



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"**

## CARRERA DE BIOLOGO

"Estudio del efecto genotóxico inducido *in vivo*  
por la Casiopeína II-gly y por la Casiopeína III-ia".

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:  
JOSÉ RAÚL CERMEÑO GARCÍA

Director de tesis.

Dr. Juan José Rodríguez Mercado



Septiembre de 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Tesis dirigida por el Dr. Juan José Rodríguez Mercado, en el Laboratorio de Toxicología Reproductiva y Teratogénesis (L-5 PA) de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) a cargo del Dr. Mario A. Altamirano Lozano. La UNIGEN es parte de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo de PAPIIT IN236303

## DEDICATORIA

### **A mis padres:**

María Elena García Flores y José Carmen Cermeño Herrera, con todo cariño para las dos personas que más admiro, quiero, amo y respeto en este mundo gracias por todo su apoyo incondicional y su confianza en mí en todo momento.

### **A mi hermano:**

Rubén Cermeño García, por toda una vida que hemos compartido y sido cómplices de tantos y tantos sueños, gracias por tu apoyo.

### **A Laura:**

Gracias por amarme tanto, por motivarme, quererme, escucharme, apoyarme y siempre creer en mí, te AMO.

Al Sr. Emilio Carmona Flores, a la Sra. Laura Edith Figueroa Butron, a Edith Montserrat Carmona Figueroa por las atenciones hacia mi persona.

### **A mis hermanos:**

José Juan Gómez Domínguez, Gonzalo Cermeño Martínez y Víctor Hugo Meré Hernández, siempre los llevo en mi mente y en mi corazón.

### **Tíos:**

Ermelinda García Flores y Salvador Ramírez, María Ascensión Martínez Chávez, Carlos Cermeño Herrera y Martha Rjo Frío.

### **Padrinos:**

Silvia Ramírez y Alejandro Figueroa, con mucho cariño.

### **Primos:**

Ma. Angélica, José Juan, Mario, y Adriana Cermeño Martínez, Leticia Chaparro Salazar, Leonor García Jacinto, a Noret, Eric, Miriam, Francisco y Fabiola Neria García, a Ortencia Ramírez García, a Araceli, Juan Carlos y Erika Cermeño Rjo Frío y a **todos mis sobrinos** en especial a Jesús Hazael Gómez Cermeño.

### **A mis amigos:**

Mercedes González García, gracias por todo.

Rogelio Vidales Pérez, Gabriel Estrella Camacho, Marco Antonio Aguilar Segundo, Marco Antonio García Álvarez, , Hugo Jesús Sierra Jiménez, Alejandro Castañeda Peralta, Fernando Chávez Ramírez, Cinthya Leticia Fragoso González, Guadalupe Flores Sosa, Martha Nancy González Castellanos, Alma Iris Gallegos Vázquez, Ana Victoria González Fernández, Manuel Ahumada Ferreiro, Gustavo Bonilla Alcántara, Carlos García González, Víctor Dionisio Mendiola Jiménez, gracias por su amistad.

### **En memoria de quienes ya no están en este mundo.**

Primos: José de Jesús y Cirilo Cermeño Martínez.

Tíos: Eustacio y Hortencia García Flores, Francisco Gabriel Neria Pardave, Gonzalo y Antonio Cermeño Herrera.

Para mis **Abuelos:** Cirilo Cermeño Pérez y Ma. Gpe. de Jesús Herrera Flores, José Refugio García Trejo y Eloisa Flores Sánchez.

Espero que tengamos muchos momentos como éste.

## *AGRADECIMIENTOS*

*Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado por su apoyo y todas sus enseñanzas, que me han permitido lograr una meta más en mi vida. Por sus sugerencias y el tiempo invertido en este trabajo.*

*Al Dr. Mario A. Altamirano Lozano por darme la oportunidad de ser parte del laboratorio.*

*Al Biólogo Carlos Zúñiga por su tiempo y apoyo invaluable.*

*A los miembros del jurado:*

*Dra. Elia Roldán Reyes*

*M en C. Rosalva Rangel Corona*

*Dra. Ma. de Lourdes Mora García*

*Por sus comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo.*

## **INDICE**

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>3. MARCO TEORICO</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Quimioterapia</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Complejos metálicos usados en quimioterapia</b>	<b>7</b>
<b>3.3 Cobre</b>	<b>10</b>
<b>3.4 Casiopeínas</b>	<b>10</b>
<b>3.5 Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia</b>	<b>10</b>
<b>3.6 Electroforesis unicelular en gel</b>	<b>14</b>
<b>3.7 El ratón como modelo biológico</b>	<b>16</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>18</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>20</b>
<b>6.1 Objetivos particulares</b>	<b>20</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<b>7.1 Animales y tratamiento</b>	<b>21</b>
<b>7.2 Aislamiento de órganos y tejidos</b>	<b>21</b>
<b>7.3 Viabilidad</b>	<b>22</b>
<b>7.4 Ensayo cometa</b>	<b>22</b>
<b>7.5 Análisis estadístico</b>	<b>23</b>
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>40</b>
<b>12. ANEXO</b>	<b>47</b>

## ABREVIATURAS.

AC; aberraciones cromosómicas

ADN; ácido desoxirribonucleico

Ag; plata

Au; oro

Br-et; bromuro de etidio

°C; grado centígrado

CFDA; el 5-6 diacetato de  
carboxifluoresceína

CG; células grandes

Cgt; células grandes de testículo

CP; células pequeñas

Cpt; células pequeñas de testículo

Cu; cobre

DE; desviación estándar

DMSO; dimetilsulfoxido

E.E; error estándar

EDTA-Na<sub>2</sub>; etilendiamintetracetato de  
sodio

EUG; electroforesis unicelular en gel.

Fe; hierro

Ga; galio

ICH; intercambio de cromátidas hermanas

im; intramuscular

ip; intraperitoneal

iv; intravenosa

LD<sub>50</sub>; dosis letal aguda cincuenta por  
ciento

mg; miligramo

ml; mililitro

mM; milimolar

MN; micronúcleo

NaCl; cloruro de sodio

NaOH; hidróxido de sodio

nd; no determinado

PBS; solución amortiguadora de fosfatos

Pt; platino

R; ratón

Ru; rutenio

sc; subcutánea

Tris; base trizma

µl; microlitro

## 1. RESUMEN

El cáncer se inicia cuando una célula escapa del control normal de división y comienza a proliferar de modo incontrolado. Para combatir éste padecimiento se utilizan tratamientos como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, entre otros. Dentro de las nuevas alternativas en quimioterapia se encuentran las Casiopeínas, que son una familia de compuestos de coordinación con centro metálico de cobre con actividad antineoplásica.

Entre estos compuestos se encuentra la Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia, que son los más eficientes para inhibir la proliferación y la división celular, sin embargo, es necesario realizar estudios que ayuden a comprender de que manera estos compuestos ejercen su actividad antiproliferativa. Por lo anterior, en este estudio se decidió evaluar el efecto genotóxico en diferentes órganos de ratones machos de la cepa CD-1, expuestos durante 3, 6, 12 y 24 horas a  $\frac{1}{2}$  de la dosis letal media para ratón, que corresponde a 4.4 mg/kg para la Casiopeína II-gly y 7.3 mg/kg para la Casiopeína III-ia.

Al terminar el tiempo de exposición los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y las células de los órganos sólidos se obtuvieron por procesos mecánicos, al mismo tiempo, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca. Se cuantificó la viabilidad celular con dos colorantes fluorocromados y se estimó el daño al ADN mediante la prueba de electroforesis unicelular en gel (EUG) en medio alcalino.

El análisis de viabilidad mostró que la Casiopeína II-gly es capaz de disminuir estadísticamente este parámetro en las células de sangre, corazón, hígado y bazo durante 12 horas y en el tratamiento de 24 horas en corazón, hígado, bazo y testículo. En tanto que con la Casiopeína III-ia este comportamiento se noto a las 12 horas en las células de bazo y a las 24 horas en bazo y riñón.

Cuando se evaluó la EUG, se observó que la Casiopeína II-gly incremento la longitud total del cometa a partir de 3 horas de tratamiento en las células de sangre, corazón, hígado, bazo, riñón y células pequeñas de testículo y en células grandes de testículo a partir de 6 horas, en el caso de la Casiopeína III-ia se observó a partir de 3 horas en los mismos órganos excepto en bazo y células grandes de testículo que lo hacen a partir de 12 horas, efecto que sigue un comportamiento dependiente del tiempo.



Los resultados obtenidos muestran que ambos compuestos cuando se aplican en modelos *in vivo* disminuyen la viabilidad celular a partir de 12 horas de exposición e inducen daño al ADN en tratamientos de 3 horas con un comportamiento dependiente del tiempo. Además, se observó que las células de riñón e hígado son más susceptibles a la inducción de daño y que la Casiopeína II-gly produce efectos genotóxico y citotóxico más acentuados que la Casiopeína III-ia.

## **2. INTRODUCCIÓN**

El término cáncer se aplica a la entidad patológica que se caracteriza por el crecimiento anormal de las células del organismo. El cáncer no existe como enfermedad única, hay más de 100 formas distintas con comportamiento biológico y manifestaciones clínicas diferentes (González, *et al.*, 2001).

El cáncer se inicia cuando una célula escapa del control normal de la división y a la muerte, y comienza a proliferar de modo incontrolado. Este crecimiento desmedido puede dar lugar a la formación de una masa de células denominada tumor. Mientras las células tumorales quedan restringidas a una masa única, se dice que el tumor es benigno. Un tumor benigno puede proseguir su crecimiento sin invadir el tejido circundante; puede también detener su crecimiento o reducirse. Una característica clave de las células cancerosas es que, a diferencia de las células normales, tienen la capacidad de migrar, invadir nuevos tejidos y establecer nuevas colonias, a este proceso se llama metástasis. Un tumor que adquiere esta capacidad se denomina maligno y frecuentemente conduce a la muerte del individuo. La capacidad de proliferar en forma descontrolada está relacionada con la acumulación de ciertos cambios bioquímicos, genéticos y morfológicos en la célula. El cáncer es el resultado de una serie de modificaciones en el material genético, que trae como consecuencia la alteración del comportamiento normal de la célula (Curtis *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2003).

## **3. MARCO TEÓRICO**

El cáncer es conocido desde la antigüedad y cobró gran importancia a lo largo del siglo XX por la magnitud de cifras de mortalidad que ocasiono (Senra, 2002).

El cáncer se desarrolla como resultado de una serie de factores exógenos y endógenos. Dentro de los factores exógenos tenemos a los agentes químicos (más del 90 % de los casos), los agentes físicos y los agentes biológicos. Hay factores endógenos muy importantes en el desarrollo de una enfermedad cancerosa como, el factor hereditario y el factor inmunitario (Senra, 2002).

En la actualidad el cáncer constituye un problema de salud pública. Ocupa el segundo lugar como causa de mortandad en la mayoría de los países en vías de desarrollo,

aproximadamente 50% de los individuos con este diagnóstico fallecen. Es considerada la enfermedad más frecuente de este siglo XXI (González *et al.*, 2001).

En el año 2004, los tumores malignos fueron la segunda causa de muerte en México, 61 248 personas fallecieron, que en porcentaje constituyen el 12.9% del total de las defunciones registradas. Las defunciones por tumores malignos representaron el 11.4% del total de fallecimientos en los varones y el 14.9% en las mujeres, que representa la segunda y la tercer causa de muerte respectivamente ([www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)).

Para tratar el cáncer se utilizan con mayor efectividad cuatro tratamientos; la cirugía, la radioterapia, la terapia hormonal y la quimioterapia. En la mayoría de los casos se utilizan tratamientos en los que se combinan dos o más de estas alternativas (Carswell, 2002). La inmunoterapia y la fototerapia (esta en fase experimental) pueden llegar a ser tratamientos opcionales contra este padecimiento (Senra, 2002).

### **3.1 Quimioterapia**

La quimioterapia es el tratamiento más utilizado en la actualidad. En esta terapia se usan fármacos que eliminan las células con crecimiento descontrolado y rápido, como en el caso de las células malignas (Carswell, 2002).

Hace 500 años ya existía el concepto del tratamiento del cáncer con drogas, se sabe que con este propósito se empleaban preparaciones de plata (Ag), zinc (Zn) y mercurio (Hg), sin embargo, el uso de drogas en un tratamiento sistemático en neoplasias malignas no se documentó sino hasta 1865 cuando se administraba arseniato de potasio a pacientes con leucemias en los cuales se observaron efectos positivos; y pese a estos antecedentes, la quimioterapia como tratamiento se sistematizó hasta 80 años después (Ruiz *et al.*, 1994).

Hoy en día la quimioterapia ha alcanzado avances sorprendentes por la aparición de fármacos de alta potencia terapéutica, como el taxol, carboplatino, vinorelbina, gencitabina, entre otros, y sobre todo, por las nuevas combinaciones y estrategias que han permitido resultados excelentes en tumores antes invulnerables como el cáncer de pulmón. La quimioterapia es muy útil en el tratamiento de las leucemias, linfomas, tumores del testículo, coriocarcinomas, en terapia adyuvante complementaria del tratamiento quirúrgico del cáncer

de mama y de colon. También se ha empleado antes de la cirugía para reducir el tamaño del tumor y facilitar la operabilidad, lo que se conoce como quimioterapia neoadyuvante (Senra, 2002).

La combinación de fármacos es más eficaz que la utilización de agentes únicos debido a que abarcan un espectro más amplio de resistencia celular existente en una población. La selección de los medicamentos que se deben combinar en un tratamiento se basa en, que individualmente muestren actividad contra el tumor, eviten el incremento de efectos tóxicos y eviten retrasos terapéuticos que faciliten el desarrollo de resistencia (Ruano y Calderón, 2001).

Existen factores farmacológicos que pueden influir en la respuesta a estos fármacos como son; la vía de administración, la farmacocinética y la farmacodinámica del compuesto, la biotransformación, la excreción, la interacción con otros medicamentos, la resistencia celular neoplásica y la toxicidad (Ruano y Calderón, 2001).

Desde el punto de vista farmacológico, estos agentes se pueden subdividir en cinco grupos; fármacos no específicos del ciclo (alquilantes) y agentes específicos del ciclo (alcaloides, antibióticos, antimetabolitos) y diversos (antineoplásicos que no encajan claramente en ninguna de las categorías anteriores como: dacarbacina, nitrosoureas, hidroxiurea, hexametilmelamina, cis-diaminodicloroplatino, carboplatino, entre otros) (Di Saia y Creasman, 2002). Dentro del grupo de los agentes alquilantes se considera un tipo de compuestos que parecen actuar como agentes alquilantes pero que marcan una serie diferente de sustancias antineoplásicas: los complejos metálicos, dentro de los cuales destaca el *cis*-diamino-dicloro-platino (II),  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})_2]$ , conocido como cisplatino (Lezama *et al.*, 1996).

Es importante describir la forma en que los alquilantes actúan ya que las Casiopeínas por su diseño químico pueden actuar de manera similar, estos compuestos representan un grupo grande de fármacos de gran utilidad clínica. El término alquilación se refiere a la unión del grupo alquilo a alguna biomolécula como las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos, su acción más importante es la de afectar la integridad y función del ácido desoxirribonucleico (ADN). A este grupo pertenecen las mostazas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida,

ifosfamida, melfatan, clorambucil), las nitrosoureas (lomustina, carmustina), el busulfan, el cisplatino y sus análogos (Ruano y Calderón, 2001).

Estos medicamentos son administrados en el organismo a través de diferentes vías; pueden ser administrados de manera intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o por vía oral (Carswell, 2002). De ahí viajan por todo el cuerpo, destruyendo las células malignas desprendidas de un tumor, que pudieran empezar a desarrollarse en otros sitios, sin embargo, estos fármacos no pueden diferenciar entre células de crecimiento rápido malignas y benignas, por lo que provocan efectos secundarios indeseados. Los efectos colaterales pueden ser muy variados y no debe generalizarse, ya que los medicamentos son distintos y las reacciones diferentes de una persona a otra (Di Saia y Creasman, 2002).

La quimioterapia afecta a las células malignas de rápido crecimiento para destruirlas. Pero entre este tipo de células también se encuentran las de la sangre, los tejidos de la boca y los del tubo digestivo, como son las mucosas del esófago e intestino. Al respecto en el **cuadro 1** se muestra la tasa de recambio de los diferentes tejidos del cuerpo según Di Saia y Creasman (2002). El pelo, el tejido conjuntivo, la mucosa vaginal, los óvulos y espermatozoides, son otros elementos que pueden disminuir su número (Carswell, 2002). Los medicamentos que se usan en la quimioterapia contra el cáncer son diversos (Senra, 2002).

### 3.2 Complejos metálicos usados en quimioterapia

Entre los compuestos usados en quimioterapia están los elementos de coordinación, estos pueden ser un complejo neutro o un compuesto iónico, el ión generalmente es un metal rodeado de otros átomos o moléculas orgánicas (Desoize y Madoulet, 2002).

**Cuadro 1.** Clasificación de los tejidos normales según su tasa de proliferación.

Proliferación rápida	Proliferación lenta	Sin proliferación
Médula ósea	Pulmón	Músculo
Mucosa Gastrointestinal	Hígado	Hueso
Ovarios	Riñones	Cartílago
Testículos	Glándulas endocrinas	Nervios
Folículo piloso	Endotelio vascular	

Tomado de Di Saia y Creasman, 2002.

Los compuestos que han llamado la atención son aquellos que presentan un centro metálico, los cuales incluyen plata (Ag), hierro (Fe), rutenio (Ru), galio (Ga), oro (Au), platino (Pt) y **cobre (Cu)**, por mencionar algunos.

El Ga es un ión metálico con diversas actividades bioquímicas y celulares. Este modifica la estructura tridimensional del ADN e inhibe su síntesis, así como la de las proteína, inhibe la actividad de varias enzimas, cambia la permeabilidad de la membrana celular y las funciones mitocondriales. Cuando se administran oralmente algunas sales inorgánicas de Ga son absorbidas de manera eficiente por células tumorales, otros compuestos como el maltolato de Ga, conjugado de doxorubicina-Ga-transferrina y Tris (8-quinolinolato) Ga(III), han mostrado actividad antiproliferativa y los isótopos Ga<sup>67</sup> y Ga<sup>68</sup> son prometedores en el estudio de cáncer de hueso (Collery *et al.*, 2002).

Los complejos de Ru(II) y Ru(III) también han mostrado propiedades antitumorales interesantes. El compuesto Ru(III), [ImH] [*trans*-Cl<sub>4</sub> (Me<sub>2</sub>SO) (Im) Ru(III)] (Im=imidazol, NAMI-A) es el primer compuesto que ha entrado satisfactoriamente en la fase 1 de ensayos clínicos (Katsaros y Anagnostopoulou, 2002).

En cuanto al Au se han hecho pruebas de citotoxicidad y actividad antitumoral. Los tiolatos de Au(I) se han empleado clínicamente en el tratamiento de artritis reumatoide y muestran actividad potencial contra varios tumores, de la misma manera se han sintetizado y empleado compuestos orgánicos de Au(III) (Tiekink, 2002).

Compuestos de Fe, como el quelato desferrioxamina, tiene efectos anti-proliferativos tanto en leucemia como contra neuroblastoma. Algunos quelatos como 3-aminofiridina-2-carboxaldehído thiosemicarbazona (Triapine ®) han entrado en la fase de pruebas clínicas, mientras que otros quelatos (2-hidroxi-1-naftilaldehído isonicotinoil hidrazona o taqpiridina) requieren aún de la evaluación en modelos animales (Richardson, 2002).

Por otro lado, el tratamiento contra el cáncer usando Pt comenzó hace 150 años. El primer complejo de coordinación que contuvo Pt fue el cisplatino (*cis*-diclorodiaminoplatino II), sintetizado en 1844 y llamado cloruro de peyrone. Rosenberg, 120 años más tarde, realizó un informe de su actividad inhibitoria sobre la división de *Escherichia coli*. En la década de

los 70 se estableció como medicamento contra el cáncer, en la actualidad el cisplatino es recomendado para algunos tipos de cáncer y es sustituido por carboplatino que es menos tóxico. En Japón se recomienda el nedaplatino en el cáncer de cabeza, cuello, testículo, pulmón, esófago, ovario y cervical. En la actualidad en varios países además del cisplatino, carboplatino y nedaplatino se emplea el oxaliplatino (Desoize y Madoulet, 2002).

La eficacia del cisplatino es impresionante pero es altamente tóxico. Por lo que hoy en día se continúa con la búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos con gran potencial antiproliferativo que presenten una eficacia aun mayor, una toxicidad reducida, sin la resistencia cruzada comparada con cisplatino o carboplatino, así como de menor costo (Desoize y Madoulet, 2002; Carswell, 2002).

Por tal motivo, a finales de la década de los 70, en la Facultad de Química (UNAM) el grupo de trabajo de la Dra. Lena Ruiz inició un proyecto encaminado al desarrollo de fármacos antineoplásicos a partir de metales de transición, de preferencia esenciales biológicamente, con el propósito de disminuir la toxicidad y su alto costo. Una segunda premisa de trabajo fue sintetizar una familia de compuestos con variantes estructurales tales que permitieran la selectividad tumoral (Bravo *et al.*, 2002).

En la actualidad, se ha diseñado un grupo de compuestos de coordinación con posible actividad antitumoral que reciben el nombre de **Casiopeínas®**, estas son una familia de fármacos de coordinación con Cu(II) de fórmula general  $\{Cu(N-N)(N-O)\}NO_3$  ó  $\{Cu(N-N)(O-O)\}NO_3$ , análogos al cisplatino, los cuales han sido sometidos a múltiples pruebas *in vitro* e *in vivo* de acuerdo con las normas internacionales de evaluación de fármacos con potencial anticancerígeno y han mostrado interesante actividad citostática y antineoplásica (Ruiz-Ramírez *et al.*, 1991; 1993; 1995).

El Cu(II) de las Casiopeínas funciona como centro metálico que en la esfera de coordinación tiene un ligando bidentado de tipo diimina (N-N) y otro ligando que puede ser un aminoacidato (N-O) o un donador (O-O) (Márquez *et al.*, 2000).

### 3.3 Cobre

El Cu es un metal de transición ( $[Ar] 4s^1 3d^{10}$ ) que es esencial en los sistemas biológicos incluyendo el humano, sus propiedades químicas le permiten la participación en procesos fundamentales que involucran la transferencia de electrones asociada a enzimas oxidantes, por ejemplo la hemocianina, citocromo oxidasa y superóxido dismutasa. El Cu(II) puede coordinar ligantes siguiendo una geometría cuadrada plana o pirámide de base cuadrada. Son las características citadas las que llevaron a su selección como centro metálico para el diseño de las Casiopeínas. Adicional a esto al ser un metal esencial se espera que su toxicidad sea menor que la de los complejos de platino (Bravo *et al.*, 2002).

La concentración de cobre no excede de  $10^{-15}$  M dentro de las células. Otros estudios adicionales han establecido que el Cu es importante durante el crecimiento de los niños, interviene en los mecanismos de defensa, fuerza en los huesos, maduración de las células rojas y blancas, transporte de hierro, metabolismo del colesterol, metabolismo de la glucosa, contractibilidad del miocardio y desarrollo del cerebro. Se ha encontrado que la deficiencia de este metal esta relacionada con el síndrome Menkes, que es un síndrome genético en el cual alteraciones en la absorción del cobre y transporte conduce a una muerte temprana (Olivares y Uauy, 1996). Por lo expuesto arriba se utilizo como centro metálico al Cu en la síntesis de las Casiopeínas.

### 3.4 Casioepínas

A la fecha se han sintetizado alrededor de 100 Casiopeínas colocadas en varias familias, algunos compuestos de las familias I, II y III tienen actividad antineoplásica *in vivo* (Ruiz-Ramírez *et al.*, 1991; 1993). Dentro de la familia II, se encuentra la Casiopeína II-gly y en la familia III se encuentra la Casiopeína III-ia, dos de los compuestos más prometedores.

### 3.5 Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia

En cuanto a las características particulares de la Casiopeína II-gly® se tiene que: su fórmula general es [Acua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) Cu(II) nitrato]. Su coeficiente de extinción en agua es de 49.23, si la concentración está expresada en moles por litro y de 0.12, si la concentración está expresada en gramos por litro. En solución salina (cloruro de



sodio) precipita. En solución dextrosada permanece estable durante una semana según lo demuestran los espectros de luz. En solución Ringer se mantiene estable por el tiempo de 3 semanas. No es soluble en metanol, al disolverla en buffer de fosfatos (0.2 M) ésta reacciona con los componentes del disolvente ya que se forma una suspensión en forma de película blanca (Romero de L *et al.*, 1996; 1998). Del estudio de grado de unión a proteínas los picos máximos de Casiopeína II-gly se observan a 209 y a 273 nm. Es estable en condiciones de oscuridad y refrigeración por lo menos durante 21 días y se degrada muy fácilmente cuando se expone a la luz. Se une en un alto grado (>97%) a las proteínas plasmáticas, principalmente a albúmina (García y Fuentes, 2002).

Utilizando el método analítico por cromatografía líquida de alta resolución se obtuvo que el grado de unión a proteínas es; para la albúmina de 96.8%, para el plasma humano de 95.2%, para el plasma de rata de 88.68% y para el plasma de perro de 72.78%, en concentraciones de 15, 25 y 50 µg/ml de Casiopeína II-gly. El fármaco se une en un alto grado a las proteínas plasmáticas del plasma humano y es menor en el plasma de rata y de perro, dependiendo de la concentración de albúmina (García-Ortuño, 2006).

La Casiopeína II-gly ha mostrado generar especies reactivas de oxígeno, además de que al ser un compuesto con Cu(II) está relacionado directamente con la reacción de Fenton en la cual se puede generar el radical hidroxilo (Márquez *et al.*, 2000). Actúa contra las líneas celulares de murino leucemia linfóide L1210, sarcoma S180, melanoma melanótico B16, un clon de L5178 llamado LW1, y en líneas celulares de tumores humanos HeLa y CaLo; es potencialmente citotóxico y mata a las células por apoptosis (Reyes y Ruiz-Azuara, 2000) e induce mutación y recombinación somática en alas de *Drosophila melanogaster* en concentraciones de 0.01 mM (De la Rosa *et al.*, 2000).

En células de tumor AS-30D (de roedor) y HeLa (de humano), la Casiopeína II-gly, inhibe la proliferación tumoral, la fosforilación oxidativa y la glucólisis, el crecimiento de ambas líneas tumorales es sensible a este compuesto, con valores en la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) abajo de 0.5 µM para células HeLa, además se observó que prolongó la supervivencia de animales que llevan implantado intraperitonealmente el hepatoma AS-30D (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2006).

En cultivos de células de glioma C6 de rata la Casiopeína II-gly causa la translocación mitocondrial-nuclear del factor inductor de la apoptosis. Ambas rutas, la dependiente e independiente de caspasas participa en la apoptosis inducida por Casiopeína II-gly. El tratamiento con el mismo fármaco en C6 reduce el volumen tumoral, los índices mitóticos y proliferativos e incrementa el índice apoptótico (Trejo-Solís *et al.*, 2004; 2005).

Con respecto a las características de la Casiopeína III-ia®; su fórmula general es [(4, 4'-dimetil, 2, 2'-bipiridina)(acetilacetato) Cu(II) nitrato]. El coeficiente de extinción de dicha Casiopeína en agua es de 0.14 cuando la concentración está expresada en gramos por litro y de 58.91, si la concentración está expresada en moles por litro. Permanece estable en solución salina 9 días, en solución dextrosada 4 días, en solución Hartmann 3 semanas. No es muy soluble en metanol. Al disolverla en buffer de fosfatos (0.2 M) forma una suspensión en forma de película blanca. Manteniendo constante en la estructura el donador por oxígeno O,O y variando el donador por nitrógeno N,N se encontró que la apertura del anillo fenantrolínico disminuye la toxicidad, es decir, la toxicidad de [Cu (4,7-dime-fen)(O,O)]NO<sub>3</sub> >toxicidad de [Cu (4,4'-dime-bipy)(O,O)]NO<sub>3</sub> (Romero de L. *et al.*, 1996; 1998). Su valor del pKa es de 8.25 y tiene un coeficiente de partición de 0.3580 (Alpizar y Fuentes, 1998). Este compuesto es estable a temperatura ambiente en plasma durante 12 horas y en refrigeración hasta 72 horas (Fuentes *et al.*, 2002a).

La Casiopeína III tiene actividad apoptótica *in vitro* en células HeLa, con la dosis de 0.5 µg/ml, en un porcentaje mayor al exhibido en las células no tratadas y tratadas con busulfán® (Carvallo-Chaigneau *et al.*, 2004). En estudios preliminares en ratas transplantadas con glioma C6, se postula a la Casiopeína III como un probable inductor de apoptosis, dada la completa desaparición del tumor en 27 de las 30 ratas tratadas con este compuesto (Carvallo-Chaigneau *et al.*, 2004). También se describe dentro de su mecanismo de acción, la inhibición de la respiración celular mediante la inhibición de la α-cetoglutarato deshidrogenasa a concentraciones por debajo de 10 nmoles/mg y la liberación de citocromo C a concentraciones de 25 nmoles/mg. Lo anterior, inhibe la respiración celular y la síntesis de ATP, lo que puede comprometer los procesos dependientes de energía como la duplicación celular (Marín-Hernández *et al.*, 2003).

La Casiopeína III tiene un menor efecto tóxico que la Casiopeína II y la intensidad de interacción con el ADN (medido por electroforesis) no es del todo equivalente para las tres

familias. Esto es, el mecanismo de acción es diferente para la Casiopeína III que para las familias I y II, lo cual además podría explicar la selectividad de la actividad antineoplásica hacia las líneas celulares tumorales (Fuentes *et al.*, 2002a).

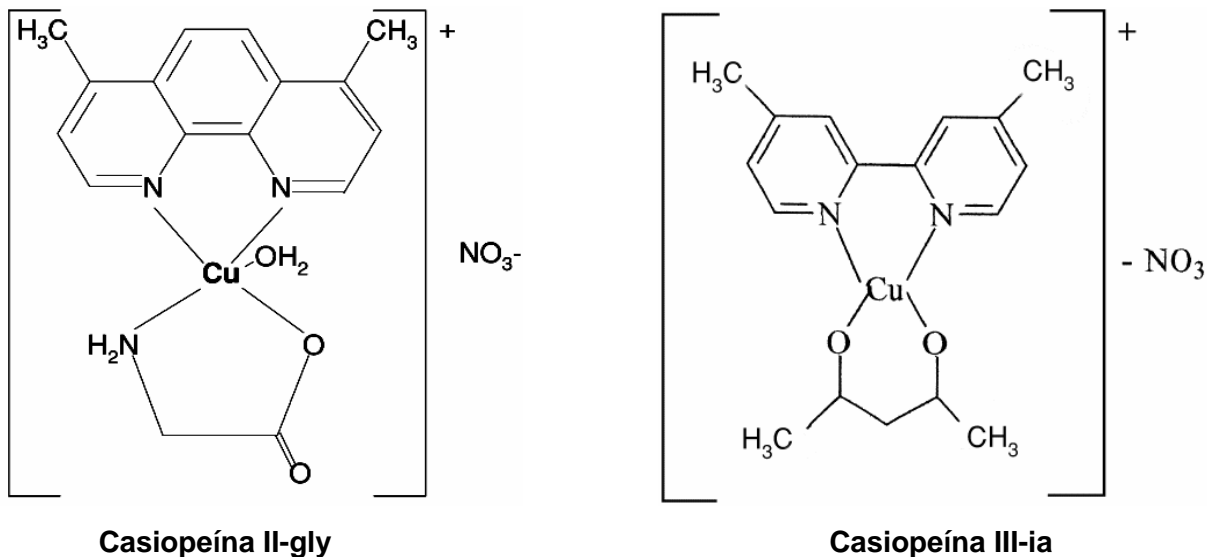
Un estudio en gatos con leucemia viral felina tratados con Casiopeína III se observó que es capaz de revertir a números normales todos los parámetros sanguíneos de fórmula blanca (Gracia-Mora *et al.*, 2000).

En un estudio con perros que fueron tratados con Casiopeína III-ia a dosis de 10 mg/Kg, independientemente del tiempo de administración (10, 12 y 30 minutos después de terminada la infusión) presentaron crisis respiratoria, se registraron alteraciones electrocardiográficas, una disminución de la presión y oxigenación arteriales, edema pulmonar y finalmente la muerte ocurre por insuficiencia cardíaca (García-Ortuño *et al.*, 2004; 2006).

Por otro lado, al evaluar la actividad antitumoral *in vitro* de la Casiopeína II-gly y III-ia, contra algunas líneas celulares tumorales humanas (HeLa, SiHa, CaSKi, C33-A, CaLo, InBI) y murinas (B16 melanoma y carcinoma de Lewis) expuestas por 24 horas a los fármacos, estos mostraron actividad antineoplásica (Gracia-Mora, 2001), mientras en corazones aislados de ratas Wistar se encontró disminución en el ritmo cardíaco, en el consumo de oxígeno en forma dependiente de la dosis y del tiempo (Hernández-Esquivel *et al.*, 2006).

Por lo anterior es conveniente conocer la manera como actúan las Casiopeínas para producir sus efectos. En este estudio se utilizaron la Casiopeína II-gly y la Casiopeína III-ia, cuyas estructuras moleculares se muestran en la **figura 1** y las dosis letales agudas cincuenta por ciento (LD<sub>50</sub>) en el **cuadro 2** (Rendón y Tenorio, 1998; Marín-Hernández *et al.*, 2003; Gracia-Mora *et al.*, 1994).

Uno de los aspectos que deben conocerse son los efectos de las Casiopeínas en el material genético (ácido desoxiribonucleico, ADN). Las aberraciones cromosómicas (AC), intercambio de cromátidas hermanas (ICH), micronúcleos (MN) y **electroforesis unicelular en gel** (EUG), son pruebas que permiten evaluar, entre otros aspectos, el daño en el ADN (Tice *et al.*, 2000).



**Figura 1.** Estructura química de las Casiopeínas (Tomado de: Reyes *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2002b).

**Cuadro 2.** Dosis letal cincuenta por ciento (LD<sub>50</sub>) de la Casiopeína II-gly y la Casiopeína III-ia en ratones.

	Vía de administración	Dosis (LD <sub>50</sub> ) mg/kg	Cepa
Casiopeína II-gly	Intraperitoneal	8.8	CD-1
Casiopeína II-gly	intravenosa	16.7	NIH
Casiopeína III-ia	Intraperitoneal	14.6	NIH
Casiopeína III-ia	intravenosa	nd	NIH

nd; no determinado

Tomado de (Gracia-Mora *et al.*, 1994).

### 3.6 Electroforesis unicelular en gel

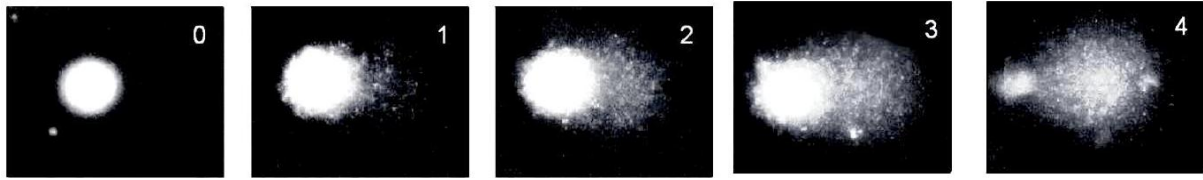
La electroforesis unicelular en gel a pH>13 (EUG) llamado también ensayo cometa, fue propuesta por Singh *et al.*, (1988). Es una prueba que combina la simplicidad de técnicas bioquímicas para detectar rompimiento de cadena sencilla del ADN, sitios sensibles al álcali y entrecruzamiento con la típica técnica de células individuales de pruebas citogenéticas.

Comparado con otros ensayos genotóxicos la metodología de EUG tiene ciertas ventajas en las que se incluyen:

1. colección de datos a nivel de la célula individual
2. ajuste a distintos tipos de análisis estadísticos
3. el uso de un número pequeño de células por muestra (menor a 10,000)
4. alta sensibilidad para detectar daño al ADN
5. factible de usar en todas las poblaciones de células eucariontes
6. es rápida y altamente reproducible
7. es ampliamente recomendada para investigar la genotoxicidad de metales, de químicos industriales, agroquímicos y fármacos (Tice y Andrews, 1992; Altamirano-Lozano *et al.*, 1996; 1999; Tice *et al.*, 1996; 2000; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003; Collins, 2004).

Este ensayo tiene también usos en pruebas de contaminación ambiental con genotoxinas, como biomonitor humano y en la epidemiología molecular, además de que promete proporcionar respuestas a preguntas importantes acerca de los niveles de daño al ADN en las células normales, la variación en la capacidad de reparación de ADN dentro de poblaciones humanas y la regulación de la reparación del ADN en el nivel molecular dentro del núcleo (Collins, 2004).

El ensayo cometa se basa en la migración del ADN de núcleos de células suspendidas en agarosa bajo condiciones de electroforesis. Bajo el microscopio, se ve una célula que tiene apariencia de cometa, con una cabeza (la región nuclear) y su cola (la cual contiene el ADN fragmentado) que migra hacia el ánodo (**figura 2**). La migración del ADN, depende de varios parámetros como la concentración de agarosa en el gel, el pH, la temperatura, duración de desenrollamiento del ADN, del voltaje, del amperaje y el tiempo de electroforesis. A un pH > 13 la prueba puede detectar rompimientos de cadena sencilla, sitios sensibles al álcali que son expresados como rompimientos de cadena sencilla y rompimientos de cadena sencilla asociados a sitios donde ocurrió reparación. Es ampliamente recomendada en evaluaciones *in vivo*, porque puede detectar el daño que se produce en cualquier tejido (Hartmann *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 1988).



**Figura 2.** Cometa con diferente grado de migración del ADN (tomado de Collins, 2004).

### 3.7 El ratón como modelo biológico

El ratón de laboratorio es un roedor cuyo ancestro es el ratón común o ratón casero. Su nombre científico es *Mus musculus*. Es un mamífero pequeño, de manejo sencillo económico y fácil de alojar. A través de cruzamientos selectivos se han creado nuevas cepas de ratones de laboratorio. Actualmente existen más de 120 cepas consanguíneas de ratón. Los ratones de laboratorio constituyen entre el 60 y 80 por ciento de los mamíferos usados en la investigación, debido a su gran proliferación, a su capacidad de adaptación, a los conocimientos que se tienen de su fisiología, genética y a la factibilidad de su manejo (Andress *et al.*, 1992).

Su periodo de vida es de 1.5 a 3 años. Nacen sin pelo, con los ojos y oídos cerrados, son muy activos, su pelo comienza a crecer al tercer día, al décimo ya están cubiertos de pelo y el meato auditivo externo esta completamente abierto. A los doce días abren los ojos; comienzan a comer sólido y aprenden a beber agua de la botella por imitación (Lane, 1976). Los machos se distinguen de las hembras por los testículos visibles a través de la pared abdominal, la mayor distancia entre el ano y la papila urogenital y el mayor tamaño de la papila urogenital (Dyban *et al.*, 1991; Harkness y Wagner, 1989). Los incisivos crecen constantemente pero son limados por fricción.

Los animales son sacrificados por eutanasia, utilizando técnicas humanitarias aceptadas, realizándose de manera silenciosa y sin sufrimiento como la dislocación cervical que consiste en interrumpir la comunicación del cerebro y la médula espinal mediante la separación de las vértebras cervicales (Altamirano, 1994).

El ratón de laboratorio se seleccionó para este trabajo, debido a que presenta varias ventajas como lo es el administrar variados agentes de manera intraperitoneal (ip), intravenosa (iv), subcutánea (sc), intramuscular (im), oral, además de que su fisiología es similar a la de los humanos.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a los antecedentes mencionados, se decidió estudiar el daño al ADN producido por las Casiopeínas II-gly y III-ia en diferentes órganos de ratones de la cepa CD-1.

Por lo tanto la pregunta a resolver en este trabajo es:

¿La Casiopeína II-gly y la Casiopeína III-ia son capaces de producir cambios en la viabilidad e inducir rompimientos sobre la cadena de ADN de las células obtenidas de diferentes tejidos y órganos de ratones tratados con estos compuestos a diferentes tiempos?



## **5. HIPÓTESIS**

Si exponemos a ratones machos de la cepa CD-1 con la Casiopeína II-gly o la Casiopeína III-ia a una sola dosis durante distintos tiempos, entonces, se espera que sus efectos se manifiesten como toxicidad celular y daño al ADN, además de evidenciar diferencias en cuanto a la intensidad de dichos efectos.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto sobre el ADN de tejidos y células de ratones machos de la cepa CD-1 expuestos a diferentes tiempos administrando  $\frac{1}{2}$  de la LD<sub>50</sub> de Casiopeína II-gly o Casiopeína III-ia, mediante el ensayo cometa.

### **6.1 Objetivos particulares**

Evaluar la viabilidad celular en los diferentes órganos y tejidos de ratones machos de la cepa CD-1 tratados durante 3, 6, 12 y 24 horas con Casiopeína II-gly o Casiopeína III-ia, respectivamente.

Estimar los rompimientos de cadena sencilla inducidos en el ADN de las células en los diferentes órganos y tejidos de ratones machos de la cepa CD-1, tratados durante 3, 6, 12 y 24 horas con Casiopeína II-gly o Casiopeína III-ia, respectivamente.

Determinar el posible comportamiento tiempo-dependiente en la viabilidad y en el daño al ADN.

Determinar el tiempo mínimo a partir del cual se observan efectos sobre la viabilidad y sobre la inducción de daño al ADN.

Determinar si alguno de los tejidos u órganos analizados es blanco de las Casiopeínas.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Animales y tratamiento**

Se utilizaron 50 ratones machos de la cepa CD-1, que se encontraban entre los dos y tres meses de edad, con un peso de 30 a 35 gr. Los animales fueron expuestos durante 3, 6, 12 y 24 horas a  $\frac{1}{2}$  de la LD<sub>50</sub> que corresponden a 4.4mg/kg de la Casiopeína II-gly o 7.3 mg/kg de la Casiopeína III-ia, respectivamente. Todos los animales estuvieron separados en grupos de cinco ratones en jaulas de plástico, bajo condiciones controladas de humedad (70 %) y temperatura (20 °C) con 12 horas luz por 12 horas de oscuridad, comida (Harlan 2018 S) y agua *ad libitum*.

La Casiopeína II-gly y III-ia utilizadas en este estudio, fueron proporcionadas por el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM, encabezado por la Doctora Lena Ruiz. Ambos compuestos se prepararon por separado en el momento, se disolvieron en solución salina y fueron administradas vía i.p. en los volúmenes apropiados. Cuatro grupos de ratones fueron tratados con 4.4 mg/kg de Casiopeína II-gly y otros cuatro grupos con 7.3 mg/kg de Casiopeína III-ia respectivamente. Los ratones de cada grupo fueron sacrificados al terminar el tiempo de exposición, los otros dos grupos fueron testigos a los cuales no se les aplicó ningún tratamiento.

### **7.2 Aislamiento de órganos y tejidos**

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. El corazón, el riñón, el hígado, el bazo y los testículos fueron disectados y lavados con medio de cultivo RPMI (Sigma Chemical Co., St, Louis, MO). Las células de los órganos se disgregaron mecánicamente con unas tijeras finas hasta obtener un homogeneizado y después se tomaron 30  $\mu$ l (entre 5 y 10 mil células aproximadamente) de muestra de cada órgano para determinar la viabilidad y 30  $\mu$ l para el ensayo de electroforesis. Al mismo tiempo, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca, a las cuales, también se les evaluó la viabilidad y se realizó la prueba del cometa.

### 7.3 Viabilidad

La evaluación de la viabilidad se determinó usando el 5-6 diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y el bromuro de etidio (Br-Et) de acuerdo con la técnica descrita por Strauss (1991). Brevemente: se preparo una solución de Br-Et disolviendo 50 mg en 1.0 ml de etanol al 100% y se aforo a 50 ml con PBS (solución amortiguadora de fosfatos). Para la solución de trabajo se añadieron 50  $\mu$ l de la solución anterior a 2 ml de PBS (concentración final de 0.025  $\mu$ g/ $\mu$ l). La solución de CFDA se preparo disolviendo 3 mg del compuesto en 1 ml de acetona y después se añadieron 84  $\mu$ l de esta última en 2 ml de PBS (concentración final de 0.125  $\mu$ g/ $\mu$ l) y se protegió de la luz. Ambos colorantes se mezclaron en una proporción 1:1, agregando 30  $\mu$ l de esta mezcla con los 30  $\mu$ l de células. Después de 10 minutos a 37 °C las células fueron lavadas en 3 ocasiones con 1 ml de medio de cultivo. Finalmente las células se colocaron en un portaobjetos y encima un cubreobjetos para su análisis al microscopio de fluorescencia (**Figura 3**). Se evaluaron 100 células, donde, las viables tiñen de verde en el citoplasma y las no viables tiñen de rojo en el núcleo.

### 7.4 Ensayo cometa

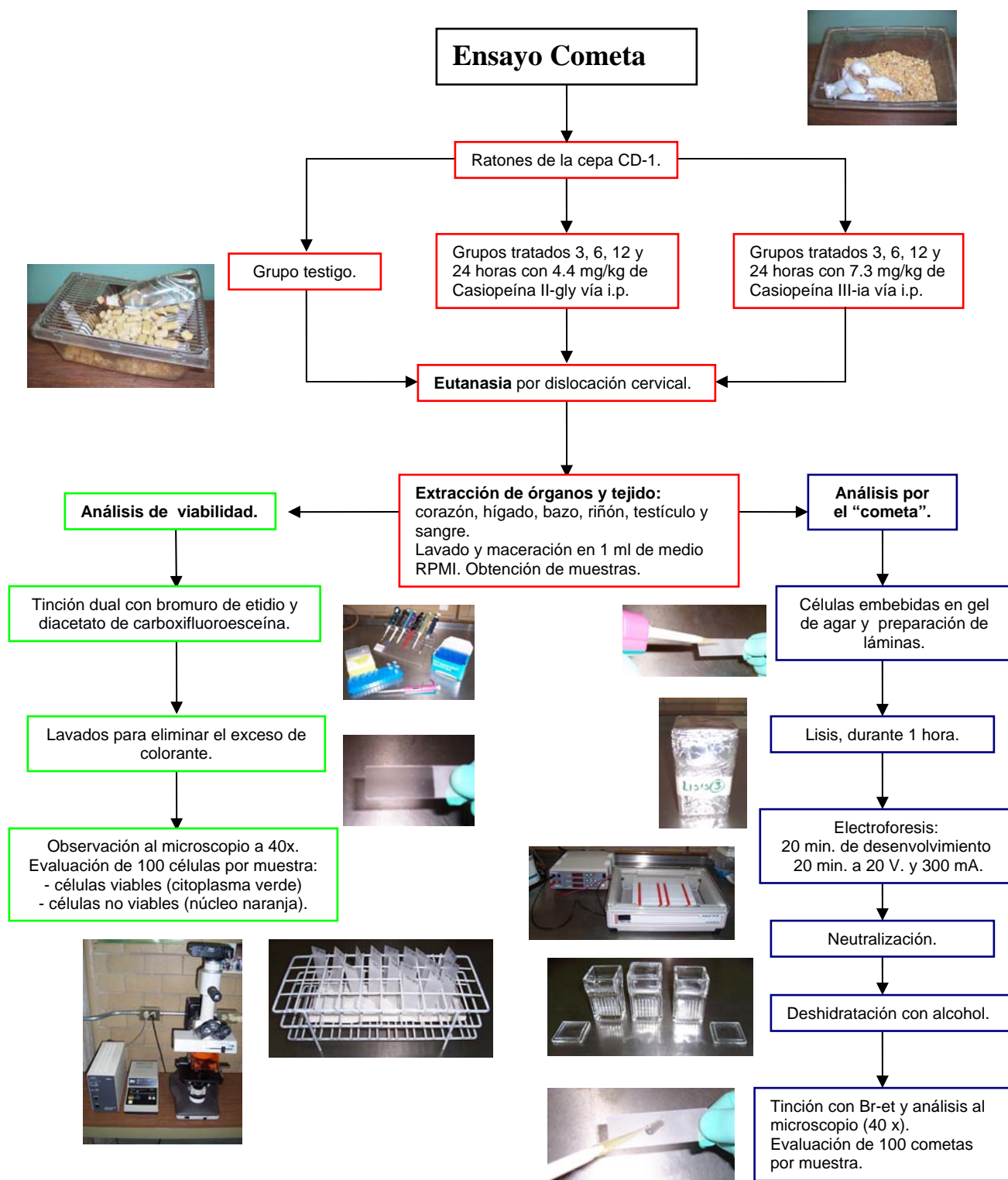
En laminillas esmeriladas se colocaron una capa de agarosa regular al 1% (500 mg en 50 ml de PBS) y enseguida una segunda capa mezclando 10  $\mu$ l de la suspensión celular con 75  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (125mg en 25 ml de PBS) a 37 °C. Una tercera capa de agarosa (75  $\mu$ l) de bajo punto de fusión, se colocó para cubrir las preparaciones y así las células quedaron entre dos capas de gel. Las láminas se mantuvieron en frío (4 °C) hasta que solidificó el gel de cada capa. Posteriormente las láminas se colocaron 1 hora en una solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM a pH 10, con Triton X-100 al 1% y DMSO al 10 %) fría, preparada en el momento. Después, las láminas se pasaron a una cámara horizontal de electroforesis, donde el ADN se dejó desenrollar por 20 minutos en una solución amortiguadora (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM a pH > 13). La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente por 20 minutos a 25 volts y 300 miliampers. Los pasos anteriores se efectuaron en oscuridad o con luz amarilla. A continuación, las preparaciones se colocaron en una solución de Tris (0.4 M a pH 7.5) para neutralizar las condiciones alcalinas, realizando dos cambios de 5 minutos. Por último, las láminas se deshidrataron en etanol al 70% durante 5 minutos y posteriormente en etanol absoluto, completando su secado al aire (**Figura 3**) (Tice *et al.*, 1996; Rojas *et al.*, 1999).

Para su análisis, las preparaciones fueron teñidas con 75  $\mu$ l de Br-Et (de una solución de 20  $\mu$ g/ml). La migración del ADN fue medida con una escala ocular adaptada a un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2 equipado con filtro G-2A. Se evaluaron 100 células por cada órgano de cada ratón. Todas las laminillas fueron etiquetadas para el análisis (Tice *et al.*, 1996; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003).

El medio de cultivo RPMI-1640, los geles de agarosa, el PBS (libre de calcio y magnesio), los reactivos cloruro de sodio (NaCl), etilendiamintetracetato de sodio (EDTA-Na<sub>2</sub>), base trizma (Tris), tritón X-100, dimetilsulfoxido (DMSO), hidróxido de sodio (NaOH), Br-Et y CFDA, utilizados en este estudio fueron obtenidos de la compañía de químicos Sigma St. Louis MO, EUA. El etanol absoluto por J. T. Baker, México y la Heparina por Industrias Farmacéutica Pisa, México.

### **7.5 Análisis estadístico**

Los resultados de viabilidad celular fueron analizados con la prueba *t* de *Student* y los resultados del cometa se analizaron con la prueba no paramétrica *U* de *Mann-Whitney*, comparando siempre los grupos tratados contra el grupo control (Marques de Cantú, 1991).



**Figura 3.** Método de la prueba de viabilidad y ensayo cometa.

## 8. RESULTADOS

### Viabilidad

Los valores de la prueba de viabilidad celular en los órganos de ratones no tratados y tratados con Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia, durante 12 y 24 horas, se presentan en el **cuadro 3**. Los datos de viabilidad en los diferentes órganos del grupo testigo muestran valores mayores de  $90.40 \pm 6.42$ , mientras que en los tratados con Casiopeína II-gly durante 12 horas los resultados van de  $68.20 \pm 2.04$  en las células de sangre a  $97.20 \pm 1.30$  en testículo, evidenciando diferencia estadística en todos los órganos evaluados excepto riñón y testículo. En los ratones tratados por 24 horas con el mismo compuesto los cambios estadísticos se observan en corazón, hígado, bazo y testículo ( $P < 0.01$ ). Con respecto a la Casiopeína III-ia en el tratamiento de 12 horas, las diferencias estadísticas se dan en bazo, en tanto a las 24 horas se dan en bazo y testículo.

Los datos de los tratamientos de 6 y 3 horas con ambas Casiopeínas no mostraron cambios considerables por lo que los datos no se incluyeron en esta tesis. En el **cuadro 3** se puede observar la ausencia de algunos datos, esto es debido a que en el momento de la evaluación no se pudo determinar la viabilidad por una tinción dudosa.

### Ensayo cometa

El daño al ADN evaluado por el ensayo cometa en las células de sangre, corazón, hígado, bazo, riñón y testículo de ratones tratados con 4.4 mg/kg de la Casiopeína II-gly, y 7.3 mg/kg de la Casiopeína III-ia durante 3, 6, 12 y 24 horas, se muestra en el **cuadro 4** y en las **figuras** de la 4 a la 7.

En el **cuadro 4** se muestra la longitud de la migración del daño al ADN en  $\mu\text{m}$ , representados por su media y su error estándar. En general se observa que la media incrementa con respecto al testigo al aumentar el tiempo de exposición de cada órgano, excepto sangre, para las dos Casiopeínas,

A su vez, el mayor incremento en la media de los órganos tratados con Casiopeína II-gly, se observa a las 12 horas de tratamiento para sangre, corazón, hígado, riñón, células grandes y

pequeñas de testículo, y a las 24 horas para bazo, incremento que va de  $26.60 \pm 0.26$  en sangre hasta  $80.86 \pm 1.49$  en corazón. Por otro lado, para la Casiopeína III-ia el mayor aumento se ve en corazón, bazo y células pequeñas de testículo a las 12 horas y en sangre, hígado, riñón y células grandes de testículo a las 24 horas, aumento que va de  $26.74 \pm 0.34$  en sangre hasta  $89.21 \pm 2.08$  en riñón.

Con respecto a las células de sangre, en el **cuadro 4** se observa que el testigo tiene una media de  $24.45 \pm 0.08$ , mientras que el grupo tratado con Casiopeína II-gly tiene valores que van de  $25.42 \pm 0.20$  en el tiempo de 24 horas de tratamiento a  $26.60 \pm 0.26$  en 12 horas y el grupo tratado con Casiopeína III-ia de  $25.16 \pm 0.18$  en 6 horas a  $26.74 \pm 0.34$  en 24 horas, donde, no se logra apreciar un comportamiento claro entre los resultados de los grupos tratados comparados con el grupo testigo. Sin embargo, en la **figura 4A** se puede apreciar mejor el efecto producido por las dos Casiopeínas, donde, se muestra la distribución de la migración del daño al ADN de los mismos datos, en el cual el testigo tiene una migración menor a  $40 \mu\text{m}$ , mientras, en los grupos tratados con Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia hay cometas con valores que alcanzan hasta  $70 \mu\text{m}$  en 24 horas y hasta  $80 \mu\text{m}$  en el grupo tratado durante 12 horas con Casiopeína III-ia, además, en todos los tiempos hay diferencia estadística con respecto al testigo ( $P < 0.05$  y  $P < 0.001$ ).

La distribución de la migración del daño al ADN se muestra de la **figura 4** a la **7**. En cada una de las figuras se puede observar que el porcentaje de células con daño aumenta conforme se incrementa el tiempo de 3 hasta 24 horas con la Casiopeína II-gly y la Casiopeína III-ia, respectivamente.

En sangre, corazón, hígado, bazo, riñón y células pequeñas de testículo, se encontraron diferencias estadísticas a partir de 3 horas de tratamiento con la Casiopeína II-gly, en tanto que para las células grandes de testículo esta diferencia aparece a partir de las 6 horas (**Cuadro 4, Figura 4, 5, 6 y 7**). Para la Casiopeína III-ia las diferencias aparecen a partir de 3 horas en los mismos órganos excepto bazo, mientras que para células grandes de testículo y bazo se observa diferencia solo en 12 y 24 horas.



**Cuadro 3.** Viabilidad de órganos de ratón de la cepa CD-1 tratados durante 12 y 24 horas con las Casiopeínas

Tratamiento (mg/kg)	Viabilidad celular (100 células analizadas por muestra por ratón)						
	R1	R2	R3	R4	R5	Total	Media ± DE
<b>Testigo</b>							
Sangre	97	94	90	91	80	469	90.40 ± 6.42
Corazón	98	100	100	96	98	487	98.40 ± 1.67
Hígado	97	96	98	90	93	464	94.80 ± 3.27
Bazo	90	97	92	98	95	466	94.40 ± 3.36
Riñón	94	80	98	89	80	471	88.20 ± 8.13
Testículo	93	98	98	98	99	477	97.20 ± 2.38
<b>Casiopeína II-gly (4.4mg/kg) 12 horas</b>							
Sangre	65	68	70	70	68	341	68.20 ± 2.04 **
Corazón	95	93	98	95	92	473	94.60 ± 2.30 *
Hígado	90	92	88	90	86	446	89.20 ± 2.28 *
Bazo	84	87	77	80	70	398	79.60 ± 6.58 **
Riñón	96	95	85	87	80	443	88.60 ± 6.80
Testículo	98	98	95	98	97	486	97.20 ± 1.30
<b>Casiopeína II-gly (4.4mg/kg) 24 horas</b>							
Sangre	70	90	-	92	80	332	83.00 ± 10.13
Corazón	79	-	90	77	89	335	83.75 ± 6.70 **
Hígado	90	85	80	90	85	430	86.00 ± 4.18 **
Bazo	80	70	76	89	84	399	79.80 ± 7.29 **
Riñón	78	87	85	86	87	423	84.60 ± 3.78
Testículo	80	90	85	90	90	435	87.00 ± 4.47 **
<b>Casiopeína III-ia (7.3mg/kg) 12 horas</b>							
Sangre	93	98	78	75	96	440	88.00 ± 10.7
Corazón	96	100	92	94	97	479	95.80 ± 3.03
Hígado	96	86	88	90	92	452	90.40 ± 3.84
Bazo	90	92	93	86	83	444	88.80 ± 4.20 *
Riñón	86	89	90	96	84	445	89.00 ± 4.58
Testículo	99	96	96	92	94	477	95.40 ± 2.60
<b>Casiopeína III-ia (7.3mg/kg) 24 horas</b>							
Sangre	88	96	91	31	36	342	68.40 ± 32.03
Corazón	94	97	88	98	82	459	91.80 ± 6.72
Hígado	90	92	-	-	-	182	91.00 ± 1.41
Bazo	86	83	65	60	37	331	66.20 ± 19.79 *
Riñón	96	84	90	74	82	426	85.20 ± 8.31
Testículo	92	94	93	95	92	466	93.20 ± 1.30 *

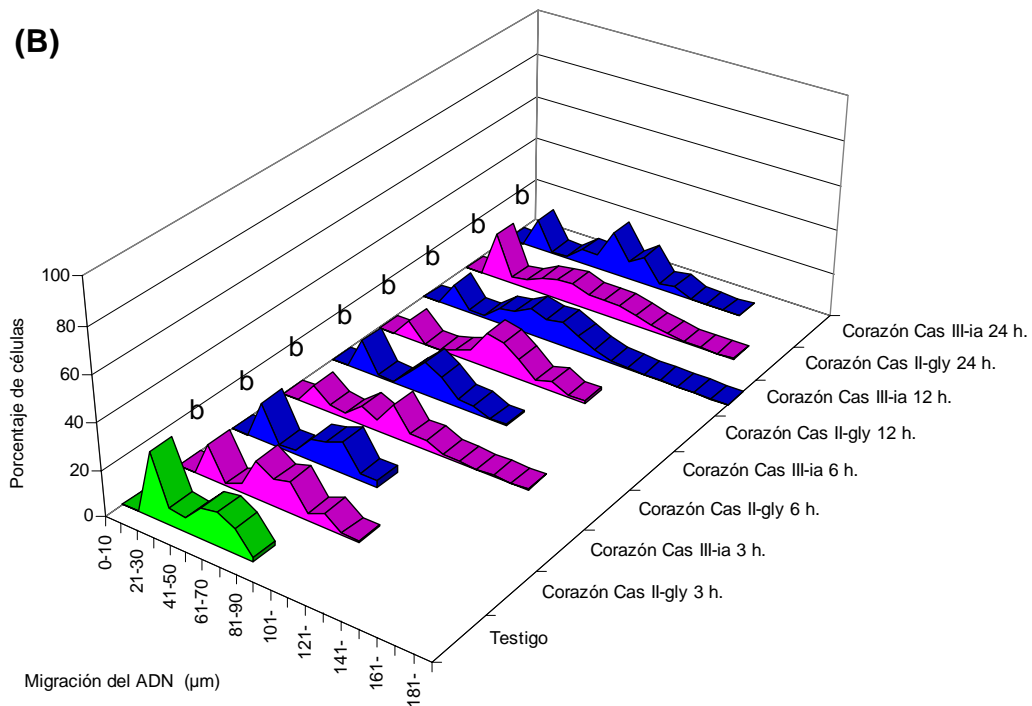
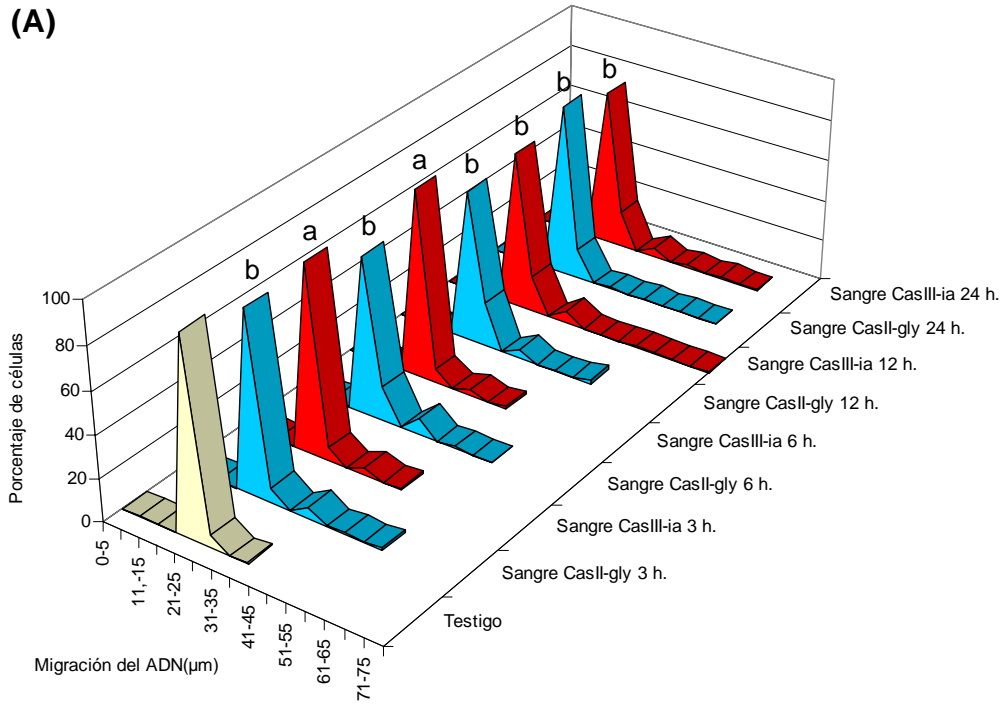
R, ratón; los dígitos (1, 2, 3, 4 y 5) representan el número de ratón en cada lote experimental DE, desviación estándar; \* P < 0.05 y \*\* P < 0.01, diferencias con respecto al grupo control

**Cuadro 4.** Longitud de la migración del ADN en  $\mu\text{m}$  de los diferentes órganos de ratón macho de la cepa CD-1 tratados durante 3, 6, 12 y 24 horas con las Casiopeínas.

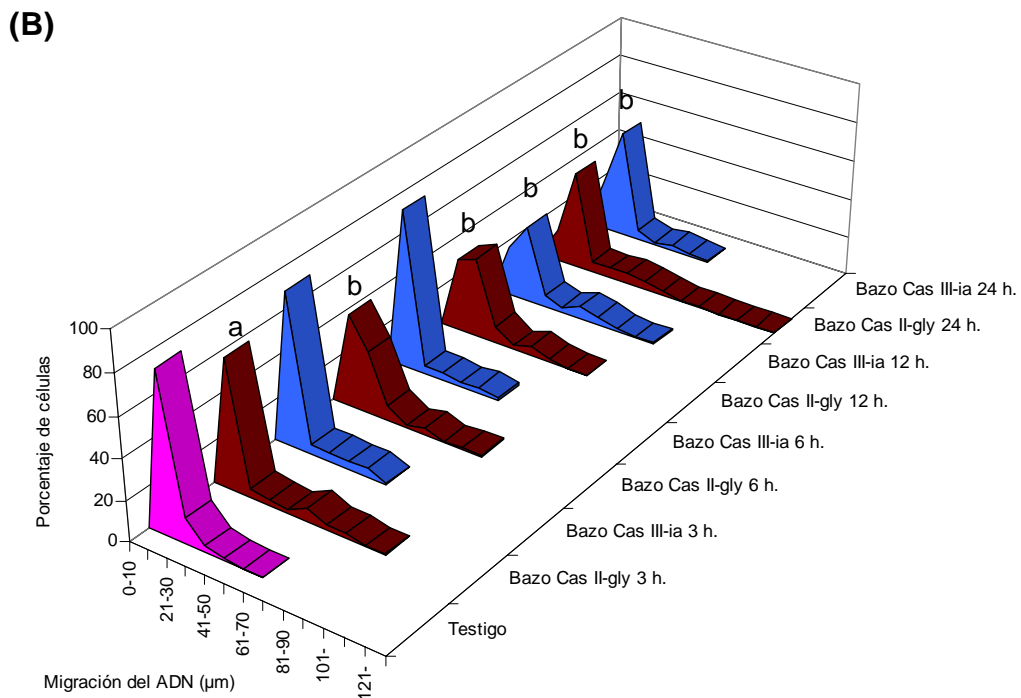
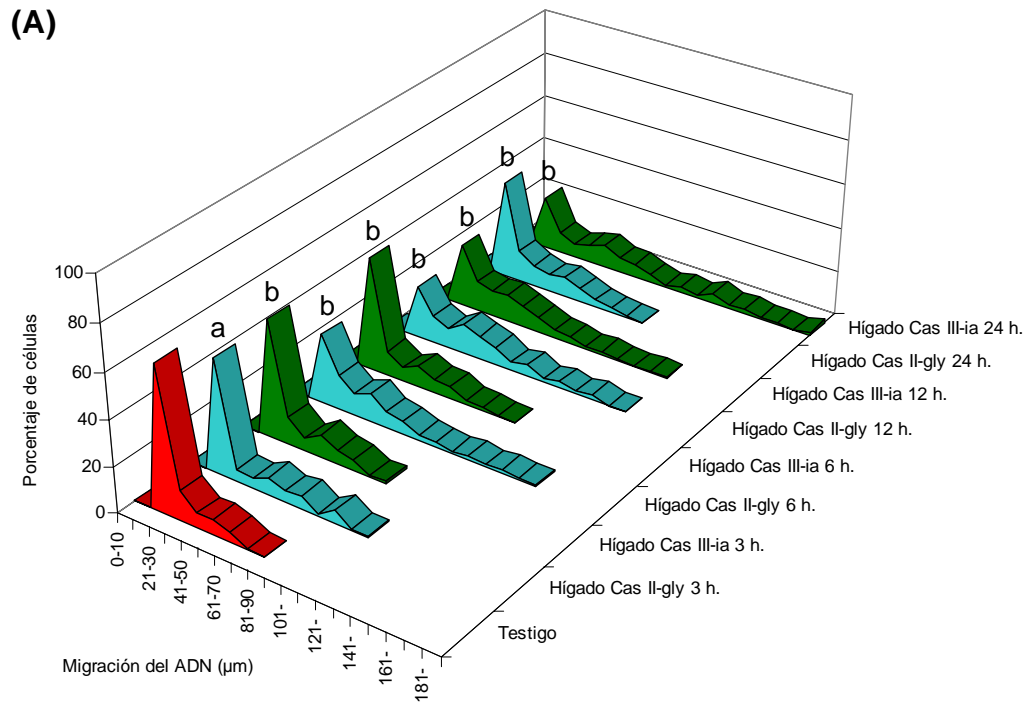
Órganos	Testigo	Tiempo de exposición a Casiopeína (Cas)							
		3 horas		6 horas		12 horas		24 horas	
		Cas II-gly	Cas III-ia.	Cas II-gly	Cas III-ia.	Cas II-gly	Cas III-ia.	Cas II-gly	Cas III-ia.
Sangre	24.45 $\pm 0.08$	25.82 $\pm 0.24$	25.20 $\pm 0.18$	26.58 $\pm 0.24$	25.16 $\pm 0.18$	26.60 $\pm 0.26$	26.46 $\pm 0.27$	25.42 $\pm 0.20$	26.74 $\pm 0.34$
Corazón	50.84 $\pm 1.02$	62.51 $\pm 1.23$	59.65 $\pm 1.37$	67.54 $\pm 1.67$	62.84 $\pm 1.42$	80.86 $\pm 1.49$	78.41 $\pm 1.50$	71.13 $\pm 1.71$	75.40 $\pm 1.45$
Hígado	34.39 $\pm 0.66$	43.43 $\pm 1.21$	40.21 $\pm 0.89$	51.12 $\pm 1.28$	41.62 $\pm 1.00$	60.36 $\pm 1.40$	52.51 $\pm 1.16$	45.19 $\pm 0.97$	69.74 $\pm 2.01$
Bazo	22.08 $\pm 0.26$	28.02 $\pm 0.81$	24.75 $\pm 0.50$	26.99 $\pm 0.57$	24.19 $\pm 0.50$	28.66 $\pm 0.56$	31.94 $\pm 0.80$	33.96 $\pm 0.82$	27.08 $\pm 0.47$
Riñón	43.04 $\pm 0.92$	49.56 $\pm 1.35$	53.78 $\pm 1.31$	61.69 $\pm 1.57$	55.12 $\pm 1.22$	71.90 $\pm 1.30$	68.67 $\pm 1.27$	58.46 $\pm 1.43$	89.21 $\pm 2.08$
Testículo CG	43.39 $\pm 1.06$	48.98 $\pm 1.52$	44.89 $\pm 1.44$	65.53 $\pm 1.91$	45.18 $\pm 1.37$	77.16 $\pm 2.14$	66.59 $\pm 1.67$	70.64 $\pm 1.61$	74.39 $\pm 1.75$
Testículo CP	26.20 $\pm 0.83$	29.28 $\pm 0.99$	29.32 $\pm 0.97$	39.47 $\pm 1.48$	27.53 $\pm 0.80$	50.34 $\pm 2.11$	43.66 $\pm 1.58$	43.55 $\pm 1.64$	42.24 $\pm 1.66$

Datos representados en media  $\pm$  E.E.

CG, células grandes; CP, células pequeñas.

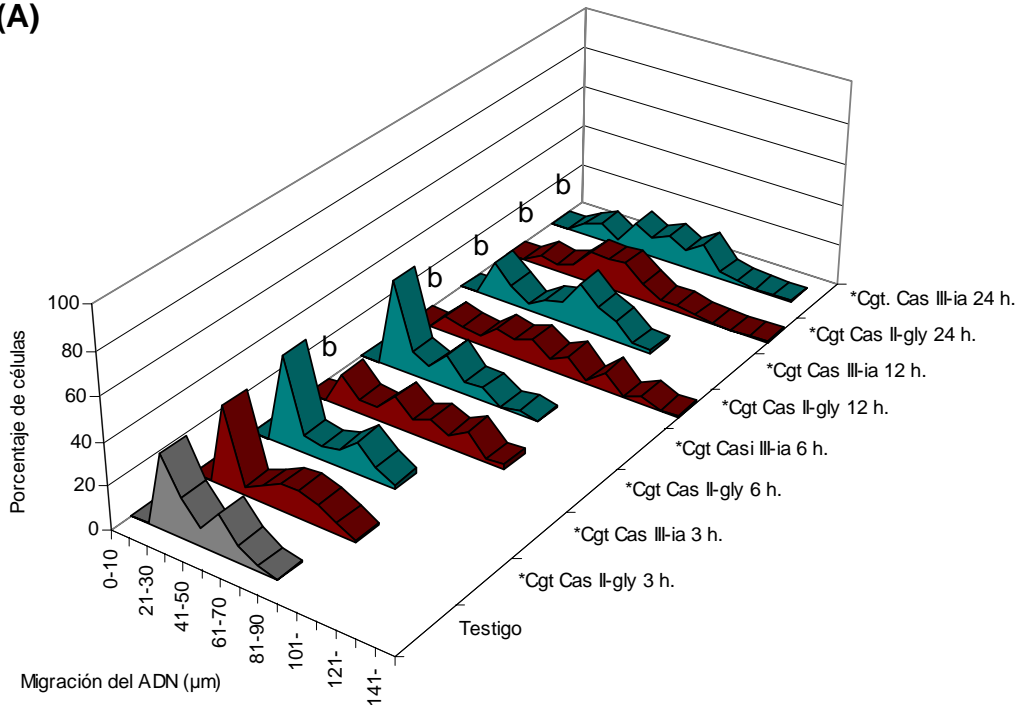


**Figura 4.** Daño al ADN en células de sangre (A) y corazón (B) de ratones tratados durante 3, 6, 12, y 24 horas, con 4.4 mg/kg de la Casiopeína II-gly, y 7.3 mg/kg de la Casiopeína III-ia. Distribución de la migración del ADN (<sup>a</sup>  $P < 0.05$  y <sup>b</sup>  $P < 0.001$ , diferencias con respecto a su testigo).

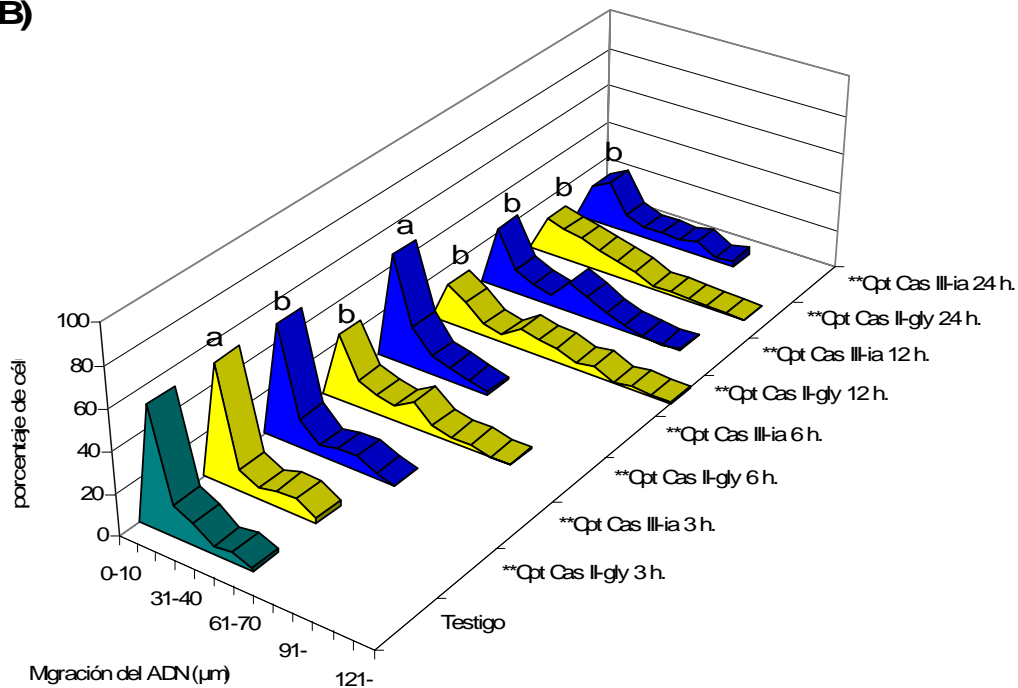


**Figura 5.** Daño al ADN en células de hígado (A) y bazo (B) de ratones tratados durante 3, 6, 12, y 24 horas, con 4.4 mg/kg de la Casiopeína II-gly, y 7.3 mg/kg de la Casiopeína III-ia. Distribución de la migración del ADN (<sup>a</sup>  $P < 0.01$  y <sup>b</sup>  $P < 0.001$ , diferencias con respecto a su testigo).

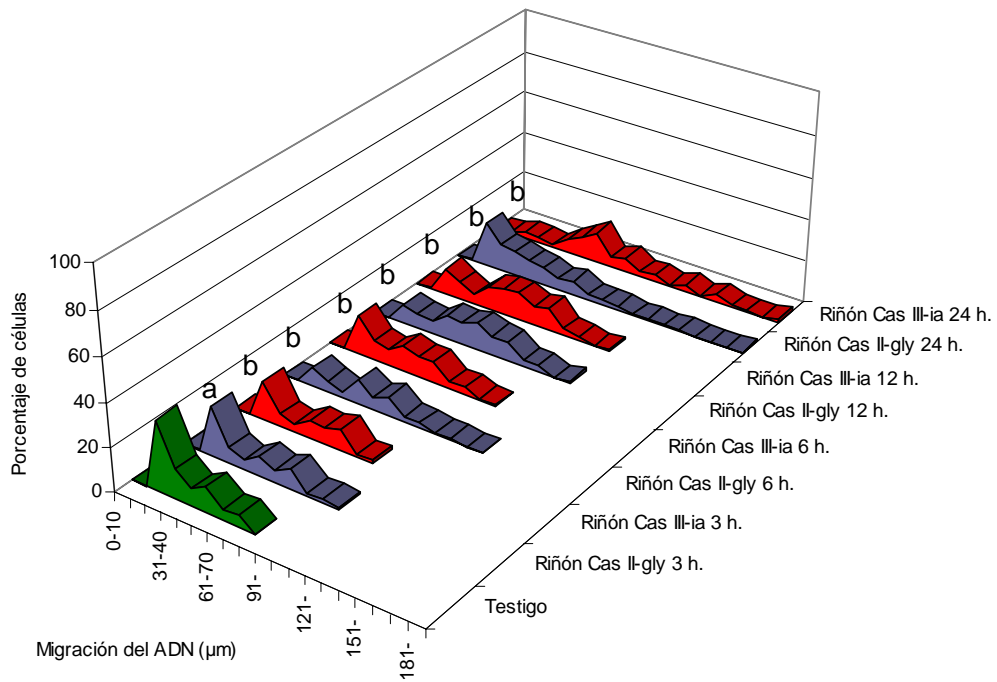
(A)



(B)



**Figura 6.** Daño al ADN en células grandes de testículo (A) y en células pequeñas de testículo (B) de ratones tratados durante 3, 6, 12, y 24 horas, con 4.4 mg/kg de la Casiopeína II-gly, y 7.3 mg/kg de la Casiopeína III-ia. Distribución de la migración del ADN (\*Cgt son células grandes de testículo y \*\*Cpt; son células pequeñas de testículo; <sup>a</sup> P < 0.01 y <sup>b</sup> P < 0.001, diferencias con respecto a su testigo).



**Figura 7.** Daño al ADN en células de riñón de ratones tratados durante 3, 6, 12, y 24 horas, con 4.4 mg/kg de la Casiopeína II-gly, y 7.3 mg/kg de la Casiopeína III-ia. Distribución de la migración del ADN (<sup>a</sup> P < 0.01 y <sup>b</sup> P < 0.001, diferencias con respecto a su testigo).

## 9. DISCUSIÓN

Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. Muchos, como el calcio (Ca), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), níquel (Ni), zinc (Zn) y cobre (Cu), son micronutrientes y constituyen parte esencial en los sistemas biológicos. En la célula catalizan reacciones, son mediadores en el metabolismo y en el transporte de oxígeno, estabilizan macromoléculas y están involucrados en la traducción de señales y en concentraciones altas algunos de ellos tienen propiedades genotóxicas (Rodríguez-Mercado y Altamirano Lozano, 2006).

Numerosos compuestos usados en quimioterapia tienen como centro en su estructura química un metal y esto ha permitido diseñar diversos fármacos que contienen Ag, Au, Ru, Ga, Fe, V y Pt, entre otros, sin embargo, resultan muy tóxicos para el humano (Collery *et al.*, 2002; Katsaros y Anagnostopoulou, 2002; Tiekink, 2002; Richardson, 2002; Desoize y Madoulet, 2002; Carswell *et al.*, 2002). Es por lo anterior que las Casiopeínas® han adquirido importancia en nuestro país y han traspasado fronteras.

Con la finalidad de conocer los efectos de la Casiopeína II-gly y III-ia, en este trabajo se analizó su capacidad para producir cambios en la viabilidad celular y de inducir rompimientos sobre la cadena del ADN de células obtenidas de diferentes órganos y tejidos de ratones tratados con estos compuestos.

Es importante resaltar que cuando se evalúan los rompimientos de cadena sencilla sobre el ADN con la técnica de EUG, siempre debe de ir acompañada por la prueba de viabilidad celular y de esta manera evitar dar falsos positivos (Henderson *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos muestran que la viabilidad en las células de sangre, de los ratones tratados con Casiopeína II-gly durante 12 horas, disminuye estadísticamente, debido a que en los cinco ratones los valores se redujeron de un 30 a un 35%. Por otro lado, la disminución observada en las células de sangre de los ratones tratados con Casiopeína III-ia durante 24 horas, se debe a que en dos ratones la viabilidad se redujo y en los otros tres fue mayor al 88% (**cuadro 3**). Esto se puede deber a una respuesta interindividual (Rodríguez-Mercado, 2001).

También se puede observar que la Casiopeína II-gly disminuye la viabilidad en los diferentes órganos excepto en el riñón y testículo a partir de las 12 horas de exposición y a las 24 horas

en corazón, hígado, bazo y testículo, mientras que, con la Casiopeína III-ia a partir de las 12 horas para bazo y 24 para testículo (**cuadro 3**).

Se conoce que la toxicidad de los fármacos antineoplásicos esta dada por su capacidad para causar lesiones graves, intoxicación, deterioro de la calidad de vida, e incluso la muerte del organismo. Los agentes quimioterapéuticos deben usarse a dosis que produzcan toxicidad en las células normales que no tienen proliferación, con proliferación lenta o rápida y en células tumorales (Di Saia y Creasman, 2002). El hecho anterior se observo en este trabajo con las dos Casiopeínas, pero en mayor medida con la Casiopeína II-gly que afecta a las células de más órganos, ya que en células de testículo y de tejido hematopoyetico con una proliferación rápida, como en células de hígado, corazón y bazo de proliferación lenta, se observa una disminución de la viabilidad, en tanto que para la Casiopeína III-ia el decremento se da en testículo y bazo. Dicho efecto posiblemente es producto de la dosis y el tiempo de exposición.

Hay pocos estudios realizados *in vivo* acerca de la viabilidad de las células tratadas con estos fármacos. Castañeda *et al.* (2004) utilizando ratones CD-1, encontró que la viabilidad espermática se reduce cuando se administra ip la Casiopeína II-gly en dosis de 1.1 y 2.2 mg/kg (que corresponden a 1/4 y 1/8 de la LD<sub>50</sub>) en tratamientos de 60 días.

Algunos estudios *in vitro* apoyan los resultados aquí presentados. Florín (2005), encontró que la Casiopeína II-gly en concentraciones de 1.04, 2.08, 4.17, 8.35 y 16 µg/ml, disminuye la viabilidad celular en leucocitos humanos en las dos dosis más altas con tres horas de exposición, lo cual indica que este compuesto produce daño en la membrana que puede conducir a la muerte de las células. En otro estudio en el que se emplearon células de leucemia de murino L1210 y carcinoma ovárico humana CH1, el mismo compuesto induce muerte celular por apoptosis y necrosis (De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2000), efecto que también se indujo en células HeLa al ser tratadas con Casiopeína II-gly y III-ia (Rodríguez-Aguilera, 2004).

Uno de los procesos que causa muerte celular es cuando se afecta la función mitocondrial, como lo es la actividad respiratoria que repercute directamente sobre los niveles de ATP (Alberts, 2003). Al respecto Marín-Hernández *et al.* (2003), encontraron que la Casiopeína II-gly y III-ia en células de rata provoca efectos de este tipo en mitocondrias aisladas y en



mitocondrias de células de corazón, hígado y riñón en concentraciones menores de 10 nmoles/mg, además de que la Casiopeína II-gly presentó efectos más potentes.

Los reportes anteriores apoyan los resultados de este trabajo, ya que al utilizar una dosis aguda de 4.4 mg/kg de Casiopeína II-gly y 7.3 mg/kg de Casiopeína III-ia, se observó que a partir de 12 horas de tratamiento hay disminución en la viabilidad celular, y la Casiopeína II-gly produce un daño celular mayor en más órganos utilizando una dosis menor en comparación a la administrada de Casiopeína III-ia.

En el **cuadro 3** de viabilidad y el **cuadro 4** de daño al ADN, no hay una relación directa entre ambos parámetros. La viabilidad disminuye a partir de 12 horas de tratamiento mientras que la media de la longitud de la migración del ADN se incrementa en todos los órganos en los diferentes tiempos utilizados, incremento que alcanza niveles máximos para las dos Casiopeínas en 12 horas, mostrándose siempre un efecto relacionado con el tiempo de exposición, lo que indica que el efecto genotóxico que observamos con el cometa es producto de la exposición al compuesto y no una consecuencia de la toxicidad celular.

Al comparar los resultados de los diferentes tiempos utilizando la Casiopeína II-gly, hay un incremento en la longitud de la migración constante desde las 3 y hasta las 24 horas de exposición en todos los órganos excepto en células grandes de testículo donde se da de 6 horas en adelante, de igual forma, los resultados obtenidos utilizando la Casiopeína III-ia muestran un comportamiento similar excepto en bazo y células grandes de testículo donde el aumento se da a partir de las 12 horas, con un incremento en la migración del daño al ADN dependientes del tiempo en todos los órganos (**Figura de la 4 a la 7**).

La importancia de clasificar las células en dos grupos; células grandes, donde se agrupo a las espermatogonias y espermatocitos primarios que son células diploides y células pequeñas donde se encuentran los espermatocitos secundarios y espermátidas que son células haploides (Altamirano-Lozano et al., 1999), es porque se observó que las células diploides son más resistentes al daño causado por las Casiopeínas que las haploides, esto corrobora los resultados obtenidos por Castañeda *et al.*, (2004) y Bocanegra (2005) en los cuales encontraron daño en espermatozoides.

Para entender un poco más la forma de actuar de los compuestos aquí utilizados es importante describir el metabolismo general de los agentes alquilantes como las mostazas nitrogenadas, las nitrosoureas, el busulfan y en especial el de cisplatino ya que las Casiopeínas fueron diseñadas en base a este fármaco y pueden actuar de manera similar. Muchos de estos fármacos ligan el grupo alquilo al ADN afectando su integridad y función, también puede unirse en varios sitios de los aminoácidos y las proteínas (Ruano y Calderón, 2001; Desoize y Madoulet, 2002).

El cisplatino es un complejo constituido por un átomo de platino rodeado por dos átomos de cloruro y dos moléculas de amoníaco en posición *cis* lo que le da la especificidad para interactuar con el ADN y las proteínas. Cuando se administra por vía intravenosa su desaparición del plasma describe una curva bifásica con vida media de 25 a 49 minutos y de 58 a 72 horas, respectivamente. Más de 90% del fármaco presente durante la segunda fase se encuentra unido a proteínas plasmáticas. Se elimina lentamente por el riñón y alcanza concentraciones altas y relativamente estables en hígado, riñón, intestino y testículo (Rivero y Tanimoto, 1999; Desoize y Madoulet, 2002). Al respecto, en este trabajo se encontró que las dos Casiopeínas causan daño en el ADN de las células de estos mismos órganos, esto puede indicar que estos compuestos se pueden estar acumulando en estas regiones del cuerpo.

No hay datos completos de la cinética del metabolismo de las Casiopeínas. Se ha reportado que la Casiopeína II-gly se une eficientemente a las proteínas plasmáticas como la albúmina (García y Fuentes, 2002), lo que implica que puede ser transportada a los diferentes órganos del cuerpo. Se conoce que la Casiopeína III-ia administrada en ratas macho Wistar, en dosis de 7 mg/kg, 67.3% es excretada en orina después de 59 horas (Romero, 2006).

De los resultados del presente estudio, la Casiopeína II-gly muestra mayor efecto genotóxico en comparación con los datos de la Casiopeína III-ia (**figura de la 4 a la 7**). Estas diferencias pueden deberse a que la familia de la Casiopeína III presenta una interacción mucho más débil con el ADN, que la familia de las Casiopeínas I y II como lo indica un trabajo *in vitro* realizado por Tovar-Tovar y Ruíz-Ramírez (1995), Tovar-Tovar *et al.* (1998; 2000; 2002) y Tovar-Tovar (2004). El daño en las células producido por estos compuestos es atribuido a la generación de radicales libres y el daño oxidante que son resultado de la reducción del Cu(II) y la probable disociación del complejo. (De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2003). Si las Casiopeínas se

unen al ADN por los mecanismos descritos, entonces, estos pueden incrementar la tasa de reparación, proceso que incluye cortes en el ADN que finalmente conducen a un aumento de rompimientos que el cometa revela como incremento en la longitud de la cola.

En un estudio previo en el laboratorio utilizando el cometa *in vitro*, Florín (2005) encontró que al administrar la Casiopeína II-gly (16.0, 8.35, 4.17, 2.75 y 1.43 µg/ml) en leucocitos humanos tratados a diferentes tiempos (10, 20, 30, 60 minutos y 3 horas) hay daño al ADN, con un efecto dependiente de la dosis y del tiempo. En los resultados obtenidos en esta tesis utilizando la misma metodología aplicada *in vivo* y en concentraciones diferentes, se observó incremento en la longitud del daño al ADN en las células de todos los órganos con un comportamiento dependiente del tiempo.

El ensayo cometa se considera como un indicador sensible para detectar daño primario en el material genético (Singh, 2000; Rodríguez-Mercado, 2006), por lo que la longitud de la migración en el ADN de este estudio se interpreta como producto de los rompimientos de cadena sencilla, sitios sensibles a la alcalinidad que son transformados en rompimientos y sitios donde se reparó una lesión.

Diversos estudios de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* indican que la Casiopeína II-gly y la Casiopeína III-ia inducen aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales, micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas. En un estudio previo realizado en el laboratorio utilizando linfocitos humanos, tratados por 72 horas con 0.33, 0.66 y 1.0 µg/ml de Casiopeína II-gly, se encontró disminución en los índices de división nuclear y mitótico, así mismo, aumentó la frecuencia de micronúcleos y en concentraciones altas aberraciones cromosómicas estructurales (Atilano, 2007).

Así mismo, en la búsqueda de conocer los efectos biológicos *in vivo*, estudios en *Drosophila melanogaster* han mostrado que las Casiopeínas producen mutaciones somáticas en los ojos y alas (Ruiz-Ramírez, 1993). En el modelo de ratones de la cepa CD-1, utilizando sangre periférica de machos, hembras preñadas con machos tratados y hembras sin preñar, la administración ip de 4.4 y mg/kg de Casiopeína II-gly en los tratamientos agudo y subcrónico no elevó la frecuencia de micronúcleos, sin embargo, se encontró un efecto positivo en los fetos obtenidos de las hembras tratadas subcrónicamente con 3.3 mg/kg (Santiago, 2004) además de un incremento en los defectos al nacimiento como son

malformaciones esqueléticas (González, 2004). La misma Casiopeína administrada a ratones machos durante 60 días, en diferentes dosis (0.55, 1.1 ó 2.2 mg/Kg), se encontró aumento en el peso de la vesícula seminal y epidídimo, disminución en el peso testicular, en el peso de las glándulas adrenales, de la glándula coagulante, de la próstata y en la movilidad espermática (Castañeda *et al.*, 2004).

Por otro lado, al administrar en murinos Casiopeína III-ia en diferentes dosis (1.75, 3.5 y 4.8 mg/kg) se observó una reducción en la motilidad espermática y en el número de espermatozoides, además de inducir alteraciones esqueléticas en la descendencia de los machos tratados (Bocanegra, 2005). Al respecto se sabe que muchos agentes quimioterápicos tienen efectos duraderos sobre las funciones del testículo y del ovario, particularmente los agentes alquilantes pueden causar azoospermia y amenorrea. (DiSaia y Creasman, 2002).

Muchos de los efectos embriotóxicos, reprotóxicos y teratogénicos causados por las Casiopeínas observados en los diferentes estudios realizados en el laboratorio (Santiago, 2004; González, 2004; Castañeda, 2004; Bocanegra, 2005) pueden ser el resultado del daño al material genético observado en la presente tesis.

## 10. CONCLUSIONES

- La Casiopeína II-gly y la Casiopeína III-ia producen citotoxicidad en las células de sangre, corazón, hígado, riñón y testículo a partir de 12 horas de tratamiento.
- La Casiopeínas II-gly y III-ia son agentes genotóxicos, debido al aumento en el número de las células con daño y al incremento de la longitud de los cometas en los tejidos y órganos analizados.
- Los tratamientos con la Casiopeína II-gly y III-ia siguen un comportamiento tiempo-dependiente tanto en la viabilidad como en el daño al ADN.
- La toxicidad celular se presenta a partir de 12 horas y el efecto genotóxico desde 3 horas de exposición.
- La Casiopeína II-gly produce efectos genotóxico y citotóxico más acentuados que la Casiopeína III-ia.
- Las células de los órganos más susceptibles al daño sobre el ADN son riñón e hígado seguidos de testículo y corazón, por lo que, estos podrían ser sitios blanco de las Casiopeínas.

**INDICE****CONFERENCIA MAGISTRAL****CF LAS INVESTIGACIONES SUSTENTABLES: SU RACIONALIDAD Y SUS RESPONSABLES***Dr. Rafael M. De Gasperin Gasperin***SIMPOSIO DE CANCER****SC1 PATOLOGIA DE LOS TUMORES NEUROBLASTICOS; EVALUACIÓN PRONOSTICA, EXPERIENCIA DEL CENTRO ESPAÑOL DE REFERENCIA DE LA SEOP PARA ESTUDIOS BIOPATOLOGICOS DEL NEUROBLASTOMA (1992-2005)***Dr. Samuel Navarro Fos***SC2 LA TERAPIA FOTODINÁMICA: ALTERNATIVA PARA LA DETECCIÓN Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER***Dra. Eva Ramón Gallegos***SC3 CASIOPEÍNAS, COMPUESTOS DE NOVO CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA: UN EJEMPLO DE DESARROLLO DE MEDICAMENTOS EN QUÍMICA MÉDICA***Dra. Lena Ruiz Azuara e Dra. Isabel Gracia Mora***SIMPOSIO DE DIABETES****SD1 EL VANADIO EN EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES, MANEJO.***Dr. Mario A. Altamirano Lozano***SD2 ALIMENTACIÓN EN EL PACIENTE DIABÉTICO***Dr. Jessica De Haene***SD3 DESARROLLO Y FUNCIÓN PANCREÁTICA***Dr. Ma. del Carmen Méndez Herrera***SD4 GENES DE LA DIFERENCIACIÓN PANCREÁTICA IMPLICADOS EN LA DIABETES. EVALUACIÓN GENÉTICO-MOLECULAR DE POBLACIÓN MEXICANA****Prefacio**

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

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

*Dra. Marta A. Menjívar Iraheta*

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

*Dr. María Teresa Tusié Luna*

**10 TOXICOLOGÍA REPRODUCTIVA INDUCIDA POR LA CASIOPEÍNA III-IA EN RATONES MACHO DE LA CEPA CD-1.**

*Bocanegra-Astivia, D. y Altamirano-Lozano MA.*

**11 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN IN VITRO DE POLISACÁRIDOS DE FRIJOL COMÚN (PHASEOLUS VULGARIS) Y SU ACTIVIDAD SOBRE LA SOBREVIVENCIA DE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON CaCo-2**

*Campos-Vega Rocio, Loarca-Piña Guadalupe y García-Gasca Teresa*

**12 EFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y APOPTÓTICO DE LA LACTONA SCKHURIOLIDA EN CÉLULAS PROVENIENTES DE CÁNCER CERVICOUTERINO CASKI**

*Cancino Pineda, D; Cano, A; Escobar-Sánchez, ML; Santiago Osorio, E y Sánchez-Sánchez, L.*

**13 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA DE LAS CITOCINAS INMUNOMODULADORAS IFN- , TGF- 1 E IL-4 Y SUS IMPLICACIONES EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER CÉRVICO UTERINO**

*Carbajal-Franco E, Terán-Porcayo MA, † Illades-Aguilar B, ‡ Madrid-Marina V, \_ Fernández-Tilapa G..*

**14 GLICEMIA BASAL Y GRADO DE ADIPOSIDAD EN ESTUDIANTES DE NUEVO INGRESO A LA UACJ: UNIVERSIDAD SALUDABLE**

*Carrasco K, Loya Y, Reyes G*

**15 CAS III-IA INDUCE APOPTOSIS EN HCT -15 A TRAVÉS DE MECANISMO DEPENDIENTES DE CASPASAS IN VITRO Y TIENE EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS IN VIVO**

*Francisco Carvallo-Chaigneau, Cristina Trejo-Solís, Celedonio Gómez-Ruiz, Ernesto Rodríguez-Aguilera, Lucía Macías-Rosales, Edith Cortés-Barberena, Carlos Cedillo-Peláez, †Isabel Gracia-Mora, Lena Ruiz-Azuara, Vicente Madrid-Marina, Fernando Constantino-Casas.*

**16 EFECTO ANTIPROLIFERATIVO IN VITRO DE UNA LECTINA DE FRIJOL TEPARI SOBRE DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER HUMANO.**

*Ana Luisa Castañeda Cuevas, Lorena Yllescas Gasca, Josué López Martínez, Elizabeth Mendiola Olaya, Alejandro Blanco Labra y Teresa García Gasca*

**17 ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO INDUCIDO IN VIVO POR LA CASIOPEÍNA II-GLY Y POR LA CASIOPEÍNA III-IA.**

*Cermeño-García JR, Rodríguez-Mercado JJ y Altamirano-Lozano MA*



## ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO INDUCIDO *IN VIVO* POR LA CASIOPEÍNA II-GLY Y POR LA CASIOPEÍNA III-IA.

Cermeño-García JR<sup>1</sup>, Rodríguez-Mercado JJ<sup>2</sup> y Altamirano-Lozano MA<sup>3</sup>. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Bioterio Campo II. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México. Correo: <sup>1</sup>rul\_left2003@yahoo.com.mx, <sup>2</sup>juserom@correo.unam.mx, <sup>3</sup>maal@servidor.unam.mx

### INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos con gran potencial anticancerígeno que presenten una eficacia aun mayor, una toxicidad reducida, así como un menor costo. En la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz, se han diseñado un grupo de más de 100 compuestos de coordinación agrupados en diferentes familias con centro metálico de cobre (Cu<sup>II</sup>) de formula general {Cu (N-N)(N-O)}NO<sub>3</sub> ó {Cu(N-N)(O-O)}NO<sub>3</sub>, análogos al cis-platino, que reciben el nombre de Casiopeínas. De los cuales la Casiopeína II-gly y III-ia han mostrado tener actividad antineoplásica en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Ruiz-Ramírez et al., 1991, 1993), muchos de estos efectos pueden estar relacionados con alteraciones en el ADN. Sin embargo, se tienen pocos datos acerca de los mecanismos que siguen estos fármacos y de la actividad genotóxica que pueden tener sobre el material genético de las células sanas.

### OBJETIVO

En este estudio se decidió evaluar el daño al ADN en las células de diferentes órganos de ratones machos de la cepa CD-1 expuestos durante 24 horas a ½ de la LD<sub>50</sub> de Casiopeína II-gly y de Casiopeína III-ia.

### METODOLOGÍA

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1, de edades entre ocho a doce semanas con peso de 30 a 35 gr. Los animales se colocaron en grupos de 5 individuos bajo condiciones controladas de humedad, temperatura (17 °C), 12 horas luz por 12 horas de oscuridad, comida (Purina Rat Chow, México) y agua al libitum. Los compuestos se disolvieron en solución salina y se administraron de manera intra-peritoneal (i.p.). Se contó con tres grupos experimentales, uno testigo, otro tratado con 4.4mg/kg de Casiopeína II-gly y el tercero tratado con 7.3 mg/kg de Casiopeína III-ia. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 24 horas después del tratamiento (tiempo elegido en base a experimentos previos). El corazón, el hígado, el bazo, el riñón y los testículos fueron disectados, lavados con medio de cultivo RPMI (Sigma Chemical Co., St, Louis, MO) y macerados para obtener células individuales. Se tomaron 30 µl de las muestras de cada órgano para determinar la viabilidad celular con dos colorantes fluorocromados de acuerdo con la técnica descrita por Strauss (1991) y 30 µl para evaluar el daño al ADN con la prueba del "cometa" de acuerdo con Tice *et al.* (1996) y las recomendaciones de Hartmann *et al.* (2003). Al mismo tiempo, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca y se siguieron los pasos anteriores. Los resultados de viabilidad fueron analizados con la prueba *t* de Student y los del cometa se analizaron con la prueba *U* de Mann-Whitney, comparando siempre los grupos tratados contra el grupo control.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Viabilidad Celular

En el Cuadro 1 se muestran los resultados de la viabilidad celular de los órganos y tejido de ratones machos de la cepa CD-1 tratados durante 24 horas con las dos Casiopeínas. Al comparar el grupo testigo con los grupos tratados se observó una disminución de la viabilidad en las células de el corazón, el hígado, el bazo, el riñón y el testículo cuando se aplico 4.4 mg/kg de la Casiopeína II-gly y en el bazo y el riñón cuando se aplico 7.3 mg/kg de la Casiopeína III-ia ( $P < 0.05$ ). Al respecto Marín-Hernández y colaboradores (2003), reportaron que en concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  la Casiopeína II-gly afecta la función de las mitocondrias, disminuye la actividad respiratoria y consecuentemente los niveles de ATP, mientras que por encima de esta concentración hay inhibición de la respiración, la cual puede producir muerte celular. Otros estudios *in vitro* han demostrado que las Casiopeínas inhiben el crecimiento celular en líneas tumorales humanas de Sarcoma S189, CaLo y HeLa (Ruiz-Ramírez *et al.*, 1993).

### Ensayo “cometa”

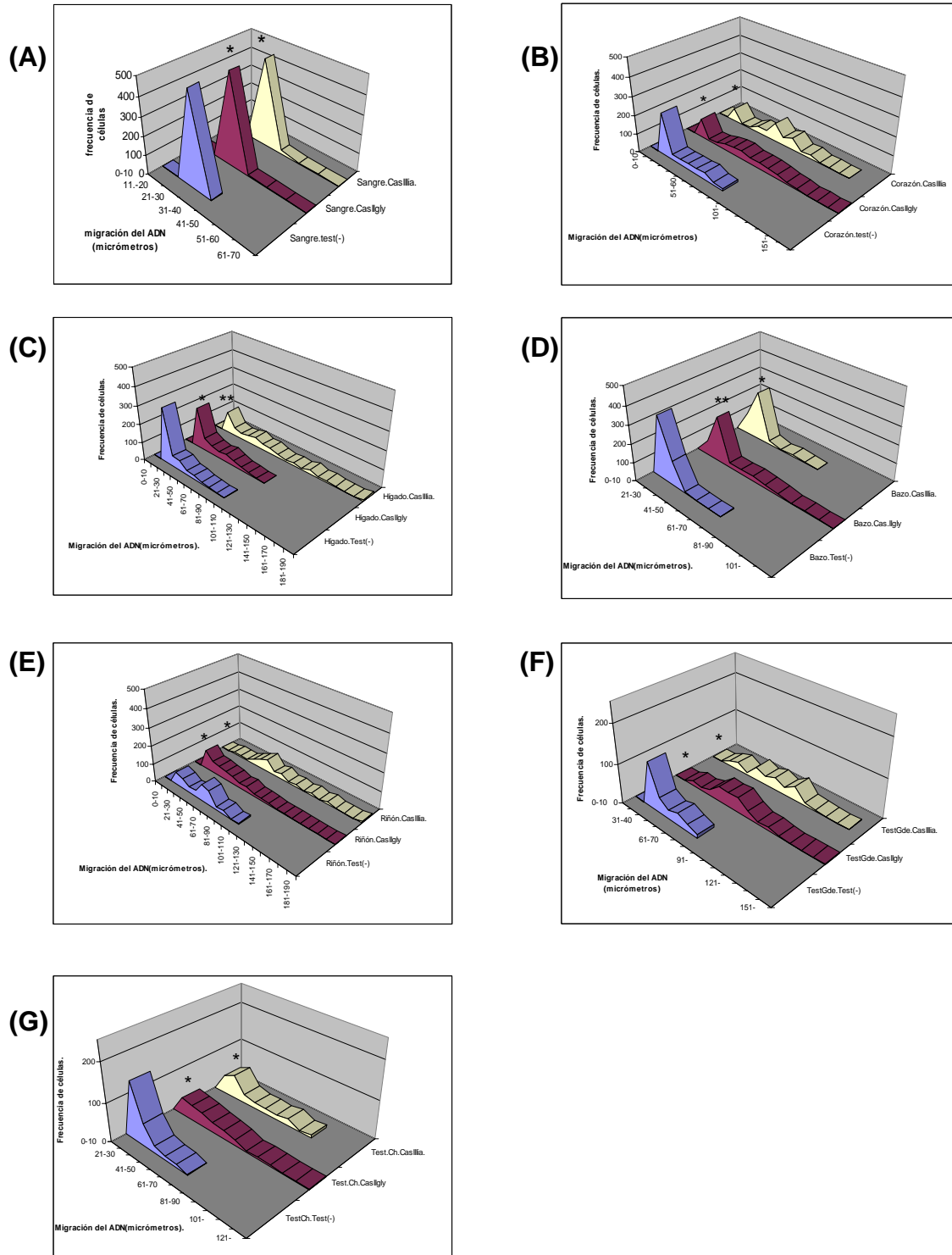
En la figura 2 se muestran los resultados de la longitud de los cometas de las células de la sangre, el corazón, el hígado, el bazo, el riñón, el testículo (este último dividido en dos mediadas células chicas y grandes de acuerdo con Altamirano-Lozano *et al.*, 1999). En todos los tejidos u órganos de los ratones tratados con ambas Casiopeínas se aprecia un incremento significativo con respecto al grupo control. Un incremento en la longitud de los cometas es indicativo de daño al ADN por rompimientos de cadena sencilla, sitios que en condiciones alcalinas son transformados en rompimientos y zonas escindidas durante la reparación (Singh *et al.*, 1988). Efectos como este han sido observados en cultivos de leucocitos humanos tratados *in vitro* con Casiopeína II-gly (Florín, 2005). Los datos obtenidos en el presente estudio aportan información importante acerca de los alcances de las Casiopeínas para producir daño primario al ADN por tratamientos *in vivo*.

**Cuadro 1.** Viabilidad celular de los tejidos de ratón de la cepa CD-1 tratados durante 24 horas con las Casiopeínas

	Viabilidad celular (500 células analizadas por tejido, resultados de 5 ratones por tratamiento)		
	Testigo	Casiopeína II-gly 4.4 mg/kg	Casiopeína III-ia 7.3 mg/kg
Sangre	93.80 $\pm$ 3.27	83.00 $\pm$ 10.13	68.40 $\pm$ 32.03
Corazón	97.40 $\pm$ 1.14	83.75 $\pm$ 6.70 **	91.80 $\pm$ 6.72
Hígado	92.80 $\pm$ 3.11	86.00 $\pm$ 4.18 *	91.00 $\pm$ 1.41
Bazo	93.20 $\pm$ 3.27	79.80 $\pm$ 7.29 **	66.20 $\pm$ 19.79 *
Riñón	94.20 $\pm$ 3.89	84.60 $\pm$ 3.78 **	85.20 $\pm$ 8.31 *
Testículo	95.40 $\pm$ 2.79	87.00 $\pm$ 4.47 **	93.20 $\pm$ 1.30

Los datos representan la media  $\pm$  DE

\*  $P < 0.05$  y \*\*  $P < 0.01$ , diferencias con respecto al grupo control



**Figura 1.** Longitud de la migración del ADN en células de sangre (A), corazón (B), hígado (C), bazo (D), riñón (E) y en células chicas (F) o grandes (G) de testículo de los ratones tratados con 4.4 mg/kg de Casiopeína II- gly ó 7.3 mg/kg de Casiopeína III-i.a (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, diferencias con respecto al grupo control).

## CONCLUSIONES

Los resultados de viabilidad en las células de los diferentes órganos mostraron que las Casiopeínas II-gly y III-ia son capaces de producir toxicidad celular en tratamientos de 24 horas. Por otro lado, la exposición i.p. a las Casiopeínas II-gly y III-ia inducen daño al ADN en las células de la sangre, el corazón, el hígado, el bazo, el riñón y el testículo, que se refleja en el incremento de la longitud de los cometas y el aumento de las células con daño. Lo anterior indica que estos compuestos pueden inducir genotoxicidad y citotoxicidad *in vivo*.

## REFERENCIAS

- Altamirano-Lozano M, Valverde M, Alvarez-Barrera L, Molina B y Rojas E. 1999. Genotoxic Studies of Vanadium Pentoxide ( $V_2O_5$ ) in male mice. II. Effects in Several Mouse Tissues. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and mutagenesis* 19:243-255.
- Florín RD. 2005. Estimación de los rompimientos de cadena sencilla inducidos en el ADN de leucocitos humanos de sangre periférica expuestos a Casiopeína II-gly. Tesis de Licenciatura. FES. Zaragoza, UNAM. México. 42,46pp.
- Hartmann A., Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V y Tice R.R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18:45-51.
- Marín-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L y Moreno-Sánchez R. 2003. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas) on mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.* 65:1979-1989.
- Ruiz-Ramírez L, Gracia MI, Moreno ER, Díaz D, Gasque L, Huerta L, Mayet L, Ortiz V y Lomelí C. 1991. The antitumor activity of several transition metal complexes. *J. Inorg. Biochem. Metals and medicine* 615.
- Ruiz-Ramírez L, Gracia-Mora I, y De La Rosa ME. 1993. Cytostatic, Mutagenic Antineoplastic activities and Preliminar Toxicity of Cooper (II) New Drugs: Casiopeínas I, II, III. *J. Inorg. Biochem.* 51:1-2.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR y Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191.
- Strauss GHS, 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT) I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res.* 252:1-15.
- Tice R, Andrews P y Vasquez M. 1996. Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. Revsed. Integrated Laboratory Systems P.O. Box 13501. Research Triangle Park, NC 27709. 1-8pp.

## 11. REFERENCIAS

- Alberts B**, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. 2003. Molecular biology of the cell. 3ª edición. Editorial Omega, S.A. España, pp 1387.
- Alpizar VA** y Fuentes I. 1998. Determinación del pka y el coeficiente de partición de la casiopeína III. 3ª Jornada de trabajo en Casiopeínas, Facultad de Química, UNAM. F3. pp 64-68.
- Altamirano BA**. 1994. Manual de manejo de animales de laboratorio. México: FES Zaragoza, UNAM.
- Altamirano-Lozano M**, Álvarez-Barrera L, Basurto-Alcántara F, Valverde M y Rojas E. 1996. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 16:7-17.
- Altamirano-Lozano M**, Valverde M, Álvarez-Barrera L, Molina B y Rojas E. 1999. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 19:243-255.
- Andress JM**, Frith CH, Goodman DG, Boysen BG y Cook CS. 1992. The mouse. En: Cox GS y Chengelis, C.P. (Eds.). Animal models in toxicology. New Cork: Marcel Dekker. pp 165-294.
- Atilano-Alvarado A**. 2007. Evaluación del daño genotóxico, citotóxico y citostático inducido por Casiopeína II-gly en cultivos de linfocitos. Tesis de Licenciatura. FES. Zaragoza, UNAM. México. pp 57.
- Bocanegra AD**. 2005. Toxicología reproductiva inducida por la Casiopeína III-ia en ratones machos de la cepa CD-1. Tesis de Licenciatura. FES. Zaragoza, UNAM. México. pp 29, 30, 32.
- Bravo ME**, Tovar A, Ruiz M, Ruiz-Ramírez L y Moreno ER. 2002. Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas. 5ª Jornada de trabajo 1º Congreso en Casiopeínas. pp 1-9.
- Carvallo-Chaigneau F**, Macias-Rosales L, Gómez RC, Madrid-Marina V, Constantino-Casas F, Gracia-Mora I y Ruiz-Azuara L. 2004. Evaluación preclínica de Casiopeína III-ia, II-gly y 5,6dm (acac) en tumores de colon xenotransplantados al ratón desnudo. 1º Congreso Nacional de Química Médica. Oaxaca, Oax. pp 125-130.
- Carswell E**. 2002. Cáncer mamario, el reto de hoy. Editorial Trillas SA de CV. Impreso en México D. F. pp 320.

- Castañeda PA**, Aragón-Martínez A y Altamirano-Lozano MA. 2004. Toxicidad reproductiva masculina de la Casiopeína II-gly. 1º Congreso Nacional de Química Médica. Oaxaca, Oaxaca. pp 135-138.
- Collery AP**, Keppler BB, Madoulet CC y Desoize CB. 2002. Gallium in cancer treatment Crit. Rev. Oncol. Hematol. 42: 283–296.
- Collins AR**. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. Mol. Biotechnol. 26: 249-261.
- Curtis H**, Sue BN, Schnek A y Flores G. 2001. Biología. 6ª edición en español. Editorial Médica Panamericana S. A. Madrid España pp 1496.
- De la Rosa D MaE**, Ruiz GM, Pérez HC, Ruiz-Ramírez L y Hernández VT. 2000. Genotoxicidad de nuevos compuestos antineoplásicos denominados Casiopeínas en *Drosophila Melanogaster*. 4ª Jornada de trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM, Instituto Nacional de Cancerología. pp 60-63.
- Desoize B** y Madoulet C. 2002. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. Crit Rev. Oncol. Hematol. 42: 317-325.
- De Vizcaya-Ruiz**, Rivero-Muller A, Ruiz-Ramirez L, Kass GEN, Kelland LR, Orr RM y Dobrota M. 2000. Induction of apoptosis by a novel copper- based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. Toxicol. *in vitro* 14: 1-5.
- De Vizcaya-Ruiz A**, Rivero-Müller A, Ruiz-Ramirez L, Howarth JA y Dobrota M. 2003. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. Toxicology 194:103–113.
- Di Saia PJ** y Creasman WT. 2002. Principios básicos de la quimioterapia Oncología, ginecología clínica. 6ª edición en español. Impreso en Madrid, España. pp 675.
- Dyban AP**, Punchkov VF, Samoshkina NA, Khozhai LI, Chebotar NA y Baranov VS. 1991. Laboratory mammals: Mouse (*Mus musculus*), rat (*Rattus norvegicus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and goleen hamster (*Crisetus auratus*). En: Dettlaff, T.A. y Vassetzky, S.G. (Eds.). Animal species for development studies. Vol. 2 Vertebrates. USA: Consultants Bureau New Cork. pp 353-437.
- Florín RD**. 2005. Estimación de los rompimientos de cadena sencilla inducidos en el ADN de leucocitos humanos de sangre periférica expuestos a Casiopeína II-gly. Tesis de Licenciatura. FES. Zaragoza, UNAM. México. pp 42-46.

- Fuentes NI**, Novelo T AM, Ruiz-Ramírez L y Macias RL. 2002a. Cinética *in vitro* de un nuevo fármaco antineoplástico (Casiopeína III-ia). 5<sup>ta</sup> Jornada de trabajo en casiopeínas. 1<sup>o</sup> Congreso en Casiopeínas. pp 115-120.
- Fuentes NI**, Ruiz RL, Tovar TA, Rico MH y Gracia MI. 2002b. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína III-ia in rat plasma. J. Chromat. B. 772: 115-121.
- García E**. 1991. Acute toxicity of casiopeine, a new type of cytotoxic agent. Proc. West. Pharmacol. Soc. 34:65-67.
- García-Ortuño LE**, Leal G MG, Sumano LH, Constantino CF, Mondragón V RL, Luna del Villar VJ, Gracia MI y Ruiz AL. 2004. Determinación de los efectos cardiotóxicos y sistémicos de la Casiopeína III-ia y su terapia adyuvante. 1<sup>o</sup> Congreso nacional de Química Médica. pp 45-48.
- García-Ortuño LE**. 2006. Estudio de los efectos tóxicos de la Casiopeína III-ia en perros. 2<sup>o</sup> Congreso Nacional de Química Médica. Querétaro, Qro. 5 de septiembre de 2006.
- García RMO** y Fuentes NI. 2002. Unión a proteínas de la Casiopeína II por el método de ultra filtración. 5<sup>a</sup> Jornada de trabajo 1<sup>o</sup> Congreso en Casiopeínas. pp 1-3.
- González AG**, Bello VH y Jiménez PE. 2001. Trastornos médicos frecuentes en oncología. Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores S. A. de C. V. Impreso en México. pp 244.
- González VME**. 2004. Efecto teratogénico de la Casiopeína II. Tesis de Licenciatura. FES. Zaragoza, UNAM. México.
- Gracia-Mora I**, Candanosa E, Quiroz RG y Ruiz AL. 1. 1994. Dosis letales de Casiopeínas en ratón, vía IP e IV. 1<sup>o</sup> jornada de Casiopeínas. Resumen No 8.
- Gracia-Mora I**, Ruiz AL, Sumano LH y Vargas GR. 2000. Evaluación preclínica de la actividad antineoplásica de dos nuevos compuestos de coordinación. 4<sup>ta</sup> Jornada de trabajo en Casiopeínas, Facultad de Química, UNAM. pp 18.
- Gracia-Mora I**. 2001. Knigth's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeínas, evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panel. Met. Bas. Drugs. Vol.8, Nr. 1.
- Harkness JE** y Wagner JE. 1989. The biology and medicine of rabbits and rodents 3<sup>th</sup> ed. Philadelphia, USA: Lea y Febiger. pp 372.

- Hartmann A.**, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V y Tice R.R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. Oxford University Press. Mutagen. 18: 45-51.
- Hernández-Esquivel L**, Marín-Hernández A, Pavón N, Carvajal K y Moreno-Sánchez R. 2006. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs Casiopeínas is related to inhibition of energy metabolism. Toxicol Appl. Pharmacol. 212: 79-88.
- Henderson L**, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C y Windebank S. 1998. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. Mutagen. Vol. 13:89-94.
- Katsaros N** y Anagnostopoulou A. 2002. Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 42: 297–308.
- Lane WP**. 1976. The laboratory mouse. In: the UFAW handbook of the care and management of laboratory animals. 5<sup>th</sup> ed. USA: UFAW (Universities Federation for Animal Welfare). Edinburgh: Churchill Livingstone pp 206.
- Lezama CJ**, Ruiz-Azuara L, De la Rosa Ma.E, Hernández VT y Gracia MI. 1996. Estudio radiofarmacocinético de Casiopeínas. 2<sup>da</sup> Jornada de trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM. E.3: pp 67-70.
- Marín-Hernández A**, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L y Moreno-Sánchez R. 2003. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas) on mitochondrial functions. Biochem. Pharma. 65:1979-1989.
- Márquez A**, Romero L y Marín A. 2000. Evaluación Antineoplásica *in vitro* de nuevos fármacos (Casiopeínas) empleando líneas tumorales humanas y murinas. 4<sup>a</sup> Jornada de trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM, Instituto Nacional de Cancerología. pp 4.
- Marques de Cantú**, M. J. 1991. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. Ed. McGraw-Hill. México. pp 655.
- Olivares, M**, Uauy R. 1996. Copper as an essential nutrient. Am. J. Clin. Nut. Bethesda 63: 791S.
- Rendón GE** y Tenorio ME. 1998. Determinación farmacocinética de las Casiopeínas II y III en ratón, por absorción atómica. 3<sup>a</sup> Jornada de trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM. pp 43.
- Reyes L**, Fuentes-Noriega I, Ruiz-Ramirez L y Macias L. 2003. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína II-gly in rat plasma. J. Chromat. B, 791: 111-116.

- Reyes VL** y Ruiz-Azuara L. 2000. Farmacocinética de la Casiopeína II en conejos. 4<sup>ta</sup> Jornada de trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM, Instituto Nacional de Cancerología. pp 77-80.
- Richardson DR.** 2002. Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 42: 267–281.
- Rivero SO y Tanimoto WM,** 1999. Uso de los medicamentos en la clínica. Consejo de salubridad general AMFEM. McGraw-Hill, Interamericana editores, México DF. pp 542.
- Rodríguez-Aguilera E,** Ruiz-Azuara L, Gómez RC, Macias RL, Téllez AL, Cortéz BE, Ortiz MR y Gracia-Mora I. 2004. Efecto de seis Casiopeínas de las familias I, II y III, sobre el ciclo celular en células HeLa. 1<sup>er</sup> Congreso Nacional de Química Médica. Oaxaca, Oax. pp 138-140.
- Rodríguez-Enríquez S,** Paola A, Vital-González, Fanny L. Flores-Rodríguez, Marín-Hernández A, Ruiz-Azuara L y Moreno-Sánchez R. 2006. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 215: 208-217.
- Rodríguez-Mercado JJ.** 2001. Evaluación de los efectos genotóxico y citotóxico inducidos en cultivos de células de sangre periférica expuestos a tetraóxido de vanadio. Tesis de Maestría. FES. Zaragoza, UNAM. México. pp 69.
- Rodríguez-Mercado JJ,** Roldán-Reyes E y Altamirano-Lozano M. 2003. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. Toxicol. Lett. 144: 359-369.
- Rodríguez-Mercado JJ y Altamirano-Lozano MA.** 2006. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. Rev. Int. Contam. Ambient. 22: 173-189.
- Rojas E,** Lopez VM. 1999. Single cell electrophoresis assay: Meth. Appl. Chromat. B, 722: 225-254.
- Romero de L. LC,** Márquez QA, Gracia MI, Muller CG y Ruiz AL. 1996. Estadio de la estabilidad de las Casiopeínas II y III en soluciones fisiológicamente compatibles. 2<sup>da</sup> Jornada de trabajo en Casiopeínas, Facultad de química, UNAM. A.5. pp 20-22.
- Romero de L LC,** Márquez QA, Gracia MI, Muller CG y Ruiz AL. 1998. Estabilidad de las Casiopeínas II y III en soluciones fisiológicamente compatibles. 3<sup>ra</sup> Jornada de trabajo en Casiopeínas, Facultad de química, UNAM. A2: pp 4-7.



- Romero RA.** 2006. Estudio preliminar de farmacocinética en ratas con análisis de datos urinarios de Casiopeína III-ia. 2º Congreso Nacional de Química Médica. Queretaro, Qro. 6 de septiembre de 2006.
- Ruano A JM,** y Calderón E CA. 2001. Principios de quimioterapia Oncología Medico-quirúrgica Pediátrica. Mc Graw-Hill Interamericana. Impreso en México DF. pp 385.
- Ruiz AL,** Moreno ER, Ferrer SG y Gasque SL. 1994. Diseño, síntesis y caracterización de las Casiopeínas. 1ª Jornada de Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM. pp 1-4.
- Ruiz-Ramírez L,** Gracia MI, Moreno ER, Díaz D, Gasque L, Huerta L, Mayet L, Ortiz V y Lomelí C. 1991. The antitumor activity of several transition metal complexes. J. Inorg. Biochem. 43: 615.
- Ruiz-Ramírez L,** Gracia-Mora I y De La Rosa ME. 1993. Cytostatic, Mutagenic Antineoplastic activities and Preliminar Toxicity of Cooper (II) New Drugs: Casiopeínas I, II, III. J. Inorg. Biochem. 51:1-2.
- Ruiz-Ramírez L.** 1995. Casiopeínas, metal –based drugs a new class of antineoplastic and genotoxic compounds. Metals in Medicine. J. Inorg. Bioch. 207.
- Santiago MY.** 2004. Efecto genotóxico de los tratamientos agudo y subcrónico de la Casiopeína II-gly en machos, hembras preñadas y fetos de ratón CD-1. Tesis de Licenciatura. FES. Zaragoza, UNAM. México. pp 46.
- Senra V AA.** 2002. El cáncer: epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención. Ediciones Harcourt .S.A. Impreso en España. pp 183.
- Singh NP,** McCoy MT, Tice RR y Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175: 184-191.
- Singh NP.** 2000. Microgel for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. Mutat. Res. 455: 111-117.
- Strauss GHS.** 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT) I. Toxic and immunotoxic effects. Mutat. Res. 252, 1-15.
- Tice R** y Andrews P. 1992. Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in various organs of medaka. Friend Integrated Laboratory Systems P.O. Box 13501. Research Triangle Park, NC 27703 (919) 544-4589.

- Tice R**, Andrews P y Vasquez M. 1996. Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. Integrated Laboratory Systems P.O. Box 13501. Research Triangle Park, NC 27709 (919). 1-8.
- Tice RR**, Aguerri E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC y Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:206-221.
- Tiekink RTE**. 2002. Gold derivatives for the treatment of cancer. *Crit. Rev. Oncol/Hematol.* 42: 225–248.
- Tovar-Tovar A y Ruíz-Ramírez L**. 1995. Interaction of Casiopeínas III with methionine, adenosinemonophosphate, puric and pyrimidic bases. *J. Inorg. Bioch.* 206 Abstracts.
- Tovar-Tovar A**, Ruiz-Azuara L y Campero CA. 1998. H2 Interacción Casiopeínas – Constituyentes del DNA. Espectroscopia electrónica y RPE (en solución). 3ª Jornada de trabajo en Casiopeínas, Facultad de Química, UNAM. pp 69-72.
- Tovar-Tovar A**, Ruiz-Azuara L y Campero CA. 2000. Interacción Casiopeínas-constituyentes del ADN. 4ª Jornada de trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM. pp 91-94.
- Tovar-Tovar A**, Ruiz-Azuara L y Campero CA. 2002. Interacción entre Casiopeínas y adenina. 1º Congreso en Casiopeínas. 5ª Jornada en Casiopeínas. Taxco, Guerrero. pp 121-128.
- Tovar-Tovar A**. 2004. Dos formas diferentes de interacción entre complejos mixtos de cobre (II) (Casiopeína) y Adenina, como una aproximación a su selectividad. 1º Congreso Nacional de Química Médica. Oaxaca, Oax. pp 159-161.
- Trejo-Solís C**, Palencia HG, Zúñiga S, Rodríguez RA, Osorio RL, Márquez RL, Cruz SA, Ruiz-Ramírez L y Sotelo J. 2004. Casiopeína II-gly induce apoptosis sobre células de glioma C6 de rata *in vitro* e *in vivo* a través de mecanismos dependiente e independiente de caspasas. 1º Congreso nacional de Química Médica. pp 89, 90.
- Trejo-Solís C**, Palencia G, Zúñiga S, Rodríguez-Ropony A, Osorio-Rico L, Sánchez Torres Luvaiy, Gracia-Mora I, Márquez-Rosadoy L, Moreno-García ME, Cruz A, Bravo-Gómez MaE, Ruiz-Ramírez L, Rodríguez-Enríquez S y Sotelo J. 2005. Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells *in vitro* and *in vivo* through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia.* 7: 563-574.
- [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx). (Consultado el 12 de febrero de 2007).