



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática
de las Casiopeínas Igli, IIgli y III-ia en linfocitos,
médula ósea de ratón y linfocitos humanos en cultivo**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Francisco Sánchez Bartéz



TUTOR: Dra. Lena Ruiz Azuara

AÑO: 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo Celular, la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) y el Depto. de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química por lo que se agradecen las facilidades proporcionadas para la realización de este proyecto.

Se agradece el apoyo económico otorgado por Programa de Apoyo a Proyectos de Investigaciones e Innovación Tecnológica PAPIIT-IN206303 y por el Proyecto CONACyT SALUD-2002-C01-7677 para la realización de este proyecto.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca otorgada durante el tiempo en que se realizó este proyecto.

Se agradece a la Pasante de Doctorado María Elena Bravo Gómez por la síntesis y caracterización fisicoquímica de las Casiopeínas[®] utilizadas en el desarrollo de este proyecto.

A mis padres y abuelos por su eterno apoyo

A mi hermana por su alegría

A mi familia y amigos por estar ahí cuando se necesita

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
1. Introducción	4
2. Antecedentes	8
2.1 Cáncer	9
2.2 Complejos de cobre como agentes anticancerosos	21
2.3 El Sistema ADME y su influencia en la actividad Farmacológica	23
2.4 Toxicología Genética	29
3. Hipótesis y Objetivos	34
3.1 Hipótesis	35
3.2 Objetivos	36
4. Diseño experimental y Metodología	37
4.1 Diseño experimental <i>in vitro</i>	38
4.2 Diseño experimental <i>in vivo</i>	39
4.3 Metodología	41
4.4 Tratamiento de datos	44
5. Resultados	47
5.1 Experimentos <i>in vitro</i>	48
5.2 Experimentos <i>in vivo</i>	54
6. Discusión y Conclusiones	73
6.1 Discusión y Conclusiones <i>in vitro</i>	74
6.2 Discusión y Conclusiones <i>in vivo</i>	76
7. Bibliografía	81

RESUMEN

La familia de las CASIOPEÍNAS[®] comprende una serie de quelatos ternarios de Cobre (II) con fórmula general $[Cu(N-N)(X-X)]NO_3$ donde N-N es un donador de electrones de tipo diimina y X-X de tipo O-O (acetilacetato o salicilaldehidato) o N-O (L-aminoácidos). Dichos compuestos han demostrado actividad anticancerosa en estudios de fase preclínica.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las actividades citostática, citotóxica y genotóxica de las Casiopeínas Igli, IIgli y III-ia, tanto *in vitro* como *in vivo* empleando linfocitos humanos en cultivo y médula ósea de ratón, determinando los siguientes parámetros: Índice Mitótico (IM), Cinética de Proliferación Celular (CPC), Tiempo de Proliferación Linfocitaria (TPL) e Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH). Los linfocitos humanos en cultivo, la médula ósea y los linfocitos de sangre periférica de ratón son indicadores muy sensibles para la evaluación de la actividad citotóxica, citostática y genotóxica de algunos compuestos, además de dar información sobre el comportamiento que puedan tener *in vivo* e *in vitro* respectivamente.

En el presente estudio se utilizaron linfocitos humanos en cultivo y la médula ósea de ratones ICR:Hsd machos de 8 semanas de edad, los cuales fueron tratados con diferentes concentraciones y dosis, utilizando la técnica para la tinción diferencial de cromátidas hermanas para su posterior análisis al microscopio.

Los resultados obtenidos fueron: *In vitro* ninguna de las Casiopeínas fue citotóxica, no obstante fueron citostáticas a una concentración equivalente a su respectiva concentración inhibitoria 50 (CI50) en la línea celular HeLa. *In vitro*, la única Casiopeína con actividad genotóxica fue la Casiopeína Igli, no obstante no se descarta la posibilidad de que las otras dos Casiopeínas probadas lo sean a menores concentraciones de las que se utilizaron ya que, la capacidad citostática es dependiente de la concentración utilizada, por lo que a menor concentración se puede observar un efecto genotóxico y no citostático. En orden decreciente de citotoxicidad *in vivo* se tiene a la Casiopeína Igli (0.05 mg/kg) seguida de la Casiopeína IIgli (4.42 mg/kg) y por último la Casiopeína III-ia (12.34 mg/kg). Sólo la Casiopeína IIgli a la dosis de 2.21 y 1.05 mg/kg resultó ser citostática *in vivo*. Sólo la Casiopeína III-ia a las dosis de 6.17 y 3.085 mg/kg resultó ser genotóxica *in vivo*.

Al analizar las laminillas tanto *in vitro* como *in vivo* se observaron células muertas con morfología apoptótica, confirmándose en todos los casos este mecanismo de muerte celular al utilizar la técnica de TUNEL.

Se puede concluir que las Casiopeínas son citotóxicas, citostáticas y genotóxicas, dependiendo de la dosis o concentración que se use, aunque en menor grado que el cisplatino, siendo diferente su perfil de actividad en un sistema *in vitro* que en un sistema *in vivo*. Esta diferencia sólo se puede deber a la modificación que pueda tener la molécula dentro del sistema ADME en el animal completo, por lo que se recomienda que los estudios de la fase preclínica se hagan en animales completos, ya que dichos modelos nos pueden dar mayor información de cómo podrían comportarse las Casiopeínas dentro del cuerpo humano.

RESUMEN

La familia de las CASIOPEÍNAS[®] comprende una serie de quelatos ternarios de Cobre (II) con fórmula general $[Cu(N-N)(X-X)]NO_3$ donde N-N es un donador de electrones de tipo diimina y X-X de tipo O-O (acetilacetato o salicilaldehidato) o N-O (L-aminoácidos). Dichos compuestos han demostrado actividad anticancerosa en estudios de fase preclínica.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las actividades citostática, citotóxica y genotóxica de las Casiopeínas Igli, IIgli y III-ia, tanto *in vitro* como *in vivo* empleando linfocitos humanos en cultivo y médula ósea de ratón, determinando los siguientes parámetros: Índice Mitótico (IM), Cinética de Proliferación Celular (CPC), Tiempo de Proliferación Linfocitaria (TPL) e Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH). Los linfocitos humanos en cultivo, la médula ósea y los linfocitos de sangre periférica de ratón son indicadores muy sensibles para la evaluación de la actividad citotóxica, citostática y genotóxica de algunos compuestos, además de dar información sobre el comportamiento que puedan tener *in vivo* e *in vitro* respectivamente.

En el presente estudio se utilizaron linfocitos humanos en cultivo y la médula ósea de ratones ICR:Hsd machos de 8 semanas de edad, los cuales fueron tratados con diferentes concentraciones y dosis, utilizando la técnica para la tinción diferencial de cromátidas hermanas para su posterior análisis al microscopio.

Los resultados obtenidos fueron: *In vitro* ninguna de las Casiopeínas fue citotóxica, no obstante fueron citostáticas a una concentración equivalente a su respectiva concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) en la línea celular HeLa. *In vitro*, la única Casiopeína con actividad genotóxica fue la Casiopeína Igli, no obstante no se descarta la posibilidad de que las otras dos Casiopeínas probadas lo sean a menores concentraciones de las que se utilizaron ya que, la capacidad citostática es dependiente de la concentración utilizada, por lo que a menor concentración se puede observar un efecto genotóxico y no citostático. En orden decreciente de citotoxicidad *in vivo* se tiene a la Casiopeína Igli (0.05 mg/kg) seguida de la Casiopeína IIgli (4.42 mg/kg) y por último la Casiopeína III-ia (12.34 mg/kg). Sólo la Casiopeína IIgli a la dosis de 2.21 y 1.05 mg/kg resultó ser citostática *in vivo*. Sólo la Casiopeína III-ia a las dosis de 6.17 y 3.085 mg/kg resultó ser genotóxica *in vivo*.

Al analizar las laminillas tanto *in vitro* como *in vivo* se observaron células muertas con morfología apoptótica, confirmándose en todos los casos este mecanismo de muerte celular al utilizar la técnica de TUNEL.

Se puede concluir que las Casiopeínas son citotóxicas, citostáticas y genotóxicas, dependiendo de la dosis o concentración que se use, aunque en menor grado que el cisplatino, siendo diferente su perfil de actividad en un sistema *in vitro* que en un sistema *in vivo*. Esta diferencia sólo se puede deber a la modificación que pueda tener la molécula dentro del sistema ADME en el animal completo, por lo que se recomienda que los estudios de la fase preclínica se hagan en animales completos, ya que dichos modelos nos pueden dar mayor información de cómo podrían comportarse las Casiopeínas dentro del cuerpo humano.

ABSTRACT

The family of CASIOPEÍNAS[®] includes a series of Copper(II) ternary chelates with general formula $[Cu(N-N)(X-X)]NO_3$ where N-N is a donor of electrons (phenanthroline or bipyridine) and X-X a O-O donor electron (acetylacetonate or salicylaldehyde) or N-O (L-aminoacides). These compounds have demonstrated anticancer activity in studies of Non-clinical phase.

The objective of this work was the evaluation of Casiopeínas Igly, IIgly and III-ia, determining the following parameters: Mitotic index (MI), Cellular Proliferation Kinetic (CPK), Lymphocyte Proliferation Time (LPT) and Sister Chromatid Exchange (SCE) in human lymphocytes in culture, bone marrow and lymphocytes of peripheral blood of mice being these very sensible indicators for the evaluation of the cytotoxic, cytostatic and genotoxic activities, in order to clarify the behavior that a new drug can have *in vivo* and *in vitro*.

In the present study human lymphocytes in culture and the bone marrow of ICR:Hsd male mice of 8 weeks old were treated with different concentrations and doses, and stained for differential Sisters Chromatid Exchanges for its analysis to the microscope.

The obtained results showed: *In vitro* none of the Casiopeínas studied seem to be cytotoxic, but were cytostatics to an equivalent concentration of its respective IC50 in the cellular line HeLa. *In vitro* only Casiopeína Igly showed genotoxic activity, we can not discard this effect with the other two Casiopeínas, testing these to a smaller doses of those used, so minor doses can have a genotoxic effect and non cytostatic.

In decreasing order of cytotoxicity *in vivo*, Casiopeína Igly (0.05 mg/kg) is followed for Casiopeína IIgly (4.42 mg/kg) and finally Casiopeína III-ia (12.34 mg/kg). Only Casiopeína IIgly to the dose of 2.21 and 1.05 mg/kg turned out to be cytostatic *in vivo*. Only Casiopeína III-ia to the doses of 6.17 and 3.085 mg/kg turned out to be genotoxic *in vivo*.

When analyzing the samples as much *in vitro* like *in vivo*, cells died with apoptotic morphology, confirming this mechanism of cellular death using the TUNEL technique.

It is possible to conclude that the Casiopeínas show cytotoxic, cytostatic and genotoxic activities, depending on the dose or concentration used, being an important founding that the activity of the Casiopeínas are different in the *in vitro* and *in vivo* systems using the same variables, such difference it's only possible if the ADME system modify the activities of the Casiopeínas, reason why it recommends that the studies of the non-clinical phase become in animals, since these models can give better information of how Casiopeínas could behave in the human body.

ABREVIATURAS

5-BrdU → 5-Bromodesoxiuridina

acac → Acetilacetato

ADN → Ácido Desoxirribonucleico

ADME → Sistema de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción de un Fármaco

CPC → Cinética de Proliferación Celular

CI50 → Concentración Inhibitoria 50

DSBs → Double-Strand Breaks (Rompimientos doble de cadena)

DS → Desviación Estandar

DL50 → Dosis Letal 50

EPA → Environmental Protection Agency

ERO → Especies Reactivas de Oxígeno

Fase S → Fase de Síntesis del ADN durante el ciclo celular

Hrs. → Horas

ICH → Intercambio de Cromátidas Hermanas

IM → Índice Mitótico

M.O. → Médula Ósea

n → Número de Muestras Analizadas

NCI → Nacional Cancer Institute

n.d. → No Determinado

S → Sangre

SSBs → Single-Strand Breaks (Rompimientos sencillos de cadena)

salal → salicilaldehidato

SPH → Sangre Periférica Humana

TGP → Tiempo Generacional Promedio

TUNEL → Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling

QSAR → Quantitative Structure-Activity Relationship

rpm → revoluciones por minuto

U.V. → Ultravioleta

CAPÍTULO

2

ANTECEDENTES

2. Antecedentes

2.1 Cáncer

Las más de 30 000 millones de células que constituyen nuestro organismo nacen, crecen, se dividen y mueren bajo la estricta vigilancia del material hereditario (ADN); por tanto unas células regulan la proliferación de otras, para asegurarse de este modo que los órganos y tejidos crezcan en equilibrio y mantengan la arquitectura corporal.¹⁶

Actualmente se acepta que el cáncer es una enfermedad genética, resultado del cúmulo de alteraciones en un conjunto de genes, específicamente los oncogenes y los genes supresores de tumores, cuyos productos ejercen funciones básicas para el buen funcionamiento, diferenciación, crecimiento y muerte de todas nuestras células. Las células transformadas presentan una serie de características que las diferencia de células normales, tales como:¹⁷

1. Las células transformadas no dependen de factores de crecimiento como lo hacen las células normales. Esto puede deberse a dos posibilidades: a) Las células cancerosas son capaces de secretar sus propios factores de crecimiento, con la finalidad de estimular su propia proliferación (estimulación autócrina) y/o b) Los receptores para los factores de crecimiento situados en la superficie de la célula están alterados de tal manera que ya no es necesaria la unión con el factor de crecimiento para la estimulación de la proliferación.
2. Las células normales requieren de contacto con una superficie en la matriz extracelular mientras que las células cancerosas crecen sin un anclaje específico.
3. Las células normales responden a la presencia de otras células, es decir tienen una inhibición del crecimiento por contacto, mientras que las células cancerosas carecen de esta característica. Es por esto que las células normales paran su proliferación al llegar a cierta densidad de población, en cambio las células cancerosas continúan su proliferación.
4. Las células transformadas tienen menos adherencia por la matriz extracelular que las células normales.

2.1.1 Carcinogénesis

Al proceso del paso de una célula normal a una célula cancerosa se le conoce como carcinogénesis, el cual consta de varias etapas, las que en términos generales son:

- **Iniciación.-** el daño ocurre al cambiar una proteína, rutas de señalización o cambio directo al ADN (mutación), pero no implica la transformación a una célula maligna, es decir, la célula sigue siendo fenotípicamente normal.
- **Promoción.-** el daño que normalmente debió ser reparado, persiste y propicia una mayor tasa de mutaciones y cambios fenotípicos de la célula.
- **Progresión o Carcinogénesis.-** la célula ya no respeta los procesos normales de diferenciación y crecimiento, transformándose por completo, ahora su crecimiento es descontrolado, la angiogénesis, la invasión y la metástasis son posibles.
- **Enfermedad Clínica.-** existe una disfunción del tejido que trae como consecuencia una manifestación clínica, es decir, hay signos y síntomas característicos.
- **Metástasis.-** la célula está totalmente transformada y obtiene la capacidad de invadir tejidos circundantes, ingresar al sistema circulatorio del organismo y establecerse en zonas de proliferación alejadas del sitio de aparición original, a lo que se le denomina invasividad y diseminación.¹⁸

Aunque se observa que el proceso del desarrollo de un tumor canceroso es un proceso de varias etapas que implican varios eventos, no está claro si el orden de estas etapas es crítico para dicho desarrollo. Sin embargo, se sabe que es más importante la acumulación de eventos y no el orden en el que ocurran.^{1,19}

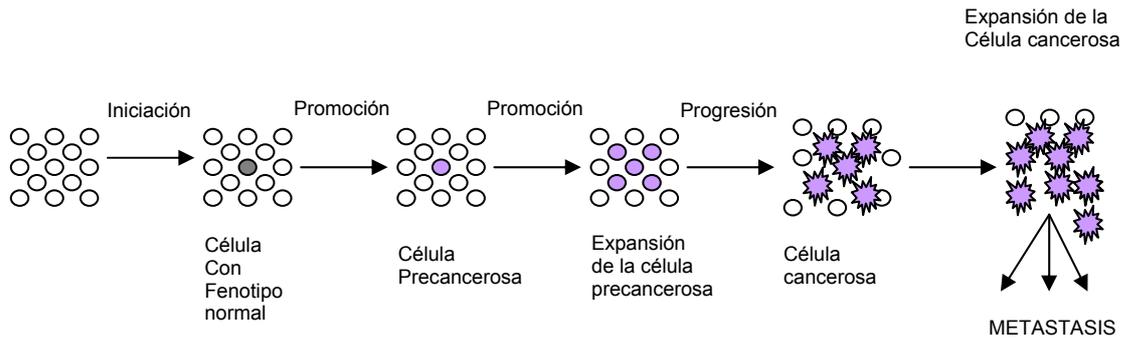


Figura 1.- Proceso multietapas de la carcinogénesis.

Existen sustancias químicas que tienen la capacidad de promover alguna o varias de las etapas anteriores, con lo que se puede deducir que no existe una causa particular del Cáncer sino varias y que algunas pueden ser concurrentes, sin embargo se puede hacer una clasificación de agentes de acuerdo a la etapa que favorecen.²⁰

2.1.2 Agentes Físicos, Biológicos y Químicos como causa de Cáncer

Considerando en forma general, los factores cancerígenos pueden ser de naturaleza física, biológica o química

Carcinógenos Físicos:

Dentro de este tipo de carcinógenos se encuentran las radiaciones ionizantes y la radiación ultravioleta (U.V.), ambas producen lesiones en el ADN, ya sea por un rompimiento de la hélice de ADN, mutaciones a lo largo del genoma y formación de dímeros de pirimidinas, entre otros. Sin embargo, la acción y consecuencia de las radiaciones dependerán de las características propias de la radiación, tiempo de exposición, forma de exposición y cuestiones fisiología de cada individuo.

Carcinógenos Biológicos:

Los agentes carcinogénicos de tipo biológico más importantes son los virus llamados oncogénicos, los cuales al infectar a una célula normal le transfieren información genética que promueve la activación de un oncogen o la información transferida es un oncogen en sí que promueve la transformación maligna de la célula infectada. Algunos de los virus que poseen esta característica son: el virus de Epstein-Barr asociado a linfoma de Burkitt's, virus de Hepatitis B asociado con cáncer de hígado, virus del papiloma humano asociado a cáncer cervicouterino, entre otros.

Carcinógenos Químicos:

Existe un gran número de compuestos químicos que pueden causar o favorecer la aparición del Cáncer, estos pueden dividirse en iniciadores o promotores, dependiendo cual etapa de la carcinogénesis estimulen, existen también los llamados carcinógenos completos, los cuales favorecen tanto la iniciación como la promoción de la carcinogénesis. El riesgo de desarrollar un cáncer debido a estas sustancias está dado principalmente por la exposición a ellas (que en su mayor parte es ocupacional). Sin embargo no se debe olvidar que también puede influir la alimentación, edad, estado inmunológico, la ingesta de algunos medicamentos, la carga genética del individuo, entre otros. Algunos compuestos químicos carcinogénicos son: benceno, asbestos, cloranfenicol, ciclofosfamida, gas mostaza, compuestos policíclicos aromáticos, etc.^{21, 22, 23, 24}

2.1.3 Epidemiología del Cáncer en México.

Ciertos tipos de cáncer son más comunes en determinadas regiones geográficas; en Japón, por ejemplo, existen muchos casos de cáncer gástrico, mientras que en los Estados Unidos este tipo de cáncer es relativamente poco común. Es posible que esta diferencia tenga relación con las variantes en la dieta o en la genética interracial.

En nuestro país, constituye la segunda causa de muerte desde el año de 1990; en 2000 causó 55,731 muertes, de las cuales 52% fueron mujeres y el 48% hombres. La distribución por edad de acuerdo al sexo muestra en el sexo masculino el primer lugar en el grupo de 75 años o mayores con el 20%, seguido por el de 60 a 64 con el 11.8%. En las mujeres también fue el grupo de 75 años y mayores el más elevado con el 11.5% seguido por el grupo de 45 a 49 años con el 11.2% y después el grupo de 40 a 44 años (10.0%).²

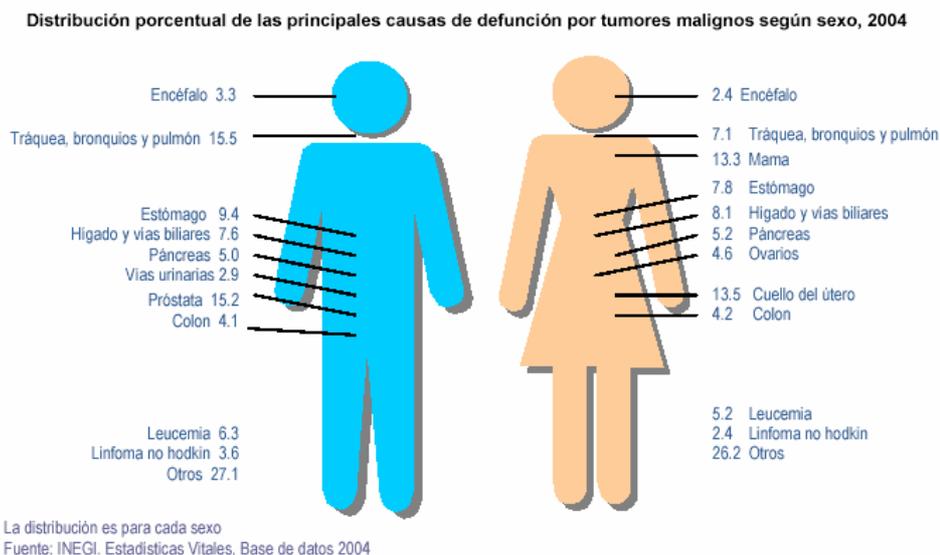


Figura 2.- Casos de Principales Tumores Malignos en México durante el año 2004. INEGI.

Los primeros cinco lugares de nuevos casos registrados según su topografía fueron: cáncer cervicouterino (23.5%), piel (13.1%), Mama (10.9), Próstata (5.9%), Estómago (3.9%).

Tabla 1.-Distribución de casos de neoplasias malignas por topografía en hombres.

2005

Lugar	Localización	No.	%
1	Glándula Prostática	3,674	14.2
2	Estómago	1,620	6.3
3	Ganglio Linfático	1,566	6.1
4	Tejidos Blandos	1,332	5.2
5	Testículo	1,233	4.8
6	Tráquea, Bronquios y Pulmón	1,139	4.4
7	Vejiga Urinaria	1,136	4.4
8	Laringe	842	3.3
9	Encéfalo	702	2.7
10	Riñón y otros órganos urinarios	660	2.6

Fuente: Estadísticas Vitales Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática

Tabla 2.- Distribución de neoplasias malignas por topografía en mujeres.

2005

Lugar	Localización	No.	%
1	Cuello del Útero	15,749	33.2
2	Mama	7,791	16.4
3	Ovario	1,684	3.5
4	Cuerpo del Útero	1,432	3.0
5	Estómago	1,258	2.7
6	Glándula Tiroides	1,211	2.6
7	Ganglios Linfáticos	1,179	2.5
8	Tejidos Blandos	1,080	2.3
9	Vesícula Biliar y Vías Intrahepáticas	763	1.6
10	Colon	728	1.5

Fuente: Estadísticas Vitales Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
2005

2.1.4 Tratamiento del Cáncer

La detección, diagnóstico y manejo terapéutico de las neoplasias malignas requieren de una estructura organizada de médicos, paramédicos, técnicos, instituciones y tecnología de elevado costo, por lo que se necesita una continua búsqueda de fármacos de menos costo e igual o mejor eficacia para poder atender la alta demanda que se tiene.^{2, 25}

El tratamiento varía de acuerdo con el tipo de cáncer y con su etapa. La etapa del cáncer hace referencia a cuánto se ha diseminado o no desde su ubicación original.

- Si el cáncer está confinado a un solo lugar y no se ha diseminado el objetivo del tratamiento estará orientado hacia la cirugía y al cuidado posquirúrgico.
- Si el cáncer se ha diseminado sólo a los ganglios linfáticos locales, estos algunas veces se pueden extirpar.
- Si el cáncer no se puede extirpar totalmente por medio de cirugía, las opciones de tratamiento son la radiación, quimioterapia o ambas.
- Algunos tipos de cáncer requieren la combinación de cirugía, radiación y quimioterapia.

Sin embargo no son las únicas opciones ya que están en fase de experimentación y desarrollo otras terapias como son: la inmunoterapia, la terapia hormonal y más reciente la terapia génica.²⁶

Cabe señalar que estos procedimientos no son excluyentes uno de los otros, ya que por lo general se suele ocupar dos o más de estos para tener un alto porcentaje de éxito, sin embargo la quimioterapia es el tratamiento más usado, aunque la calidad de vida a menudo sufre deterioro.

La tendencia actual de la quimioterapia del cáncer es el uso de compuestos diseñados en el laboratorio que incrementen su eficacia y selectividad. La falta de especificidad de los agentes quimioterapéuticos en contra de las células malignas en relación con las células en proliferación relativamente rápida, como las de médula ósea, piel y mucosa intestinal, da como resultado un muy estrecho margen de seguridad para estos agentes.

Los efectos tóxicos más comunes que producen los agentes anticancerosos en general son: anorexia, vómito, diarreas, supresión funcional de la médula ósea y del sistema inmune y problemas cardiacos.²⁷

Los agentes anticancerosos que se conocen actualmente se pueden clasificar de las siguientes manera:

- Agentes alquilantes del ADN..

Los agenteas alquilantes son compuestos muy reactivos que transfieren grupos alquilos a importantes constituyentes de la célula por combinación con grupos amino, sulfhiidrido, carboxilo y fosfato. Son no específicos del cilco celular, considerándose que estos agentes alquilan preferentemente a la guanina.causándo un daño irreparable de tal forma que se inhibe la proliferación celular. Como por ejemplo: Mecloretamina, Ciclofosfamida, Busulfán, Carmustina, entre otros.

- Antimetabolitos

Los agentes de esta categoría incluyen fármacos diversos e interesantes que tienen en común su capacidad de inhibir la biosíntesis de algún elemento esencial en la célula, o remedar la acción de estos metabolitos naturales, trayendo como consecuencia una disminución en la capacidad vital de las células. Algunos elementos de esta clasificación son: Metotrexato (análogo del ácido fólico), 5-Fluoracilo (análogo de pirimidina), 6-Mecaptopurina (análogo de purina), entre otros.

- Productos de origen natural

Estos se caracterizan por ser de naturaleza orgánica y principalmente provenir de una fuente natural, ya sea animal o vegetal. Algunos fármacos de esta familia son: Vincristina y Vinblastina (*Vinca rosea* Linn.), Taxol o Paclitaxel (*Taxus brevifolia*), Daunorrubicina y Doxorrubicina (*Streptococcus peucetius* var. *caesius*).

- Hormonas y antagonistas hormonales

Dentro de este grupo se encuentran en general fármacos de estructura esteroidal, los cuales al igual que los antimetabolitos tratan de inhibir o emular alguna función vital de la célula cancerosa de tipo dependientes a hormonas, tales como en el cáncer de testículos, cáncer de próstata, cáncer de ovario o cáncer de glándula mamaria. Ejemplo de este tipo de compuestos son: Tamoxifeno, Citrato de Clomifeno, Ciproterona, Espironolactona, Cimetidina, entre otros.

- Agentes diversos.

Esta clasificación envuelve a todos aquellos fármacos que no comparten características con los grupos anteriores. Entre los fármacos que se encuentran dentro de esta clasificación están: el Cisplatino, Hidroxiurea, Procarbazina, Mitotano.^{3,28}

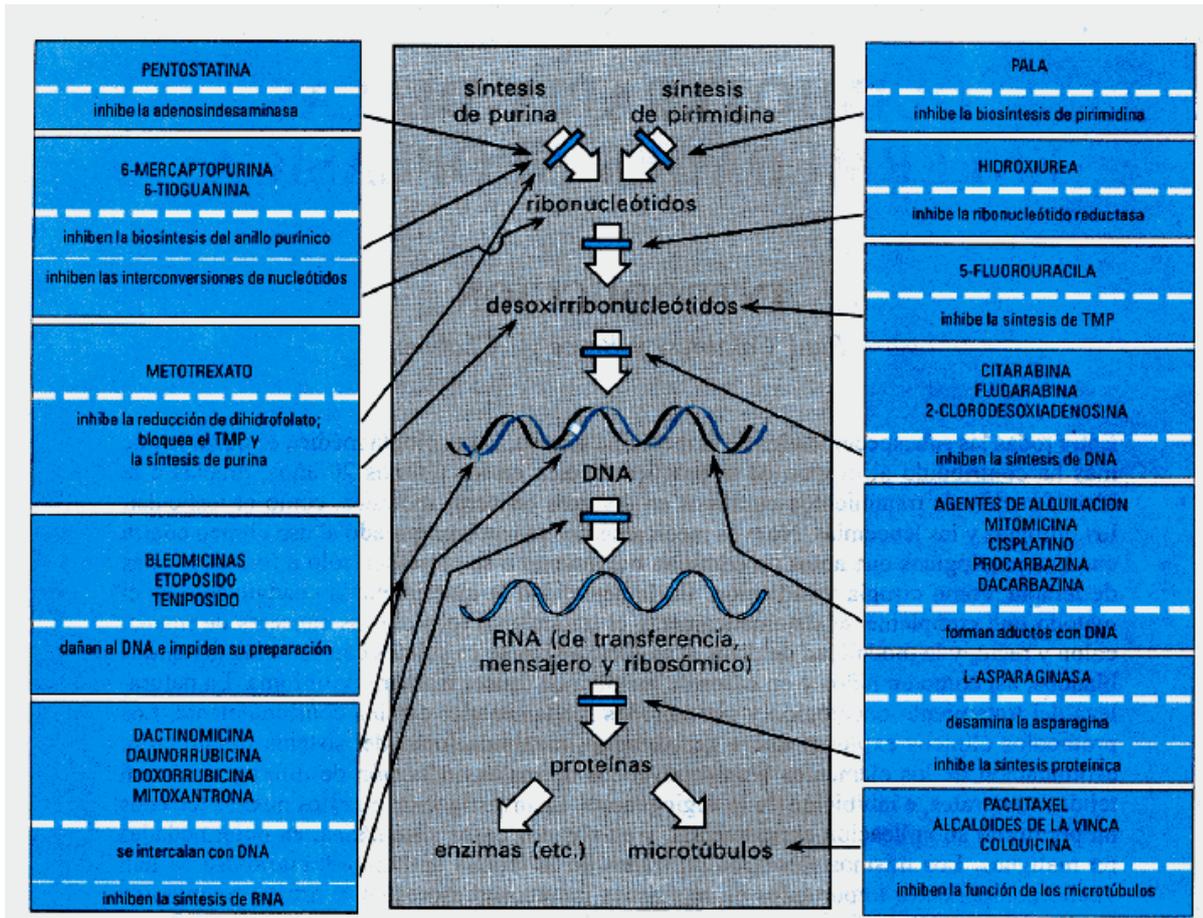


Figura 3.- Mecanismos y sitios de acción de los agentes anticancerosos (Goodman and Gilman, *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 9ª Ed.)

2.1.5 Complejos de Platino como Agentes Anticancerosos.

Como ya se mencionó el tratamiento actual del cáncer depende fundamentalmente de la cirugía, la radiación y la quimioterapia; sin embargo, la evolución en los conocimientos biológicos de la transformación de una célula normal a cancerosa, el conocimiento de las diferencias en el control de la proliferación de células normales y neoplásicas, así como la elucidación de los mecanismos de acción de los diferentes fármacos que actualmente se utilizan en la clínica, dará mas bases para encontrar o diseñar nuevos fármacos que tengan una eficacia, potencia y especificidad mayor en contra de células cancerosas que los que se encuentran en el mercado hoy en día.

En 1965, Rosenberg encontró accidentalmente que un complejo de coordinación con centro de platino (diamino, dicloro platino (II)) inducía un crecimiento normal y muerte en bacterias. Estudios posteriores demostraron que también inhibía el crecimiento de células tumorales tanto de tumores sólidos como de tumores diseminados, como por ejemplo leucemias y linfomas. En 1978 fue aprobado por la FDA como agente quimioterapéutico contra el cáncer de testículo y ovario.^{29, 30} Posteriormente se demostró su eficacia contra otros tipos de tumores por lo que también se utiliza para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, próstata, esófago y linfomas, entre otros.

Derivados del conocimiento farmacodinámico del Cisplatino en líneas tumorales Rosenberg propuso los siguientes postulados como propiedades que deben cumplir este tipo de compuestos para tener una actividad anticancerosa:

- A) Estos complejos deben intercambiar rápidamente sólo algunos ligantes en reacciones con moléculas biológicas.
- B) Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante dentro del organismo.
- C) Son necesarios dos ligantes *cis* monodentados (o uno bidentado) como grupos salientes. Los isómeros *trans* son inactivos.
- D) Las velocidades de intercambio de estos ligantes se encuentra en un intervalo específico de labilidad.
- E) Los ligantes no intercambiables en la molécula deben estar fuertemente enlazados.

El reconocimiento del Cisplatino como un agente antitumoral disparó una respuesta entre la comunidad científica tanto química como médica. Con el objeto de identificar agentes activos contra el cáncer y diferentes al Platino, se han evaluado compuestos cuyo centro metálico es: rutenio, titanio, paladio y especies metálicas de estaño, entre otros.

Cuando se diseña un complejo metálico con posibilidad de usarlo como fármaco se debe considerar lo siguiente: la hidrólisis, la unión a proteínas, si tiene o no un mecanismo de transporte y la molécula blanco. La hidrólisis del complejo es importante ya que el medio biológico es un medio netamente acuoso, lo que podría desactivarlo. La unión a proteínas y si tiene o no un mecanismo de transporte ya que de esto dependerá la distribución del fármaco dentro del organismo, por lo que si se une fuertemente a proteínas, el fármaco no estará disponible y la acción biológica no se dará. Por otro lado también se debe considerar el carácter lipofílico de las membranas, vesículas o sitios activos de las células blanco para el correcto diseño de los ligantes de tipo hidrofóbico del complejo.^{31,32}

A pesar de su efectividad contra un número considerable de tumores, el cisplatino tiene graves efectos secundarios entre los que están: nefrotoxicidad (degradación de las células de los túbulos renales), mielotoxicidad, ototoxicidad (tinitus, pérdida del oído a altas frecuencias), neuropatías del sistema nervioso periférico, hipomagnesemia, leucopenia, trombocitopenia, anemia, reacciones anafilácticas y problemas gastrointestinales (náusea severa, vómito y diarrea). Por otro lado debe mencionarse que una desventaja que tienen estos compuestos es que existen algunos tipos de tumores que son o se vuelven refractarios al cisplatino y a sus derivados (resistencia cruzada).³³

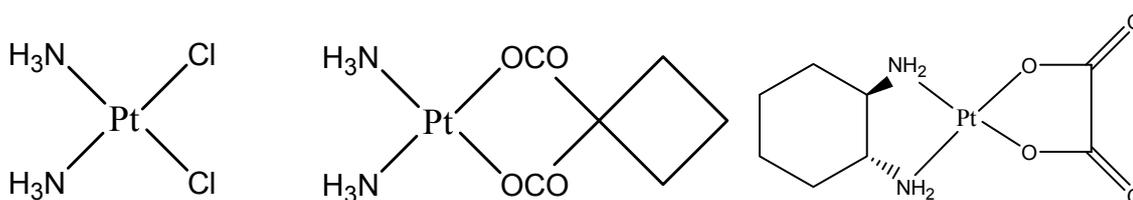


Figura 4.- Cisplatino, Carboplatino y Oxaliplatino

Es por esto que la búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos se debe proponer bajo las siguientes características:

1. Ausencia de resistencia cruzada al cisplatino.
2. Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el cisplatino no ha demostrado efectos terapéuticos significativos.
3. Mayor efectividad clínica tumoral.
4. Disminución de los efectos tóxicos.
5. Sinergismo en terapias combinadas.³⁴

2.2 Complejos de Cobre como Agentes Anticancerosos.

La Dra. Lena Ruiz, en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, concibió la idea de diseñar compuestos de coordinación de cobre con posible actividad contra el cáncer. Los compuestos de coordinación desarrollados mostraban, de manera teórica, una actividad biológica potencial. A partir de la década de los 80 los compuestos fueron caracterizados y en 1986 iniciaron los trabajos de constatación biológica *in vitro* e *in vivo* de los compuestos con centro metálico de cobre cuyo nombre genérico son Casiopeínas[®].⁴⁻⁷

Durante el desarrollo de estas moléculas se tomaron en cuenta tres aspectos fundamentales:

1. La inclusión de un metal esencial en vez del platino, con lo que se disminuiría la toxicidad. Esto debido que existirán mecanismos de destoxificación si se encuentra en exceso dentro del organismo.
2. La presencia de quelatos favorecen la orientación *cis* alrededor del ión metálico.
3. La asociación de moléculas con capacidad quelatante que le confiere diferentes niveles de hidrofobicidad, con sustituyentes periféricos que aumentan o disminuyen dicha propiedad.^{35,36}

Partiendo de estas consideraciones se llevó a cabo la síntesis de la familia de las Casiopeínas.[®] Esta familia comprende una serie de compuestos con fórmula general $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ ó $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$; donde N-N es una diimina como la 1,10-fenantrolina o la 2,2' bipyridina, sustituidas por radicales fenilo, metilo o grupos nitro en diferentes posiciones; en tanto que el donador N-O puede ser cualquier aminoácido esencial y el donador O-O es una acetilacetato (acac) o salicilaldehidato (salal), como ligantes aniónicos. Las diversas combinaciones entre los sustituyentes de las Casiopeínas[®] ha originado alrededor de 100 compuestos que se han clasificado por subfamilias que van de la familia I a la IX. Alguna de estas subfamilias han demostrado actividad en contra de líneas tumorales *in vitro* y tumores iso^a y heterotransplantados^b.³⁷ Cabe mencionar que las Casiopeínas[®] no cumplen en su totalidad los postulados de Rosenberg y muestran una actividad superior al Cisplatino en los ensayos mencionados.⁷

2.2.1 Casiopeína[®] Igli.

Esta Casiopeína[®], cuyo nombre químico es: Nitrato de acua (4,7-difenil-1,10-fenantrolina) (glicinato) cobre(II), con peso molecular de 550.03 g/mol ha demostrado ser activa en varias líneas tumorales humanas como por ejemplo HeLa, SiHa, CaSki, C33, CaLo, líneas tumorales murinas como S180, L1210 y B16, en concentraciones muy por debajo de lo requerido para mostrar la misma actividad con Cisplatino.

Sin embargo es poco soluble lo que dificulta su administración, además de presentar aspectos citotóxicos *in vivo*, no obstante el estudiar su comportamiento dentro y fuera de un organismo puede dar información sobre el posible mecanismo de acción de las Casiopeínas[®].³⁸

^a Isotransplante.- Aquel entre individuos de una cepa endogámica a otro de la misma cepa.

^b Heterotransplante.- Aquel entre diferentes especies.

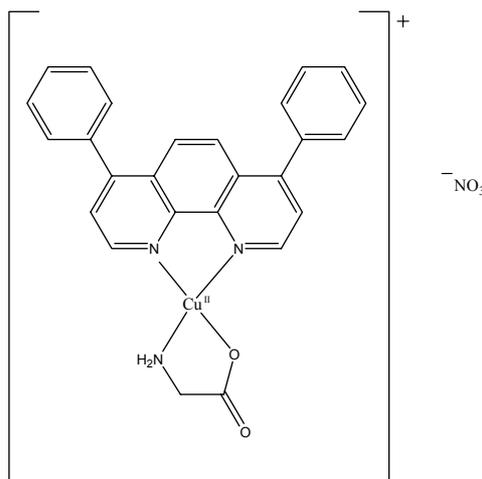


Figura 5.- Casiopeína® Igli

2.2.2 Casiopeína® Igli

La Casiopeína Igli con nombre Nitrato de acua (4,7-dimetil 1,10-fenantrolia) (glicinato) de Cobre (II) con un peso molecular de 423.5 g/mol 5.4 ha demostrado actividad antineoplásica y una toxicidad menor hacia las células sanas que el Cisplatino. Actúa sobre células HeLa, CaLo, leucemia murina L1210, S180 y B16 induciendo apoptosis. El efecto tóxico más severo *in vivo* es la hemólisis producida por la capacidad del cobre de la Casiopeína para reducirse y generar radicales libres.^{39, 40, 41}

Se ha propuesto que se une al ADN como lo hacen otros agentes anticancerosos. Adicionalmente se ha demostrado que su actividad puede deberse a que reacciona con agentes reductores produciendo radicales libres, que rompen la molécula del ADN, y con ello produciendo la muerte celular.⁴²

La Casiopeína Igli al ser administrada por vía intravenosa se une libremente a proteínas plasmáticas (en la mayor parte probablemente vía el centro de cobre). La unión de la Casiopeína Igli a proteínas parece ser relativamente débil debido a que el complejo muestra más afinidad por membranas celulares, como resultado de la lipofilia de la fenantrolina.⁴³

Se ha demostrado que la Casiopeína IIgli produce especies reactivas de oxígeno tanto *in vivo* como *in vitro* lo que le permite causar daño y muerte celular por apoptosis, falla respiratoria y trastornos de membrana, los cuales serían atractivos si ocurrieran más específicamente en células cancerosas. No hay evidencia clara de blancos específicos por Casiopeína IIgli a células tumorales, pero la sensibilidad de éstas es alta a bajas dosis debido a que los mecanismos de protección para las especies reactivas de oxígeno están dañados por mutaciones intrínsecas de las células transformadas.⁴⁴

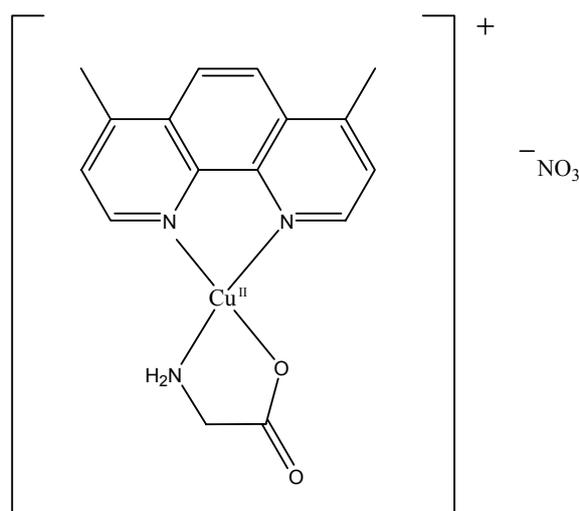


Figura 6.- Casiopeína® II-gli.

2.2.3 Casiopeína® III-ia

De nombre Nitrato de (4,4'- dimetil, 2,2'- bipyridina, acetilacetonato)cobre(II) y de un pKa igual a 8.25 y un peso molecular de 426.92 también ha demostrado actividad sobre líneas tumorales murinas y humanas. La Casiopeína III-ia presenta un ligante bidentado de nitrógenos, con geometría de cuadrado plano y un ligante del tipo O-O en el otro extremo de la molécula.

Al igual que la Casiopeína IIgli la Casiopeína III-ia produce especies reactivas de oxígeno, aunque en menor proporción y a una menor velocidad, sin embargo la citotoxicidad es muy parecida lo que nos puede dar una idea que el mecanismo de acción de estos dos fármacos es diferente, a pesar de tener una estructura semejante siendo también activa, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre células murinas de L1210, B16, y células humanas como SiHa, HCT15, HeLa, entre otras.

Por otro lado, en estudios realizados comparando la actividad de esta Casiopeína[®] con y sin activación metabólica sobre células cancerosas y células normales en cultivo se observa que la actividad aumenta cuando se aumenta la activación metabólica, agregando fracción microsomal S9. Así mismo se observó que la sensibilidad al fármaco es mayor en células cancerosas que en células sanas, en condiciones de actividad metabólica aumentada.

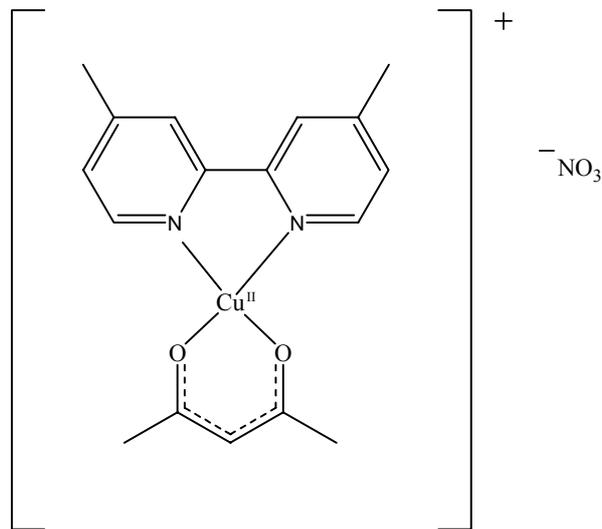


Figura 7.- Casiopeína[®] III-ia

2.3 El Sistema ADME y su influencia en la actividad Farmacológica

La acción de los fármacos no depende únicamente de su capacidad para desarrollar una respuesta farmacológica. Es también de importancia crítica que posean propiedades farmacocinéticas que les permitan alcanzar el lugar requerido para su acción y que su toxicidad sea mínima, para esto debe tener una buena absorción, distribución y excreción, sin embargo no todos los fármacos se eliminan de la misma forma en la que se adsorbieron, es decir son transformados por el organismo para que su excreción sea de una manera fácil y rápida, a este proceso se le conoce como biotransformación.⁴⁵

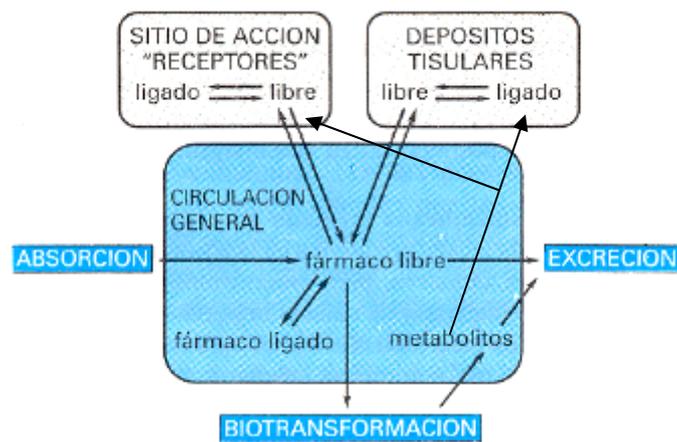


Figura 8.- Esquema de las relaciones entre absorción, distribución, biotransformación y eliminación de un fármaco (sistema ADME)

(Goodman and Gilman, *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 9^oEd.)

El resultado final de las reacciones de biotransformación es el de transformar químicamente al compuesto original en otro distinto llamado metabolito. Este metabolito es en general más hidrofílico que el original, esto aumenta su solubilidad en agua y reduce la habilidad que pueda tener para atravesar membranas biológicas, lo que lleva a una restricción de la distribución en los tejidos. Otra consecuencia de esa transformación es que disminuye la reabsorción intestinal y la reabsorción tubular en el riñón, promoviendo su excreción por vía renal y biliar.⁴⁶ Sin embargo en algunos casos se producen metabolitos activos, es decir, con una actividad biológica igual o diferente en tipo y magnitud al del compuesto original o con propiedades tóxicas como mutagénesis, carcinogénesis o teratogénesis.^{47, 48}

La biotransformación de los fármacos es una transformación química que se realiza por medio de reacciones enzimáticas, tales reacciones se pueden clasificar en dos tipos: Reacciones de fase I, que involucran reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis y Reacciones de fase II que consisten en la reacciones de conjugación con sustancias endógenas.⁴⁹

A pesar de que las reacciones de fase I convierten al fármaco en metabolitos más solubles en agua, introduciendo grupos funcionales como: OH, SH, NH₂, COOH, etc., algunos no son lo suficientemente polares para ser excretados. Estos grupos le permiten a la molécula entrar a reacciones de fase II la cuales son de tipo biosintético, es decir, unen al fármaco metabolizado con sustancias endógenas como el ácido glucurónico, sulfatos, o glicina para formar productos más hidrosolubles que se excreten con mayor facilidad.^{50, 51}

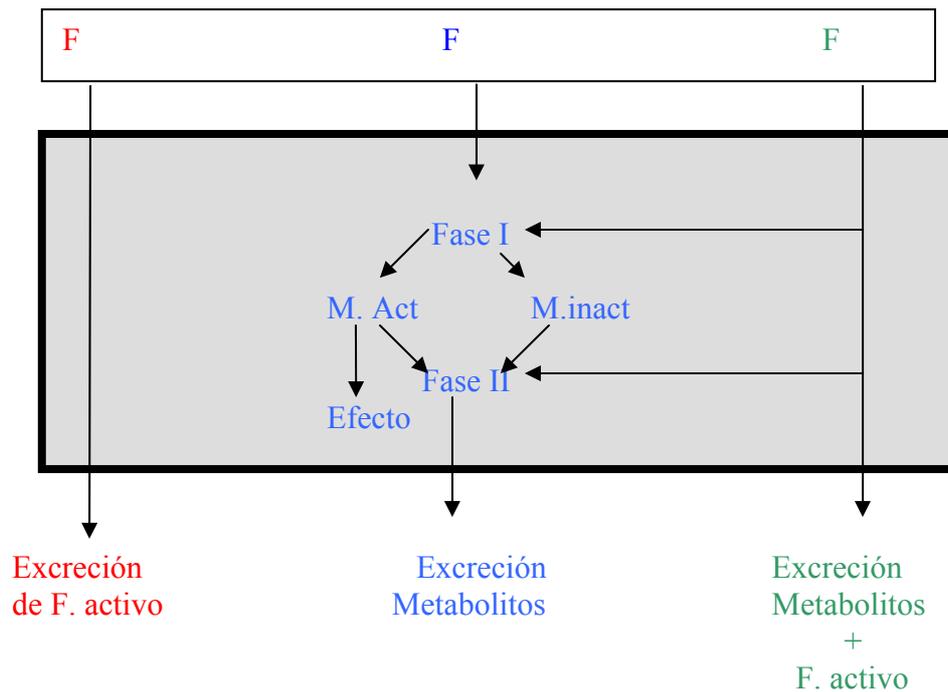


Figura 9.- Esquema del metabolismo de un fármaco dentro de un organismo.

Los sistemas enzimáticos que intervienen en la biotransformación de los fármacos en su mayoría están en el hígado, sin embargo existe una actividad metabólica en los diferentes tejidos que conforman a un organismo, como por ejemplo los riñones, vías gastrointestinales, piel y pulmones. Dentro de una célula particular, gran parte de la actividad metabolizante reside en el retículo endoplásmico y el citoplasma, aunque también pueden efectuarse biotransformaciones en mitocondrias, cubierta nuclear y membranas plasmática.⁵²

2.3.1 Familia CYP P450

La familia de enzimas del citocromo P450 constituye el principal catalizador de las reacciones de biotransformación de medicamentos. Las enzimas del citocromo P450 son proteínas de membrana con un grupo hemo, localizadas en el retículo endoplásmico liso de varios tejidos; dichas hemoproteínas están en estrecha relación con una segunda proteína de membrana, la NADPH-citocromo P450 reductasa, a una razón de aproximadamente de 10 moléculas de citocromo por una de reductasa.⁵³

Las reacciones oxidativas catalizadas por el sistema de monooxigenasa microsómica necesita de la hemoproteína citocromo P450, de la reductasa, de NADPH y del oxígeno molecular, llevando una reacción multifásica. El sustrato (fármaco) reacciona con la forma oxidada del citocromo P450 (Fe^{3+}), para formar un complejo de enzima-sustrato. La reductasa del citocromo acepta un electrón de NADPH, que a su vez reduce el complejo oxidado del citocromo-fármaco. El complejo reducido (Fe^{2+}) reacciona con oxígeno molecular y un segundo electrón de NADPH donado a través de la misma reductasa, para formar una especie de oxígeno activado. En las fases finales se libera un átomo de oxígeno en forma de agua y otro se transfiere al sustrato. Una vez liberado el sustrato sometido a oxidación, la enzima oxidada se regenera.^{54, 55}

En seres humanos se han identificado 12 familias del gen que codifica las enzimas del citocromo P450, y a menudo en una sola célula existen diversas enzimas de estas familias.

La clasificación de la familia de multigenes de citocromo P450 se basa en la similitud de secuencias de las proteínas en forma individual. Los miembros de una familia génica particular tienen una identidad que incluye más de 40% de los aminoácidos. Una familia particular del citocromo suele dividirse en subfamilias, de tal manera que las secuencias proteínicas dentro de la misma subfamilia son idénticas en más del 55% de los casos.^{56, 57, 58} Las Familias 1, 2 y 3 del citocromo P450 (*CYP1*, *CYP2*, *CYP3*) codifican las enzimas que intervienen en la mayor parte de las biotransformaciones de los fármacos. Como resultado de la especificidad relativamente pequeña por el sustrato entre las

proteínas del citocromo P450, dos o más enzimas individuales suelen catalizar una reacción de biotransformación particular.

Sin embargo la enzima *CYP3A4* interviene en la biotransformación de casi todos los fármacos, y se expresa en niveles altos fuera del hígado.⁵⁹

Como ya se mencionó, muchas de las enzimas metabólicas se encuentran distribuidas en tejidos hepáticos y no hepáticos como el cerebro, pulmones, médula ósea y sangre.

Entre los componentes celulares de la sangre se encuentran las células blancas que incluyen a los linfocitos, monocitos y granulocitos; siendo los linfocitos y monocitos los que tienen una mayor cantidad de enzimas metabólicas del citocromo P450.

Las enzimas metabólicas que tienen los linfocitos incluyen la *CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP2E1*, *CYP2D6* y *CYP3A5*. Sin embargo estas enzimas no están activas todo el tiempo ya que su acción se ve influenciada con la edad, el tipo de alimentación, enfermedades, embarazo y hasta la época del año, por lo que no se puede utilizar al linfocito en experimentos *in vitro* para conocer como afecta la biotransformación a la actividad de algún fármaco.^{60, 61}

2.4 Toxicología Genética

La Toxicología Genética es una rama de la Genética o de la Toxicología que identifica y analiza la acción de aquellos agentes que, a niveles subtóxicos de exposición, producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados. Esta disciplina tiene dos funciones; por una parte, la implantación de métodos para evaluar el riesgo de los agentes genotóxicos presentes en el ambiente y cuya interacción con el material genético puede alterar la integridad del genoma humano y, por otra, la aplicación de estas metodologías para la detección y el conocimiento de los mecanismos de actuación de los carcinógenos. De este estudio han surgido un número de pruebas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estas pruebas están diseñadas para evaluar el efecto de sustancias químicas sobre los mecanismos genéticos y el riesgo que puedan tener los organismos expuestos, incluyendo a los humanos. Así mismo se puede obtener

información sobre los posibles daños en tres diferentes niveles: gen, cromosoma y la maquinaria para la correcta segregación de los cromosomas durante la división celular.⁶²

Se han desarrollado más de 200 ensayos para la identificación de sustancias genotóxicas, entre los sistemas de pruebas se incluyen: virus, bacterias, hongos, células en cultivo, plantas, insectos y mamíferos.⁶³

Dentro de estos sistemas biológicos de prueba los más utilizados para determinaciones genotoxicológicas son: el cultivo de linfocitos de sangre periférica (*in vitro*) y la médula ósea de ratón (*in vivo*), los cuales se han visto que son indicadores confiables y sensibles tanto *in vitro* como *in vivo* respectivamente. Adicionalmente existe una buena correlación entre los dos sistemas al realizar las determinaciones del daño que se pudiera producir a nivel genético.^{64,65} Al realizar estos estudios en los sistema *in vivo* e *in vitro* proporciona información particular del comportamiento genotoxicológico en cada uno de ellos, sin embargo, después de hacer un análisis de los resultados que se obtengan en cada uno de los sistemas, se podrá obtener información complementaria.¹³ Principalmente la influencia del sistema ADME del sistema *in vivo* en el perfil genotoxicológico; aspecto que no se da en el sistema *in vitro* por carecer de la mayoría de las enzimas y barreras biológicas propias del organismo completo.¹⁴

La sangre periférica es el tejido que se extrae con mayor facilidad, además de ofrecer las siguientes ventajas como sistema de prueba:

- Se obtienen fácilmente un gran número de células humanas.
- Virtualmente todos los linfocitos de sangre periférica son una población celular sincronizada ya sea en G₀ o G₁.
- En individuos sanos, estas células no se encuentran en proliferación mitótica.
- Pueden ser estimulados por mitógenos, lo que provee un buen número de células en división.⁶⁶

También se han realizado investigaciones a nivel citogenético, teniendo como modelo animales de experimentación, entre ellos se han empleado principalmente ratas y ratones, obteniéndose de éstos la médula ósea o los linfocitos de sangre periférica como tejido de prueba, para la determinación del efecto genotóxico.

Este tipo de estudios tienen la ventaja, en relación a los estudios que se realizan *in vitro*, de mantener a los organismos en condiciones controladas, dándonos información importante de cómo pudiera influir el metabolismo, la reparación del ADN y la farmacodinámica.⁶⁷

2.3.1 Intercambio de Cromátidas Hermanas.

Una de las pruebas genotoxicológicas más utilizadas es el Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH). Un ICH es la manifestación de la reparación de una lesión en el ADN, la cual fue reparada por un mecanismo de recombinación homóloga durante la fase S del ciclo celular.⁶⁸ Dicha recombinación homóloga involucra la reparación de los rompimientos de cadena doble (DSB, por sus siglas en inglés). Éstos se pueden formar a partir de rompimientos sencillos de cadena (SSB, por sus siglas en inglés) que lleva a un colapso de la orquilla de replicación en la fase S del ciclo celular.⁶⁹ Esta prueba se ha empleado para evaluar la respuesta citogenética a la exposición de químicos tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* y tiene una excelente relación dosis-respuesta para cientos de compuestos desde la nicotina hasta carcinógenos completos.⁷⁰ Además ha sido reconocida por la *Environmental Protection Agency* (EPA) como una de las pruebas necesarias para el registro de fármacos, plaguicidas y sustancias tóxicas.^{15,71}

La metodología de ICH se basa en la incorporación de un análogo de base la 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdU) al ADN durante dos ciclos de replicación continuos y su posterior revelado mediante la luz ultravioleta y un colorante como el Giemsa, de tal modo que las células cuyo ADN ha incorporado la 5-BrdU por un ciclo de duplicación teñirán de una manera homogénea, mientras que las células que ya han pasado por dos ciclos de replicación mostrarán una cromátida monofilamente sustituida y la otra bifilamente sustituida (debido a la replicación semiconservativa del ADN), y teñirán de una manera diferencial, oscura la primera y pálida la segunda. De esta manera se pueden evidenciar los intercambios entre las cromátidas hermanas.^{72, 73}

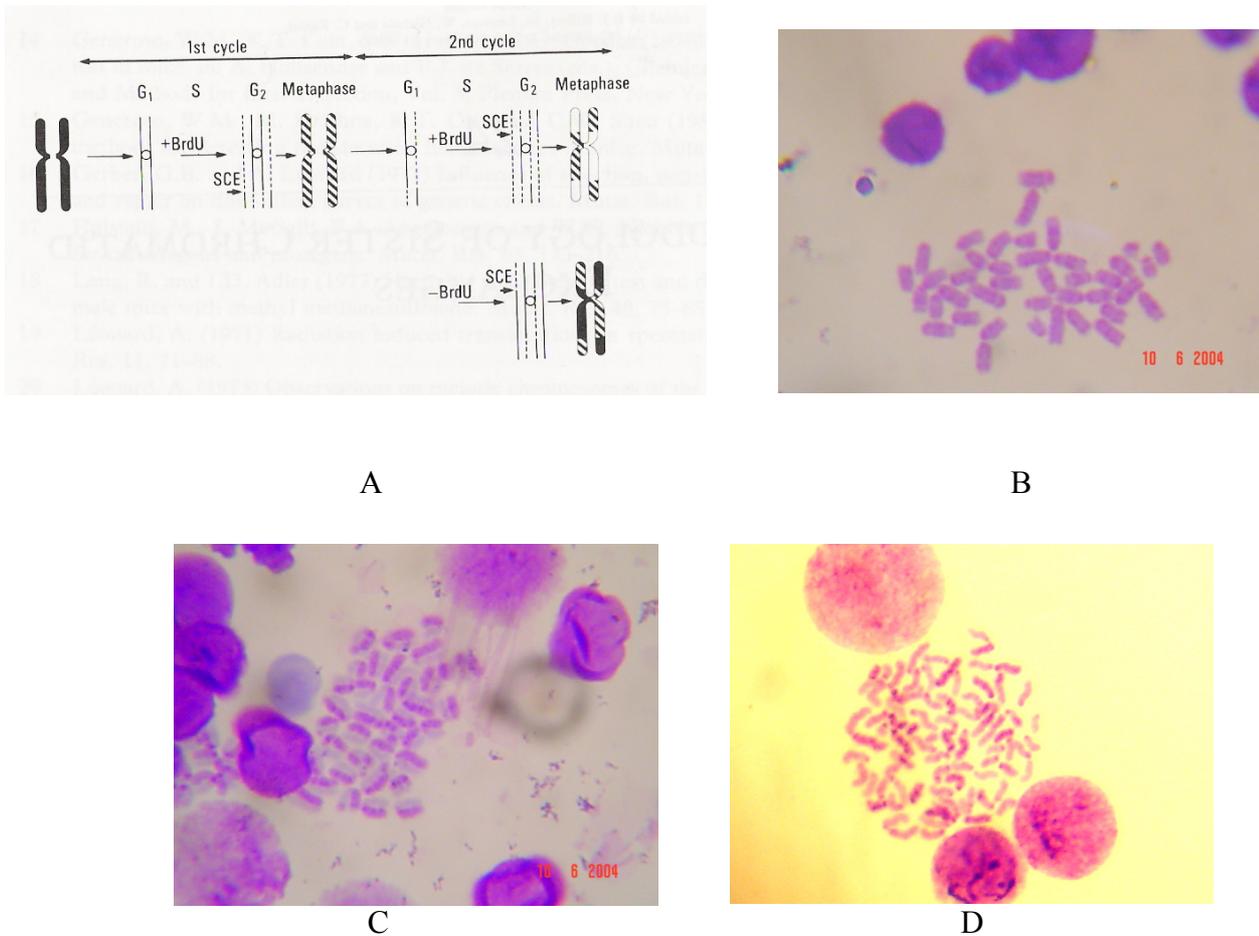


Figura 10.- A) Incorporación de la BrdU en la replicación del cromosoma y la formación de los ICH's. B) Metafase en primer ciclo de replicación. C) Metafase en segundo ciclo de replicación. D) Metafase en tercer ciclo de replicación.

Una vez teñidas las células con la tinción diferencial, es posible no sólo leer el número de intercambios por células, también es posible determinar en la misma muestra: el Índice Mitótico (IM), la Cinética de Proliferación Celular (CPC) y el Tiempo Generacional Promedio (TGP), los cuales se ven afectados dependiendo del mecanismo de acción del fármaco utilizado.⁷⁴

El IM nos da información sobre la capacidad que tiene el tejido para seguir en proliferación, es un parámetro porcentual de la cantidad de células en replicación en relación a las células obtenidas o que responden al mitógeno, mientras que la CPC proporciona idea de la capacidad citotóxica (muerte celular) o citostática (arresto del

ciclo celular normal en alguna etapa específica) que pueda tener el xenobiótico probado, ya que representa la proporción de metafases encontradas que han pasado por uno, dos o tres ciclos de replicación. Estos parámetros junto con el TGP (tiempo necesario para que una célula se replique) y los ICH's nos pueden dar un perfil genotoxicológico, además de poder saber la influencia de otros factores como lo son el metabolismo, edad, embarazo, influencia hormonal, entre otros.⁷⁵

CAPÍTULO

3

HIPÓTESIS
y

OBJETIVOS

3. Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

Si el perfil genotoxicológico de las Casiopeínas Igli, IIgli y IIIia evaluado *in vivo* e *in vitro* es diferente entre sí, será indicativo que su interacción con biomoléculas a través del sistema ADME influirá su actividad.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

- Evaluar a nivel celular los perfiles toxicológicos de las Casiopeína[®] Igli, IIgli y III-ia empleando linfocitos humanos en cultivo, médula ósea y sangre periférica de ratón.

3.1.2 Objetivos Particulares

- Evaluar la capacidad genotóxica mediante la cuantificación del número de Intercambios de Cromátidas Hermanas en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo, médula ósea y linfocitos de sangre periférica de ratón en presencia de las Casiopeínas[®].
- Valorar la capacidad citostática por medio de la determinación de la Cinética de Proliferación Celular y el Tiempo Generacional Promedio en presencia de las Casiopeínas[®] en linfocitos humanos en cultivo, médula ósea de ratón y linfocitos de sangre periférica de ratón.
- Evaluar la capacidad Citotóxica de las Casiopeínas[®] determinando el Índice Mitótico en linfocitos humanos en cultivo, médula ósea de ratón y linfocitos de sangre periférica de ratón.

CAPÍTULO
4
DISEÑO
EXPERIMENTAL
Y
METODOLOGÍA

4. Diseño Experimental y Metodología

4.1 Diseño experimental *in vitro*

Se utilizó sangre periférica de un donador (sano, 24 años de edad, no fumador)^c para realizar un cultivo de linfocitos humanos. Los experimentos se realizaron por duplicado, a continuación se presenta una tabla donde se observan las concentraciones utilizadas como tratamientos.

Tabla 3.- Tratamientos utilizados en los experimentos *in vitro*.

		Testigo Negativo	Testigo Positivo (Cisplatino)	Casiopeína* Igli	Casiopeína* IIgli	Casiopeína* III ia
Dosis	µg/ml	-----	0.1	0.47	0.33	16.84
	mmol/ ml	-----	3.4×10^{-7}	8.27×10^{-7}	7.43×10^{-7}	3.78×10^{-5}
Tejido utilizado		SPH	SPH	SPH	SPH	SPH

SPH = Sangre Periférica Humana

* Casiopeína Igli lote 151MBG060205, Casiopeína IIgli lote 170MBG030305 y Casiopeína III-ia lote 173MBG300305 sintetizadas en el laboratorio 210 del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química.

^c Si bien un solo donador no posee significancia en términos estadísticos, el efecto citostático, citotóxico y/o genotóxico de un fármaco antineoplásico deberá resultar evidente sin importar la ideosincracia del donador, no obstante este estudio contempla una siguiente etapa como protocolo de Doctorado donde se incluirán suficientes donadores.

Las concentraciones utilizadas en los experimentos *in vitro* se basaron en las Concentraciones Inhibitorias 50 (CI50), de cada una de las Casiopeínas[®], utilizadas sobre la línea celular transformada HeLa (Carcinoma epitelial de cervix) con la finalidad de ver la sensibilidad de células normales a una concentración que es tóxica para células transformadas. Con lo que respecta a la concentración del testigo positivo, se uso cisplatino a una concentración de 0.1 µg/ml, ya que en estudios previos se observó que a esta concentración la viabilidad celular era suficiente para observar los efectos genotóxicos del cisplatino.

Una vez realizada la tinción diferencial de cromátidas hermanas se prosiguió al análisis de las muestras, todo esto se realizó conforme se explica en la sección de metodología.

4.2 Diseño experimental *in vivo*

Para la realización de los experimentos se utilizaron 5 ratones exogámicos machos Hsd:ICR (Harlan México) de 8 semanas por grupo. Con respecto a las dosis utilizadas, se partió de la respectiva Dosis Letal 50 (DL50) de las Casiopeínas y se realizó una subdivisión en factor de 2, con la finalidad de encontrar una dosis en la que se pudieran observar los parámetros requeridos, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 4.- Tratamientos utilizados en los experimentos *in vitro*.

		Testigo Negativo	Testigo Positivo (Cisplatino)	Casiopéina Igli*	Casiopéina IIgli*	Casiopéina III ia*
Dosis	mg/kg	-----	1.78	7.5	4.42	12.34
				3.5		
				1.875		
				0.93		
				0.46		
				0.2		
				0.05		
	mmol/ kg	-----	5.97*10 ⁻³	1.30 x 10 ⁻⁵	9.95 x 10 ⁻⁶	2.77 x 10 ⁻⁵
				6.60 x 10 ⁻⁶		
				3.30 x 10 ⁻⁶		
				1.65 x 10 ⁻⁶		
				8.25 x 10 ⁻⁷		
				4.12 x 10 ⁻⁷		
				1.03 x 10 ⁻⁷		
Tejido utilizado		M.O. y S	M.O. y S	M.O. y S	M.O. y S	M.O. y S

M.O. = médula ósea

S= Sangre

* Casiopéina Igli lote 151MBG060205, Casiopéina IIgli lote 170MBG030305 y Casiopéina III-ia lote 173MBG300305 sintetizadas por la candidata a Dr. Ma. Elena Bravo Gómez en el laboratorio 210 del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química.

Una vez realizada la tinción diferencial de cromátidas hermanas se prosiguió al análisis de las muestras, conforme se explica en la sección de metodología.

Se debe hacer mención que la realización de la prueba de TUNEL sobre la médula ósea fue con el objetivo de determinar sólo la vía de muerte de las células, y no la intensidad de respuesta de la misma.

4.3. Metodología

La metodología usada en el desarrollo de esta tesis sigue los lineamientos de las guías internacionales de la EPA (Environmental Protection Agency) con número:

OPPTS 870.5900 *In Vitro* Sister Chromatid Exchange Assay

OPPTS 870.5915 *In Vivo* Sister Chromatid Exchange Assay

4.3.1 Tinción Diferencial de Cromátidas *in vitro*

Partiendo de un donador sano de las características antes mencionadas, se extrajeron por punción venosa 5 ml de sangre periférica por medio de un sistema de extracción de sangre al vacío con heparina (S-Monovette, Sarstedt). Posteriormente 0.5 ml de esta sangre se cultivó en 4.75 ml de medio McCoy 5a (Gibco BRL) suplementado con antibióticos y aminoácidos esenciales y 0.25 ml de fitohemaglutinina M (Microlab), incubándose por 24 hrs. a 37°C.

A las 24 horas de iniciados los cultivos, se adicionaron los tratamientos correspondientes y unos minutos después se adicionó 0.1 ml de una solución de 5-Bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma) para una concentración final de 5µg/ml. A las 70 horas de comenzado el cultivo se le adicionó 0.1 ml de una solución de Colchicina (Merck) para una concentración final de 4µg/ml, dejándose en incubación hasta completar las 72 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 2500 rpm. durante 5 minutos y el paquete celular fue sometido a un choque hipotónico con una solución de cloruro de potasio 0.075 M (KCl, J.T.Baker) por 20 minutos a 37°C. Posteriormente se realizó otra centrifugación, retirando el sobrenadante y fijando al paquete celular con una mezcla de metanol-ácido acético (3:1) (J.T.Baker) por 20 minutos cambiando la mezcla dos veces con un tiempo de 15 y 10 minutos respectivamente.

Del último cambio de la solución fijadora se realizaron preparaciones por goteo las cuales se dejaron secar al aire, una vez secas las preparaciones se irradiaron con luz U.V. por 20 minutos dentro de una solución 2XSSC (citrato de sodio 0.03 M y cloruro de sodio, 0.3M) (J.T.Baker). Transcurrido este tiempo las laminillas se lavaron en agua corriente y fueron puestas en un baño María a 60°C con la solución 2XSSC durante 20 minutos, pasado esto se lavaron al agua corriente y se dejaron secar. Las laminillas fueron codificadas para su posterior lectura a doble ciego.

Una vez secas las laminillas fueron teñidas con una solución de colorante Giemsa (1:10) (Hycel de México) por 10 minutos, al término se lava el colorante excedente con agua. Posteriormente se realizó el análisis correspondiente, según el parámetro a evaluar.

4.3.2 Tinción diferencial de Cromátidas *in vivo*

Se emplearon ratones exogámicos machos Hsd:ICR (Harlan México) de 8 semanas de edad y peso aproximado a los 30-32g, los cuales se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas que incluyeron extracción e inyección de aire a una razón de 18 recambios/h filtrándose partículas hasta de 5 µm. La temperatura se mantuvo a 23°C ± 1°C con un 40-55% de humedad relativa, los ciclos de luz oscuridad fueron de 12/12 horas. Se les proporcionó alimento esterilizable para ratón/rata Harlan Tekland 2018S (Harlan México) y agua *ad libitum*.

El fármaco de prueba se administró por vía intraperitoneal (i.p.), 30 minutos después los animales fueron inyectados por esa misma vía con una solución que contenía 1.5 mg de BrdU/g de ratón, 1.5 ml de agua y 150 mg de carbón activado. Transcurridas 22 horas después de la inyección de la BrdU, se les administró por vía i.p. 0.1 ml/10g de peso corporal de una solución de colchicina al 0.1%, 2 horas después (24 horas a partir de la administración de la BrdU) se procedió a sacrificar a los animales por dislocación cervical y se extrajo la médula ósea de los fémures del ratón y la sangre periférica por corte de la vena yugular.

Para realizar la extracción de la médula ósea se disectó el fémur, limpiándolo adecuadamente y cortando las epífisis con unas tijeras de disección. Se utilizó una jeringa de 10 ml (Henke Sass Wolf GMBH), se lavó el interior con 5 ml de solución salina hipotónica (cloruro de potasio al 0.075 M) precalentada a 37°C, la médula se colectó en un tubo para centrífuga (Corning) y se resuspendió utilizando un agitador de toque y se dejó reposar por 40 minutos a 37°C, la sangre obtenida se trató de la misma manera.

Transcurrido el tiempo, se centrifugaron las muestras a 2500 rpm. durante 5 minutos, eliminándose el sobrenadante, resuspendiendo el botón y en agitación se le agregaron 5 ml de una solución fijadora (metanol-Ac. acético 3:1) dejándose reposar por 15 minutos.

Este paso se repite 2 veces más en intervalos de 10 y 5 minutos respectivamente. Finalmente, las células se centrifugaron a 2500 rpm. durante 5 minutos y el botón se resuspendió en 0.5 ml de fijador. A partir de esta suspensión se realizaron las preparaciones por goteo y se dejaron secar al aire.

Para realizar la tinción diferencial las preparaciones se tiñeron con una solución Hoechst 33258 (Sigma) (0.05 µg/ml) durante 20 minutos a la oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, las preparaciones se irradiaron con luz U.V. por 20 minutos en una solución 2XSSC, posteriormente se lavaron al agua corriente y se incubaron en la misma solución a 55°C en baño María.

Transcurrido ese tiempo se las laminillas se lavaron y fueron teñidas en una solución Giemsa 1:10 durante 10 minutos.

4.3.3 TUNEL (Tranferase-mediaded dUTP Nik End Labeling)

Para esta determinación las laminillas obtenidas en las tinciones anteriores que tenían células con aparente morfología de apoptosis fueron tratadas por 10 minutos en horno de microondas con una solución recuperadora de antígenos pH 6.0 (Dako), dejándose enfriar a temperatura ambiente y lavándose con tris-buffer con tween 20 pH 7.6 (Dako), posteriormente se les aplicó la reacción mixta de TUNEL (Roche), incubándose a 37°C por 1 Hr, al término de la incubación se lavó con tris-buffer y se adicionó el convertidor POD (Dako) por 30 min a 37°C, nuevamente se lavó con tris buffer y se reveló la reacción de TUNEL con diamino bencidina (Dako) por 5 minutos formando un producto final permanente de color café, luego los cultivos fueron lavados y contrateñidos con hematoxilina de Mayers (Dako) por 3 minutos, finalmente fueron lavados con agua corriente, deshidratados, cubiertos con resina y observados al microscopio.

Para esta prueba sólo se revisó si la reacción era positiva o negativa, lo que es equivalente a si sufrieron o no apoptosis.

4.4 Tratamiento de datos

4.4.1 Índice Mitótico

Para calcular el índice mitótico (IM) se revisaron 1,000 células al azar por tratamiento y por ratón, utilizándose la siguiente fórmula para calcularlo:

$$IM = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células en metafase}}{\text{N}^\circ \text{ de células totales}} \times 100$$

Una vez obtenidos los datos de IM, estos se analizaron mediante la prueba de diferencia de proporciones Z.

4.4.2 Cinética de Proliferación Celular y Tiempo Generacional Promedio

Se observaron 100 células en metafase al azar, por tratamiento y por ratón, se cuantificaron las células en primera, segunda o sucesivas divisiones. A partir de estos datos se obtuvo el Tiempo Generacional Promedio utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{TGP} = \frac{\text{hrs. en Presencia BrdU}}{1(\text{I}) + 2(\text{II}) + 3(\text{III})} \times 100$$

Donde I, II y III representan las proporciones de células en primera, segunda y tercera o subsecuentes divisiones.

Para comparar los porcentajes de células en primera, segunda y tercera división se aplicó la prueba estadística χ^2 , al igual que a los datos de tasa de proliferación celular.

4.4.3 INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH's)

De las laminillas obtenidas se observó un mínimo de 30 metafases en segundo ciclo por tratamiento y por ratón, cuantificándose el número y tipo de ICH's.

A los datos de la frecuencia de ICH's se les aplica la prueba estadística t de Student, para la cual se calculó la media aritmética de ICH's por célula y su desviación estándar.

Figura 11.- Esquema de Tratamiento *in vitro*

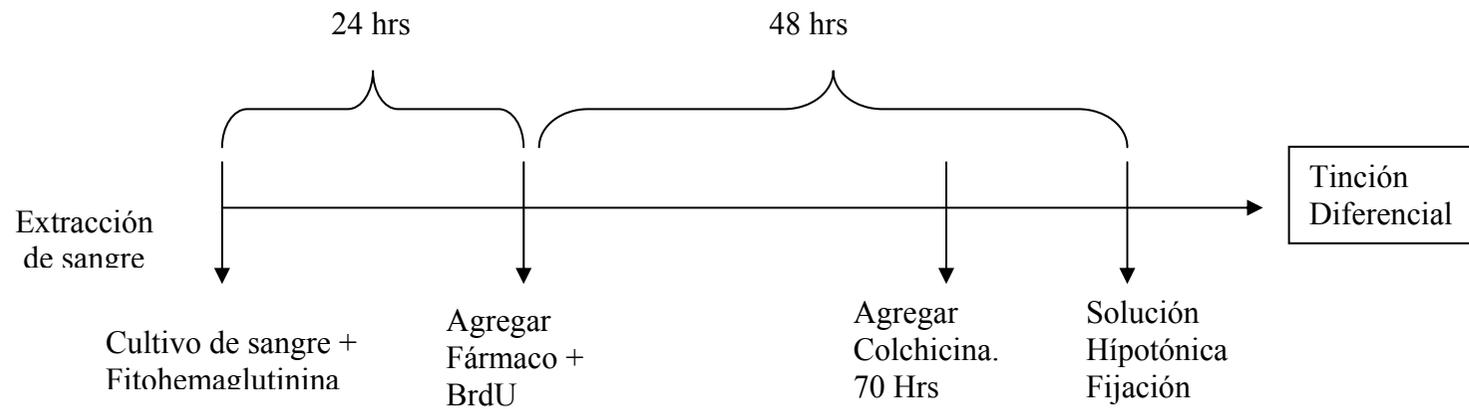
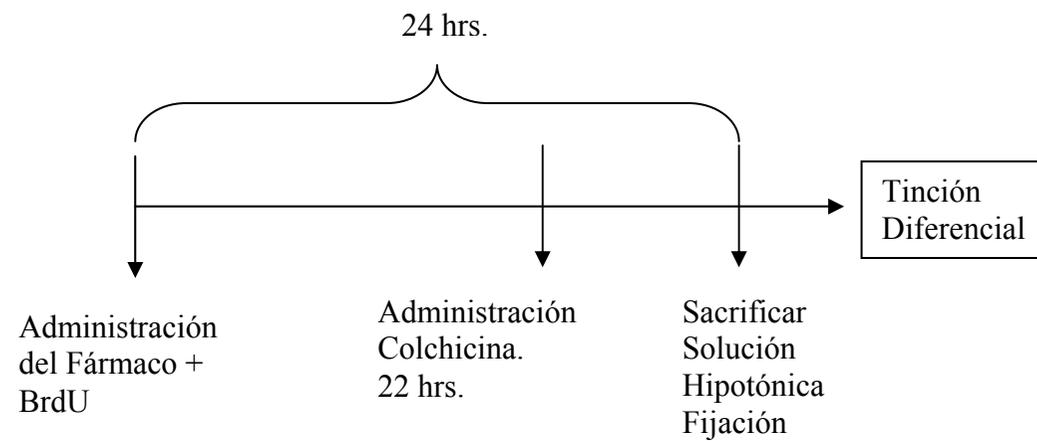


Figura 12.- Esquema de Tratamiento para el sistema *in vivo*



CAPÍTULO
5
RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Experimentos *in vitro**Linfocitos humanos en cultivo*

5.1.1 Determinación del Índice Mitótico en linfocitos humanos en cultivo.

En los experimentos realizados con linfocitos humanos se utilizaron las concentraciones inhibitorias medias (CI50) para la línea celular HeLa. Como se puede observar en la Tabla 5, los tratamientos con Casiopeínas no alteran de manera estadísticamente significativa el índice mitótico de los linfocitos humanos en cultivo.

Tabla 5.- Índice Mitótico de los cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica, tratados con las diferentes Casiopeínas.

	<i>Testigo Negativo</i>	<i>Testigo Positivo Cisplatino 0.01 µg/ml 3.4 x 10⁻¹⁴ mmoles/ml</i>	<i>Casiopeína Igli 0.47 µg/ml 8.27x10⁻⁷ mmoles/ml</i>	<i>Casiopeína IIgli 0.33 µg/ml 7.43x10⁻⁷ mmoles/ml</i>	<i>Casiopeína III-ia 16.84 µg/ml 3.78x10⁻⁵ mmoles/ml</i>
IM (%) (D.S)	8.49 (0.50)	3.63* (0.29)	5.9 (0.33)	4.73 (0.16)	9.89 (0.76)
Número de repeticiones	2	2	2	2	2

* p<0.05 Z para proporciones

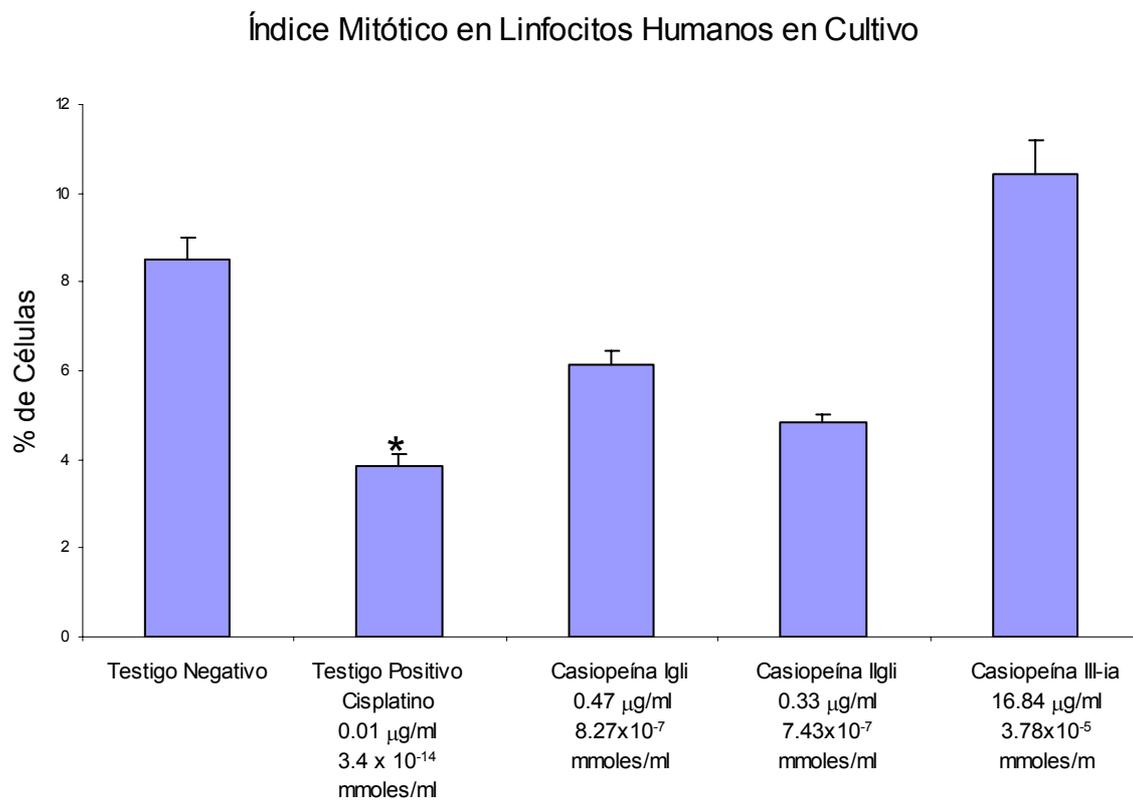


Figura 13.- Determinación del índice mitótico en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo en presencia de diferentes Casiopeínas.

* $p < 0.05$ Z para proporciones

5.1.2 Cinética de Proliferación Celular en linfocitos humanos en cultivo.

Como se puede observar en la Tabla 6, la cinética de proliferación celular se ve alterada significativamente ($p < 0.05$) con las tres Casiopeínas deteniendo a las células en el primer ciclo de replicación a diferencia del Cisplatino que las detiene en el 2° ciclo.

Tabla 6.- Determinación de la Cinética de Proliferación Celular para los tratamientos con Casiopeína en linfocitos humanos en cultivo.

	<i>Testigo Negativo</i>	<i>Testigo Positivo Cisplatino</i>	<i>Casiopeína Igli</i>	<i>Casiopeína IIgli</i>	<i>Casiopeína III-ia</i>
<i>Ciclos</i>		<i>0.01 µg/ml 3.4 x 10⁻¹⁴ mmoles/ml</i>	<i>0.47 µg/ml 8.27x10⁻⁷ mmoles/ml</i>	<i>0.33 µg/ml 7.43x10⁻⁷ mmoles/ml</i>	<i>16.84 µg/ml 3.78x10⁻⁵ mmoles/ml</i>
1° (%)	30.7	52.31	85.98**	91.08**	84.15**
DS	(1.11)	(3.93)	(0.53)	(0.82)	(1.06)
2° (%)	59.45	33.85*	14.02**	8.91**	15.84**
DS	(1.839)	(6.3)	(0.54)	(0.82)	(1.06)
3° (%)	9.85	13.82	0**	0**	0**
DS	(0.71)	(2.37)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
Número de repeticiones	2	2	2	2	2

* $p < 0.05 \chi^2$

** $p < 0.01 \chi^2$

Cinética de Proliferación Celular en Linfocitos Humanos en Cultivo

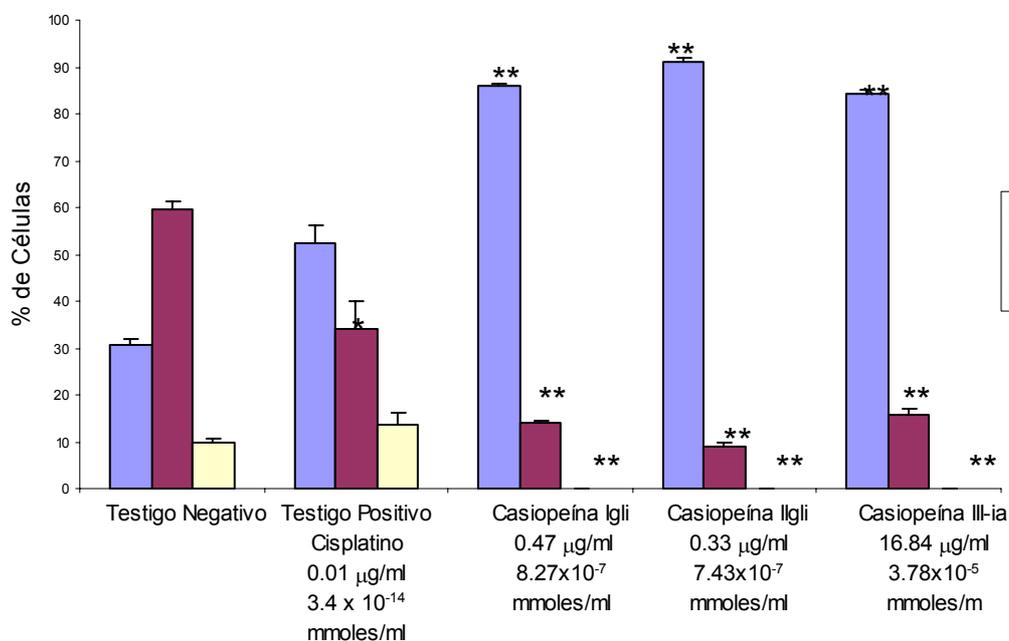


Figura 14.- Efecto de las Casiopeínas en la Cinética de Proliferación Celular en linfocitos humanos en cultivo. * $p < 0.05 \chi^2$ ** $p < 0.01 \chi^2$

5.1.3 Tiempo Generacional Promedio en linfocitos humanos en cultivo.

En la siguiente Tabla se observa que el Tiempo de Proliferación Celular se ve aumentado en comparación con el testigo negativo al ser tratados con las Casiopeína, lo que demuestra, junto con los resultados de la Cinética de Proliferación Celular, que los fármacos utilizados tienen la capacidad de ser citostáticos.

Tabla 7.- Tiempo Generacional Promedio para los linfocitos humanos tratados con Casiopeína.

	<i>Testigo Negativo</i>	<i>Testigo Positivo Cisplatino 0.01 µg/ml 3.4 x 10⁻¹⁴ mmoles/ml</i>	<i>Casiopeína Igli 0.47 µg/ml 8.27x10⁻⁷ mmoles/ml</i>	<i>Casiopeína IIgli 0.33 µg/ml 7.43x10⁻⁷ mmoles/ml</i>	<i>Casiopeína III-ia 16.84 µg/ml 3.78x10⁻⁵ mmoles/ml</i>
TGP (hrs.) (DS)	26.79 (0.062)	29.71 (0.28)	42.09* (0.20)	44.07* (0.33)	41.43* (0.38)
Número de repeticiones	2	2	2	2	2

* p<0.05 Z para proporciones

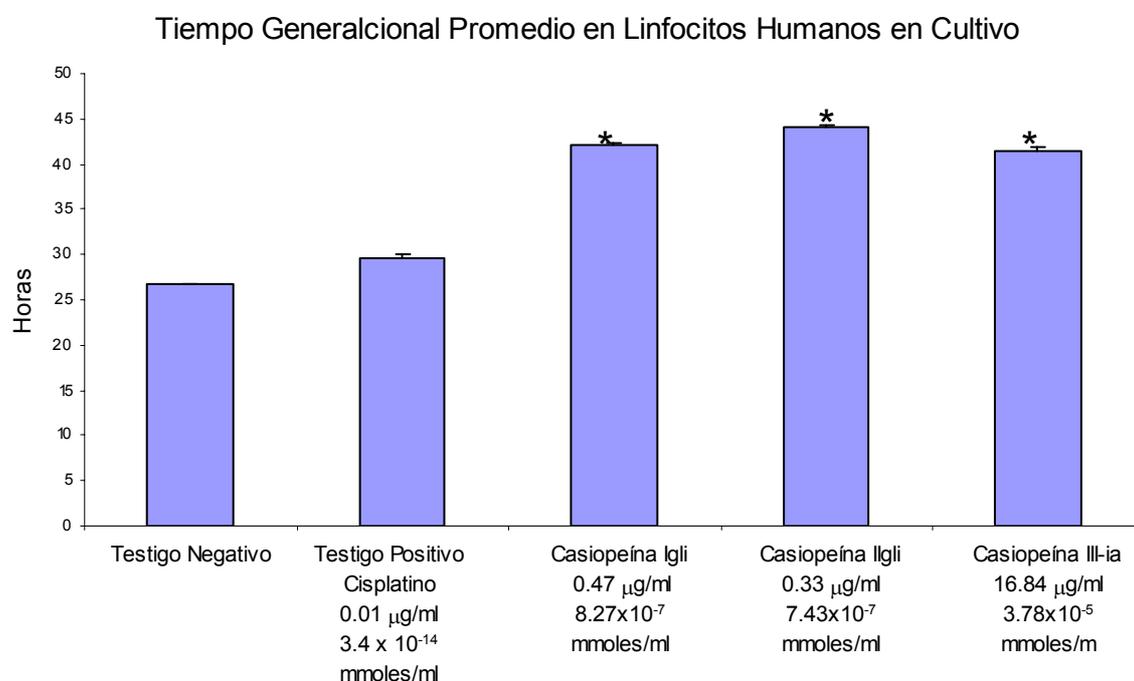


Figura 15 .Determinación del Tiempo Generacional Promedio en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo tratados con las diferentes Casiopeínas. * p<0.05 Z para proporciones

5.1.3 Intercambio de Cromátidas Hermanas en linfocitos humanos en cultivo.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los intercambios de cromátidas hermanas: se observa que para la Casiopeína Igli hay un aumento significativo con respecto al testigo negativo, por lo que se considera que esta es genotóxica bajo las condiciones del experimento, por otro lado para las Casiopeínas IIgli y III ia no se pudo determinar este parámetro debido a que no se encontró un número suficiente de metafases en segundo ciclo como consecuencia de la capacidad citostática antes mencionada.

Tabla 8.- Determinación del Intercambio de Cromátidas Hermanas en linfocitos humanos de sangres periférica en cultivo.

	<i>Testigo Negativo</i>	<i>Testigo Positivo Cisplatino 0.01 µg/ml 3.4 x 10⁻¹⁴ mmoles/ml</i>	<i>Casiopeína Igli 0.47 µg/ml 8.27x10⁻⁷ mmoles/ml</i>	<i>Casiopeína IIgli 0.33 µg/ml 7.43x10⁻⁷ mmoles/ml</i>	<i>Casiopeína III-ia 16.84 µg/ml 3.78x10⁻⁵ mmoles/ml</i>
ICH (DS)	1.57 (0.14)	7.1* (0.6)	4.13* (0.24)	n.d.	n.d.
Número de repeticiones	2	2	2	2	2

* p<0.05 “t” de Student

n.d. → no determinado

Intercambio de Cromátidas Hermanas en Linfocitos Humanos en Cultivo

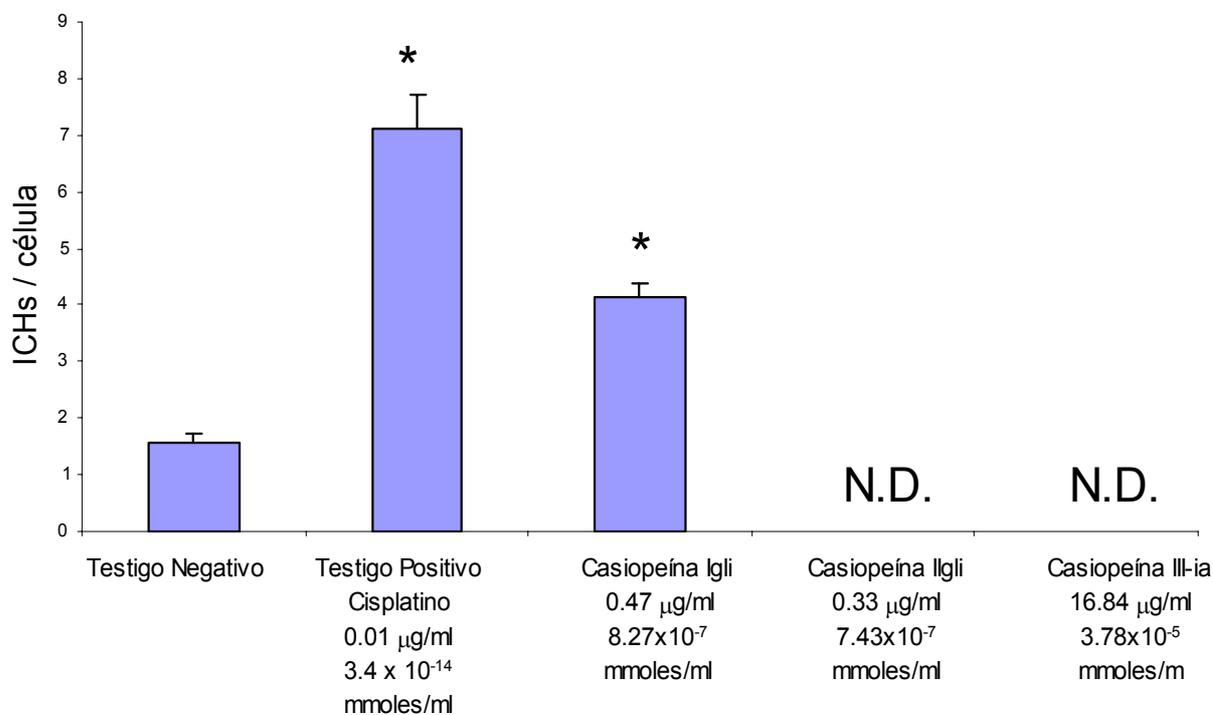


Figura 16.-Determinación del Intercambio de Cromátidas Hermanas en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo. * $p < 0.05$ "t" de Student, N.D.. → no determinado

5.2 Experimentos *in vivo*.*Sangre periférica y médula ósea de ratón.*

5.2.1.- TUNEL

La prueba de TUNEL se realizó sólo como confirmación de muerte celular, además de por determinar con mayor seguridad el mecanismo de muerte, por el cual optaron las células de la médula ósea de los ratones.

En la Tabla número 9 se observa que todas las dosis administradas de Casiopeína Igli producen muerte celular por apoptosis en la médula ósea, por lo que no fue posible realizar la cuantificación de los parámetros citogenéticos, excepto a la dosis más baja (0.05 mg/kg) en donde a pesar de encontrar un número considerable de células apoptóticas, fue posible determinar dichos parámetros.

Tabla 9.- Resultados obtenidos para la Casiopeína Igli con la técnica de TUNEL en médula ósea de ratón.

<i>Casiopeína Igli</i>							
	7.5 mg/kg	3.75 mg/kg	1.875mg/kg	0.93 mg/kg	0.46 mg/kg	0.2 mg/kg	0.05 mg/kg
	1.32x10 ⁻⁵	6.6x10 ⁻⁶	3.3x10 ⁻⁶	1.65x10 ⁻⁶	8.25x10 ⁻⁷	4.12x10 ⁻⁷	1.03x10 ⁻⁷
	mmoles/kg	mmoles/kg	mmoles/kg	mmoles/kg	mmoles/kg	mmoles/kg	mmoles/kg
TUNEL	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos con la Casiopeína IIgli en la médula ósea de ratón, observándose que a todas las dosis la mayoría de las células mueren a través de un proceso de apoptosis (confirmado por e), sin embargo esto no impidió la cuantificación de los parámetros genotoxicológicos antes mencionados.

Tabla 10.- Resultados obtenidos para la Casiopeína IIgli con la técnica de TUNEL en médula ósea de ratón.

<i>Casiopeína IIgli</i>			
	4.42 mg/kg	2.21 mg/kg	1.05 mg/kg
	9.95×10^{-6}	4.9×10^{-6}	2.48×10^{-6}
	mmoles/kg	mmoles/kg	mmoles/kg
TUNEL	Positivo	Positivo	Positivo

Al tratar a los ratones con la Casiopeína III-ia se observa (Tabla 11) que igualmente a todas las dosis utilizadas producen muerte celular por apoptosis, sin embargo esto no impidió las determinaciones genotoxicológicas requeridas, exceptuando a la dosis más alta debido al poco material que se encontró ya que la gran mayoría de las células estaban muertas.

Tabla 11.- Resultados obtenidos para la Casiopeína III-ia con la técnica de TUNEL, positiva a apoptosis.

<i>Casiopeína III-ia</i>			
	12.34 mg/kg	6.17 mg/kg	3.085 mg/kg
	2.77×10^{-5}	1.38×10^{-5}	6.93×10^{-6}
	mmoles/kg	mmoles/kg	mmoles/kg
TUNEL	Positivo	Positivo	Positivo

5.2.2 Experimentos realizados con sangre periférica de ratón

No existió material en la sangre periférica que se pudiera analizar bajo las condiciones del experimento en ninguna de las dosis utilizadas para cualquiera de las Casiopeína utilizadas.

5.2.3 Experimentos realizados con la médula ósea de ratón

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos para los grupos testigo que fueron comparados con los tratamientos con Casiopeínas como fármaco de prueba.

Tabla 12.- Resultados obtenidos para los controles positivo y negativo en médula ósea de ratón.

	<i>Testigo Negativo</i>	<i>Testigo Positivo Cisplatino 1.78 mg/kg 6.0×10^{-6} mmol/kg</i>
IM (%)	14.14	9.15
(DS)	(7.70)	(1.13)
CPC	38	45
1 ^a (%)	(5.89)	(1.64)
(DS)	50	45
2 ^a	(9.08)	(1.48)
(DS)	12	10
3 ^a	(4.18)	(3.11)
(DS)		
TGP (Hrs.)	13.8	14.6
(DS)	(0.65)	(0.8)
ICH ± ES	0.67	5.6 ***
(DS)	(0.077)	(0.19)

* $p < 0.05$ Z para proporciones

** $p < 0.05$ χ^2

*** $p < 0.05$ “t” de Student

Casiopeína Igli

La Tabla 13 muestra los resultados obtenidos para los experimentos en donde se utilizó la Casiopeína Igli como fármaco de prueba, se observa que sólo en la dosis más baja probada se pudo determinar los parámetros requeridos exceptuando los Intercambios de Cromátidas Hermanas, en las demás dosis no se pudo determinar ningún parámetro debido a que no existía suficiente material para analizar a consecuencia de que el tejido estaba muerto, confirmándose esto por la técnica de TUNEL y dando positivo a apoptosis como se mencionó anteriormente.

Tabla 13.- Resultados obtenidos para la determinación del IM, CPC, TGP e ICHs en médula ósea de ratón utilizando Casiopeína Igli a diferentes dosis.

	<i>Testigo</i>								
	<i>Testigo</i>	<i>Positivo</i>	<i>7.5 mg/kg</i>	<i>3.75 mg/kg</i>	<i>1.875mg/kg</i>	<i>0.93 mg/kg</i>	<i>0.46 mg/kg</i>	<i>0.2 mg/kg</i>	<i>0.05 mg/kg</i>
	<i>Negativo</i>	<i>Cisplatino</i>	<i>1.32x10⁻⁵</i>	<i>6.6x10⁻⁶</i>	<i>3.3x10⁻⁶</i>	<i>1.65x10⁻⁶</i>	<i>8.25x10⁻⁷</i>	<i>4.12x10⁻⁷</i>	<i>1.03x10⁻⁷</i>
		<i>1.78 mg/kg</i>	<i>mmoles/kg</i>	<i>mmoles/kg</i>	<i>mmoles/kg</i>	<i>mmoles/kg</i>	<i>mmoles/kg</i>	<i>mmoles/kg</i>	<i>mmoles/kg</i>
		<i>6.0x10⁻⁶ mmol/kg</i>							
IM (%)	14.14	9.15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.9 *
(DS)	(7.7)	(1.1)							(2.2)
CPC									
1 ^a (%)	38	45							58**
(DS)	(5.8)	(1.6)							(1.4)
2 ^a	50	45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	42**
(DS)	(9.1)	(1.4)							(1.2)
3 ^a	12	10							0**
(DS)	(4.1)	(3.1)							(0)
TGP (Hrs.)	13.8	14.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14.3
(DS)	(0.6)	(0.8)							(1.3)
ICH	0.67	5.6 ***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(DS)	(0.077)	(0.2)							
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5

* p<0.05 Z para proporciones

** p<0.05 χ^2

n.d. → no determinado

En la Figura 17 se muestra la gráfica del índice mitótico donde se observa que la Casiopeína Igli disminuye significativamente el índice mitótico con respecto al testigo negativo.

Índice Mitótico en Médula Ósea de Ratón

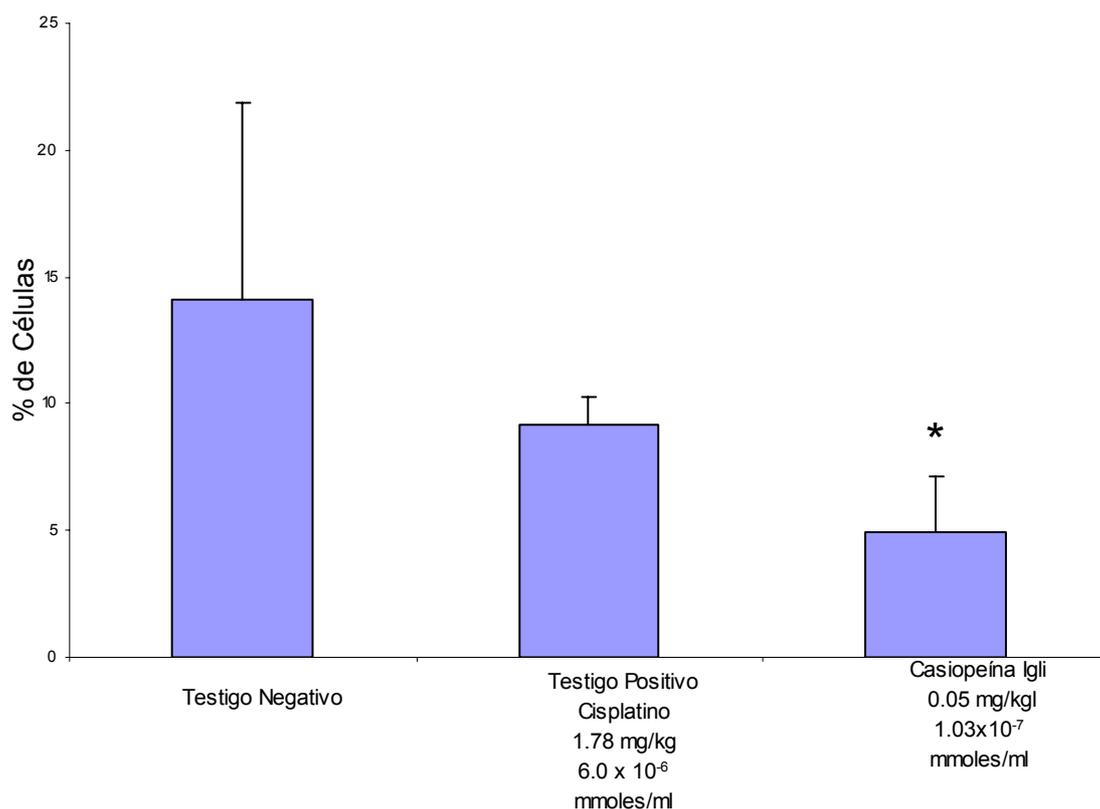


Figura 17.- Determinación del Índice Mitótico en médula ósea de ratón en presencia de la Casiopeína Igli. * $p < 0.05$ Z para proporciones

En la Figura 18 se muestra la cinética de proliferación celular, donde se puede observar que la dosis utilizada de Casiopeína Igli (0.05 mg/kg) cambia la distribución de la metafases según los ciclos de replicación por los que ha pasado, dejando a las células en la primera división.

Cinética de Proliferación Celular en Médula Ósea de Ratón

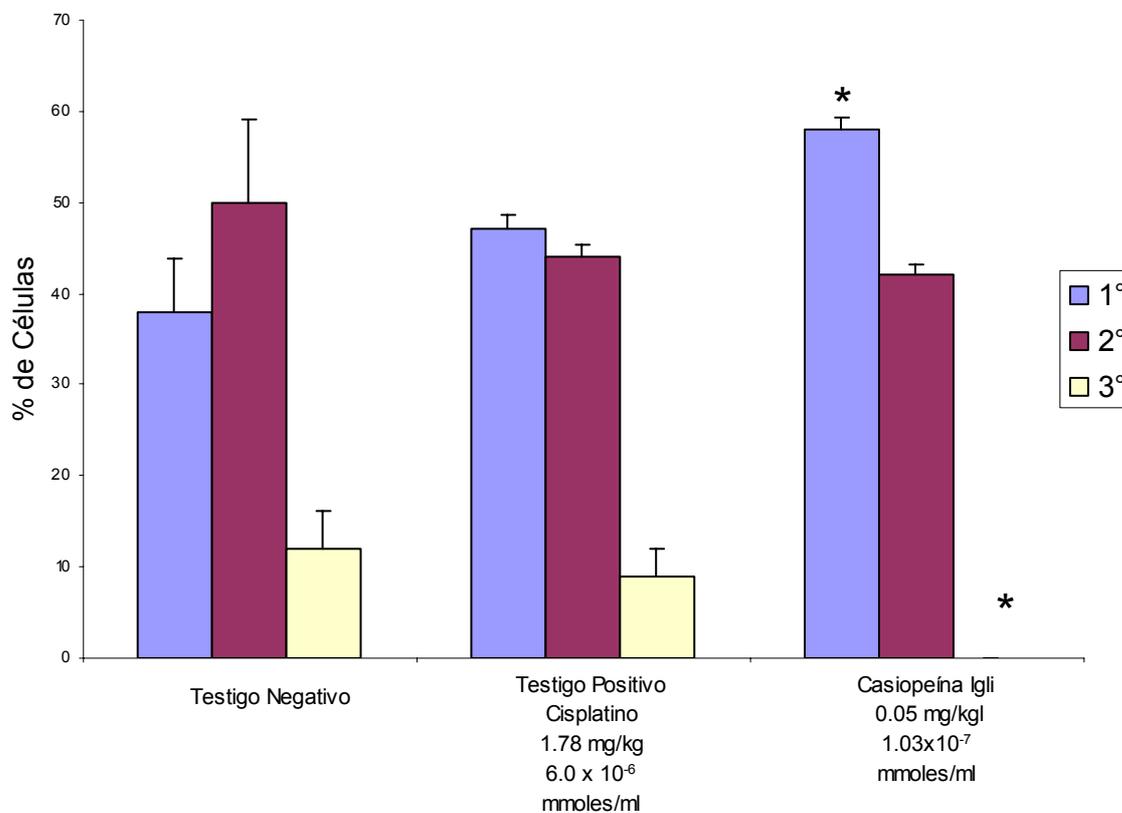


Figura 18.- Efecto en la Cinética de Proliferación Celular de la Casiopeína Igli en médula ósea de ratón. * $p < 0.05 \chi^2$

En la Figura siguiente se observa que el tiempo generacional promedio no se ve afectado de forma estadísticamente significativa en comparación con el testigo negativo.

Tiempo Generacional Promedio en Médula Ósea de Ratón

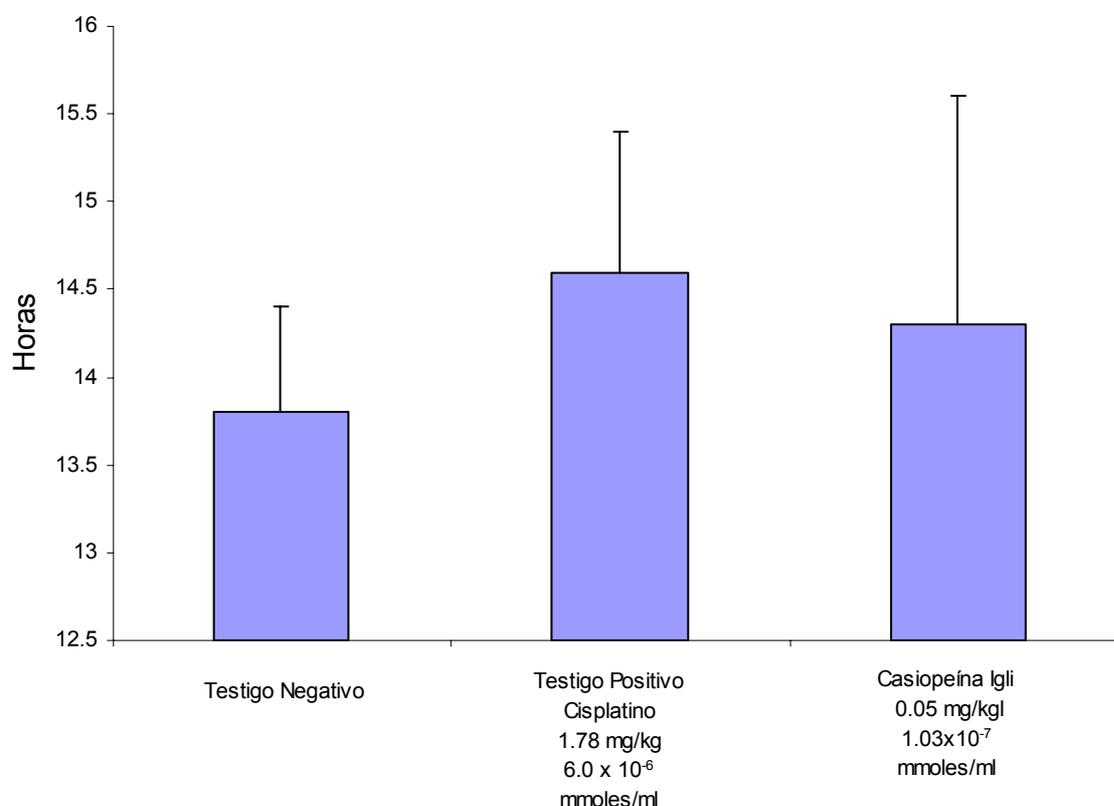


Figura 19.- Tiempo generacional promedio en médula ósea de ratón utilizando una dosis de Casiopeína Igli. * $p < 0.05$ Z para proporciones

Casiopeína IIgli

A continuación se muestran los resultados con la Casiopeína IIgli, donde se observa que, sólo a la dosis más alta utilizada, hay una disminución significativa del Índice Mitótico. Así mismo se observa una marcada tendencia a dejar a las células en un primer ciclo de replicación por lo que el Tiempo Generacional Promedio de las células se ve aumentado casi al doble del testigo negativo. Sin embargo debido al poder citotóxico de las Casiopeína no existió material suficiente para cuantificar los Intercambios de Cromátidas Hermanas, como se puede ver en la Tabla 14.

Tabla 14.- Resultados de la determinación del IM, CPC, TGP e ICHs, obtenidos con la Casiopeína IIgI en médula ósea de ratón a diferentes dosis.

		<i>Testigo</i>	<i>4.42 mg/kg</i>	<i>2.21 mg/kg</i>	<i>1.05 mg/kg</i>
		<i>Positivo</i>	<i>9.95x10⁻⁶</i>	<i>4.9x10⁻⁶</i>	<i>2.48x10⁻⁶</i>
	<i>Testigo</i>	<i>Cisplatino</i>	<i>mmoles/kg</i>	<i>mmoles/kg</i>	<i>mmoles/kg</i>
	<i>Negativo</i>	<i>1.78 mg/kg</i>			
		<i>6.0x10⁻⁶</i>			
		<i>mmol/kg</i>			
IM (%)	14.14	9.15	4.1*	6.7	6.9
(DS)	(7.7)	(1.1)	(2.1)	(1.3)	(1.6)
CPC (%)					
1 ^a	38	45	98**	96 **	98 **
(DS)	(5.8)	(1.6)	(4.3)	(1.78)	(2.34)
2 ^a	50	45	1**	4**	2**
(DS)	(9.1)	(1.4)	(2.6)	(0.83)	(1.14)
3 ^a	12	10	1**	0**	0**
(DS)	(4.1)	(3.1)	(1.3)	(0)	(0)
TGP (Hrs.)	13.8	14.6	22.16 *	22.07*	22.82*
(DS)	(0.6)	(0.8)	(2.3)	(0.6)	(0.5)
ICH	0.67	5.6 ***	n.d.	n.d.	n.d.
(DS)	(0.077)	(0.2)			
n	5	5	5	5	5

* $p < 0.05$ Z para proporciones

** $p < 0.05$ χ^2

*** $p < 0.05$ "t" de Student

A continuación se presentan las gráficas derivadas de los datos presentados en la Tabla anterior.

Índice Mitótico en Médula Ósea de Ratón

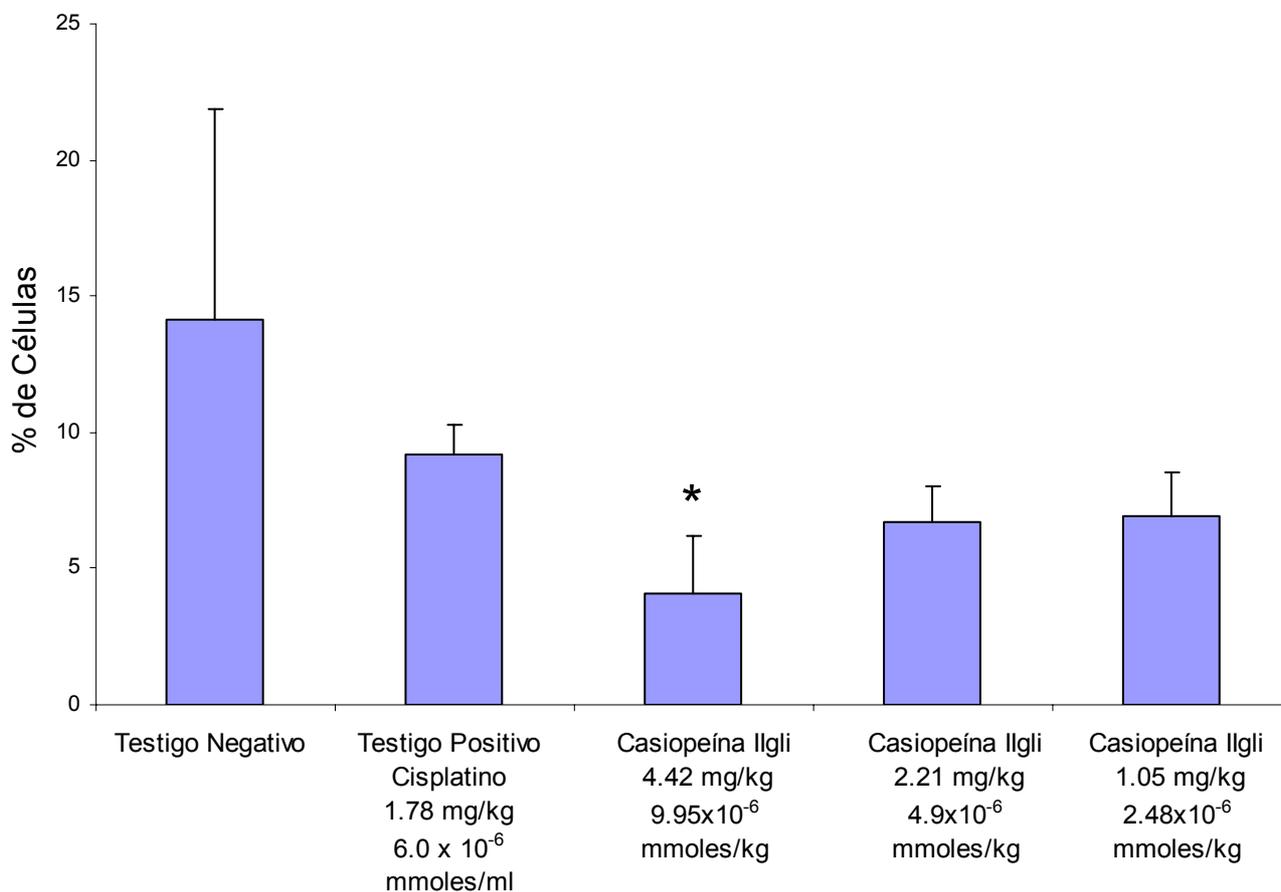


Figura 20.- Determinación del Índice Mitótico en médula ósea de ratón utilizando diferentes dosis de Casiopeína IIgli. * $p < 0.05$ Z para proporciones

Cinética de Proliferación Celular en Médula Ósea de Ratón

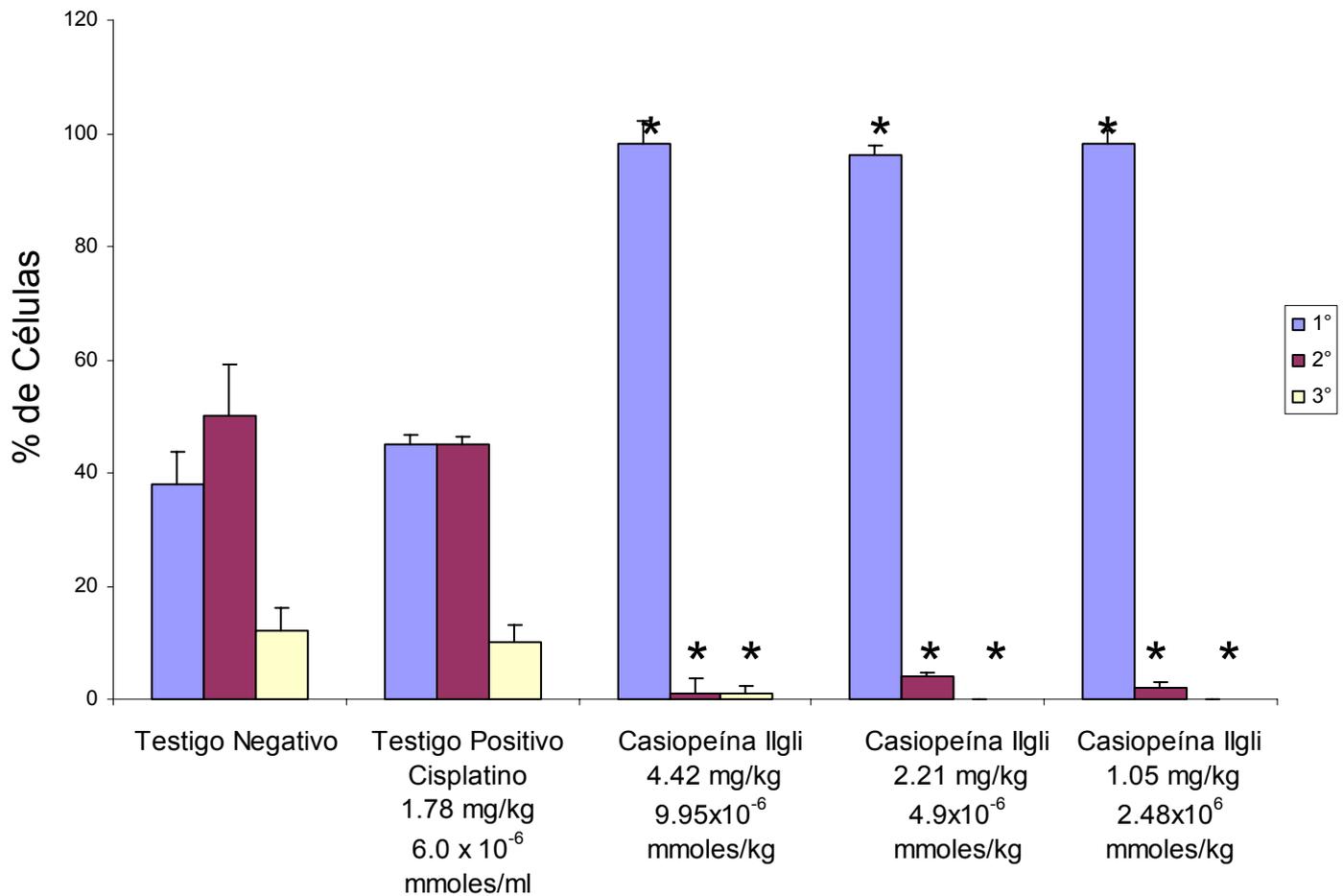


Figura 21.- Determinación de la Cinética de Proliferación Celular en médula ósea de ratón utilizando Casiopeína II gli a diferentes dosis. * $p < 0.05$ χ^2 -cuadrada

Tiempo Generacional Promedio en Médula Ósea de Ratón

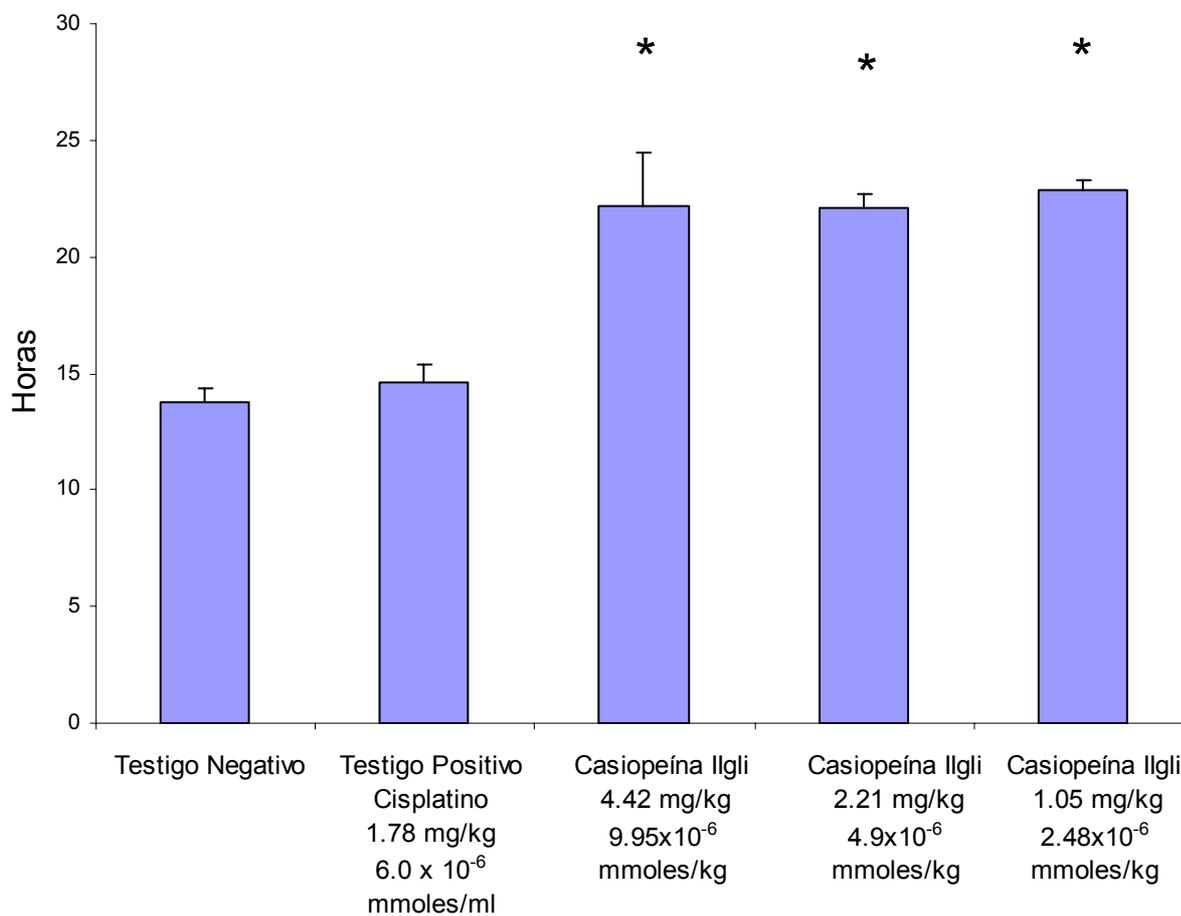


Figura 22.- Determinación del Tiempo generacional promedio en médula ósea de ratón utilizando diferentes dosis de Casiopeína Ilgli. * $p < 0.05$ Z para proporciones

Casiopéina III-ia

En la Tabla 15 se observa que a la dosis más alta utilizadas no se pudieron medir los parámetros requeridos ya que no se encontró material que pudiera ser analizado debido a que las células estaban muertas, comprobándose esto por la prueba de TUNEL como se mencionó anteriormente, sin embargo a dosis menores se pudieron obtener todos los parámetros.

Tabla 15.- Resultados obtenidos con la Casiopéina III-ia en médula ósea de ratón a diferentes dosis.

	<i>Testigo</i>				
	<i>Testigo</i>	<i>Positivo</i>			
	<i>Cisplatino</i>	<i>12.34 mg/kg</i>	<i>6.17 mg/kg</i>	<i>3.085 mg/kg</i>	
	<i>Negativo</i>	<i>1.78 mg/kg</i>	<i>2.77x10⁻⁵</i>	<i>1.38x10⁻⁵</i>	<i>6.93x10⁻⁶</i>
		<i>6.0x10⁻⁶</i>	<i>mmoles/kg</i>	<i>mmoles/kg</i>	<i>mmoles/kg</i>
		<i>mmol/kg</i>			
IM (%)	14.14	9.15		14.8	11.2
(DS)	(7.7)	(1.1)	n.d.	(4.2)	(1.38)
CPC					
1ª (%)	38	45		19	27
(DS)	(5.8)	(1.6)		(5.3)	(4.0)
2ª	50	45		69	61
(DS)	(9.1)	(1.4)	n.d.	(3.0)	(2.9)
3ª	12	10		12	12
(DS))	(4.1)	(3.1)		(4.3)	(3.5)
TGP(Hrs.)	13.8	14.6	n.d.	12.9	12.4
(DS)	(0.6)	(0.8)		(0.4)	(0.6)
ICH	0.67	5.6 *		2.79*	3.1*
(DS)	(0.077)	(0.2)	n.d.	(0.12)	(0.10)
N	5	5	5	5	5

* p<0.05 “t” de Student

Al comparar con el testigo negativo se observa que no existe diferencia significativa para ningún parámetro, excepto en el Intercambio de Cromátidas Hermanas en donde se observa un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

A continuación se presentan las gráficas derivadas de los datos presentados en la Tabla anterior.

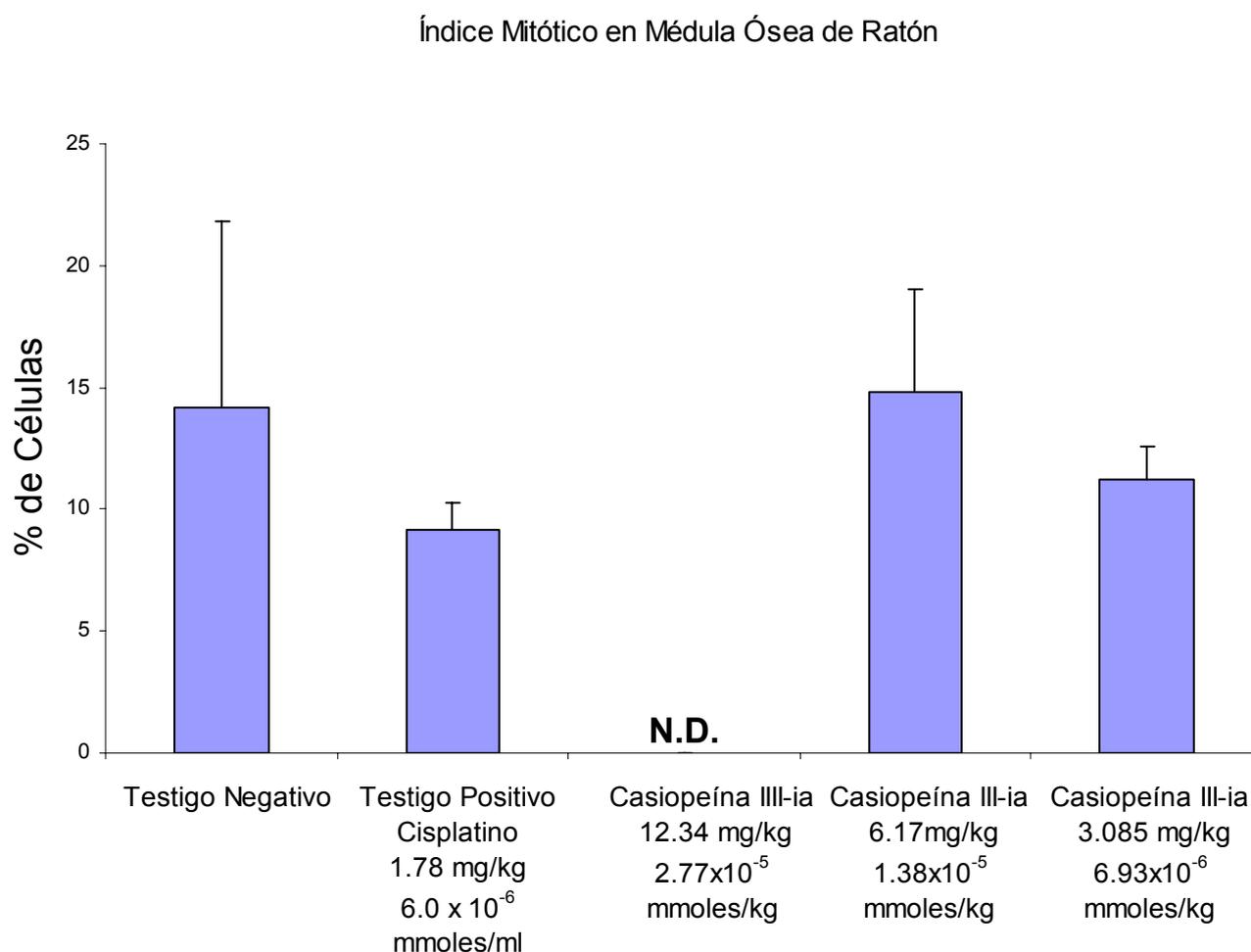


Figura 23.- Determinación del Índice Mitótico en médula ósea de ratón utilizando Casiopeína III-ia a diferentes dosis. * $p < 0.05$ Z para proporciones

Cinética de Proliferación Celular en Médula Ósea de Ratón

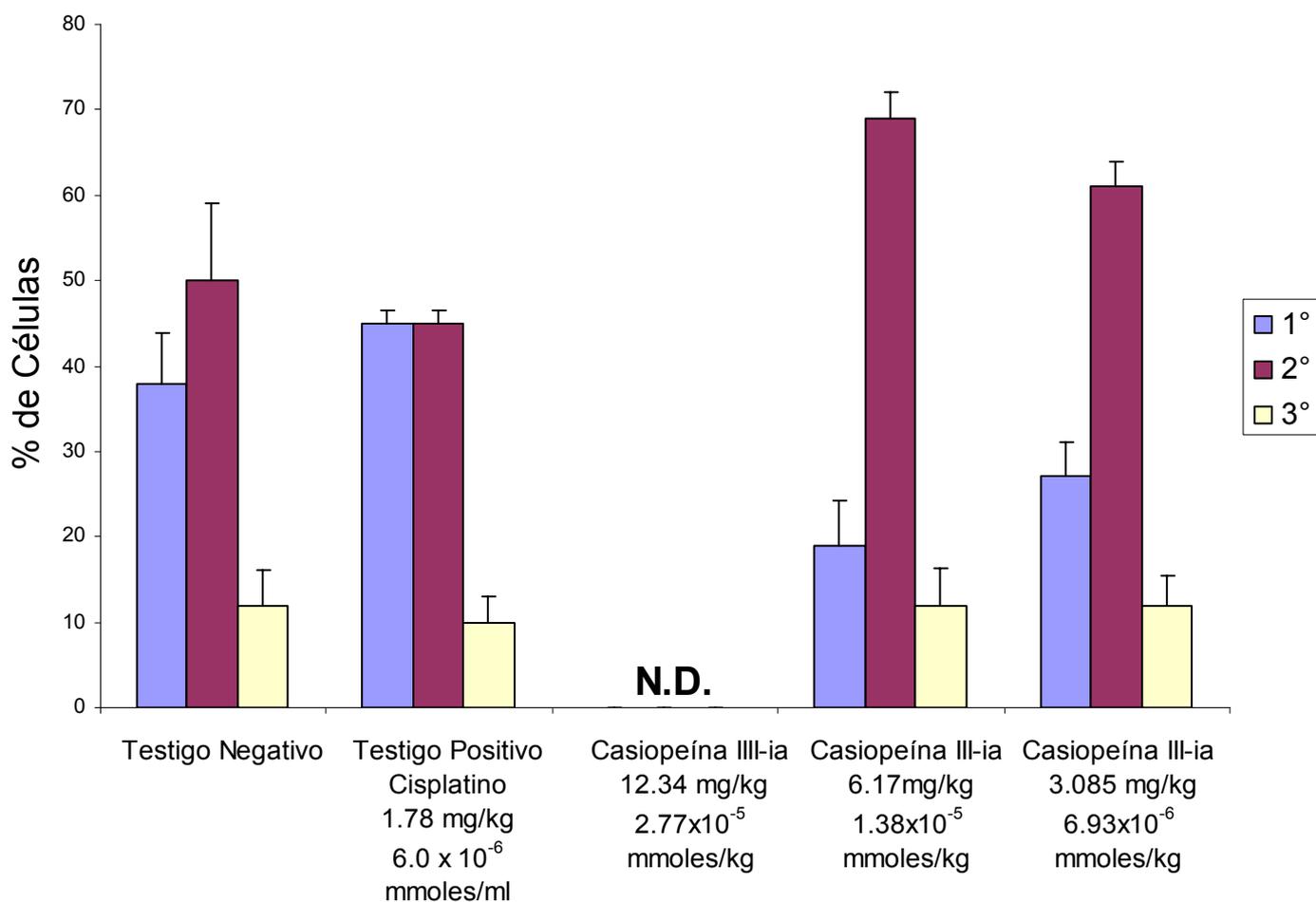


Figura 24.- Determinación de la Cinética de Proliferación Celular en médula ósea de ratón utilizando Casiopeína III-ia a diferentes dosis.

Tiempo Generacional Promedio en Médula Ósea de Ratón

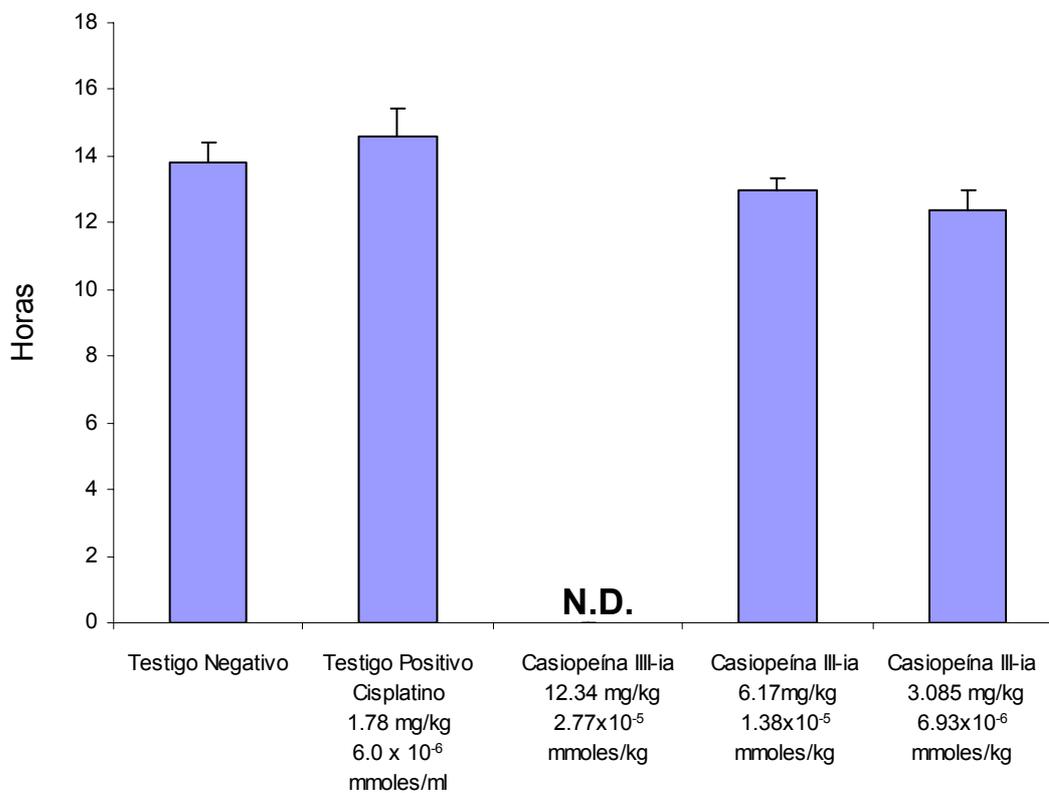


Figura 25.- Tiempo Generacional Promedio en médula ósea de ratón utilizando diferentes dosis de la Casiopeína III-ia.

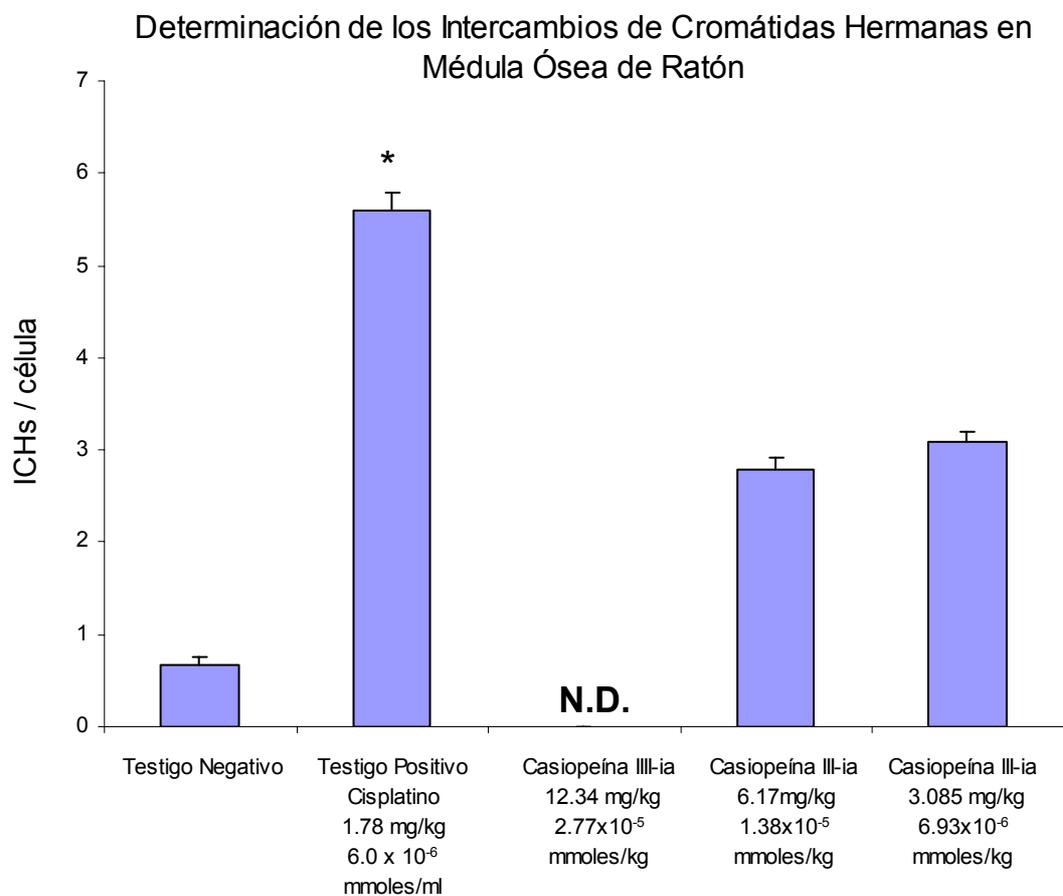


Figura 26.- Efecto de la Casiopeína III-ia sobre el Intercambio de Cromátidas Hermanas en médula ósea de ratón. * $p < 0.05$ "t" de Student

En la Tabla 16 se presentan en forma resumida los perfiles toxicológicos a nivel celular de cada Casiopeína dependiendo el sistema de prueba utilizado, en cada una de las Casiopeínas.

Tabla 16.- Perfiles Citotoxicológicos de las Casiopeínas Igli, IIgli y III-ia según su sistema de prueba.

	<i>In vitro</i> (Cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica)	<i>In vivo</i> (Médula ósea de ratón)
Casiopeína Igli	Citostática No citotóxica Genotóxica	Citostática Citotóxica* Genotóxica (ND)
Casiopeína IIgli	Citostática No citotóxica Genotóxico(ND)	Citostático* Citotóxico Genotóxico(ND)
Casiopeína III-ia	Citostática No citotóxica Genotóxico(ND)	Citotóxico Citostática Genotóxica*

* Efecto predominante.

ND → No determinado

CAPÍTULO

6

DISCUSIÓN

Y

CONCLUSIONES

6.- Discusión y Conclusiones

6.1.- Sistema *In vitro*

De los resultados obtenidos en los experimentos en el sistema *in vitro* se observa que los linfocitos humanos no son tan sensibles a las Casiopeínas como las células HeLa a dosis igual a la CI50 en estas últimas. Si se observa el IM no existe una diferencia significativa con respecto al testigo negativo, aunque si hay una tendencia a disminuir su valor. Esta diferencia de sensibilidad puede deberse a diferencias fisiológicas entre las células sanas y las transformadas, como por ejemplo, el potencial de membrana ya que ha sido ampliamente demostrado que la células neoplásicas facilitan la acumulación de solutos catiónicos lipofílicos menores a 1500 D, lo que activa la liberación del Citocromo C y la ejecución de la vía intrínseca de la apoptosis.⁷⁶ Los hallazgos anteriores nos hacen ser optimistas ya que la baja toxicidad de estos compuestos en células sanas es una de las características deseables en el desarrollo de un nuevo fármaco anticancerígeno e importante para la obtención de su registro ya que será más seguro su manejo y administración.^{77,78}

Las Casiopeínas mostraron ser citostáticas en este mismo sistema. Posiblemente este efecto puede ser resultado de una interacción dañina con moléculas esenciales que impiden y/o retrasan la entrada de la célula a un proceso de división. Dicho daño tendrá que ser reparado antes de empezar una nueva división. Esta hipótesis se ve apoyada en estudios previos que mostraron la capacidad de las Casiopeínas para producir ERO y con ello lipoperoxidación de membranas⁷⁹ y desacoplamiento en la cadena respiratoria.^{80,81}

Dentro de estos mismos estudios se debe hacer especial mención de los resultados obtenidos por Trejo (2005) en donde se menciona que al tratar células de glioma (C6) con Casiopeína IIgli *in vitro* a diferentes dosis con y sin la adición de N-acetilcisteína los resultados fueron: a) el ciclo celular es afectado de manera dosis dependiente de la Casiopeína IIgli, b) Las células tratadas con la Casiopeína IIgli son secuestradas en una fase inicial del ciclo celular (G_0/G_1) d) la generación de ERO dentro de la célula es uno de los posible mecanismos de acción de la Casiopeína IIgli lo cual se evidencia al

adicionar un atrapador de radicales libres como la N-acetilcisteína, con lo cual disminuye la muerte celular y el daño provocado al ciclo celular.⁸²

Con base en lo anterior y haciendo referencia a nuestros resultados, podemos afirmar que si el daño es persistente, las células no pueden entrar en un ciclo de replicación normal, con lo que el IM disminuye, el TGP aumenta y existe una marcada diferencia en la distribución de metafases.

Para el caso de la Casiopeína Igli se observa que aumenta de manera significativa el número de intercambios de cromátidas hermanas, indicando rompimientos de la doble hebra del ADN en síntesis y el cual fue reparado por una recombinación homóloga lo que dio lugar al intercambio.^{11, 12} No obstante se desconoce, con este ensayo, si la interacción con el ADN fue de la Casiopeína, de algún metabolito de ésta o de un producto de la reacción de generación de ERO.

Debido a sus propiedades citostáticas de las Casiopeína IIgli y III-ia no fue posible determinar los ICHs, sin embargo no se descarta la posibilidad de que se pueda dar una interacción con el ADN. Para poder determinar la genotoxicidad de las Casiopeína IIgli y III-ia se recomienda bajar la concentración utilizada, con la finalidad de que la capacidad citostática no sea tan grande y sea posible encontrar metafases en un segundo ciclo de replicación, estado necesario para la cuantificación de la ICHs.

En resumen las Casiopeínas en un sistema *in vitro* (linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo) presentan el siguiente perfil toxicológico:

- Citostáticas → siendo en orden decreciente la Casiopeína IIgli>Casiopeína Igli = Casiopeína III-ia.
- No citotóxicas a las condiciones en que se realizó este experimento.
- Sólo con la Casiopeína Igli se observó la capacidad genotóxica, sin embargo no se descarta la posibilidad que las otras dos lo sean a menores dosis, como se mencionó anteriormente.

6.2.- Sistema *in vivo*

En los experimentos con sangre periférica de ratón, las Casiopeínas, no inducen proliferación de los linfocitos de sangre periférica, es decir no son mitogénicas, lo que disminuye la posibilidad de tener efectos secundarios del sistema inmunitario, como respuestas alérgicas o de choque anafiláctico.²¹

Adicionalmente se observó que la Casiopeína Igli a 1/256 de su DL50 (0.05 mg/kg; $1.03 \cdot 10^{-7}$ mmol/kg), la Casiopeína IIgli a 1/2 de su DL50 (4.42 mg/kg; $9.95 \cdot 10^{-6}$ mmol/kg) y la Casiopeína III-ia a 1/2 de su DL50 (12.34 mg/kg; $2.77 \cdot 10^{-5}$ mmol/kg), tienen un efecto citotóxico similar. Esto es congruente con los resultados obtenidos por Bravo donde se observa en un estudio de Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR por sus siglas en inglés). En el que se señala que las Casiopeínas con un número mayor de anillos aromáticos presentarán una mayor toxicidad, por aumento en su lipofilidad. La presencia de anillos aromáticos en las diiminas de las Casiopeínas, producen un incremento en la capacidad de formar enlaces π , generando la posibilidad de una intercalación más fuerte con el ADN, además la presencia de los diferentes sustituyentes periféricos producen una variación en el potencial de media onda del cobre en las Casiopeínas confiriéndole la capacidad de participar en reacciones tipo Fenton-Haber Weiss y de generar radicales libres.⁸³

En relación a la Casiopeína Igli, se observa un perfil altamente citotóxico pues sólo a una dosis equivalente a 1/256 de su DL50 en ratón se pudieron evaluar los parámetros requeridos en este estudio; cabe mencionar que esta dosis es 35 veces menor a la utilizada con cisplatino (1/10 DL50 1.78mg/kg; $6.0 \cdot 10^{-6}$ mmol/ml), lo que nos puede llevar a plantear que el margen de seguridad terapéutico de la Casiopeína es mayor que el Cisplatino, pues la dosis letal y la dosis a la cual existe un efecto citotóxico están muy alejadas entre sí.

Con esto se puede decir que el perfil toxicológico a nivel celular *in vivo* de la Casiopeína Igli a la dosis de 0.05 mg/kg (1.03×10^{-7} mmoles/kg) es:

- Citotóxico y citostático, predominando el efecto citotóxico sobre el citostático a la dosis utilizada y
- Debido al poder citotóxico y citostático, no se pudo determinar la capacidad genotóxica a la dosis utilizada, sin embargo no se descarta la posibilidad que sea genotóxica a menores dosis.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los experimentos con la Casiopeína Igli sólo a la dosis equivalente a 1/2 de su DL50 (4.42 mg/kg; 9.95×10^{-6} mmol/kg) resultó ser citotóxica disminuyendo significativamente ($p < 0.05$) el Índice Mitótico, sin embargo a las dosis de 1/4 (2.21 mg/kg; 4.9×10^{-6}) y 1/8 (1.05 mg/kg; 2.48×10^{-6}) de su DL50 se abatió el IM, pero sin ser estadísticamente significativo, con esto se puede proponer que existe una tendencia inversamente proporcional a la dosis.

Al observar la CPC se ve que a todas la dosis arriba del 90% de las células se detienen en una primera división, esto puede deberse al daño que pueda generar la Casiopeína y el proceso posterior de reparación dentro de la célula como se mencionó anteriormente, esto se comprueba al calcular el TGP el cual se ve aumentado significativamente en todas las dosis ocupadas.

Con respecto a la genotoxicidad de esta Casiopeína no se pudo determinar los ICHs, debido a la alta capacidad citostática presentada, sin embargo no se descarta la posibilidad de que se tenga una interacción con el ADN, que pueda generar dicha genotoxicidad, recomendándose realizar ensayos a dosis menores para poder dilucidar si el efecto citostático enmascara al efecto genotóxico.

Con esto se puede decir que el perfil toxicológico a nivel celular *in vivo* de la Casiopeína Igli a las dosis utilizadas es:

- Citostático y Citotóxico, predominando el efecto citostático sobre el citotóxico a las dosis utilizadas y

- Debido al poder citotóxico y citostático, no se pudo determinar la capacidad genotóxica a la dosis utilizada, sin embargo no se descarta la posibilidad que sea genotóxica a menores dosis

Por otro lado la Casiopeína III-ia sólo a la dosis más alta (1/2 DL50; 12.34 mg/kg, $2.77 \cdot 10^{-5}$ mmol/kg) resultó ser citotóxica, matando a la célula por apoptosis comprobándose ésto por la técnica de TUNEL. A las dosis equivalentes de 1/4 y 1/8 de su DL50 no se encontró diferencia con respecto al control negativo de ninguno de los parámetros analizados (IM, CPC, TGP e ICH).

En un estudio realizado por Carvallo F. (2006)^{84,85} utilizando un sistema de xenotrasplante en ratón desnudo con el carcinoma de colon (HCT15), se probaron las mismas dosis de Casiopeína III-ia que en este estudio (1/4 y 1/8 de la DL50), observándose que a dichas dosis la pérdida de peso de los animales no es significativa, lo que es un indicio de su baja toxicidad, además se observó una marcada actividad anticancerosa sobre el carcinoma, aumentando el tiempo en el que el tumor tarda en doblar su tamaño. Estos resultados apoyan lo obtenido en este estudio ya que los parámetros relacionados con la citotoxicidad y la citostaticidad (IM, CPC y TGP) no se ven alterados, mostrando que la médula ósea de los ratones no es sensible en las condiciones del experimento, lo anterior sugiere la baja toxicidad que tiene este fármaco para la células sanas, lo cual es una excelente característica en cualquier fármaco y excepcional en fármacos anticancerosos

El único parámetro que se vio afectado, más no de forma significativa, son los ICHs, lo que demuestra una interacción con el ADN que provocó un daño susceptible de reparación. Se recomienda hacer un estudio en donde este parámetro sea determinado a las mismas concentraciones utilizadas pero a diferentes tiempos para poder observar si este daño disminuye conforme la Casiopeína es excretada del organismo.

En resumen se puede decir que el perfil toxicológico a nivel celular *in vivo* de la Casiopeína III-ia a las dosis utilizadas es:

- Citotóxica a dosis de 12.34 mg/kg y no citotóxico a dosis menores de 6.17 mg/kg.
- No Citostático a dosis menores de 6.17 mg/kg.
- Genotóxico a dosis menores de 6.17 mg/kg.

En páginas anteriores se ha analizado cada Casiopeína por separado y en cada uno de los sistemas de prueba (*in vitro* e *in vivo*) dando información importante del perfil citotoxicológico en cada uno de ellos, sin embargo, si se observa con cuidado estos perfiles (*in vitro* e *in vivo*) para cada Casiopeína, se observa que son diferentes en cada sistema.

La diferencia en el comportamiento entre el sistema *in vitro* e *in vivo*, sólo puede deberse a la capacidad biotransformante del sistema ADME en el sistema *in vivo*, un fármaco que podemos citar como ejemplo de la necesidad de activación metabólica para la producción de efecto citotóxico y genotóxico es la ciclofosfamida.^{13,62} Vale la pena señalar que esta misma Casiopeína ha mostrado diferencias en su capacidad antiproliferativa *in vitro* sobre líneas celulares al ser evaluada en presencia y ausencia de activación metabólica, siendo activa en ausencia de esta pero incrementando su actividad al agregar la fracción microsomal, lo que nos lleva a proponer que la Casiopeína una vez metabolizada es transformada en una molécula con mayor actividad.⁴⁴

En este estudio un hallazgo importante es que la cantidad de Casiopeína administrada, en el sistema *in vivo* es menor que en el sistema *in vitro* aproximadamente en 2 ó 3 órdenes de magnitud, no obstante se produce un daño mayor en el sistema *in vivo* a pesar de tener una menor cantidad de fármaco, esto puede deberse a que el sistema ADME potencializa la acción citotóxica, citostática o genotóxica del fármaco⁸⁶ lo que comprueba la hipótesis propuesta y con lo mencionado anteriormente.

Por otro lado al observar los resultados obtenidos en esta tesis y estudios previos^{37-41,44,66,80} se observa que el comportamiento de las Casiopeínas es diferente entre ellas, lo que nos hace pensar que probablemente tengan mecanismos de acción diferentes.

Un dato importante que se debe de resaltar, es el hecho de que todas las dosis utilizadas de las Casiopeínas en los experimentos *in vivo* se encuentran de 2 a 4 órdenes de magnitud por debajo de la dosis utilizada de cisplatino. En los casos de las Casiopeínas Igli y IIgli a pesar de que la dosis es menor se produce un daño citotóxico y citostático parecido e inclusive mayor que el cisplatino. Sin embargo este efecto se realizaría tanto en células cancerosas como en células sanas (médula ósea), este último efecto traería consecuencias importantes, como lo puede ser una inmunosupresión. Sin embargo este no debe de verse como un aspecto negativo de estos fármacos, pues se sabe que los compuestos anticancerosos tienen este tipo de comportamiento. Probablemente este efecto de las Casiopeínas sobre la médula ósea es dependiente del tiempo, por lo que se recomienda realizar otros experimentos a diferentes concentraciones y tiempos para observar si existe un cambio conforme son excretadas del organismo, como se mencionó anteriormente.

En el caso de la Casiopeína III-ia los resultados son más prometedores pues como se mencionó anteriormente a la misma dosis utilizada en este estudio, se observa una marcada actividad anticancerosa, sin repercutir en el tejido sano. Sin embargo se encuentra que esta Casiopeína tiene una actividad genotóxica, por lo que se recomienda seguir realizando estudios en toxicología genética, para conocer de una mejor manera la repercusión que pueda tener en los individuos expuestos.

CAPÍTULO

7

BIBLIOGRAFÍA

7.-Bibliografía

- [1] Macdonald F., Ford C.H.J. , Casson A.G. Molecular Biology of Cancer. Advanced Text. Ed. BIOS Scientific Publishers, (2004).
- [2] SSA. Compendio de Cáncer 2000, Mortalidad y Morbilidad.
- [3] Goodman and Gilman, *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 9ª Edición. Edit. MacGrawill Interamericana, (1995).
- [4] Ruiz-Azuara L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complex from phenylatephenantroline to be used as anticancerigenic agent. U.S. Patent. April 21 (1992) Number 5, 107,005. U.S. Patent Re35, 458, Feb. 18 (1997).
- [5] Ruiz-Azuara L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complex from phenylatephenantroline to be used as anticancerigenic agent. U.S. Patent. Pat. No. 5,576,326. Noviembre 19 (1996).
- [6] ® Marca Registrada: CASIOPEINA. Reg. 407543 SECOFI (1992).
- [7] Gracia-Mora I., Ruiz-Ramirez L., Gómez-Ruiz C., Tinoco-Méndez M., *et al.* Knigth's Move in the Periodic Table, from Platinum to Copper. New Anticancer Compounds, Casiopeinas, *In vitro* evaluation. *Metal Based Drugs*. 8, (1) 19-28. (2001).
- [8] Moutschen J. Introduction to Genetic Toxicology. John Wiley and Sons, NY. (1985).
- [9] Nilüfer A. *et al.* *In vitro* genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes. *Mutation Research* 582, 35-41, (2005).
- [10] Formato de Registro de un Medicamento según la NOM-069 SSA. 2000.
- [11] Prestayho A.W., Croque S.T. Cisplatin: Current Status and New Deveolpments. Academic Press.(1980.)
- [12] Hernández-Esquivel L., Marín-Hernández A., Pavón N., Carvajal K. and Moreno-Sánchez R., Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212, (1), 79-88, (2006).
- [13] Reimer D., Shingh S., *Cyclophosphamide-induced in vivo sister chromatid exchanges (SCE) in Mus Musculus. III Quantitative Genetic Analysis.* Genetics 105; 169-179 September (1983).

- [14] Kram D., Schneider E., Senula G. and Nakanishi Y. *Spontaneous and mitomy-C induced sister-chromatid exchanges. Comparisons of in vivo and in vitro systems.* Mutation Research. 60(3); 339-347, (1979).
- [15] OPPTS 870.5900 *In Vitro* Sister Chromatid Exchange Assay.
- [16] Ríos Hernández-M., Hernández Menéndez-M. Los genes supresores de tumores y el cáncer. Rev. Cubana de Oncología, 17(1), 65-71, (2001).
- [17] Jiménez Luis F., Merchant H., *Biología Celular y Molecular* 1º Edición, 663-664, Edit. Prentice Hall.(2003)
- [18] Lodish H. Berk A. *et al. Biología Celular y Molecular* 4º Edición 2002, 1054-1055, Edit. Médica Panamericana.(2002)
- [19] Cancer Biology Review, December 4, (2003).
- [20] Clark, Brater y Johnson. *Goth Farmacología Clínica.* 12º Edición. Edit. Panamericana. (1990)
- [21] Rojas-Espinosa. *Inmunología (de memoria),* 2º edición. Edit Médica Panamericana. (2000)
- [22] Weinberg R.A. How cancer arise. *Scientific American* Sept., 32-40, (1996).
- [23] De Vita V., Hellman S. Rosenberg S. *Cancer: Principles and practice of oncology.* Edit J.B. Lippincott company. (1995)
- [24] Bruce N. William E. Edith Y. Frank L. Carcinogens are mutagens: A simple Test System Combinig Liver Homogenates for Activation ans Bacteria for Detection. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 (8), 2281-2285. (1973)
- [25] Luna R. *Estructura Funcional del Registro Histopatológico de Neoplasias en México.* Dirección General de Epidemiología. (1997).
- [26] Boyd J.D. Review report, progress in new drug developmente. *Cancer letters.* 15(1), (1989).
- [27] Powis G. Hacker M.P. *The toxicity of anticancer drugs.* Pergamon Press, USA. (1991).
- [28] Harrison. *Principios de Medicina Interna.* 13º Edición, Edit. MacGrawill Interamericana., (1994).
- [29] Rosenberg B. *et al.* Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis from platinum electrode products. *Nature* 205m 698-699, (1965).
- [30] Wong E. Giandomenico C.M. Current status of platinum.based antitumor drugs. *ChemicacI Reviews.* 99, 2451-2466, (1999).

- [31] Schwietert Ch. W., McCue J.P. Coordination compounds on medicinal chemistry. *Coordination Chemistry Reviews* 184, 67-89, (1999).
- [32] H. Sigel, A, Sigel. Metal Ions in Biological Systems. Edit. Marcell Dekker. (1998).
- [33] Kosmider *et al.* Evaluation of genotoxicity of *cis*-bis(3aminoflavone)dichloroplatinum(II) in comparison with *cis*-DDP. *Mutation research* 558, 93-110, (2004).
- [34] Farrell N. Transition Metal Complex as Drug and Chemotherapeutic Agents. Kluwer Academic Publishers. London.(1990).
- [35] Ruiz-Ramirez L., Gracia I., Moreno R., Gasque L., Díaz D., Huerta L. The antitumor activity of several transition metal complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 615 (43) 1-2, (1991).
- [36] Gasque L., Moreno R., Ruiz-Ramirez L. Stability of ternary Coppers and Nickel Complexes with 1,10-phenanthroline *Journal of Inorganic Biochemistry* 48(2) 121, (1992).
- [37] Ruiz-Ramírez L, De la Rosa M. E., Gracia-Mora I., Mendoza A., Pérez G., Ferrer-Sueta G., Tovar A., Breña M, Gutierrez P, Cruces Martínez M. P. *et al.* Casiopeinas, metal-based drugs a new class of antineoplastic and genotoxic compounds *Journal of Inorganic Biochemistry*, 59, (2-3), 207 August, (1995).
- [38] Bravo Gómez M. E. *Evaluación antineoplásica de compuestos de Coordinación de Cobre en modelo tumoral murino*. Tesis de Licenciatura. UNAM (1997).
- [39] De Vizcaya A., Rivero A. Ruiz-Ramirez L. Kass G. Kelland R. Dobrota M. L1210 and CH1 cells treated with novel coppers-based anticancer compound Casiopeína II die by apoptosis. *Anticancer Research*. 18,48-53, (1998).
- [40] De Vizcaya A., Rivero A., Ruiz-Ramirez L., Howarth J., Dobrota M. Hematotoxicity response in rats by novel copper-based anticancer agent: Casiopeína II. *Toxicology* 194, 103-113, (2003).
- [41] De Vizcaya A., Rivero A. Ruiz L. Kass G. Kelland R. Dobrota M. Induction of Apoptosis by Novel Copper-based Anticancer Compound, Casiopeina II, in L1219 murine leukemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells. *Toxicology in vitro*. 14, 1-5, (2000).

- [42] Rivero A. Plant N. Ruiz L. De Vizcaya A. Dobrota M. Degradation on DNA by the copper-based anticancer agent Casiopeina II. *Human and Experimental Toxicology*. 17, 531, (1998).
- [43] Luza S., Speisky H. Liver copper storage and transport curing development: implication for citotoxicity. *Americna Journal of Clinical Nutrition*. 53, 812S-820S, (1996).
- [44] Barrón L. *Influencia del Metabolismo en la actividad antiproliferativa y apoptótica del quelato mixto de cobre Casiopeína III-ia en tres líneas tumorales y linfocitos humanos*. Tesis de Licenciatura, UNAM (2006).
- [45] Avendaño C. Introducción a la Química Farmacéutica. 2º Edición. McGraw-Hill Interamericana. (2001).
- [46] Glenn I., Gandolfi A. Biotransformation of drugs. General Principles of Toxicology. Chapter 4. Lewis Publishers. (1994).
- [47] Orellana M., Guajardo V. Biotransformación de fármacos y sus implicaciones tóxicas. *Revevista Médica de Chile*, 132,85-94, (2004)
- [48] Guengerich P. Shimada T. Activation of procarcinogenes by human cytochrome P450 enzymes. *Mutation Research* 400, 201-213, (1998).
- [49] Silverman R. The organic Chemistry of Drug Design and Drug Action. Chapter 8. Academic Press, (1992).
- [50] Velik J. Baliharová V. Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. *Research in veterinary Science* 76, 95-108, (2004)
- [51] Boyland E. Levi A. Metabolism of polycyclic compounds: production of dihydroxydihydroanthracene from anthracene. *Journal of Biochemistry* 29, 2679-2683, (1985)
- [52] Ames B., Durston W. Carcinogens are Mutagens: A simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 (8), 2281-2285, (1973).
- [53] Gabrielsson J., Weiner D. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications. Swedish Pharmaceutical Press. (1994).
- [54] Wrighton S. Stevens J.C. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Clinical Reviews in Toxicology* 22, 1-21, (1992).
- [55] Commandeur J. Stijntjes G. Enzymes and transport systems involved in formation and disposition of the glutathione S-Conjugates: role in bioactivation and

- detoxification mechanism of xenobiotics. *Pharmacology Reviews* 47, 271-330, (1995).
- [56] Ingelman-Sundberg M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207, S52-S56, (2005).
- [57] Nelson, D. Kamataki, T, Waxman, D. *et al.* The P450 superfamily :update on new sequences, gene mapping, accession number, earle trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biology*. 12, 1-51, (1993).
- [58] Nelson, D.R., Zeldin, D.C., Hoffman, S.M., Maltais, L.J., Wain, W.H., Nebert, D.W. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*. 14, 1– 18. (2004).
- [59] Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M., McLellan, R.A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends in Pharmacology Science* 20, 342– 349. (1999).
- [60] Raucy J., Ingelman-Sundberg M. Drug Metabolizing Enzymes in Lymphocytes. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*. 13. 3/4, 223-226. (1999).
- [61] Autrup H. Genetic Polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as suscepyibility factors in toxic response. *Mutation Research* 464, 65-76, (2000).
- [62] Krishna G. Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assy: protocol, conducto and data interpretation. *Mutation Research* 455, 155-166, (2000).
- [63] Hoffman G.R. Genetic Toxicology. General Principles of Toxicology. Chapter 6. pag. 201- 223, (1990).
- [64] Nakayama A., Koyoshi S. Morisawa S., Yagi Takashi. Comparison of the mutation induced by *p*-benzoquinone a benzene metabolite, in human and mouse cells. *Mutation Research*. 470, 147-15, (2000).
- [65] Kligerman A. *et al.* Comparison of cytogenetic effects of 3,4-epoxy-1-butene and 1,2:3,4-diepoxybutane in mouse, rat and human lymphocytes following in vitro G₀ exposures. *Mutation Research*. 439, 13-23, (1999).
- [66] Watt J., Stephen G. Lymphocyte Culture for Chromosom Analysis. Chapter 2. Prentice Hall. (1986).

- [67] Madrigal E. Velázquez N., Díaz S. Inhibitory effect of chlorophyllin on the frequency of sister chromatid exchanges produced by benzo[a]pyrene in vivo. *Mutation research*. 388, 79-83, (1997).
- [68] Norpa H., Bonassi S., *et al.* Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutation research* 600, 37-45, (2006).
- [69] Helleday T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research* 532, 103-115, (2003).
- [70] Tucker J., Preston R. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mutation research* 365, 147-159, (1996).
- [71] OPPTS 870.5915 *In Vivo* Sister Chromatid Exchange Assay
- [72] Tucker J. Auletta A., Cimino M., Sister chromatid exchange: second report of the gen-tox program, *Mutation Research* 297, 101-180, (1993).
- [73] Perry P., Thomson E. The methodology of sister chromatid exchanges. *Handbook of Mutagenicity test procedures*. 2^oed. Elsevier Science Publisher. (1989).
- [74] Ostrosky P. El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico. *Gaceta medica de México* 130(6), 432-437, (1994).
- [75] Weidner S., Erdtmann B. *Mutation Research* 471, 21-27, (2000).
- [76] Fantin VR, Berardi MJ, Scorrano L, Kormeyer SJ, Leder P. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer Cell* 2:29-42, (2002).
- [77] Ronald D., John W. Greenb A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals *Mutation Research* 488, 151-169, (2001).
- [78] Sharbel Wiedner M, Bernardo E. *Mutation Research* 471; 21-27, (2000).
- [79] Trejo Solis C. *et al.* Casiopeína IIgI induce apoptosis sobre células de glioma C6 de Rata in vitro e in vivo a través de un mecanismo dependiente e independiente de caspasas. *Ier Congreso Nacional de Química Médica (memorias), Oaxaca, México* (2004).
- [80] Rodríguez-Enríquez S., Vital-González P., Flores-Rodríguez F., Marín-Hernández A., Ruiz-Azuara L. and Moreno-Sánchez R. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, In Press, Corrected Proof, Available online 31 March (2006).

- [81] Alemon Medina R. *Inducción de daño oxidativo por antineoplásicos de tipo quelatos de cobre*” Tesis para obtener grado de Maestría en Ciencias Quimiobológicas, Mexico DF. IPN, (2003).
- [82] Trejo Solís C. *et al.* Cas IIgly induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Neoplasia*, 7 (6) June, 563-574. (2005)
- [83] Bravo Gómez M. *Estudio QSAR de complejos de coordinación de cobre (Casiopéinas) del tipo [Cu(N-N)(acetilacetato)]NO₃ empleando varias líneas tumorales humanas.* 1er Congreso Nacional de Química Médica (memorias), Oaxaca, México (2004.)
- [84] Carvallo F. *Cas III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antiproliferative effect in vivo.* Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. UNAM En proceso.
- [85] Carvallo F., Macias L. *et al.* *Evaluación Preclínica de las Casiopéinas III-ia, IIgly, 5,6dm(acac) en tumores de colon xenotransplantados al ratón desnudo.* 1er Congreso Nacional de Química Médica (memorias), Oaxaca, México (2004).
- [86] Bergman K., Müller L. Weberg T. S. *Mutation Research* 349; 263-288, (1996).