



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA - UNAM

"EFECTO GENOTOXICO DE LOS TRATAMIENTOS AGUDO Y SUBCRONICO DE LA CASIOPEINA II - GLY EN MACHOS, HEMBRAS, HEMBRAS PREÑADAS Y FETOS DE RATON CD-1"

T E S I S

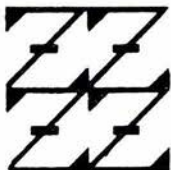
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

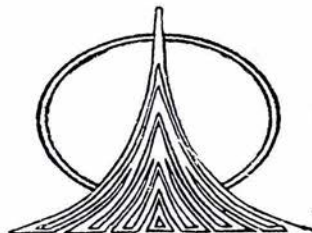
YOLANDA SANTIAGO MORENO

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTORA DE TESIS: M. en C. MA. DEL CARMEN GARCIA RODRIGUEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM encabezada por el Dr. Mario A. Altamirano Lozano, en el laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis, bajo la dirección de la M. en C. Ma. del Carmen García Rodríguez.

Durante el desarrollo de la tesis de licenciatura se contó con beca de DGAPA, proyecto N212701 y fue financiado por CONACYT, proyectos G35012 y 25417-M.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Ma. del Carmen García Rodríguez por su amistad, apoyo y dirección en la elaboración de esta tesis.

A mis sinodales por sus consejos y sugerencias para mejorar y enriquecer este trabajo.

Dr. Mario A. Altamirano Lozano

M. en C. Ma. del Carmen García Rodríguez.

Dra. Elia Roldan Reyes

Dra. Lucila Álvarez Barrera

Biól. Ana Laura Maldonado Tena

A la Dra. Leticia Morales Ledesma por todos sus consejos y amistad que siempre me ha brindado.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en mi formación

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Por brindarme todo su amor, confianza, comprensión y paciencia. Por ser en todo momento mi apoyo para seguir adelante y hoy lograr una de las metas en mi vida.

Con profundo agradecimiento

A MIS HERMANOS

Alejandro, Javier y Liliana, por su apoyo y cariño en todo momento y por compartir conmigo cada uno de mis éxitos y fracasos.

Con todo mi amor

AMIGOS

Quienes siempre me ayudaron y apoyaron para seguir adelante; Elizabeth, Edna, Alejandra, Fabiola, Ana, Julissa, Estela, Genaro. Gracias por la amistad que siempre me han brindado.

ÍNDICE

	Páginas
I. RESUMEN	
II. INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	2
2. TRATAMIENTOS DEL CÁNCER	3
2.1. Quimioterapia	4
2.2. Cisplatino	5
3. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE FÁRMACOS	6
3.1. Fármacos antineoplásicos	7
4. CASIOPEÍNAS	10
4.1. Propiedades fisicoquímicas	10
4.2. Antecedentes generales	12
4.3. Antecedentes genotóxicos	14
5. EVALUACIÓN: GENOTOXICIDAD	15
5.1. Micronúcleos	15
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
1. General	19
2. Particulares	19
VI. MATERIAL Y MÉTODO	21
1. Compuesto	21
2. Animales	21

3. Tratamientos	21
4. Preparación de laminillas con naranja de acridina	24
5. Obtención de Sangre Periférica	25
6. Evaluación de Micronúcleos	25
7. Análisis estadísticos	26
VII. RESULTADOS	27
1. Tratamiento agudo en machos y hembras sin preñar	27
2. Tratamiento subcrónico en machos y hembras sin preñar	31
3. Tratamiento subcrónico a hembras preñadas	35
4. Fetos de hembras con tratamiento subcrónico	38
VIII. DISCUSIÓN	39
IX. CONCLUSIONES	48
X. REFERENCIAS	49

I. RESUMEN

Durante décadas, el cáncer ha sido foco de intensos esfuerzos de investigación debido a su impacto sobre la salud humana, por ejemplo, en México desde la década de los 80's, en la Facultad de Química (UNAM) el grupo de trabajo de la Dra. Lena Ruíz, desarrolló un grupo de compuestos de coordinación llamadas casiopeínas® con centro metálico de cobre, las cuales, han demostrado actividad antineoplásica y citostática. Sin embargo, el desarrollo de nuevos fármacos implica un proceso bastante complejo que va desde su concepción, hasta las pruebas preclínicas para identificar sus propiedades farmacológicas y toxicológicas, así como de ensayos clínicos para llegar al tratamiento en humanos, dentro de las pruebas preclínicas es necesario evaluar el daño producido al material genético (genotoxicidad). La evaluación de la frecuencia de micronúcleos *in vivo*, es una de las pruebas recomendadas por agencias internacionales para evaluar genotoxicidad.

Por lo que en este estudio se trabajó en colaboración con la Facultad de Química, para evaluar el efecto genotóxico de la casiopeína II-gly, mediante la evaluación de la inducción de micronúcleos en sangre periférica de ratones machos, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1 tratados de manera aguda y subcrónica.

Para la evaluación del daño genotóxico se utilizó la técnica de micronúcleos, la cual consistió en la obtención de sangre periférica cada 12 ó 24 horas después de su administración aguda ó subcrónica de la casiopeína II-gly. La sangre periférica se colectó directamente sobre laminillas previamente cubiertas con naranja de acridina.

En los resultados obtenidos se observa un incremento en la frecuencia de MN sólo en; a) las hembras sin preñar con tratamiento subcrónico; b) las hembras preñadas tratadas subcrónicamente con una

concentración de 4.4 mg/kg; y c) los fetos obtenidos de las hembras tratadas con 3.3 mg/ kg de casiopeína II-gly.

Aunque se observa un incremento de MN en las hembras sin preñar, se considera que la casiopeína II-gly no mostró un efecto genotóxico, debido a que el incremento de MN no es claro, ya que fue de de alrededor de 3 MN con respecto a sus testigos, además de que el efecto se observó en el último día de evaluación (10 días después) y hubo muerte.

El tratamiento subcrónico en las hembras preñadas con una concentración de 3.3 mg/kg, provocó muerte materna, por lo que se piensa, que estas muertes probablemente son debidas a un efecto toxicológico del fármaco *per se*, lo que puede estar alterando funciones fisiológicas en el organismo, y por lo tanto, una inducción indirecta de MN.

En cuanto a la citotoxicidad, en términos generales, se observó que la casiopeína II-gly no altero la frecuencia de EPC. Sin embargo, la evaluación de este parámetro en nuestro estudio es cuestionable, debido a que en un gran número de estudios no ha sido posible concluir por la variabilidad natural que se presenta en la eritropoyesis. Cabe mencionar, que otros estudios han mostrado que la casiopeína II-gly si es citotóxica.

En los fetos obtenidos de las hembras preñadas tratadas con 3.3 mg/kg, se observó un efecto genotóxico y citotóxico.

II. INTRODUCCIÓN

La importancia de controlar enfermedades degenerativas mortales como el cáncer, ha propiciado la búsqueda, la caracterización y la 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. Aunado a esto, particularmente en nuestro país, estos productos son caros y de importación. Por lo que, a finales de la década de los 70's en la Facultad de Química (UNAM), el grupo de trabajo de la Dra. Lena Ruiz Ramírez, inició un proyecto encaminado al desarrollo de fármacos antineoplásicos a partir de metales de transición biológicamente esenciales, con el propósito de disminuir la toxicidad y el costo. De esta forma, se diseñó la familia de compuestos llamados Casiopeínas®, de los cuales, se comprobó la actividad antitumoral en ensayos *in vivo* basados en protocolos internacionales, y posteriormente fueron patentados (Ruiz-Ramírez, *et al.*, 1993).

Actualmente, ya han sido sintetizados más de 100 compuestos y al parecer han presentado mayor actividad antitumoral las casiopeínas I, II y III. Con el desarrollo de un nuevo compuesto, se deben seguir una secuencia de estudios, tanto químicos, bioquímicos, como toxicológicos, dentro de este último se encuentran las evaluaciones de daño al material genético (genotoxicidad) (Ruiz-Ramírez, *et al.*, 1993; Müller, *et al.*, 1999).

Una de las pruebas recomendadas por las diferentes agencias reguladoras alrededor del mundo para evaluar genotoxicidad, es la evaluación de la frecuencia de micronúcleos *in vivo*, además de que fue aprobada como batería de prueba para la evaluación genotóxica de fármacos en la "Fourth International Conference on Harmonization" (ICH4) of Genotoxicity Guidelines. El propósito del ensayo de micronúcleos, es identificar sustancias que causan

daño citogenético (Heddle *et al.*, 1983; Mavournin, 1990; Krishna, 1992, 1998; Müller, *et al.*, 1999).

1. ANTECEDENTES

El cáncer parece ser una enfermedad tan antigua como lo es la vida humana en nuestro planeta, y es el resultado de dos procesos sucesivos; el aumento en la proliferación de un grupo de células denominado tumor o neoplasia, y la posterior adquisición de estas células de la capacidad invasiva que les permite migrar de su sitio natural en el organismo, colonizando y proliferando en otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis. Ambas alteraciones son necesarias para definir un cáncer, ya que, si sólo tiene lugar un aumento del crecimiento de un grupo de células en el lugar donde normalmente se hallan, se habla de un tumor benigno, mientras que, cuando las células de un tumor son capaces de invadir los tejidos circundantes o distantes tras penetrar en el torrente sanguíneo o linfático, se habla de un tumor maligno (Bruce, *et al.*, 1989, Muñoz, 1997).

Por regla general, los cánceres son el resultado de que en una célula se produzcan de forma aleatoria varios accidentes independientes, cuyos efectos son acumulativos. Sin embargo, se conocen algunos agentes químicos, físicos y biológicos, que aumentan la probabilidad de los sucesos críticos hasta el punto de que, dada una dosis lo suficientemente alta, se hace prácticamente inevitable que al menos una célula se convierta en cancerosa (De Vita, 1993; Murphy, 1996; Gil, 1997).

Cabe destacar a los agentes químicos, por ser a los que más comúnmente nos encontramos expuestos, ya sea de manera natural o bien como productos de la actividad industrial, considerándose que estos son

responsables del 80 al 90% de los cánceres en el hombre, por lo que en la actualidad se ha enfocado el tratamiento del cáncer y la prevención, a estudios en los que se revela una reducción en el riesgo de cáncer si se incrementa el consumo de frutas y vegetales, así como de algunos fitonutrientes como los flavonoides, carotenoides, entre otros. Por ello, a la par de los tratamientos empleados actualmente en el cáncer, se han realizado grandes esfuerzos para identificar sustancias o mezclas complejas que puedan en un futuro ayudar a inhibir o tratar el cáncer (De Vita, 1993; Murphy, 1996; Gil, 1997; García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2001; Young-Joon, 2003).

2. TRATAMIENTOS DEL CÁNCER

A lo largo de los últimos 50 años se han desarrollado distintas formas de tratamiento para el cáncer, ya que antes, la estrategia fundamental era la extirpación quirúrgica de la enfermedad local, por lo que no existían alternativas para los pacientes con neoplasias metastásicas. Durante las décadas de los 40' y 50', surgió la radioterapia como opción alternativa para algunas localizaciones primarias, tales como el cuello del útero y la zona de la cabeza, así como para los linfomas. La radiación también resultó eficaz como terapia de muchas formas de cáncer metastático, incluyendo la infiltración del hueso. Posteriormente, con el desarrollo de fármacos antineoplásicos (década de 1950), la quimioterapia del cáncer comenzó a ser utilizada para las neoplasias diseminadas (metástasis) (De Vita, 1993; Murphy, 1996).

Actualmente la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia han llegado a ser modalidades terapéuticas básicas, ya que han incrementado la posibilidad de supervivencia de los pacientes a demás de reducir los efectos secundarios del tratamiento, aunque hoy en día existan otros tipos de procedimientos

terapéuticos tales como; la hipertermia, la crioterapia, y la inmunoterapia entre otros (Murphy, 1996).

2.1. Quimioterapia

La quimioterapia del cáncer, es el uso de fármacos de composición conocida para tratar a los tumores diseminados, y esta dirigida contra tumores que se han extendido desde un inicio o que tienen una alta capacidad de metástasis. El índice terapéutico de la quimioterapia del cáncer, varía marcadamente de un tumor a otro y de fármaco a fármaco, según su actividad bioquímica y su origen, por lo que se han clasificado en; agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, alcaloides vegetales, agentes hormonales y compuestos misceláneos (Magrath, 1989; Murphy, 1996).

Aunque los principios de la quimioterapia han sido claramente demostrados en animales, así como en estudios clínicos en humanos, ninguno de los agentes anticancerígenos existentes es ideal, debido a la falta de eficacia, de selectividad y a sus efectos tóxicos producidos (Bruce, *et al.*, 1989).

Uno de los fármacos que revolucionó la quimioterapia a partir de la década de los sesentas, es el cisplatino, el cual resultó ser más activo en tumores resistentes a los otros fármacos comerciales. En 1969 Rosenberg, encontró una mayor actividad citostática de este compuesto, el cual sintetizó de manera inorgánica y lo llamó cis-diamino-dicloro-platino (II), conocido más comúnmente como cisplatino. Sin embargo, el cisplatino presenta una toxicidad importante sobre todo a nivel renal (Rosenberg, 1969).

2.2. Cisplatino

El cisplatino, es un potente agente antineoplásico para el tratamiento de una gran variedad de cánceres, se encuentra entre los más importantes fármacos de la práctica clínica, con un amplio espectro de actividad y su mecanismo de acción se relaciona con su genotoxicidad, la cual se produce mediante mecanismos celulares similares a los agentes alquilantes clásicos, la sustitución del hidrógeno 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 (Lippert, 1999).

El cisplatino es un complejo de coordinación inorgánico de estructura plana, en el que el átomo de platino está coordinado con dos grupos amina a un lado y dos átomos de cloro al otro (figura 1) (Lippert, 1999).

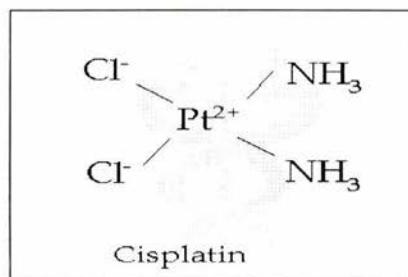


Figura 1. Molécula del cisplatino

El cisplatino forma aductos covalentes con muchas moléculas biológicas, pero su principal blanco es el ADN. Numerosos estudios, han determinado como la unión de platino afecta la conformación y estabilidad de la doble hélice, también, estudios cristalográficos y espectrográficos revelan que el platino induce enrollamientos de 26 a 50° entre las bases de guanina involucradas en el entrecruzamiento. De esta manera, el cisplatino bloquea la replicación y

transcripción, la síntesis de ADN *in vivo* es inhibida a nivel del ARN y la síntesis de proteínas; además, al dañar al ADN éste se fragmenta y genera rompimientos cromosómicos, forma micronúcleos, y causa inestabilidad genómica, llevando así a la mutagénesis y muerte celular por apoptosis (Jackson, 1996; Jordan, 1998; Lippert, 1999; Mazur, 2000).

Debido a que el costo del cisplatino resulta excesivo para las terapias contra el cáncer, en los últimos 20 años ha habido un resurgimiento en la investigación, para la síntesis y desarrollo de nuevas moléculas con actividad antineoplásica (Boyd y Paull, 1995).

3. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE FÁRMACOS

Actualmente, muchos de los más efectivos fármacos son sintetizados por tecnología de la química orgánica. Esta síntesis química produce agentes con una alta pureza a bajo precio, y la gran ventaja de los fármacos sintéticos, es que se pueden hacer cambios en su estructura durante el proceso de síntesis, por ejemplo, cuando un compuesto es identificado y su estructura química es elucidada, mediante la modificación de su estructura molecular es posible mejorar su actividad farmacológica y reducir sus efectos adversos (Sarel *et al.*, 1992; Chin-Jen, 2000).

Para que un nuevo fármaco sea determinado, evaluado, autorizado y eventualmente sea transformado en agente terapéutico, es necesario que un gran número de científicos colaboren, ya que el desarrollo de un producto farmacéutico depende de un amplio conocimiento científico, de tecnología, así como de un mayor entendimiento de la enfermedad y sus mecanismos. La "Pharmaceutical Manufactures Association" (PMA), actualmente estima que el tiempo en la investigación de un nuevo fármaco es aproximadamente de 10

años o más, antes de que la "Food & Drug Administration" (FDA) pueda aprobarlo para su uso. Por ello, cientos y a veces miles de compuestos químicos deben ser aislados o sintetizados y probados, para encontrar el compuesto óptimo que logre una actividad farmacológica específica sin serios efectos colaterales (Chin-Jen, 2000).

Cuando un fármaco es prometedor, se somete a una serie de evaluaciones; tanto preclínicas, para identificar sus propiedades farmacológicas y toxicológicas, como clínicas, para evaluar su relación estructura-actividad, sus efectos a corto plazo, la dosis óptima, los riesgos y su eficacia en el humano, entre otros, para que pueda salir al mercado. Lo mismo sucede con los fármacos antineoplásicos (Chin-Jen, 2000).

3.1. Fármacos antineoplásicos

Desde hace más de 50 años en que fue dada la primera quimioterapia citotóxica, literalmente, cientos de agentes químicos han sido probados para la destrucción de las células cancerosas y pocas de estas drogas han llegado a la etapa clínica, por ser muy inseguras o poco efectivas para ser probados en humanos.

Existe un gran número de fármacos antineoplásicos tanto de origen orgánico como inorgánico, sin embargo, la existencia de tumores refractarios a estos tratamientos, su toxicidad y costos elevados, estimulan la búsqueda de nuevas moléculas. Por ejemplo, existen 44 compuestos aprobados para su uso contra el cáncer, de ellos sólo dos, el cisplatino y el carboplatino son fármacos inorgánicos a base de platino, y ninguno de ellos son de tecnología nacional (Bravo, 2002).

El descubrimiento de nuevos agentes anticáncer es particularmente difícil debido a varios factores; a) a la falta de un adecuado conocimiento en la bioquímica de diferentes tipos celulares de los tumores, b) a la heterogeneidad de los tumores, c) al desarrollo de resistencia bioquímica de los fármacos, y d) a la baja predictibilidad en modelos animales. Dada la escasez de auténticos compuestos antineoplásicos, existe una continua necesidad de descubrir y desarrollar nuevos agentes antineoplásicos (Magrath, 1989).

Para probar la actividad antitumoral de un compuesto o extracto, el ensayo inicial empleado más comúnmente, es el de medir su capacidad para inhibir el crecimiento de líneas tumorales en cultivo, después, se estudia su estructura y su *formulación química*, para posteriormente, a partir de sus fuentes naturales o por métodos de síntesis química o a veces por procedimientos mixtos, realizar la *producción* de aquellos compuestos que muestran una cierta actividad antineoplásica, (Muñoz, 1997). En la siguiente etapa de los ensayos preclínicos, los compuestos son probados en animales a los que se inducen tumores de modo experimental, y cuya finalidad es obtener información sobre su farmacodinámica, farmacocinética y sus propiedades toxicológicas. Dentro de los estudios que deben de realizarse en esta fase preclínica están:

- 1) Establecer la dosis inicial segura y las dosis subsecuentes para humanos.
- 2) Identificar los órganos blanco y su toxicidad en los mismos.
- 3) Determinar los parámetros de monitoreo clínico apropiados.
- 4) Evaluar el daño potencial al material genético (genotoxicidad).

(De Vita, 1993; Krishna, 1998).

Solo los compuestos que resultan prometedores pasan a ensayos de experimentación clínica, tras presentar una solicitud de investigación llamada "Investigational New Drug" (IND) ante el organismo competente, la FDA. Esta IND debe analizar los datos de producción y toxicología, además de presentar un análisis razonado de las pruebas clínicas propuestas (Magrath, 1989; Muñoz, 1997).

Tras su aprobación, el fármaco pasa a la *fase I*, en la que se trata de determinar tanto su toxicidad o su dosis máxima tolerada en humanos. Generalmente, este estudio implica un reducido número de pacientes en fase avanzada de la enfermedad. Si la toxicidad no lo impide, posteriormente se analiza en la *fase II*, su actividad frente a algunos tumores específicos para ver el espectro de acción, así como la relación dosis-respuesta en unos centenares de pacientes en los que han fallado otros tratamientos y existe la posibilidad de obtener algún beneficio. Finalmente, si los resultados obtenidos son aceptables, en la *fase III* se estudia la efectividad o beneficio terapéutico del compuesto, en esta fase se tratan ya miles de pacientes, en los que se analizan ciertas variables como el sexo, la edad y la raza, además, de una comparación con los fármacos en uso (Magrath, 1989; Muñoz, 1997).

Si se obtuvieron resultados satisfactorios, se presenta entonces la solicitud "New Drug Application" (NDA) en la que se asigna al nuevo fármaco una propiedad de acuerdo a su tipo químico y tratamiento potencial, se revisan los resultados clínicos que ponen en evidencia su eficacia y seguridad en las condiciones de uso propuestas. En la *fase IV*, ya cuando el fármaco esta comercializado, se estudian las acciones combinadas con otras terapias y se realiza un seguimiento más estrecho de sus efectos, con objeto de definir el papel del nuevo fármaco en la quimioterapia anticancerosa (Magrath, 1989; Muñoz, 1997).

El uso apropiado de un agente contra el cáncer, finalmente depende del entendimiento de su mecanismo de acción en todos los niveles, es decir, a nivel molecular, celular, de tejidos, y órganos. Sin este conocimiento solo se pueden tomar decisiones intuitivas para la elección de agentes anticancerígenos y esperar que el resultado clínico sea útil (Sporn y Suh, 2000)

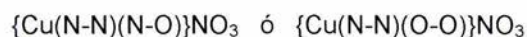
Actualmente, diversas instituciones de nuestro país, se centran en la búsqueda, aislamiento y síntesis de nuevos agentes terapéuticos con propiedades anticancerígenas, ejemplo de ello, tenemos a las casiopeínas, que fueron desarrolladas en la Facultad de Química de la UNAM, tomando como base la molécula del cisplatino.

4. CASIOPEÍNAS

4.1. Propiedades fisicoquímicas

Las casiopeínas son un grupo de compuestos de coordinación cuyo centro es el cobre. El cobre (Cu) es un metal de transición, biológicamente esencial, que disminuye de manera importante la toxicidad, al igual que su costo, en comparación con el cisplatino (Ruiz-Ramírez, 1991; Ruiz-Azuara, 1992).

Las fórmulas generales de las casiopeínas son:



Donde:

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

(N-O) = Ligante aminoacidatos ó peptidos

(O-O) = Ligante donador (acetilacetionato o salicilaldehidato)

Este grupo de compuestos fue diseñado pensando en:

- Que la planaridad en la geometría de la molécula y el ligante diimina con carácter hidrofóbico le conferirían la posibilidad de actuar como intercalante a través de interacciones con las bases del ADN y el ligante cargado le conferirá una polaridad necesaria para el transporte de la molécula.
- La naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el ligante diimina serían los responsables de la variación en la actividad biológica.
- Al presentar un núcleo metálico (cobre II) tienen una geometría más cercana a los compuestos de platino (cisplatino).
- El uso de elementos esenciales disminuye de manera importante la toxicidad de los fármacos, ya que los organismos tienen procesos homeostáticos para regular los excesos de elementos esenciales.
- El cobre puede o no intercambiar alguno de sus ligantes para coordinarse directamente con el nitrógeno de las bases, formando enlaces similares a los observados con el cisplatino.
- Los ligantes son los responsables de la modulación en la distribución y transporte, y por tanto de la selectividad tumoral de la molécula (Bravo, 2002).

A la fecha, se han sintetizado alrededor de 100 compuestos y con base en experimentos realizados *in vivo*, las casiopeínas I, II y III, han demostrado tener la mayor actividad antineoplásica en los ensayos exigidos por el "Cancer Chemotherapy National Service Center del National Cancer Institute" de los Estados Unidos (Ruiz-Azuara, 1995).

Particularmente, la casiopeína II-gly (figura 2), con fórmula: Acua (4,7-diimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre (II) Nitrato, tiene las siguientes propiedades; un peso molecular de 425.89 g/mol y un pKa de 5.4, es estable en agua en estado sólido y en condiciones de refrigeración por lo menos durante

21 días, se degrada fácilmente cuando se expone a la luz (Ruiz-Azuara, 1995). No se puede administrar por vía oral, pues el pH del estómago es de 1 y la casiopeína se disocia a ese pH, por lo que no presentaría actividad farmacológica (Ferrer *et al.*, 1995). La LD₅₀ vía intraperitoneal en ratones de la cepa CD-1 es de 8.8 mg/Kg (Quiroz *et al.*, 1995).

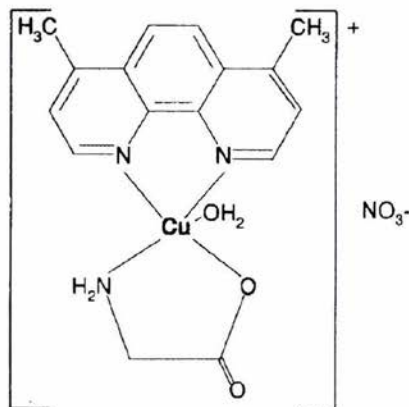


Figura 2. Estructura química de la casiopeína II-gly

4.2. Antecedentes generales

Dado que las casiopeínas I, II y III, han demostrado tener una mayor actividad antineoplásica, éstas han sido sometidas a un gran número de pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*, por ejemplo, un estudio realizado por Ruiz-Ramírez, *et al.* (1991), reportó que las casiopeínas I, II y III tienen actividad antineoplásica *in vivo* en líneas tumorales, tales como, L1210 (leucemia), S180 (sarcoma), B16 (melanoma) y L5178 (de un clon llamado Lw1). También las casiopeínas han demostrado citotoxicidad en líneas tumorales humanas de Sarcoma S189, CaLo y HeLa, además, a través de estudios toxicológicos con la

LD₅₀ han mostrado ser menos tóxicas (Ruiz-Ramírez, *et al.*, 1993). Por otra parte, la inhibición del índice mitótico es 4 veces menor en comparación con el cisplatino o la mitomicina C (Morales *et a.*, 1995).

Otros estudios confirman que las casiopeínas tienen actividad antineoplásica en diferentes líneas celulares murinas (B16) y humanas (HeLa, SiHa, CaSki, C33-A y CaLo), además tienen una mayor actividad en líneas celulares humanas cervico-uterinas (Gracia-Mora, 2001; Rico, 2002). Así mismo, Marín-Hernández (2003), determinó que la casiopeína II, interactúa directamente con las mitocondrias aisladas o dentro de las células intactas, causando una variedad de efectos en diferentes sitios, como la inhibición, tanto de la fosforilación oxidativa, como de la síntesis de ATP. Por otra parte, Vizcaya-Ruiz (2003), encontró que la casiopeína II, induce anemia hemolítica en ratas, provocada por un daño directo a los eritrocitos. Recientemente, González (2004), demostró que la casiopeína II, es embriotóxica y teratogena en ratones de la cepa CD-1.

Anteriormente, se han realizado estudios preliminares con diferentes casiopeínas, por ejemplo; se ha evaluado la toxicidad de las casiopeínas en perros y gatos (casos clínicos) (Gómez, 1994); también se han realizado análisis post-mortem de cobre en órganos de perro (De Vizcaya, 1996); así como estudios anatomo-histológicos en ratón (Quiroz, 1996), estudios de los subproductos del metabolismo de las casiopeínas, *in vivo* (De la rosa, 1998) y el establecimiento de la farmacocinética y distribución en la sangre de las casiopeínas en ratas, conejos y perros (Fuentes, 2002).

Actualmente, las casiopeínas se encuentran en la fase preclínica y se están realizando los estudios necesarios para obtener información sobre su farmacodinámica, farmacocinética y sus propiedades toxicológicas, dentro de esta última, es necesario evaluar el daño producido al material genético. Cabe

resaltar que también se están llevando a cabo trabajos en los que se trata de establecer los mecanismos de inducción de daño de las casiopeínas, mediante la inducción de apoptosis en células de carcinoma de colon; así como estudios de interacción de las casiopeínas con la molécula de ADN y la interacción con el citocromo p-450 (Verdejo, 1998; Carvallo, 2002).

4.3. Antecedentes genotóxicos

Estudios preliminares indican que las casiopeínas producen mutaciones somáticas en ojos y alas de *Drosophila melanogaster* (Ruiz-Ramírez, 1993; Cruces, 1994), por otra parte, Vizcaya-Ruiz (2000), demostró que la casiopeína II-gly es capaz de inducir muerte celular por apoptosis en líneas celulares, tales como, de leucemia murina L1210 y de carcinoma ovárico humano CHI, y cuando se realizó el análisis de la morfología nuclear éste mostró condensación de cromatina y fragmentación nuclear. Al realizar estudios para observar las interacciones con el ADN, se obtuvo que sólo hay interacciones entre las casiopeínas y la adenina, mediante el apilamiento entre los sustituyentes bipyridina o fenantrolina del complejo mixto y el anillo de la base, lo cual lleva a pensar que las casiopeínas actúan como intercalantes (Tovar, 2002). Estudios de espectroscopia electrónica y fluorescencia apoyan la hipótesis de que la intercalación es el mecanismo de acción entre las casiopeínas y el ADN (Cirigo, 2002).

Todos estos estudios que se han realizado hasta la fecha, tanto en líneas tumorales como en animales de laboratorio, han demostrado baja toxicidad y una alta selectividad por algunos tumores, lo cual las hacen una serie de compuestos con mucho futuro, tal es el caso de la casiopeína II-gly, que fue seleccionada como uno de los compuestos más apropiados de esta familia para realizar estudios de genotoxicidad.

5. EVALUACIÓN: GENOTOXICIDAD

Las pruebas de genotoxicidad no solo son indispensables para evaluar el daño que puede producir un fármaco al material genético, si no también, es una herramienta necesaria para determinar si el mecanismo de acción esta relacionado con su genotoxicidad.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la ICH y las diferentes agencias reguladoras alrededor del mundo tales como; International Agency of Research Cancer (IARC), Environmental Protection Agency (EPA) y la FDA, establecieron, que las tres principales pruebas para evaluar daño genotóxico son; 1) una prueba de mutación en bacterias: (AMES), 2) una prueba *in vitro*: evaluación de daño cromosómico en células de mamífero (aberraciones cromosómicas), y 3) una prueba *in vivo*: la evaluación de la frecuencia de micronúcleos (MN) (Krishna, 1992; Mavournin, 1990; Müller, *et a.*, 1999)

5.1. Micronúcleos

Los MN 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 hijas, como pequeños núcleos adicionales. Un incremento en la frecuencia de MN, en animales tratados por agentes químicos, nos indica que estos agentes son inductores de daño cromosómico (Schmid y Ledebur, 1973; Krishna, 1992).

Los MN pueden ser evaluados en células que están en una constante proliferación como por ejemplo; los mieloblastos, mielocitos, médula ósea de ratón (eritrocitos), eritrocitos de sangre periférica, eritrocitos de hígado y de

sangre periférica fetal. En células binucleadas de sangre periférica (linfocitos) en humanos, así como también células uroteliales y exfoliadas de la mucosa bucal y nasal. Además de células vegetales como son las de tejido meristemático (Schmid y Ledebur, 1973; Heddle *et al.*, 1983; Tucker *et al.*, 1996).

Los MN pueden ser fácilmente detectados de forma redonda con un diámetro de alrededor de 1/20 a 1/5 de un eritrocito. En las células eritroides se distinguen claramente a los eritrocitos jóvenes y maduros. Los eritrocitos policromáticos (EPC, eritrocito joven), todavía contiene ARN, son basófilos y el núcleo principal es expulsado; si un MN se ha formado, éste permanece en el citoplasma enucleado. Los EPC, con el tiempo, pierden el ARN y se convierten en eritrocitos normocromáticos (ENC, eritrocitos maduros), más pequeños que los EPC y son acidófilos. Partiendo de esto, los eritrocitos se pueden diferenciar entre ENC, EPC y MN, utilizando diferentes colorantes, tales como, May-Gruenwald, Giemsa y Naranja de Acridina (NA), en esta última, al observarse al microscopio de fluorescencia, los EPC presentan color rojo debido al ARN-ribosomal que aún contienen, a diferencia de los ENC que no se tiñen (ya que perdieron el ARN-ribosomal) y los MN se tiñen de color verde fluorescente por la presencia de ADN (Schmid y Ledebur, 1973; Hayashi, 1990; Mavournin, 1990).

El ensayo de MN fue desarrollada por Schmid y Boller en 1970, comúnmente se utiliza en ensayos a corto plazo, debido a que es muy rápida. Detecta daño citogenético asociado con la frecuencia de aberraciones cromosómicas, evalúa el daño en cromosomas enteros o en fragmentos y también puede identificar daño citotóxico (Krishna, 1992).

La evaluación de MN tiene como ventajas: ser rápida, sí se compara con la técnica de aberraciones cromosómicas, su análisis es muy fácil, además no

requiere de células en metafase. Mientras que prácticamente la única desventaja, es que no se puede identificar el tipo de aberraciones cromosómicas, ni su frecuencia (Heddle *et al.*, 1983; Tucker *et al.*, 1996).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como ya se ha mencionado, el cáncer ha sido foco de intensos esfuerzos de investigación durante décadas y no es la excepción en nuestro país. Los tratamientos antineoplásicos que maneja actualmente la Secretaría de Salud, presentan una toxicidad y costos elevados, razón por la cual, el proyecto encabezado por la Dra. Lena Ruiz Ramírez, desarrolló un grupo de compuestos llamados casiopeínas, las cuales, han demostrado actividad citostática y antineoplásica, además de ser menos tóxicas y de menor costo que los actuales tratamientos. Lo que ha generado muchas expectativas para una posible aplicación clínica a corto plazo. Sin embargo, para ser aplicado un nuevo fármaco es necesario realizar pruebas preclínicas, tales como la evaluación genotóxica. Para por un lado saber el efecto genético de la aplicación de dicho fármaco, y por otro, dado que el mecanismo de acción del cisplatino es mediante el daño genético, comparar si persiste este mecanismo en la molécula de casiopeína.

Por lo que en este estudio se trabajó en colaboración con la Facultad de Química, para evaluar el efecto genotóxico de la casiopeína II-gly en ratones machos, hembras, hembras preñadas y fetos.

IV. HIPÓTESIS

Sí el cisplatino es actualmente uno de los fármacos antineoplásicos más efectivos con un mecanismo de acción semejante al de un agente alquilante, enlazándose directamente con el nitrógeno en la posición 7 de las guaninas del ADN, por lo que genera un daño genotóxico y las casiopeínas son un grupo de compuestos de coordinación con centro metálico Cu (II), muy parecida al cisplatino, entonces, se espera que al administrar tratamientos agudos y subcrónicos de casiopeína II-gly, se induzca daño genotóxico mediante el incremento de la frecuencia de MN en sangre periférica a ratones machos, hembras, hembras preñadas y sus fetos.

V. OBJETIVOS

1. General

Estudiar el efecto genotóxico y citotóxico de la casiopeína II-gly, mediante la evaluación de la inducción de micronúcleos en sangre periférica de ratones machos, hembras, hembras preñadas y sus fetos.

2. Particulares

2.1. Analizar el tiempo de mayor inducción de EPC-MN en sangre periférica de machos y hembras sin preñar con tratamientos agudo y subcrónico de casiopeína II-gly, mediante la evaluación, cada 12h de EPC-MN a partir de las 0h hasta las 72h y cada 24h durante 10 días respectivamente.

2.2. Analizar la inducción de EPC-MN en sangre periférica de hembras preñadas con tratamiento subcrónico de casiopeína II-gly, mediante la evaluación de EPC-MN cada 24h a partir del día 6 y hasta día 15 de gestación

2.3. Analizar la inducción de EPC-MN en la sangre periférica de los fetos obtenidos en el día 18 de gestación de las hembras preñadas tratadas subcrónicamente con casiopeína II-gly.

2.4. Estudiar el daño citotóxico de los tratamientos agudo y subcrónico de la casiopeína II-gly, en los machos y hembras sin preñar, mediante la evaluación de la frecuencia de EPC en sangre periférica obtenida cada 12 h a partir de las 0h y hasta las 72h.

2.5. Estudiar el daño citotóxico del tratamiento subcrónico de la casiopeína II-gly, en las hembras preñadas, mediante la evaluación de la frecuencia de EPC en sangre periférica obtenida cada 24h desde el día 6 y hasta el día 15 de gestación.

2.6. Estudiar el daño citotóxico de la casiopeína II-gly, en la sangre periférica fetal, obtenida en el día 18 de gestación de las hembras preñadas.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

1. Compuesto

La casiopeína II-gly [Acua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre (II) Nitrato] utilizada en el presente estudio, fue proporcionada por el departamento de Química Inorgánica y Nuclear a cargo de la Dra. Lena Ruiz Azuara en la Facultad de Química de la UNAM.

2. Animales

Se emplearon ratones hembras y machos adultos de la cepa CD-1 de 2 a 3 meses de edad (Bioterio Harlan, UNAM), con un peso corporal entre 25-32g. Los ratones fueron alimentados con nutricubos (Purina), con libre acceso al agua y se mantuvieron bajo condiciones estériles y controladas de luz-oscuridad (12-12 h). Las cruces, 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.

3. Tratamientos

- Se emplearon por cada tratamiento dos grupos de cinco machos adultos y dos grupos de cinco hembras adultas, y se sometieron a un tratamiento agudo (una sola aplicación) o subcrónico (10 aplicaciones, una diaria), de acuerdo a los protocolos establecidos en la figura 3.

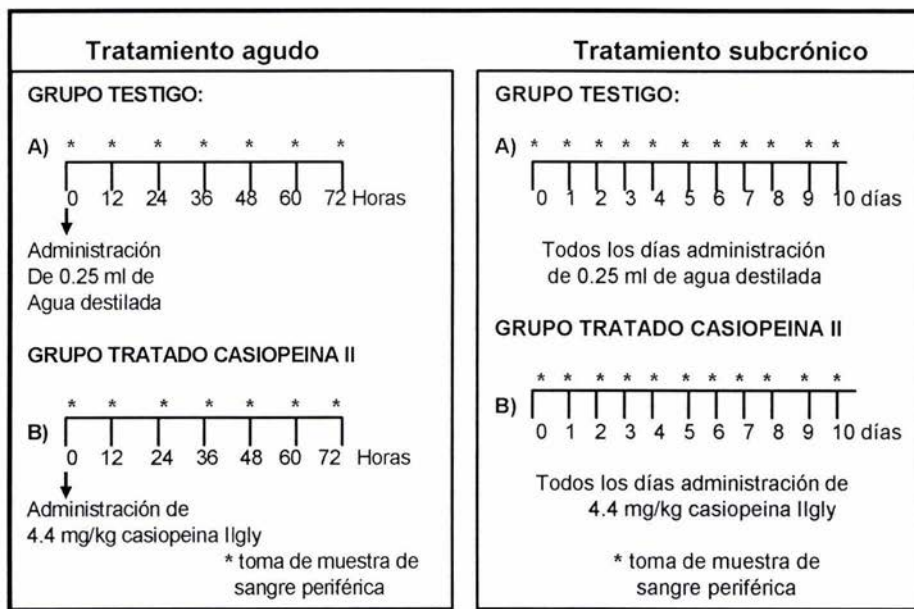


Figura 3. Protocolos para la evaluación de EPC-MN y la frecuencia de EPC en sangre periférica de machos y hembras sin preñar.

- Por otra parte, se emplearon tres grupos de cinco hembras preñadas, y fueron tratadas subcrónicamente (10 aplicaciones, una diaria) con casiopeína II-gly, de acuerdo al protocolo establecido en la figura 4.

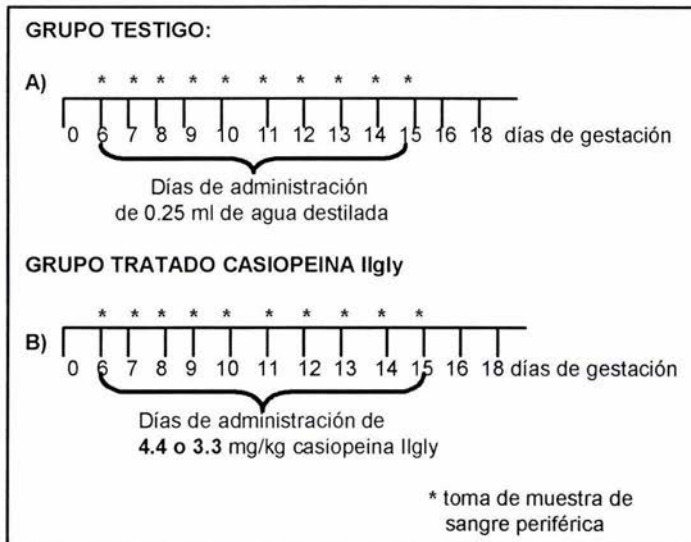


Figura 4. Protocolos para la evaluación de EPC-MN y la frecuencia de EPC en sangre periférica materna.

- Los fetos se obtuvieron de las madres preñadas y tratadas con casiopeína II-gly (Fig. 4) de acuerdo con lo establecido en el protocolo de la figura 5.

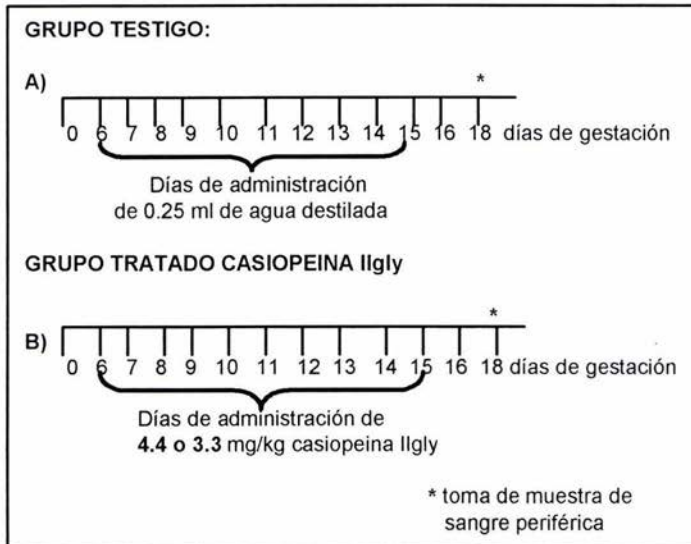


Figura 5. Protocolo para la evaluación de EPC-MN y de la frecuencia de EPC en sangre periférica fetal.

4. Preparación de laminillas con naranja de acridina

La naranja de acridina (NA) (Sigma Chemical) se disolvió en agua destilada a una concentración de 3 mg/ml. Se tomaron 10 μ l de esta solución y se colocaron sobre laminillas precalentadas (aproximadamente a 70°C), con ayuda de otro portaobjetos se extendió el colorante. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en la oscuridad hasta su uso como recomienda Hayashi (1990).

5. Obtención de sangre periférica

La evaluación de EPC-MN y la frecuencia de EPC se realizaron en sangre periférica de la siguiente manera:

a) Con tijeras a machos, hembras sin preñar y hembras preñadas, se les cortó la punta de la cola, y con ayuda de una micropipeta se tomaron 5µl de sangre periférica, la cual se colocó directamente en las laminillas preparadas con NA. Inmediatamente se les colocó un cubreobjetos y se sellaron con Ruber Cement (ROSS). Las preparaciones se guardaron en cajas de plástico en la oscuridad a 4°C y después de 12h se analizaron. Se prepararon 2 laminillas por cada organismo.

b) Después de sacrificar a las hembras preñadas por dislocación cervical se extrajo el útero y se colocó en una mezcla fría de solución Tyrode's (Sigma Chemical). Los fetos fueron removidos del útero de 5 hembras y se tomaron cuatro fetos al azar. Se lavaron con la solución de tiroides, se les decapitó con unas tijeras y se obtuvieron 5µl de sangre periférica con ayuda de una micropipeta. La sangre periférica se colocó directamente en las laminillas preparadas con NA, inmediatamente se les colocaron un cubreobjetos y se sellaron con ROSS. Las preparaciones se guardaron en cajas de plástico en la oscuridad a 4°C y después de 12h se analizaron. Se prepararon 2 laminillas por cada feto.

6. Evaluación de micronúcleos

Con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (Nikon OPTIPHOT-2) y un objetivo de 100X, se realizó la cuantificación de 1000 eritrocitos, distinguiendo los 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 como se observa en la figura 6, donde se pueden observar células de color oscuro que son ENC, las de color rojo son los EPC y el punto de color verde fluorescente es un MN. Además se calculó la Inducción Neta (NIF) y la Diferencia (DIF) de la Frecuencia de EPC-MN (García-Rodríguez, 2001).

El NIF y el DIF se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{NIF} = \text{número de EPC-MN} - \text{número de EPC-MN al tiempo 0}$$

$$\text{DIF} = \text{número de EPC-MN tratados} - \text{número de EPC-MN testigos}$$

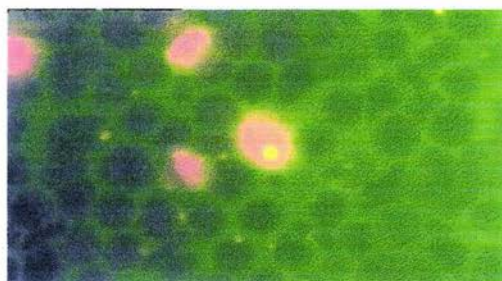


Figura 6. microfotografía de eritrocitos normocromáticos y policromáticos de ratón a 100X

7. Análisis estadísticos

Los resultados de la inducción de MN y de la frecuencia de los EPC se presentan en media \pm desviación estándar y se compararon mediante un análisis de varianza seguida de una prueba de Tukey, y una F de Fisher, por medio del programa SPSS versión 10 y el nivel de significancia usado en todos los análisis fue de $p < 0.05$

VII. RESULTADOS

1. Tratamiento agudo en machos y hembras sin preñar

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos de la inducción de MN y de la frecuencia de EPC, en donde se observa que la administración del tratamiento agudo de casiopeína II en machos, no presenta efectos. De igual manera, los resultados registrados en el cuadro 2, de hembras adultas sin preñar y tratadas con la misma dosis con que se trató a los machos, no presentaron efecto. Por lo que se calculó la inducción diferencial y neta de la frecuencia de MN (DIF y NIF), y se aprecia que tanto para las hembras como para los machos, cuando se le restó el valor de la inducción de EPC-MN por cada hora del grupo tratado al grupo testigo (DIF), no se encontraron efectos estadísticamente significativos (figura 7). De igual manera, al restar el valor de la inducción de MN de cada hora del grupo tratado a su propia hora cero (NIF), tampoco hay efecto estadísticamente significativo (figura 8).

Cuadro 1. Frecuencia de la inducción de MN y de EPC en machos con tratamiento agudo

Tratamiento Casiopéinas (mg/kg)	Hora	N	EPC \pm de	EPC-MN \pm de
0	0	4	61.00 \pm 6.05	2.25 \pm 1.89
	12	4	58.62 \pm 3.27	1.50 \pm 1.00
	24	4	68.12 \pm 7.22	1.25 \pm 1.89
	36	4	61.50 \pm 5.95	2.75 \pm 2.50
	48	4	62.87 \pm 2.89	1.75 \pm 0.95
	60	4	72.62 \pm 9.20	1.25 \pm 1.89
	72	4	71.62 \pm 5.85	2.25 \pm 2.50
	4.4	0	4	57.25 \pm 5.90
12		4	55.75 \pm 8.85	1.00 \pm 0.81
24		4	53.00 \pm 2.58	1.25 \pm 0.95
36		4	56.62 \pm 2.62	1.25 \pm 0.50
48		4	58.75 \pm 6.06	3.00 \pm 1.41
60		4	60.62 \pm 4.42	0.75 \pm 0.95
72		4	55.50 \pm 7.72	1.50 \pm 1.91

Cuadro 2. Frecuencia de la inducción de MN y de EPC en hembras con tratamiento agudo

Tratamiento Casiopeinas (mg/kg)	Hora	N	EPC \pm de	EPC-MN \pm de
0	0	4	61.00 \pm 16.97	1.50 \pm 1.73
	12	4	66.37 \pm 6.720	1.75 \pm 0.95
	24	4	69.62 \pm 8.480	3.25 \pm 2.21
	36	4	68.37 \pm 10.96	1.00 \pm 1.41
	48	4	70.05 \pm 12.60	2.00 \pm 2.16
	60	4	67.75 \pm 8.370	1.25 \pm 0.95
	72	4	71.12 \pm 6.280	1.25 \pm 0.95
4.4	0	4	64.25 \pm 11.17	2.00 \pm 1.82
	12	4	61.25 \pm 7.170	2.50 \pm 1.29
	24	4	56.50 \pm 10.70	2.00 \pm 0.81
	36	4	55.25 \pm 8.300	1.75 \pm 0.95
	48	4	60.12 \pm 11.37	1.25 \pm 0.95
	60	4	55.33 \pm 11.27	1.33 \pm 0.57
	72	4	56.25 \pm 3.470	1.25 \pm 0.50

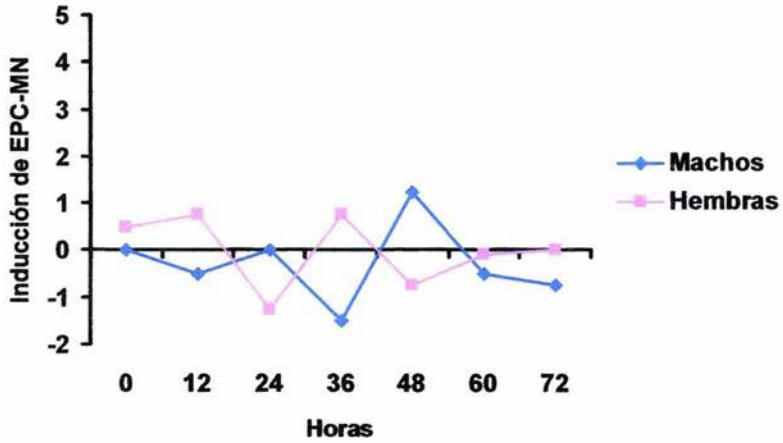


Figura 7. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN (DIF) en ratones hembras sin preñar y machos con tratamiento agudo

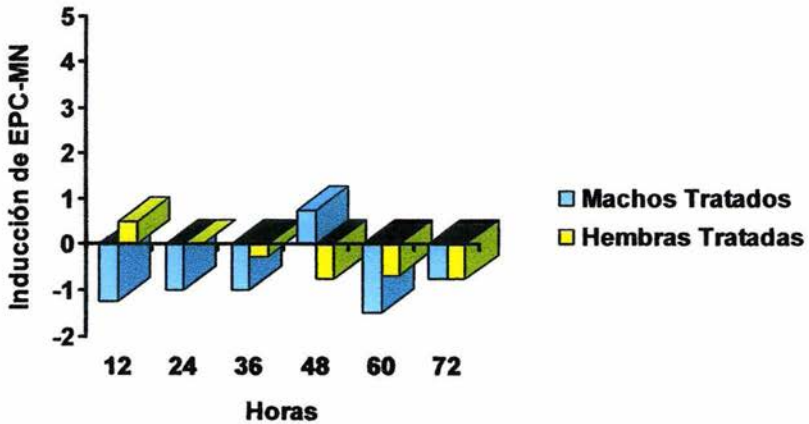


Figura 8. Inducción Neta de la Frecuencia de EPC-MN (NIF) en ratones hembras sin preñar y machos con tratamiento agudo

2. Tratamiento subcrónico en machos y hembras sin preñar

En el cuadro 3 se muestran los resultados de la inducción de MN y de la frecuencia de EPC en machos con un tratamiento subcrónico, observándose que la frecuencia de EPC, disminuyó y resultó estadísticamente significativo en los días 3, 4 y 5, mientras que para las hembras sin preñar, con este mismo tratamiento, la frecuencia de EPC a los días 8 y 9 resultaron alteradas e indujo MN en el día 10 (cuadro 4), además de que se observó muerte en los animales a partir del día 6. Al obtener el DIF (figura 9) y el NIF (figura 10) en los machos y hembras sin preñar, se distingue que tanto en la diferencia como en la inducción neta de la frecuencia de EPC-MN, tiene efectos estadísticamente significativos sólo en las hembras en el día 10.

Cuadro 3. Frecuencia de la inducción de MN y de EPC en machos con tratamiento subcrónico.

Tratamiento Casiopeinas (mg/kg)	Día	N	EPC± de	EPC-MN ± de
0	0	5	65.4 ± 3.41	1.4 ± 0.89
	1	5	62.8 ± 1.30	1.6 ± 1.51
	2	5	62.4 ± 3.18	1.0 ± 1.00
	3	5	64.4 ± 4.49	2.0 ± 0.70
	4	5	60.4 ± 1.19	1.0 ± 0.70
	5	5	62.8 ± 3.03	0.8 ± 0.83
	6	5	64.0 ± 4.16	1.0 ± 0.70
	7	5	66.3 ± 3.19	1.0 ± 1.00
	8	5	65.1 ± 2.19	1.8 ± 1.09
	9	5	65.6 ± 0.74	0.8 ± 0.44
4.4	10	5	64.2 ± 2.25	1.2 ± 0.83
	0	5	60.2 ± 2.94	1.2 ± 1.30
	1	5	61.1 ± 3.07	2.0 ± 0.70
	2	5	60.3 ± 2.90	1.2 ± 0.83
	3	5	57.6 ± 1.91*	1.2 ± 0.44
	4	5	52.2 ± 3.13*	0.4 ± 0.54
	5	5	54.4 ± 4.39*	1.8 ± 0.83
	6	5	64.3 ± 3.51	1.6 ± 0.89
	7	5	60.5 ± 1.69	1.8 ± 0.83
	8	5	61.9 ± 3.41	1.4 ± 1.34
9	5	67.5 ± 2.03	1.2 ± 0.44	
10	5	59.8 ± 4.00	2.2 ± 1.92	

* p<0.05 con la prueba ANOVA seguida de Tuckey

Cuadro 4. Frecuencia de la inducción de MN y de EPC en hembras sin preñar con tratamiento subcrónico.

Tratamiento Casiopeínas (mg/kg)	Día	N	EPC \pm de	EPC-MN \pm de
0	0	5	57.0 \pm 4.06	0.8 \pm 1.30
	1	5	55.6 \pm 3.64	0.8 \pm 1.30
	2	5	53.7 \pm 3.36	1.6 \pm 1.14
	3	5	55.9 \pm 4.85	0.4 \pm 0.54
	4	5	56.7 \pm 3.70	0.8 \pm 0.44
	5	5	55.4 \pm 1.19	1.0 \pm 1.41
	6	5	57.8 \pm 4.20	1.4 \pm 0.54
	7	5	55.9 \pm 3.84	1.6 \pm 1.14
	8	5	54.8 \pm 3.09	1.8 \pm 0.83
	9	5	56.4 \pm 1.63	2.0 \pm 1.00
4.4	10	5	54.3 \pm 1.80	1.2 \pm 0.44
	0	5	56.5 \pm 4.16	0.2 \pm 0.44 ^a
	1	5	53.8 \pm 1.68	1.2 \pm 1.09
	2	5	55.4 \pm 3.26	1.4 \pm 0.54
	3	5	55.3 \pm 4.23	1.8 \pm 1.64
	4	5	52.1 \pm 4.17	1.4 \pm 0.89
	5	5	52.8 \pm 6.62	1.6 \pm 1.14
	6	4	55.0 \pm 2.27	1.7 \pm 0.95
	7	3	49.6 \pm 6.82	2.0 \pm 1.00
	8	2	41.5 \pm 5.65*	0.5 \pm 0.70
9	2	47.0 \pm 3.53*	2.0 \pm 0.00	
10	2	54.2 \pm 3.88	3.5 \pm 1.12 *	

* $p < 0.05$ con la prueba ANOVA seguida de Tuckey vs a

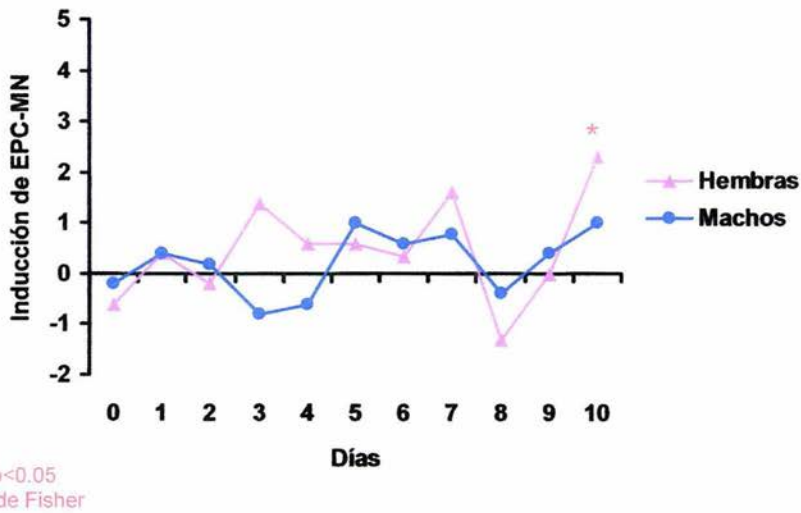


Figura 9. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN (DIF) en ratones hembras sin preñar y machos con tratamiento subcrónico

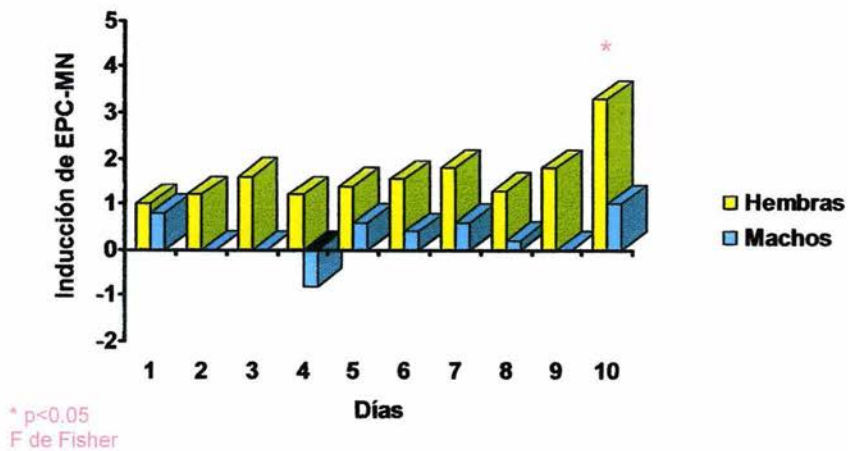


Figura 10. Inducción Neta de la Frecuencia de EPC-MN (NIF) en ratones hembras sin preñar y machos con tratamiento subcrónico

3. Tratamiento subcrónico a hembras preñadas

En el cuadro 5 se observan los resultados obtenidos de la inducción de MN y de la frecuencia de EPC en hembras preñadas cuando se les administró el tratamiento subcrónico, en donde se observa que la administración de 4.4 mg/kg indujo muerte materna, además de observarse un aumento en la frecuencia de MN que resultó estadísticamente significativo en los días 8, 9, 11, 12 y 13 de gestación. Sin embargo, la dosis de 3.3 mg/kg no presentó efecto alguno. Al realizar el DIF (figura 11) y el NIF (figura 12) en los EPC-MN sólo en las hembras preñadas tratadas con 4.4 mg/kg, la inducción resultó estadísticamente significativa en los días 8, 11 y 12 de gestación en ambos análisis. Al realiza el DIF y el NIF en las hembras tratadas con 3.3 mg/kg no se observó efecto alguno. Cabe mencionar que la única hembra sobreviviente tratada con 4.4 mg/kg perdió la camada y desde el día 17 de gestación se observó muerte materna.

Cuadro 5. Frecuencia de la inducción de MN y de EPC en hembras preñadas con tratamiento crónico.

Tratamiento Casiopeinas (mg/kg)	Días de gestación	N	EPC \pm de	EPC-MN \pm de	
0	6	5	64.54 \pm 5.97	0.80 \pm 0.44	
	7	5	65.18 \pm 1.33	1.80 \pm 1.70	
	8	5	70.72 \pm 3.82	2.40 \pm 1.51	
	9	5	71.62 \pm 2.78	2.40 \pm 1.14	
	10	5	78.78 \pm 3.07	1.80 \pm 0.83	
	11	5	79.64 \pm 5.08	2.20 \pm 1.30	
	12	5	77.12 \pm 7.74	1.40 \pm 1.10	
	13	5	75.74 \pm 3.52	2.60 \pm 1.94	
	14	5	73.64 \pm 5.41	1.40 \pm 0.54	
	15	5	66.26 \pm 8.63	1.00 \pm 1.41	
	16	5	65.34 \pm 6.36	1.00 \pm 1.00	
	17	4	63.57 \pm 7.09	1.50 \pm 0.57	
	18	4	63.40 \pm 1.31	0.75 \pm 0.95	
	4.4	6	7	64.80 \pm 1.34	0.85 \pm 0.69 ^a
		7	7	65.80 \pm 3.56	2.00 \pm 1.52
		8	7	73.20 \pm 4.17	4.57 \pm 2.50*
		9	7	74.10 \pm 5.54	3.42 \pm 1.13*
10		7	73.07 \pm 4.86	2.28 \pm 1.20	
11		7	71.80 \pm 3.05	4.57 \pm 1.98*	
12		7	73.22 \pm 3.58	5.00 \pm 1.63*	
13		7	69.37 \pm 5.36	3.28 \pm 1.38*	
14		6	62.70 \pm 8.60	2.16 \pm 2.92	
15		6	61.01 \pm 5.45	2.16 \pm 0.75	
16		6	59.20 \pm 5.04	1.80 \pm 0.98	
3.3	17	4	57.87 \pm 2.38	2.75 \pm 1.70	
	18	1	64.1 \pm 00.00	2.00 \pm 00.0	
	6	7	59.27 \pm 1.06	0.71 \pm 0.75	
	7	7	63.34 \pm 2.16	1.43 \pm 0.78	
	8	7	55.32 \pm 4.12	2.45 \pm 1.72	
	9	7	49.22 \pm 4.35	1.43 \pm 0.97	
	10	7	45.44 \pm 2.06	1.57 \pm 1.27	
	11	7	50.62 \pm 5.29	1.71 \pm 1.25	
	12	7	59.87 \pm 6.04	1.86 \pm 1.34	
	13	7	55.95 \pm 8.90	0.71 \pm 0.48	
	14	7	61.07 \pm 4.60	1.14 \pm 0.69	
	15	7	62.72 \pm 4.16	1.14 \pm 1.07	
16	7	64.80 \pm 4.45	1.71 \pm 1.25		
17	6	61.25 \pm 4.17	1.83 \pm 1.47		
18	6	61.06 \pm 1.55	0.83 \pm 0.75		

* p<0.05 con la prueba ANOVA seguida de Tuckey vs a

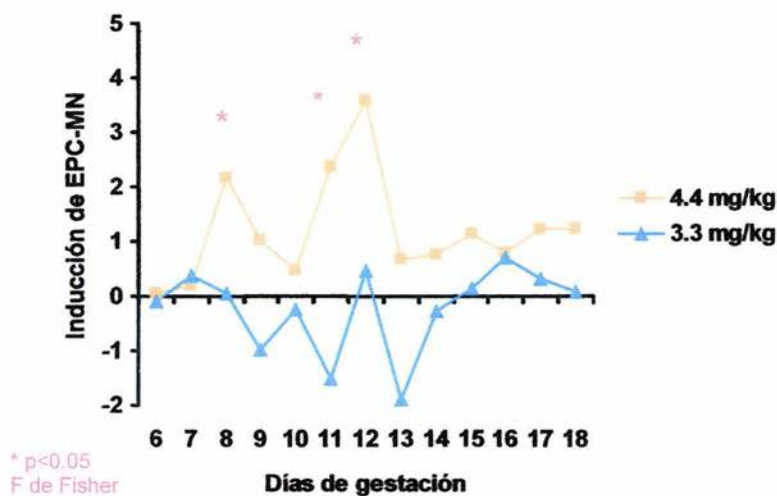


Figura 11. Inducción Diferencial de la Frecuencia de EPC-MN (DIF) en ratones hembras preñadas con tratamiento subcrónico

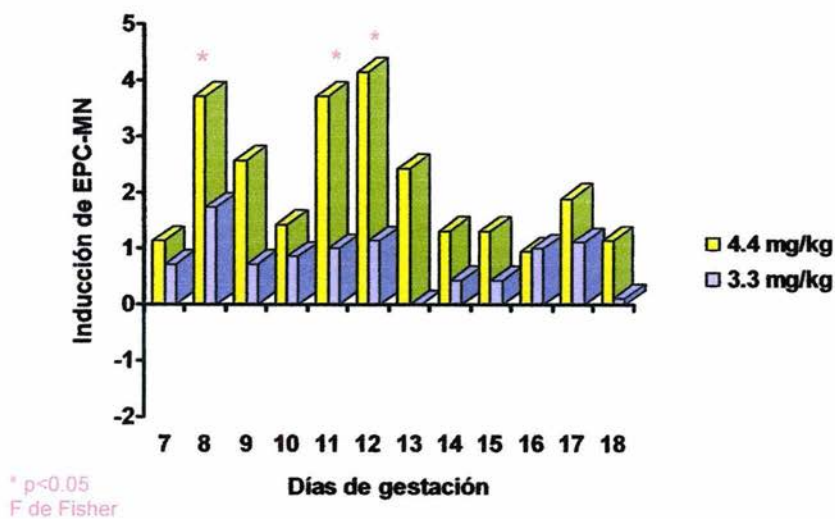


Figura 12. Inducción Neta de la Frecuencia de EPC-MN (NIF) en ratones hembras preñadas con tratamiento subcrónico (4.4 y 3.3 mg/kg de casiopéina II-gly)

4. Fetos de hembras con tratamiento subcrónico

Los resultados observados, de los fetos obtenidos de hembras con tratamiento subcrónico se muestran en el cuadro 6, donde se aprecia que existe un incremento estadísticamente significativo tanto en la frecuencia de EPC como de MN sólo en los fetos de las hembras tratadas con 3.3 mg/kg, ya que las hembras tratadas con 4.4 mg/kg presentaron muerte materna y fetal. Cabe mencionar que 2 hembras tratadas con 3.3 mg/kg perdieron su camada, por lo que únicamente se obtuvieron fetos de 4 hembras.

Cuadro 6. Frecuencia de la inducción de MN y de EPC en fetos de hembras con tratamiento subcrónico.

Tratamiento Casiopeinas (mg/kg)	N	EPC± ds	EPC-MN± ds
0	20	510.00 ± 55.72	2.50 ± 1.26
3.3	16	406.34 ± 50.51 *	5.43 ± 1.56*
4.4	0	0	0

* $p < 0.05$ con la prueba ANOVA seguida de Tuckey

VIII. DISCUSIÓN

Dado que las casiopeínas fueron sintetizadas para su posible aplicación antineoplásica en humanos, es necesario someterlas a una serie de estudios preclínicos antes de su aplicación, además de ser lo solicitado por las agencias reguladoras cuando se desarrolla un nuevo fármaco. Estos estudios van desde los químicos hasta los toxicológicos, dentro de estos últimos es necesario establecer la posible genotoxicidad, por lo que en el presente trabajo, se estudió el efecto de la casiopeína II-gly sobre la inducción de MN, al ser administrada tanto de manera aguda como subcrónica en concentraciones de 3.3 y 4.4 mg/kg.

Las casiopeínas son un grupo de compuestos de coordinación muy parecidas a la molécula del cisplatino, sólo que el centro metálico de platino se sustituye por cobre para disminuir su toxicidad, por ello, se esperaba que la casiopeína II-gly tuviese un efecto parecido al del cisplatino, el cual es un claro agente genotóxico (Ruiz-Ramírez, *et al.*, 1993; Lippert, 1999).

En diversos estudios se ha observado que el cisplatino induce daño al ADN, causando principalmente entrecruzamientos 1,2-intrahebra en la posición N⁷ de las guaninas, así como entrecruzamientos 1,3-intrahebra, además de entrecruzamientos interhebra, y de aductos monofuncionales (Lippert, 1999). Así mismo, se ha encontrado que el cisplatino inhibe la replicación del ADN, la transcripción del ARN, y genera apoptosis (Barry, 1990; Ciccarelli, 1985; Mello, 1995; Uchida, 1986). Este daño al ADN, puede resultar en su fragmentación y posterior formación de MN, causando inestabilidad cromosómica, la cual puede conducir a una muerte celular por apoptosis (Mazur, 2000).

En algunos sistemas de prueba, tales como; cultivos de linfocitos humanos, medula ósea de ratón y de rata, se ha observado que el cisplatino

causa intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas, destacando los rompimientos de tipo cromosómico, los cuales están asociados con daño clastogénico (Alder, 1989; Ohe, 1990; Krishnaswamy, 1991; Edelweiss, 1995; Olveira, 2002).

Al cisplatino también se le ha descrito como un agente inductor de MN, ya que en los estudios realizados por Mazur (2000), una sola administración de 5 mg/kg de cisplatino a ratones, les indujo en promedio alrededor de 100 EPC-MN en medula ósea y 45 EPC-MN en sangre periférica, al ser comparados con los testigos. Así mismo en otro estudio realizado por Kliesch (1987), al administrar la misma dosis de cisplatino, se observó un incremento en la frecuencia de MN de alrededor de 57 EPC-MN en medula ósea con respecto a los testigos. Estas dosis utilizadas de cisplatino corresponden aproximadamente a un medio de la dosis terapéutica para humano que es de 8-10 mg/kg de peso (Khyriam, 2003).

En este estudio se empleó $\frac{1}{2}$ de la LD₅₀ de casiopeína II-gly (4.4 mg/kg), (la cual corresponde a 5 veces más, la posible dosis terapéutica inicial propuesta para humanos) y no fue un claro inductor de MN, lo cual se contrapone con los datos observados para cisplatino (Kliesch, 1987; Mazur, 2000), lo que hace suponer que aunque la molécula de casiopeína es muy similar a la del cisplatino, el cambio del platino por el cobre, muy seguramente modifica la respuesta de daño al ADN para la inducción de MN.

Si bien, la casiopeína II-gly ha demostrado actividad antineoplásica, su mecanismo de acción al parecer no es mediante el daño al ADN (al menos para la formación de MN), aunque en los resultados se observa un incremento en la frecuencia de MN, estos no se pueden considerar como un daño genotóxico, debido a que en el tratamiento subcrónico de las hembras sin preñar, el incremento en los EPC-MN sólo se presentó en la última hora de evaluación

(día 10), y este efecto fue de sólo 2 MN con respecto a su testigo, además de que no se pudo evaluar en las 5 hembras del grupo, debido a la muerte de 3 de ellas.

Estas tres variables observadas 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 médula ósea. Además, 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 a torrente sanguíneo, y son detectables hasta 24 horas después de ese pico máximo de inducción, dado que se necesitan 24 horas para que un EPC se convierta en un ENC (Mavournin, 1990; MacGregor, 1980). Por otra parte, Reyes (2003), demostró mediante cromatografía de líquidos, que al administrar 8 mg/kg de casiopeína II-gly a ratas, la casiopeína es eliminada del plasma en un corto tiempo, y observa que al tiempo cero se obtuvo en plasma una concentración de 25.67 µg/ml de casiopeína y la vida media observada fue aproximadamente de 40 minutos, lo que hace pensar que la casiopeína es metabolizada rápidamente, y sí causaran daño genotóxico, este sería inmediato. Por lo tanto, como no se observaron MN en los primeros días de evaluación y el incremento de MN se observó sólo hasta el día 10 del tratamiento, entonces, probablemente este daño no es producido por la casiopeína.

Así mismo, el hecho de que sólo se encontraran poco más de 2 MN, con respecto a su testigo y aunque resultaron ser estadísticamente significativos, esto no demuestra su genotoxicidad, ya que las diferentes agencias

reguladoras tales como la FDA, IARC, así como la ICH, mencionan que para que un fármaco sea genotóxico, es necesario que se incremente claramente el número de EPC-MN, al ser comparados con sus testigos, tales como los datos obtenidos por Kliesch (1987) que observó incremento de 57 EPC-MN en medula ósea de ratón, y Mazur (2000) que obtuvo un incremento de 100 EPC-MN en medula ósea y 45 EPC-MN en sangre periférica de ratón. Tomando en cuenta los datos mencionados anteriormente, podemos concluir que la casiopeína II-gly no es genotóxica (al menos no es inductora de MN).

De igual manera, como se observó muerte en las hembras sin preñar desde las día 6 hasta el día 10, y en la última día de evaluación sólo sobrevivieron 2 de ellas, entonces, esto no nos permitió evaluar en al menos 5 organismos por grupo, como lo indica la FDA para considerar si un agente químico es genotóxico (FDA, 2000). Sin embargo, estas muertes observadas probablemente son debidas a un efecto toxicológico del fármaco *per se*, lo que puede estar alterando funciones fisiológicas en el organismo, debido a la confluencia de algunos factores tales como; la dosis, la vía de administración, el tiempo de exposición, así como a una compleja relación entre la absorción del fármaco, su distribución en los diferentes fluidos corporales, la biotransformación, y la eliminación del mismo, que al ser alterados debido a la administración del fármaco, puedan estar; a) modificando propiedades físicas y químicas de algunos fluidos o sus constituyentes, b) reemplazando sustancias fisiológicas, c) ocupando receptores, d) modificando las funciones de la membrana celular, e) alterando los productos celulares, ó f) interfiriendo con la síntesis de proteínas. Es probable que alguno de los factores anteriores pueda estar provocando la muerte de las hembras sin preñar al ser tratadas subcrónicamente con casiopeína II-gly (Scialli, 1992; Ballantyne, 1993).

Al analizar por otra parte, los resultados cuando se administró el tratamiento subcrónico del día 6 al 15 de gestación y con dosis de 4.4 mg/kg en las hembras preñadas, se obtuvo; un incremento de la frecuencia de MN en los días 8, 9, 11, 12 y 13 de gestación, después de aplicar el NIF y el DIF el incremento persistió en los días 8, 11 y 12 de gestación; se incrementó alrededor de 3 MN con respecto al testigo; y además se observó muerte materna desde el día 14 de gestación hasta el último día de evaluación.

Si bien, el daño genotóxico observado en las hembras preñadas es marginal (de alrededor 3 MN), este efecto probablemente es debido a un acción indirecta de la casiopeína, ya que durante la gestación, los cambios fisiológicos y la presencia de una actividad metabólica placentaria, pueden aumentar la sensibilidad materna a agentes xenobioticos y de esta manera generar un daño genotóxico indirecto, provocando con ello toxicidad materna, hasta llegar a la muerte (Hood, 1997).

Un estudio realizado por Giavini (1990) al trabajar con ratas, observó que una sola aplicación de 6 mg/kg de cisplatino a hembras preñadas, les indujo en promedio 86 EPC-MN en medula ósea, con respecto al testigo, este dato nos muestra claramente como el cisplatino es un potente inductor de MN en hembras preñadas, y comparando los datos obtenidos por Giavini, con este estudio, se observa que el incremento de MN que induce la casiopeína es muy bajo ó marginal.

Debido a que el tratamiento subcrónico en hembras preñadas indujo mortalidad materna, a partir del día 14 de gestación hasta contar con sólo una hembra en el día 18 de gestación, y como también indujo fetoletalidad, se piensa que la casiopeína II-gly provocó un efecto toxicológico en las hembras preñadas, ya que la mortalidad materna y la fetoletalidad son claros signos de toxicidad (Hood, 1997). Un estudio previo de teratogénesis realizado en nuestro

laboratorio, en los que se utilizó el mismo compuesto (casiopeína II-gly), la misma dosis (4,4 mg/kg) y tratamiento (subcrónico a hembras preñadas), se observó que sólo 5 de 10 hembras preñadas llegaron a término debido a muerte materna, el peso corporal ganado durante el periodo de gestación en promedio disminuyó (0.54 g por día), además de que sólo se obtuvieron 3 fetos vivos por camada, y el número de reabsorciones se incrementó (González, 2004). Todos estos datos observados, son claros indicadores de toxicidad materna, debida al tratamiento, por lo tanto, estos antecedentes y nuestros resultados (muerte materna y fetoletalidad), apoyan la idea de que probablemente el efecto genotóxico observado en el tratamiento subcrónico en las hembras preñadas, sea debido a la toxicidad generada por la casiopeína.

Al observar los resultados de los fetos obtenidos de hembras tratadas subcrónicamente y con una concentración de 3.3 mg/kg, encontramos que existe incremento en la frecuencia de MN, y aunque no fue posible evaluar el efecto genotóxico en los fetos de madres tratadas con 4.4 mg/kg, debido a que, como ya se mencionó, esta dosis de casiopeína es fetoletal, estos daños causados a los fetos puede ser debidos a dos vías diferentes:

a) Directa, el agente atraviesa la placenta o el saco vitelino y causa toxicidad en el desarrollo del embrión y el feto (Scialli, 1992).

b) Indirecta, el agente induce alteraciones en la homeostasis de la madre, y por lo tanto estos desórdenes alteran el desarrollo fetal (Cole *et al.*, 1981).

Aunque, el saco vitelino (en roedores) es un sistema de intercambio entre la madre y el feto al rodear internamente al útero en forma de anillo, y la placenta sea una barrera filtradora de una gran cantidad de sustancias químicas evitando el contacto directo con los productos durante el desarrollo fetal, se han

descrito que algunas sustancias químicas pueden atravesarlas e inducir directamente alteraciones en los organismos. El tamaño de la molécula y la liposolubilidad, son unos de los principales parámetros que contribuyen en la transferencia de sustancias entre la madre y el feto (Juchau, 1981; Hood, 1997; Scialli, 1992). Situación que muy seguramente esta sucediendo con la casiopeína, que atraviese placenta y saco vitelino, ya que el peso molecular de la casiopeína es de 425.89 g/mol y el peso máximo que debe tener una molécula para atravesar la placenta es de 1000 g/mol, además de que la casiopeína II-gly es altamente lipofílica, y debido a estos factores, la casiopeína II-gly esta afectando a los fetos produciendo MN o su muerte.

También, la toxicidad materna se ha asociado con las alteraciones en el desarrollo del embrión o del feto, por lo que una alteración en la fisiología o metabolismo de las madres a consecuencia de algún agente químico exógeno, puede alterar indirectamente el desarrollo de las crías y como consecuencia incrementar la frecuencia de inducción de MN, o inducir la muerte fetal (Hood, 1997; Scialli, 1992). No se descarta la idea de que también esta vía de daño indirecto sea la responsable de la inducción de MN o hasta de la muerte de los fetos.

Por otra parte, el análisis de los resultados obtenidos de la frecuencia de EPC, en las hembras preñadas, no resultó afectada en ninguna de las dosis (4.4 mg/kg, y 3.3 mg/kg), al igual que en los machos y hembras sin preñar con tratamiento agudo. Esta evaluación de la frecuencia de EPC en sangre periférica nos indica daño citotóxico, sin embargo, en un gran número de estudios, no ha sido posible concluir respecto a este parámetro, debido a la variabilidad natural que se presenta, ya que si un compuesto induce muerte celular, se disminuiría la frecuencia de EPC, pero a su vez, esta señal puede desencadenar la proliferación acelerada de eritrocitos para compensar dicha muerte (Krishna, *et al.*, 2000).

Sin embargo, en los datos obtenidos del tratamiento subcrónico y una concentración de 4.4 mg/kg en machos, se observan alteraciones en la frecuencia de EPC sólo en los días 3, 4 y 5 horas; los resultados de las hembras sin preñar con el mismo tratamiento y concentración, sólo se observó alterada la frecuencia de EPC en los días 8 y 9. En este caso, como se menciono anteriormente, la evaluación de la frecuencia de EPC, es cuestionable, ya que algunas veces no es posible evaluar si algún fármaco es citotóxico, debido a la variabilidad natural que se presenta en la eritropoyesis. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que las casiopeínas son citotóxicas, por ejemplo, Ruiz-Ramírez, *et al.* (1993) demostró que inhibe el crecimiento celular (citotoxicidad) en líneas tumorales humanas de Sarcoma S189, CaLo y HeLa.

En los resultados de los fetos obtenidos de las hembras tratadas subcrónicamente con una concentración de 3.3 mg/kg, se observó alterada la frecuencia de EPC, en este caso sí se podría decir que la casiopeína II-gly es citotóxica, esto debido a que la casiopeína muy seguramente atravesó placenta y daño directamente a los fetos, aunque también el daño pudo ser indirecto, como se menciono anteriormente.

Con estos resultados, observamos que aunque la casiopeína II-gly es una molécula muy similar a la del cisplatino, el tratamiento agudo y subcrónico en una concentración de 4.4 mg/kg en machos y hembras sin preñar, no genera daño al ADN (al menos no forma micronúcleos, ni es citotóxica), al igual que en el tratamiento subcrónico a una concentración de 3.3 mg/kg en hembras preñadas, además de crear daño toxicológico, al provocar su muerte. La administración subcrónica de 4.4 mg/kg a hembras preñadas, genera una genotoxicidad indirecta, debida a la toxicidad observada mediante la muerte materna. Por último también la casiopeína II-gly, puede estar provocando una genotoxicidad indirecta a los fetos, debido al daño toxicológico producido en las

madres, ó directa en dado caso que la casiopeína atraviere placenta y saco vitelino.

Al parecer el mecanismo de daño al ADN, al menos para la formación de MN por las casiopeínas, es diferente al del cisplatino. Sin embargo, las casiopeínas al parecer si generan daño al ADN, mediante otra vías, por ejemplo, Vizcaya-Ruiz (2000), demostró que la casiopeína II-gly es capaz de inducir muerte celular por apoptosis en líneas celulares, tales como, de leucemia murina L1210 y de carcinoma ovárico humano CHI, y cuando se realizó el análisis de la morfología nuclear éste mostró condensación de cromatina y fragmentación nuclear.

Finalmente, todos esto datos obtenidos de los machos, hembras sin preñar y hembras preñadas con tratamientos agudos y subcrónicos, nos indica que probablemente las hembras son más sensibles a dicho fármaco que los machos (debido a las muertes observadas en las hembras tratadas subcrónicamente) ya que existen evidencias donde nos reportan la diferencia de género en respuesta a alguna sustancia tóxica, debido a las diferencias hormonales en ambos sexos (FDA, 2000; Hayashi, 1994; Mavourin, 1990; Müller, 1999).

IX. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, las conclusiones son las siguientes:

- El tratamiento agudo y subcrónico de la casiopeína II-gly en ratones machos y hembras sin preñar, no altera la frecuencia de MN, por lo tanto no es genotóxica (al menos no forma MN), al igual que, el tratamiento subcrónico del día 6 al día 15 de gestación con una concentración de 3.3 mg/kg de casiopeína II-gly en hembras preñadas.
- En las hembras preñadas, el tratamiento subcrónico del día 6 al día 15 de gestación con una concentración de 4.4 mg/kg de casiopeína II-gly, incrementa marginalmente el número de MN, por lo que el daño genotóxico posiblemente es indirecto, debido a la toxicidad observada como muerte materna y fetal.
- Los tratamientos agudos de casiopeína II-gly, no alteran la frecuencia de EPC en las hembras sin preñar, en los machos, ni en las hembras preñadas.
- En los machos y las hembras sin preñadas tratadas subcrónicamente con casiopeína II-gly, no se altera de manera clara la frecuencia de EPC.
- La casiopeína II-gly es genotóxica y citotóxica en los fetos obtenidos de las hembras tratadas subcrónicamente con 3.3 mg/kg.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aldler, I., El-Tarras, A. (1989) Clastogenic effects of *cis*-diamminedichloroplatinum(II). Part I. Induction of chromosomal aberrations in somatic and germinal cells of mice. *Mutation Research*, 244;131-137.
- Ballantyne, B., Marrs, T., Turner, P. (1993) "General & applied toxicology". Volume 1. de Macmillan Press Ltd. USA. 865p.
- Barry, M., Behnke, C., Eastman, A. (1990) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochemical Pharmacology*, 40;2353-2362.
- Boyd, M. y Paull, K. (1995) Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute *in vitro* anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research*, 34;91-109.
- Bravo, E., Tovar, A., Ruiz, M., Ruiz, L., Moreno, R. (2002) "Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre casiopeínas". Primer Congreso en Casiopeinas, UNAM. p1-9
- Bruce, A. Bray, D. Lewis, J. Roberts K., Watson, J. (1989) "Molecular Biology of the Cell". Garland publishing. New York. 1315p
- Carballo, F., Mejía, C., Gómez, C., Constantino, F., Roldán, E., Gracia, I. (2002) "Determinación *in vitro* de las células vías de inducción de apoptosis por casiopeína III en células de carcinoma humano". 1^{er} Congreso en Casiopeínas y 5^a Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química. p74-77

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Chin-Jen Lee. (2000) Development and Evaluation of Drugs: from Laboratory Through Licensure to Market. CRC Press, Inc. USA, 226p.

- Cicarelli, R., Solomon, M., Varshavsky, A., Lippard, S. (1985) *In vivo* effects of *cis*- and *trans*- diamminedichloroplatinum(II) on SV40 chromosomes: differential repair. DNA-protein crosslinking, and inhibition of replication. *Biochemistry*, 24;7533-7540.

- Cirigo, C., Moreno, R., Ruiz, L. (2002) "Interacciones entre complejos ternarios del tipo casiopeína II con el ADN y sus constituyentes" 1^{er} Congreso en Casiopeínas y 5^a Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química. p135-140

- Cole, R., Taylor, N., Cole, J., Arlet, C. (1981) Short-term test for transplacentally active carcinogens. *Mutation Research*, 80;141-157.

- Cruces, M., De la rosa, E., Pimentel, E., Gracia, I., Ruiz, L. (1994) "Pruebas de genotoxicidad". 1^a Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química, Resumen 14.

- De la Rosa, E., Mavcote, P., Salgado, A., Ruíz, L. (1998) "Estudio de los subproductos del metabolismo de las casiopeínas *in vivo*". 3^a Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química, p73-77

- De Vita, V., Hellman, S. Rosenberg, S. (1993) "Cancer; Principles & Practice of Oncology". Volume 1. 4^o ed. J.B. Lippincott company, E.U. 915p.

- De Vizcaya, A., Gracia, I., Castilla, M., Saldivar, L., Ruíz, L (1996) "Análisis post-mortem de cobre en órganos tratados con casiopeína II". 2^a Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química, p53

- Edelweiss, K., Trachtenberg, A., Pinhero, E., Da-Silva, J., Riegel, M., Mattevi, M. (1995) Clastogenic toxicity of platino on Wistar rat bone marrow cells. *Journal Medical Biology Research*, 28;679-683.

- FDA, Food and Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition Office of Premarket Approval (2000), Mammalian erythrocyte micronucleus test. (en línea) Julio 7, 2000 (fecha de acceso 23 de Julio del 2001). URL disponible en: <http://vm.cfsan.fda.gov/~redbook/redivc1d.html>.

- Ferrer, S., Gasque, L., Moreno, E., y Ruíz-Azuara, L. (1995) "Equilibrio en disolución". 1ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química de la UNAM, Resumen 4.

- Fuentes, I., Jarquín, A., Ruiz-Ramirez, L. (2002) "Farmacocinética preclínica de casiopeína III en ratas, conejos y perros y su distribución en sangre total". 1er Congreso en Casiopeínas y 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química, p89-100.

- García-Rodríguez, M.C., Lopez-Santiago, V. y Altamirano-Lozano, M. (2001) Effect of Chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research*, 496;145-151.

- García-Rodríguez M. Carmen y Altamirano Lozano M. (2001) Sales de sodio y cobre de la clorofila; usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticarcinógena. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas*, 4(2);77-86.

- Giavini, E., Lemonica, I., Lou, Y., Broccia, M., Prati, M. (1990) Induction of micronuclei and toxic effects in embryos of pregnant rats treated before implantation with anticancer drugs: cyclophosphamide, cis-platinum, adriamycin. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 10;417-426.

- Gil, I.; Rabadan, I.; Bustamante, I. (1997) "Carcinogénesis: fundamentos etiológicos del cáncer". Universidad de Valladolid, 149p.

- Gómez, E., Galicia, P., Gracia, M., Sumano, H. (1994) "Informe de casos clínicos de perros y gatos tratados con casiopeínas". 1ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química, Resumen 12.

- González, ME. (2004) "Efecto teratogénico de la casiopeína II". Tesis para obtener el título de bióloga. UNAM, FES-Zaragoza.

- Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L., Gómez, C., Tinoco, M., Márquez, A., Romero, L., Marín, A., Macías, L., Bravo, E. (2001) Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeínas, evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panel. *Metal Based Drugs*, 8(1);19-28.

- Hayashi, M., Morita, T. Kodama. Y., Sofuni, T. y Ishidate, M Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, 245;245-249.

- Heddle, A. John, Hite, M., Kirkhart, MK. y Salamone, FM. (1983) "The induction the micronuclei as a measure of genotoxicity". Ed. Elsevier Publisher 83, 61-118.

- Hood, R. (1997) "Handbook of Developmental Toxicology". CRC Press, Inc. 457p.
- Jackson, MA., Stack, HF., Waters, MD. (1996) Genetic activity profiles of anticancer drugs. *Mutation Research*, 355;171-208.
- Jordan P., Carmo-Fonseca, M. (1998) Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA *in vivo*. *Nucleic Acid Research*, 26;2831-2836.
- Juchau, M. (1981) "The Biochemical Basis of Chemical Teratogenesis". Elsevier/North-Holland. 358p
- Khinryam, D., Prasad, S. (2003) Cisplatin-induced genotoxic effects endogenous glutathione levels in mice bearing ascites Dalton's lymphoma. *Mutation Research*, 526;9-18.
- Kliesch, I., Adler, I. (1987) Micronucleus test in bone marrow of mice treated with 1-nitropropane, 2- nitropropane and cisplatin. *Mutation Research*, 192;181-184.
- Krishna, G., Fiedler, R., Theiss, JC. (1992) Simultaneous evaluation of clastogenicity, aneugenicity and toxicity in the mouse micronucleus assay immunofluorescence. *Mutation Research*, 282;159-167.
- Krishna, G., Urdana, G., and J. Theiss (1998) Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies; a pharmaceutical industry perspective. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32;115-120.

- Krishnaswamy, G., Dewey, W. (1993) Cisplatin induced cell killing and chromosomal aberration in CHO cells treated during G1 or S phase. *Mutation Research*, 293;161-172.

- Lippert, B. (1999) "Cisplatino: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug". Verlag Helvetica Chimica Acta Zurich. pp. 563.

- MacGregor, J., Wehr, C., and Gould, D. (1980) Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis*, 2;509-514.

- Magrath, I. (1989) "New direction in cancer treatment. Springer-verlag". International Union Ag. 215p.

- Marín-Hernandez, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L., Moreno-Sanchez, R. (2003) Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (casiopéinas) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology*, 65;1979-1989.

- Mavournin, KH., Blakey, DH., Cimino, MC., Salamone, MF., Heddle, HA. (1990) The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 239;29-80.

- Mazur, L., Czyzewska, A., Augustynek, A. (2000) WR-2721: Inhibitor of cisplatin-induced micronuclei. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 20;349-356.

- Mello, A., Lippard, S., Essigmann, J. (1995) DNA adducts of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) and its *trans* isomer inhibit RNA polymerase II differentially *in vivo*. *Biochemistry*, 34;14783-14791.

- Morales, P., Vallarino-Kelly, K., y Rodríguez, R. (1994) "Determinación del potencial citostático de drogas antineoplásicas en desarrollo mediante su efecto sobre el índice mitótico en células de la médula ósea de ratón *in vivo*". 1ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química de la UNAM, Resumen 5.

- Müller, L., Kikuchi, Y., Probst, G., Schechtman, L., Shimada, H., Sofuni, T., Tweats, D., (1999) ICH-Harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Research*, 436;195-225.

- Muñoz, A. (1997) "Cáncer; genes y nuevas terapias". Ed, Helice, España, 158p.

- Murphy, G., Lawrence. W. Jr., Lenhard, R. (1996). "Oncología Clínica; Manual de la American Cancer Society". 2da Ed. Publicaciones Científicas No. 559, Organización Panamericana de la Salud. 389p.

- Ohe, T., Tsuda, S., Sakata, Y., Taniwaki, M., Misaea, S., Abe, T. (1990) *cis*-diamminedichloroplatinum II-Induced sister-chromatid exchanges and chromosome aberration formation in cultured human lymphocytes and their inhibition by sodium thiosulfate. *Mutation Research*, 244;279-285.

- Oliveira, L., Gregg, L., Coletta, H., Pires, M. (2002). The effects of oral glutamine on cisplatin-induced genotoxicity in wistar rat bone marrow cells. *Mutation Research*, 518;65-70.

- Quiroz, R., Candanosa, E., Gracia, I., Tinoco, M., Ruíz, L. (1996) "Toxicidad aguda de casiopeína II por administración intravenosa en ratones. Estudio anatómico-histológico". 2ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química, p37-42.
- Quiroz, R., Gracia, M., Candanosa, E., y Ruíz-Azuara, L. (1995) "Dosis letales de casiopeínas en ratón vía I.P. e I.V.". 1ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química, Resumen 8.
- Reyes, L., Fuente-Noriega, I., Ruíz-ramírez, L., Macías, L. (2003) Development and validation of a liquid chromatographic method for casiopeína II in rat plasma. *Journal of Chromatography*, 791;111-116.
- Rico, H., Gracia, I., Ruiz, L., Sumaro, H. (2002) "Actividad antineoplásica de la casiopeína III sobre diferentes líneas tumorales humanas xenotransplantadas al ratón desnudo". 1er Congreso en Casiopeínas y 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química. p20-25
- Rosenberg, B., Van Camp, L., Truska, JG., and Mansour, BH. (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 22(26);385-386.
- Ruiz-Azuara L. (1992) 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., García I., Moreno, R., Díaz, D., Gasque, L., Mayet, L., Ortiz, V., y Lomelí, C. (1991) The antitumor activity of several transition metal complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 43(2-3);615.
- Ruiz-Ramírez L., García I., de la Rosa M.E., Sumano H., Gómez L., Arenas F., Gómez E., Pimentel E. and Cruces M., (1993) Cytostatic, Mutagenic, Antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) new drugs; Casiopeínas I, II, and III. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 51(1-2);406.
- Ruiz-Azuara, L., Moreno, E., Ferrer, S. y Gasque, L. (1994). "Diseño, síntesis y caracterización de las casiopeínas". 1ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM- Fac. Química, Resumen 1.
- Sarel, S., Mechoulam, R., y Agranat, I. (1992) "Racional Drug Design, in *Trend in Medicinal Chemistry*. Oxford; Blackwell Scientific 198p.
- Schmid, W y Ledebur, MV. (1973) The Micronucleus test methodological aspects. *Mutation Research*, 19;109-117.
- Scialli, RA. (1992) "A Clinical Guide to Reproductive and Developmental Toxicology". CRC, Boca Raton Ann Florida, EUA, 284p.
- Sporn, M. y Suh, N. (2000) Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*, 21(3);525-530.
- Tovar, A., Ruiz, L., Campero, A. (2002) "Interacciones entre casiopeínas y adenina". 1^{er} Congreso en Casiopeínas y 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química. p10-14.

- Tucker, JD. Y Preston, RJ. (1996) Chromosome aberration, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mutation Research*, 365;147-159.

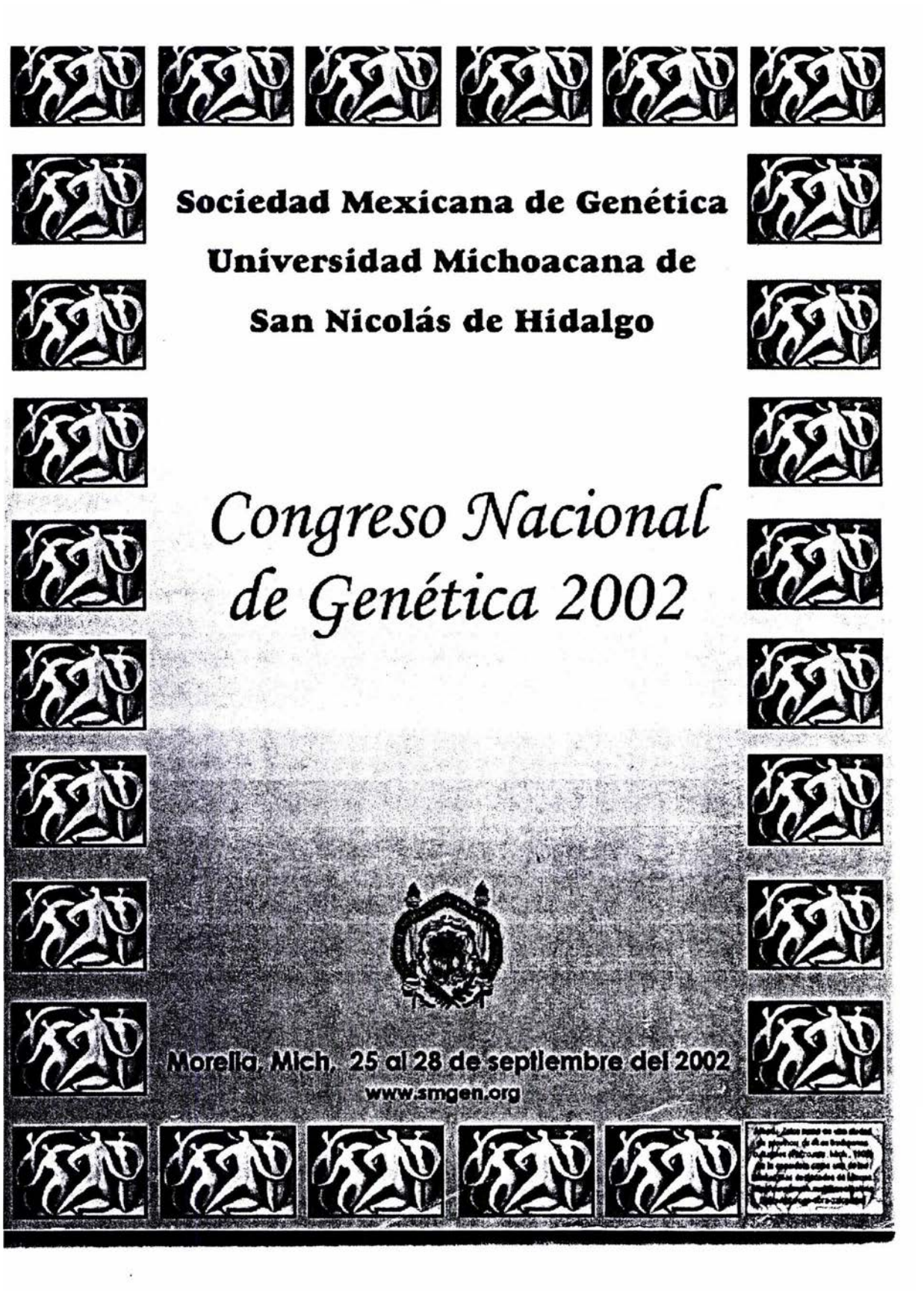
- Uchida, K., Tanaka, K., Nishimura, T., Haschimoto, Y., Watanabe, T., Harada, I. (1986) Effect of serum on inhibition of ADN synthesis in leucemia cells by *cis*- and *trans*- diamminedichloroplatinum(II). *Biochemical Biophysical Research Common*, 138;631-637.

- Verdejo, A., Ruíz, L., Espinosa, J., Muñoz, R. (1998) "Estudio de la interacción cyp-casiopeína". 3ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química, p84-86.

- Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Kass, G., Kelland, R., Orr, M., Dobrota, M. (2000) Induction of apoptosis by novel copper-based anticancer compound, casiopeina II in L1210 murine leukaemia and CI Human ovarian carcinoma cells. *Toxicology In Vitro*, 14;1-5.

- Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Howarth, J., Dobrota, M. (2003) Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. *Toxicology*, 194;103-113.

- Young-Joon, S., Ferguson, L. (2003) Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens molecular mechanisms and chemopreventive potential-highlights of a symposium. *Mutation Research*, 523-524;1-8.



Sociedad Mexicana de Genética
Universidad Michoacana de
San Nicolás de Hidalgo

*Congreso Nacional
de Genética 2002*



Morelia, Mich. 25 al 28 de septiembre del 2002
www.smggen.org

Advertencia: Este libro es una obra de la propiedad de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. No se permite su venta, distribución o reproducción sin el consentimiento escrito de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE DIVERSAS POBLACIONES DE LOS ROBALOS (PISCES:Centropomidae) DEL PACIFICO ORIENTAL MEXICANO EVALUADA MEDIANTE ANÁLISIS DE RAPD'S.

Sandoval-Castellanos, E., Díaz-Jaimes P., Uribe-Alcocer M. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

Todos los robalos que habitan en aguas del continente americano pertenecen al género *Centropomus*. Existen doce especies reconocidas: seis en el litoral del Atlántico y seis en el Pacífico. Cinco de las especies que habitan en el Pacífico se encuentran en aguas mexicanas y son ampliamente explotadas debido al elevado precio de venta. Los robalos son peces demersales que desovan en el mar, se desarrollan en cuerpos de agua dulce o salobre y muestran una marcada preferencia a permanecer y alimentarse en estos cuerpos de agua continentales durante su vida adulta, lo que podría traer como consecuencia una limitada migración en el ambiente marino. Como producto de una limitada o inexistente migración podría tener cabida la divergencia genética poblacional. La posible presencia de estructura genética poblacional en las poblaciones de tres especies de robalos (*C. viridis*, *C. medius* y *C. robalito*) se evaluó analizando DNA genómico mediante el uso de RAPD's (Random Amplified Polimorfism DNA). Para ello se analizaron muestras provenientes de tres o cuatro localidades del Pacífico mexicano. Los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis y analizados para obtener frecuencias alélicas y estimaciones de diversidad genética y divergencia poblacional. La variación genética fue alta de acuerdo a lo esperado y la diferenciación poblacional evaluada mediante los estadísticos *f* y mediante la prueba exacta de Raymond y Rousset, solamente fue detectada entre las poblaciones de las especies *C. viridis* y *C. medius*. Sin embargo las estimaciones de flujo génico, así como las distancias genéticas muestran patrones de flujo genético que no concuerdan con un patrón de aislamiento por distancia (mismo que fue probado estadísticamente). Se considera que la divergencia poblacional entre las poblaciones de las especies de mayor tamaño podría deberse a su mayor vulnerabilidad a la deriva génica así como a otras fuerzas evolutivas mientras que la ausencia de divergencia en *C. robalito* podría deberse al mayor efecto homogeneizador que presenta el tener poblaciones más numerosas y por ende con mayor cantidad de posibles migrantes.

CINÉTICA DE LA INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS POR CASIOPEÍNA II EN HEMBRAS Y MACHOS DE RATÓN *in vivo*.

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

La importancia de controlar enfermedades degenerativas mortales como el cáncer a propiciado la búsqueda, caracterización y síntesis de nuevos compuestos con capacidad antineoplásica, tal es el caso de las casiopeínas®. Estos compuestos de coordinación, tienen un centro metálico (Cu II) y han demostrado actividad citostática y antineoplásica importante en el aspecto clínico y terapéutico, sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no son concluyentes, pero debido a las grandes expectativas que ofrecen se encuentran en evaluación preclínica. En el presente trabajo se estableció la cinética de inducción de micronúcleos (MN), producidos por la casiopeína II, mediante la evaluación de la frecuencia de MN en eritrocitos policromáticos (EPC) de sangre periférica (s.p.) de ratón a diferentes tiempos. Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa CD-1, tratados por vía i.p. con una sola dosis de 4.4 mg/kg de peso corporal ($\frac{1}{2}$ LD₅₀) de casiopeína II. Las muestras de s.p. fueron obtenidas de la vena caudal cada 12 h hasta la hora 72 después del tratamiento. Se colocaron 10 μ l de s.p. directamente sobre laminillas cubiertas de naranja de acridina siguiendo la técnica de Hayashi (1990). Los resultados obtenidos indican que la administración de casiopeína II, no tiene efectos estadísticamente significativos en la inducción de MN para los tiempos evaluados, tanto en hembras como en machos. Así mismo, aunque se observó un ligero decremento en la frecuencia de EPC, este no resultó estadísticamente significativo. A partir de los resultados se concluye que la administración de $\frac{1}{2}$ de la LD₅₀ de casiopeína II, no induce MN en EPC de s.p. y no presenta efectos citotóxicos en eritrocitos de s.p. tanto en hembras como en machos de ratón *in vivo*.

Proyecto apoyado por DGAPA IN212701 y por CONACYT 25417-M.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Primer Congreso en *Casiopeínas*

Jornada de Trabajo en
Casiopeínas



Unidad de Seminarios
Ex Hacienda *El Chorrillo*
Taxco, Guerrero
2 y 3 de diciembre de 2002

EFFECTO DE LA CASIOPEÍNA II SOBRE EL DAÑO GENOTÓXICO EN MACHOS, HEMBRAS PREÑADAS Y SIN PREÑAR DE RATÓN.

García-Rodríguez, M. C., Santiago-Moreno, Y. y Altamirano-Lozano, M. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), FES-Zaragoza, UNAM. México D.F. maricar_67@yahoo.com

ABSTRACT

The importance of controlling lethal degenerative diseases as cancer had started the investigation, characterization and synthesis of new antineoplastic drugs. The casiopeine® is a new type of copper-coordination complex that has been found to possess cytotoxic and cytostatic activity in cultured cells. In this study was determined the genotoxic effect produced by casiopeine in males, pregnant and non-pregnant females, through evaluation of MN frequency in polychromatic erythrocytes (PCE) of peripheral blood mice. Males and non-pregnant females were exposed to a single dose of casiopeine II, by i.p. injection (4.4 mg/kg b.w.), whereas to pregnant females, casiopeine was administered 4.4 or 3.3 mg/kg b.w., i.p. daily on days 6-15. Peripheral blood samples were drawn from the caudal vein and analyzed by the acridine orange technique. Results show that casiopeina-treatment did not modify the number of MN-PCE in males and non-pregnant females. However, only treatment to pregnant females with 4.4 mg/kg induced MN-PCE and total litter loss. Finally, was not observed effect on frequency PCE in any sample.

INTRODUCCIÓN

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.

Recientemente, 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 (Cu II), a los cuales llamó Casiopeinas®¹. Estos compuestos han demostrado actividad citostática y antineoplásica importante, principalmente las casiopeínas II y III^{2,3}, pero sobre todo, lo que ha llamado mucho la atención es su

baja toxicidad⁴, por lo que han generado muchas expectativas para una posible aplicación clínica a corto plazo.

En este estudio se estableció el efecto genotóxico de la casiopeína II en ratones machos, hembras preñadas y sin preñar, mediante la evaluación de la cinética de inducción de micronúcleos (MN), en eritrocitos policromáticos (EPC) de sangre periférica.

MATERIAL Y MÉTODO

Se emplearon ratones hembras y machos adultos de la cepa CD-1 de 2 a 3 meses de edad, con un peso corporal entre 25-32 g. Los ratones fueron alimentados con nutricubos (Purina), con libre acceso al agua y se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12-12 h). Las cruces 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.

Todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal y fueron divididos en: a) Grupos testigo, solo se les administró el vehículo y b) Grupo tratado; se le administró 4.4 ó 3.3 mg/kg de casiopeína II-gly diluida en un volumen de 0.25 ml de agua destilada. Estos grupos fueron empleados para los diferentes protocolos con machos, hembras sin preñar y preñadas⁵.

Tanto a los machos como a las hembras sin preñar se les administró una sola dosis de tratamiento, mientras que a las hembras preñadas se les aplicó del día 6 al 15 gestación.

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de la vena caudal de cada organismo y se colocaron sobre laminillas cubiertas con naranja de acridina siguiendo la técnica de Hayashi y col. (1990)⁵. 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 cuantificación 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 y se calculó la inducción neta (NIF) y la diferencia (DIF) de la frecuencia de MN-EPC⁶.

Los resultados obtenidos fueron analizados con la prueba F exacta de Fisher, con el paquete estadístico STATISTICA/PC V6.0TM. El nivel de significancia usado en todos los casos fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 y 2 se muestra la diferencia e inducción neta de la frecuencia de MN tanto para el grupo de hembras sin preñar, como para los machos tratados con una sola dosis de casiopeína (4.4 mg/kg), en donde se puede observar que, cuando se le restó el valor de la inducción de MN-EPC por cada hora, del grupo testigo al tratado, DIF, no se encontró efecto estadísticamente significativo sobre la inducción de MN-EPC (Fig. 1). De igual manera se observa que, al restar el valor de la inducción de MN de la hora cero, a las demás horas del mismo grupo, NIF, tampoco hay efecto estadísticamente significativo (Fig. 2).

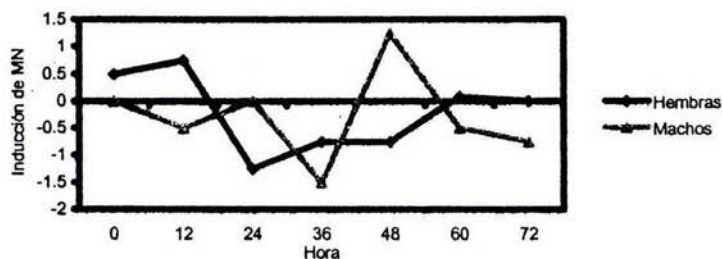
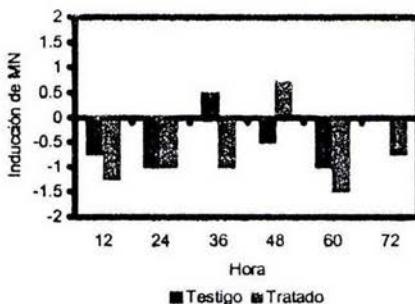
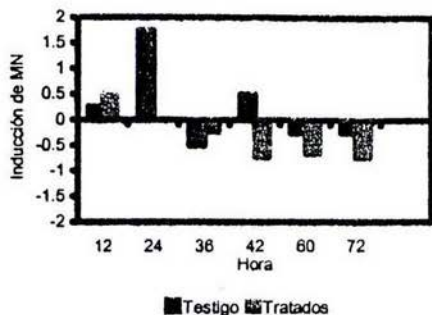


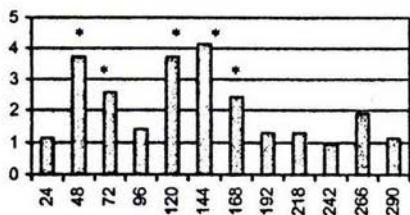
Figura 1. Diferencia de la frecuencia de Inducción de MN-EPC (DIF) en ratones hembras sin preñar y machos tratados con 4.4 mg/kg de casiopeina



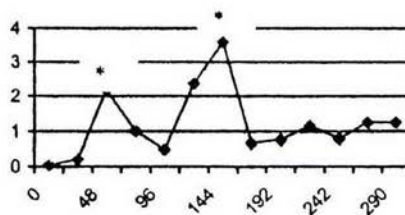
(a)

(b)

Figura 2. Inducción Neta de la frecuencia de MN-EPC (NIF) en ratones hembras sin preñar (a) y machos (b) tratados con 4.4 mg/kg de casiopeína



(a)



(b)

Figura 3. Análisis de la frecuencia de MN-EPC en hembras preñadas tratadas del día 6 al 12 con 4.4 mg/kg de casiopeína. a) NIF y b) DIF.

Sin embargo, cuando se administraron las casiopeínas a hembras preñadas, se observó al hacer el análisis del DIF de MN-EPC, que hubo efecto estadísticamente significativo para la hora 48 y 144 (Fig. 3b), mientras que para el NIF de MN-EPC resultó estadísticamente significativo de las 48 a las 168 horas (Fig. 3a). Cabe mencionar que a las hembras preñadas se les administró diariamente 4.4 mg/kg de casiopeínas del día 6 al 15 de gestación, mientras que a

las hembras sin preñar y a los machos, solo se les administró una dosis. Todas las hembras preñadas tratadas con esta dosis de casiopelna perdieron las camadas.

En la figura 4, se muestra el análisis del NIF y DIF de MN-EPC en hembras preñadas tratadas con 3.3 mg/kg de casiopelna, en donde se puede observar que, solo hubo efecto estadísticamente significativo al calcular el NIF a la hora 72.

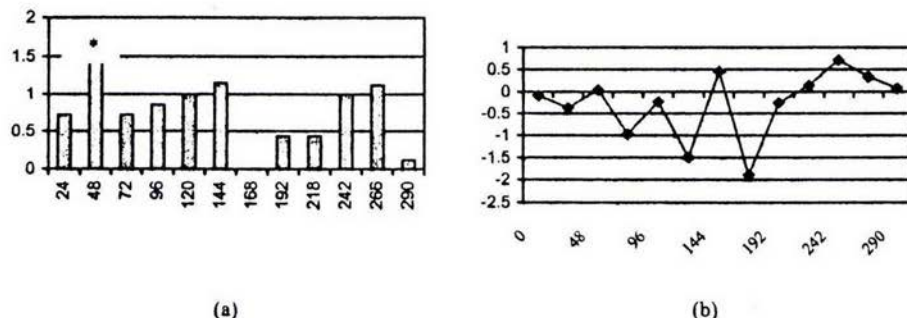


Figura 4. Análisis de la frecuencia de MN-EPC en hembras preñadas tratadas del día 6 al 12 con 3.3 mg/kg de casiopelna. a) NIF y b) DIF.

Finalmente, en cuanto a la evaluación de la relación de los EPC con respecto a los ENC, no se observó efecto en ninguno de los protocolos estudiados, esta evaluación se realizó para darnos una idea de la citotoxicidad, más sin embargo, dado los mecanismos de la proliferación en eritrocitos es necesario hacer más pruebas para concluir al respecto.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que:

1. La administración de una sola dosis de casiopelna Ilgly (4.4 mg/kg) a ratones machos y hembras sin preñar, no tiene efectos estadísticamente significativos en la inducción de MN.
2. La administración del día 6 al día 15, de 4.4 mg/kg de casiopelna Ilgly a ratones hembras preñadas induce MN, mientras que la dosis de 3.3 mg/kg no induce daño.

3. La frecuencia de EPC en machos, hembras sin preñar y hembras preñadas, no se afecto por la administración de las casiopeínas.

REFERENCIAS

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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. García-Rodríguez, M.C., Lopez-Santiago, V. y Altamirano-Lozano, M. Effect of Chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Res.*

Tip Revista Especializada en
Ciencias Químico-Biológicas

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

\$ 30.00

Vol. 6 No. 1, 2003

ESTUDIO DEL EFECTO POR TRATAMIENTO AGUDO Y CRÓNICO DE LA CASIOPEÍNA IIgly SOBRE LA INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS EN MACHOS, HEMBRAS PREÑADAS Y SIN PREÑAR

Yolanda Santiago-Moreno y Ma. del Carmen García-Rodríguez*

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN),

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. E-mail: *carmen.garcia@correo.unam.mx

Debido al impacto en la salud humana y a la esperanza de encontrar una curación, el cáncer ha sido foco de esfuerzos intensos en investigación durante décadas. Recientemente en la Facultad de Química de la UNAM, la Dra. Lena Ruiz, diseñó y sintetizó una serie de compuestos de coordinación con centro metálico (Cu II), llamadas casiopeínas®. Estos compuestos han demostrado tener actividad citostática y antineoplásica en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, y baja toxicidad, por lo que han generado muchas expectativas para una posible aplicación clínica a corto plazo. En el presente trabajo se estudió el efecto genotóxico de la casiopeína IIgly, mediante la inducción de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos de sangre periférica (sp) en ratones machos, hembras preñadas y sin preñar. Se utilizaron ratones de la cepa CD-1, tratados por vía intraperitoneal con casiopeína IIgly (4.4 mg/kg o 3.3 mg/kg de peso corporal), tanto con una sola dosis (tratamiento agudo); como con varias dosis durante 10 días (tratamiento crónico). Las muestras fueron obtenidas de la vena caudal cada 12h hasta las 72h o cada 24h durante 10 días después del tratamiento. Se colocaron 10µl de sp directamente sobre laminillas cubiertas con naranja de acridina. Los resultados obtenidos hasta el momento nos indican que: 1) la administración aguda de casiopeína IIgly (4.4 mg/kg) en machos y hembras, no tiene efectos estadísticamente significativos en la inducción de MN, 2) la administración crónica sólo presenta efecto con las hembras sin preñar. 3) la administración crónica a hembras preñadas induce MN sólo con la dosis de 4.4 mg/kg, y 4) sólo se presentaron efectos citotóxicos en los tratamientos crónicos.

Proyecto financiado por DGAPA N212701 Y POR CONACYT 25417-M.

ESTUDIO DE LAS VÍAS DE INDUCCIÓN DE MICRONÚCLEOS DEL TRÍOXIDO DE CROMO EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN

Yolanda Santiago-Moreno y Ma. del Carmen García-Rodríguez*

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN),

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. E-mail: *carmen.garcia@correo.unam.mx

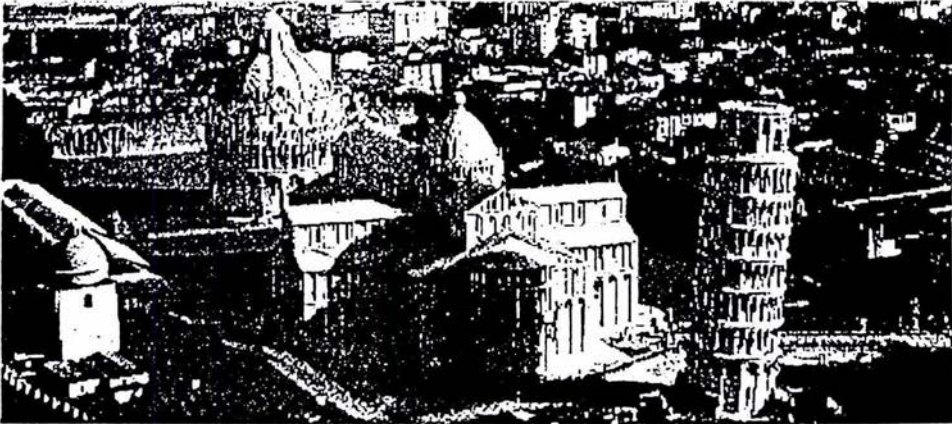
Uno de los metales pesados más estudiados en los diferentes sistemas biológicos es el Cromo (VI) y sus compuestos, debido a sus múltiples usos en la industria y a su asociación con la inducción de cáncer, sin embargo, los mecanismos o vías de inducción de daño aún no están bien establecidos. En recientes estudios realizados en nuestro laboratorio, se observó que la inducción de micronúcleos (MN) por trióxido de cromo (CrO_3), se realiza por dos vías diferentes. En el presente trabajo se estudiaron las vías de inducción de daño de MN inducidos por CrO_3 mediante la evaluación de la señal centrómero-positivo y centrómero-negativo en MN, utilizando la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) y sonda centromérica de ratón. Se utilizaron ratones hembras de la cepa CD-1, tratados por vía intraperitoneal con una sola dosis de 20 mg/kg de peso corporal de CrO_3 , a los cuales se les obtuvieron muestras de sp de la vena caudal, a las 0, 12 y 48 h. después del tratamiento. Las muestras fueron extendidas directamente sobre laminillas perfectamente limpias y secas, para posteriormente fijarlas y realizarles la técnica de FISH (maduración de las células, desnaturalización, hibridación y posthibridación), y fueron teñidas con yoduro de propidio. Los resultados obtenidos indican que el CrO_3 induce MN a las 48 h, ya que el incremento en la frecuencia resultó estadísticamente significativo, además de que se observaron MN con señal positiva y negativa de la sonda centromérica, lo cual, por una parte ratifica lo ya reportado para el CrO_3 como agente clastógeno, y por otra, la presencia del centrómero en los MN nos indica que su origen es posiblemente por cromosomas completos y por lo tanto también tiene un efecto como agente aneuploidógeno. A partir de estos resultados podemos concluir que el CrO_3 induce MN por dos diferentes vías (clastogénesis y aneuploidogénesis) en EPC de sp de ratón *in vivo*.

Proyecto financiado por PAEP-UNAM 500306, 500406.



**PROCEEDINGS OF ICMAA-VIII
(EIGHTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON
MECHANISMS OF ANTIMUTAGENESIS AND
ANTICARCINOGENESIS)**

Pisa, Italy, 4-8 October 2003



Edited by Giorgio Bronzetti (Chair of the Organizing Committee), Lynnette R. Ferguson and Silvio De Flora (Co-Chairs of the Scientific Program Committee)

GENOTOXIC EFFECTS OF CASIOPEINAS: A NEW TYPE OF ANTINEOPLASTIC AGENTS

M. Carmen García-Rodríguez¹, Yolanda Santiago-Moreno¹, Mario Altamirano-Lozano¹ and Lena Ruiz-Ramírez²

¹*Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, D.F. México (carmen.garcia@correo.unam.mx), and* ²*Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, UNAM, D.F. México (lena@servidor.unam.mx)*

Conventional cancer chemotherapy is highly inadequate as the result of lack of selectivity between cancer cells and normal cells. This calls for novel cancer therapies for selectively targeting cancers without toxicity to normal tissues. In the search for new anticancer drugs the proposal that drugs based on endogenous (essential) metals may be less toxic has led to the development of copper-based drugs. In México, this work culminated in the synthesis, conducted by Dr. Lena Ruiz-Ramírez, of a series of copper ligands, which were given the generic name Casiopeinas[®]. Compounds of this family have shown cytotoxicity and antineoplastic activity in different test screening *in vivo* and *in vitro*. Casiopeinas[®] produce a dose dependent inhibition of ³H-Tdr incorporation to cell lines, as well as depress cell proliferation kinetics and mitotic index in cultured human lymphocytes. In this study we evaluated the genotoxic effects produced by casiopeina IIgly[®] [Aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycine) copper (II) Nitrate] in males, pregnant and non-pregnant females, and their fetuses of CD-1 mice, through evaluation of micronucleus (MN) frequency in polychromatic erythrocytes (PCE) of peripheral blood. Males and non-pregnant females were exposed to a single *i.p.* dose (4.4 mg/kg *b.w.*) of casiopeina[®], whereas casiopeina[®] was administered (4.4 or 3.3 mg/kg *b.w.*) *i.p.* daily on days 6-15 to pregnant females. Peripheral blood samples were drawn from the caudal vein and analyzed by acridine orange technique. The results showed that a single dose of casiopeina[®] did not modify the number of MN-PCE, however, in the subchronic treatments the 4.4 mg/kg dose increased, between 48 and 168 h, the MN-PCE frequency in the pregnant females and induced too the total litter loss. On the other hand, in the 3.3 mg/kg dose no effects in females were observed but an increase in MN-PCE frequency was found in the fetuses.

Contract grant sponsor: CONACYT G35012-N, and DGAPA IN-212701.

V CONGRESO MEXICANO DE TOXICOLOGÍA



MEMORIAS



Guadalajara, Jal.
01 al 03 de abril de 2004.



Instrumentos y Equipos Falcon, S.A de C.V
San Juan Bosco No. 3833
Col. Jardines de San Ignacio

Tel: 31-22-49-54

C.P. 45040

Guadalajara Jalisco

EFFECTO GENOTÓXICO DE LA CASIOPEÍNA IIgly EN RATONES DE LA CEPA CD-1.

García-Rodríguez MC¹*, Santiago-Moreno Y¹, Altamirano-Lozano M¹, Ruiz-Azuara L².

¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Bioterio, Campo-II, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, D.F. México. ²Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, UNAM, D.F. México.*carmen.garcia@correo.unam.mx

Antecedentes: Actualmente existen 44 fármacos antineoplásicos tanto de origen orgánico como inorgánico, aprobados para su uso y de ellos sólo dos, el cisplatino y el carboplatino son fármacos inorgánicos obtenidos a partir de platino y ninguno de los 44 son de tecnología nacional (Bravo *et al.*, 2002).

Una nueva familia de compuestos del tipo quelatos mixtos de cobre(II), denominados Casiopeínas[®] $\{Cu(N-N)(N-O)\}NO_3$ o $\{Cu(N-N)(O-O)\}NO_3$ donde, (N-N) = fenantrolinas o bipyridinas substituidas, (N-O) = aminoacidatos o péptidos y (O-O) = acetilacetato o salicilaldehidato), patentados y registrados a nombre de la UNAM (Ruiz-Azuara, 1992) comenzó en 1976 con la idea de que los metales en compuestos de coordinación con moléculas orgánicas pudieran llegar a interaccionar con el ADN de las células cancerosas, interrumpiendo así su reproducción incontrolada dentro de la fase de tratamiento.

De los 100 compuestos patentados de la familia de las Casiopeínas[®] (todos con cobre) se han seleccionado los más activos y menos tóxicos para realizar pruebas preclínicas en animales, como gatos con leucemia viral felina y en ratones "desnudos" o sin respuesta inmune a los cuales se les introdujo un tumor humano.

Los resultados han sido exitosos. Del total de compuestos se eligieron 24, de los cuales se seleccionaron cinco y, finalmente, dos, los más prometedores por su solubilidad y selectivos para leucemia y carcinomas. Esas dos moléculas llevan el nombre de Casiopeínas[®] II y III, de las cuales hasta el momento se tienen nueve subfamilias, unas más activas que otras ya sea *in vitro* o *in vivo* (Alex, 2002).

Estos resultados indican de manera preliminar que la sustitución en las diiminas modifica el grado de actividad y la modificación del ligante iónico es responsable de la selectividad del fármaco, hacia el tipo de tumor (Bravo *et al.*, 2002), aunque tienen algunos efectos adversos sobre estructuras celulares como las mitocondrias de diferentes órganos, incluyendo corazón y riñón (Vallejo, 2000).

Metodología: En el presente trabajo se estudió el efecto genotóxico de la casiopeína IIgly, mediante la inducción de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos de sangre periférica (sp) en ratones machos, hembras preñadas y sin preñar, así como de los fetos. Se utilizaron ratones de la cepa CD-1, tratados por vía intraperitoneal con casiopeína II (4.4 mg/kg ó 3.3 mg/kg de peso corporal), tanto con una sola dosis (tratamiento agudo); como con varias dosis durante 10 días (tratamiento subcrónico). Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal cada 12h hasta las 72h o cada 24h durante 10 días después del tratamiento y colocadas directamente sobre laminillas cubiertas con naranja de acridina para su observación en el microscopio de fluorescencia.

Resultados: Los resultados mostraron que la aplicación de una sola dosis de casiopeína IIgly no modificó la frecuencia de micronúcleos en ninguno de los grupos tratados, sin embargo en los tratamientos subcrónicos el análisis de las hembras preñadas y de los fetos mostró un incremento en la frecuencia de micronúcleos a partir de las 48 horas y hasta las 168 horas, solo en las madres y en la dosis de 4.4mg/kg, disminuyendo posteriormente. Esta dosis produjo un 100% de pérdida de las camadas.

Por otro lado en la dosis de 3.3 mg/kg, no se observó incremento de la frecuencia de micronúcleos en las hembras preñadas, sin embargo este parámetro sí se incrementó en las crías.

Discusión y Conclusiones: Las casiopeínas son moléculas cuya estructura molecular es plana muy parecida a la del cisplatino. Tiene ligantes de tipo quelato mixtos con propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas, además de contar con una gran cantidad de sustituyentes químicos en estos quelatos. Estas propiedades han permitido que estas moléculas puedan atravesar fácilmente las membranas e interactuar con el ADN. Las casiopeínas al igual que muchos antineoplásicos son capaces de producir especies reactivas de oxígeno las cuales tienen como blanco al ADN. Por otro lado, se ha demostrado que las casiopeínas también son citotóxicas, modificando el ciclo celular ó inhibir la síntesis de ADN. Estos eventos podrían explicar la inducción de micronúcleos, los cuales como se saben pueden ser o fragmentos de cromosomas o cromosomas completos los cuales se salen del proceso normal de mitosis. El efecto de las casiopeínas durante el la gestación es un punto que habría que investigar con cuidado, ya que en dosis altas es embriotóxico y en dosis bajas es genotóxico para los productos. Si bien las casiopeínas son genotóxicas, este efecto es menor al presentado por el cisplatino. Esto se puede deber en gran medida a la molécula de cobre en comparación al platino.

Implicaciones: Las casiopeínas a diferencia de los antineoplásicos conocidos son compuestos con baja genotoxicidad. Aunque también mostró ser embriotóxico, su posible uso es una alternativa muy viable ya que esto reduciría los efectos secundarios de la quimioterapia.

Referencias:

1. Alex 2002. Podrían probarse en humanos con cáncer fármacos desarrollados en la UNAM. (en línea). 2002 Agosto 21 (Fecha de acceso 19 de febrero 2003). URL disponible en: <http://www.bine.lztacala.unam.mx.html>
2. Bravo E et al. 2002. Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre casiopeínas®. 1° Congreso de Casiopeínas. México; UNAM. Fac. Química. 1-155.

3. Ruíz-Azuara L 1992. Dirección general de Invenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico (SECOFI), Registro Núm. 18801-120579 y 18802-120580. U.S. Patents: Number Ap. 21 5, 107, 005; Nov. 19 (1996), 5, 576, 326; Feb. 18, (1997).
4. Vallejo M 2000. Caracterización ultraestructural de lesiones en ratones inducidas por la aplicación de casiopeína III. 4° Jornada de trabajo en casiopeínas.