organotin compounds and a large number of these have antibacterial, antifungal and recently there has been a boom in the study of organotin compounds with antitumor activity. Recently the research group of Dr. Víctor Jiménez synthesized some organotin compounds with luminescent capabilities. In this study it was found that some of these compounds can be used as fluorescent biomarkers and it was observed the effects of viability on murine melanoma cell line using metabolic activity assay and fluorescence microscopy images. It was found that two of the nine compounds with which we worked yield a better staining in cells at higher concentrations used (10  $\mu\text{g/mL}$ ), but show high toxicity in the cell culture. Decreasing the dose two magnitude orders (0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) only one of the organotin compounds is still capable of staining cells in culture and also the viability rise above 95%. Furthermore we discuss the possible mechanisms by which the compounds can be internalized into cells.

## Introducción

### ***Compuestos orgánicos de estaño.***

Los compuestos orgánicos de estaño o compuestos de organoestaño son compuestos químicos a base del elemento estaño (Sn). Estos compuestos organoestánnicos son aquellos en los que se presenta al menos un enlace estaño-carbono. Generalmente el elemento estaño presenta un estado de oxidación de +4. Existe un amplio número de aplicaciones industriales para sus compuestos y poseen una estructura que responde a las siguientes fórmulas:  $R_4Sn$ ,  $R_3SnX$ ,  $R_2SnX_2$  y  $RSnX_3$ ; dónde, **R** es un grupo orgánico, como por ejemplo el grupo metilo ( $CH_3$ ), etilo ( $CH_3-CH_2$ ), butilo u octilo, mientras que **X** es un sustituyente inorgánico, por lo general, cloruros ( $Cl^-$ ), fluoruro ( $F^-$ ), hidróxido ( $OH^-$ ), carboxilatos o tioles [1]. Estos compuestos forman parte de un área de la química orgánica denominada como química organometálica [2]. Uno de los primeros compuestos descubiertos fue el diioduro de dietilestaño, que fue estudiado por el químico inglés Edward Frankland en el año de 1849.

En este estudio se pretende analizar compuestos orgánicos fluorescentes de estaño, debido a que son compuestos que recientemente se diseñaron y sintetizaron, y de los cuales no se conoce alguna aplicación en el área biológica. Un atractivo más de estos compuestos es que son sintetizados de una manera muy sencilla y pudieran resultar en una buena alternativa como fluorocromos para experimentos del área biomédica.

### ***Luminiscencia***

La luminiscencia es un fenómeno de emisión de fotones (ultravioleta, visible o infrarrojo) provenientes de un material excitado electrónicamente. La palabra luminiscencia proviene del latín (*lumen* = luz) y fue utilizada por primera ocasión por el físico alemán Eilhard Wiedemann en el año de 1888 para describir todos los fenómenos de la luz que no están condicionados únicamente por el aumento de la temperatura. Las principales causas de este fenómeno son las reacciones químicas, la energía eléctrica, movimientos de los

electrones o el esfuerzo mecánico en un cristal. Es fundamental aclarar que la luminiscencia se distingue de la incandescencia en que en este último, la luz emitida por una sustancia es resultado de su calentamiento, debido a esto, a la luminiscencia se le conoce como “luz fría”.

En la tabla 1 se puede observar que existen varias clases de luminiscencia dependiendo del modo excitación:

**Tabla 1.- Tipos de luminiscencia [3]**

<b>Fenómeno</b>	<b>Modo de excitación</b>
<b>Fotoluminiscencia (fluorescencia, fosforescencia, fluorescencia retardada)</b>	Absorción de luz (fotones)
<b>Radioluminiscencia</b>	Radiación ionizante (Rayos-X, $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )
<b>Catodoluminiscencia</b>	Rayos catódicos (haz de electrones)
<b>Electroluminiscencia</b>	Campo eléctrico
<b>Termoluminiscencia</b>	Emisión de una energía previamente absorbida como resultado de un estímulo térmico
<b>Quimioluminiscencia</b>	Proceso químico (ejemplo: oxidación)
<b>Bioluminiscencia</b>	Proceso bioquímico
<b>Triboluminiscencia</b>	Fuerzas electroestáticas y de fricción
<b>Sonoluminiscencia</b>	Ultrasonido

La distinción entre fluorescencia y fosforescencia fue explicada en el siglo XIX con base experimental: se determinó que la fluorescencia era la emisión de luz que desaparece al mismo tiempo en que termina la excitación, mientras que en la fosforescencia la luz es emitida incluso después de que se termina la fuente de excitación.

Una vez que una molécula es excitada debido a la absorción de un fotón, esta puede regresar a su estado basal con emisión de fluorescencia, sin embargo, también son posibles muchas otras formas de la pérdida de excitación, como conversión interna (regreso al estado basal sin emisión de fluorescencia), transferencia de carga intermolecular, cambio conformacional, transferencia de protones y transferencia de electrones [3].



### ***Fluorescencia***

La importancia del estudio de la fluorescencia como herramienta para la investigación de la materia u organismos vivos surge debido a la información espacial y temporal que puede proporcionar debido a que la fluorescencia de las moléculas puede ser afectada por parámetros como el pH, la temperatura, la presión, la viscosidad, la polaridad, el potencial eléctrico, etc [3]. Debido a esta característica en la actualidad se utilizan en sondas para investigaciones en sistemas fisicoquímicos, bioquímicos y biológicos. La información que se puede obtener a partir de estas sondas en el área de membranas biológicas incluye su fluidez, interacciones lípidos-proteínas, cambios estructurales, difusión traslacional, ubicación de proteínas y organización dinámica y lateral, en el área de proteínas se pueden conocer datos tan importantes como lo son sitios de unión, desnaturalización, dinámica, distancias, entre otras.

### ***Fluoróforo***

Un fluorocromo o fluoróforo es un grupo funcional en una molécula que ocasiona que ésta sea fluorescente. Este grupo funcional de la molécula absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir a otra longitud de onda determinada de menor energía, es decir, de mayor longitud de onda. La cantidad de energía que emite y su longitud de onda dependen del fluorocromo, así como del ambiente químico en el que se encuentre.

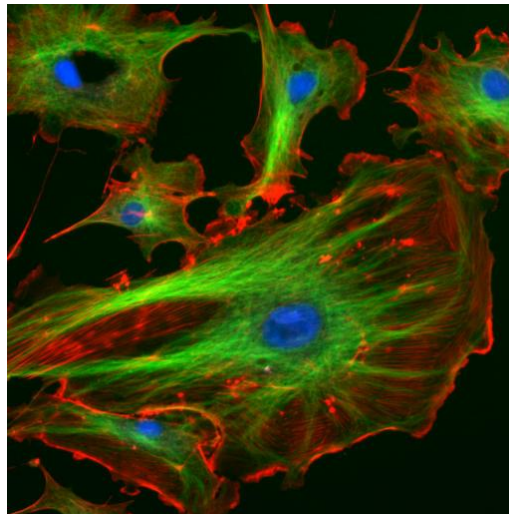
Los fluoróforos se pueden dividir en general en dos grandes grupos: intrínsecos y extrínsecos. Los fluoróforos intrínsecos son aquellos que fluorescen de manera natural. Estos incluyen aminoácidos aromáticos, flavinas, derivados del piridoxil y la clorofila. Los fluoróforos extrínsecos son añadidos a la muestra para otorgarle fluorescencia cuando ésta no la tiene. En estos se incluyen los dansilos, la fluoresceína, rodamina, entre otras [3].

En ocasiones estas moléculas se utilizan solas, como colorantes para marcar ciertas estructuras, como sustratos de enzimas, o como sondas o indicadores (cuando su

fluorescencia es afectada por su ambiente como polaridad, concentración de iones, entre otros).

***Microscopía de fluorescencia.***

La microscopía de fluorescencia es una herramienta esencial para la investigación biológica en la actualidad, especialmente en biología celular y molecular. Es un campo en continuo crecimiento y cada vez se dan a conocer más fluoróforos [4] y más proteínas fluorescentes se ponen a disposición como marcadores [5-7]. El microscopio de fluorescencia permite irradiar una muestra con una longitud de onda deseada y específica, y después obtener y separar la fluorescencia de mucha menor energía emitida por la muestra. Con esta técnica se pueden obtener imágenes como la que se muestra a continuación:



**Figura 1.-** Células epiteliales teñidas con DAPI (en azul) y dos anticuerpos (verde y rojo) mediante la técnica de inmunofluorescencia.

## Antecedentes

Alrededor del año 1986 los compuestos de organoestaño tuvieron gran auge debido a su rápida expansión de uso y aplicaciones potenciales, debido a esto se comenzaron a estudiar sus efectos en el medio ambiente y en la salud.

Anteriormente, a mediados del siglo XIX fue cuando se comenzó a explotar las aplicaciones de los compuestos de organoestaño como estabilizadores de aceites para transformadores eléctricos (también conocidos como aceites aislantes) y plásticos de vinilo. Debido a una gran cantidad de investigaciones en la materia, realizadas durante los cien años posteriores, los usos comerciales de los compuestos de organoestaño se expandieron rápidamente durante las últimas cuatro décadas del siglo XX. En la actualidad existen tres áreas principales para la utilización de estos compuestos, estabilizadores de calor, agentes catalíticos y biocidas para la agricultura e industria [8].

Debido a que se ha encontrado que los compuestos de organoestaño son efectivos en el control de hongos y bacterias, estos compuestos se han utilizado como preservadores de madera, telas, papel, cuero, equipo eléctrico, electrónico y vidrio. La mayoría de los compuestos de organoestaño biológicamente activos tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antipolillas. En esta área compiten contra muchos otros compuestos con los cuales la principal desventaja de los compuestos de organoestaño es su costo, pero sus principales ventajas es que son incoloros y su ausencia en tinción [9].

En el año de 1976, Kimbrough realizó una revisión de los estudios que existían hasta la fecha sobre la toxicidad y efectos en la salud de algunos compuestos organoestánnicos. Él encontró que muchos de los síntomas producidos por algunos de estos compuestos eran similares en animales y humanos. Debido a que estos compuestos son insolubles, presentan una pobre absorción y, en promedio, son moderadamente tóxicos a dosis pequeñas [10].

En el año 2000 Mazaahir Kidwai *et al.* encontraron una forma novedosa y sencilla de sintetizar compuestos orgánicos de estaño utilizando recipientes abiertos y radiación de

microondas. Ellos lograron disminuir el tiempo de reacción requerido para que se lleven a cabo las reacciones, de horas a segundos, comparados con el método de calentamiento convencional. Todos los compuestos que lograron sintetizar mostraron actividad antimicóticas y antibacterianas [11].

Jiménez *et al*, recientemente han utilizado el método de síntesis mediante la radiación de microondas para realizar la síntesis de nuevos compuestos orgánicos de estaño. Este nuevo método de síntesis, a comparación de los métodos de síntesis tradicionales, tiene las ventajas siguientes: utilización de una menor cantidad de disolvente para obtener los compuestos, un menor tiempo de reacción (pasando de 48 horas mediante síntesis tradicional a 12 minutos utilizando microondas) y un mayor rendimiento (comunicación personal Dr. Víctor Jiménez).

Este grupo de investigación se encuentra interesado en estudiar estos compuestos en el área biomédica debido a que en diversas investigaciones se ha encontrado que los compuestos orgánicos de estaño tienen un gran potencial como marcadores fluorescentes para células y posiblemente tejidos. Además, existe la posibilidad de que puedan presentar efectos antitumorales, con lo cual se podrían convertir en agentes terapéuticos [12].

## **Hipótesis**

Los compuestos orgánicos de estaño funcionan como marcadores fluorescentes en cultivos de células.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

- Determinar la funcionalidad de compuestos orgánicos de estaño como marcadores fluorescentes *in vitro*.

### ***Objetivos particulares***

- Seleccionar los compuestos organoestánicos que funcionen como fluoróforos en células en cultivo.
- Realizar estudios de dosis-respuesta de los compuestos fluorescentes en células de melanoma murino.
- Determinar los efectos de los compuestos fluorescentes sobre células de melanoma murino.

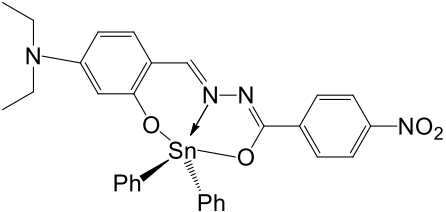
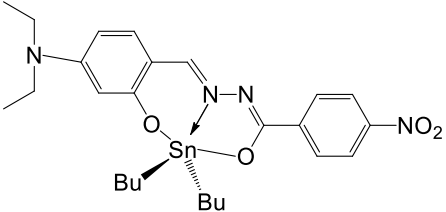
## Materiales y Métodos

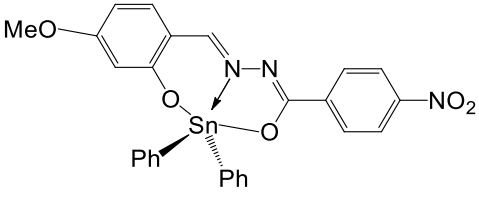
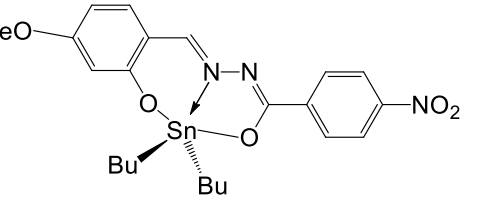
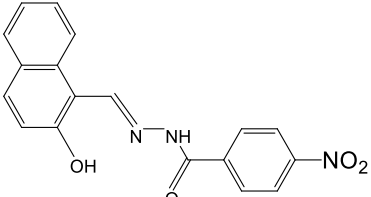
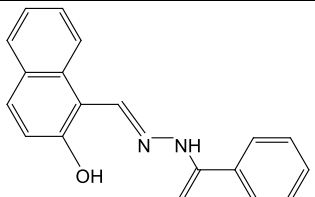
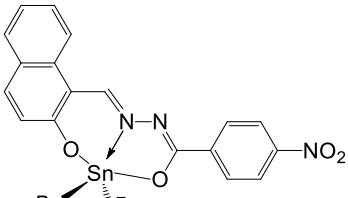
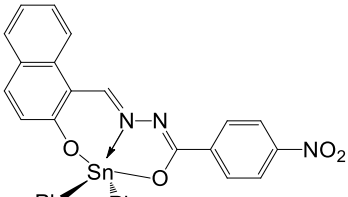
### Materiales

#### Compuestos Organoestánnicos

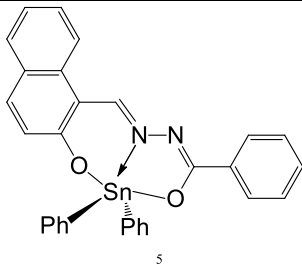
Los compuestos organoestánnicos que se utilizaron para la realización de este estudio fueron diseñados, sintetizados y proporcionados por el Dr. Víctor Jiménez de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las condiciones en las que se estudió la fluorescencia por primera vez en estos compuestos con el grupo de investigación del Dr. Jiménez fue en estado sólido y posteriormente realizando soluciones con cloroformo. La primer pregunta que surgió fue si estos compuestos presentarían fluorescencia en otras condiciones, específicamente utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como disolvente de los compuestos organoestánnicos y utilizando un ambiente donde las células de melanoma murino sean capaces de crecer. A cada uno de estos compuestos se les observó la cantidad y patrón de fluorescencia emitida después de haber sido incubados con células de melanoma murino. Los compuestos de interés se muestran en la tabla 2:

**Tabla 2.-** Compuestos orgánicos de estaño utilizados.

N° Compuesto	Estructura	Nombre
1		(E)-N'-(4-(diethylamino)-2-hydroxysalicylidine)-4-nitrobenzohydrazinato diphenyl-tin (IV)
2		1.3.4.(E)-N'-(4-(diethylamino)-2-hydroxysalicylidine)-4-nitrobenzoylhydrazinato-n-dibutyl-tin (IV)

3		(E)-N'-(4-(methoxy)-2-hydroxysalicylidine)-4-nitrobenzoylhydrazinato-diphenyl-tin (IV)
4		(E)-N'-(4-(methoxy)-2-hydroxysalicylidine)-4-nitrobenzoylhydrazinato-n-di-butyltin (IV)
5		N'-(2-hydroxy-naphthylidene)-4-nitrobenzoylhydrazide
6		N'-(2-hydroxy-naphthylidene)-4-nitrobenzoylhydrazide
7		N'-(naphthylidene)-4-nitrobenzoylhydrazinato-n-di-butyltin (IV)
8		N'-(naphthylidene)-4-nitrobenzoylhydrazinato-diphenyl-tin (IV)



9		<p>N'-( naphthylidene) benzoylhydrazinato- diphenyl-tin (IV)</p>
---	---	--

Es importante hacer la aclaración de que los compuestos 5 y 6 de la tabla 2 no son compuestos orgánicos de estaño, sin embargo, constituyen la base estructural para los compuestos 7, 8 y 9.

Se prepararon soluciones stock de los compuestos de organoestaño a mil partes por millón en Dimetil Sulfoxido (DMSO).

#### *Cultivo celular*

Para realizar los estudios *in vitro* se utilizó la línea celular de melanoma murino B16F10 (American Type Culture Collection -ATCC- número de catálogo ATCC® CRL-6475™). Se seleccionó esta línea celular debido a que el grupo de investigación ya ha trabajado con ella con anterioridad y se conocen las características y comportamiento del cultivo, pero principalmente, al ser singénica a una línea de ratón usada comúnmente en laboratorio, sería posible trasladar la investigación a un modelo *in vivo* a futuro.

#### *Medio de cultivo*

El medio de cultivo utilizado fue DMEM/F12 suplementado con 5% de suero fetal bovino y 1x antibiótico-antimicótico, todo adquirido de GIBCO Invitrogen Life Technologies.

### *Otros reactivos*

0.25% Tripsina-EDTA (1x), Antibiótico-Antimicótico (100x) adquiridos de GIBCO Invitrogen Life Technologies, Vectashield® medio de montaje para fluorescencia adicionado con DAPI proveniente de Vector Laboratories, Inc. Azul Alamar fue utilizado para el ensayo de viabilidad metabólica proveniente de Biosource Invitrogen Life Technologies.

### *Equipo utilizado*

Para la realización de los experimentos se utilizó el siguiente equipo:

- Incubadora para cultivo celular Thermo Electron Corporation modelo 3554.
- Campana de bioseguridad de flujo laminar Nuair modelo UN-425-400.
- Lector para placas ELISA marca Labsystems modelo Multiskan ELX800.
- Microscopio confocal modelo TCS SP5 de Leica.

### **Métodos**

#### *Cultivo celular.*

La línea celular B16F10 fue cultivada en cajas de 25 cm<sup>2</sup>, se utilizó DMEM/F12 como medio de cultivo adicionado con 5% de suero fetal bovino (FBS). Se realizó pase de células dos veces por semana y el cultivo se mantuvo a 37 °C en un ambiente de 5% CO<sub>2</sub> y 95% humedad.

Para manipular las células, tanto el medio de cultivo como la tripsina se calentaron a 37°C. Después se procedió a revisar las placas de cultivo en un microscopio y en el momento que se encontró una confluencia mayor del 80% se procedió con el pase de células, esto para asegurarnos de contar con suficientes células al momento de trabajar.

Se retiró el medio de cultivo de la botella y se agregó 1 ml de Tripsina (a la botella de 25 cm<sup>2</sup>), asegurándonos de que la tripsina cubriera totalmente el piso de la placa, en caso de

ser necesario, en ocasiones fue necesario dar unos pequeños golpes a la placa para ayudar en el proceso de desprendimiento de células. Una vez que las células se despegaron de la placa se procedió a inactivar la tripsina con tres volúmenes de medio (3 ml) y se agitó con la pipeta subiendo y bajando el medio de forma enérgica, esto para separar algún cumulo de células que se pudieran encontrar en el cultivo.

Se agregaron 8 ml de medio en una botella vacía y posteriormente se añadieron de 3 a 5 gotas del cultivo disgregado (dependiendo de la densidad de células que se encuentran en éste). Se agitó suavemente antes de acostar la placa asegurándose que el cultivo cubrió por completo el piso. Finalmente se guardó en la incubadora a 37°C. Como se describe a continuación, del cultivo restante se procedió a realizar conteo de las células para su posterior utilización en los experimentos.

#### *Identificación de los compuestos que inducen una mejor fluorescencia.*

Para la selección de los compuestos que presentaron una mejor fluorescencia *in vitro* lo primero que se realizó fue un cultivo celular, de ese cultivo se llevó a cabo un conteo de células utilizando una cámara de Neubauer y se preparó una suspensión con 100,000 células por mililitro. Se procedió a colocar un portaobjetos estéril en los pocillos de una placa de 12 pozos para posteriormente sembrar 1 ml de las células encima de estos y el experimento se realizó de la siguiente manera:

- 1 pozo para células sin tratamiento (Control).
- 1 pozo para células solo con DMSO (Control).
- Cada uno de los compuestos se colocó en un pozo a una concentración de 10 µg/ml.

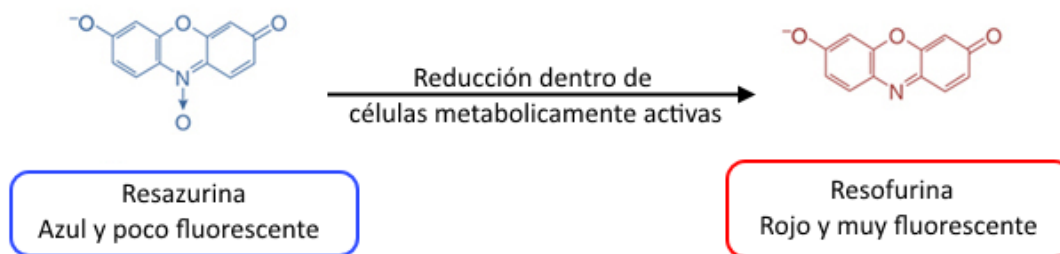
Una vez obtenidas las células con los compuestos en la caja de pocillos, se incubaron por 2 horas a 37°C en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se procedió a realizar un lavado con PBS a temperatura ambiente y los cubreobjetos con las células se montaron con Vectashield® adicionado con DAPI en un portaobjetos para ser analizados en el microscopio

Confocal. Se seleccionaron los compuestos que presentaron una mejor tinción en las células en cultivo. Cada experimento se realizó por duplicado y se repitió tres veces.

Cada uno de los compuestos utilizados fueron excitados a una longitud de onda de 458 nm y la lectura de las longitudes de onda de emisión fue de 478 a 612 nm, lo que corresponde a las longitudes de onda de absorción y de emisión de todos los compuestos orgánicos de estaño utilizados.

#### *Ensayo de viabilidad azul Alamar.*

El ensayo de viabilidad Azul Alamar es ampliamente utilizado para realizar mediciones de proliferación y citotoxicidad en varias líneas celulares humanas, animales, cepas de hongos y bacterias [13-16]. Este reactivo no tóxico y altamente permeable a la membrana plasmática aprovecha el ambiente reductor que se encuentra dentro de las células sanas para reducir el reactivo de color azul Resazurina a Resofurina, reactivo de color rojo. El cambio de coloración es directamente proporcional al número de células vivas. De esta manera se puede relacionar el cambio en la coloración del cultivo celular con la viabilidad y citotoxicidad de este.



**Figura 2.-** Reducción del reactivo azul alamar dentro de las células metabólicamente activas.

El procedimiento se comenzó realizando un cultivo de células en una placa de 96 pozos a una densidad de 10,000 células en 100  $\mu$ L de medio por pozo. Después de realizado el

sembrado de células se procedió a incubar las células por veinticuatro horas. Pasado ese tiempo se realizó un cambio del medio de cultivo y se procedió a agregar cada uno de los compuestos organoestánicos a distintas concentraciones. Se incubó nuevamente por veinticuatro horas adicionales y se añadió el reactivo azul alamar para incubar nuevamente por tres horas más. Al terminar este tiempo se midió el cambio de la coloración en cada uno de los pozos utilizando un espectrofotómetro en un lector de ELISA a longitudes de onda de 570 y 600 nm, los datos obtenidos fueron después analizados utilizando la computadora.

#### *Estudio dosis-respuesta.*

Con el objetivo de analizar hasta que concentraciones eran capaces de teñir a las células, se realizaron experimentos de dosis-respuesta. Para esto se sembraron en placas de 12 pozos 100,000 células por pozo de la línea B16F10 a las cuales se procedió a aplicarles las soluciones de los compuestos que presenten una mejor tinción a tres diferentes concentraciones (10, 1 y 0.1 µg/ml) y se incubaron por 2 horas a 37°C en una atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Al igual que en el experimento anterior, se procedió a realizar un lavado con PBS y los cultivos se montaron con Vectashield adicionado con DAPI en un portaobjetos para verlos bajo el microscopio confocal y de esta manera poder observar la cantidad de fluorescencia que emitieron.

#### *Análisis de datos obtenidos del ensayo de viabilidad Azul Alamar*

Con los resultados obtenidos de cada uno de los compuestos se procedió a ajustar los datos a un modelo no lineal utilizando la ecuación de Hill. La ecuación de Hill fue explicada por primera vez por Archivald Vivian Hill (1886-1977) en el año de 1910 para describir la relación de equilibrio que existe entre la cantidad de oxígeno y la saturación de la hemoglobina [17]. En el área de la farmacología, la ecuación de Hill ha sido ampliamente utilizada para analizar la relación que existe entre ligando y receptores [18].

La expresión básica de la ecuación o modelo de Hill es una ecuación de tres parámetros de una relación no lineal entre dos variables,  $x$  (la variable independiente) y  $y$  (la variable dependiente):

$$y = \frac{y_{max}x^n}{C^n + x^n}$$

**Ecuación 1.-** Ecuación descrita por A.V. Hill en el año de 1910.

Tomando un enfoque farmacodinámico, la ecuación de Hill se ha utilizado para describir la relación entre el efecto de una droga (en este caso toxicidad - $T$ -) y su concentración ( $C$ ). Se puede cambiar la ecuación 1, descrita con anterioridad sustituyendo las variables  $y$  y  $x$ , por  $T$  y  $C$ , respectivamente, y los parámetros  $C$  y  $y_{max}$ , por  $VC_{50}$  y  $T_{max}$ , de tal manera obtenemos la siguiente ecuación:

$$T = \frac{T_{max}C^n}{VC_{50}^n + C^n}$$

**Ecuación 2.-** Ecuación obtenida al sustituir los parámetros anteriormente descritos.

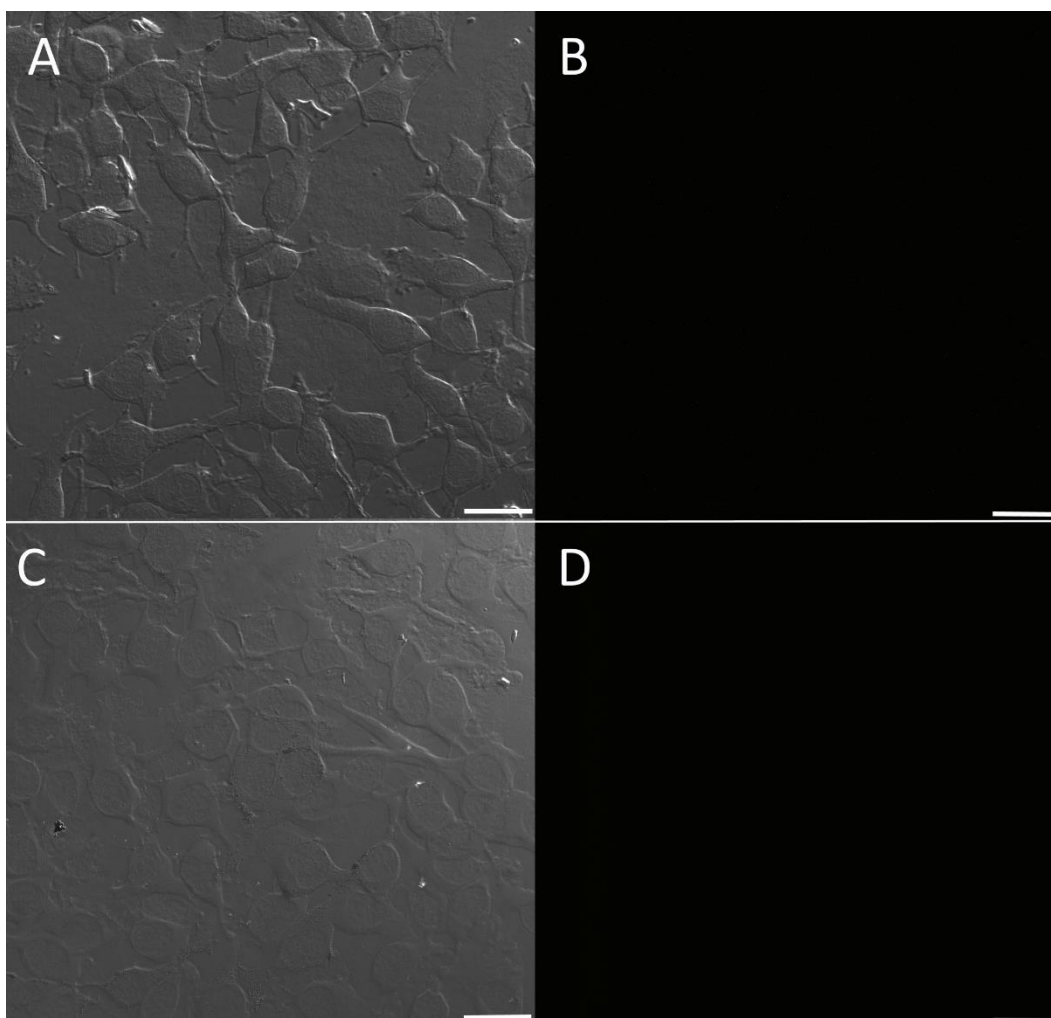
Donde  $T$  es el efecto (toxicidad) predicho de la droga,  $T_{max}$  es el efecto máximo de toxicidad,  $C$  es la concentración y  $VC_{50}$  es la concentración de la droga a la cual se obtiene el 50% del máximo efecto (en caso de que la droga mate todo el cultivo de células en las concentraciones utilizadas, este valor corresponde a la dosis letal 50) y  $n$  es el coeficiente sigmoideal de Hill. El coeficiente de Hill ( $n$ ) indica cuántas de las zonas de unión de sustrato de una enzima afectan a la afinidad de la unión del sustrato en el resto de las zonas de unión. El coeficiente de Hill puede tomar valores mayores o menores que 1:

- $n < 1$  : cooperatividad negativa
- $n = 1$  : no hay cooperatividad
- $n > 1$  : cooperatividad positiva

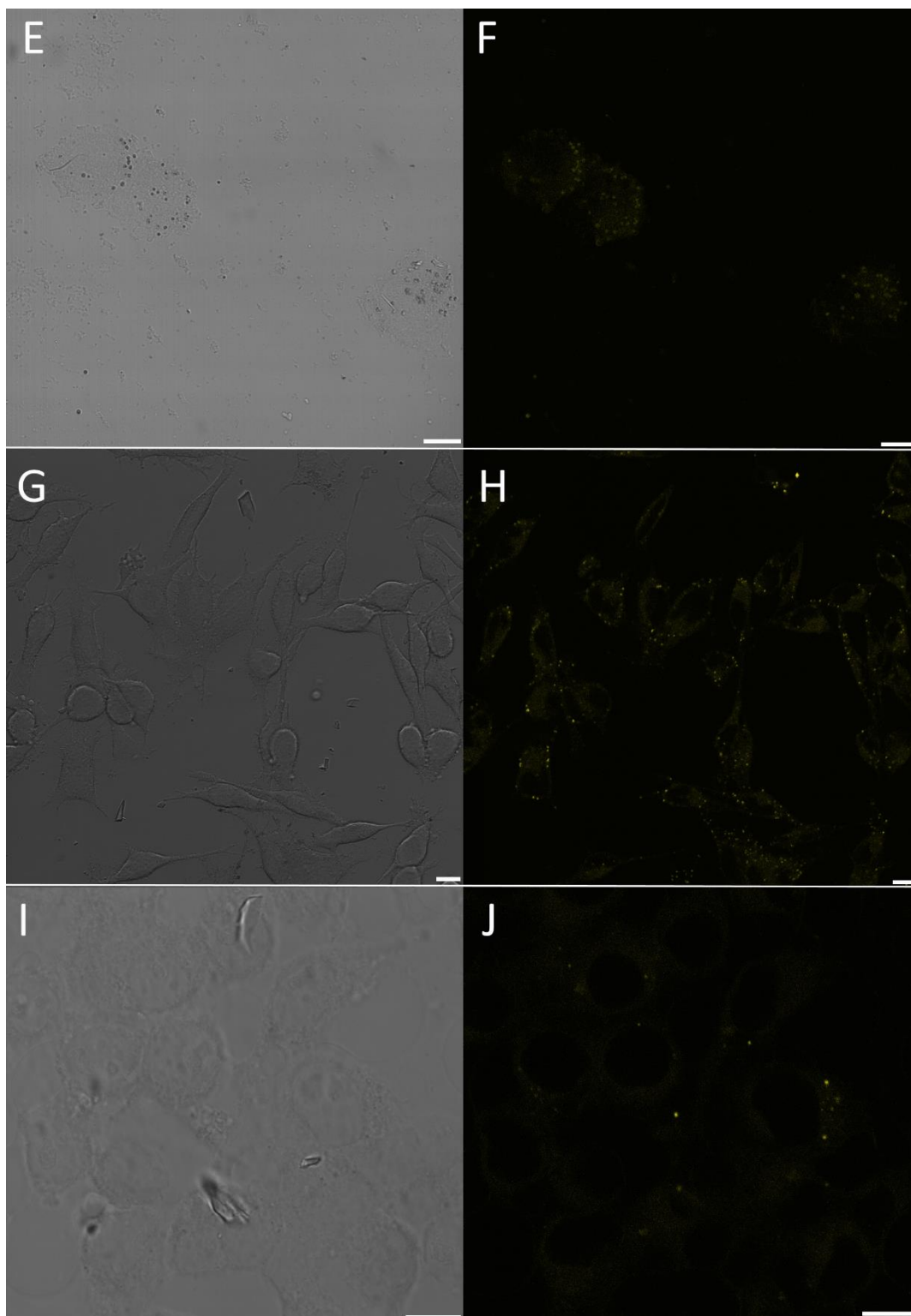
## Resultados

### *Selección de compuestos que se utilizarán como fluoróforos.*

Lo primero que se realizó fue la selección de los compuestos que presentan una mayor fluorescencia. Se tomaron imágenes de microscopía confocal a las células de melanoma murino tratadas con cada uno de los compuestos orgánicos de estaño a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 2 horas y también a los grupos control, sin tratamiento (ST) y el disolvente utilizado (dimetil sulfóxido, DMSO). Estos experimentos se realizaron por triplicado y las imágenes obtenidas se muestran a continuación:

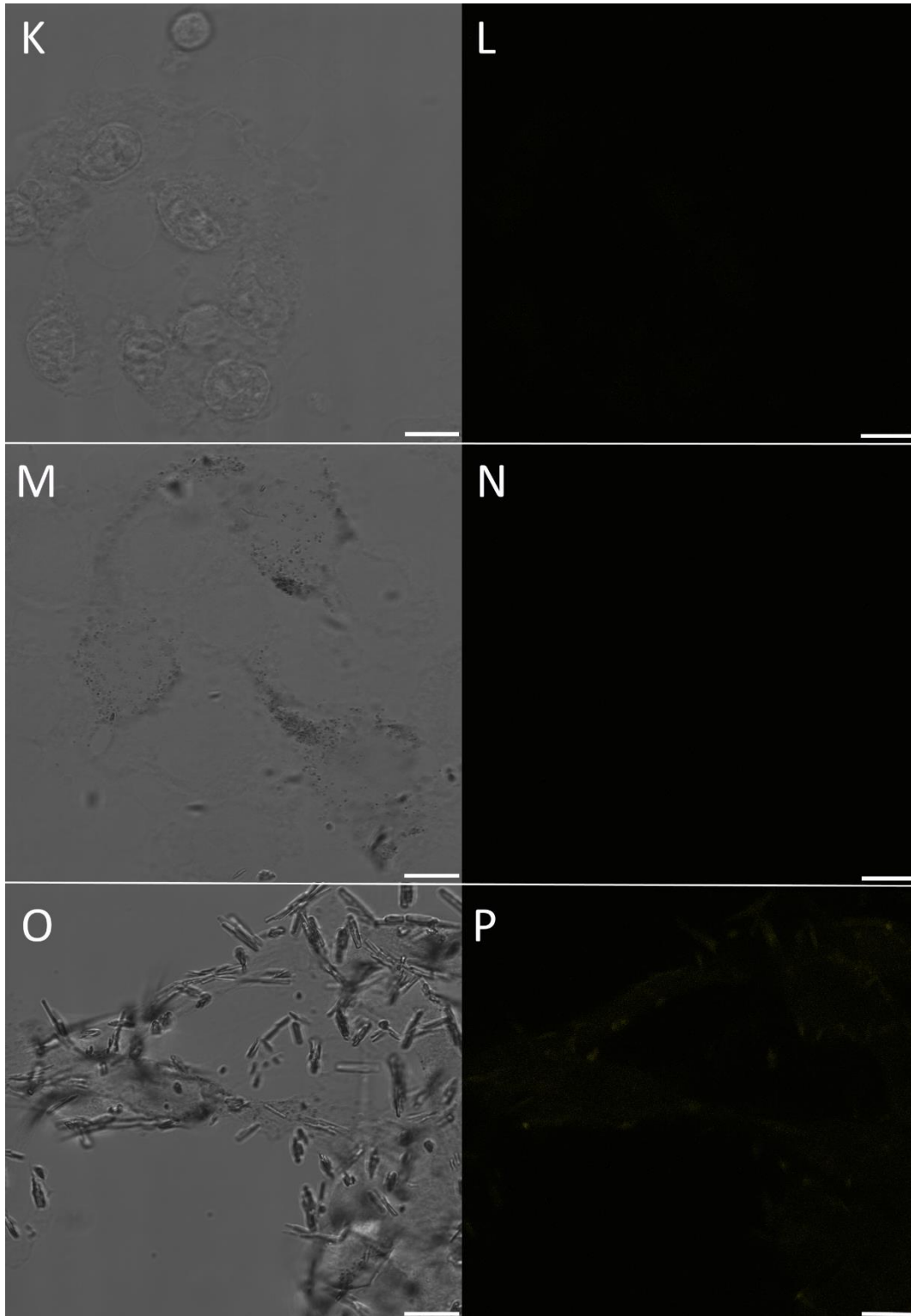


**Figura 3.-** Células B16F10 tratadas con A) y B) Sin tratamiento, C y D) DMSO. A y C) Imágenes a luz visible, B) y D) Imágenes de fluorescencia. Escala 25  $\mu\text{m}$ .

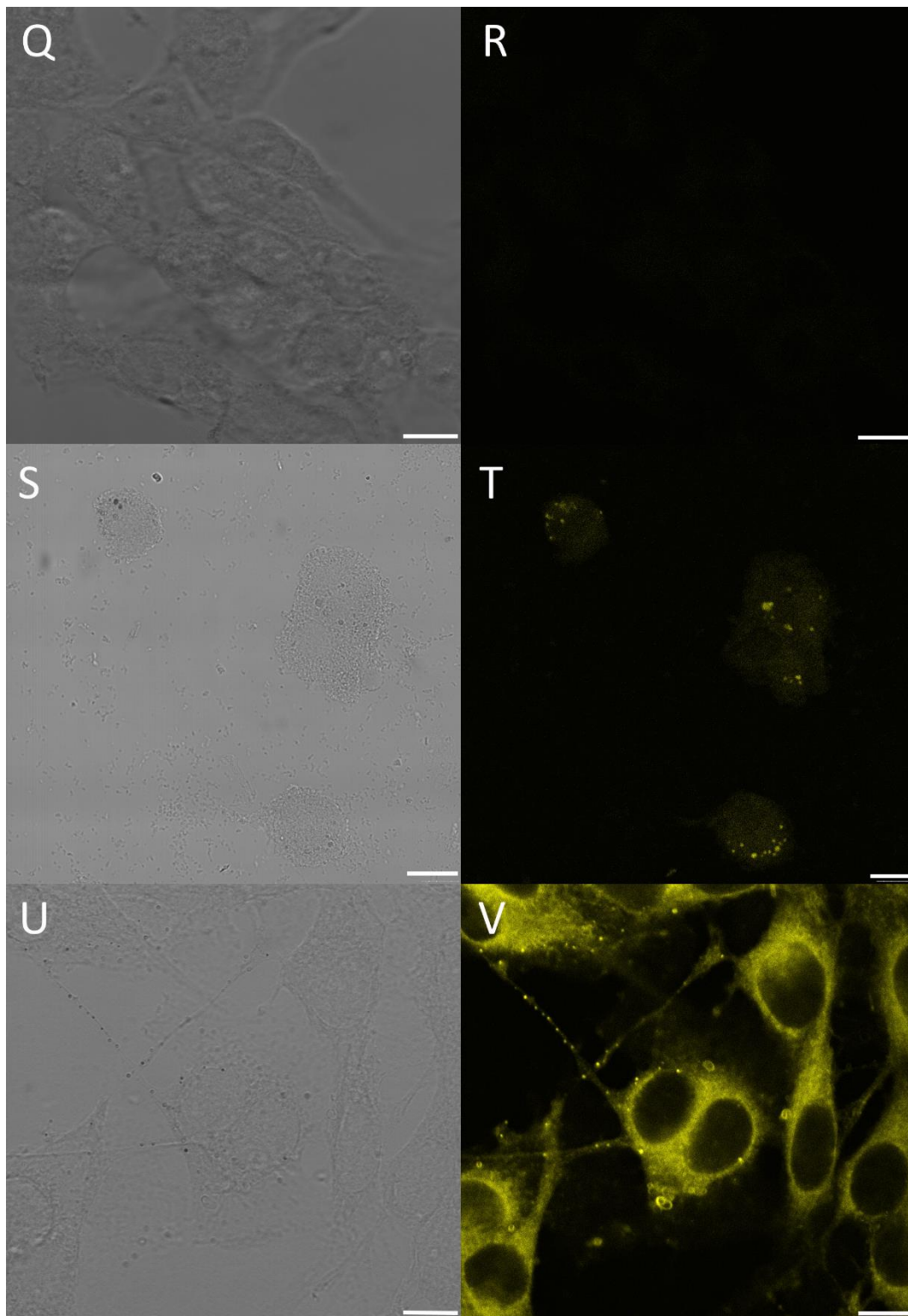


**Figura 3** (continuación).- Células B16F10 tratadas con E) y F) Compuesto 1, G) y H) Compuesto 2, I) y J) Compuesto 3. E), G) e I) Imágenes a luz visible, F), H) y J) Imágenes de fluorescencia. Escala 10  $\mu\text{m}$ .





**Figura 3** (continuación).- Células B16F10 tratadas con K) y L) Compuesto 4, M) y N) Compuesto 5, O) y P) Compuesto 6. K), M) e O) Imágenes a luz visible, L), N) y P) Imágenes de fluorescencia. Escala 10  $\mu$ m.



**Figura 3** (continuación).- Células B16F10 tratadas con Q) y R) Compuesto 7, S) y T) Compuesto 8, U) y V) Compuesto 9. Q), S) e U) Imágenes a luz visible, R), T) y V) Imágenes de fluorescencia. Escala 10  $\mu$ m.

En las imágenes mostradas anteriormente se puede apreciar que solo con algunos de los compuestos se produce tinción del cultivo celular. Sin embargo, la intensidad que se presenta con cada uno es distinta. Los compuestos que muestran una mejor tinción celular plasmática son los compuestos 2 y 9, siendo este último el que muestra la mayor fluorescencia. Cabe mencionar que además de tinción citoplasmática uniforme, se presenta una tinción localizada en forma de puntos o pequeños círculos con fluorescencia intensa con estos dos compuestos organoestánicos. En cada uno de las imágenes observadas se aprecia que los compuestos orgánicos de estaño no fueron capaces de entrar al núcleo y teñirlo.

En el caso particular del compuesto 6, se observó que se forman cristales poco fluorescentes alrededor de las células sin llegar a entrar a las mismas.

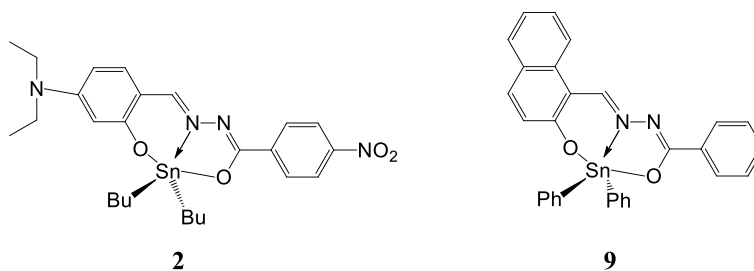
A continuación se muestra una tabla con un resumen resultados para cada uno de los compuestos organoestánicos:

**Tabla 3.-** Cantidad de fluorescencia observada en las células de melanoma murino tratándolas con compuestos organoestánicos fluorescentes.

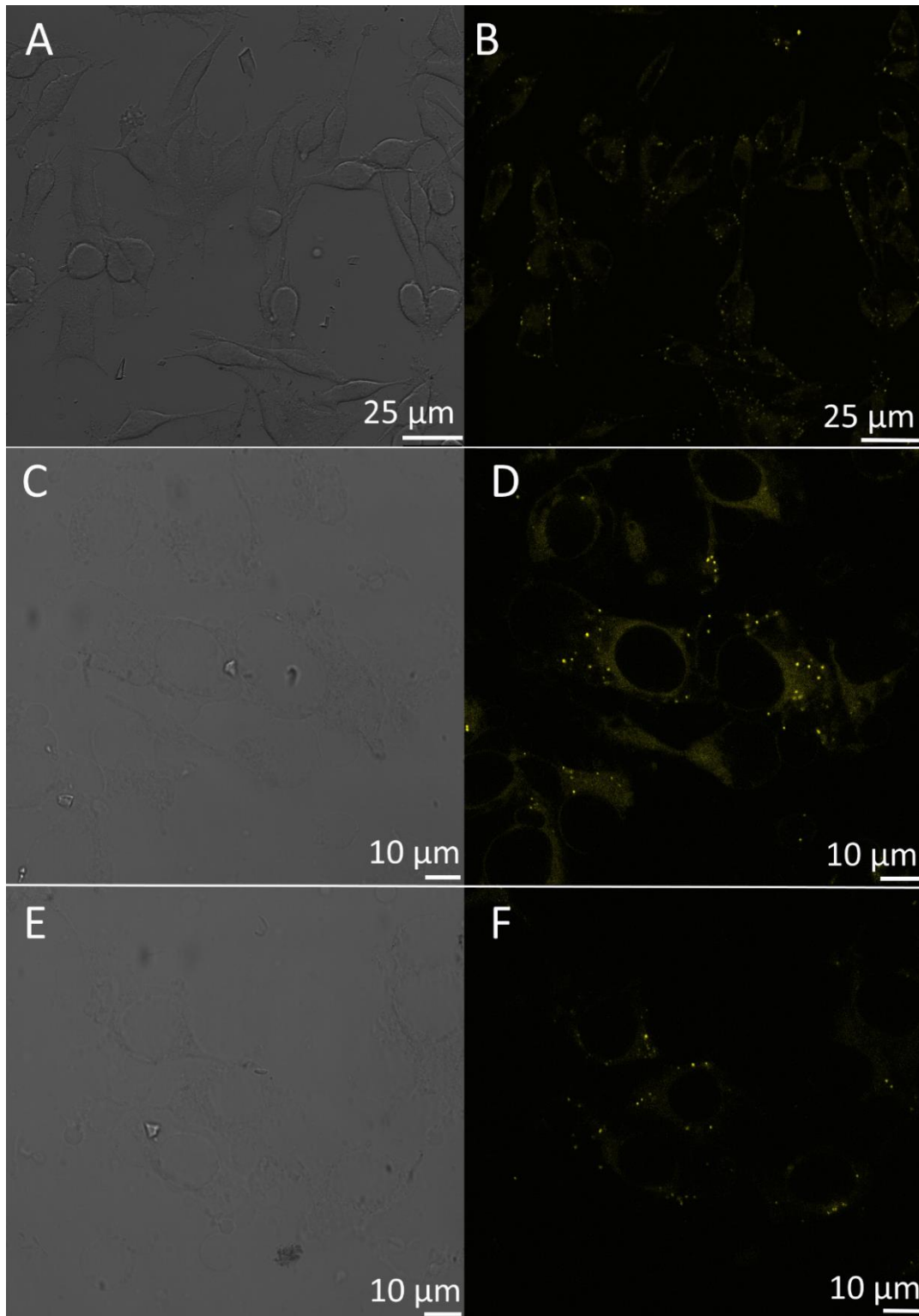
<b>Compuesto Organoestánico</b>	<b>Cantidad de tinción en cultivo celular</b>
<b>1</b>	Muy leve
<b>2</b>	Fuerte (citoplasmática y localizada)
<b>3</b>	Moderada
<b>4</b>	Muy leve
<b>5</b>	Ninguna
<b>6</b>	Ninguna
<b>7</b>	Poca
<b>8</b>	Moderada
<b>9</b>	Muy fuerte (citoplasmática y localizada)

**Estudio dosis-respuesta.**

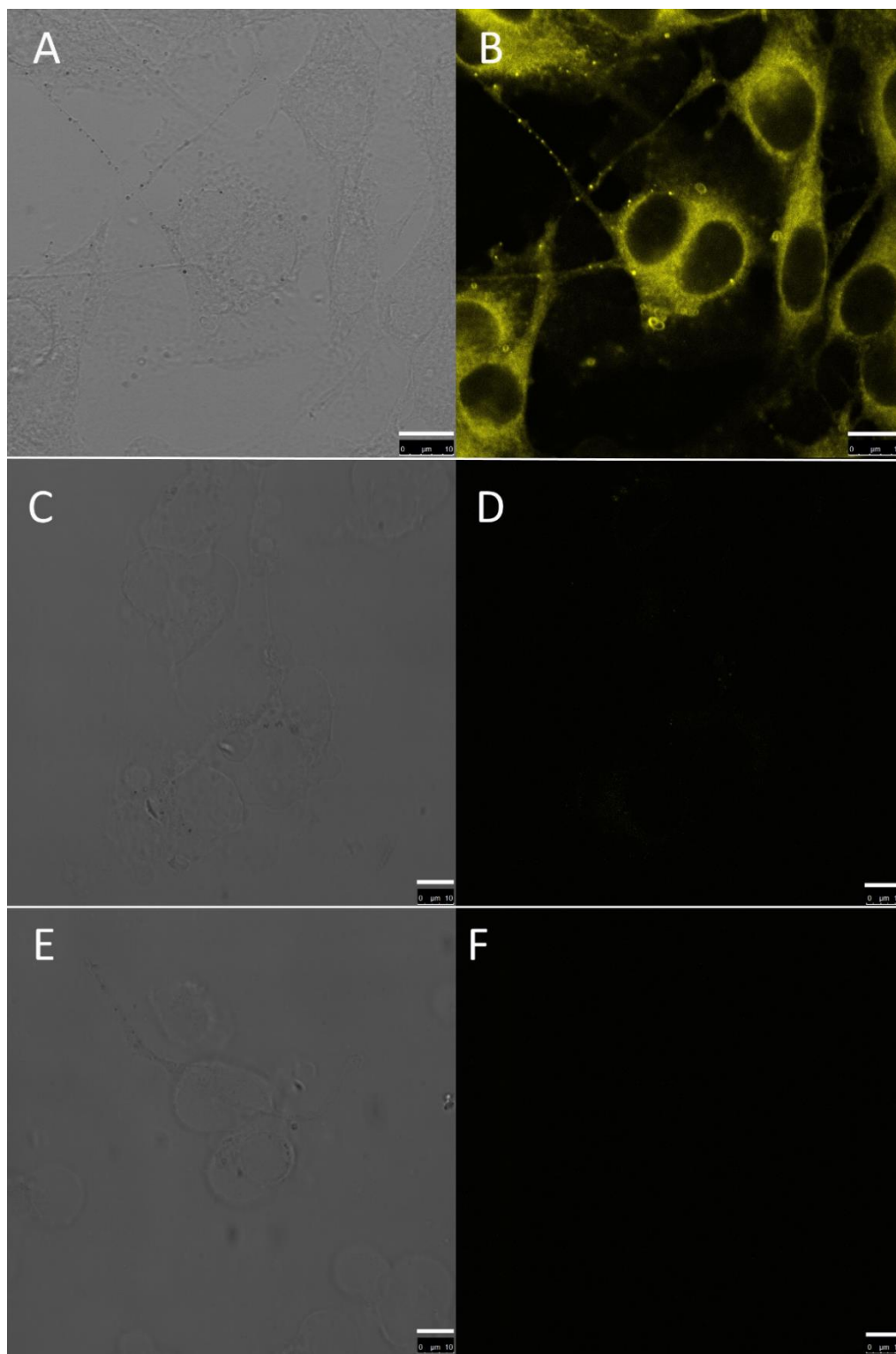
Se procedió a realizar el estudio de dosis-respuesta utilizando los compuestos organoestánicos seleccionados (2 y 9; figura 4) disminuyendo la concentración, utilizando 10, 1 y 0.1  $\mu\text{g/mL}$  durante 2 horas de incubación con las células. Las imágenes obtenidas con el compuesto 2 se muestran a continuación:



**Figura 4.-** Compuestos organoestánicos seleccionados.



**Figura 5.-** Células B16F10 tratadas con el compuesto 2 a distintas concentraciones A) y B) 10 µg/mL, C) y D) 1 µg/mL, E) y F) 0.1 µg/mL. A), D) y E) Imágenes a luz visible B), D) y F) Imágenes de fluorescencia.



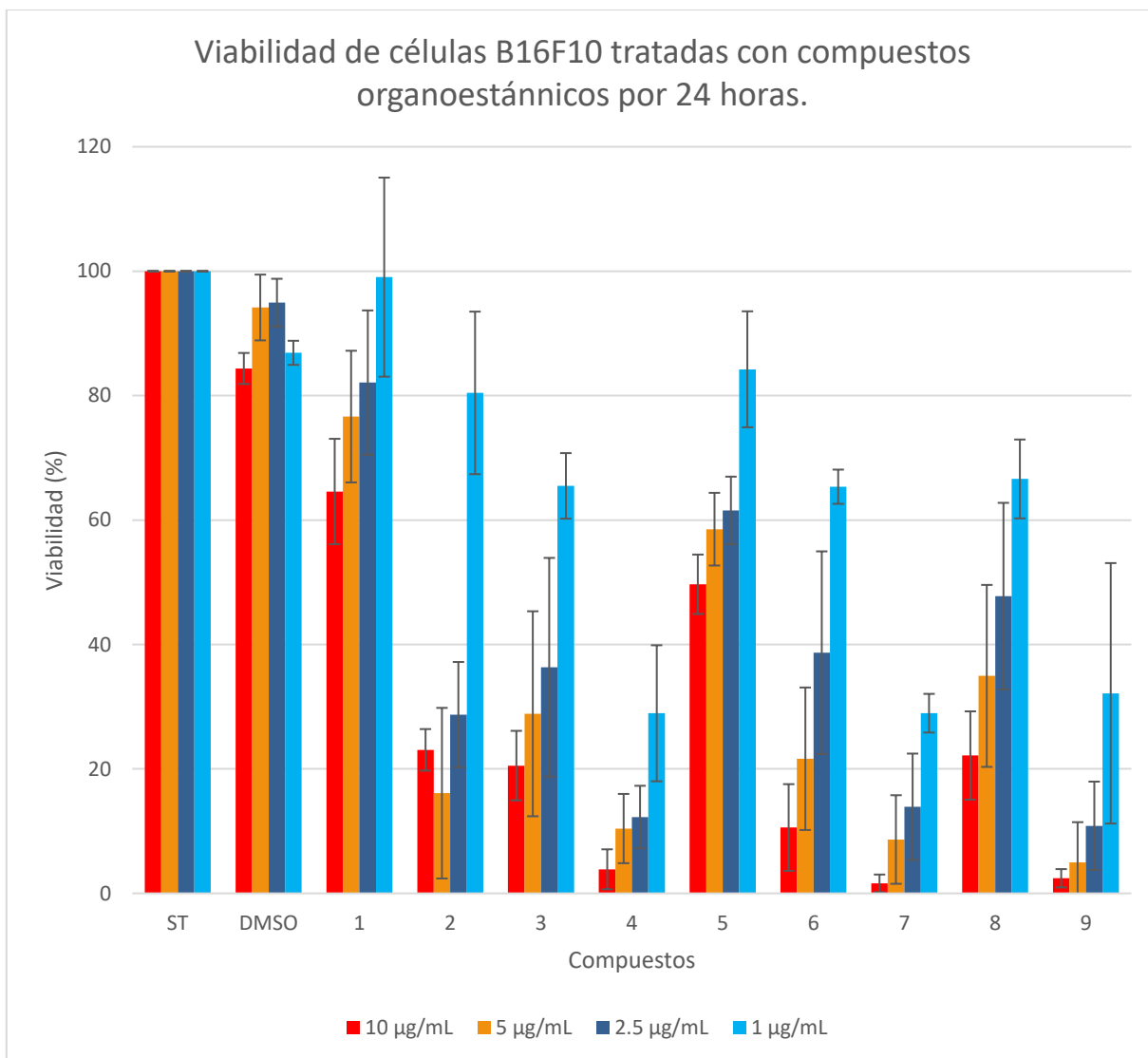
**Figura 6.**-Células B16F10 tratadas con el compuesto 9 a distintas concentraciones A) y B) 10  $\mu\text{g/mL}$ , zoom 3x. C) y D) 1  $\mu\text{g/mL}$ , E) y F) 0.1  $\mu\text{g/mL}$ . A), D) y E) Imágenes a luz visible B), D) y F) Imágenes de fluorescencia. Escala 10  $\mu\text{m}$ .

En las imágenes del compuesto 2 se puede apreciar que la fluorescencia va disminuyendo a medida que la concentración también disminuye, a pesar de que la tinción en la concentración más baja (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) es poca, se observa que la fluorescencia es más localizada en los círculos. Esto nos dice que aunque la concentración se haya disminuido 2 órdenes de magnitud aún hay fluorescencia en el cultivo celular y ésta se encuentra más localizada que en cuando se utiliza a concentraciones mayores.

Por el contrario, a pesar de que el compuesto 9 es el que muestra una mayor fluorescencia en la concentración más alta utilizada, al disminuir la concentración a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o menos, las células ya no muestran ninguna tinción.

#### ***Efecto de los compuestos organoestánicos sobre la proliferación de las células B16F10***

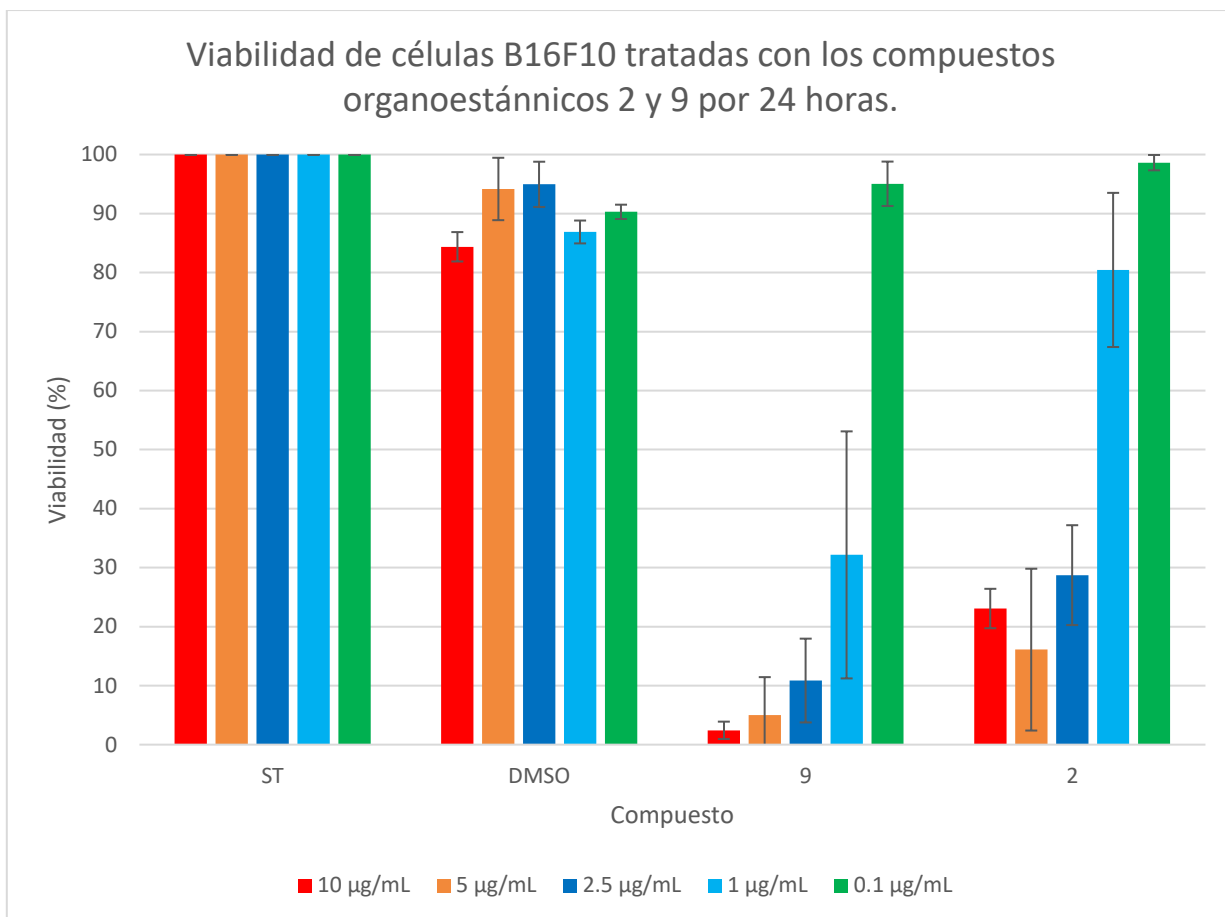
En la gráfica 1 se muestran los efectos de la viabilidad de la línea celular B16F10 cuando se le aplican a distintas concentraciones (10, 5, 2.5 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) cada uno de los compuestos orgánicos de estaño por un periodo de 24 horas. Se puede apreciar que los compuestos menos tóxicos para las células son el compuesto 1 y 5. Sin embargo, los compuestos que fueron seleccionados por su mayor fluorescencia en cultivo presentan alta toxicidad en las concentraciones más altas. También se puede observar que la toxicidad observada en el cultivo de células es dependiente de la concentración en cada uno de los compuestos organoestánicos.



**Grafica 1.-** Efecto de los compuestos orgánicos de estaño a distintas concentraciones en las células de melanoma murino. Normalizado al control sin tratamiento (ST), las barras de error muestran  $\pm$  desviación estándar.

Debido a que los compuestos 2 y 9 fueron los seleccionados por ser los que mejor marcaban a las células en cultivo se decidió realizar otro ensayo de viabilidad pero a una concentración más baja (0.1 µg/mL). Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 2.





**Grafica 2.-** Efecto en la viabilidad de las células B16F10 debido a tratamiento con los compuestos organoestánicos 2 y 9. Normalizado al control sin tratamiento (ST), las barras de error muestran  $\pm$  desviación estándar.

Se puede observar que en ambos casos la viabilidad de la línea celular aumenta a más del 95 % cuando la concentración baja a 0.1 µg/mL.

**Análisis de datos.**

Al realizar un ajuste usando un modelo no lineal, se requiere minimizar la suma de los cuadrados de los residuos. Esta minimización produce lo que se conoce como un ajuste de mínimos cuadrados, en donde es necesario medir que tan efectivo es. Una medida para conocer la efectividad es lo que se conoce como coeficiente de determinación ( $R^2$ ) [19]. Éste valor estadístico define qué tan cercanos son los valores que se obtienen de una medición

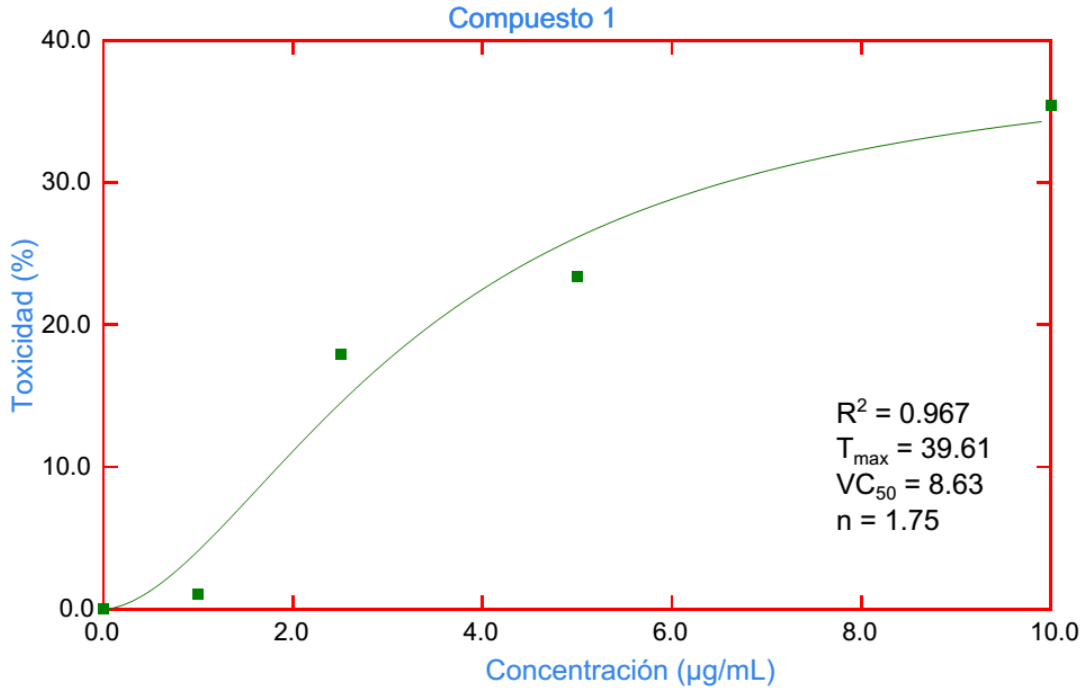
con respecto a una señal ideal, y se calcula utilizando la varianza residual de un modelo de ajuste [20]:

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{resid}}{SS_{total}}$$

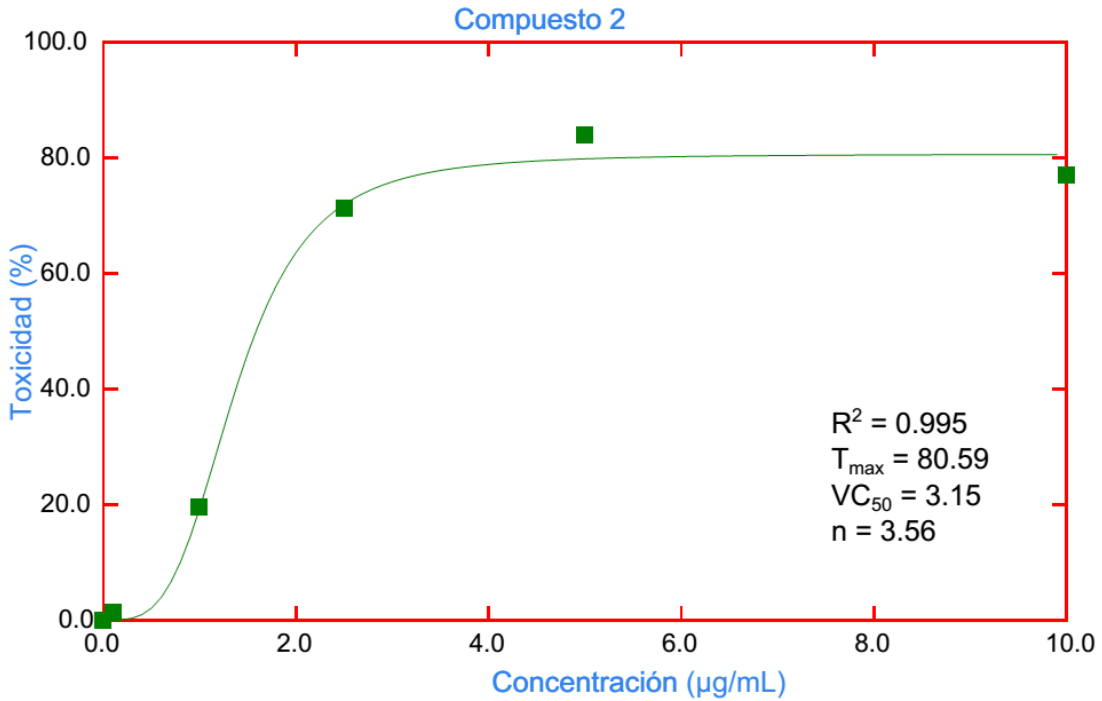
**Ecuación 3.-** Coeficiente de determinación.

En donde **SS<sub>resid</sub>** es la suma de los cuadrados residuales de la regresión y **SS<sub>total</sub>** es la suma de las diferencias de los cuadrados de la media de la variable dependiente (suma total de los cuadrados). Ambos valores son escalares positivos. Por lo tanto, la eficacia está en función del error (diferencia entre la señal ideal y la señal medida), siendo un valor altamente eficaz cuando el coeficiente de determinación es muy grande, es decir, muy cercano a 1 [20].

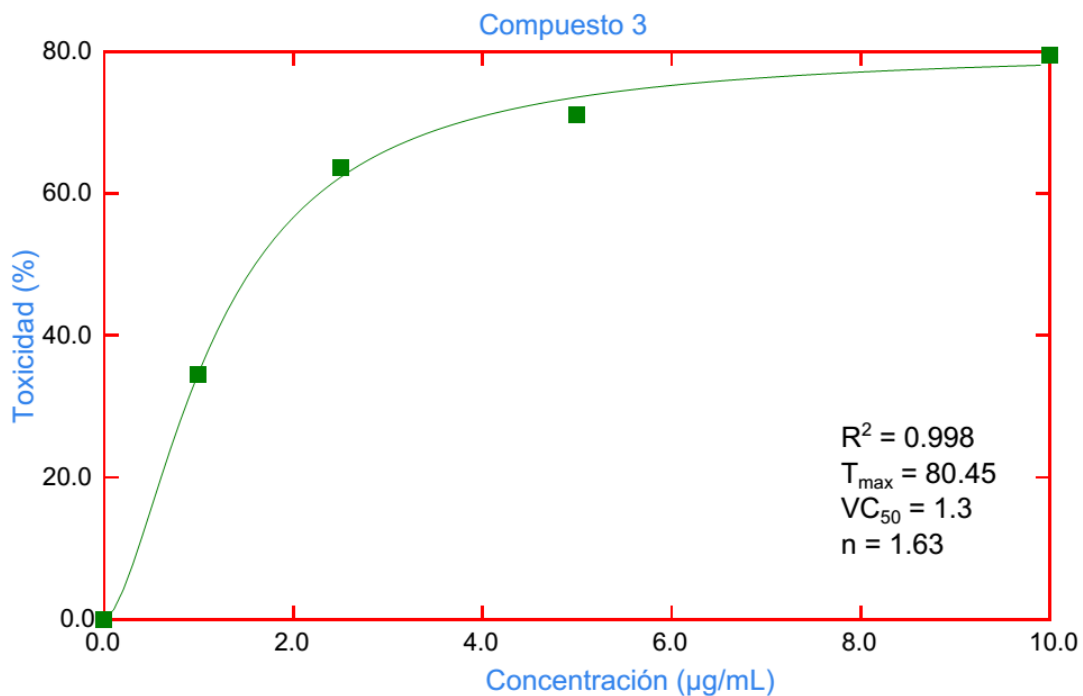
Después de desarrollar el análisis estadístico se concluyó que los datos se ajustan con bastante fidelidad a una ecuación de Hill, obteniendo coeficientes de determinación muy cercanos a 1 para cada uno de los casos. Las gráficas obtenidas al realizar el ajuste para cada uno de los compuestos organoestánicos son las siguientes:



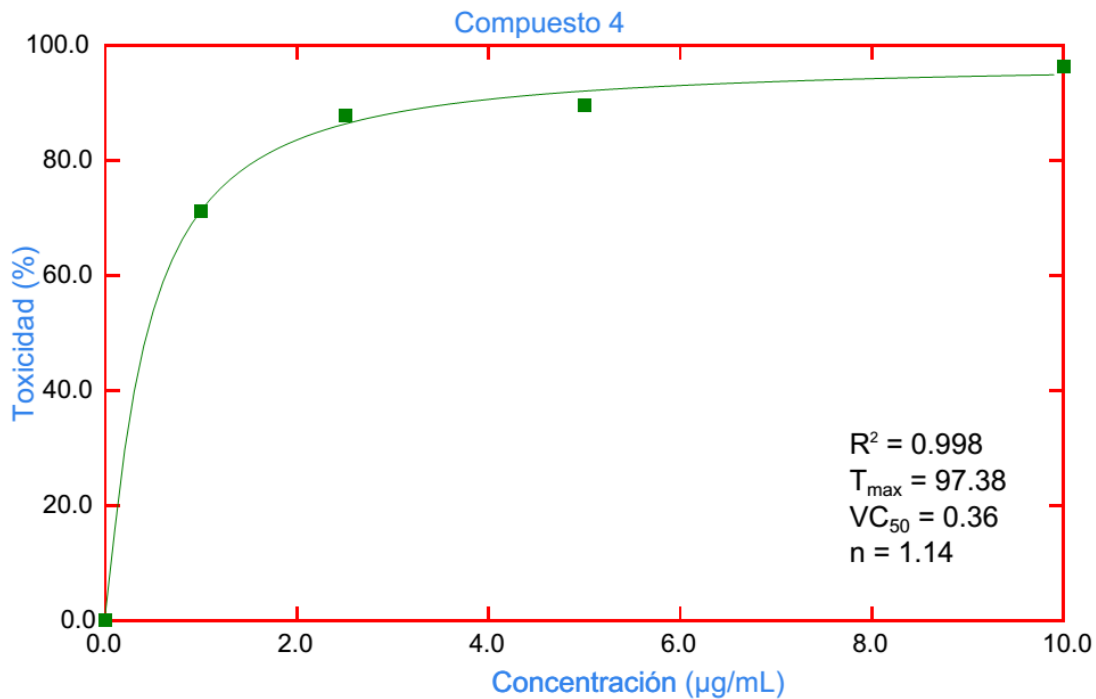
**Grafica 3.-** Ajuste realizado con los datos obtenidos de la viabilidad de las células B16F10 tratadas con el compuesto 1.



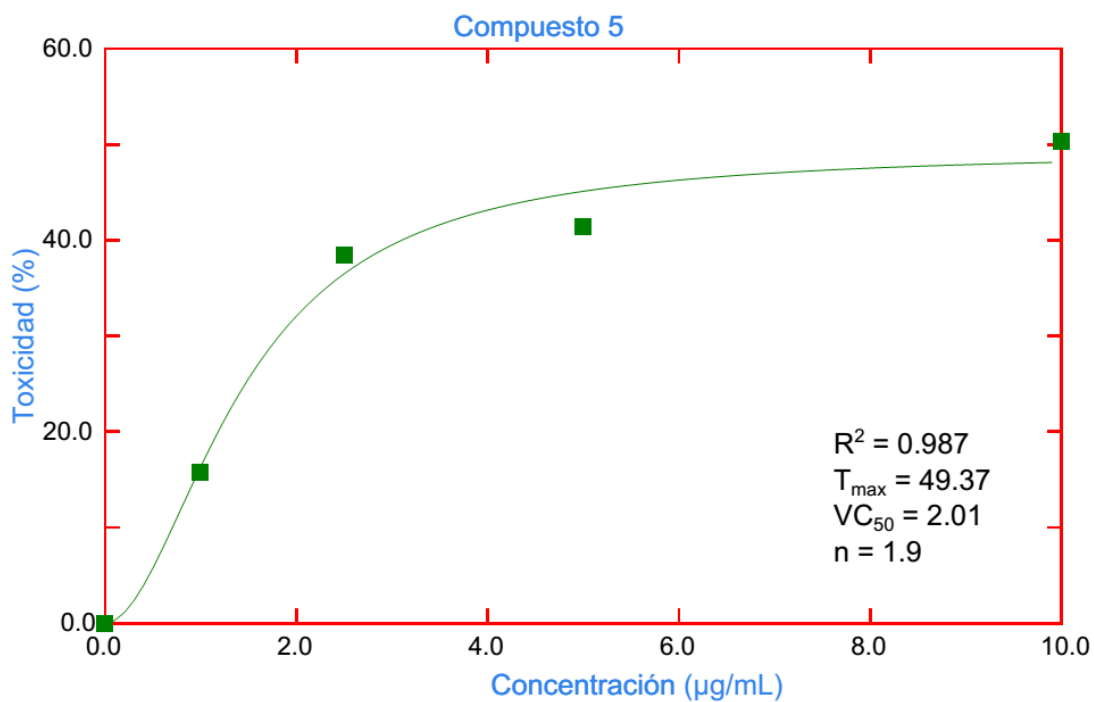
**Grafica 4.-** Ajuste realizado con los datos obtenidos de la viabilidad de las células B16F10 tratadas con el compuesto 2.



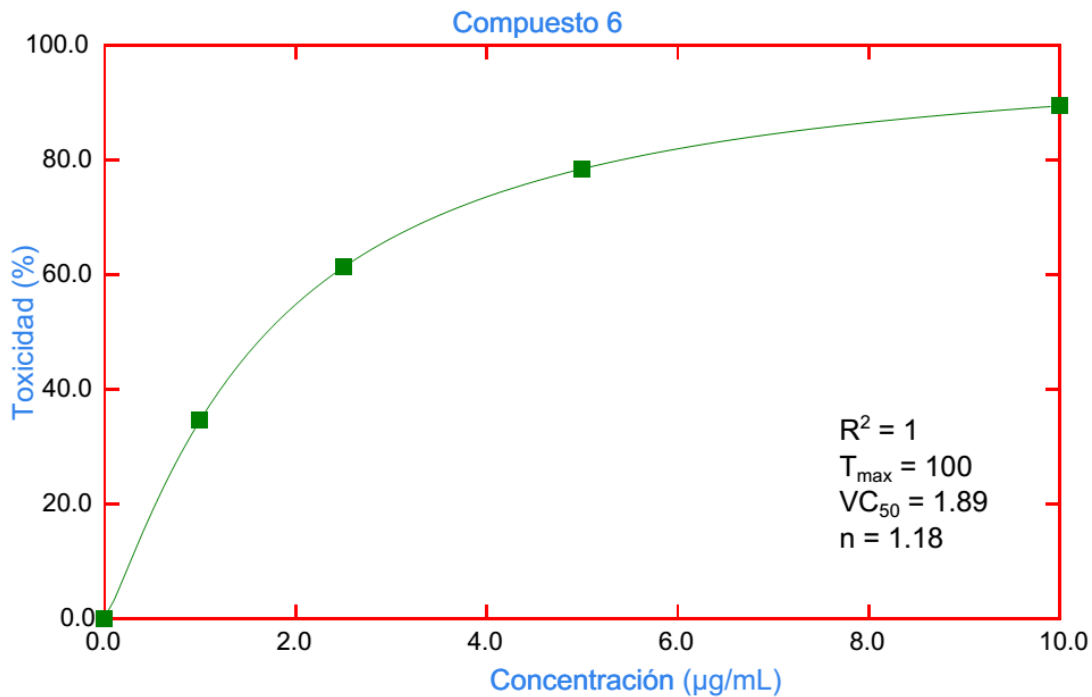
**Grafica 5.-** Ajuste realizado con los datos obtenidos de la viabilidad de las células B16F10 tratadas con el compuesto 3.



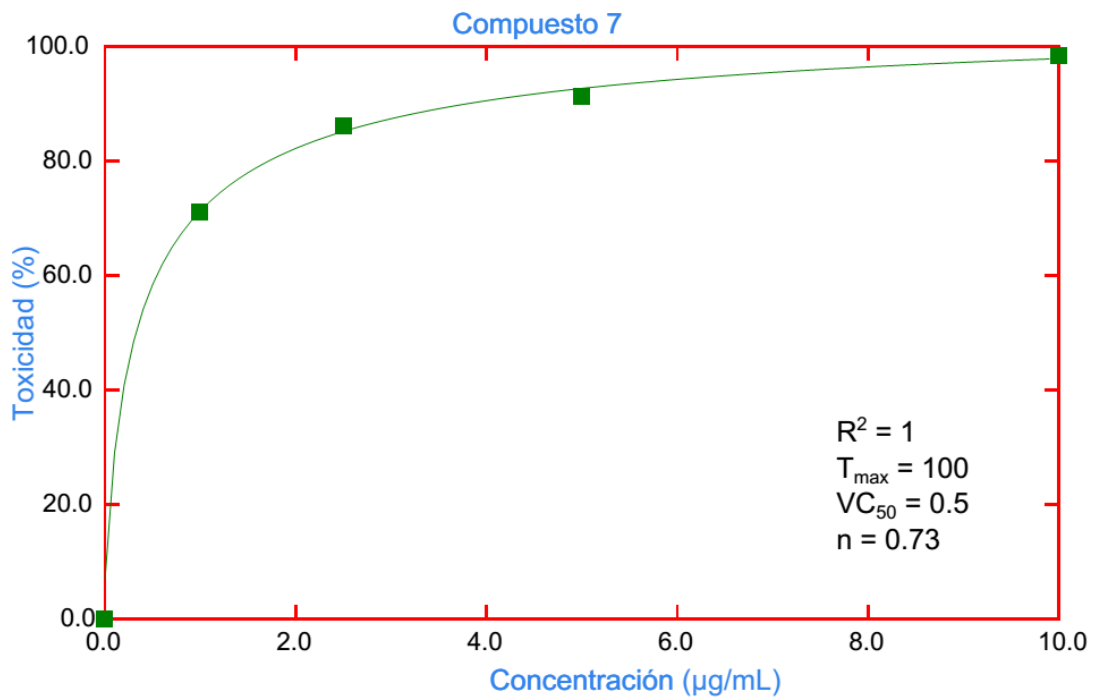
**Grafica 6.-** Ajuste realizado con los datos obtenidos de la viabilidad de las células B16F10 tratadas con el compuesto 4.



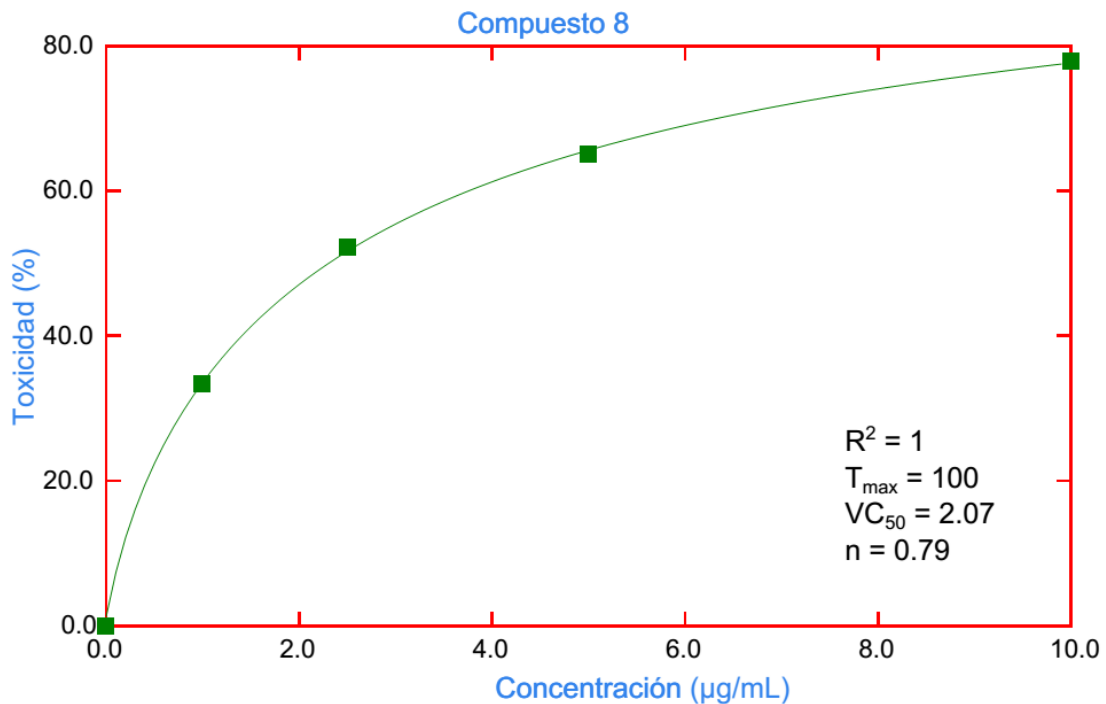
**Grafica 7.-** Ajuste realizado con los datos obtenidos de la viabilidad de las células B16F10 tratadas con el compuesto 5.



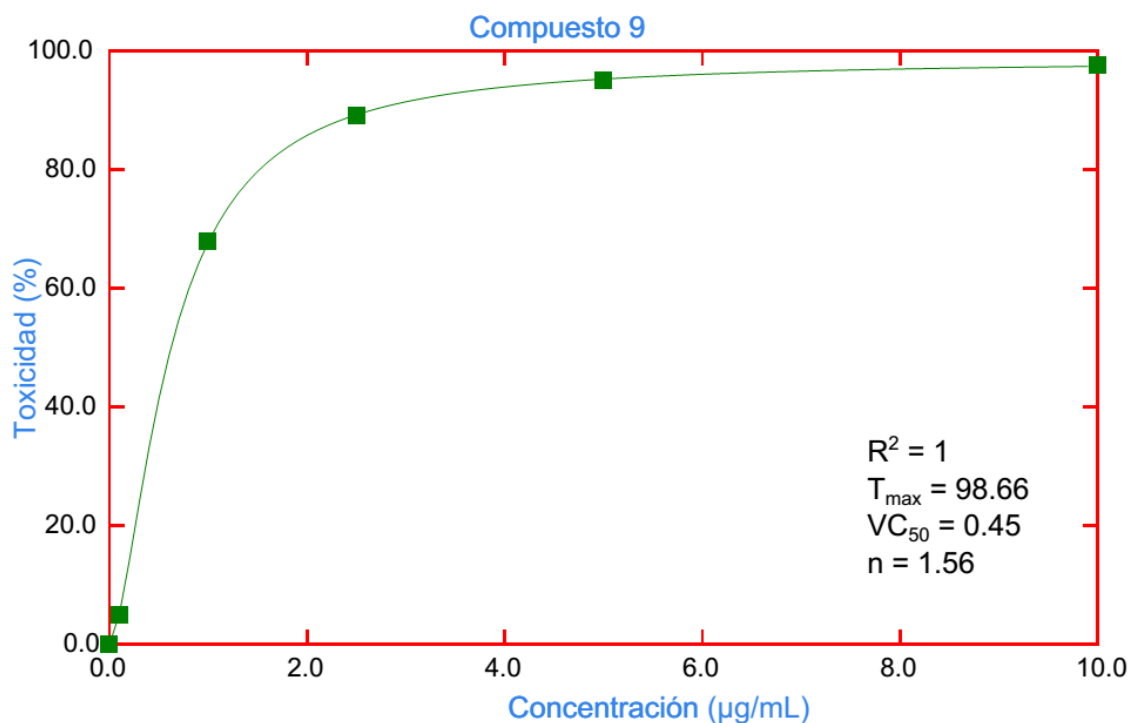
**Grafica 8.-** Ajuste realizado con los datos obtenidos de la viabilidad de las células B16F10 tratadas con el compuesto 6.



**Grafica 9.-** Ajuste realizado con los datos obtenidos de la viabilidad de las células B16F10 tratadas con el compuesto 7.



**Grafica 10.-** Ajuste realizado con los datos obtenidos de la viabilidad de las células B16F10 tratadas con el compuesto 8.



**Gráfica 11.-** Ajuste realizado con los datos obtenidos de la viabilidad de las células B16F10 tratadas con el compuesto 9.

A continuación se presenta una tabla con los parámetros obtenidos del ajuste para cada uno de los compuestos organoestánicos a manera de resumen:

**Tabla 4.-** Valores obtenidos con el ajuste no lineal de la ecuación de Hill para cada uno de los compuestos organoestánicos.

<i>Compuesto</i>	$T_{max}$	$VC_{50}$	$n$	$V(100 - T_{max})$
1	39.61	8.63	1.75	60.39
2	80.96	0.69	2.03	19.04
3	80.45	1.3	1.63	19.55
4	97.38	0.36	1.14	2.62
5	49.37	2.01	1.9	50.63
6	100	1.89	1.18	0
7	100	0.5	0.73	0
8	100	2.07	0.79	0

Observando la gráfica 1 y tomando en cuenta el valor  $VC_{50}$  de la tabla anterior se puede concluir que los compuestos que tienen un valor pequeño en este parámetro son los que muestran la toxicidad más alta en las concentraciones mayores utilizadas, en este caso los compuestos 4, 7 y 9. A medida que este valor aumenta la toxicidad de cada compuesto es menor como en el caso de los compuestos 3, 5, 6 y 8. En particular el compuesto 1 es el que tiene un valor mayor en este parámetro lo cual da a entender que a pesar que se aumenta la concentración, esto no afecta demasiado en la viabilidad de la línea celular.

El parámetro  $V$  (Viabilidad) nos habla de que existe un umbral en el cual a pesar de utilizar concentraciones altas los compuestos no son capaces de matar a la mayoría de las células en cultivo. Tal es el caso del compuesto 1 que en la concentración más alta la viabilidad no disminuyó a menos del 60% y utilizando el compuesto 5 la viabilidad menor obtenida fue de aproximadamente el 50%. En este caso en particular se observa que a pesar de que la concentración se aumenta de 1 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  esto no afecta demasiado en la viabilidad de las células.

El coeficiente de Hill en la mayoría de los casos es mayor a 1, lo que implica la presencia de cooperatividad positiva, a excepción de los compuestos 7 y 8 que tienen una cooperatividad negativa (coeficiente de Hill menor a 1). Esto quiere decir que los compuestos se podrían estar uniendo a algún receptor extracelular de las células y esto facilita que cada vez sea más sencillo para las moléculas unirse y después internalizarse.



## Discusión

Actualmente en la literatura se encuentran varios artículos donde se reportan experimentos con compuestos organoestánnicos que ha mostrado propiedades antitumorales [8, 12, 21-24]. Sin embargo, no se han reportado, hasta el momento, estudios donde se utilicen este tipo de compuestos químicos como marcadores celulares fluorescentes. Con los resultados obtenidos se demuestra que varios de los compuestos orgánicos de estaño analizados tiñen a las células de melanoma murino, aunque solamente dos de estos compuestos mostraron una tinción intensa. La principal duda que surge al analizar las imágenes de fluorescencia es que mecanismo utilizan estos compuestos para atravesar la membrana plasmática. Debido a que en la mayoría de las imágenes de fluorescencia de los compuestos seleccionados se observan focos localizados más fluorescentes, uno de los mecanismos por los cuales los compuestos organoestánnicos pudieran atravesar la membrana sería endocitosis. La endocitosis es la forma más habitual de internalización de fluidos, solutos, macromoléculas y partículas por medio de la invaginación de la membrana plasmática y la formación de vesículas debido a la fusión de la membrana [25]. Este mecanismo podría explicar la existencia de estas vesículas fluorescentes que después de madurar liberan su contenido al citoplasma haciendo que el citoplasma de las células muestre fluorescencia de manera más uniforme y de menor intensidad que las vesículas. También es importante tomar en cuenta que en el proceso de maduración de los endosomas estos van desde un pH en el rango de 6.8 – 6.1 hasta 6 – 4.8 al final del proceso de maduración [26]. Esto podría estar afectando la cantidad de fluorescencia que emiten los compuestos orgánicos de estaño, sin embargo, se requiere hacer estudios para poder comprobarlo. Si se pudiera comprobar que los compuestos se internalizan mediante endocitosis, los compuestos orgánicos de estaño 2 y 9 podrían utilizarse como un marcador de endosomas.

Por otra parte, los resultados obtenidos con el ensayo de viabilidad nos muestran que los datos se pueden ajustar a la ecuación de Hill con mucha precisión. Realizando el análisis se obtiene el coeficiente de Hill, el cual nos habla de la cooperatividad entre ligando y receptores. En este caso los compuestos organoestánnicos serían los ligandos que activan

receptores en las células que inducen el mecanismo de endocitosis. En la tabla 4 se muestra que siete de los nueve compuestos que se estudiaron presentan cooperatividad positiva, esto podría explicar que después de solo dos horas de incubación se puedan observar una gran cantidad de vesículas fluorescentes dentro de las células de melanoma murino.

En el presente trabajo se encontró que la viabilidad de las células en cultivo se ve en gran medida disminuida al ser tratadas con los compuestos organoestánicos. Los compuestos 2 y 9 que fueron seleccionados como mejores marcadores de células por su cantidad de fluorescencia emitida presentan toxicidad muy elevada en la concentración de 10 µg/mL. Cuando se disminuyó la concentración a 0.1 µg/mL solamente el compuesto 2 siguió produciendo fluorescencia detectable dentro de las células y la viabilidad del cultivo celular aumento a más del 95%. Esto podría dar la oportunidad de seguir trabajando con las células aún después de ser marcadas con este compuesto orgánico de estaño.

Aunque la toxicidad de estos compuestos a altas concentraciones sea elevada, esto no significa que sea algo no deseado. El marcador fluorescente DAPI ó (4',6-diamino-2-fenilindol) se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN y es ampliamente utilizado en la microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, visualización de ADN, entre otras [27]. A pesar de que es un marcador fluorescente con toxicidad muy alta, es muy utilizado al ver células que se encuentran fijas para poder observar el núcleo de las células. Además de lo mencionado con anterioridad, se podría realizar un estudio tratando con estos compuestos a células que no sean de una línea celular cancerígena y observar la viabilidad que se presenta para conocer si estos compuestos organoestánicos cuentan con un posible efecto antitumoral.

Como se mencionó anteriormente, los compuestos 5 y 6 no son compuestos orgánicos de estaño, pero son la base estructural de los compuestos 7, 8 y 9. Es interesante observar como el compuesto 5 no presenta fluorescencia en células en cultivo, pero, después de añadir el elemento estaño y los grupos funcionales se observa un poco de fluorescencia en el cultivo utilizando el compuesto 7. En el caso del compuesto 6, al utilizar el compuesto con estaño y sus grupos funcionales se aprecia que el compuesto 9 es capaz de entrar a las

células en cultivo y producen fluorescencia en las células evitando la formación de cristales. Se tendrían que realizar estudios para conocer de qué manera el elemento estaño y los grupos funcionales afectan la interacción de los compuestos con la membrana celular.

## Conclusiones

- Los compuestos 2 y 9 producen las mejores tinciones fluorescentes en células B16F10 en cultivo.
- La exposición de las células B16F10 a los compuestos orgánicos de estaño 7 y 9 produce citotoxicidad.
- La toxicidad en el cultivo celular muestra una tendencia dependiente de la concentración de los compuestos organoestánnicos.
- El compuesto 2 produce tinción fluorescente en las células incluso a las concentraciones más bajas probadas, mientras que el compuesto 9 solo lo hace a altas concentraciones (10 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

## **Perspectivas**

En este trabajo se comprobó que la mayoría de los compuestos organoestánicos fueron capaces de teñir a las células en cultivo a excepción de los compuestos 1 y 5. Varios de estos compuestos muestran lo que podrían ser vesículas más fluorescentes, pero se requiere realizar estudios utilizando algún marcador fluorescente que se una a membrana para comprobar que los puntos de mayor intensidad sean estructuras rodeadas de membrana, lo cual reforzaría la teoría de internalización de los compuestos por medio de endocitosis. Conocer la manera en que interactúan los compuestos orgánicos de estaño con la membrana celular nos ayudaría a comprender de qué manera se internalizan los compuestos y provocan que las células en cultivo fluorescan, con lo cual se podrían proponer como biomarcadores específicos.

Como trabajo a futuro sería conveniente realizar estudios de viabilidad con células no cancerígenas para conocer si estos compuestos presentan actividad antitumoral.

## Bibliografía

1. Ministerio de Agricultura, A.y.M.A. *Compuestos Organoestánicos*. 2012, <http://www.prtr-es.es/Compuestos-Organoestannicos-Sn-total,15656,11,2007.html>. [Consulta: Lunes, 30 de Junio del 2014]
2. Angelici, R.J., *Técnica y síntesis en química inorgánica*. 1979: Reverté.
3. Valeur, B. and M.N. Berberan-Santos, *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2013: John Wiley & Sons.
4. Zhang, J., et al., *Creating new fluorescent probes for cell biology*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002. **3**(12): p. 906-918.
5. Hu, C.-D. and T.K. Kerppola, *Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis*. *Nature biotechnology*, 2003. **21**(5): p. 539-545.
6. Lippincott-Schwartz, J. and G.H. Patterson, *Development and use of fluorescent protein markers in living cells*. *Science*, 2003. **300**(5616): p. 87-91.
7. Miyawaki, A., A. Sawano, and T. Kogure, *Lighting up cells: Labelling proteins with fluorophores*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003. **4**(SUPPL.): p. S1-S7.
8. Snoeij, N., A. Penninks, and W. Seinen, *Biological activity of organotin compounds—an overview*. *Environmental Research*, 1987. **44**(2): p. 335-353.
9. Ross, A., *Industrial applications of organotin compounds*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1965. **125**(1): p. 107-123.
10. Piver, W.T., *Organotin compounds: industrial applications and biological investigation*. *Environmental health perspectives*, 1973. **4**: p. 61.
11. Kidwai, M., et al., *Novel synthetic approach for antifungal and antibacterial organotin compounds*. *Inorganic Chemistry Communications*, 2000. **3**(9): p. 465-468.
12. Hadjikakou, S.K. and N. Hadjiliadis, *Antiproliferative and anti-tumor activity of organotin compounds*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2009. **253**(1): p. 235-249.
13. Collins, L. and S.G. Franzblau, *Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium*

- tuberculosis and Mycobacterium avium*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1997. **41**(5): p. 1004-1009.
14. Mikus, J. and D. Steverding, *A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue®*. Parasitology international, 2000. **48**(3): p. 265-269.
  15. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(17): p. 5421-5426.
  16. Rätz, B., et al., *The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*Tb rhodesiense* and *Tb gambiense*) in vitro*. Acta tropica, 1997. **68**(2): p. 139-147.
  17. Hill, A.V., *The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide*. I. Biochemical journal, 1913. **7**(5): p. 471.
  18. Goutelle, S., et al., *The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling*. Fundamental & clinical pharmacology, 2008. **22**(6): p. 633-648.
  19. Center, M.D. *Linear Regression*. 2014, [http://www.mathworks.com/help/matlab/data\\_analysis/linear-regression.html](http://www.mathworks.com/help/matlab/data_analysis/linear-regression.html).  
[Consulta: Miercoles, 9 de Julio del 2014]
  20. Blair, R.C., et al., *Bioestadística*. 2008: Pearson Educación.
  21. Alama, A., et al., *Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents*. Drug Discovery Today, 2009. **14**(9): p. 500-508.
  22. Barbieri, F., et al., *Antitumor activity of a new orally active organotin compound: a preliminary study in murine tumor models*. Anti-cancer drugs, 2002. **13**(6): p. 599-604.
  23. Costa, M.A., et al., *Apoptosis and cell growth arrest in A375 human melanoma cells by diorganotin (IV) and triorganotin (IV) complexes of [meso-Tetra (4-sulfonatophenyl) porphine] manganese (III) chloride*. oncology, 2011. **1**: p. 4.

24. Tabassum, S. and C. Pettinari, *Chemical and biotechnological developments in organotin cancer chemotherapy*. Journal of Organometallic Chemistry, 2006. **691**(8): p. 1761-1766.
25. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. The EMBO journal, 2011. **30**(17): p. 3481-3500.
26. Maxfield, F.R. and D.J. Yamashiro, *Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis*, in *Immunobiology of Proteins and Peptides IV*. 1987, Springer. p. 189-198.
27. Kapuscinski, J., *DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*. Biotechnic & Histochemistry, 1995. **70**(5): p. 220-233.