

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Antimutagenésis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. El proyecto fue financiado por CONACYT-635012 y salud CO1-7677, así como por PAPIIT-DGAPA proyecto IN-212701 y IN217712. Se contó con beca para la elaboración de la tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Atilana por su amor, comprensión y por iluminar mi camino

A mis hermanos, primos y sobrinos por aquellas enseñanzas y divertidos momentos

A mi esposa Elena por estar siempre a mi lado, por tu amor incondicional, por despertar conmigo a diario y ser parte de mi sueño

A Mirnita Saraf eres mi bebe y mi mayor orgullo, te amo

A todos mis amigos que estuvieron en todo momento a mi lado, gracias totales

A la Dra. Carmen gracias por la ayuda y consejos

Al Dr. Mario, la Dra. Lucy, a la M en C. Marisela y al M en C. Aníbal por los comentarios, consejos y paciencia brindados

RESUMEN

El cáncer constituye un problema de salud pública a nivel mundial. Dentro de los principales tratamientos se encuentra la quimioterapia y en nuestro país el cisplatino es uno de los agentes más utilizados debido a su eficacia ante diferentes tipos de cáncer, el uso del cisplatino presenta diversos problemas ya que es altamente mutagénico, ocasiona daño hepático en pacientes y su producción es costosa. Por lo cual se ha hecho necesaria la búsqueda de nuevas moléculas antineoplásicas, que sean más efectivas, menos tóxicas y cuyos costos de producción también disminuyan. Tal es el caso de las casiopeínas®, desarrolladas y sintetizadas en la Facultad de Química de la UNAM, este grupo de compuestos poseen un centro de cobre unido a varios aniones o moléculas circundantes. Dentro de las evaluaciones farmacológicas y toxicológicas de fármacos está el determinar la genotoxicidad mediante la prueba de micronúcleos (MN). En este estudio se evaluó la genotoxicidad de la casiopeína III-ia, en comparación con un anticancerígeno ampliamente utilizado, el cisplatino, mediante la evaluación de la inducción de MN en sangre periférica de ratones macho, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1, bajo tratamientos crónico y subcrónico. En los grupos de hembras, machos y hembras preñadas, tratados con cisplatino se observó un claro incremento en el número de eritrocitos policromáticos micronucleados, desde la hora 24, alcanzando el máximo en la 48, tanto para el tratamiento agudo como para el subcrónico. En el caso de los fetos, no se observa un incremento estadísticamente significativo para ninguno de los tratamientos. La casiopeína III-ia no alteró la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados y no presentó efecto genotóxico ni citotóxico en ninguno de los tratamientos. Por otro lado, no alteró la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en fetos, sin embargo, presentó un efecto fetoletal en hembras preñadas bajo tratamiento subcrónico.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AC	Aberraciones Cromosómicas
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
MN	Micronúcleo (s)
EPC	Eritrocitos Policromáticos
ENC	Eritrocitos Normocromáticos
EPC-MN	Eritrocitos Policromáticos Micronucleados
DIF	Frecuencia Diferencial de la Inducción de MN
NIF	Frecuencia Neta de la Inducción de MN
EPA	Environmental Protection Agency
FDA	Food and Drug Administration
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
i.p.	Intraperitoneal
LD₅₀	Dosis Letal Media
LD₉₉	Dosis Letal noventa y nueve
NA	Naranja de Acridina
WHO	World Health Organization

ÍNDICE

RESUMEN

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Desarrollo de fármacos	4
1.3 Casiopeínas	5
1.4 Cisplatino	9
1.5 Genotóxicidad	11
1.6 Micronúcleos	11
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	14
4.1 General	14
4.2 Particulares	15
5. MATERIAL Y MÉTODO	16
5.1 Animales	16
5.2 Tratamientos	16
5.3 Preparación de laminillas	18
5.4 Obtención de muestras	18
5.4.1 Individuos adultos	18
5.4.2 Fetos	19
5.5 Evaluación de micronúcleos	19
5.6 Análisis estadístico	20
6. RESULTADOS	21
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
8. CONCLUSIÓN Y COMENTARIOS FINALES	44
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
10. ANEXOS	52

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

De acuerdo con las estadísticas de la OMS (2011) el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, además se prevé que para 2030 la mortalidad a nivel mundial aumentará alrededor de 11.5 millones por año. En México la tasa de defunción por cáncer de 1998 a 2008 aumentó de 57 mil a 66 mil por cada 100 mil habitantes, esta tendencia resulta preocupante por la capacidad de las instituciones para dar atención adecuada y oportuna (INEGI, 2011).

El cáncer consiste en el crecimiento excesivo, no limitado y autónomo de las células, con respecto a los estímulos reguladores normales, además se establece que por regla general son el resultado de que, en al menos una célula, se produzcan, de forma aleatoria, varios incidentes independientes, cuyos efectos son acumulativos (De Vita y Hellman, 1993; Murphy, 1996; Gil *et al.*, 1997).

El cáncer no es una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen. Los principales subtipos son:

- Sarcomas, procedentes de tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.
- Carcinomas, originados en tejidos epiteliales como la piel, o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y de tejidos glandulares como mama y próstata. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan de células escamosas. Los que tienen una estructura glandular se llaman adenocarcinomas.
- Por otro lado, las leucemias y los linfomas incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfático, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras (INC, 2008).

Los tumores son crecimientos neoplásicos íntimamente relacionados al cáncer. Se pueden clasificar en dos grupos según su efecto sobre el organismo y según ciertas características de su crecimiento. Existen benignos y malignos, estos últimos tienen la potencialidad de producir cáncer. Los benignos en general tienen crecimiento limitado, se mantienen localizados en el sitio de aparición y sus efectos sobre el organismo no son graves y derivan de los trastornos mecánicos que puede ocasionar un cuerpo extraño en el seno de un tejido normal. Por otra parte los malignos se caracterizan por un crecimiento descontrolado y rápido, son invasivos, tanto en el sitio donde se han iniciado, como en su capacidad de diseminarse a otros tejidos del organismo, originando metástasis. Sus efectos son graves y si no son tratados a tiempo, conducen a la muerte (Alberts *et al.*, 1994).

Al considerar la naturaleza básica de la neoplasia se debe tomar en cuenta si existe una pérdida parcial o completa de los mecanismos de control de crecimiento, así como pérdida de las propiedades normales de diferenciación en diversos grados, que incluyen cambios en las estructuras cromosómicas y de las propiedades bioquímicas, pérdida del control posicional, que conlleva a la metástasis (Pardee, 1993; Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997).

Dentro de los factores causales del desarrollo de la carcinogénesis se encuentran tanto exógenos (químicos, físicos y biológicos) como endógenos (daño en el sistema inmune, inflamación crónica, desequilibrio endócrino y predisposición genética entre otros). Dentro de los factores más estudiados se encuentran los agentes químicos, que son capaces de aumentar la probabilidad de que, al menos una célula diferenciada se convierta en cancerosa por alteraciones en los genes que controlan el crecimiento y la muerte normal de la misma (De Vita y Hellman, 1993). También la inducción del cáncer se ha asociado con la acumulación de mutaciones preexistentes, debido a que durante la división celular, se producen errores genéticos espontáneos (Oliveira *et al.*, 2007).

Hay tres líneas de evidencia que han relacionado durante mucho tiempo el desarrollo del cáncer con cambios en el material genético. Primero, una vez que una célula se ha transformado en cancerosa, todas las células hijas son cancerosas; en otras palabras, el cáncer es una propiedad heredada de las células. Segundo, anomalías cromosómicas como deleciones y translocaciones, son frecuentemente visibles en las células cancerosas. Tercero, la mayoría de los carcinógenos son también mutágenos (Curtis y Barnes, 2006).

En la actualidad los principales tratamientos del cáncer son: cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal y terapia biológica. Se puede usar un tratamiento o una combinación de ellos, dependiendo del tipo, ubicación y extensión del cáncer, además de la edad y salud general del paciente (INC, 2008). La mayoría de los tratamientos aprovechan diferencias relativamente sutiles entre las células normales y neoplásicas con respecto a su velocidad de proliferación, metabolismo y sensibilidad a la radiación (Alberts, *et al.*, 1994). Sin embargo, los tratamientos pueden dañar también células y tejidos sanos, que con frecuencia causan efectos secundarios indeseados (Klug y Cummings, 1999; Clayson, 2001). Por esta razón, el cáncer ocupa un lugar primordial en la investigación de nuevas estrategias terapéuticas, que busquen la curación, así como aumentar la supervivencia del paciente con una mejor calidad de vida. En este contexto, se exploran diversos tratamientos que van desde terapias génicas, inmunológicas e inhibición de la angiogénesis, hasta el consumo de algunos fitonutrientes y la síntesis de sustancias o mezclas complejas que puedan, en un futuro, ser auxiliares en el tratamiento (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2001; Young-Joon, 2003). La importancia de controlar enfermedades degenerativas mortales como el cáncer a propiciado la búsqueda, caracterización y síntesis de nuevos compuestos con capacidad antineoplásica, ya que, si bien es cierto que actualmente existe una gran cantidad de estos agentes en el mercado, también es conocido que son altamente tóxicos, por lo que su eficacia se ve disminuida con el paso del tiempo. La Dra. Lena Ruiz diseñó y sintetizó en la Facultad de Química de la UNAM, un nuevo grupo de compuestos de coordinación con un centro

metálico de cobre, a los cuales llamó casiopeínas®, los cuales poseen un centro de Cu II unido a varios aniones o moléculas circundantes. Estos compuestos han mostrado actividad citostática y antineoplásica importante, principalmente las casiopeínas II y III, pero sobre todo, lo que ha llamado mucho la atención es su baja toxicidad en comparación con el cisplatino entre otros, por lo que han generado muchas expectativas para una posible aplicación clínica a corto plazo (Ruiz-Ramírez, 1991; García *et al.*, 1991; Ruiz Azuara, 1992; De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2000).

1.2 Desarrollo de fármacos

El proceso de investigación y desarrollo de una molécula para su uso clínico involucra diversas etapas, tales como: investigaciones exploratorias de síntesis y tamizaje, estudios pre-clínicos y toxicología animal, estudios clínicos (fases I, II, III, IV y 0), solicitud de nuevo medicamento, revisión (fármaco-vigilancia), además se evalúa un gran rango de parámetros de la molécula que incluyen estabilidad, niveles plasmáticos, tisulares y propiedades farmacocinéticas. El desarrollo de dichas etapas es riguroso e involucra grandes costos y pocas posibilidades de éxito, pues de las muchas moléculas identificadas y ensayadas muy pocas llegan a los estantes de las farmacias, siendo desechadas la mayoría en distintas etapas del proceso (Sarel *et al.*, 1993; Chin-Jen, 2000; Marovac, 2001; Bayona y Fajardo, 2012).

La existencia de tumores refractarios, es decir que no responden a los protocolos establecidos, ha generado la búsqueda de nuevas moléculas orgánicas e inorgánicas con actividad antineoplásica, que sean más efectivas, menos tóxicas y cuyos costos de producción o importación sean inferiores a los medicamentos de mayor uso a nivel nacional (Bravo, 2002). En esta búsqueda de alternativas, investigadores de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, se ha enfocado al diseño, síntesis, caracterización y evaluación de una familia de sustancias orgánicas con iones metálicos, denominadas casiopeínas®,

dichas sustancias poseen las mismas características químico-estructurales que le confieren actividad biológica al cisplatino sobre las células cancerosas (Ruiz-Azuara, 1992; 1996; 1997).

1.3 Casiopeínas®

Las casiopeínas® son un grupo de compuestos de coordinación, los cuales contienen un centro de cobre unido a varios aniones o moléculas circundantes, lo que le confiere una geometría similar a los compuestos del platino (cisplatino o carboplatino) (Ruiz-Ramírez, 1991; Ruiz-Azuara, 1992).

En el humano el Cu es un metal biológicamente esencial, se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos como parte de complejos orgánicos, muchos de ellos son metalo-proteínas y funcionan como enzimas (citocromo c oxidasa, lisil oxidasa, la superóxido dismutasa, tirosinasa y dopamina β -monooxigenasa). Las enzimas que lo contienen están envueltas en una variedad de reacciones metabólicas como la utilización del oxígeno y de la energía, la síntesis de compuestos esenciales como proteínas del tejido conectivo, sustancias neuro-activas esenciales en la formación de las vainas protectoras de mielina de las fibras nerviosas. Además, es necesario para el buen funcionamiento del sistema inmune, los huesos, los vasos sanguíneos y la correcta absorción de algunos nutrientes (WHO, 1996). Dadas estas propiedades, el Cu tiene la posibilidad de disminuir la toxicidad de los fármacos antineoplásicos que son sintetizados con base a él, en comparación con el cisplatino (Ruiz Azuara, 1992).

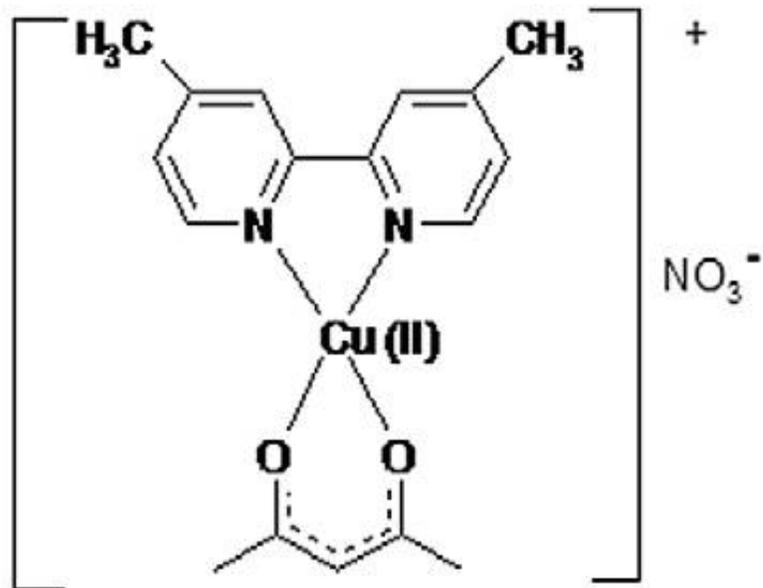


Figura 2. Estructura química de la casiopeína III-ia (Carvallo-Chaigneau et al., 2008)

Las formulas generales de las casiopeínas® son:



Donde:

(N-N) = ligante del tipo diimina (fenantrolinas o bipyridinas substituidas)

(N-O) = ligante aminoacidatos ó péptidos

(O-O) = ligante donador (acetilcetonato o salicialdehidato)

Las casiopeínas fueron sintetizadas con la finalidad de (Bravo, 2002):

- ∂ Que el núcleo de cobre le confiera una geometría plana, cercana a los compuestos del platino (cisplatino o carboplatino) y que el ligante diimina, con carácter hidrofóbico, le posibilite actuar como intercalante a través de interacciones con las bases del ADN.

- ∞ La naturaleza, número, posición y carga de los sustituyentes en el ligante diimina serían los responsables de la modulación en la distribución y transporte, y por tanto de la selectividad tumoral de la molécula, confiriéndole variación en la actividad biológica.
- ∞ Que el uso del cobre disminuya de manera importante la toxicidad de los fármacos, debido a que los organismos tienen procesos homeostáticos para regular el exceso de dichos elementos.
- ∞ Por otro lado, que el cobre pueda o no intercambiar alguno de sus ligantes para coordinarse directamente con el nitrógeno de las bases de los ácidos nucleicos, formando enlaces similares a los observados con el cisplatino.

De acuerdo con Ruiz-Ramírez *et al.*, 1991 las casiopeínas® I, II y III, tienen una mayor actividad antineoplásica, en comparación con otras de la misma familia, por ello han sido sometidas a un gran número de pruebas. Dichos autores reportaron la actividad antineoplásica *in vivo* en líneas tumorales de ratón: L1210 y L5178 (leucemia), S180 (sarcoma) y B16 (melanoma). Además de mostrar efectividad *in vitro* sobre líneas tumorales humanas, tales como: S189 (sarcoma), CaLo y HeLa (carcinoma escamoso invasor del cérvix y cáncer cérvico uterino, respectivamente). Se ha observado que las casiopeínas® tienen mayor actividad en líneas tumorales humanas como; HeLa, SiHa, CaSki, C33-A, CaLo y InBl y en líneas murinas B16 y carcinoma de pulmón de Lewis, en comparación con el cisplatino (Gracia-Mora *et al.*, 2001).

Así mismo se han realizado estudios de toxicidad en perro con los cuales se ha podido estimar el grado de riesgo que las casiopeínas pueden presentar al ser administradas en humanos, se logró determinar la DL₅₀ y DL₉₉ que fueron 7 mg kg⁻¹ y 10 mg kg⁻¹ respectivamente, para casiopeína III-ia y 4.5 mg kg⁻¹ y 8 mg kg⁻¹ respectivamente para casiopeína II-gli. Se determinó que los animales sometidos a DL₉₉, mueren por edema pulmonar causado por fallo cardíaco y consecuente

incremento de la presión venosa y capilar pulmonar. Se ha propuesto que el fallo cardíaco se debe a liberación de radicales libres que son lesivos sobre las células cardíacas. (Leal *et al.*, 2006). En otro ensayo realizado en perros García-Orduño *et al.* 2006 sugiere que la casiopeína® III-ia en dosis de 10 mg kg^{-1} afecta directamente a mitocondrias del músculo cardíaco, lo cual disminuye el aporte energético produciendo así insuficiencia cardíaca aguda. Existe edema pulmonar el cual se presenta de manera secundaria por incremento en la presión hidrostática en el lecho capilar pulmonar. Finalmente la muerte ocurre por insuficiencia cardio-respiratoria.

Por otro lado Sánchez *et al.*, 2006, al evaluar la citotoxicidad, genotóxicidad y citostaticidad *in vivo* obtuvo como resultados que la casiopeína III-ia es citotóxica a dosis de 12.34 mg kg^{-1} , no citostática a dosis menores de 6.17 mg kg^{-1} y genotóxica a dosis menores de 6.17 mg kg^{-1} . Vale la pena señalar que la casiopeína III-ia ha mostrado diferencias en su capacidad antiproliferativa *in vitro* sobre líneas celulares al ser evaluada en presencia y ausencia de activación metabólica, siendo activa en ausencia de esta pero incrementando su actividad al agregar la fracción microsomal, lo que les llevó a proponer que la casiopeína® una vez metabolizada es transformada en una molécula con mayor actividad.

Se han evaluado también los efectos antiproliferativo y apoptótico *in vitro* y la actividad antitumoral y sistémica *in vivo* de la casiopeína III-ia. *In vitro* con células HTC-15 (células de cáncer de colon) tratadas con 0, 2.5, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de casiopeína III-ia. En la fase *in vivo* se utilizaron ratones desnudos a los que se les inyectaron células HTC-15 subcutáneamente. La casiopeína-III-ia tiene un efecto dependiente de la dosis sobre la viabilidad celular, la mayor cantidad de células muere al administrar las dosis de 15 y 20 mg kg^{-1} a partir de la dosis de 5 mg kg^{-1} se observan cambios morfológicos relacionados con la apoptosis, además se observó que la adición de la droga no cambia la duración de las fases del ciclo celular. Estos resultados sugieren que la casiopeína III-ia ejerce un efecto citotóxico sobre células de HTC-15 involucrando una inducción de la apoptosis. En

el tratamiento *in vivo* se observa un lento crecimiento de los tumores de los animales tratados con casiopeína, el volumen relativo de los tumores tuvo un efecto dosis-respuesta siendo el grupo tratado con 6 mg kg^{-1} de casiopeína III-ia el que fue estadísticamente significativo comparado con el control. El índice mitótico se redujo 43.5% y 58% en los animales tratados con 3 mg kg^{-1} y 6 mg kg^{-1} respectivamente, para los animales tratados con cisplatino fue de 8.4 ± 2.1 , en animales tratados con 6 mg kg^{-1} de casiopeína III-ia fue de 3.5 ± 1.1 . Los datos sugieren que la casiopeína III-ia ejerce actividad antitumoral *in vivo* y que inhibe la proliferación celular e induce apoptosis (Carvallo-Chaigneau *et al.*, 2008).

Por otra parte, un estudio realizado *in vivo* en ratones CD-1, mostró que la casiopeína III-ia en dosis de 1.75, 3.5 y 4.8 mg kg^{-1} , alteró el proceso de espermatogénesis, disminuyó la fertilidad, indujo alteraciones esqueléticas en la descendencia e induce mutaciones letales dominantes observadas como reabsorciones tempranas y tardías (Bocanegra-Astivia, 2005).

Como se ha mencionado las casiopeínas® son compuestos que al parecer ofrecen un prometedor panorama en la quimioterapia y por lo tanto en el tratamiento del cáncer. Dentro de la evaluación de las propiedades toxicológicas de los nuevos fármacos se encuentran las de genotoxicidad (Krishna *et al.*, 1998 FDA, 2000; EPA, 1998; IACR, 1990).

1.4 Cisplatino

Para el caso de antineoplásicos existen 44 compuestos aprobados a nivel mundial para su uso, de ellos solo, el cisplatino y el carboplatino son inorgánicos a base de platino (Ruiz-Azuara, 1996). El descubrimiento de la actividad citostática del cisplatino (Figura 1) por Rosenberg en 1969, marcó el inicio de investigaciones encaminadas a encontrar quimioterapéuticos inorgánicos efectivos. Este compuesto es uno de los numerosos complejos de coordinación del platino con actividad antitumoral, su potencial fue reconocido gracias a las observaciones

donde se encontró que inhibía la división bacterial al igual que otros compuestos con metales de transición del grupo VIII B (Pratt y Ruddon, 1979).



Figura 1. Estructura molecular del cisplatino [cis-diamino-dicloro-platino (II)].

Actualmente se sabe que el cisplatino, es una de las más potentes drogas antitumorales con efecto en la síntesis del ADN, lo que le confiere actividad frente a distintos tipos de cáncer tales como; sarcomas, carcinomas, leucemias y linfomas, cuando se administra solo o en combinación con otras drogas, o bien con otros tratamientos como la radioterapia o la cirugía. Sin embargo, su uso es restringido porque es tóxico en tejidos normales y es altamente mutagénico, causando intercambios de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en cultivos celulares de mamíferos (Tucker y Preston, 1996; Truter, *et al.*, 2002; Khyriam y Prasad, 2003), medula ósea de rata (de Oliveira, *et al.*, 2002), así como citotoxicidad, fetoletalidad y MN en ratas preñadas (Giavini *et al.*, 1990).

Otro de los inconvenientes que presenta el uso del cisplatino es su eficacia terapéutica limitada, dado que, se ha observado en distintos tipos de cáncer como ovario, próstata y carcinoma escamoso en humanos y en leucemia L1210, P388 de ratón, los cuales muestran resistencia ante la acción química del cisplatino (Chabner y Collins 1990; Kartalou y Essigmann, 2001).

1.5 Genotóxicidad

Las diferentes agencias reguladoras que aprueban las drogas para uso humano son Food and Drugs Administration (FDA), The International Agency of Research Cancer (IARC), Environmental Protection Agency (EPA). Quienes establecen que para evaluar el daño genotóxico se necesitan realizar pruebas de mutaciones en bacterias (AMES), evaluaciones *in vitro* de daño cromosómico en células de mamífero, conocidas como aberraciones cromosómicas e *in vivo* la frecuencia de micronúcleos (MN) (Mavournin, *et al.*, 1990; Krishna, *et al.*, 1992; Müller, *et al.*, 1999; FDA, 2000; EPA, 1998; IACR, 1990).

1.6 Micronúcleos

Esta prueba tiene las ventajas de ser rápida en comparación con otras técnicas, no requiere de células en metafase, los MN pueden ser visualizados fácilmente, permite detectar daño citogenético asociado con la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Sin embargo, no se puede identificar el tipo de aberraciones cromosómicas que pueden originarse al administrar un compuesto químico. Los micronúcleos son pequeños cuerpos de cromatina que se originan de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que no son incorporados dentro del núcleo de las células hijas después de la mitosis, apareciendo en el citoplasma de las células en interfase como pequeños núcleos adicionales. (Schmid y Ledebur, 1973; Heddle *et al.*, 1983; Krishna, *et al.*, 1992; FDA, 2002).

Los micronúcleos pueden ser rápidamente detectados, son de forma redonda con un diámetro alrededor de 1/20 a 1/5 de un eritrocito. En las células eritroides se distinguen claramente los estadios jóvenes y maduros. Los eritrocitos jóvenes, llamados policromáticos (EPC) contienen ARN, son basófilos y el núcleo principal es expulsado y cuando se forma un MN permanece en el citoplasma enucleado. Los EPC, con el tiempo pierden el ARN y se convierten en eritrocitos maduros, denominados normocromáticos (ENC), éstos son más pequeños que los

EPC y son acidófilos. Partiendo de estas diferencias químicas y morfológicas, es posible distinguir a los eritrocitos, utilizando diferentes colorantes, tales como May-Grünenwald, Giemsa y Naranja de Acridina (NA), en esta última, al observarse al microscopio de fluorescencia, los EPC presentan color rojo debido al ARN ribosomal, a diferencia de los ENC que no se tiñen y los MN se tiñen de color verde fluorescente por la presencia de ADN (Figura 3) (Schmid y Ledebur, 1973; Hayashi *et al.*, 1990; Mavournin *et al.*, 1990).

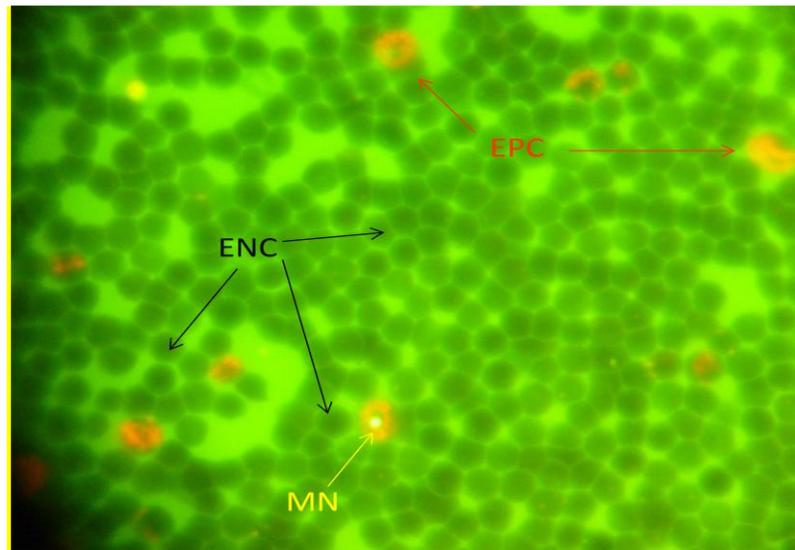


Figura 3. microneúcleo (amarillo fluorescente) en el interior de un EPC (anaranjado) rodeado de ENC (negro) 100X

El hecho de que una sustancia sea mutagénica, (es decir que altera o cambia la información genética de un organismo) en células somáticas, evidencia su potencial genotóxico (que causa daño al material genético). La positividad de las pruebas en células germinales *in vivo*, es predictiva de un riesgo genético; además se considera que los resultados de las pruebas de corta duración tienen un valor predictivo de la capacidad carcinogénica. Se ha establecido que esencialmente todos los agentes que causan rompimientos en la doble hebra de los cromosomas (clastógenos) o aquellos que interfieren con la formación del huso mitótico (aneuploidógenos) inducen MN (Vega y Reynaga, 1990; Krishna *et al.*, 1992; Mavournin *et al.*, 1990).

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer constituye un problema de salud pública a nivel mundial. Dentro de los principales tratamientos se encuentra la quimioterapia y en nuestro país el cisplatino es uno de los agentes más utilizados debido a su eficacia ante diferentes tipos de cáncer, y su mecanismo de acción se relaciona con su genotóxicidad, la cual se produce mediante la sustitución de un hidrogeno por un grupo alquilo, en grupos químicos particulares que forman parte de una gran variedad de moléculas orgánicas y principalmente sobre los átomos de nitrógeno de las bases púricas y pirimídicas, así como los grupos fosfato de las nucleoproteínas. Sin embargo, el tratamiento con cisplatino es muy costoso y altamente tóxico, además de que las células cancerosas pueden desarrollar resistencia. Lo anterior, ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos con el propósito de aumentar la efectividad, disminuir la toxicidad y abatir costos de producción. Tal es el caso de un proyecto desarrollado en la Facultad de Química (UNAM), en el cual se han sintetizado compuestos antineoplásicos basados en la química del cisplatino, pero con el centro metálico de cobre. Actualmente estos compuestos están en la fase preclínica por lo que es necesario realizar estudios de genotóxicidad antes de pasar a etapas posteriores de desarrollo del fármaco, esto de acuerdo con los requisitos de las agencias reguladoras tales como EPA, FDA, IARC entre otras. De ahí que, en la presente investigación se evaluó la genotóxicidad de la casiopeína III-ia, en comparación con el cisplatino, que es un anticancerígeno ampliamente utilizado, para lo cual se empleó el ensayo de MN en sangre periférica de ratones machos, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1, bajo tratamientos crónico y subcrónico.

Dada la semejanza de las casiopeínas® con la molécula del cisplatino la pregunta a resolver es:

¿Inducen el mismo daño genotóxico las casiopeínas® que el cisplatino?

3. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que el cisplatino induce daño genotóxico tales como los intercambios de cromátidas hermanas, las aberraciones cromosómicas y micronúcleos en tejidos tanto normales como cancerosos. Por otra parte, se ha logrado sintetizar compuestos de centro metálico basados en la química del cisplatino como lo son las casiopeínas, en las que se sustituye el platino por el cobre que es un metal menos tóxico (biológicamente esencial). Particularmente la casiopeína III-ia ha mostrado ser genotóxica en diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Entonces, en el presente estudio se espera que las casiopeínas al estar basada en la estructura química del cisplatino, inducirán daño genotóxico al ser administradas a ratones machos, hembras, hembras preñadas mediante el incremento de las frecuencias de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Comparar el efecto genotóxico del cisplatino con el efecto de la casiopeína III-ia mediante la evaluación de la inducción de EPC-MN en sangre periférica de ratones adultos macho, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1.

4.2 Particulares

- i) Comparar el efecto genotóxico del cisplatino y de la casiopeína III-ia, mediante la evaluación de EPC-MN en sangre periférica de las hembras preñadas obtenida a las 0, 24, 48 y 72 h en el tratamiento agudo y a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 h en el tratamiento subcrónico a partir del sexto día de gestación.

- ii) Comparar el efecto genotóxico del cisplatino y de la casiopeína III-ia, mediante la evaluación de EPC-MN en sangre periférica de fetos con 18 días de gestación.

- iii) Comparar el efecto genotóxico del cisplatino y de la casiopeína III-ia en ratones adultos hembras y machos, mediante la evaluación de EPC-MN en sangre periférica obtenida a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 169, 192 y 216 h en el tratamiento subcrónico.

- iv) Comparar el efecto citotóxico del cisplatino con el de la casiopeína III-ia, mediante la evaluación de la frecuencia de EPC en sangre periférica de las hembras preñadas obtenida a las 0, 24, 48 y 72 h en el tratamiento agudo y a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 142, 168, 192 y 216 h en el tratamiento subcrónico a partir del sexto día de gestación.

- v) Comparar el efecto citotóxico del cisplatino y de la casiopeína III-ia mediante la evaluación de EPC-MN en sangre periférica fetal obtenida el día 18 de gestación.

- vi) Comparar el efecto citotóxico de cisplatino y de la casiopeína III-ia e ratones adultos hembras y machos, mediante la evaluación de la frecuencia de EPC en sangre periférica a las 0, 24, 48 y 72 h en el tratamiento agudo y a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 h en el tratamiento subcrónico.

5. MATERIAL Y METÓDO

5.1 Animales

Se emplearon ratones machos, hembras sin preñar de la cepa CD-1 de 2 a 3 meses de edad, con un peso corporal entre 25-32 g, los cuales se obtuvieron de la Unidad de Investigación Animal de la Facultad de Química de la UNAM (Bioterio UNAM-Harlan). Fueron alimentados con nutricubos (Purina®), con libre acceso al agua y se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12-12 h). En el caso de las hembras gestantes, las cruas se realizaron colocando un macho con dos hembras durante la noche (de las 7 p.m. a las 7 a.m.) se tomó como día 0 de preñez la presencia de tapón espermático y a partir de ese momento las hembras fueron pesadas cada tercer día hasta el momento de su sacrificio (García-Rodríguez, 1996).

5.2 Protocolos y tratamientos

Se emplearon tres protocolos: a) machos, b) hembras sin gestar y c) hembras gestantes, en cada protocolo se aplicaron tratamientos agudo y subcrónico.

En cada protocolo se contó con tres grupos de cinco animales cada uno y se distribuyeron de la siguiente manera:

1. Grupo testigo, se le administró únicamente 0.25 mL del vehículo.
2. Grupo tratado A, se le administró 8 mg kg^{-1} de peso corporal de cisplatino (dosis terapéutica, Rosenberg, 1985) diluido en un volumen de 0.25 mL de agua destilada.
3. Grupo tratado B, se le administró 7 mg kg^{-1} de peso corporal de Casiopeína III-ia ($1/2 \text{ LD}_{50}$, Leal-García *et al.*, 2006) diluido en un volumen de 0.25 mL de agua destilada.

A las hembras preñadas tratadas con cisplatino, se les administró una dosis más baja (4 mg kg^{-1}) para evitar abortos.

Para el tratamiento agudo se aplicó una sola dosis a las 0 horas y para el tratamiento subcrónico se aplicaron 5 dosis a las 0, 48, 96, 144 y 192 horas.

Todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.).

TRATAMIENTO AGUDO



MACHOS Y HEMBRAS



8 mg kg⁻¹ cisplatino
7 mg kg⁻¹ cas III-ia

HEMBRAS PREÑADAS



4 mg kg⁻¹ cisplatino
7 mg kg⁻¹ cas III-ia

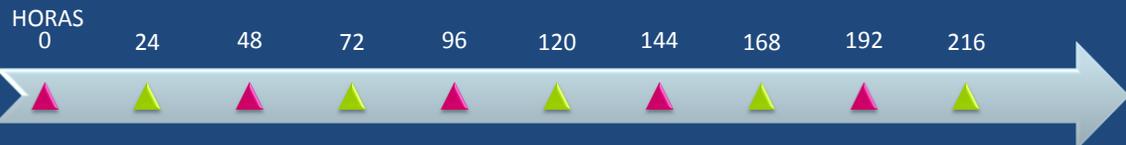
- Toma de muestra y aplicación del tratamiento
- Toma de muestra

Sacrificio
(obtención de
sangre fetal)

TRATAMIENTO SUBCRÓNICO

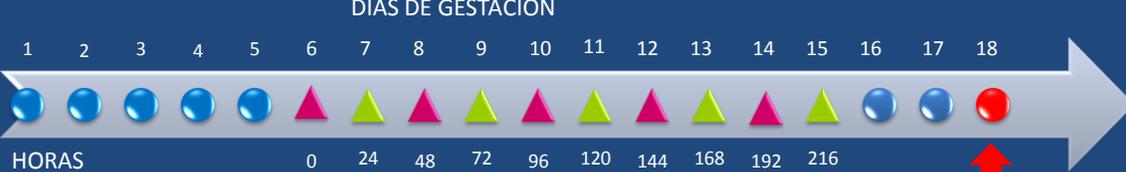


MACHOS Y HEMBRAS



8 mg kg⁻¹ cisplatino
7 mg kg⁻¹ cas III-ia

HEMBRAS PREÑADAS



4 mg kg⁻¹ cisplatino
7 mg kg⁻¹ cas III-ia

- Toma de muestra y aplicación del tratamiento
- Toma de muestra

Sacrificio y
obtención de
sangre fetal

5.3 Preparación de las laminillas con naranja de acridina

Se disolvió la naranja de acridina en agua destilada a una concentración de 2 mg mL⁻¹. De esta solución se tomaron 10 µL y se colocaron sobre portaobjetos precalentados (aprox. 70°C), con ayuda de otro portaobjetos se extendió el colorante. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron lejos de una fuente de luz (Hayashi, *et al.*, 1990).

5.4 Obtención de muestras

5.4.1 Organismos adultos

Machos y hembras

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron a las 0, 24, 48 y 72 horas de aplicado el tratamiento agudo, para el tratamiento subcrónico se obtuvieron las muestras a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 horas postratamiento. Con unas tijeras se corto la punta de la cola y con ayuda de una micropipeta se tomaron 5 µL de sangre periférica (s.p.) la cual se colocó directamente en las laminillas preparadas con NA, posteriormente se colocó un cubreobjetos y se selló con pegamento Rubert Cement. Las preparaciones se guardaron en una caja de plástico lejos de una fuente de luz y temperatura de 4°C y se analizaron después de 12 horas; se procuró no analizar las laminillas después de 5 días de haber sido preparadas, ya que estas preparaciones no son permanentes y pueden contaminarse. Se prepararon dos laminillas por animal.

Hembras gestantes

Las muestras se obtuvieron a las 0, 24, 48 y 72 horas de aplicado el tratamiento agudo, para el tratamiento subcrónico se obtuvieron las muestras a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 horas post-tratamiento.

5.4.2 Fetos

Después de sacrificar a la madre por medio de dislocación cervical se extrajo el útero y se colocó en una mezcla fría (0 ± 1) de solución Tyrodes (Sigma); suero inactivado con calor (Gibco BRL) en una relación 1:1 (solución A). Los fetos se removieron del útero, se tomaron 5 al azar y se lavaron con solución A, luego son lavados con suero fetal frío, se les decapitó con unas tijeras y se obtuvieron 5 μ l de s.p. con una micropipeta. La s.p. se colocó directamente sobre laminillas preparadas con NA. Se prepararon dos laminillas por feto (King y Wild, 1979).

5.5 Evaluación de micronúcleos

Con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2) con filtros DIA-ILL y Triple D-F-T y un objetivo de 100X se realizó la cuantificación de 1000 eritrocitos, distinguiendo los ENC de los EPC, para la evaluación del daño citotóxico mediante la evaluación de la frecuencia de EPC. Además se contaron 2000 EPC de los cuales se identificaron la presencia de (EPC-MN) o ausencia de MN. La inducción neta de la frecuencia (NIF) de EPC-MN y la diferencia en la inducción neta (DIF) se calculó de la siguiente manera (García-Rodríguez, *et al.*, 2001):

$$\text{NIF} = \text{MN observados en "A" a la hora } x_i - \text{MN observados en "A" a la } x_0$$

$$\text{DIF} = \text{MN observados en "A" a la hora } x_i - \text{MN observados en "A" a la } x_0$$

Donde:

A = grupo; x = tiempo de evaluación; x_0 tiempo 0; T = grupo testigo

5.6 Análisis estadístico

Los resultados de la evaluación de MN y de la frecuencia de EPC se presentan en media \pm desviación estándar y se compararon aplicando la prueba estadística ANOVA, seguida de una Tukey. Los resultados de fetos vivos, muertos y las reabsorciones se muestran como media \pm desviación estándar y se analizaron mediante la prueba estadística ANOVA, seguido de una Tukey. Para la realización de las pruebas estadísticas se empleo el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 21 y el nivel de significancia usado en todos los análisis fue de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Tratamiento agudo en machos y hembras sin preñar

Los resultados muestran que la administración aguda de cisplatino produce incremento significativo en la frecuencia de EPC-MN en las horas 24 y 48, mientras que se observa la disminución en el número de EPC para hembras (cuadro 1) y machos (cuadro 2), a partir de la hora 24. Por otro lado la administración aguda de casiopeína III-ia no produce ningún efecto en la frecuencia de EPC así como tampoco en la de EPC-MN para machos y hembras.

Al calcular la inducción neta de la frecuencia (NIF) figuras 2a y 2b, y la inducción diferencial de EPC-MN (DIF) figuras 3a y 3b, se aprecia que tanto en las hembras como en los machos tratados con cisplatino, existe un efecto claro de genotoxicidad, a partir de la hora 24 y alcanza su máximo a la hora 48, no así en las hembras y machos tratados con casiopeína III-ia en donde no hay un incremento.

Cuadro 1. Tratamiento agudo en hembras

Tratamiento	Hora	n	Hembras			
			EPC/2000 cels.±d.s.	ANOVA	EPC-MN/2000 cels±d.s.	ANOVA
Testigo	0	5	52.1±18.6		0.6±0.8	
	24		59.0±8.4		2.0±0.3	
	48		67.9±12.5		2.2±1.0	
	72		66.8±3.9		1.3±0.6	
Cisplatino	0	5	56.1±15.0		1.1±0.4	
	24		45.1±9.4		5.2±5.4	
	48		16.4±9.6	a,b,c,d,e	14.9±8.0	a,b,c,d,e
	72		7.7±15.1	f	1.3±2.6	
Casiopeína III-ia	0	5	49.5±5.8		0.6±0.2	
	24		49.2±12.9		1.7±0.5	
	48		51.3±13.1		1.6±1.2	
	72		70.7±12.2		2.1±1.4	

p<0.05

MN: ^a: vs testigo 48 h; ^b: cisplatino 0 h; ^c: cisplatino 24 h; ^d: cisplatino 72 h; ^e: vs casiopeína 48 h

EPC: ^a: vs testigo 48 h; ^b: cisplatino 0 h; ^c: cisplatino 24 h; ^d: cisplatino 72 h; ^e: vs casiopeína 48 h; ^f: vs casiopeína 72

Cuadro 2. Tratamiento agudo en machos.

Tratamiento	Hora	n	Machos			
			EPC/2000 cels.±d.s	ANOVA	EPC-MN/2000 cels.±d.s.	ANOVA
Testigo	0	5	44.9±9.0		0.8±0.6	
	24		63.7±9.7		0.9±0.6	
	48		65.3±9.4		0.9±0.7	
	72		58.6±5.6		1.4±0.9	
Cisplatino	0	5	59.7±19.1		1.0±0	
	24		39.2±7.8	a,g	4.6±2.	
	48		17.8±8.3 ^c	b,c,d,h	42.2±11.2	abcde
	72		14.3±18.4	e,f,i	1.5±2.1	
Casiopeína III- ia	0	5	51.5±9.2		0.8±0.9	
	24		56.6±5.8		1.9±1.3	
	48		48.4±12.6		2.2±0.8	
	72		65.3±9.8		1.9±0.8	

p<0.05

MN: ^a: vs testigo 48 h; ^b: vs cisplatino 0 h; ^c: vs cisplatino 24 h; ^d: vs cisplatino 72 h; ^e: vs casiopeína 48 h

EPC: ^a: vs testigo 24 h; ^b: vs testigo 48 h; ^c: vs cisplatino 0 h; ^d: vs cisplatino 24 h; ^e: vs cisplatino 0 h; ^f: vs cisplatino 24 h; ^g: vs casiopeína 24 h; ^h: vs casiopeína 48; ⁱ: vs casiopeína 72h

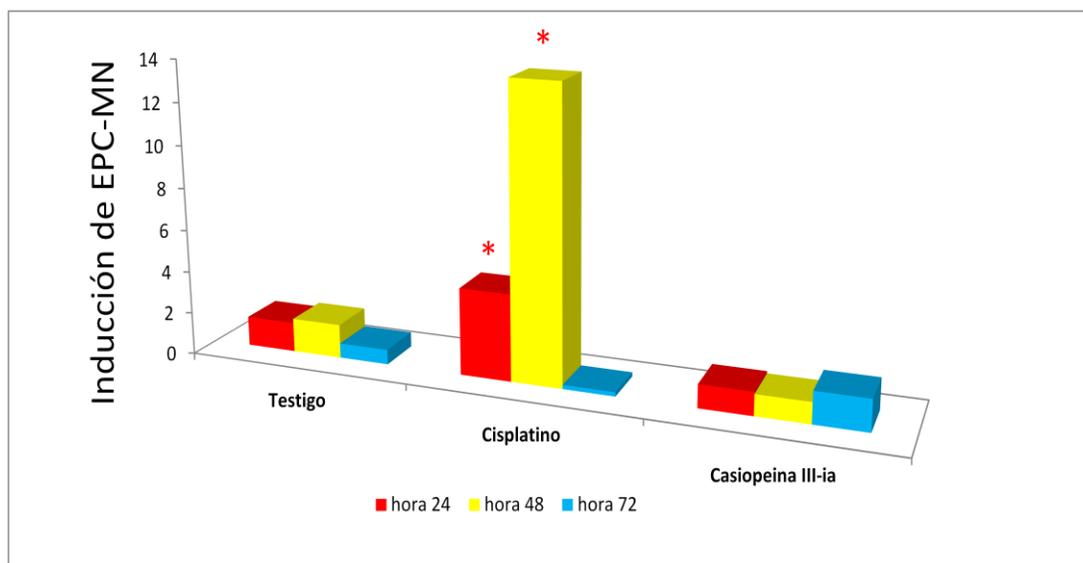


Figura 2a. Inducción Neta de la Frecuencia de EPC-MN en hembras con tratamiento agudo (*:p<0.05).

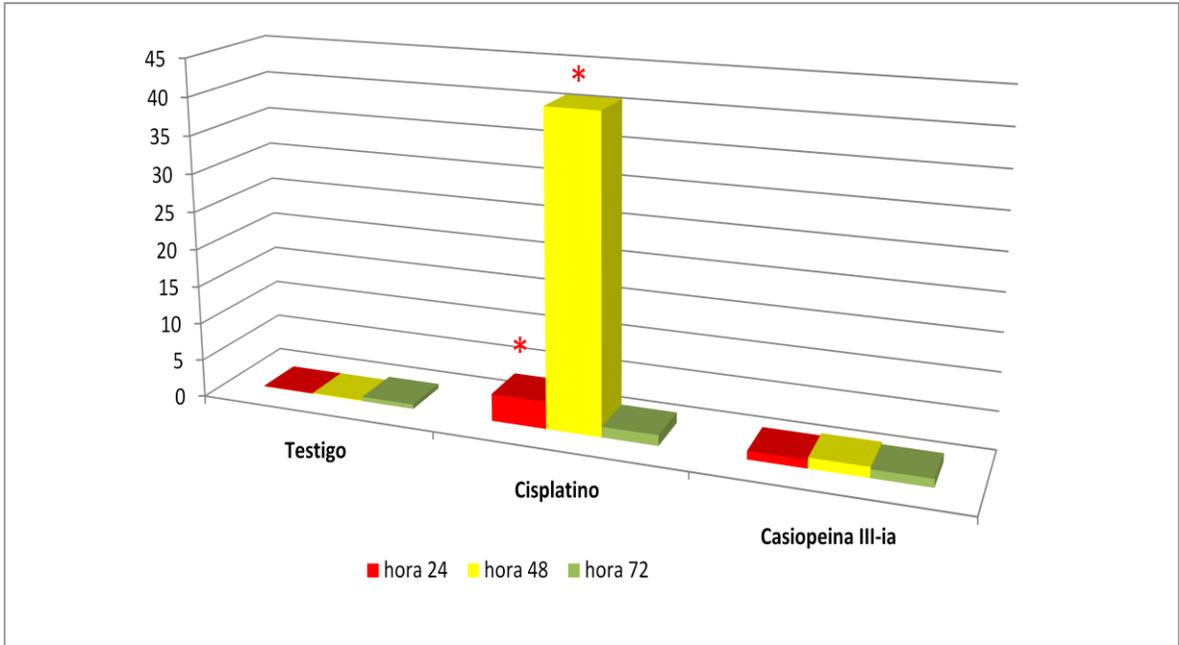


Figura 2b. Inducción Neta de la Frecuencia de EPC-MN en machos con tratamiento agudo (*:p<0.05)

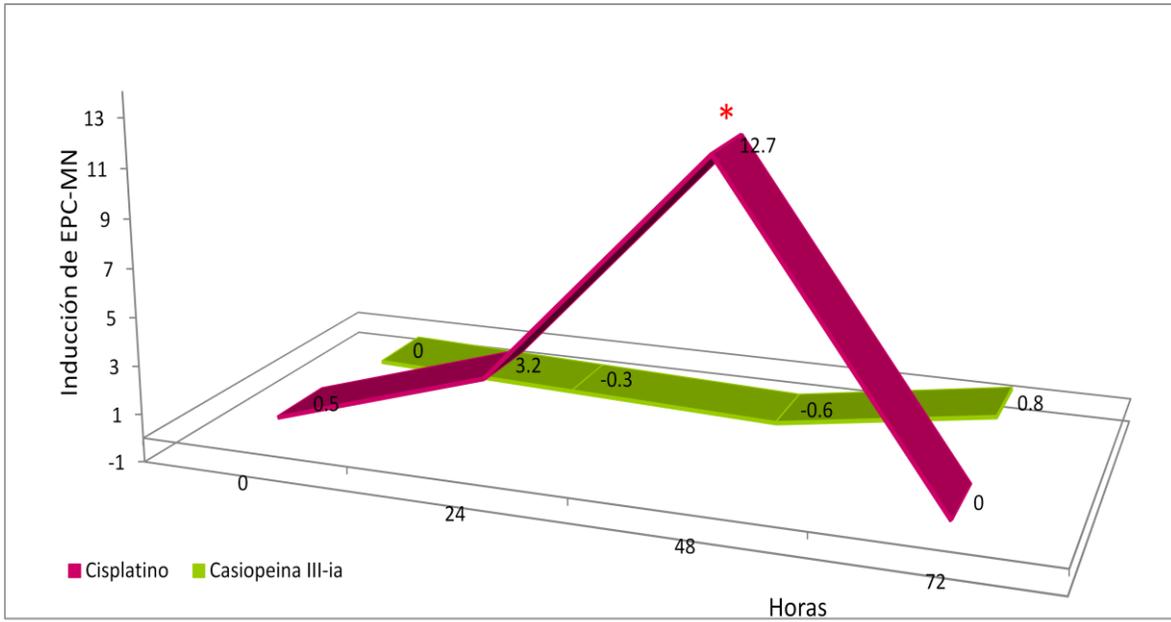


Figura 3a. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN en hembras con tratamiento agudo (*:p<0.05)

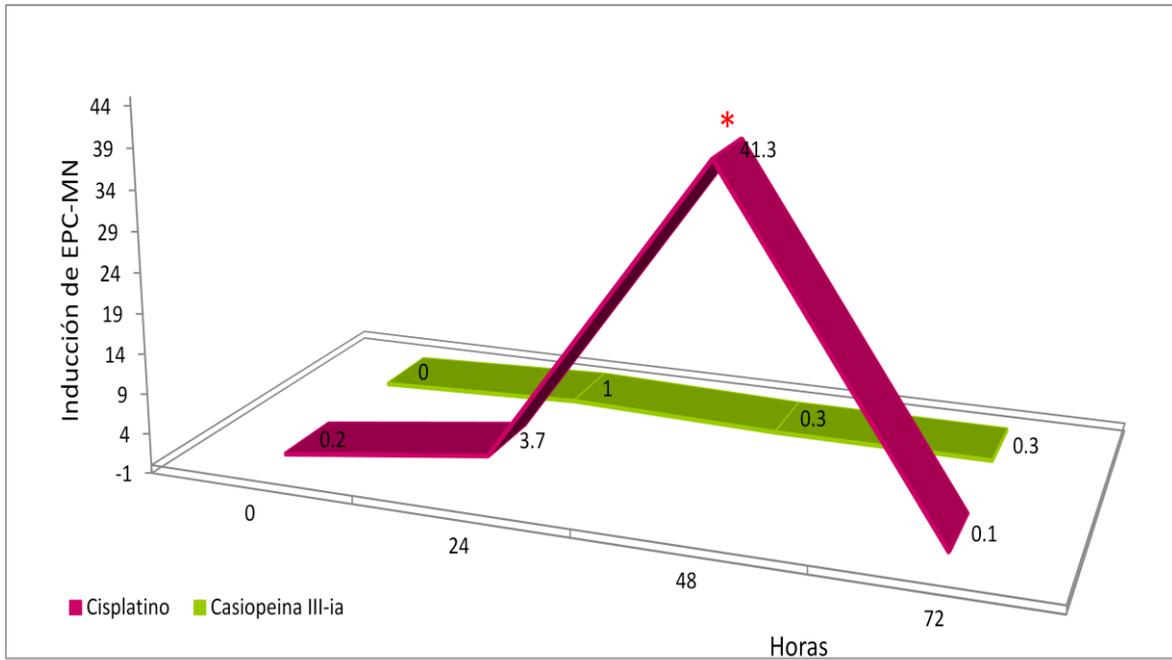


Figura 3b. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN en machos con tratamiento agudo (*:p<0.05)

Tratamiento agudo en hembras preñadas

Los resultados de la frecuencia de EPC y EPC-MN (cuadro 3), en donde se observa que la administración aguda de cisplatino produce un incremento significativo en la frecuencia de EPC-MN en la hora 48, mientras que a la misma hora, se registra una disminución en el número de EPC. Por otro lado la administración aguda de casiopeína III-ia no produce efectos en la frecuencia de EPC, así como tampoco en la de EPC-MN.

Al calcular la inducción neta y diferencial de la frecuencia de EPC-MN (NIF y DIF) se observa en la figura 4 y figura 5 respectivamente, en las hembras tratadas con cisplatino, un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de MN, no así en aquellas tratadas con casiopeína III-ia en donde no hay efecto alguno.

Cuadro 3. Tratamiento agudo en hembras preñadas

Tratamiento	Hora	n	Hembras			
			EPC/2000 cels.±d.s.	ANOVA	EPC-MN/2000 cels.±d.s.	ANOVA
Testigo	0	5	94.8±3.9		0.4±0.4	
	24		109.1±17.2		0.8±0.7	
	48		142.8±34.1	a,b	0.7±0.6	
	72		167.0±96.8	c,d	0.8±0.7	
Cisplatino	0	5	170.7±178.7		1.4±1.0	
	24		71.6±12.8	e	4.0±2.1	e
	48		51.6±29.5	f,g	6.2±2.6	a,b,c,d,g
	72		81.5±44.5	h,i	1.5±1.5	
Casiopeína III-ia	0	5	100.0±16.2		1.0±1.1	
	24		96.8±12.7		0.6±0.4	
	48		110.3±37.1	j	0.7±0.7	
	72		117.6±32.1	k	1.5±1.0	

MN: ^a: vs testigo 48 h; ^b: vs cisplatino 0 h; ^c: vs cisplatino 72 h; ^e: vs casiopeína 24 h; ^g: vs casiopeína 48 h
 EPC: ^a: vs testigo 0 h; ^b: vs testigo 24 h; ^c: vs testigo 0 h; ^d: vs testigo 24 h; ^e: vs cisplatino 0 h; ^f: vs cisplatino 0 h; ^g: vs cisplatino 24 h; ^h: vs cisplatino 0 h; ⁱ: vs cisplatino 48 h; ^j: vs testigo 48 h; ^k: vs testigo 72h

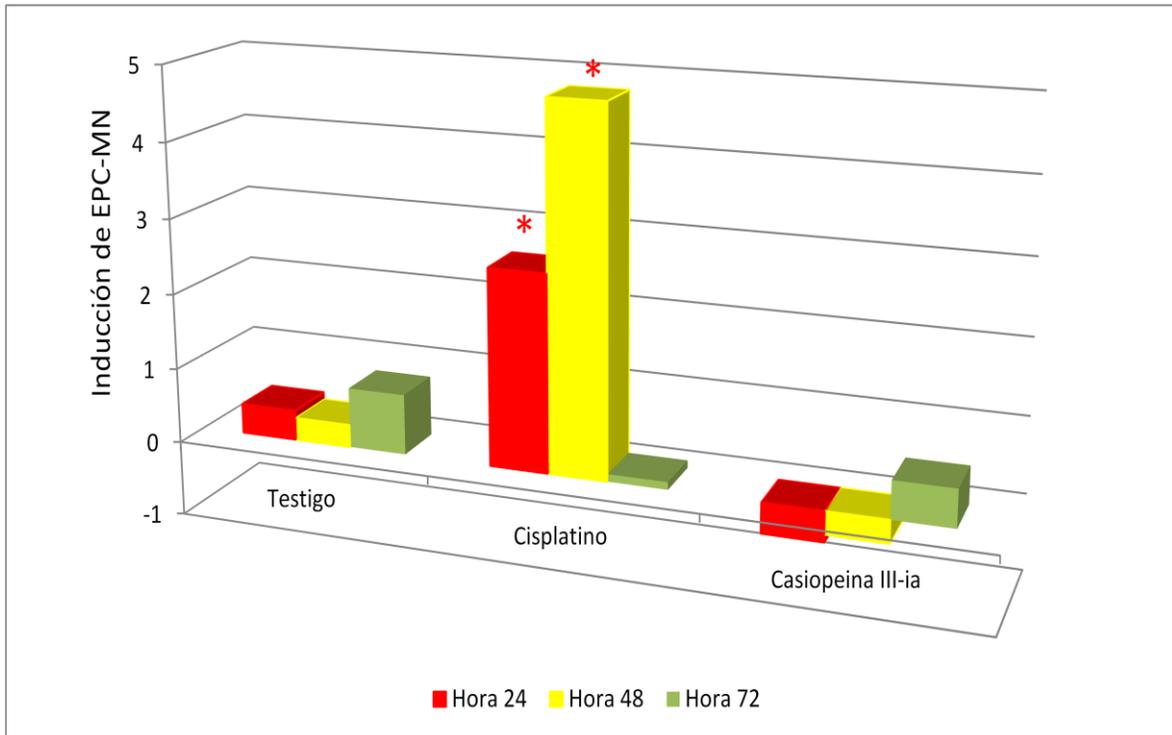


Figura 4. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN en hembras preñadas con tratamiento agudo (*:p<0.05)

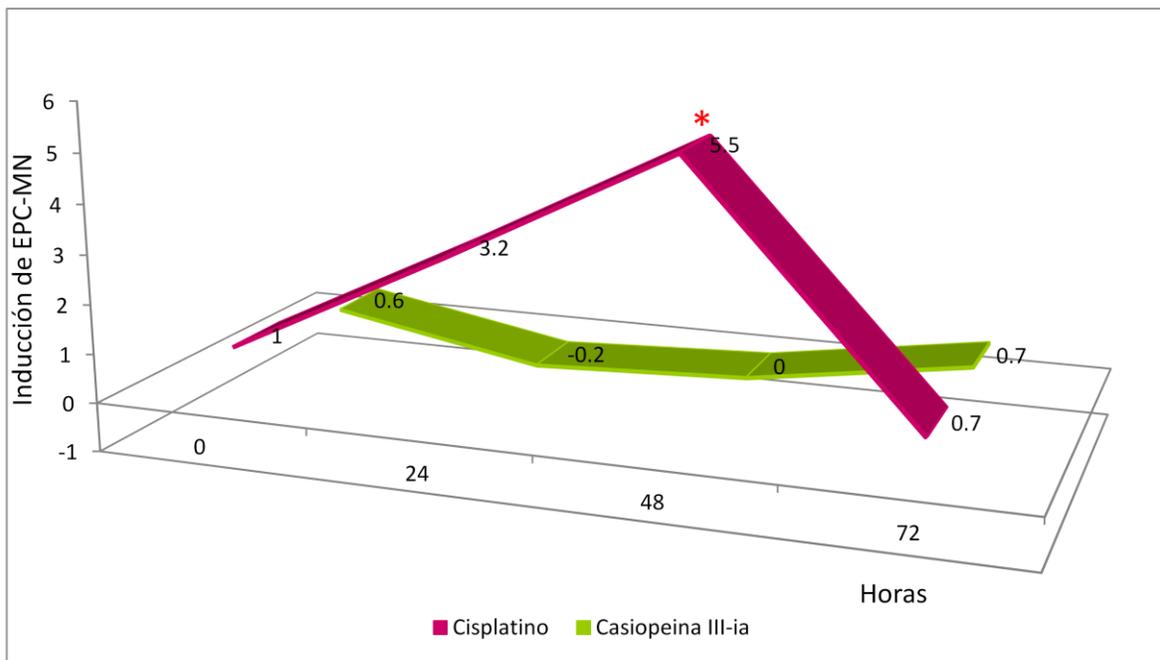


Figura 5. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN en hembras preñadas con tratamiento agudo (*:p<0.05)

Fetos de hembras con tratamiento agudo

La frecuencia de EPC y de EPC-MN (cuadro 4), muestra que la administración aguda de cisplatino produce un incremento significativo en la frecuencia de EPC, no así en la frecuencia de EPC-MN en donde no hay efecto.

Por otro lado la administración aguda de casiopeína III-ia no produce efecto en la frecuencia de EPC-MN ni en la de EPC.

Al calcular la inducción diferencial de la frecuencia (DIF) de los EPC-MN (figura 6) se observa, que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales.

Cuadro 4. Fetos de hembras con tratamiento agudo

Tratamiento	N	EPC/2000 cels.±d.s.	ANOVA	EPC-MN/2000 cels.±d.s.
Testigo	25	1117.92±712.32		1.18±1.0
Cisplatino	25	1924.1±1318.0	a,b	3.4±2.2
Casiopeína III-ia	25	1122.75±714.04		2.22±1.52

EPC: ^a:vs testigo; ^c:vs casiopeína

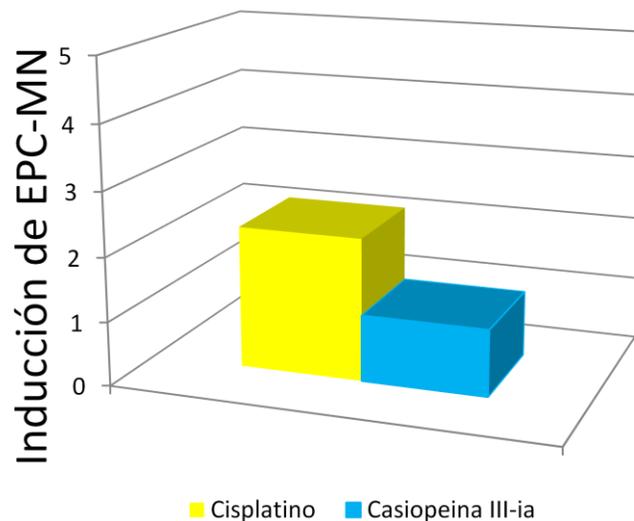


Figura 6. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN en fetos de hembras preñadas con tratamiento agudo (*:p<0.05)

Tratamiento subcrónico en machos y hembras sin preñar

En el tratamiento subcrónico administrado a hembras y machos, la frecuencia de EPC y EPC-MN, indica que la administración aguda de cisplatino produce un incremento significativo en la frecuencia de EPC-MN, mientras que se observa una disminución en el número de EPC para machos (cuadro 6) y hembras (cuadro 5), a partir de las horas 24 y 48.

Por otro lado la administración aguda de casiopeína III-ia no produce ningún efecto en la frecuencia de EPC en las hembras, pero en los machos se observa un efecto a partir de la hora 168. Así mismo en la frecuencia de EPC-MN para machos y hembras no existe incremento alguno.

Al determinar la inducción neta de la frecuencia (NIF) figuras 7a y 7b, y la inducción diferencial de la frecuencia (DIF) figuras 8a y 8b de EPC-MN tanto en las hembras como en los machos tratados con cisplatino, existe un efecto claro de genotóxicidad, no así en los machos y hembras tratados con casiopeína III-ia en donde no hay un incremento.

Cuadro 5. Tratamiento subcrónico en hembras sin preñar

Tratamiento	Hora	N	Hembras			
			EPC/2000 cels.±d.s.	ANOVA	EPC-MN/2000 cels.±d.s.	ANOVA
Testigo	0	5	39.2±7.6		0.2±0.4	
	24		33.2±2.5		1.5±0.7	
	48		29.6±6.7		1.8±0.7	
	72		34.0±7.3		2.2±2.1	
	96		44.1±13.0		3.6±1.2	
	120		39.4±11.0		2.0±1.1	
	144		53.2±21.5		1.2±1.0	
	168		48.8±17.8		1.4±0.7	
	192		48.0±9.7		1.2±1.2	
	216		51.9±8.1		1.3±0.4	
Cisplatino	0	5	41.2±4.3		0.5±0.7	
	24		26.6±2.6	a,b,f	11.6±6.3	a,b,f
	48		5.2±1.8	c,d,e,g	29.7±13.2	c,d,e,g
	72		ND		ND	
	96		ND		ND	
	120	4	ND		ND	
	144	2	ND		ND	
	168	0	ND		ND	
	192		ND		ND	
	216		ND		ND	
Casiopeína III-ia	0	5	30.7±7.1		0.2±0.7	
	24		34.1±3.7		0.8±0.5	
	48		33.8±5.7		1.7±1.3	
	72		32.4±3.5		1.8±0.7	
	96		33.1±2.0		1.4±0.6	
	120		32.2±4.4		0.8±0.8	
	144		37.8±7.9		1.6±0.7	
	168		33.9±9.1		2.1±1.0	
	192		41.1±12.3		1.2±0.7	
	216		51.4±11.8		1.9±0.8	

p<0.05

MN: ^a: vs testigo 24 h; ^b: vs cisplatino 0 h; ^c: vs testigo 48 h; ^d: vs cisplatino 0 h; ^e: vs cisplatino 48 h; ^f: vs casiopeína 24 h; ^g: vs casiopeína 48 h

EPC: ^a: vs testigo 24 h; ^b: vs cisplatino 0 h; ^c: vs testigo 48 h; ^d: vs cisplatino 0 h; ^e: vs cisplatino 48 h; ^f: vs casiopeína 24 h; ^g: vs casiopeína 48 h

Cuadro 6. Tratamiento subcrónico en machos

Tratamiento	Hora	N	Machos			
			EPC/2000 cels.±d.s.	ANOVA	EPC-MN/2000 cels±d.s.	ANOVA
Testigo	0	5	33.9±1.4		0.4±0.4	
	24		44.2±4.8		1.5±0.7	
	48		46.6±4.0		1.6±0.4	
	72		53.4±4.3		0.7±0.6	
	96		50.0±4.8		1.8±1.2	
	120		58.0±6.5	a	1.0±0.5	
	144		64.1±5.0	b	1.1±1.0	
	168		74.3±4.9	c	0.7±0.4	
	192		71.5±4.6	d	1.5±1.0	
	216		69.4±2.8	e	1.2±0.5	
Cisplatino	0	5	30.9±3.0		1.1±0.4	
	24		28.3±9.3		5.3±1.9	a,b
	48		9.2±4.4	f,g,h	8.7±8.4	c,d,e
	72		ND		ND	
	96		ND		ND	
	120		ND		ND	
	144	3	ND		ND	
	168		ND		ND	
	192		ND		ND	
	216		ND		ND	
Casiopéina III-ia	0	5	31.8±3.2		1.5±0.5	
	24		31.6±3.4		1.8±0.2	
	48		42.5±6.2		1.2±1.1	
	72		42.1±3.7		0.7±0.9	
	96		45.9±2.8		1.3±0.8	
	120		40.4±5.9		0.9±0.8	
	144		57.2±13.8		1.0±0.6	
	168		68.8±7.0		1.3±1.0	
	192		76.0±13.4		1.6±0.6	
	216		75.0±14.3		3.0±1.0	

p<0.05

MN: ^a: vs testigo 24 h; ^b: vs cisplatino 0 h; ^c: vs testigo 48 h; ^d vs cisplatino 0 h; ^e: vs cisplatino 48 h; ^f: vs casiopéina 24 h; ^g: vs casiopéina 48 h

EPC: ^a: vs testigo 0 h; ^b: vs testigo 0 h; ^c: vs testigo 0 h; ^d: vs testigo 0 h; ^e: vs testigo 0 h; ^f: vs testigo 48 h; ^g: vs cisplatino 0 h; ^h: vs casiopéina 48 h

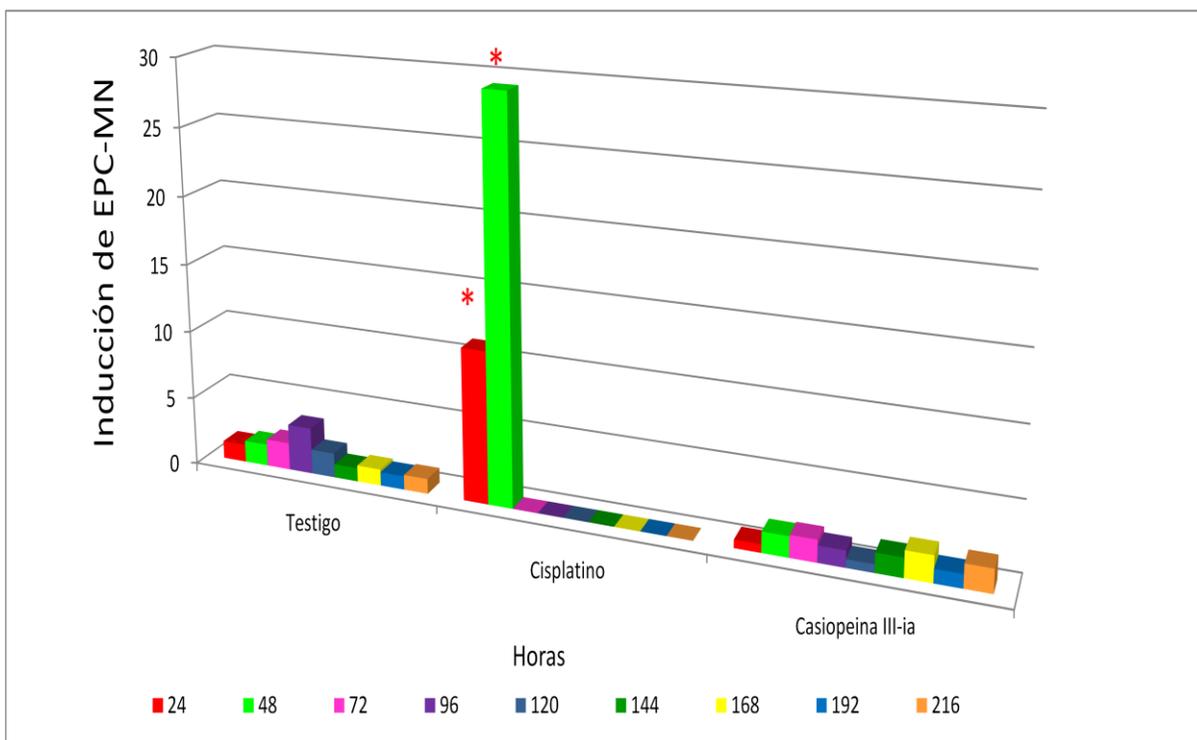


Figura 7a. Inducción Neta de la Frecuencia de EPC-MN en hembras con tratamiento subcrónico (*:p<0.05)

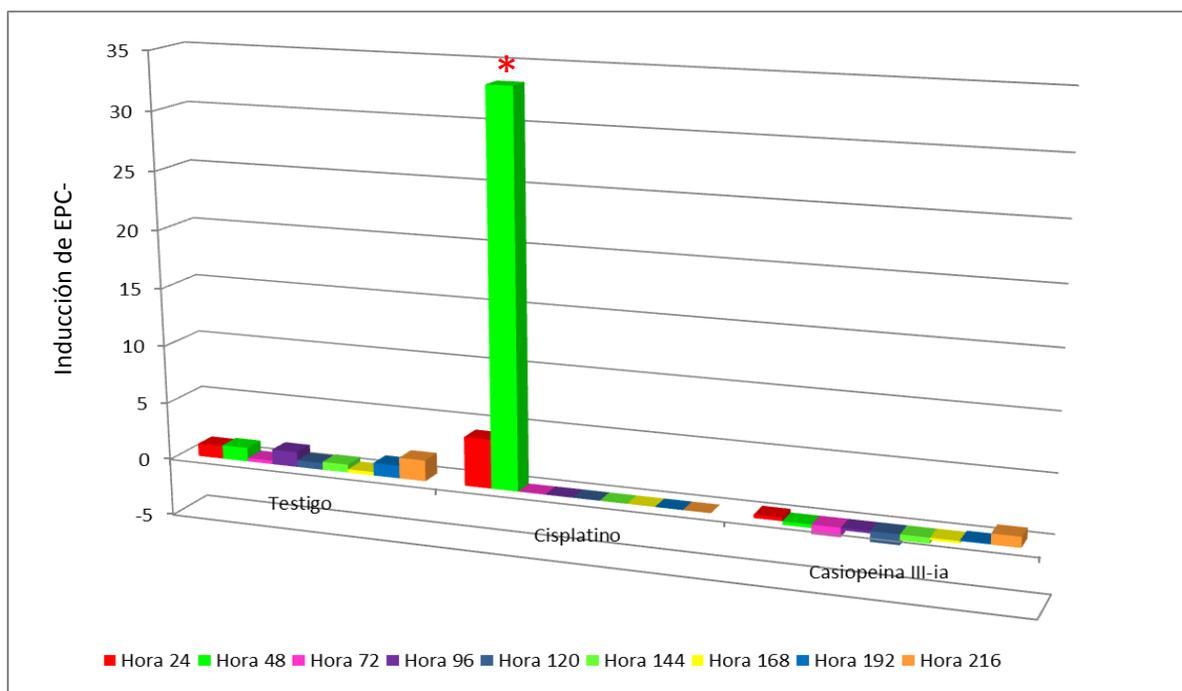


Figura 7b. Inducción Neta de la Frecuencia de EPC-MN en machos con tratamiento subcrónico (*:p<0.05)

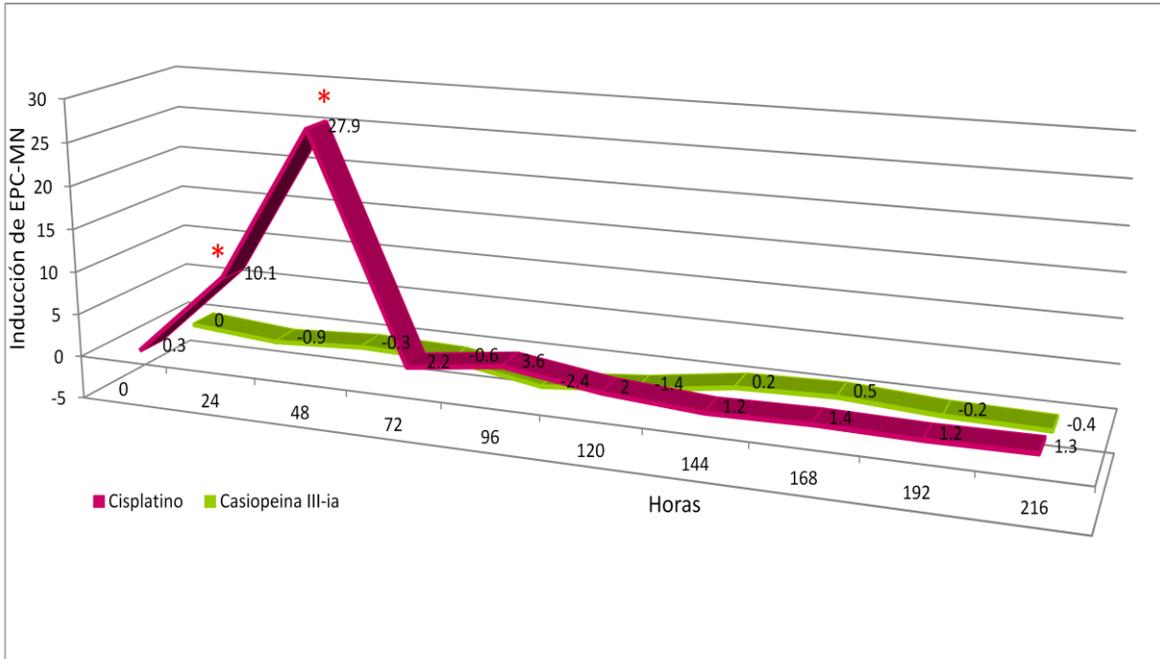


Figura 8a. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN en hembras con tratamiento subcrónico (*:p<0.05)

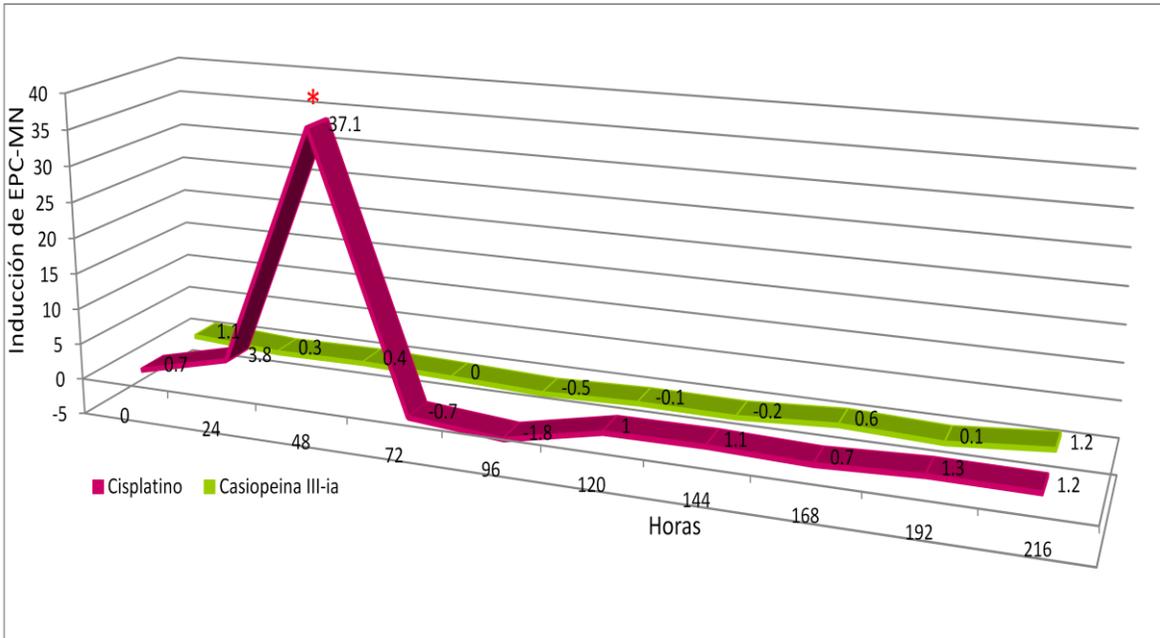


Figura 8b. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN en machos con tratamiento subcrónico (*:p<0.05)

Tratamiento subcrónico en hembras preñadas

En hembras preñadas a las que se les administro el tratamiento subcrónico, los resultados obtenidos de la frecuencia de EPC y EPC-MN (cuadro 7), muestran que la administración subcrónica de cisplatino produce un incremento significativo en la frecuencia de EPC-MN, mientras que se observa una clara disminución en el número de EPC en hembras.

Por otro lado la administración aguda de casiopeína III-ia no produce ningún efecto en la frecuencia de EPC así como tampoco en la de EPC-MN para las hembras del grupo tratado. Al calcular la inducción neta (figura 9) y la diferencial (figura 10) de la frecuencia de EPC-MN (NIF y DIF) se aprecia que en las hembras tratadas con cisplatino, existe un efecto claro de genotoxicidad, no así en el grupo con casiopeína III-ia en donde no hay un incremento en el número de MN.

Cuadro 7 Tratamiento subcrónico en hembras preñadas

Tratamiento	Hora	N	Hembras			
			EPC/2000 cels.±d.s.	ANOVA	EPC-MN/2000 cels.±d.s.	ANOVA
Testigo	0	5	118.81±67.96		1.4±0.41	
	24		102.75±25.39		0.9±0.41	
	48		128.16±19.41		0.9±0.54	
	72		147.45±35.86		1.1±0.41	
	96		125.51±27.27		1.2±0.57	
	120		153.73±25.58		1.9±0.82	
	144		157.28±14.60		1.2±0.90	
	168		134.36±29.06		0.9±0.65	
	192		165.48±91.65		1.3±0.57	
	216		103.57±16.21		0.8±0.44	
Cisplatino	0	5	85.81±7.68		1.3±1.15	
	24		67.67±13.44		5.2±2.48	a,b,i
	48		29.56±23.70	a	31.0±13.75	c,d,e,j
	72		33.76±47.46	b,c	5.4±4.91	t,g,h,k
	96		32.43±49.92	d,e	2.4±2.60	
	120		28.59±33.41	f	8.1±8.39b	
	144		8.42±8.31		9.1±10.70	
	168		0.3±0.67		1.8±4.02	
	192		ND		ND	
	216		ND		ND	
Casiopeína III-ia	0	5	99.44±9.06		1.9±1.14	
	24		88.81±10.77		1.0±0.61	
	48		100.03±15.33		1.3±0.57	
	72		108.75±18.10		1.8±1.60	
	96		126.03±6.71		1.0±1.17	
	120		111.28±8.72		1.7±1.03	
	144		116.77±18.08		1.2±1.15	
	168		93.45±27.58		1.4±0.74	
	192		81.01±42.46		0.7±1.30	
	216		73.54±51.09		0.7±0.57	

p<0.05

MN: ^a: vs testigo 24 h; ^b: vs cisplatino 0 h; ^c: vs testigo 48 h; ^d: vs cisplatino 0 h; ^e: vs cisplatino 24 h; ^f: vs testigo 72 h; ^g: vs cisplatino 0 h; ^h: vs cisplatino 48 h; ⁱ: vs casiopeína 24 h; ^j: vs casiopeína 48 h; ^k: vs casiopeína 72 h

EPC: ^a: vs testigo 48 h; ^b: vs testigo 72 h; ^c: vs casiopeína 72 h; ^d: vs testigo 96 h; ^e: vs casiopeína 96 h; ^f: vs testigo 120 h;

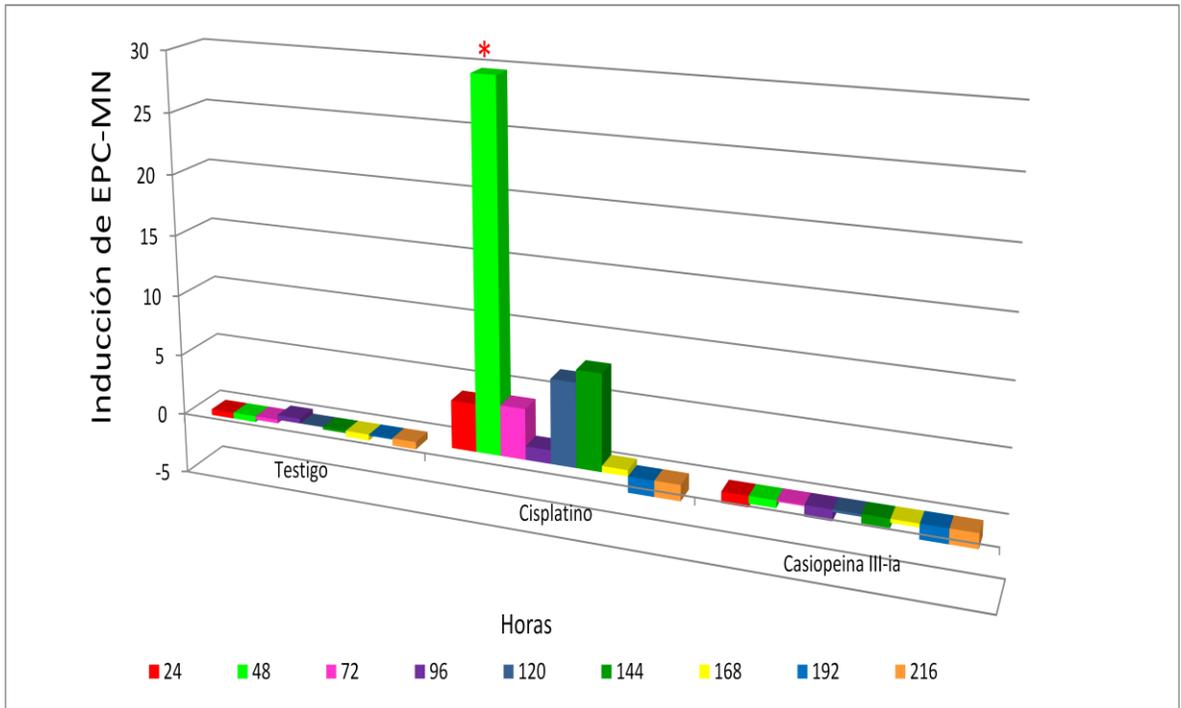


Figura 9. Inducción Neta de la Frecuencia de EPC-MN en hembras preñadas con tratamiento subcrónico (*:p<0.05)

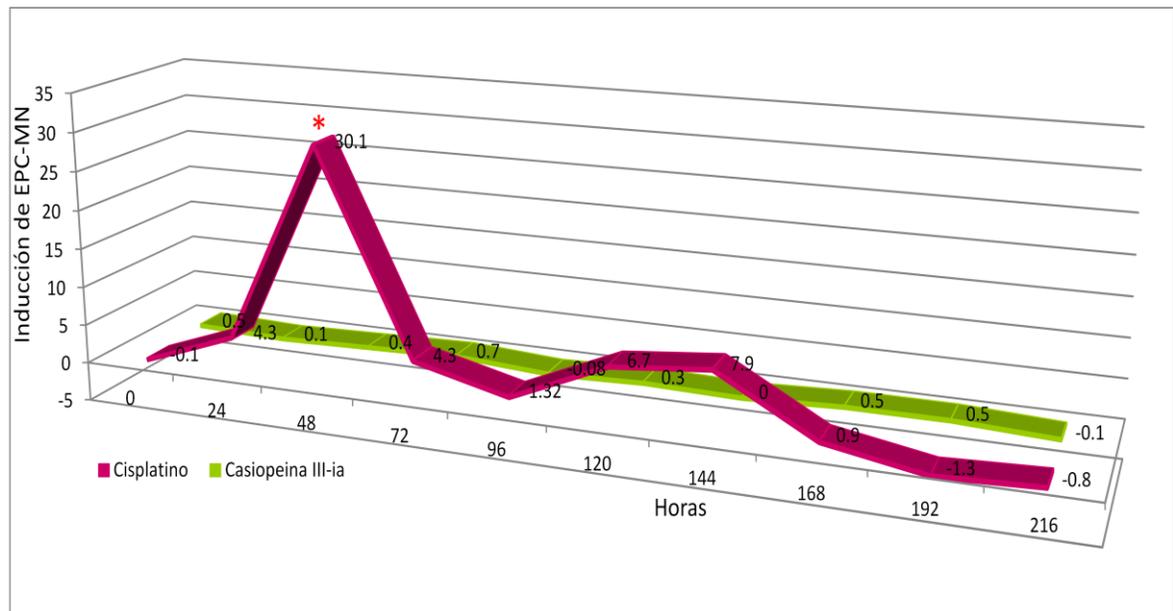


Figura 10. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN en hembras preñadas con tratamiento subcrónico (*:p<0.05)

Fetos de hembras con tratamiento subcrónico

Los resultados de la administración subcrónica de cisplatino, sobre la frecuencia de EPC y de EPC-MN en fetos (cuadro 8), muestran que no produce un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de EPC, y tampoco tiene efecto en la frecuencia de EPC-MN, sin embargo solo se obtuvieron 5 fetos de los cuales se pudo obtener sangre para dicha evaluación, ya que las madres murieron antes de concluir con el tratamiento.

Por otro lado la administración subcrónica de casiopeína III-ia produce un efecto de fetoletalidad, ya que ninguna de las hembras llegó a término de su periodo de gestación.

Al calcular la inducción diferencial de la frecuencia (DIF) de los EPC-MN (figura 11) se observa, que no existe un incremento estadísticamente significativo para los fetos tratados con cisplatino.

Cuadro 8. Fetos de hembras con tratamiento subcrónico

Tratamiento	N	EPC/2000 cels.±d.s.	EPC-MN/2000 cels±d.s.
Testigo	24	1468.28±705.76	1.04±0.70
Cisplatino	5	1419.59±245.79	2.9±1.02
Casiopeína III-ia	---	-----	-----

p<0.05

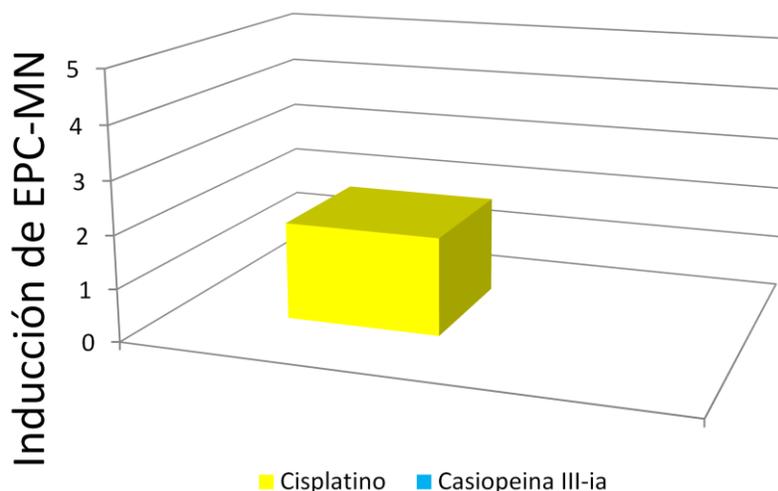


Figura 11. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN en fetos de hembras preñadas con tratamiento subcrónico

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para que una nueva sustancia pueda ser empleada como fármaco en humanos, deben ser sometidas a una serie de estudios preclínicos antes de su aplicación. Dichos estudios van desde los químicos hasta los toxicológicos, dentro de los cuales es necesario establecer la genotoxicidad (Mavournin *et al.*, 1990; Krishna, *et al.*, 1992; Müller, *et al.*, 1999). Las casiopeínas® fueron sintetizadas en la Facultad de Química de la UNAM para su posible aplicación antineoplásica en humanos, particularmente la casiopeína III-ia ha mostrado mayor actividad en comparación con las otras moléculas sintetizadas por lo que en este estudio su efecto genotóxico en ratones adultos (machos, hembras sin preñar y gestantes, así como en fetos). Se realizó un estudio comparativo con el cisplatino, el cual es un químico antineoplásico que se ha utilizado con éxito desde hace varias décadas y que induce daño genotóxico.

En el presente trabajo se utilizó una dosis de 8 mg kg^{-1} de cisplatino para machos y hembras, mientras que para las hembras preñadas de 4 mg kg^{-1} . En estudios realizados por Kliesch y Adler (1987), al administrar 5 mg kg^{-1} de cisplatino, se observó un incremento en la frecuencia de MN de alrededor de 57 EPC-MN en medula ósea de ratón con respecto a su testigo. Por otra parte Mazur *et al.*, (2000), utilizó una sola administración de 5 mg kg^{-1} de cisplatino en ratones, la cual indujo en promedio 100 EPC-MN en medula ósea y 45 EPC-MN en sangre periférica, al ser comparados con el testigo. Esta dosis utilizada de cisplatino corresponde aproximadamente a un medio de la dosis terapéutica para humano que es de $8\text{-}10 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso (Khyriam y Prasad, 2003).

Por otro lado, se empleó $\frac{1}{2}$ de la LD_{50} de casiopeína III-ia (7 mg kg^{-1}), ya que es la posible dosis terapéutica inicial propuesta para humanos, al comparar los resultados obtenidos con los reportados para el cisplatino (Kliesch y Adler, 1987; Mazur *et al.*, 2000), esta no demostró ser un claro inductor de MN, lo cual hace suponer que aunque la molécula de la casiopeína III-ia es parecida a la del

cisplatino y está basada en su estructura química, el cambio del platino por el cobre modifica la respuesta del daño al ADN ya que no induce MN.

En el tratamiento agudo de casiopeína III-ia administrado a machos, hembras sin preñar y hembras preñadas no se observó ningún cambio significativo en el número de EPC-MN ni en la frecuencia de EPC, esto en comparación con su testigo. En comparación con el cisplatino donde se observó un efecto estadísticamente significativo a la hora 48 y 72 en el caso de las hembras y machos, donde se registro un efecto citotóxico, al observarse una disminución en la cantidad de EPC de aproximadamente el 70 y 85% respectivamente. Para el grupo de hembras preñadas con tratamiento agudo la frecuencia de EPC registro el mismo efecto citotóxico, con una disminución entre el 52 y 82%. Los resultados del tratamiento agudo con cisplatino en hembras sin preñar y machos, concuerdan con los obtenidos por Kliesch y Adler (1987) y Mazur *et al.*, (2000), ya que se obtuvo un incremento estadísticamente significativo, debido a que se observó un promedio de 14 MN en hembras y 41 MN en machos, en ambos casos la máxima inducción se alcanzó a la hora 48 del tratamiento. Esta diferencia en la cantidad de MN dependiendo del sexo podrían estar relacionados con las observaciones realizadas por Álvarez-Barrera y Altamirano-Lozano 1999 donde evaluaron la inducción de aberraciones cromosómicas en ratones machos y hembras tratados con una dosis baja de ciclofosfamida (agente alquilante usado en quimioterapia), donde se observa que los machos son más sensibles al tratamiento que las hembras. Lo cual puede deberse a condiciones fisiológicas que quizás alteran la respuesta al agente, tales como edad, factores estresantes y hormonales entre otros.

Si bien la casiopeína III-ia ha mostrado tener actividad antineoplásica, su mecanismo de acción, al parecer no es mediante el daño al ADN (al menos no por la inducción de MN). A la fecha el mecanismo de acción de las casiopeínas sigue siendo poco conocido, aun cuando estudios previos sugieren que las casiopeínas pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden iniciar el mecanismo de apoptosis (Mejía y Ruiz-Azuara, 2008) Existe evidencia que la

casiopeína IIgly tiene efecto apoptótico sobre glioma de rata y que puede ser dependiente o independiente de caspasas (Trejo-Solís *et al.*, 2012). Por otro lado la casiopeína III-ia y la IIgly mostraron tener actividad antineoplásica sobre células de meduloblastoma a través de la inducción de apoptosis (Mejía y Ruiz-Azuara, 2008). Así mismo la casiopeína III-ia induce apoptosis sobre células alteradas de p53, incrementa los niveles de Bax, relacionados con la inducción de apoptosis y tiene actividad antitumoral *in vivo* sobre tumores de HCT-15 en ratones nu/nu (Carvallo-Chaigneau *et al.*, 2007).

Para el caso de las hembras preñadas tratadas de forma aguda con cisplatino se observó incremento en la cantidad de MN, el cual no fue tan evidente como en las hembras sin preñar, ya que se obtuvo en promedio 6 MN a la hora 48 del tratamiento. Esto concuerda con lo obtenido por Kliesch y Adler (1987) y Mazur *et al.*, (2000). Esta diferencia entre el número de MN obtenidos en los grupos de hembras preñadas y hembras sin preñar puede deberse a factores tales como hormonales, peso, el ritmo metabólico e incluso la dosis empleada.

Por otro lado en el caso de los fetos obtenidos de las hembras preñadas tratadas con cisplatino y casiopeína III-ia no modificó la frecuencia de EPC-MN ya que se observaron en promedio 2 y 1 respectivamente. Esto difiere con los resultados obtenidos por Giavini *et al.*, 1990 donde evaluaron la inducción de MN en embriones de ratas preñadas antes de la implantación mediante la aplicación de drogas anticancerígenas, donde los productos de las hembras tratadas con una dosis de cisplatino de 6 mg kg^{-1} presentaron un alto número de blastocistos micronucleados (43 MN en promedio). Por otro lado, cuando se evaluó la frecuencia de EPC, se observó efecto estadísticamente significativo en los fetos del grupo de cisplatino, en comparación con el testigo y la casiopeína III-ia, esto probablemente debido a un mecanismo indirecto de toxicidad, el cual pudo inducir un aumento en la proliferación de eritrocitos (Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

Diferentes agencias tales como la IARC, la ICH y la FDA, mencionan que para considerar a un fármaco genotóxico, es necesario que este incremente de manera clara el número de células micronucleadas, al ser comparadas con su testigo, como en los estudios realizados por Kliesch y Adler (1987) y Mazur *et al.*, (2000), entre otros. Por lo cual se puede concluir que la casiopeína III-ia no es genotóxica (al menos no mediante la inducción de MN).

Las observaciones obtenidas hacen cuestionable el efecto genotóxico en el tratamiento subcrónico de las hembras sin preñar, ya que cuando un fármaco es genotóxico, mediante la inducción de MN, sus efectos son visibles 24 horas después de su administración, puesto que los primeros MN inducidos aparecen en sangre periférica 24 horas después de su aparición en medula ósea. Los diferentes protocolos han establecido que para que una sustancia sea genotóxica, debe observarse un efecto (en este caso MN) que debe persistir de 48 a 72 horas después de su administración, debido a que la máxima inducción de MN frecuentemente ocurre entre 30 a 48 horas después de que los EPC-MN salen al torrente sanguíneo, y son detectables hasta 24 horas después de ese pico máximo de inducción, ya que se necesitan 24 horas para que un EPC se convierta en un ENC (Mavournin *et al.*, 1990; MacGregor *et al.*, 1980).

Por otra parte al analizar los resultados obtenidos del tratamiento subcrónico en machos y hembras sin preñar, en el caso del cisplatino se observa un claro efecto genotóxico a partir de las horas 24 y 48 de 11 y 29 MN respectivamente para hembras y de 5 y 31 MN en machos, es necesario mencionar que el análisis estadístico para MN no pudo ser evaluado por que el programa no pudo correr los datos debido a que eran insuficientes. Después de estas horas se observa un claro efecto citotóxico, ya que no se pudo observar suficiente material celular para evaluar. En el caso del grupo de hembras tratado con casiopeína III-ia de manera subcrónica, no se observa efecto genotóxico o citotóxico alguno. En el grupo de machos al evaluar la frecuencia de EPC-MN no se observó efecto alguno. No obstante se observa un efecto citotóxico a partir de

la hora 144 del tratamiento. Dicho efecto es estadísticamente significativo, pero al presentarse a partir de la hora 144, no puede ser atribuible al efecto de la casiopeína III-ia, ya que de acuerdo a las agencias reguladoras como la EPA, FDA e IARC para considerar un químico citotóxico su efecto tiene que ser medible de manera inmediata a la administración, al ser comparados con sus testigos (Krishna, *et al.*, 2000). Dicho efecto pudo deberse a otros factores como el estrés generado por la manipulación constante de los individuos, lo cual puede estar alterando funciones fisiológicas, debido a factores como la vía de administración, los tiempos de administración, la dosis, la metabolización del químico, y la eliminación del mismo.

En el tratamiento subcrónico de las hembras preñadas a las que se les aplicó cisplatino se observa un claro efecto genotóxico a partir de la hora 24 y 48, estos resultados coinciden con los obtenidos por Kliesch y Adler (1987) y Mazur *et al.*, (2000). Además se presentó un efecto citotóxico a partir de la hora 48, en las muestras obtenidas posteriormente no se encontró material suficiente para evaluar ya que todas las células observadas en las laminillas eran ENC, lo cual nos indicó que no había una producción celular normal, puesto que todas las células eran maduras y no había células jóvenes.

Por otra parte se observó muerte fetal en las hembras preñadas tratadas con casiopeína III-ia, lo cual sugiere que esta pudo haber inducido un efecto toxicológico, ya que no se obtuvo ningún feto vivo y se incrementó el número de reabsorciones, lo cual es un claro signo de toxicidad. Estos daños pueden ser por dos vías diferentes; Directa, el agente atraviesa la placenta o el saco vitelino y causa toxicidad en el desarrollo embrionario (Scialli, 1992), e Indirecta; el químico induce alteraciones en la homeostasis de la madre y por lo tanto alteran el desarrollo fetal (Cole *et al.*, 1981). Se ha descrito que algunos químicos pueden atravesar el saco vitelino o la placenta e inducir directamente alteraciones en los organismos. La liposolubilidad y el tamaño de la molécula son de los principales parámetros que contribuyen en el intercambio de sustancias entre el feto y la

madre (Juchau, 1981; Scialli, 1992; Hood, 1997; Gerschenson, *et al.*, 2001). Lo cual probablemente ocurre con la casiopeína, ya que es altamente lipofílica.

Además la toxicidad materna se asocia con las alteraciones en el desarrollo del embrión o del feto por lo que una alteración en el metabolismo o fisiología de las madres a consecuencia de un agente químico puede alterar el desarrollo de las crías e inducir muerte fetal (Scialli, 1992; Hood 1997). En estudios recientes se han observado adherencias entre el intestino seroso y del hígado con el intestino seroso en animales tratados con 3 y 6 mg kg⁻¹ de casiopeína III-ia, en forma aguda, la severidad de las lesiones fue dependiente de la dosis, análisis histológicos del peritoneo visceral mostraron abundante fibrina, y cantidades moderadas de linfocitos y macrófagos infiltrados en el mismo, indicando que la casiopeína III-ia ejerce un efecto irritante crónico dependiente de la dosis (Carvallo-Chaigneau *et al.*, 2008). Esto pudo haber pasado en las hembras preñadas y haber desencadenado la muerte fetal, dado que fueron administradas una mayor cantidad de dosis.

Por otra parte, el análisis de resultados de la frecuencia de EPC, en la hembras preñadas mostro una diferencia ligeramente significativa en la ultima hora de muestreo (hora 216). Esto indica un efecto citotóxico por parte de la casiopeína III-ia, sin embargo, en un gran número de estudios no ha sido posible determinar dicho efecto en base a este parámetro, debido a la variabilidad natural que se presenta entre las distintas especies e individuos, ya que si un químico induce muerte celular, la frecuencia de EPC disminuiría, pero al mismo tiempo, esta muerte puede desencadenar la producción acelerada de eritrocitos para compensarla (Krishna, *et al.*, 2000).

Estos resultados podrían hacer pensar en una mayor susceptibilidad de las hembras hacia la casiopeína III-ia que los machos, pero en machos, hembras, hembras preñadas con tratamiento agudo y machos y hembras con tratamiento subcrónico, no se observa ninguna diferencia entre los resultados de

genotóxicidad o citotoxicidad. Esto solo puede deberse a diferencias hormonales entre los sexos, básicamente durante el embarazo (Hayashi, 1994; Mavournin *et al.*, 1990, Müller *et al.*, 1999; Álvarez-Barrera y Altamirano-Lozano 1999).

Tomando en cuenta los datos mencionados anteriormente, podemos concluir que la casiopeína III-ia no es genotóxica mediante la inducción de MN.

8. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

- El tratamiento agudo y subcrónico de la casiopeína III-ia en organismos adultos (hembras preñadas y sin preñar, y machos) no presentó un efecto significativo sobre la frecuencia de MN, por lo tanto no es genotóxica mediante la inducción de MN.
- El tratamiento agudo y subcrónico del cisplatino en organismos adultos (hembras preñadas y sin preñar, y machos) presentó un efecto significativo sobre la frecuencia de MN, por lo tanto es genotóxico mediante la inducción de MN.
- El tratamiento agudo de la casiopeína III-ia no presentó un efecto significativo sobre la frecuencia de MN en los fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas en el día 6 de gestación por lo tanto no es genotóxica mediante la inducción de MN.
- El tratamiento agudo del cisplatino no presentó efecto estadísticamente significativo sobre la frecuencia de MN en los fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas en el día 6 de gestación por lo tanto no es genotóxico mediante la inducción de MN.
- Los tratamientos subcrónicos de la casiopeína III-ia y del cisplatino inducen fetotoxicidad al ser administrada a hembras preñadas del 6 al 15 día de gestación.
- Los tratamientos agudos y subcrónico de casiopeína III-ia no alteraron la frecuencia de EPC tanto en organismos adultos (hembras y hembras preñadas) como en desarrollo (fetos).
- El tratamiento agudo de casiopeína III-ia no altera la frecuencia de EPC en fetos.
- Los tratamientos agudos y subcrónicos con casiopeína III-ia en organismos adultos (hembras, machos y hembras preñadas) así como en desarrollo (fetos) en comparación con los tratamientos con cisplatino muestra que no es genotóxica, al menos no mediante la inducción de MN

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B.; D. Bray; J. Lewis; M. Raff; K. Roberts y J.D. Watson. 1996. *Biología Molecular de la Célula* 2a edición. Ediciones Omega, Barcelona pp 1265-1299.
- Álvarez-Barrera, L. y M. Altamirano-Lozano. 1999. Differential response to induction of chromosomal aberrations between female and male mice treated with a low dose of cyclophosphamide. *Medical Science Research*. 27: 193-196
- Bayona, A. y N. Fajardo. 2012. Desarrollo de nuevos medicamentos: oportunidades y beneficios para el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 29(4): 521-528.
- Bocanegra-Astivia, D. 2005. Toxicología Reproductiva inducida por la casiopeína III-ia en ratones machos de la cepa CD-1. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 49p.
- Bravo, M.; A. Tovar; L. Ruiz y R. Moreno. 2002. Síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas. *Memorias del 1er Congreso de Casiopeínas* pp. 1-9
- Carvalho-Chaigneau, F.; C. Trejo-Sólis; C. Gómez-Ruiz; E. Rodríguez-Aguilera; L. Macías-Rosales; E. Cortéz-Barberena; C. Cedillo-Peláez; I. Gracia-Mora; V. Marina-Madrid y F. Constantino-Casas. 2008. Casiopeína III-ia induces apoptosis in HTC-15 cells *in vitro* through caspase-dependet mechanisms and has antitumor effect *in vivo*. *Biometals* 21:17-28
- Chabner, B. y J. Collins. 1990. *Cancer Chemoterapy. Principles & Practice*. Ed. J.B. Lippincott Company. Philadelphia
- Chin-Jen, Lee. 2000. Development and evaluation of drugs: from laboratory trough licensure to market. CRC Press, Inc. USA. pp. 226
- Clayson, D.B. 2001. *Toxicological carcinogenesis*. Lewis Publishers, USA. 196 pp
- Cole, R., N. Taylor, J. Cole y C. Arlet. 1981. Short-term test for trasplacentally active carcinogens. *Mutation Research*, 80;141-157

- Curtis, H y N.S. Barnes. 2006. Biología. Editorial Médica Panamericana. España. Pp. 286,468,471 y 472
- De Oliveira, L.; L. Gregg; H. Colleta y M. Pires. 2002. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced genotoxicity an Wistar rat bone marrow cells. *Mutation Research* 518: 65-70
- De Vita, V. y S.R. Hellman. 1993. *Cancer; Principles & Practice of Oncology*. Vol. 1. 4a Ed. J.B. Lippincott company. E.U. p. 915
- De Vizcaya-Ruiz, A.; A. Rivero-Muller; L. Ruiz-Ramírez; G.E.N. Kass; L. R. Kelland; R.M. Orr y M. Dobrota. 2000. Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology in vitro*, 14 1-5.
- De Vizcaya-Ruiz, A.; A. Rivero-Muller; L. Ruiz-Ramírez; J.A. Howarth y M. Dobrota. 2003. Hemotoxicity response in rats by the novel Cooper based anticancer agent: casiopeína II. *Toxicology* 194: 103-113
- EPA (US Environmental Protection Agency). 1998. Health effects test guidelines OPPTS 870.5395. Mammalian erythrocyte micronucleus test. Office of prevention. Pesticides and toxic substances (7101) EPA 712-C-98-226. www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS.Harmonized/870.Health.Effects.Test.Guidelines/Series/870-5395.pdf
- FDA, 2000. Food and Drug Administration: guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. USA.
- García, E.; Y. Medina; Y. Rojas; L. Ruiz; P. Ostrosky y R. Rodríguez. 1991. Acute toxicity of casiopeine, a new type of cytotoxic agent. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34:65-67.
- García-Ortuño, L.E.; M. Leal, I. Gracia; F. Constantino; J. Bouda; C. Cedillo y L. Ruiz. 2006. Estudio de los efectos tóxicos agudos de las casiopeínas III-ia en perros. 2° Congreso Nacional de Química Médica. Queretaro, México. *Revista Salud Publica y Nutrición*. 7: resumen 32. 2007
- García-Rodríguez, M.C. 1996 Estudio de los efectos de la clorofilina sobre el desarrollo embrionario y fetal del ratón *in vivo*; Tesis doctoral. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

- García-Rodríguez, M.C. y M. Altamirano-Lozano. 2001. Sales de sodio y cobre de la clorofila; usos, aplicaciones terapéuticas; actividad antimutágena y anticancerígena. TIP Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas, 4(2);77-86
- Gerschenson, M.; C.Y. Paik; E.L. Gaukler; B.A. Diwan y M.C. Poirier. 2001. Cisplatin exposure induces mitochondrial toxicity in pregnant rats and their fetuses. Reproductive Toxicology 15: 525-531
- Giavini, E.; I.P. Lemonica; Y. Lou; M.L Broccia y M. Prati. 1990. Induction of micronuclei and toxic effect in embryos of pregnant rats treated before implantation with anticancer Drugs: cyclophosphamide, cis-platinum, adriamycin. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis 10: 417-426
- Gil, I.; I. Rabadan y I. Bustamante. 1997. Carcinogénesis; fundamentos etiológicos del cáncer. Universidad de Valladolid. España pp.149
- Gracia-Mora, I.; L. Ruiz-Ramírez; C. Gómez-Ruíz; M. Tinoco-Mendez; A. Marquez-Quinones; L. Lira; A. Marín-Hernández; L. Macias-Rosales y M.E. Bravo-Gómez. 2001. Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeína, evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panel. Metal. Based Drugs. 1 (8):19-28
- Hayashi, M.; T. Morita; Y. Kodama; T. Sofuni y Jr. Yshidate. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutation Research 245: 245-249
- Heddle, J.A.; M. Hite; B. Kirkhart; K. Mavournin; J.T. MacGregor; G.W. Newell and M.F. Salome. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. Elsevier Science Publisher. Canada. pp.62-118
- Hood, R. 1997. Handbook of Developmental Toxicology. CRC Press, Inc. pp. 457
- IARC, 1990. International Agency of Research on Cancer: monograph on the Evaluation of Carcinogenesis Risk to Humans, Chromium, Nickel and Welding, Lyon, France. 49.
- Instituto Nacional del Cáncer [INC]. 2008. El cáncer: preguntas y respuestas. Hoja informativa 6.7s. Disponible en línea [<http://www.cancer.gov/publications>]. Fecha de consulta 30 de agosto 2013.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI.2011. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Nota descriptiva. Disponible en línea:

<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/default.asp?c=269>
&e. Consultado el 15 de julio de 2013.

- Juchau, M. 1981. The biochemical basis of chemical teratogenesis. Elsevier/North Holland. pp. 358
- Kartalou, M. and J. Essigmann. 2001. Mechanisms of resistance to cisplatin. Mutation Research 478: 23-43
- Khynriam, D. y S. Prasad. 2003. Cisplatin-induced genotoxic effects and endogenous glutathione levels in mice bearing ascites Dalton's lymphoma. Mutation Research 526: 9-18
- King, M. y D. Wild. 1979. Transplacental Mutagenesis: The micronucleus test on fetal mouse blood. Genet 51: 183-194
- Kirsch-Volders, M.; A. Vanhauwaert; U. Eichenlaub-Ritter and I. Decordier. 2003. Indirect mechanisms of genotoxicity. Toxicology Letters 140-141: 63-74
- Kliesch, I. and I. Adler. 1987. Micronucleus test in bone marrow of mice treated with 1-nitropropane, 2-nitropropane and cisplatin. Mutation Research, 192: 181-184
- Krishna, G.; R. Fiedler and J.C. Theiss. 1992. Simultaneous evaluation of clastogenicity, aneugenicity and toxicity in the mouse micronucleus assay immunofluorescence. Mutation Research 282: 159-167
- Krishna, G.; G. Urda and J.C. Theiss. 1998. Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies: a pharmaceutical industry perspective. Environ. Molec. Mut. 32: 115-120
- Klug, W.S. y M.R. Cummings. 1999 Conceptos de Genética. 5ª edición. Ed. Prentice-Hall, España.
- Leal, M. H. Sumano, L.E. García, I. Gracia y L. Ruíz. 2006. Caracterización y tratamiento de los efectos tóxicos agudos de las casiopeínas III-ia y II-gly (Cas III-IA y Cas II-Gly). 2º Congreso Nacional de Química Médica. Queretaro, México. Revista Salud Pública y Nutrición. 7: resumen 53. 2007
- MacGregor, J., C. Werh and D. Gould. 1980. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. Environmental Mutagenesis. 2; 509-514
- Marovac, J. 2001. Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. Revista médica de Chile 129 (1):

- Mavournin, K.H., D.H Blakey, M.C. Cimino, M.F. Salome y J.A. Heddle. 1990. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report on the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. Mutation Research 239, 29-80
- Mazur, L., A. Czyzewska and A. Augustynek. 2000. WR-2721: inhibitor of cisplatin-induced micronuclei. Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis, 20: 349-356
- Mejía, C. y L. Ruiz-Azuara. 2008. Casiopeínas Ilgly and Illia induce apoptosis in medulloblastoma cells. Pathol. Oncol. Res. 14:467-472
- Müller, L., Y. Kikuchi, G. Probst, L. Schechtman, H. Shimada, T. Sofuni y D. Tweats. 1999. ICH-Harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. Mutation Research 436; 195-225
- Murphy, G., W.Jr. Lawrence y R. Lenhard. 1996. Oncología Clínica; Manual de la American Cancer Society. 2a ed. Publicaciones Científicas No. 559. Organización Panamericana de la Salud. p. 389
- Oliveira, P.A., A. Colaco, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, L.F. De la Cruz, C. Lopes. 2007. Chemical carcinogenesis. Anais de academia brasileira de ciencias 79(4): 593-616.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2011. Cáncer. Nota descriptiva No. 297. Disponible en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. Consultado el 15 de julio de 2013.
- Pardee, A.B. 1988. Principios biológicos del cáncer: bioquímica y biología celular. Pp. 3-18 *In*: V.T. de Vita, S. Hellman, S.S. Rosenberg (eds.). Cáncer Principios y prácticas de oncología 2a edición, tomo I. Salvat. Barcelona.
- Peralta-Zaragoza O., M. Bahena-Román, C.E. Díaz-Benítez, V. Madrid-Marina. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo del cáncer: perspectivas terapéuticas. Salud pública de México 39(5): 451-462.
- Pratt, W y R. Ruddon. 1979. The anticancer drugs. Oxford University Press, New York. pp 251-257

- Rosenberg, B. 1985. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* 55: 2303-2316
- Ruiz-Azuara L. Dirección general de invenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico (SECOFI), Registro Núm. 18801-120579 y 18802-120580. U.S. Patents: Number AP. 21 (1992) 5, 107, 005; Nov. 19 (1996), 5, 576, 326; Feb. 18, (1997)
- Ruiz-Ramírez, L., I. Gracia-Mora, R. Moreno-Esparza, D. Diaz, L. Gasque, L. Huerta, L. Mayet y C. Lomeli. 1991. The antitumor activity of several transition metal complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 43: 2-3, 615
- Ruiz-Ramírez, L., I. Gracia, E. De la Rosa, H. Sumano, C. Gómez, F. Arenas, E. Gómez, E. Pimentel y M. Cruces. 1993. Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) new Drugs: casiopeínas I,II,III. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 51:1-2,406
- Sánchez, B.F., I. Gracia, E. Roldán y L. Ruíz. 2006. Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las casiopeína Igly, IIgly y III-ia en linfocitos humanos en cultivo, médula ósea y linfocitos de sangre periférica de ratón. 2° Congreso Nacional de Química Médica. Queretaro, México. *Revista Salud Publica y Nutrición*. 7: resumen 93. 2007
- Sarel, S., R. Mechoulam y I. Agranat. 1992. Rational Drug desing, in trend in medicinal Chemistry. Oxford; Blackwell Scientific. p. 198
- Schmid, W. y M.V. Ledebur. 1973. The Micronucleus Test methodological aspects. *Mutation Research* 19;109-117
- Scialli, R.A. 1992. "A Clinical Guide to Reproductive and Develeopmental Toxicology". CRC, Boca Ratón Ann Florida, EUA. 284p
- Trejo-Solís C.; D. Jimenez-Farfan; S. Rodríguez-Enriquez; F. Fernández-Valverde; A. Cruz-Delgado; L. Ruiz-Azuara y J. Sotelo. 2012. Copper compoud induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and jnk activation. *BMC Cancer* 12:156 1-15
- Truter, E.J., A.S. Santos & W.J. Els. 2002. Correlation between cell survival, clonogenic activity and micronuclei induction in DMBA-OC-1R cells treated with immunospecific albumin microspheres containing cisplatin and 5-Fluorouracil. *Cell Biology International*. Vol. 26. No. 6. 505-516
- Tucker, J.D. y R.J. Preston. 1996. Chromosome aberration, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mutation Research* 365;147-159

- Vega, S. y J. Reynaga. 1990. Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Ed. Limusa, México
- World Health Organization. 1996. Trace elements in human nutrition and health pp. 343
- Young-Joon, S. y L. Ferguson. 2003. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens molecular mechanisms and chemopreventive potential-highlights of a symposium. Mutation Research 523-524; 1-8

10. ANEXOS

El presente trabajo fue presentado de manera parcial o total en los siguientes eventos académicos

1^{er} Congreso Nacional de Química Médica dedicado a investigación en cáncer. Universidad Autónoma Benito Juárez, Oaxaca, México. Celebrado del 23 al 26 de noviembre de 2004

Titulo: Estudio comparativo del daño genotóxico inducido por el cisplatino y por la casiopeína III-ia; en ratones macho, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1.

Autores: Pérez-Flores, G., García-Rodríguez, M.C. y Altamirano-Lozano, M.

XX Foro de Investigación en Salidas Terminales. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Distrito Federal, México. Celebrado del 10 al 11 de febrero de 2005

Titulo: Evaluación de la frecuencia de micronúcleos inducida en ratones por el cisplatino y su comparación con un nuevo fármaco antineoplásico: casiopeína III-ia

Autor: Pérez Flores Gerardo

2° Congreso Nacional de Química Médica dedicado a la investigación en cáncer y diabetes. En la ciudad de Queretaro, Qro. Celebrado del 2 al 8 de septiembre de 2006

Titulo: Estudio de los efectos genotóxicos y citotóxicos del cisplatino en ratones adultos y en el desarrollo embrionario y fetal, comparados con las casiopeínas IIgly y III-ia (un nuevo grupo de agentes antineoplásicos).

Autores: García-Rodríguez. M.C., Pérez-Flores, G., Santiago-Moreno, Y. y Altamirano-Lozano, M.

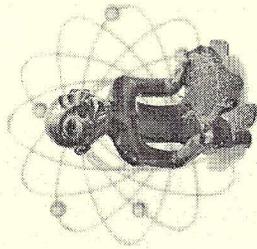
IX Foro de Investigación Escolar en Biología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Distrito Federal, México. Celebrado 1 de febrero de 2013

Titulo: Estudio comparativo del daño genotóxico inducido por el cisplatino y por la casiopeína III-ia; en ratones machos, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1

Autores: Pérez-Flores, G. y García-Rodríguez, M.C.

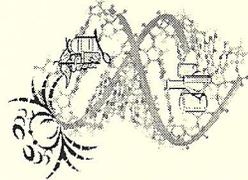


I CONGRESO NACIONAL DE QUÍMICA MÉDICA DEDICADO A INVESTIGACIÓN EN CÁNCER

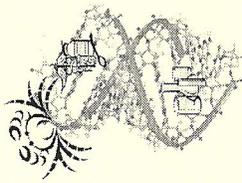


Otorga el presente reconocimiento

A: Pérez-Flores, G., García-Rodríguez, M.C. y Altamirano-Lozano, M.



*Por su participación en el evento con la presentación
del trabajo titulado:*



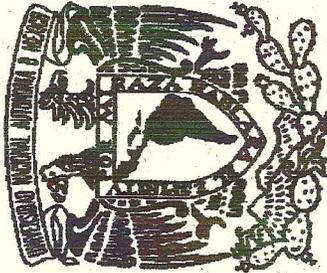
ESTUDIO COMPARATIVO DEL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO POR EL CISPLATINO Y POR LA CASIOPEÍNA III- α ; EN
RATONES MACHOS, HEMBRAS, HEMBRAS PREÑADAS Y FETOS DE LA CEPA CD-1

Sede: Ciudad de Oaxaca, Oax. México, 23 al 26 de Noviembre de 2004

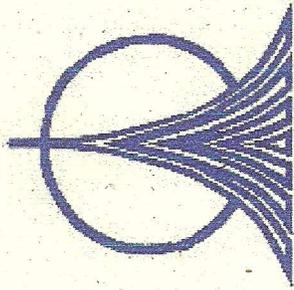
Dra. Lena Ruiz Azuara
Coordinadora General del
Proyecto de Casiopeínas
Facultad de Química, UNAM

M. en C. Santiago Capella
Director
Facultad de Química, UNAM

M. en C. Antonio Castellanos
Director
Escuela de Ciencias Químicas
U.A.B.J.O.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
 DIVISIÓN DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS
 CARRERA DE BIÓLOGO



Otorgan la presente

CONSTANCIA

a:

PÉREZ FLORES GERARDO

Por su participación en el XX Foro de Investigación en Salidas Terminales como
 PONENTE en la presentación del trabajo

**"EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS INDUCIDA EN
 RATONES POR EL CIS-PLATINO Y SU COMPARACIÓN CON UN NUEVO
 FÁRMACO ANTINEOPLÁSICO: CASIOPEINA III-ia"**

celebrado del 10 al 11 de febrero de 2005

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
 México D. F. a 11 de febrero de 2005

I. Q. RAFAEL SÁNCHEZ DIRZO
 JEFE DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

BIÓL. MARICELA ARTEAGA MEJÍA
 JEFA DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA



[Firma manuscrita]

[Firma manuscrita]

Edición Especial No. 7 - 2007

Salus cum propositum vitae

Portada

Número Actual

Índice

Información para los autores

Publicación Trimestral



2do CONGRESO NACIONAL DE QUIMICA MEDICA

2 al 8 de Septiembre del 2006, Qro, Qro., México

Edición Especial No.7-2007



INDICE

CONFERENCIA MAGISTRAL

CF LAS INVESTIGACIONES SUSTENTABLES: SU RACIONALIDAD Y SUS RESPONSABLES

Dr. Rafael M. De Gasperin Gasperin

SIMPOSIO DE CANCER

SC1 PATOLOGIA DE LOS TUMORES NEUROBLASTICOS; EVALUACIÓN PRONOSTICA, EXPERIENCIA DEL CENTRO ESPAÑOL DE REFERENCIA DE LA SEOP PARA ESTUDIOS BIOPATOLOGICOS DEL NEUROBLASTOMA (1992-2005)

Dr. Samuel Navarro Fos

SC2 LA TERAPIA FOTODINÁMICA: ALTERNATIVA PARA LA DETECCIÓN Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Dra. Eva Ramón Gallegos

SC3 CASIOPEÍNAS, COMPUESTOS DE NOVO CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA: UN EJEMPLO DE DESARROLLO DE MEDICAMENTOS EN QUÍMICA MÉDICA

Dra. Lena Ruiz Azuara e Dra. Isabel Gracia Mora

SIMPOSIO DE DIABETES

SD1 EL VANADIO EN EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES, MANEJO.

Dr. Mario A. Altamirano Lozano

SD2 ALIMENTACIÓN EN EL PACIENTE DIABÉTICO

Dr. Jessica De Haene

SD3 DESARROLLO Y FUNCIÓN PANCREÁTICA

Dr. Ma. del Carmen Méndez Herrera

SD4 GENES DE LA DIFERENCIACIÓN PANCREÁTICA IMPLICADOS EN LA DIABETES. EVALUACIÓN GENÉTICO-MOLECULAR DE POBLACIÓN MEXICANA

Dra. Marta A. Menjívar Iraheta

SD5 EL MAPEO GENÓMICO Y EL ESTUDIO DE GENES POSIBLEMENTE RELACIONADOS AL DESARROLLO DE DIABETES Y ENFERMEDADES COMUNES

Dr. María Teresa Tusié Luna

SD6 DEFINICIÓN Y DIAGNÓSTICO DE SINDROME METABÓLICO

Prefacio

En esta Edición Especial No. 7-2007 de la Revista Salud Pública y Nutrición se presentan las Memorias del 2do Congreso Nacional de Química Médica, que tóca la temática dedicada a la investigación en cáncer y diabetes; este fue realizado en la ciudad de Querétaro, Qro., (México) del 2 al 8 de Septiembre del 2006; este evento fue llevado a cabo por La Facultad de Química y el Instituto de Neurobiología de la UNAM y la Universidad Autónoma de Querétaro (Fac: Ciencias Naturales, Medicina y Química), con el auspicio de l Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONCYTEQ) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Se congregan trabajos que contienen cuestiones con la concepción del reciente conocimiento sobre investigación en cáncer y diabetes. Estas memorias se hallarán de gran utilidad para todos los investigadores de la salud en México.

Dr. Pedro César Cantú Martínez
Editor en Jefe
Revista Salud Pública y Nutrición

NERVIOSO CENTRAL

García-Gómez F. Y., Jiménez-Betanzos A. M., Flores-Ancona R. M. Arenas-Huertero Francisco, Cruz-Orea A. y Ramón-Gallegos Eva

31 APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE TAMIZAJE EMPLEADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LESIONES PRECANCEROSAS Y CÁNCER CERVICOUTERINO

García-Ocampo Daneli, Martínez-Carrillo Dinorah Nashely, Padilla-Islas Fabiola, Susano-Flores Juana, Alarcón-Romero Luz del Carmen, Illades-Aguilar Berenice, Fernández-Tilapa Gloria.

32 ESTUDIO DE LOS EFECTOS TÓXICOS AGUDOS DE LAS CASIOPEÍNAS® III-IA EN PERROS

Luis Enrique García Ortuño, Marco Leal García, Isabel Gracia Mora, Fernando Constantino Casas, Jan Bouda, Lena Ruiz Azuara, Carlos Cedillo Pelaez.

33 EVALUACIÓN ANTINEOPLÁSICA IN VITRO DE LA CASIOPEÍNA III-LA Y SU POSIBLE SINERGIJA CON OTROS FÁRMACOS COMERCIALES EN LÍNEAS TUMORALES HUMANAS DE ESTIRPE DIFERENTES

Ana E. García Pérez, Celedonio Gómez Ruiz, Lena Ruiz Azuara, Isabel Gracia Mora

34 ESTUDIO QSAR DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE COBRE DE TIPO [CU(N-N)(GLICINATO)] NO3.

Juan Carlos García Ramos, María Elena Bravo, Luis Antonio Ortiz Frade, Lena Ruiz Azuara.

35 ESTUDIO DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS DEL CISPLATINO EN RATONES ADULTOS Y EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL. COMPARADOS CON LAS CASIOPEÍNAS IIgly Y IIIia (UN NUEVO GRUPO DE AGENTES ANTINEOPLÁSICOS).

García-Rodríguez, M.C., Pérez-Flores, G. Santiago-Moreno, Y. y Altamirano-Lozano, M.

36 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS DEL VINO TINTO (CON Y SIN ALCOHOL) AL SER ADMINISTRADO DE MANERA AGUDA Y SUBAGUDA EN RATONES CD-1 in vivo.

García-Rodríguez, M. C., Mateos-Nava, R. A. y Altamirano-Lozano, M.

37 EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE Y ANTIHIPERGLICÉMICO DE FRIJOL (PHASEOLUS VULGARIS) COCIDO EN RATAS DIABÉTICAS.

Gricelda García-Verdi, Minerva Ramos-Gómez, Irineo Torre-Pacheco, Horacio Guzmán-Maldonado, Rosalía Reynoso-Camacho.

38 EFECTO ANTIDIABÉTICO DEL CLADODIO DEL NOPAL COMERCIAL EN RATAS SANAS Y DIABÉTICAS.

Gricelda García-Verdi, Ardelia Olguín-Rubio, Minerva Ramos-Gómez, Mario Enrique Rodríguez-García, Rosalía Reynoso-Camacho

39 MUERTE CELULAR EN LA LÍNEA DE LEUCEMIA MIELOGÉNICA CRÓNICA K-562 INDUCIDA POR EL COMPUESTO D3CLP, UN NUEVO DERIVADO TIAZOLO[5,4-B]QUINOLINA.

González Sánchez Ignacio, Cerbón Cervantes Marco A, Lira Rocha Alfonso, Solano Becerra José D., Loza Mejía Marco A., Olvera Vázquez Susana

40 EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LA MUTACION T130I DEL GEN HNF4A EN DOS GRUPOS INDÍGENAS MEXICANOS



ESTUDIO DE LOS EFECTOS GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS DEL CISPLATINO EN RATONES ADULTOS Y EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL, COMPARADOS CON LAS CASIOPEÍNAS IIgly Y IIIa (UN NUEVO GRUPO DE AGENTES ANTINEOPLÁSICOS).

García-Rodríguez, M.C., Pérez-Flores, G. Santiago-Moreno, Y. y Altamirano-Lozano, M. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, D. F. México.

RESUMEN

Si bien es cierto que existen diversos agentes antineoplásicos en el mercado como el cisplatino y el carboplatino, también es conocido que son altamente tóxicos. Una nueva familia de compuestos del tipo quelatos mixtos de cobre (II) denominados Casiopeínas®, ha surgido como alternativa en el tratamiento del cáncer, ya que dadas sus propiedades resultan ser menos tóxicas y más baratas. En el presente trabajo se comparó el efecto genotóxico y citotóxico del cisplatino con las casiopeínasIII-ia y IIgly. Se evaluó la frecuencia de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos (EPC) y la frecuencia de EPC con respecto a eritrocitos normocromáticos (ENC) en sangre. Se estudiaron organismos adultos (machos, hembras preñadas y sin preñar) y fetos de ratón de la cepa CD-1. Los tratamientos se administraron de manera aguda y subcrónica por vía intraperitoneal. En los resultados obtenidos se observó que la administración de la casiopeínaIII-ia, no incrementó la frecuencia de MN en los animales adultos ni en los fetos, al igual que la aplicación aguda de la casiopeínaIIgly. Sin embargo, en los tratamientos subcrónicos de las hembras preñadas con casiopeínaIIgly se incrementó el número de MN tanto en las madres como en las crías. A diferencia de la casiopeínas, el cisplatino presenta una inducción de MN estadísticamente significativa en todos los casos. La administración subcrónica de la casiopeínaIII-ia adelantó el parto, lo que podría estar relacionado con toxicidad del fármaco *per se*. En cuanto a la citotoxicidad solo se observaron efectos en los tratamientos con cisplatino. Tanto las casiopeínas como el cisplatino presentaron un efecto feto letal en el tratamiento subcrónico.

Palabras clave: cisplatino, *in vivo*, EPC

INTRODUCCIÓN

La importancia de controlar enfermedades degenerativas mortales como el cáncer ha propiciado la búsqueda, caracterización y síntesis de nuevos compuestos con capacidad antineoplásica. Si bien es cierto que actualmente existe una gran cantidad de agentes antineoplásicos en el mercado, también es conocido que son altamente tóxicos y por ende su eficacia se ve disminuida. Una nueva familia de compuestos del tipo quelatos mixtos de cobre (II) denominados Casiopeínas® ha surgido como alternativa en el tratamiento del cáncer dado que son menos tóxicas y tienen un menor costo^{1,2}, esto al ser comparadas con los compuestos como el cisplatino y el carboplatino. Las casiopeínas han mostrado actividad citostática y antineoplásica, principalmente las casiopeínas II y III^{3,4},

por lo que han generado muchas expectativas para una posible aplicación clínica a corto plazo. Dentro de las pruebas preclínicas que son solicitadas para probar la actividad antitumoral de un nuevo compuesto se encuentran las de genotoxicidad^{5,6}. En este estudio se evaluaron los efectos genotóxicos y citotóxicos de las casiopeínas III-ia y IIgly y se compararon con los efectos del cisplatino, para lo cual se emplearon ratones adultos (machos y hembras) y hembras preñadas de la cepa CD-1. El daño genotóxico se evaluó mediante el incremento en el número de micronúcleos (MN) y la citotoxicidad por la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) en sangre periférica.

MATERIAL Y MÉTODO

Se emplearon ratones hembras y machos de la cepa CD-1 de 2 a 3 meses de edad, con un peso corporal entre 25-32 g. Los ratones fueron obtenidos del bioterio Harlan de la Facultad de Química de la UNAM, y se les alimentó con nutricubos (Purina), con libre acceso al agua. Se mantuvieron bajo condiciones estériles y con periodos de luz-oscuridad (12-12 h). Las cruzas se realizaron colocando un macho con dos hembras durante la noche (de las 7 p.m. a las 7 a.m.) y se tomó como día 0 de preñez la presencia de tapón espermático.

Todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal y fueron divididos en: a) Grupos testigo, solo se les administró el vehículo, b) Grupo Cisplatino (4 mg/kg de peso corporal) y c) Grupo casiopeína; se les administró 9.0, 7.0, 4.4 ó 3.3 mg/kg de casiopeína II-gly ó III-ia. Los grupos fueron empleados en los protocolos con machos, hembras sin preñar y preñadas.

Las evaluaciones se realizaron en muestras de sangre periférica, las que fueron obtenidas de la vena caudal de cada organismo y colocadas sobre laminillas cubiertas con naranja de acridina siguiendo la técnica de Hayashi y col. (1990)⁷. La evaluación de los MN-EPC y de la frecuencia de EPC se realizó con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2). Se analizó la frecuencia de EPC, mediante la identificación de 1000 eritrocitos, distinguiendo los normocromáticos (ENC) de los EPC, con la intención de darnos una idea de la citotoxicidad. El daño genotóxico se estableció mediante la evaluación de 2000 EPC, de los cuales se identificó la presencia o ausencia de MN.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente con una prueba de Análisis de Varianza (ANDEVA). Se emplearon los paquetes estadísticos SPSS/PC (versión 10.0) y STATISTICA/PC (versión 6.0). El nivel de significancia usado en todos los casos fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se muestra la frecuencia de EPC y de MN cuando se administraron los tratamientos agudos tanto del cisplatino como de las casiopeínas. Se puede observar que las casiopeínas no incrementan el número de MN, ni alteran la frecuencia de EPC, en comparación del grupo testigo. Sin embargo, el cisplatino no incrementa de manera significativa la presencia de MN y disminuye la frecuencia de EPC tanto en los machos

como en las hembras. Cabe mencionar que el daño genotóxico evaluado y el aumento en el número de MN es más drástico en los machos (alrededor de 41 MN).

Tratamiento	Hora	N	Machos		Hembras sin preñar	
			EPC/1000 células	MN/1000 células	EPC/10000 células	MN/1000 células
Testigo	0	4	61.0±6.0	2.2±1.9	61.0±16.9	1.5±1.7
	24	4	68.1±7.2	1.2±1.9	69.6±8.4	3.2±2.2
	48	4	62.9±2.9	1.7±0.9	70.0±12.6	2.0±2.1
	72	4	71.6±5.8	2.2±2.5	71.1±6.2	1.2±0.9
Cisplatino	0	5	59.7±19.1	1.0±0.0	56.1±15.0	1.1±0.4
	24	5	39.2±7.8*	4.6±2.7*	45.1±9.4	5.2±5.4*
	48	5	17.9±8.3*	42.2±11.3*	16.4±9.6*	14.9±8.0*
	72	5	14.4±18.5*	1.5±2.2	7.7±15.1*	1.3±2.6
Casiopéina Ilgly	0	4	57.2±5.9	2.2±0.9	64.2±11.1	2.0±1.8
	24	4	53.0±2.6	1.2±0.9	56.5±10.7	2.0±0.8
	48	4	58.7±6.1	3.0±1.4	60.1±11.3	1.2±0.9
	72	4	55.5±7.7	1.5±1.9	56.2±3.4	1.2±0.5
Casiopéina Illia	0	5	51.5±9.3	0.8±0.9	49.5±5.8	0.6±0.2
	24	5	56.6±5.9	1.9±1.4	49.2±2.9	1.7±0.5
	48	5	48.4±12.7	2.2±0.8	51.3±13.1	1.6±1.2
	72	5	65.3±9.8	1.9±0.8	70.7±12.2	2.1±1.4

Cuadro 1. Frecuencias de EPC y MN con tratamientos agudos (x±d.e.). *: Estadísticamente significativo p<0.05

En el cuadro 2 se muestran las frecuencias de EPC y MN al ser administrados subcrónicamente los tratamientos de las casiopéinas y cisplatino.

Como se puede observar en el cuadro 2, el tratamiento subcrónico los efectos tanto citotóxicos como genotóxicos del cisplatino persisten, de hecho el daño es mayor que en el tratamiento agudo, ya que hubo tiempos que no se pudieron evaluar debido a que los eritrocitos estaban muy dañados (n.d.). En cuanto al efecto de las casiopéinas, se puede observar que las casiopéinas no incrementaron el número de MN al ser comparadas con el grupo testigo. Sin embargo, la administración subcrónica de ambas casiopéinas alteró la frecuencia de EPC, ya que la casiopéina Ilgly la disminuyó tanto en las hembras como en los machos, y la casiopéina Illia la incrementó. Ambos efectos pueden ser asociados con citotoxicidad.

Cuando se administraron los tratamientos de cisplatino y de casiopéinas en hembras preñadas, solo se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de MN en los fetos obtenidos de las hebras tratadas con casiopéina Ilgly. En el tratamiento del cisplatino se observa un incremento en los MN, pero este no resultó estadísticamente significativo. La frecuencia de EPC en el grupo de cisplatino se incrementó a diferencia de los otros grupos.

Tratamiento	Hora	N	Machos		Hembras sin preñar	
			EPC/1000 células	MN/1000 células	EPC/1000 células	MN/1000 células
Testigo	0	5	65.4±3.4	1.4±0.9	57.0±4.1	0.8±1.3
	24	5	62.8±1.3	1.6±1.5	55.6±3.6	0.8±1.3
	48	5	62.4±3.1	1.0±1.0	53.7±3.3	1.6±1.1
	72	5	64.4±4.4	2.0±0.7	55.9±4.8	0.4±0.5
	96	5	60.4±1.1	1.0±0.7	56.7±3.7	0.8±0.4
	120	5	62.8±3.0	0.8±0.8	55.4±1.1	1.0±1.4
	144	5	64.0±4.1	1.0±0.7	57.8±4.2	1.4±0.5
	168	5	66.3±3.1	1.0±1.0	55.9±3.8	1.6±1.1
	192	5	65.1±2.1	1.8±1.0	54.8±3.0	1.8±0.8
	216	5	65.6±0.7	0.8±0.4	56.4±1.6	2.0±1.0
	Cisplatino	0	5	60.2±2.9	1.1±0.4	56.5±4.1
24		5	28.3±9.3*	5.3±1.9*	26.6±2.6*	11.6±6.3*
48		5	9.3±4.4*	8.7±8.4*	5.2±1.8*	29.7±13.2*
72		5	0.1±0.2*	n.d.	n.d.	n.d.
96		5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
120		5	1.4±3.1*	5.7±12.7*	n.d.	n.d.
144		5	2.0±3.4*	17.16±29.7*	n.d.	n.d.
168		5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
192		5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
216		5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Casiopéina IIgly		0	5	60.2±2.9	1.2±1.3	56.5±4.1
	24	5	61.1±3.0	2.0±0.7	53.8±1.6	1.2±1.0
	48	5	60.3±2.9	1.2±0.8	55.4±3.2	1.4±0.5
	72	5	57.6±1.9*	1.2±0.4	55.3±4.2	1.8±1.6
	96	5	52.2±3.1*	0.4±0.5	52.1±4.1	1.4±0.8
	120	5	54.4±4.3*	1.8±0.8	52.8±6.6	1.6±1.1
	144	5	64.3±3.5	1.6±0.8	55.0±2.2	1.7±0.9
	168	5	60.5±1.6	1.8±0.8	49.6±6.8	2.0±1.0
	192	5	61.9±3.4	1.4±1.3	41.5±5.6*	0.5±0.7
	216	5	67.5±2.0	1.2±0.4	47.0±3.5*	2.0±0.0
	Casiopéina IIIia	0	5	51.8±2.9	1.5±0.5	56.5±4.2
24		5	51.6±3.1	1.8±0.2	53.0±1.7	0.8±0.5
48		5	62.3±2.9	1.2±1.1	55.6±3.2	1.7±1.3
72		5	67.6±1.9	0.7±0.9	55.9±4.2	1.8±0.7
96		5	62.2±3.1	1.3±0.8	52.7±4.2	1.4±0.6
120		5	64.4±4.3	0.9±0.8	52.9±6.6	0.8±0.8
144		5	74.3±3.5*	1.0±0.6	55.3±2.3	1.6±0.7
168		5	70.5±1.6*	1.3±1.0	59.6±6.9	2.1±1.0
192		5	71.9±3.4*	1.6±0.6	61.5±7.7	1.2±0.7
216		5	77.5±2.0*	3.0±1.0	67.0±4.5	1.9±0.8

Cuadro 2. Frecuencias de EPC y MN con tratamientos subcrónicos (x±d.e.). *: Estadísticamente significativo p<0.05; n.d.: no determinado.

Tratamiento	N	EPC/1000 células	MN/1000 células
Testigo	25	558±356	2.2±1.5
Cisplatino	25	962±659*	3.4±2.2
Casiopéina IIgly	16	406±50	5.4±1.6*
Casiopéina IIIia	25	561±357	1.2±1.0

Cuadro 3. Frecuencias de EPC y MN en fetos (x±d.e.).*: Estadísticamente significativo p<0.05

En el cuadro 4 se muestran los efectos sobre las frecuencias de EPC y MN de los tratamientos del cisplatino y de las casiopéinas en las hembras preñadas, en donde se puede observar que al igual que para las hembras sin preñar solo el tratamiento del cisplatino indujo daño tanto citotóxico, como genotóxico, ya que se incrementó el número de MN y se disminuyó la frecuencia de EPC, con la salvedad de que el efecto fue más significativo que en las hembras sin preñar.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que las casiopéinas IIgly y IIIia no presentan daño genotóxico mediante la inducción de MN en organismos adultos (hembras y machos), ni en hembras gestantes. Solo la casiopéina IIgly incrementa de manera marginal el número de MN en las cría de hembras tratadas durante la gestación. A diferencia de la casiopéinas, el cisplatino presenta una inducción de MN estadísticamente significativa en ratones machos, hembras y hembras preñadas. Tanto la casiopéina III-ia como el cisplatino inducen un efecto fetoletal en el tratamiento subcrónico. El cisplatino sí presentó un efecto citotóxico bien definido tanto en los organismos adultos como en desarrollo, mientras que las casiopéinas presentaron efectos ambiguos en los tratamientos subcrónicos, por lo que se sugiere evaluar este parámetro con otros ensayos más confiables.

AGRADECIMIENTOS

Apoyado parcialmente CONACYT proyecto 635012 y salud CO1-7677, y PAPIIT-DGAPA proyecto IN-212701.

Tratamiento	Hora	N	EPC/1000 células	MN/1000 células
Testigo	0	5	64.5±5.9	0.8±0.4
	24	5	65.2±1.3	1.8±1.7
	48	5	70.7±3.8	2.4±1.5
	72	5	71.6±2.7	2.4±1.1
	96	5	78.7±3.0	1.8±0.8
	120	5	79.6±5.0	2.2±1.3
	144	5	77.1±7.7	1.4±1.1
	168	5	75.7±3.5	2.6±1.9
	192	5	73.6±5.4	1.4±0.5
	216	5	66.2±8.6	1.0±1.4
Cisplatino	0	7	85.8±7.7	1.3±1.2
	24	7	67.7±13.4	5.2±2.5
	48	7	29.6±23.7*	31.0±13.7*
	72	7	33.7±47.4*	5.4±4.9*
	96	7	32.4±49.9*	2.4±2.6
	120	7	28.6±33.4*	8.1±8.4*
	144	7	8.4±8.3*	9.1±10.7*
	168	7	0.3±0.6*	1.8±4.0
	192	6	n.d.	n.d.
	216	6	n.d.	n.d.
Casiopéina IIgly	0	7	59.2±1.0	0.7±0.7
	24	7	63.3±2.1	1.4±0.7
	48	7	55.3±4.1	2.4±1.7
	72	7	49.2±4.3	1.4±0.9
	96	7	45.4±2.0	1.5±1.2
	120	7	50.6±5.2	1.7±1.2
	144	7	59.8±6.0	1.8±1.3
	168	7	55.9±8.9	0.7±0.4
	192	7	61.0±4.6	1.1±0.6
	216	7	62.7±4.1	1.1±1.0
Casiopéina IIIia	0		99.4±9.1	1.9±1.1
	24		88.8±10.7	1.0±0.6
	48		100.3±15.3	1.3±0.6
	72		108.7±18.1	1.8±1.6
	96		126.1±6.7	1.0±1.2
	120		111.3±8.7	1.7±1.0
	144		116.8±18.1	1.2±1.1
	168		93.4±27.6	1.4±0.7
	192		81.0±42.5	0.7±1.3
	216		73.5±51.1	0.7±0.6

Cuadro 4. Frecuencias de EPC y MN en hembras preñadas (x±d.e.).

BIBLIOGRAFIA

1. Ruiz Azuara L. Dirección General de Invenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico (SECOFI), Registro Núm. 18801-120579 y 18802-120580. U.S. Patents: Number Ap. 21 (1992) 5, 107, 005; Nov. 19 (1996), 5, 576, 326; Feb. 18, (1997).
2. Ruiz-Ramírez, L. Gracia-Mora, I., De la Rosa, M.E., Sumano, H., Gómez, C., Arenas, F., Gómez, E., Pimentel, E. Y Cruces, M. Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) new drugs: casiopeinas I,II, III. *J. Inorg. Bioch.* (1993) 406.
3. De Vizcaya-Ruiz, Rivero-Muller, Ruiz-Ramírez, L. Kass, G.E.N., Kelland, L. R., Orr, R.M. y Dobrota, M. Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology in vitro.* 14 (2000) 1-5.
4. García, E., Medina, Y., Rojas, Y., Ruiz, L., Ostrosky, P. Y Rodríguez, R. Acute toxicity of casiopeine, a new type of cytotoxic agent. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34 (1991) 65-67.
5. Krishna, G. Urdana, G. y Theiss. Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies; a pharmaceutical industry perspective. *Environ. and Mol. Mutagen.* 32 (1998) 115-120.
6. Adler, I.D. New approaches to mutagenicity studies in animals for carcinogenic and mutagenic agents. II. Clastogenic effects determined in transplacentally trated mouse embryos. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 3 (1983) 321-334.
7. Hayashi, M., Morita, T., Kodama Y., Sofuni, T. y Ishidate M Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Res.* 245 (1990) 245-249.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



CONSTANCIA

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través de la Carrera de Biología

a: **Pérez-Flores G.¹, García-Rodríguez M.C.²**

1 alumno 2 docente

Por la presentación del trabajo:

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL DAÑO GENOTOXICO INDUCIDO
POR EL CISPLATINO Y POR LA CASIOPEINA III-ia; EN RATONES
MACHOS, HEMBRAS, HEMBRAS PREÑADAS Y FETOS DE LA CEPA
CD-1**

XI FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU
México, D. F., a 1 de febrero de 2013.

Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez
Director