



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGO

“Evaluación del daño genotóxico provocado por la Cas III-Ea y  
efecto en varios órganos de ratón macho Cepa CD-1”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA:

**ALFONSO OSIRIS CAMARGO SÁNCHEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO

México, D.F.

Septiembre de 2011





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*"Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y  
no en el resultado. Un esfuerzo total es una  
victoria completa."*

**Mahatma Gandhi**

## *Dedicatoria.*

*A mi papa por siempre apoyarme, por darme lo mejor de sí, por tantos consejos, que me das, por todas las risas que me provocas, por todo tu tiempo, por todo el amor que sé que me tienes y que aunque no te lo diga es reciproco, y eres un pilar fundamental de lo que ahora soy Gracias Quique. Te quiero mucho papa, espero dures mucho tiempo a mi lado.*

*A mi mamita, gracias por siempre estar preocupada por mí, por siempre tratar de que no me falte nada, por siempre tratar de apoyarme en mis decisiones aunque sé que a veces son muy desatinadas, por siempre preguntar cómo me estoy, y aunque nunca te lo digo, te quiero muchísimo, más de lo que te imaginas mami, espero que al igual que mi papa dures muchos muchos años más. Gracias por existir PAPIS.*

*A mi hermano, porque aunque no nos llevamos como los grandes amigos, compartimos muchas cosas en común y empezamos a entendernos y luchar juntos, Gracias Alex por el apoyo que me das, también te quiero aunque nunca te lo diga.*

*A mis hermanos adoptados, Carlos (chopo), Víctor (Miguel Ángel), y Adrián (Choker), por siempre estar disponibles, por los momentos alegres y tristes que compartimos y seguiremos compartiendo, por darme su amistad incondicional, espero jamás separarnos los quiero.*

*A mis amigos; Cesar por tantas conversaciones en el salón, por las fiestas que terminaban en pláticas de quien sabe que, por los consejos, a Mitzi por pasarme las tareas, hacer mis trabajos, por darme consejos, por ser tan enojona por todos esos momentos chistosos gracias Pisto, a Raúl por siempre hacerme reír, por ayudarme cuando no entendía, por siempre ser honesto gracias Piruja, a Vero, Mari, Roberto, porque siempre me hacen reír y siempre están cuando los necesito gracias, a Miriam por ayudarme con mis experimentos, por hacer que casi repruebe IBM por ayudarme en mis experimentos del labo, a Destroyer pues por ser tan aventado por decir lo que piensas aunque sean perversiones y por cuidarme cuando me querían violar jajaja, a Víctor por todas las aventuras que pasamos y los conciertos que fuimos, A Ivette por ser tan fresca y tan borracha jajaja.*

## *Agradecimientos.*

*Al Dr. Mario Altamirano, por aguantarme tanto tiempo, por el tiempo que me dedico, aunque tenía mil ocupaciones, por la excelente persona que es, por los excelentes convivios que tuvimos.*

*Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado, por sus críticas, aunque a veces en el momento no las tomaba a bien, por ser una persona que le gusta compartir su conocimiento y por aceptar ser mi sinodal.*

*A los miembros del jurado.*

*El Presidente: M. en C. Carlos Bautista Reyes.*

*Vocal: Dr. Mario Altamirano Lozano.*

*Secretario: M. en C. Raúl Zavala Chavero.*

*Suplente: Biól. Carlos Martínez Montoya.*

*Suplente: Biól. Juan José Rodríguez Mercado.*

*Por su valioso tiempo, por sus críticas y sugerencias.*

*Al Biól. Rodrigo Aníbal Mateos Nava, por siempre tratar de que entendiera lo que estaba haciendo, también porque pudimos llegar a entablar una amistad.*

*A Paula García Zamora, por ayudarme en todos mis experimentos, por ser siempre una persona ecuánime y por lo que alguna vez compartimos.*

## Índice.

<b>I.-Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1.-Cáncer.....	1
1.2.- Metástasis.....	3
1.3.- Clasificación de los tumores cancerosos.....	4
1.4.- Causas del cáncer.....	5
1.5.- Tratamientos.....	7
1.6.- Farmacología.....	10
1.7.- Desarrollo farmacológico.....	11
1.8.- Ensayos clínicos.....	13
1.9.- El ratón.....	15
1.10.- Cobre.....	15
1.11.- Casiopeínas.....	17
1.12.- Casiopeína III-Ea.....	19
1.13.- Electroforesis Unicelular en gel.....	20
<b>II.- Justificación.....</b>	<b>22</b>
<b>III.- Objetivos.....</b>	<b>23</b>
3.1.- Objetivos particulares.....	23
<b>IV.- Hipótesis.....</b>	<b>24</b>
<b>V.-Material y Método.....</b>	<b>25</b>
5.1.- Animales.....	25
5.2.- Sustancias Químicas y Tratamientos.....	25
5.3.- Grupos.....	25
5.4.- Sacrificio.....	26

5.5.- Prueba de Viabilidad .....	26
5.6.- Electroforesis Unicelular Alcalina en Gel .....	27
5.7.- Análisis estadístico .....	28
<b>VI.- Resultados .....</b>	<b>29</b>
<b>VII. Discusión .....</b>	<b>47</b>
<b>VIII.- Conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>IX.- Referencias .....</b>	<b>57</b>

---

# I. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. CÁNCER.

El término cáncer deriva del latín *cancrem*, cangrejo, que a su vez procede del griego *carcinus*, cangrejo de mar, por las similitudes de crecimiento excéntrico, como las patas de un cangrejo. Aunque suele admitirse que los términos tumor y neoplasia son sinónimos de cáncer, lo cierto es que deberían seguirse del adjetivo maligno para diferenciarlos de los tumores y neoplasias benignos.

La existencia del cáncer se conoce desde la antigüedad y así en los viejos manuscritos de Egipto y de la India. A pesar de estos antecedentes históricos ha sido preciso llegar al último tercio de del siglo XX para que se pueda entender los mecanismos moleculares que suceden en la transformación de células normales en neoplásicas. Así como también para poder desarrollar tratamientos. Tan solo recientemente la sociedad ha tomado conciencia del terrible impacto que supone la elevada frecuencia y mortalidad del cáncer (Díaz y García, 2000); incluso en los países occidentales es la segunda causa de muerte (William *et al.*, 2006).

A nivel mundial, el cáncer es la primera causa de mortalidad. En 2007, fallecieron en el mundo por alguna neoplasia 7.9 millones de personas que representan 13% de las defunciones generales. Se observa que en México, al igual que en el plano internacional, existe un incremento en los casos de cáncer (INEGI, 2010).

De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, se espera que las muertes por neoplasias sigan en aumento y alcancen 12 millones de casos para 2030 (OMS, 2010).

La enfermedad cancerosa, es como cualquier otra, es el resultado de la interacción de un agente causal y la reacción viva del organismo. Es una enfermedad crónica evitable, curable en un elevado número de casos, con una



historia natural que se aparta de los modelos habituales de las enfermedades agudas (Senra, 2002).

El cáncer es una enfermedad que ataca los procesos básicos de la vida de la célula, alterando en casi todos los casos el genoma celular y dando lugar a un crecimiento indómito y diseminado de las células afectadas. La causa de la alteración del genoma es la mutación de uno o más genes o en algunos casos, la adición o pérdida de grandes segmentos de cromosomas (Guyton, 1984).

Solo una fracción mínima de las células que mutan en el organismo causa alguna vez cáncer (Guyton, 1984). Solo se necesita el azar para que se lleven a cabo las mutaciones, de tal forma que debemos suponer que un gran número de canceres resulta simplemente de un hecho desafortunado (Guyton, 1984).

No obstante, la probabilidad de mutaciones puede aumentar varias veces cuando una persona se expone a ciertos factores químicos, físicos o biológicos (Guyton, 1984).

Las células cancerosas se multiplican en forma desordenada e incontrolada y forman tejidos inútiles que desplazan y destruyen a las células normales. Solo las células cancerígenas se pueden desprender de un tumor maligno y entrar al sistema circulatorio o al sistema linfático. Esa es la forma en que el cáncer se expande desde el tumor original (primario) hasta formar nuevos tumores en otras partes del cuerpo. Esta expansión del cáncer se denomina metástasis (Guyton, 1984).

Todas las células cancerosas comparten dos propiedades fundamentales: (1) crecimiento y proliferación celular anormal, y (2) anomalías en las restricciones que evitan que las células se propaguen e invadan otras partes del cuerpo (**metástasis**) (William *et al.*, 2006).

La mayoría de la mortalidad relacionada con el cáncer es a causa de la metástasis de las células tumorosas originales hacia sitios distantes del tumor inicial o primario.

Generalmente, el desarrollo de un cáncer comprende muchas etapas, cada una de las cuales está gobernada por múltiples factores: algunos de ellos son dependientes de la constitución genética de los individuos, otros son dependientes de su entorno y su modo de vida. Por lo tanto cambiando nuestro medio ambiente o nuestros hábitos podemos, en principio, ser capaces de reducir notablemente nuestra posibilidad de desarrollar casi cualquier tipo dado de cáncer (Alberts *et al.*, 1996).

## 1.2.- METÁSTASIS.

La capacidad de las células tumorales para diseminarse y formar metástasis en lugares diferentes al tumor primario puede considerarse como una de las fases de la progresión tumoral, aunque probablemente continúan produciéndose cambios genéticos en el tumor primario y en sus metástasis a medida que siguen creciendo. (Rubin, 2003).

La mayoría de la mortalidad relacionada con el cáncer es a causa de la metástasis de las células afectadas originales hacia sitios distantes del tumor inicial o primario.

La metástasis es un proceso por el cual las células cancerosas migran a través del cuerpo. La cascada metastática se refiere a una serie de pasos secuenciales en los cuales las células del tumor migran desde la masa tumoral, entran en un compartimiento por ejemplo, vasos sanguíneos o linfáticos, para ser transportadas, salen de la circulación y proliferan en un sitio secundario (Schwab, 2001).

El proceso de metástasis puede dividirse en diferentes fases que incluyen

- Salida del tumor primario hacia la circulación.
- Supervivencia a la circulación.
- Llegada a la nueva localización.
- Salida de la circulación.

- Migración hacia el espacio intersticial en la nueva localización e inicio del crecimiento.

Esto va seguido por el inicio de la formación de nuevos vasos (angiogénesis) para proporcionar nutrientes a la masa tumoral en crecimiento (Rubin, 2003).

### 1.3.-CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES CANCEROSOS.

Es fundamental establecer una clasificación tumoral que se base en aspectos anatómicos e histológicos (Rubin, 2003).

Muchos comités nacionales e internacionales tratan de elaborar una nomenclatura estándar. El principal problema reside en evitar la excesiva complejidad en las descripciones que pudieran limitar su uso clínico (Rubin, 2003).

Las dos principales agencias implicadas en la clasificación de las enfermedades tumorales son el Comité Americano para el Cáncer y la International Unión Contra el Cáncer (Rubin, 2003).

Los tumores se clasifican según

- Clasificación histopatológica.

Las dos características principales son el tipo de tumor y el grado de malignidad del tipo dominante.

- Tipo histológico.

La importancia de diferenciar el tipo histopatológico de un cáncer se establece fácilmente con los ejemplos de las neoplasias ováricas y testiculares. Ya que los dos requieren de un tratamiento diferente y el pronóstico es muy diferente entre estas dos neoplasias.

- Grado de malignidad.

El grado de malignidad suele ser más importante que el tipo en cuanto a pronóstico.

- Clasificación anatómica por estadios.

Pierre Denoix introdujo en 1944 el sistema tumor, ganglios, metástasis (TNM), varios autores han añadido numerosas variaciones:

#### TNM

- Categoría T Según extensión o tamaño del tumor primario.
- Categoría N Indica el estado de los ganglios linfáticos regionales.
- Categoría M Indica la presencia de metástasis a distancia.

- Tumores según el tejido del que derivan.

- De origen epitelial (carcinomas): Carcinoma escamoso o epimoide, carcinoma basocelular, carcinoma transicional, melanoma, adenocarcinoma, hepatocarcinoma, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma adenoescamoso, etc.
- Tumores de origen mesenquimal (sarcomas): leucemias, linfomas, mieloma, fibrosarcoma, liposarcoma, osteosarcoma, condrosarcoma, leiosarcomara, rabdomiosarcoma, tumores maligno neuroendocrino, linfagiosarcoma, etc.
- Otros tumores malignos: Existen tumores de origen desconocido, como el tumor Edwing u otras formas mixtas.

#### 1.4.- FACTORES CAUSANTES DE CÁNCER.

Las teorías de la carcinogénesis explican todos los casos por los siguientes factores

Es debida a una serie de factores exógenos: agentes químicos (más del 90% de los casos), agentes físicos y agentes biológicos (Senra, 2002). Algunos de ellos son los siguientes: 1) Se sabe bien que la radiación ionizante como los rayos X y gamma, y las emanaciones de sustancias radiactivas, e incluso la luz ultravioleta, pueden predisponer al cáncer, 2) Las sustancias químicas de ciertos tipos también

tienen gran propensión a causar mutaciones (Guyton, 1984), 3) Biológicamente se han relacionado causalmente con el cáncer una serie de bacterias y virus. Los agentes virales no son capaces de producir un cáncer por sí mismos, requieren una segunda infección previa o posterior por otro virus o la actuación de un segundo agente químico o físico (Senra, 2002)

Hay unos factores endógenos muy importantes en el desarrollo de la enfermedad cancerosa

- Factor hereditario en los tumores malignos. En muchas familias hay una gran tendencia hereditaria al cáncer. Ello se debe probablemente a que la mayor parte de las neoplasias necesitan no solo de una mutación sino de dos o tres mutaciones antes de que ocurra el cáncer (Guyton, 1984). Aunque este factor afecta a menos del 5% de todos los casos de cáncer observados en nuestro país y cuya frecuencia relativa es cada vez menor (Senra, 2002). La vasta cantidad de experimentación realizada en este aspecto de las neoplasias, principalmente en ratones, ha demostrado que la producción de un tumor por una sustancia reconocida como carcinógena depende de la relatividad susceptible no solo individual, sino del órgano o del tejido en cuestión. La susceptibilidad o la falta de ella, es transmitida de una generación a la siguiente. Por ejemplo, ciertas líneas de ratones son altamente susceptible al carcinoma de la piel, pero resistentes a otros tipos (Hilton *et al.*, 1962).
- Factor inmunitario, que nos explica la mayor frecuencia de tumores malignos en los individuos trasplantados que son tratados con sustancias que le suprimen la inmunidad y en los enfermos de SIDA.
- Factores hormonales, especialmente en el grupo de tumores hormodependientes: cáncer de mama, adenocarcinoma de endometrio, cáncer de próstata y otros.
- Factores nutritivos. Doll y Peto publicaron unas estimaciones según las cuales podía atribuirse a la dieta el 35% de todos los canceres (Díaz y

García, 2000). La abrasión continua de los recubrimientos del tubo intestinal por algunos alimentos es causa de cáncer (Guyton, 1984).

El hecho de que una infección viral pudiera promover una neoplasia fue sospechado ya en principios del siglo (Díaz y García, 2000). En animales de experimentación algunos virus pueden causar ciertos tipos de cáncer, incluyendo leucemia (Guyton, 1984).

Los parásitos merecen alguna atención como agentes productores de irritación que puede generar una neoplasia. Como por ejemplo, la bilarciasis, mejor conocida como esquistosomiasis (*Schistosoma hematobium*), ha sido considerada como causa de carcinoma en la vejiga humana (Hilton *et al.*, 1962).

### 1.5.- TRATAMIENTOS.

Clásicamente ha sido el cirujano primero y el radioterapeuta después los que se han encargado del tratamiento del enfermo neoplásico (Díaz y García, 2000, Lewis *et al.*, 2004).

El principio terapéutico básico es curar al paciente con la menor afectación estructural y funcional. La decisión sobre lo radical que deba ser el tratamiento se determina por una combinación de factores (Rubin, 2003)

- Agresividad del cáncer.
- Predicción respecto a su diseminación.
- Morbilidad y mortalidad del procedimiento terapéutico.
- Tasa de curación del tratamiento planeado.
- La tasa o ventana terapéutica.

La cirugía es el tratamiento más antiguo del cáncer y hasta fechas recientes fue la única modalidad terapéutica de la enfermedad. El tratamiento quirúrgico del cáncer ha cambiado de forma espectacular en las últimas décadas. Los avances en la técnica quirúrgica y anestésica, así como la mayor comprensión de la biología del

cáncer, han proporcionado a los cirujanos las bases para efectuar resecciones quirúrgicas a un mayor número de pacientes (Celorio *et al.*, 1986).

Las células cancerosas pueden ser extirpadas quirúrgicamente o destruidas con agentes tóxicos o radiación, pero es difícil erradicarlas todas y cada una de ellas. La cirugía raramente puede descubrir todas las metástasis, y los tratamientos que matan las células cancerosas generalmente también son tóxicos para las células normales. Además con que queden unas cuantas células cancerosas pueden proliferar y producir un resurgimiento de la enfermedad; a diferencia de las células normales, pueden desarrollar resistencia a los tóxicos utilizados en su contra.

#### HORMONOTERAPIA

En 1896, Beatson demostró la eficacia de la castración en un cáncer de mama metastásico de una mujer premenopáusica (Díaz y García, 2000). Desde entonces se sabe que las hormonas gobiernan la vida el crecimiento y la muerte de los tejidos y tumores hormonodependientes.

#### TRATAMIENTO BIOLÓGICO

El tratamiento puede ser eficaz solo o en combinación con cirugía, radioterapia y quimioterapia. El tratamiento biológico o tratamiento modificador de la respuesta biológica, consiste en agentes que modifican la relación entre huésped y el tumor, al alterar la respuesta biológica del huésped a las células tumorales. Los fármacos biológicos afectan la respuesta huésped-tumor de tres maneras: 1) tienen efectos antitumorales directos; 2) restauran, aumentan o modulan los mecanismos del sistema inmunitario del huésped y 3) tienen otros efectos biológicos como la interferencia con la capacidad de las células cancerosas para metastatizar o diferenciarse (Lewis *et al.*, 2004).

#### TERAPIA GÉNICA

En los últimos años, el trasplante células progenitoras, como forma de rescatar el sistema hematopoyético, ha pasado de ser un tratamiento experimental, en pacientes sin otra alternativa terapéutica, a ser el tratamiento de elección en

algunas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. Los avances en el conocimiento de la biología del trasplante así como de las mejoras en el tratamiento de soporte (transfusiones, nutrición, antibióticos) han disminuido la mortalidad y morbilidad del trasplante, lo que se ha traducido en un aumento exponencial en el número de trasplantes de células progenitoras realizados (Díaz y García, 2000).

Además del trasplante de células hematopoyéticas a partir de un donante compatible (trasplante alogénico), el tratamiento con dosis altas de quimioterapia seguidas del trasplante autólogo de progenitores (infusión de las propias células del enfermo) ha ocupado en lugar relevante como terapia de enfermedades hematológicas (linfomas, leucemias, mielomas) y más recientemente en neoplasias como el cáncer de mama, ovario o los tumores germinales (Díaz y García, 2000).

#### RADIOTERAPIA

Se ha definido como una especialidad médica, orientada al empleo de los tratamientos con radiaciones y terapéuticas asociadas (De Las Heras, 2008). El objetivo es el empleo de las radiaciones ionizantes en el tratamiento de enfermos con cáncer.

#### QUIMIOTERAPIA

El uso de químicos como tratamiento sistémico para el cáncer ha ido evolucionando durante las últimas décadas (Lewis *et al.*, 2004). La quimioterapia es la principal forma de tratamiento de la enfermedad maligna diseminada y tiene un papel muy importante en el tratamiento de determinados tumores clínicamente localizados (Díaz y García, 2000). Los fármacos antineoplásicos se pueden clasificar en familias en relación a su actividad bioquímica o a sus orígenes. Otra clasificación de los agentes quimioterapéuticos se basa en su actividad sobre el ciclo celular.

Una gran parte de la investigación clínica sobre el cáncer se centra en el problema de cómo matar selectivamente las células cancerosas. En su mayoría, los métodos actuales aprovechan diferencias relativamente sutiles existentes entre las células normales y las neoplásicas con respecto a su velocidad de proliferación, a



su metabolismo y a la sensibilidad a la radiación: estos métodos tienen efectos tóxicos. Algunos tipos de células cancerosas son especialmente vulnerables al ataque selectivo porque dependen de hormonas específicas o porque sus superficies tienen características químicas no usuales que pueden ser reconocidas por anticuerpos. Sin embargo, en general el progreso en el difícil problema de la selectividad anticancerosa ha sido lento (Alberts *et al.*, 1996).

En México, existe una necesidad creciente por dar servicio a la demanda de salud en pacientes con problemas de cáncer. El costo de la quimioterapia como tratamiento primario o adyuvante hace, en ocasiones, inaccesible la opción a un gran número de pacientes con las consecuencias éticas que esto implica (Ruiz-Azuara y Gracia-Mora, 2006).

## 1.6.-FARMACOLOGÍA.

El desarrollo de la química permitió la obtención de sustancias puras de forma más o menos frecuente durante el siglo XIX. El desarrollo de la metodología científica en las ciencias médico-biológicas hace inevitable que un grupo de investigadores centrara su atención en cómo estas sustancias químicas podían alterar el funcionamiento de los procesos biológicos (Baños y Farré, 2002).

El campo central de la farmacología es entender la relación entre la interacción del medicamento con el objetivo molecular, los efectos acumulativos y la interacción con la célula (Rahman y Kauffman, 2004). El trabajo que se ha venido desarrollando desde hace 40 a 50 años son los acercamientos computacionales que permiten la predicción del comportamiento de un organismo a la exposición de una droga.

La farmacocinética y la farmacodinamia proveen poderosas e instructivas herramientas particularmente elucidando aspectos importantes de la farmacología humana (Rahman y Kauffman, 2004).

El conocimiento de la farmacocinética reviste una importancia extrema para el desarrollo de fármacos, tanto para entender las pruebas preclínicas de toxicidad

como el campo de la farmacología animal (Rang *et al.*, 2008). Para el clínico, los conocimientos necesarios de la farmacología deben enmarcarse en el contexto de la relación dosis-respuestas para que él o pueda aplicar racionalmente la farmacoterapia óptima para la prevención el tratamiento de la enfermedad.

Cuando se considera la relación dosis-respuesta en el organismo, la farmacocinética ofrece, en lugar de la dosis un perfil de concentración que proporciona una estimación más precisa de la cantidad de fármaco que está disponible para entrar en los tejidos y por tanto interactuar con el huésped a nivel del receptor (Rahman y Kauffman, 2004).

Los análisis farmacocinéticos de tiempo-concentración proveen datos útiles y algunas veces datos cruciales durante el desarrollo de drogas oncológica. Los modelos de farmacocinética y farmacodinamia tienen un potencial importante en el desarrollo de drogas oncológicas (Karlsson *et al.*, 2005).

### 1.7.-DESARROLLO FARMACOLÓGICO.

Una vez que se identifica en el laboratorio una droga candidata, inician años de investigaciones. Este proceso comienza con pruebas de laboratorio y estudios sobre animales para evaluar su seguridad y demostrar que tiene actividad biológica sobre la enfermedad objetivo.

El objetivo del desarrollo preclínico es satisfacer todos los requisitos que se deben cumplir antes de que un nuevo compuesto se considere listo para ser probado por primera vez en seres humanos (Rang *et al.*, 2008). Estos requisitos pertenecen a cuatro categorías:

- Pruebas farmacológicas, para comprobar que el fármaco no produce ningún efecto agudo potencialmente peligroso o grave evidente, como broncoconstricción, arritmias cardiacas, modificaciones de la presión arterial, ataxia, etc. Esto se denomina farmacología de seguridad.
- Pruebas toxicológicas preliminares, para evaluar la toxicidad y determinar la dosis no toxica máxima del fármaco (a menudo cuando se administra

diariamente durante 28 días y se comprueba en dos especies). Además de comprobar de forma regular la posible pérdida de peso o de cualquier otro cambio, los animales de experimentación se examinan de forma minuciosa, tras su sacrificio al final del experimento, en busca de datos histológicos o bioquímicos de lesión tisular.

- Pruebas farmacocinéticas, como estudios de su absorción, metabolismo, distribución y eliminación en animales de laboratorio.
- Desarrollo químico y farmacéutico, para valorar la viabilidad de la síntesis y la purificación a gran escala, la estabilidad del compuesto en diversas condiciones y el desarrollo de una formulación adecuada para los estudios clínicos.

La presencia de efectos farmacológicos *in vitro* o *in vivo* forman la base racional para considerar que un fármaco probablemente tenga algún beneficio terapéutico. Dichos datos son necesarios antes de investigar un nuevo fármaco en humanos, porque siempre existe algún riesgo para los pacientes en ensayos clínicos (Page, *et al.*, 1998).

Aproximadamente la mitad de los compuestos considerados candidatos a fármacos fracasan durante la fase de desarrollo preclínico (Rang *et al.*, 2008).

El trabajo de desarrollo no clínico continua durante un periodo de ensayos clínicos, durante el cual se tienen que generar muchos más datos, sobre todo en relación con la toxicidad a largo plazo en animales. Si se busca un fármaco para uso clínico prolongado, los estudios clínicos se deben ampliar hasta 2 años. (Rang *et al.*, 2008).

Las pruebas preclínicas clave incluyen farmacocinética, que es el estudio de cómo se mueve la droga sobre organismos vivos. Los científicos investigan cuatro procesos clave: absorción, distribución, metabolismo y excreción.

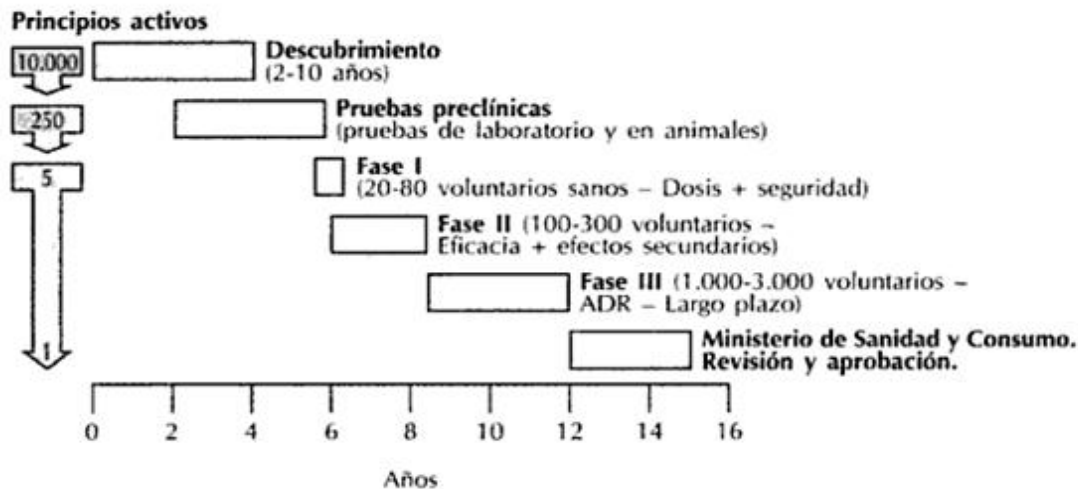


Figura 1. Etapas de descubrimiento y desarrollo de las drogas (Mattei *et al.*, 2001)

## 1.8.-ENSAYOS CLÍNICOS.

Los ensayos clínicos empiezan después de que se hayan generado datos suficientes para justificar las pruebas de un nuevo fármaco en humanos. Las tres fases de desarrollo farmacológico se indican como fase I, fase II, fase III (Page *et al.*, 1998).

Fase I – indica los primeros estudios en humanos, que se efectúan bajo una supervisión muy estrecha y son habitualmente estudios a simple ciego para encontrar la dosis más baja que no pueda ser tolerada por su toxicidad inaceptable (Page *et al.*, 1998).

Los ensayos en fase I se realizan en un pequeño grupo de voluntarios sanos (normalmente entre 20 y 80 sujetos) y su objetivo es comprobar varios factores (Rang *et al.*, 2008), tales como seguridad, tolerabilidad y propiedades farmacocinéticas. Los estudios de la fase 1 pueden tomar de seis meses a un año.

Tradicionalmente, estos estudios se han realizado en sujetos sanos, pero éstos están siendo reemplazados de modo acelerado por el tipo de pacientes en los que el fármaco sería eventualmente usado (Page *et al.*, 1998).

Fase II – Comienza después de que se haya definido el rango de dosis tolerada. Estos estudios se llevan a cabo en pacientes para los que se considera

que el nuevo fármaco puede tener un potencial beneficio. El propósito principal es acumular evidencias de que el fármaco presenta los efectos sugeridos por las pruebas preclínicas. En ocasiones, el punto de referencia de las pruebas preclínicas de la fase II es el objetivo actual del tratamiento; en otras ocasiones se utiliza un punto de referencia sustitutivo. Otros propósitos de las pruebas de la fase II son definir la cinética de un fármaco y relacionar las concentraciones plasmáticas con sus efectos. La influencia de las enfermedades renal y hepática en la eliminación de fármaco también es investigada, y se explora la farmacocinética y las interacciones farmacológicas del nuevo fármaco (Page *et al.*, 1998). Los estudios de la fase II se efectúan en grupos de pacientes (normalmente entre 100 y 300) y están diseñados para valorar la eficacia en la situación clínica y, en caso de confirmarse, determinar la dosis que se debe emplear en los estudios en fase III definitivos (Rang *et al.*, 2008). Los estudios de la fase II pueden llevar entre seis meses y un año.

Fase III – Esta consiste en las pruebas clínicas definitivas que establecen la eficacia y la seguridad de un nuevo fármaco. Cuando es posible, las pruebas son a doble ciego, tomadas al azar y controladas. Son casi siempre de diseño paralelo. Deben hacerse consideraciones estadísticas en cuanto al planteamiento del diseño y el tamaño de todas las pruebas preclínicas, pero especialmente de las de fase III, de modo que puedan establecerse conclusiones validas cuando la prueba esté terminada (Page *et al.*, 1998). Generalmente realizados en forma de ensayos multicéntricos en 1000 a 3000 pacientes, con el objetivo de comparar el nuevo fármaco con las alternativas habitualmente utilizadas. Estos ensayos son muy costosos y difíciles de organizar y a menudo tardan años en completarse, especialmente si el tratamiento está diseñado para retrasar la progresión de una enfermedad crónica (Rang *et al.*, 2008).

Algunos autores incluyen una cuarta fase que son los estudios que comprenden la vigilancia postcomercialización obligatoria, diseñada para detectar cualquier efecto adverso poco frecuente o largo plazo derivado de la utilización del fármaco en el contexto clínico en muchos miles de pacientes. Tales acontecimientos pueden implicar la limitación de la utilización del fármaco en

determinados grupos específicos de pacientes o incluso la retirada del mismo. (Rang *et al.*, 2008).

### 1.9.- EL RATÓN.

La presencia de efectos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* forman la base racional para considerar que un fármaco probablemente tenga algún beneficio terapéutico. Dichos datos son necesarios antes de investigar un nuevo fármaco en humanos (Page *et al.*, 1998).

El ratón es un mamífero clasificado en el orden Rodentia, suborden Sciurognathi. Existen tres grandes familias de ratón: Muridae, Cricetidae y Platacanthomyidae. El nombre taxonómico del ratón de laboratorio es *Mus musculus* (Sirois, 2005).

El ratón fue utilizado en estudios de anatomía comparada, pero la aceleración de la investigación biológica en el siglo XIX, el renovado interés en la genética y las necesidades de un mamífero pequeño, económico, de fácil alojamiento y alimentación fueron los instrumentos para desarrollar el moderno ratón de laboratorio (Altamirano, 1994).

Un gran número de ratones se utiliza para bioensayos, realización de pruebas de toxicidad, estudio de nuevos fármacos, estudios de microbiología y virología (Altamirano, 1994).

### 1.10.- COBRE.

El cobre es un metal rojizo que se encuentra de forma natural en el suelo, rocas, agua, sedimentos y, en niveles bajos, incluso en el aire. Su uso terapéutico se conoce ya desde la época de Hipócrates, que prescribía compuestos de cobre para enfermedades pulmonares. En el siglo XIX llega su utilización a su máximo esplendor cuando se asoció su déficit con la aparición de anemia resistente al hierro en ratas con dieta exclusiva de leche (Bellido y A. de Luis, 2006). Su papel en la

nutrición no se conoce hasta el año 1996, cuando se describen ciertos trastornos por falta de cobre en la dieta (Matarese y Gottschlich, 2004).

Los minerales son nutrientes que se obtienen de la dieta y, dependiendo de su presencia en el organismo, se clasifican en macroelementos, microelementos y oligoelementos.

El cobre es un oligoelemento esencial en la dieta del hombre y se encuentra presente en el organismo en 100 a 150 mg, y el 90% de esta cantidad se encuentra en músculos, huesos e hígado (Bellido y A. de Luis, 2006). Es el tercero en el contenido orgánico total después del hierro y del cinc (Illera *et al.*, 2000).

Como el hierro, participa en la síntesis de la hemoglobina y es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de huesos y tejido elástico como tendones, tejido conectivo así como del sistema vascular (Bellido y A. de Luis, 2006).

La mayoría de sus funciones las deducimos de las reacciones que catalizan las enzimas que contienen cobre (cuproenzimas) y otras de los síntomas observados en los casos publicados del déficit de cobre (Bellido y A. de Luis, 2006).

Todos requerimos cobre para nuestros procesos vitales, a pesar de que su presencia es distinta en cada órgano, dependiendo de la actividad que realice. A excepción del hígado, que es donde se almacena, lo encontramos en mayor cantidad y participando activamente en el corazón, cerebro, músculos y huesos.

Es una parte importante en muchas enzimas, incluida la tirosina, el citocromo oxidasa y la amino oxidasa. El cobre está involucrado en la incorporación del hierro en la hemoglobina (Carson *et al.*, 1987), es decir, el componente más importante de los glóbulos rojos que se combina con el oxígeno en los pulmones y transporta a éste por el sistema circulatorio a todos los tejidos del cuerpo.

El cobre es un elemento esencial (Carson *et al.*, 1987), está envuelto en la respiración celular, defensa antioxidante, neurotransmisión, biosíntesis de tejido conectivo (Grillo *et al.*, 2009). También se requiere para una eritropoyesis y leucopoyesis adecuada, la mineralización del esqueleto, formación de mielina,

función inmunitaria, función cardíaca y regulación de glucosa (Matarese y Gottschlich, 2004).

La deficiencia de cobre es extraordinariamente rara debido a la naturaleza ubicua del cobre en varios alimentos (Matarese y Gottschlich, 2004), pero se ha descrito en lactantes y niños que se recuperan de un estado de malnutrición con dieta exclusiva de leche ya que tienen unos depósitos hepáticos reducidos (Bellido y A. de Luis, 2006). También se han descrito unas bajas concentraciones séricas de cobre en pacientes que se hallan recuperándose de quemaduras mayores. La deficiencia de cobre se caracteriza por anemia, neutropenia y trombocitopenia (Matarese y Gottschlich, 2004).

La exposición a dosis altas puede ser perjudicial. La exposición prolongada a polvos de cobre puede irritar la nariz, la boca, los ojos y causar dolores de cabeza, mareo, náusea y diarrea. La ingestión intencionada de niveles altos de cobre puede producir daño del hígado y los riñones y puede causar la muerte (Bellido y A. de Luis, 2006).

Investigaciones recientes arrojan evidencias de que los iones de cobre son capaces de interactuar directamente con el núcleo de las proteínas y el ADN causando daño específico (Grillo *et al.*, 2009). Indirectamente puede intervenir en reacciones Fenton-Haber-Weiss y producir daño por la formación de especies reactivas de oxígeno.

### 1.11.- CASIOPEÍNAS.

En la búsqueda de nuevos fármacos para combatir las enfermedades neoplásicas con la finalidad de que su costo sea más accesible y el daño provocado al organismo sea el menor posible se han desarrollado una gran cantidad de medicamentos. 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 ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) de fórmula general  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-N})]\text{NO}_3$  and  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ , análogos al cis-platino. El

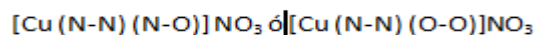


desarrollo de nuevas series de medicamentos antineoplásicos de cobre llamados Casiopeínas (formula general  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-N})]\text{NO}_3$  and  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$  (Ruiz-Ramírez *et al.*, 1995).

Los compuestos han cubierto de forma más que satisfactoria los requisitos de actividad exigidos internacionalmente tanto *in vitro* como en modelos animales de isotransplatación y heterotransplatación, una de ellas han cubierto casi en su totalidad las pruebas preclínicas exigidas para el registro de un fármaco (Ruiz-Azuara y Gracia-Mora, 2006).

El diseño de las moléculas fue basado en tres factores principales: Los compuestos deben contener un metal esencial para disminuir la toxicidad; contener quelatos a favor de la configuración *cis* alrededor del ion de metal y una mezcla de quelatos que tengan diferentes niveles de hidrofobia. Las Casiopeínas fueron diseñadas para tener actividad antitumoral, basada en trabajos previos en cisplatino y otros metales de transición (Gracia-Mora *et al.*, 2001) con propiedades antineoplásicas.

La fórmula general de las Casiopeínas es:



Dónde:

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

(N-O) = Ligante aminoacidatos o péptidos

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



Figura 2. Formula general de las Casiopeínas (Guevara, 2008)

El mecanismo de acción no ha sido definido completamente (Leal-García *et al.*, 2007). Aunque el modo de acción de las Casiopeínas es en gran parte desconocido se sugiere que la permeabilidad de la mitocondria puede ser

importante (Rivero-Müller *et al.*, 2007). A pesar de que las casiopeínas representan una opción para el tratamiento oncológico, los complejos estudiados de esta familia han mostrado tener actividad citostática citotóxica (Bocanegra y Altamirano, 2006) en células sanas.

### 1.12.- CASIOPEÍNA III-EA.

Las Casiopeínas inducen diferentes grados de daño genético como inicialmente se sugirió por antecedentes preliminares de varias casiopeínas (Alemón *et al.*, 2007).

Actualmente la Cas III-Ea es la más genotóxica seguida por la Cas Igly y finalmente la Cas III-Ha. La Cas III-Ea tiene un pequeño sustituyente álcali mientras que los otros dos tienen grupos fenilo aromáticos (Alemón *et al.*, 2007).

La Casiopeína III-Ea induce un gran número de células con daño al DNA (Alemón *et al.*, 2007). Es importante hacer notar que la Cas III-Ha y la Cas III-Ea tienen acetilacetato, pero debido al pequeño sustituyente en la diimina se forma un donador que puede ser capaz de participar en reacciones redox (Alemón *et al.*, 2007).

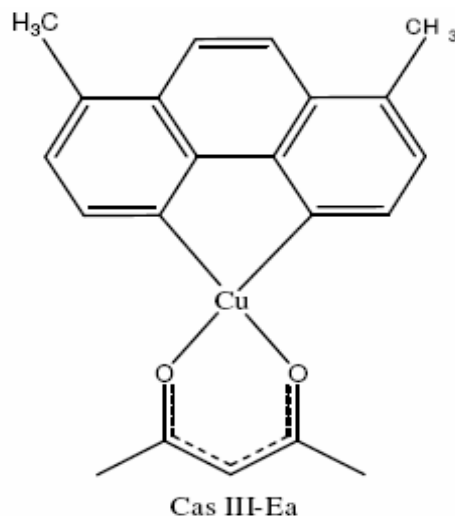


Figura 3. Estructura de la Casiopeína III-Ea (Tovar-Huerta *et al.*, 2006)

Aunque existen una gran cantidad de trabajos realizados alrededor de los efectos provocados por las casiopeínas en modelos *in vitro* como en modelos aún

falta gran parte para poder dilucidar los mecanismos de acción de las casiopeínas y en particular de la Cas III-Ea que con los pocos trabajos que existen sobre ella se sabe que es una de las casiopeínas más genotóxica. El propósito de este trabajo es aportar información acerca del posible daño que pueda provocar la Cas III-Ea en un modelo *in vivo*, esto es importante ya que con los resultados arrojados por esta investigación se podrán determinar si el fármaco probado provoca daño a células sanas, además de que podremos saber si existe algún órgano que sea más susceptible al compuesto probado

### 1.13.- ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL O “ENSAYO COMETA”.

El desarrollo de técnicas que permitan la detección de una manera más sensible el daño al ADN han sido utilizadas en estudios de toxicología ambiental, carcinogénesis y envejecimiento (Singh, 1988).

Rydberg and Johanson fueron los primeros en cuantificar directamente daño al ADN en células individuales (Singh, 1988). Este ensayo requería que las células fueran embebidas en agarosa, fueran puestas en un portaobjetos, se lisaran para romper las membranas, posteriormente se les daba un tratamiento alcalino para permitir el desenrollamiento del ADN; se neutralizaba y se teñía al ADN con naranja de acridina, usando un fotómetro, observaban y medían el radio de la fluorescencia, verde y roja indicando ADN de una o doble hebra, respectivamente.

Para probar la sensibilidad para detectar el daño al ADN en células individuales, Ostling y Johanson desarrollaron en 1984 fueron los primeros en la técnica de electroforesis en micro gel para detectar daño al ADN a nivel de una sola célula en esta técnica se embeben las células en un gel de agarosa, se colocan sobre un portaobjetos y se les da un tratamiento de lisis con una solución que contiene detergentes y una alta concentración de sales, después se ponen en un campo eléctrico (electroforesis) bajo condiciones neutras. Las células con aumento de daño muestran un incremento en la migración del ADN hacia el ánodo. La migración es cuantificada por medio de un intercalante fluorescente, bromuro de

etidio. Las condiciones neutras limitan mucho en general la utilidad de la prueba, ya que bajo estas condiciones solo se detecta rompimientos de doble cadena (Tice *et al.*, 2000)

En 1988, Singh y colaboradores propusieron otra técnica de electroforesis unicelular, la modificación de la técnica consiste en permitir la evaluación de daño al ADN en células individuales bajo condiciones alcalinas. Esta aproximación optimiza la desnaturalización del ADN y la migración de una sola hebra de ADN, por lo tanto permitiendo la evaluación del rompimiento de una hebra de ADN y de los sitios álcali lábil.

---

## II.-JUSTIFICACIÓN

---

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por la proliferación incontrolada de células. Actualmente en México el cáncer es una de las principales causas de muerte en la población. La quimioterapia es uno de los tratamientos más útiles para atacar a estas enfermedades. No obstante estas terapias no son efectivas para todos los tipos de cáncer, por lo que resulta imperativa la elaboración de nuevos fármacos.

Para la quimioterapia del cáncer existen 44 compuestos aprobados para su uso, sin embargo ninguno de estos fármacos es de tecnología nacional. Por lo que estos medicamentos tienen un precio elevado haciéndolo inaccesibles para ciertos sectores de la sociedad.

En la década de los 70's se inició un proyecto en la Facultad de Química con el fin de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de neoplasias a base de metales esenciales para el organismo con el propósito de disminuir su toxicidad y costo. Así como también se buscó que los compuestos tuvieran modificaciones estructurales tales que les permitieran tener mayor selectividad.

De este proyecto surgieron los compuestos llamados Casiopeínas® cuyo centro metálico es el cobre, que prometen ser una alternativa para la quimioterapia para el tratamiento contra el cáncer, sin embargo estos han provocado citotoxicidad y genotoxicidad en diversas líneas celulares,

El presente trabajo pretende evaluar la actividad genotóxica y citotóxica de la Casiopeína III-Ea en varios órganos de ratón con la finalidad de conocer cuáles son los órganos en los que la Casiopeína tiene mayor efecto y conocer cómo se comporta un medicamento en el organismo así como saber a qué tejidos son los que afectara es importante ya que permite hacer inferencias de qué manera puede ayudar o perjudicar este fármaco al organismo.

---

## III.-OBJETIVOS

---

### 3.1 GENERAL

- Evaluar el daño provocado por la Cas III-Ea en varios órganos de ratones de la cepa CD-1 tratados con diferentes dosis y a diferentes tiempos.

### 3.2 PARTICULARES

- Evaluar los cambios en la viabilidad celular inducida por la Cas III-Ea en varios órganos y tejidos.
- Evaluar el daño en el ADN inducido por la Cas III-Ea en varios órganos y tejidos.
- Evaluar la susceptibilidad de los órganos y tejidos al daño inducido por la Cas III-Ea.

---

## IV.HIPÓTESIS

---

- Las Casiopeínas han mostrado tener una actividad citotóxica y citostática y genotóxica en diferentes líneas celulares, por lo tanto si se administra Cas III-Ea a ratón macho la viabilidad celular bajara y se encontrara daño, efecto de la interacción de la Cas III-Ea con el ADN.

---

## V.MATERIAL Y MÉTODO

---

### 5.1.- ANIMALES.

Se utilizaron ratones macho cepa CD-1 de entre 8 y 12 semanas de edad, con un peso de entre 30 a 40 gramos los cuales se colocaron en grupos de 15 individuos bajo condiciones de controladas de humedad y temperatura, 12 horas luz por 12 horas de oscuridad, comida (Harland) y agua *ad libitum*. En todos los casos los animales serán pesados antes y durante el tratamiento y al sacrificio.

### 5.2.- SUSTANCIAS QUÍMICAS Y TRATAMIENTOS.

La solución de trabajo con la Casiopeína III-Ea (**Nitrato de acua, 4,7-dimetill-1,10-fenantrolina, acetilacetionato cobre (II)**) se preparó disolviendo el compuesto en agua inyectable y se inyectó intraperitonealmente (i.p.). El grupo que se utilizó como testigo negativo se trató con agua inyectable.

### 5.3.- GRUPOS.

Sesenta ratones macho fueron colocados aleatoriamente en grupos. Grupo A: control (15 animales), fueron inyectados ip con agua inyectable cada tercer día durante 45 días. Grupo B: 15 animales fueron inyectados con Cas III-Ea (3.25 mg/Kg (1/4 de DL<sub>50</sub>)). Grupo C: 15 animales fueron inyectados con Cas III-Ea (1.625 mg/Kg (1/8 de DL<sub>50</sub>)). Grupo D: 15 animales fueron inyectados con Cas III-Ea (0.812 mg/Kg (1/16 de DL<sub>50</sub>)). De cada grupo tratado se tomaron 5 individuos cada 15 días y se sacrificaron.



#### 5.4.-SACRIFICO.

Todos los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca con una jeringa previamente heparinizada, realizando viabilidad y laminillas para electroforesis de la muestra obtenida.

El bazo, corazón, hígado, pulmón, riñón y testículo fueron extraídos y puestos en PBS a 37°C, se procedió a macerar los órganos mecánicamente. De la suspensión celular se tomaron las alícuotas para preparar las laminillas para electroforesis y para la viabilidad celular.

#### 5.5.- PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR.

La prueba de viabilidad se utiliza a menudo para interpretar los datos de la prueba de electroforesis unicelular. Esta es una técnica desarrollada por Strauss (1991)

En esta técnica se colocaron 40µl de la muestra en un tubo de microcentrífuga, se adicionaron 10µl de una solución de colorante con bromuro de etidio y 5-6 diacetato de carboxifluorsceina en una proporción 1:1.

Se dejó reposar por un periodo de 3- 5 minutos a una temperatura de 37°C, pasado este tiempo se adiciono 1 ml de una solución de lavado, en este caso se ocupó PBS, se agito para remover el exceso de colorante.

Se metió a la centrifuga por 4 minutos a 4000rpm para el caso de las células de sangre y para el caso de las células de los órganos en cuestión se centrifugo a 14000rpm durante 4 minutos.

Terminada la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado dos veces más.

El botón de células que quedo después del tercer lavado se mezcló con una fracción del sobrenadante del último lavado, y se tomó una muestra de 10µl que se colocó en una laminilla y se observó bajo un microscopio de fluorescencia.

Se contaron 100 células entre células viables, serán verdes fluorescentes en el citoplasma, y el número de células muertas rojo fluorescente el núcleo.

#### 5.6.- ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL.

La técnica que se empleó para este estudio fue la descrita por Tice en 1996. Para el ensayo cometa se utilizaron portaobjetos totalmente esmerilados, los cuales fueron previamente preparados con una capa de agarosa de punto de fusión regular al 1%, esta capa se dejó secar en una parrilla de calentamiento. Posteriormente se extrajo 20µl de cada órgano procesado y se le agregó 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%), se colocó un cubreobjetos para distribuir la muestra uniformemente hasta su solidificación (5 minutos a 4°C). Cuando el gel solidificó se retiró el cubreobjetos y se agregó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión, se colocó nuevamente el cubreobjetos y se dejó solidificar en las mismas condiciones antes mencionadas. Al termino del tiempo propuesto se retiró el cubreobjetos y las laminillas se sumergieron en una solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10 y 10% DMSO, 1% Triton X-100), a 4°C por un periodo de 24 horas.

Después de este tiempo, las laminillas se colocaron en una cámara horizontal de electroforesis y se sumergieron en una solución buffer de NaOH a pH 13 (10N NaOH y 200mM de EDTA). Las laminillas se incubaron en esta solución durante 20 minutos para permitir el desenrollamiento del ADN pasado este tiempo se le aplicó un potencial de 25 voltios y 300 miliamperios por 20 minutos, cabe resaltar que esta técnica fue llevada a cabo a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Terminado el lapso de tiempo de corrimiento se procedió a realizar tres lavados con una solución neutralizadora de Tris (0.4 M Tris, pH 7.5) por cinco minutos cada uno y finalmente se deshidrataron las laminillas con etanol al 70% y 90%.

Por último las laminillas se tiñeron con bromuro de etidio (concentración 20 µg/ml) para evaluar la fragmentación del ADN, las células individuales fueron observadas a 40X en un microscopio Nikon Optiphot-2 con un filtro de excitación de 515-560nm, midiendo la longitud del cometa con una escala ocular. Para evaluar la migración del ADN se contaron 100 células por laminilla y dos laminillas por concentración.

El criterio para la evaluación de las células fue asignando en clases de acuerdo al grado de daño del ADN. Se clasificó el grado de daño en cinco categorías dependiendo de la relación de la cabeza del cometa y la cola del mismo: “Sin daño”, aquellos que no presentaron migración del ADN; “Daño bajo”, aquellos que la migración fue de hasta 1 núcleo; “Daño medio”, los que presentaron migraciones de hasta dos núcleos; “Daño alto” aquellos que sus migraciones fueron de más de dos núcleos y “Daño total” y cuando virtualmente todo el ADN migro a la región de la cola (Altamirano-Lozano et al., 1999).

Las células de testículo se clasificaron en dos grupos: células grandes; donde se agrupo a las espermatogonias y espermatocitos primarios que son células diploides y en células pequeñas donde se encuentran los espermatocitos secundarios y espermáticas que son células haploides (Altamirano-Lozano et al., 1999), se hace esta clasificación porque se observó que las células diploides son más resistentes al daño causado por las Casiopeínas que las haploides (Cermeño-García, 2007).

## 5.7.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para evaluar la viabilidad y la migración del ADN se realizó un Análisis de Varianza seguido de una prueba Tukey. El grado de daño fue evaluado con una prueba no paramétrica de rangos para muestras independientes U de Mann-Whitney. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa estadístico SPSS para Windows versión 17.

## VI. RESULTADOS

### VIABILIDAD CELULAR

En los cuadros I, II y III se presenta el promedio de los porcentajes de las células viables por órgano en los tres tratamientos que se llevaron a cabo para este estudio que son 1/8 de la DL<sub>50</sub>, 1/16 de la DL<sub>50</sub>, 1/32 de la DL<sub>50</sub> de Casiopeína III-Ea, a los 15, 30 y 45 días de tratamiento, respectivamente. Para los tres cuadros el grupo testigo es el mismo, y se puede observar que los organismos del grupo control presentan porcentajes de células viables mayores a 80 en todos los órganos que se examinaron para este estudio. En el caso del cuadro I que presenta los datos obtenidos a los 15 días de tratamiento las viabilidades se encuentran por debajo del 50% en varios órganos y distintas concentraciones del fármaco administrado. Las comparaciones estadísticas entre los animales del grupo control y los tres grupos tratados para este tiempo demostraron diferencias significativas en todos los casos, con excepción de la sangre en el tratamiento de 1/32 de la DL<sub>50</sub> de Casiopeína III-Ea.

**Cuadro I.** Porcentaje de células viables a los 15 días de tratamiento de Casiopeína III-Ea.

Órgano	Porcentaje de células viables del grupo Testigo (media± D.E)	Porcentaje de células viables del grupo tratado con 1/8 DL <sub>50</sub> (media± D.E)	Porcentaje de células viables del grupo tratado con 1/16 DL <sub>50</sub> (media± D.E)	Porcentaje de células viables del grupo tratado con 1/32 DL <sub>50</sub> (media± D.E)
Bazo	92 ±2.34	44.4 ±11.43*	51.4 ±4.21*	45.8 ±8.55*
Corazón	91.2 ±3.56	45 ±6.55*	48 ±7.96*	60.2 ±15.59*
Hígado	90 ±2.91	46 ±8.27*	47.8 ±9.25*	55 ±14.64*
Pulmón	93.2 ±3.27	44.2 ±5.01*	47.4 ±10.33*	52.6 ±19.07*
Riñón	90.6 ±2.50	50.4 ±4.72*	56.4 ±6.42*	57.2 ±11.75*
Sangre	89.2 ±3.96	39.4 ±4.82*	46.8 ±8.43*	68.2 ±15.31
Testículo	93 ±2.34	47.8 ±6.01*	58.6 ±4.61*	56.8 ±5.11*

\*p≤0.05 en comparación con los datos obtenidos en el grupo testigo, aplicando la prueba de Tukey.

La n es de 5 animales, tanto para el grupo control como para los tres tratamientos. (D.E.= desviación estándar).

**Cuadro II.** Porcentaje de células viables a los 30 días de tratamiento de Casiopeína III-Ea.

Órgano	Porcentaje de células viables del grupo testigo (media± D.E)	Porcentaje de células viables del grupo tratado con 1/8 DL <sub>50</sub> (media± D.E)	Porcentaje de células viables del grupo tratado con 1/16 DL <sub>50</sub> (media± D.E)	Porcentaje de células viables del grupo tratado con 1/32 DL <sub>50</sub> (media± D.E)
Bazo	92 ±2.34	55 ±7.07*	66.2 ±9.95*	71.4 ±3.50*
Corazón	91.2 ±3.56	55.5 ±7.77*	68 ±13.63*	74 ±5.78
Hígado	90 ±2.91	56.5 ±4.94*	63.8 ±3.11*	68.8 ±6.37*
Pulmón	93.2 ±3.27	55.5 ±9.19*	63.8 ±8.95*	76.6 ±4.72
Riñón	90.6 ±2.50	56 ±5.65*	72.4 ±12.79*	73 ±4.35*
Sangre	89.2 ±3.96	56.5 ±6.36*	70.6 ±17.58	77.6 ±9.63
Testículo	93 ±2.34	60.5 ±9.19*	64.6 ±10.03*	72 ±7.41*

\* $p \leq 0.05$  en comparación con los datos obtenidos en el grupo testigo, aplicando la prueba de Tukey. La n es de 5 animales para el grupo control y para los tratamientos de 1/16 y 1/32 de la DL<sub>50</sub>, para el tratamiento de 1/8 de DL<sub>50</sub> la n es de 2 ratones. (D.E.= desviación estándar).

Para el caso del cuadro II los datos mostrados corresponden a los 30 días de tratamientos de los animales, se aprecia que las viabilidades son bajas aunque si se comparan con las del cuadro I estas aumentaron y se encuentran por encima del 50%. Las comparaciones estadísticas entre los animales del grupo control y los tres grupos tratados durante 30 días mostraron diferencias significativas en su mayoría. Cabe resaltar que para el tratamiento de 1/8 de la DL<sub>50</sub> la media es de 2 ratones ya que los tres organismos restantes del grupo fallecieron durante el tratamiento, y por consiguiente no se evaluó la viabilidad.

**Cuadro III.** Porcentaje de células viables a los 45 días de tratamiento de Casiopeína III-Ea.

Órgano	Porcentaje de células viables del grupo testigo (media± D.E)	Porcentaje de células viables del grupo tratado con 1/8 DL <sub>50</sub> (media± D.E)	Porcentaje de células viables del grupo tratado con 1/16 DL <sub>50</sub> (media± D.E)	Porcentaje de células viables del grupo tratado con 1/32 DL <sub>50</sub> (media± D.E)
Bazo	92 ±2.34	55.3 ±7.09*	69.6 ±4.44*	71.6 ±8.59*
Corazón	91.2 ±3.56	66.6 ±11.01*	70.8 ±6.87*	82.2 ±2.38
Hígado	90 ±2.91	62.6 ±6.65*	64.4 ±9.04*	76.6 ±10.57
Pulmón	93.2 ±3.27	67.6 ±14.57*	73.4 ±4.97	73 ±12.98
Riñón	90.6 ±2.50	70 ±11.13*	72.4 ±4.61*	78.8 ±5.63
Sangre	89.2 ±3.96	75 ±1.73	75.2 ±9.25	77 ±6
Testículo	93 ±2.34	71.3 ±1.15*	73.6 ±6.34*	76.6 ±8.84*

\* $p \leq 0.05$  en comparación con los datos obtenidos en el grupo testigo, aplicando la prueba de Tukey. La n es de 5 animales para el grupo el grupo control y para las tratamientos de 1/16 y 1/32 de la DL<sub>50</sub>, para el tratamiento de 1/8 de DL<sub>50</sub> la n es de 3 ratones.(D.E.= desviación estándar).

En el cuadro III se encuentran los datos obtenidos para los 45 días de tratamiento, se puede observar que las viabilidades aumentan considerablemente con respecto a las obtenidas para los 15 y 30 días de tratamiento. Las comparaciones estadísticas entre los grupos mostro que si existen diferencias significativas en la mayoría de los casos. Aquí también es importante mencionar que para el tratamiento de 1/8 de la DL<sub>50</sub> la media se realizó solamente de tres individuos ya que los dos restantes murieron.

## ELECTROFORESIS UNICELULAR ALCALINA (ENSAYO COMETA).

En el cuadro IV, V y VI se muestran el número de células con daño así como la migración del ADN en los diferentes órganos de ratón macho cepa CD-1 tratados con 1/8 de la DL<sub>50</sub>, 1/16 de la DL<sub>50</sub>, 1/32 de la DL<sub>50</sub> Casiopeína III-Ea durante 15, 30 y 45 días. En la longitud de la migración no se toma en cuenta las células con daño total.

En el caso del cuadro IV se puede distinguir que el número de células con daño aumenta considerablemente cuando se contrastan los datos del grupo testigo con respecto a los grupos tratados en todos los órganos revisados. En cuanto a la migración del ADN podemos ver que los datos son estadísticamente significativos en el tratamiento de 1/8 de la DL<sub>50</sub>, así como también se observa un aumento en cuanto al porcentaje de células con daño para todos los órganos revisados. Para el caso de 1/16 de la DL<sub>50</sub>, los datos son estadísticamente significativos exceptuando al hígado, el riñón y en las células chicas del testículo, pero igual que en el primer tratamiento analizado el porcentaje de células con daño aumenta considerablemente. En lo que respecta a 1/32 de la DL<sub>50</sub> los datos obtenidos no son estadísticamente significativos en cuanto a la migración del ADN, aunque el porcentaje de células que presentan daño es alto con respecto al testigo.

**Cuadro IV:** Daño al ADN a los 15 días de tratamiento con de Casiopeína III-Ea.

	Testigo	1/8 DL <sub>50</sub>	1/16 DL <sub>50</sub>	1/32 DL <sub>50</sub>	
	No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.	No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.	No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.	No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.	
15 días	Bazo	71/500 (14.2%) 4.54±1.30	244/500 (48.8%) 6.93±3.65*	279/500 (55.8%) 7.06±3.13*	223/500 (44.6%) 5.27±1.55
	Corazón	58/500 (11.6%) 4.62±1.76	281/500 (59.2%) 8.32±4.33*	296/500 (59.2%) 7.55±2.90*	302/500 (60.4%) 5.42±1.64
	Hígado	62/500 (12.4%) 4.35±0.92	241/500 (48.2%) 6.60±2.29*	242/500 (48.4%) 6.36±2.32	281/500 (56.2%) 5.62±1.83
	Pulmón	69/500 (13.8%) 4.67±1.31	277/500 (55.4%) 7.49±4.20*	267/500 (53.4%) 6.80±2.68*	248/500 (49.6%) 5.33±1.51
	Riñón	78/500 (15.6%) 4.64±0.99	274/500 (54.8%) 6.50±2.28*	287/500 (57.4%) 5.96±1.98	274/500 (54.8%) 5.34±1.50
	Sangre	94/500 (18.8%) 4.98±3.15	294/500 (58.8%) 6.40±2.09*	232/500 (46.4%) 6.22±2.18*	249/500 (49.8%) 5.10±1.46
	Testículo (cel. grandes)	26/500 (5.2%) 11.62±1.49	95/500 (19%) 14.34±3.25*	138/500 (27.6%) 13.80±2.45*	97/500 (19.4%) 12.91±2.45
	Testículo (cel. pequeñas)	32/500 (6.4%) 4.44±1.50	103/500 (20.6%) 6.07±2.43*	124/500 (24.8%) 5.66±1.72	105/500 (21%) 5.09±1.52

El promedio de la migración está calculado solo con el número de células que presentaron daño. La migración considera la cola del cometa excluyendo el núcleo.

(D.E= Desviación Estándar).

La n es de 5 animales por cada tratamiento al igual que el grupo testigo.

\*p≤0.05 en comparación con los datos obtenidos en el grupo testigo con relación a la longitud del cometa presentado en las células individuales, aplicando una ANOVA seguida de una prueba Tukey

El cuadro V muestra los datos obtenidos a los 30 días de tratamiento de los ratones, para este tiempo hay que remarcar que en la dosis más alta aplicada, es decir, 1/8 de la DL<sub>50</sub>, fallecieron 3 ratones, es por esto que la media mostrada en la tabla para este tratamiento en particular es de 200 células. El tratamiento de 1/8 de la DL<sub>50</sub> el corazón, el hígado y el pulmón presentan datos estadísticamente significativos en cuanto a la migración del ADN, así como también se puede observar que el porcentaje de células con daño aumenta con respecto al grupo testigo en todos los órganos. El caso de la dosis de 1/16 de la DL<sub>50</sub>, se observa que solo el riñón muestra un aumento significativo en la migración del ADN, aunque el porcentaje de células dañado de todos los órganos es mucho mayor que en el grupo testigo. En la dosis de 1/32 de la DL<sub>50</sub> se muestran cambios significativos en bazo, pulmón, riñón, sangre y en las células chicas del testículo hablando de la migración del ADN, y el porcentaje de células con daño aumento para todos los órganos cuando se compara con el grupo testigo.



## Cuadro V: Daño al ADN a los 30 días de tratamiento con de Casiopeína

### III-Ea.

		Testigo	1/8 DL <sub>50</sub>	1/16 DL <sub>50</sub>	1/32 DL <sub>50</sub>
		No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.	No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.	No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.	No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.
30 días	Bazo	71/500 (14.2%) 4.54±1.30	64/200 (32%) 5.91±2.29	250/500 (50%) 5.90±2.12	304/500 (60.8%) 6.43±2.14*
	Corazón	58/500 (11.6%) 4.62±1.76	122/200 (61%) 7.49±2.64*	268/500 (53.6%) 6.00±2.20	321/500 (64.2%) 6.50±2.37
	Hígado	62/500 (12.4%) 4.35±0.92	128/200 (64%) 7.09±3.00*	296/500 (59.2%) 6.05±2.26	335/500 (67%) 6.47±2.41
	Pulmón	69/500 (13.8%) 4.67±1.31	142/200 (71%) 6.99±2.51*	271/500 (54.2%) 5.93±2.26	312/500 (62.4%) 6.56±2.58*
	Riñón	78/500 (15.6%) 4.64±0.99	116/200 (58%) 6.17±1.81	225/500 (45%) 6.12±2.45*	237/500 (47.4%) 6.29±2.19*
	Sangre	94/500 (18.8%) 4.98±3.15	105/200 (52.5%) 5.45±1.67	287/500 (57.4%) 5.36±2.07	329/500 (65.8%) 6.37±2.42*
	Testículo (cel. grandes)	26/500 (5.2%) 11.62±1.49	38/200 (19%) 12.42±2.75	94/500 (18.8%) 13.26±2.17	134/500 (26.8%) 12.22±3.68
	Testículo (cel. chicas)	32/500 (6.4%) 4.44±1.50	30/200 (15%) 5.00±1.46	102/500 (20.4%) 5.41±2.02	114/500 (22.8%) 5.95±1.96*

El promedio de la migración está calculado solo con el número de células que presentaron daño. La migración considera la cola del cometa excluyendo el núcleo. (D.E=

Desviación Estándar).

La n es de 5 animales para el grupo control y para las tratamientos de 1/16 y 1/32 de la DL<sub>50</sub>, para el tratamiento de 1/8 de DL<sub>50</sub> la n es de 2 ratones. \*p≤0.05 en comparación con los datos obtenidos en el grupo testigo, aplicando una ANOVA seguida de una prueba Tukey

Para el caso del cuadro VI, se muestran los datos de migración y porcentaje de células con daño para los tratamientos de 1/8, 1/16 y 1/32 de la DL<sub>50</sub> de Casiopeína III-Ea a los 45 días de iniciada la administración del fármaco. Es necesario resaltar que para el caso de 1/8 de la DL<sub>50</sub> la media es de tan solo 3 individuos, ya que los dos organismos restantes fallecieron antes del día del sacrificio. Se puede observar que para el caso de la dosis de 1/8 de la DL<sub>50</sub> los datos de la migración del ADN son significativos para bazo, corazón, hígado, pulmón, riñón y sangre y en cuanto al porcentaje de células con daño aumento para todos los órganos. Para la dosis de 1/32 de la DL<sub>50</sub> todos los datos de migración de ADN son estadísticamente significativos, así como también se observa que el porcentaje de células con daño aumenta considerablemente con respecto al grupo testigo. En el tratamiento de 1/32 de la DL<sub>50</sub> se observa que los datos de la migración aumentan en todos los órganos haciendo una excepción en las células grandes del testículo, y en cuanto a al porcentaje de células con daño

se puede observar que es el que presenta mayor porcentaje de células con daño en todos los órganos.

**Cuadro VI:** Daño al ADN a los 45 días de tratamiento con de Casiopeína III-Ea.

		Testigo No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.	1/8 DL <sub>50</sub> No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.	1/16 DL <sub>50</sub> No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.	1/32 DL <sub>50</sub> No. de cel. con daño/ total de cel. (%). Migración (µm) media±DE.
45 días	<i>Bazo</i>	71/500 (14.2%) 4.54±1.30	187/300 (62.3%) 6.94±3.37*	277/500 (55.4%) 7.92±6.24*	414/500 (82.8%) 6.90±3.23*
	<i>Corazón</i>	58/500 (11.6%) 4.62±1.76	135/300 (45%) 11.81±10.42*	280/500 (56%) 8.38±7.80*	307/500 (61.4%) 9.38±6.47*
	<i>Hígado</i>	62/500 (12.4%) 4.35±0.92	173/300 (57.6%) 14.25±11.38*	312/500 (62.4%) 8.12±5.75*	364/500 (72.8%) 9.23±7.05*
	<i>Pulmón</i>	69/500 (13.8%) 4.67±1.31	157/300 (52.3%) 10.13±7.05*	298/500 (59.6%) 7.51±5.28*	344/500 (68.8%) 8.98±5.51*
	<i>Riñón</i>	78/500 (15.6%) 4.64±0.99	194/300 (64.6) 9.05±5.33*	279/500 (55.8%) 7.35±4.69*	317/500 (63.4%) 8.28±4.87*
	<i>Sangre</i>	94/500 (18.8%) 4.98±3.15	174/300 (58%) 6.37±3.75*	334/500 (66.8%) 6.70±3.04*	315/500 (63%) 8.43±4.15*
	<i>Testículo (cel. grandes)</i>	26/500 (5.2%) 11.62±1.49	83/300 (27.6%) 12.80±4.67	109/500 (21.8%) 13.93±2.26*	162/500 (32.4%) 13.52±3.92
	<i>Testículo (cel. pequeñas)</i>	32/500 (6.4%) 4.44±1.50	101/300 (33.6%) 5.66±1.85	105/500 (21%) 6.34±3.51*	173/500 (34.6%) 6.57±2.92*

El promedio de la migración está calculado solo con el número de células que presentaron daño. La migración considera la cola del cometa excluyendo el núcleo. (D.E) = Desviación Estándar.

La n es de 5 animales para el grupo el grupo control y para las tratamientos de 1/16 y 1/32 de la DL<sub>50</sub>, para el tratamiento de 1/8 de DL<sub>50</sub> la n es de 3 ratones. \*p≤0.05 en comparación con los datos obtenidos en el grupo testigo, aplicando una ANOVA seguida de una prueba Tukey

El grado de daño se clasifico en 5 grupos

“0”.- Células sin daño.

“1”.- Células con daño bajo.

“2”.- Células con daño medio.

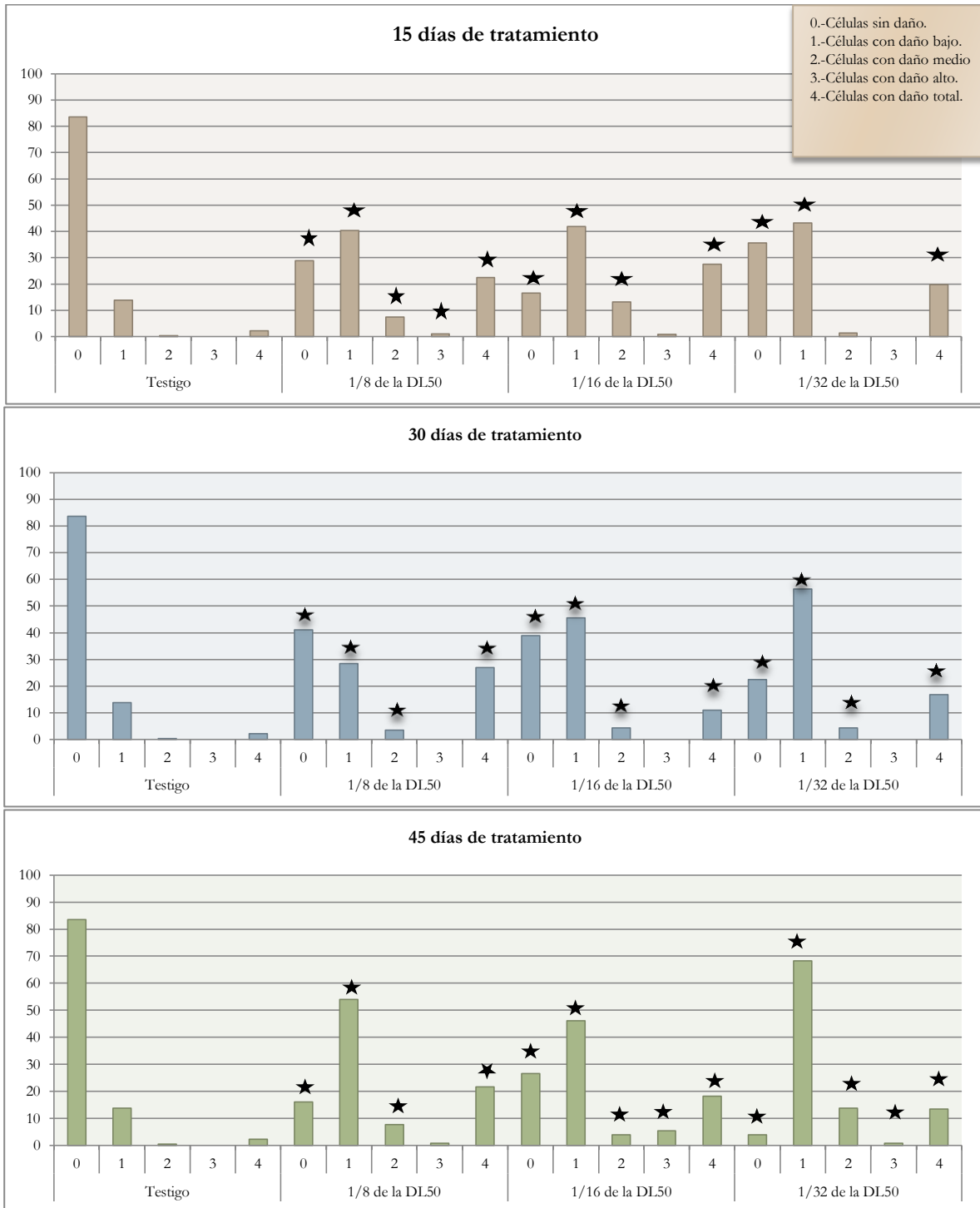
“3”.- Células con daño alto o severo

“4”.- Células con daño total.

En la figura 4 se puede observar el grado de daño en los tratamiento de 1/8, 1/16 y 1/32 de la  $DL_{50}$  de Casiopeína III-Ea en bazo, para 15, 30 y 45 días de tratamiento. Es posible observar en esta figura la disminución de las células sin daño para los tres tratamientos, esto cuando se compara con el grupo testigo. También se puede ver que el porcentaje de células con daño bajo aumento de un 13.8% en el grupo Testigo hasta datos mayores de 40%, de la misma forma los porcentajes de células con daño medio y daño total aumentaron significativamente con respecto al grupo testigo exceptuando el tratamiento de 1/32 de la  $DL_{50}$  el cual aunque si hubo un aumento no es significativo. Para el caso de las células con daño alto el porcentaje aumento significativamente solo en la dosis de 1/8 de la  $DL_{50}$ , manteniéndose muy baja o nula en los demás tratamientos.

Para el caso de los 30 días se nota un una disminución significativa del porcentaje de células sin daño y por lo tanto un aumento significativo en células con daño bajo, así como también aumento en todos los tratamientos el daño medio y el daño total. Para el caso de 45 días se muestra la misma tendencia de la disminución significativa de células sin daño y un aumento de células con daño bajo por encima del 50% en dos casos, y de igual manera el porcentaje de células con daño medio, daño severo y daño total aumento significativamente cuando estos datos se comparan con los datos del grupo testigo y en algunos casos los porcentajes son mayores que en los tratamientos correspondientes a 15 y 30 días.

**Figura 4.- Grado de daño del Bazo**



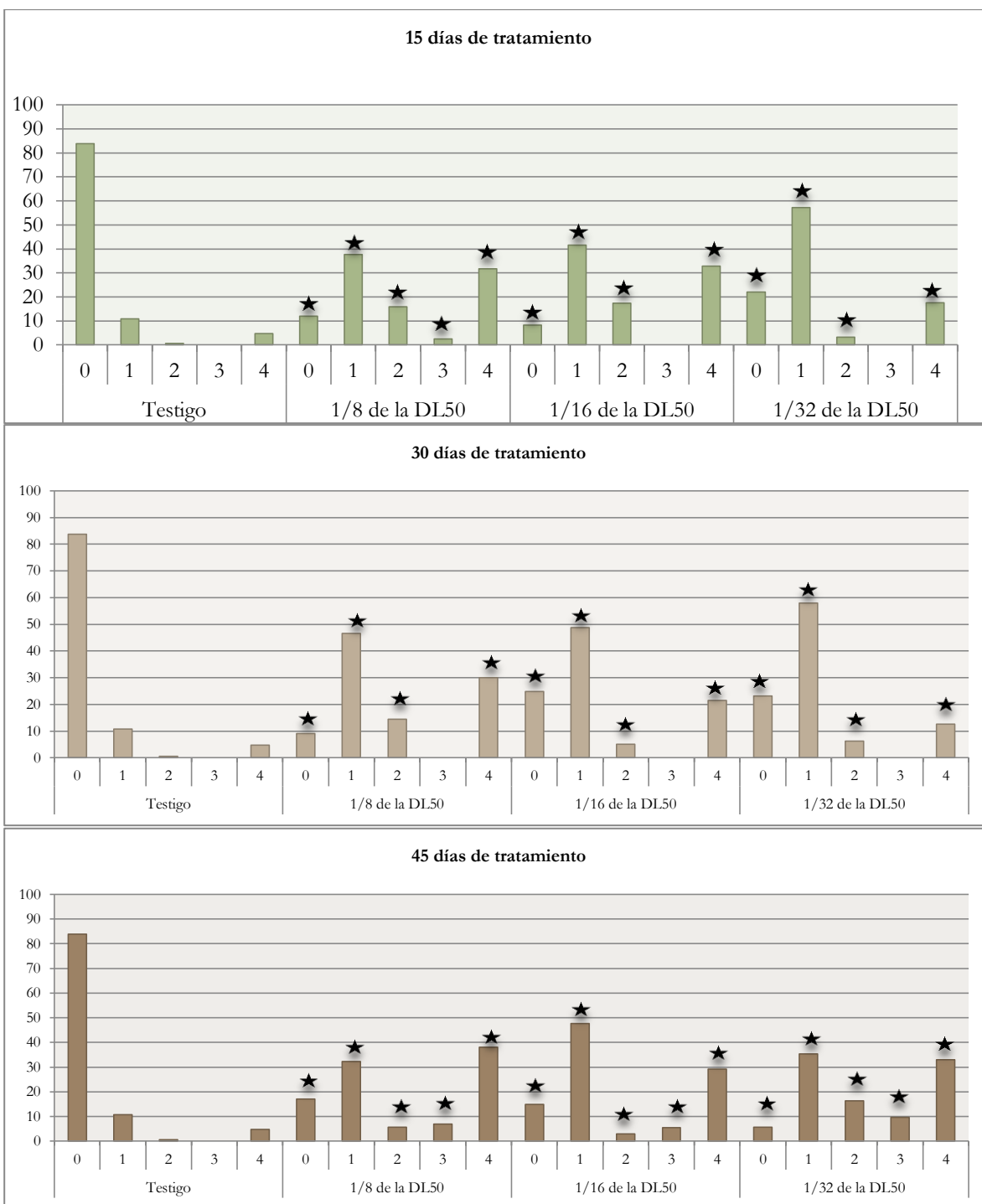
La n es de 500 células para todos los tratamientos y tiempos con excepción de 1/8 a los 30 y 45 días, donde la “n” es de 200 y 300 células respectivamente. \* $p \leq 0.05$  en comparación con los datos obtenidos del grupo testigo, aplicando la prueba de U de Mann-Whitney.

En la figura 5 se muestran el grado de daño observado en el corazón de los organismos tratados con la Casiopeína III-Ea en las concentraciones de 1/8, 1/16 y 1/32 de la  $DL_{50}$ , administrada en tres tiempos, 15, 30 y 45 días. Se puede observar a los 15 días de tratamiento que existe una disminución muy marcada en el porcentaje de células sin daño, de la misma manera se puede observar que hay un aumento significativo de las células con daño bajo, daño medio y daño total. En cuanto al porcentaje de células con daño alto o severo solo aumenta en la dosis de 1/8 de la  $DL_{50}$ , manteniéndose en cero en los tratamientos restantes.

A los 30 días de tratamiento se puede observar un comportamiento similar al de los 15 días de tratamiento, una disminución significativa en el porcentaje de células sin daño y un aumento en los porcentajes de células con daño bajo, medio y total.

Para el caso de 45 días de tratamiento observamos el mismo comportamiento que en las gráficas anteriores una severa disminución de células sin daño y un incremento de las células con daño.

**Figura 5.- Grado de daño del Corazón**



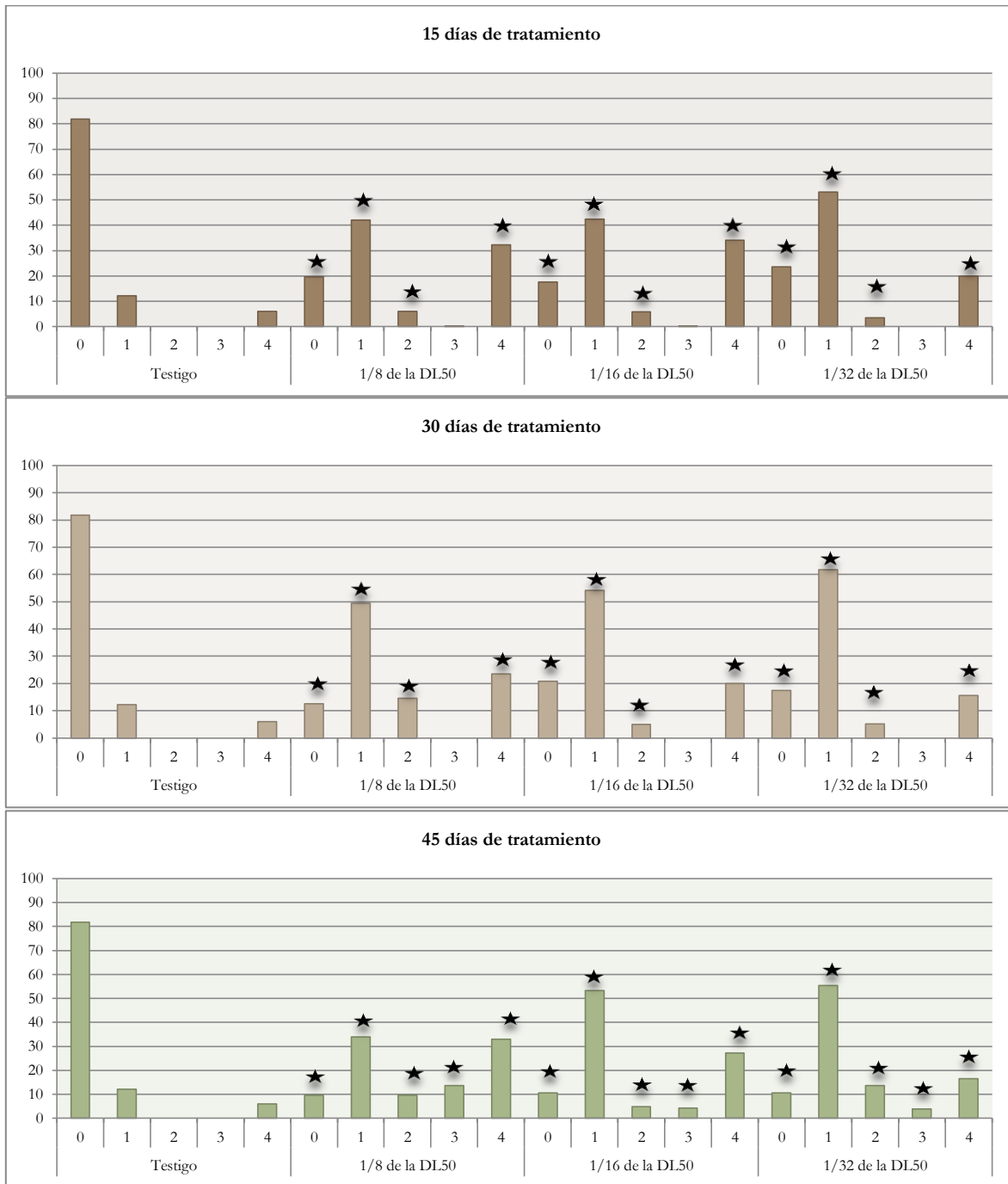
La n es de 500 células para todos los tratamientos y tiempos con excepción de 1/8 a los 30 y 45 días, donde la “n” es de 200 y 300 células respectivamente. \* $p \leq 0.05$  en comparación con los datos obtenidos del grupo testigo, aplicando la prueba de U de Mann-Whitney

En la figura 6 se muestran los datos obtenidos del daño producido por la Casiopeína III-Ea en las concentraciones de 1/8, 1/16 y 1/32 de la DL<sub>50</sub>, en esta se puede observar un comportamiento muy parecido a las gráficas anteriores con órganos diferentes, encontramos una disminución de células sin daño para todos los tratamientos, es decir, 1/8, 1/16 y 1/32 de la DL<sub>50</sub>, t para los tres tiempos que se manejaron, 15, 30 y 45 días respectivamente.

Es posible ver que para este caso en particular en todos los tiempos y tratamientos el aumento más significativo y más notorio es el de las células con daño bajo seguido de las células con daño total, siendo este último más elevado en las dosis de 1/8 y 1/32 de la DL<sub>50</sub>. También es posible notar que en el tratamiento de 45 días, aunque sigue un comportamiento similar al de los demás tiempos se puede observar que los aumentos de células con daño aumenta más que en los tratamientos de 15 y 30 días en la mayoría de los casos.

En la figura 7, 8, 9, 10 y 11 se mantiene el comportamiento de las células que se vio en los órganos anteriores, se muestra una muy severa disminución en el porcentaje de células con daño y un aumento excesivo de células con daño bajo, así como también se muestra un aumento en células con daño medio, alto y total aunque no es tan marcado como en las células con daño bajo. Para la mayoría de los casos el daño tiene su máximo en el tratamiento de 1/8 de la DL<sub>50</sub> para la mayoría de los tiempos.

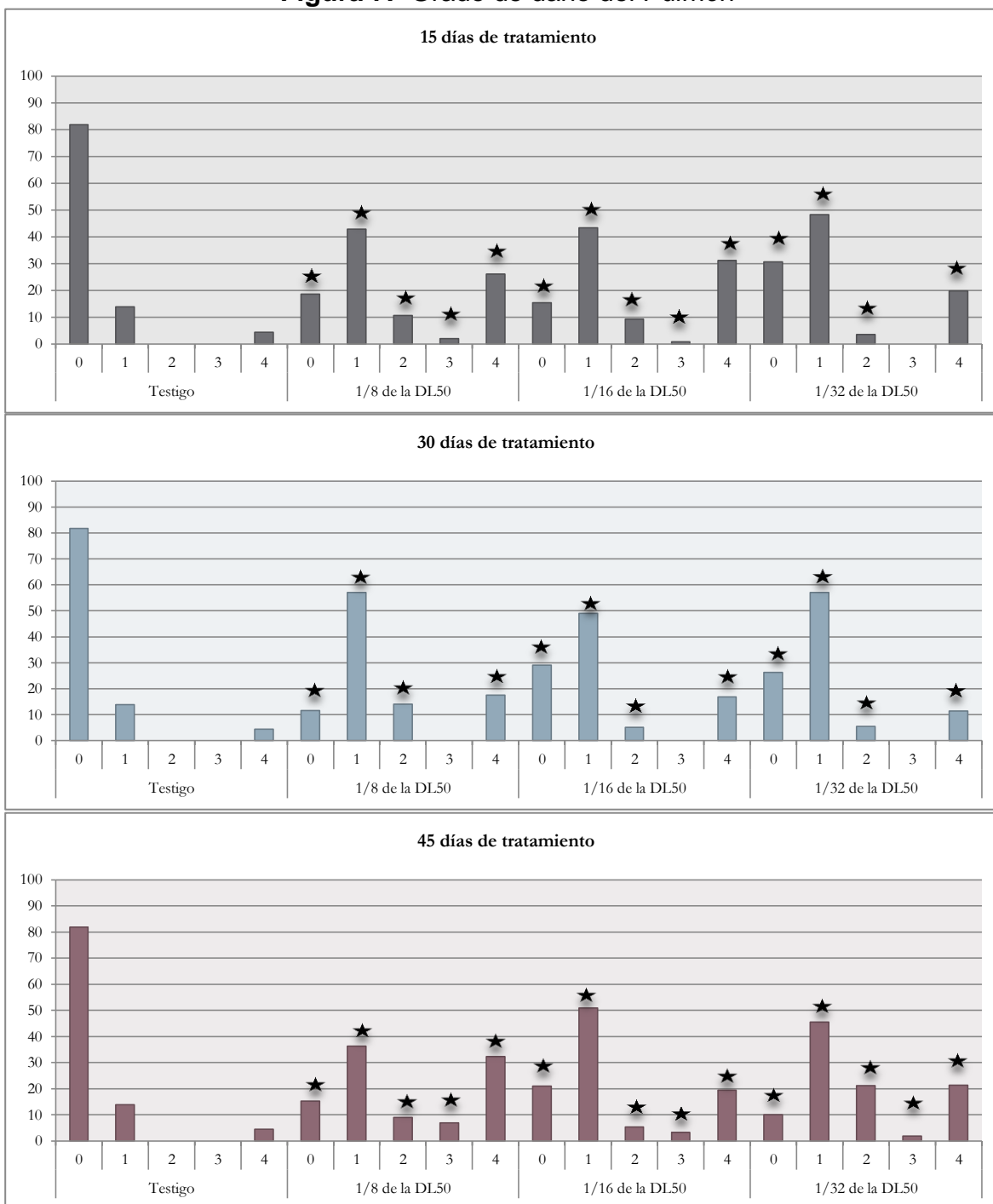
**Figura 6.- Grado de daño del Hígado**



La n es de 500 células para todos los tratamientos y tiempos con excepción de 1/8 a los 30 y 45 días, donde la “n” es de 200 y 300 células respectivamente. \* $p \leq 0.05$  en comparación con los datos obtenidos del grupo testigo, aplicando la prueba de U de Mann-Whitney

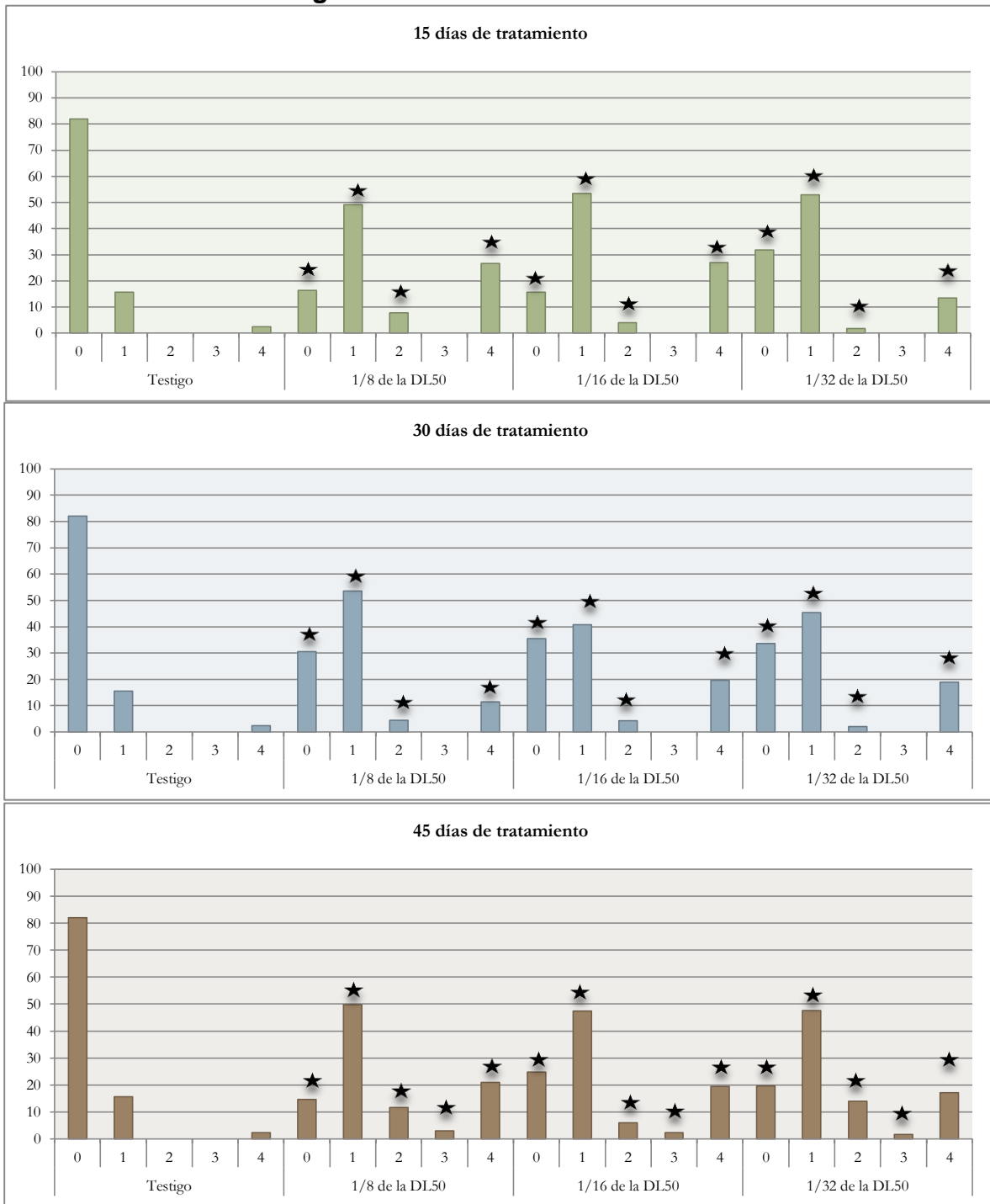


**Figura 7.- Grado de daño del Pulmón**



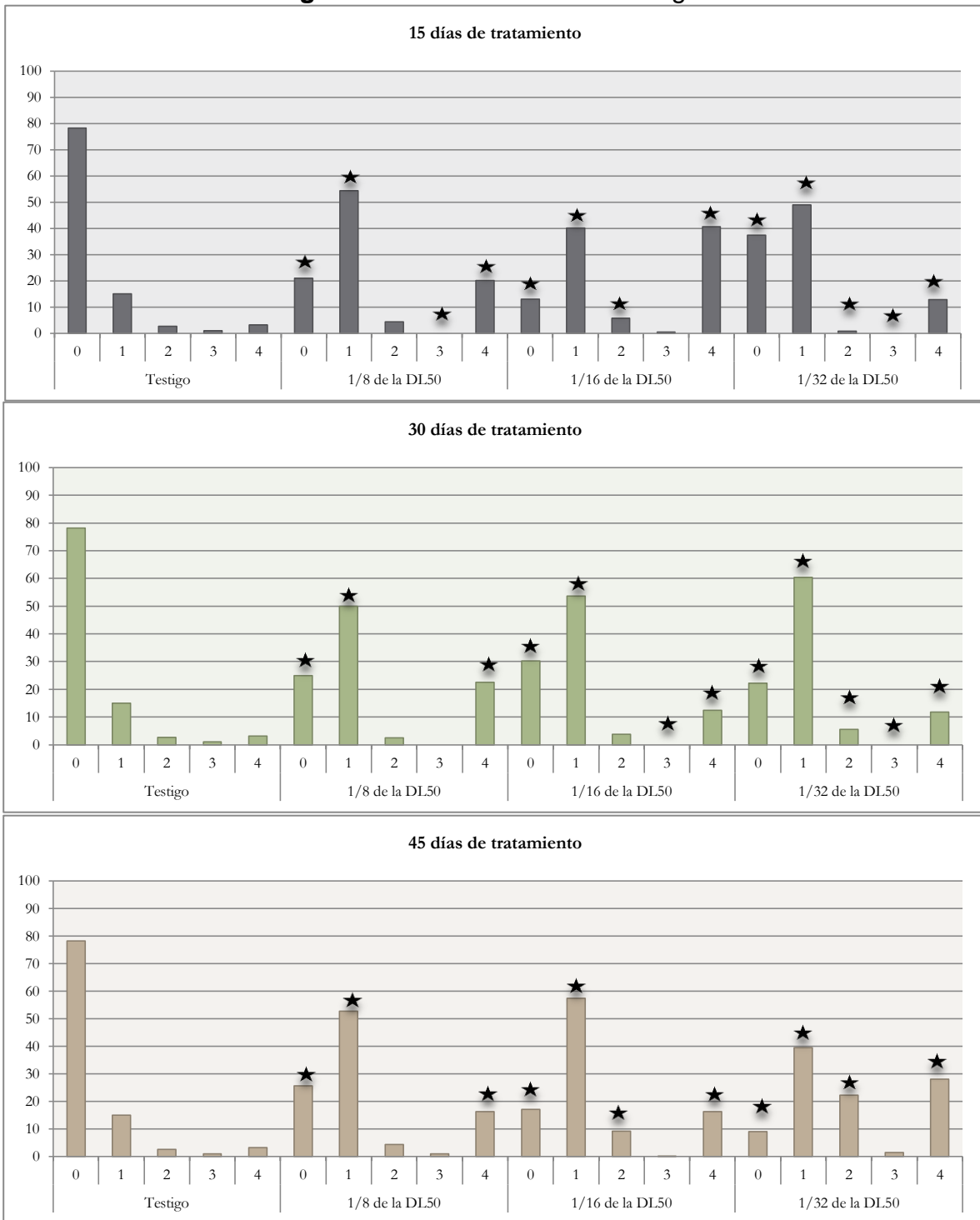
La n es de 500 células para todos los tratamientos y tiempos con excepción de 1/8 a los 30 y 45 días, donde la “n” es de 200 y 300 células respectivamente. \*p ≤ 0.05 en comparación con los datos obtenidos del grupo testigo, aplicando la prueba de U de Mann-Whitney

**Figura 8.-Grado de daño del Riñón.**



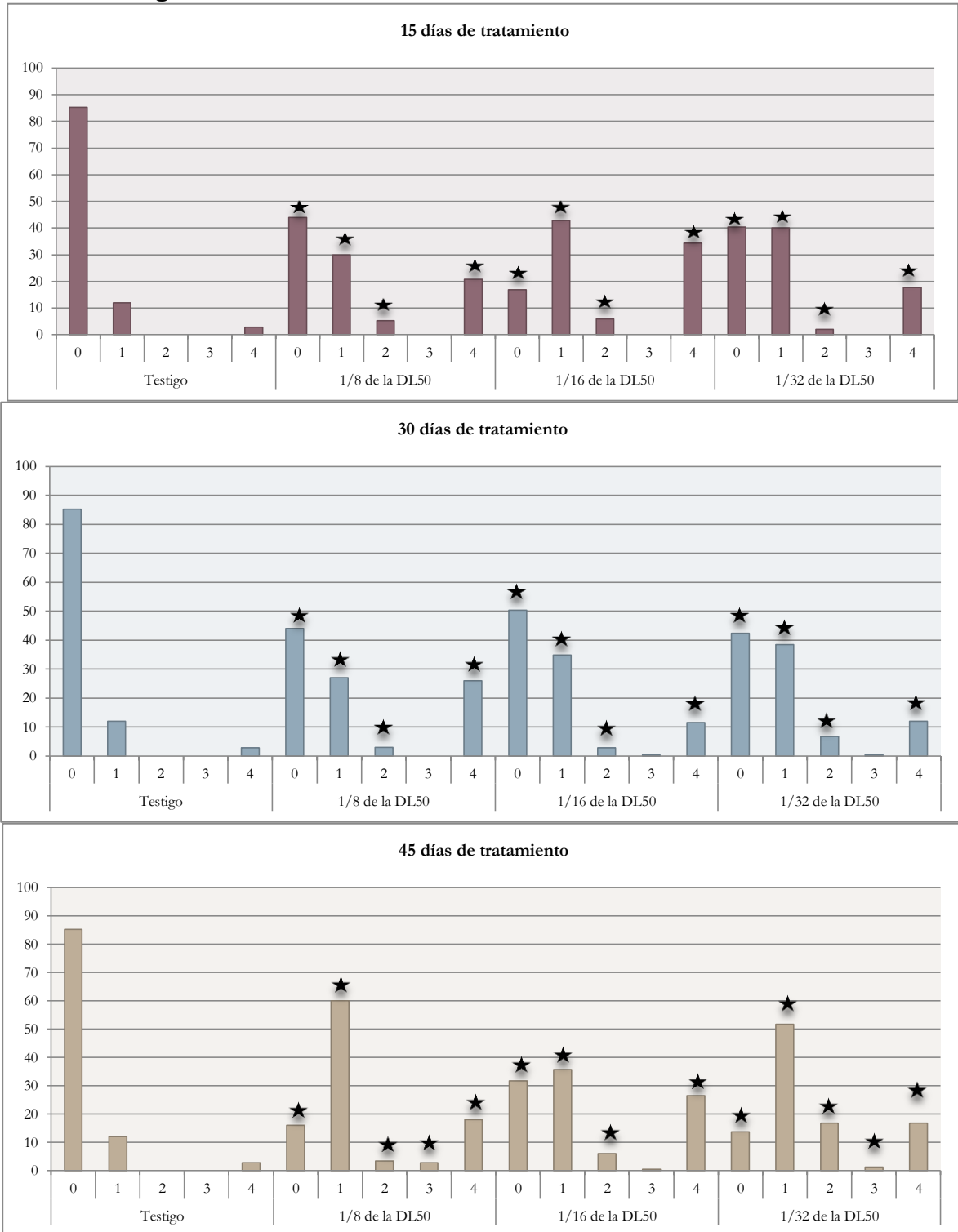
La n es de 500 células para todos los tratamientos y tiempos con excepción de 1/8 a los 30 y 45 días, donde la “n” es de 200 y 300 células respectivamente. \* $p \leq 0.05$  en comparación con los datos obtenidos del grupo testigo, aplicando la prueba de U de Mann-Whitney

**Figura 9.- Grado de daño de Sangre.**



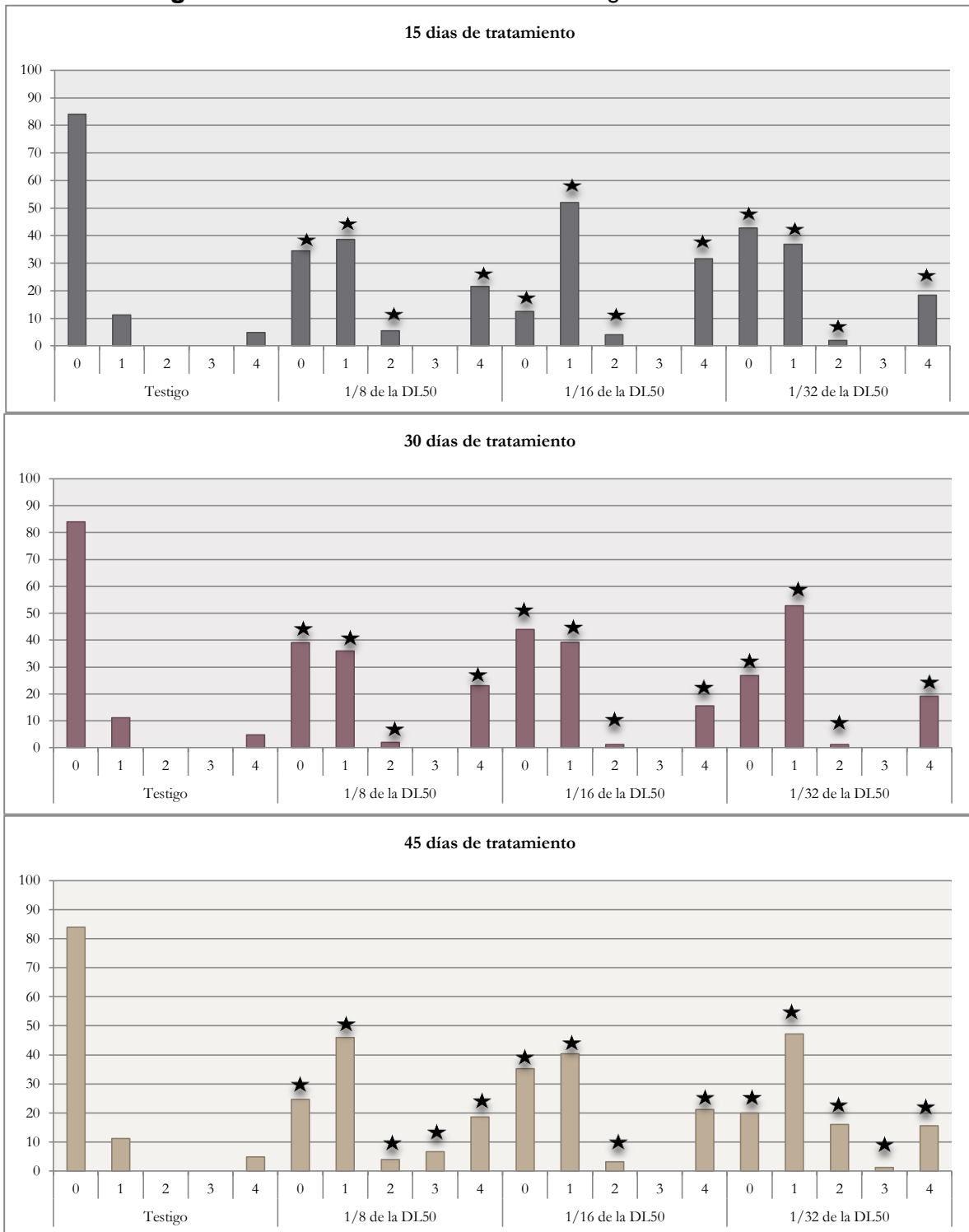
La n es de 500 células para todos los tratamientos y tiempos con excepción de 1/8 a los 30 y 45 días, donde la “n” es de 200 y 300 células respectivamente. \* $p \leq 0.05$  en comparación con los datos obtenidos del grupo testigo, aplicando la prueba de U de Mann-Whitney

**Figura 10.-Grado de daño de las células chicas del testículo.**



La n es de 500 células para todos los tratamientos y tiempos con excepción de 1/8 a los 30 y 45 días, donde la "n" es de 200 y 300 células respectivamente. \*p<0.05 en comparación con los datos obtenidos del grupo testigo, aplicando la prueba de U de Mann-Whitney

**Figura 11.- Grado de daño de las células grandes del testículo.**



La n es de 500 células para todos los tratamientos y tiempos con excepción de 1/8 a los 30 y 45 días, donde la "n" es de 200 y 300 células respectivamente. \*p<0.05 en comparación con los datos obtenidos del grupo testigo, aplicando la prueba de U de Mann-Whitney

---

## VII. DISCUSIÓN.

---

Con los estudios llevados a cabo hasta el momento se habla de que las Casiopeínas, al tener un centro metálico de cobre se espera que sean menos tóxicas para el organismo ya que el cobre es un metal esencial para el organismo y a diferencia de los demás fármacos antineoplásicos que se utilizan comúnmente como lo es el cisplatino, el cual se vuelve un problema al momento de ser absorbido por el organismo o desechado, ya que es un metal que aunque existe en el organismo no es esencial y por lo tanto no existen mecanismos puntuales de excreción de este metal, lo contrario que pasa con las Casiopeínas y el cobre dentro de estas moléculas, ya que al ser un metal esencial, existen diversos mecanismos por los cuales se pueden eliminar los excesos de éste, dentro del propio organismo.

La mayor ruta de excreción es por la bilis (Carson *et al.*, 1987), el cobre también se puede excretar por el sudor. La excreción por orina es baja en animales y humanos, ya que solo los aminoácidos unidos al plasma con una fracción de cobre están disponibles para la filtración glomerular (Lars *et al.*, 1986).

### VIABILIDAD CELULAR

La prueba de electroforesis unicelular en gel o ensayo cometa es una prueba que debe de ir acompañada de una evaluación de la viabilidad celular, ya que es de importancia crucial para la interpretación de los datos (Tice *et al.*, 2000), además de que es una prueba confiable de citotoxicidad

Se ha demostrado que las casiopeínas son capaces de disminuir la viabilidad celular, provocar apoptosis en células sanas y células tumorales, disminuir el crecimiento de las células, y provocar cambios morfológicos en células tumorales. Además Martínez (2008), observo en su investigación que las Casiopeínas se unen al ADN, con una alta afinidad, para degradar a los ácidos nucleicos ADN y ARN, en presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico.

Por ejemplo Trejo-Solis *et al.*, (2005), mostraron en sus experimentos con células de glioma 6 el efecto dosis-dependiente de la Cas IIgly sobre la viabilidad de estas células, en donde la mayoría murieron después del tratamiento con 5 mg y 10 mg/ ml de Cas IIgly durante 24 horas.

En otro estudio llevado a cabo por Alemón-Medina *et al.* (2007), se encontró que la Cas III-Ea ejerce una citotoxicidad moderada en células HeLa y en leucocitos, y después de la reducción del cobre por ASC se convierte en mucho más citotóxica. Los resultados que se obtuvieron en nuestros experimentos demuestran que la Cas III-Ea es citotóxica disminuyendo las células viables en algunos casos por debajo del 50%.

Una de las posibilidades por la cual se debe este comportamiento de los resultados es debido a que las casiopeínas presentan cobre en su centro y esto puede inducir apoptosis mediada por especies reactivas de oxígeno (ERO), producto de reacciones de óxido-reducción de tipo Fenton y Haber-Weis en la cual participa el cobre. Las ERO pueden causar pérdida del potencial de membrana mitocondrial con cambios en su permeabilidad y la liberación de factores apoptogénicos (Trejo-Solís, *et al.* 2005), y esto se ve reflejado en la disminución de células viables de los diferentes órganos y tejidos estudiados. Por otro lado, Martínez (2008) observó la formación de la proteína 8-oxodG en células que estuvieron expuestas a la Casiopeína II gly, esto sugiere que la generación de especies reactivas de oxígeno son la causa mayor de citotoxicidad de estos compuestos.

Existen relativamente pocos trabajos con respecto a la citotoxicidad provocada por las casiopeínas, por lo menos en modelos *in vivo*, y existen mucho menos trabajos realizados con la Cas III-Ea, sin embargo los estudios realizados hasta el momento con otras casiopeínas nos pueden ayudar a comprender un poco el funcionamiento de la Cas III-Ea. Cermeño-García *et al.*, (2007), observaron una disminución de la viabilidad en las células del corazón, el hígado, el bazo, el riñón y el testículo cuando se aplicó 4.4 mg/kg de la Casiopeína II-gly, mientras que Castañeda *et al.* (2004), encontraron que la viabilidad espermática se reducía

cuando aplicaba Cas IIgly vía ip en ratones de la cepa CD-1 en tratamientos de 60 días. De la misma manera Trejo-Solis *et al.* (2005) encontraron una disminución en células de glioma 6 administrando Cas II-gly. Por otro lado también se han encontrado resultados similares en otras casiopeínas en particular de la familia III, en donde con base en sus resultados concluyen que los ensayos de viabilidad celular muestran que la Cas III-ia es más activa que el cisplatino en las tres líneas evaluadas (Barrón-Sosa *et al.*, 2006).

Al parecer la Cas III-Ea no tiene un efecto marcado en algún órgano en particular, es decir las viabilidades que se obtuvieron de los ensayos realizados dentro del protocolo con los diferentes órganos es similar.

Barron-Sosa *et al.*, (2006), observaron que tanto la Casiopeína III-ia como el cisplatino producen la expresión de Bcl2 y Bax solo en las dosis más bajas, desapareciendo en las dosis mayores, lo cual probablemente implique una respuesta de defensa en las células desencadenado la vía apoptótica mitocondrial; la presencia de activación metabólica hace que esta expresión se produzca desde la dosis más baja en concordancia con el incremento de actividad anti proliferativa observado en los ensayos de viabilidad y dado que la Cas III-ia y la Cas III-Ea son de la misma familia, se puede esperar que los mecanismos de acción no sean iguales, si un tanto parecido, aunque haría falta realizar las pruebas de inmunohistoquímica para poder corroborar esta aseveraciones.

Al evaluar la viabilidad en los tres tratamientos que se dieron y los tres tiempos que se analizaron es que la mayor citotoxicidad se dio en 1/8 de la DL<sub>50</sub>, seguida de 1/16 de la DL<sub>50</sub> y por ultimo 1/32 de DL<sub>50</sub>. Estos datos de alguna manera se esperaban ya que muchas casiopeínas probadas han mostrado tener un efecto de dosis-respuesta, es decir a mayor dosis mayor efecto y viceversa. Lo que realmente es de llamar la atención en los resultados obtenidos, es el hecho de que en el tratamiento llevado a cabo durante 15 días se presentan los datos de viabilidad celular más bajos obtenidos en los tres tratamientos y los datos obtenidos después de 45 días de tratamiento presenta el mayor número de células viables generalizado para los tres tratamientos y los 7 tejidos analizados, es decir, existen



más células viables en comparación con las células para los tratamientos de 15 días en los 7 tejidos. Es probable que este comportamiento se deba a que como ya se ha mencionado con anterioridad la Cas III-Ea tiene un efecto citotóxico y genotóxico, por lo tanto al administrar este fármaco en el organismo de los ratones y al empezar a interactuar con las células y el ADN se provoca un daño en el genoma, y este daño puede conducir a la apoptosis de la célula, sin embargo también es bien sabido que las células tienen procesos de reparación del ADN que constituyen mecanismos esenciales para el mantenimiento de la integridad genómica (Pérez *et al.*, 2002), y es obvio que la estabilidad del genoma debe estar bajo continua vigilancia, y por ello, cuenta con varios mecanismos de reparación del ADN, que se han desarrollado para remover las lesiones pre-citotóxicas y pre-mutagénicas.

Los tratamientos que se llevaron a cabo en nuestros experimentos eran agresivos tanto por la naturaleza del fármaco, como por el tiempo de aplicación y la concentración del mismo en el organismo. Se sabe que cuando radiaciones, hipertermia o compuestos citotóxicos dañan gravemente a las células, se produce directamente la muerte de estas (necrosis), pero cuando la afectación es más suave se induce la apoptosis; en los tejidos se puede presentar mezcla de células afectadas por una u otra vía (Repetto y Repetto, 2009). Es muy probable que el daño causado por la Casiopeína III-Ea fuera tan severo que llevo a un gran número de células a un proceso de necrosis, lo cual se vio reflejado en la disminución de células viables. Las células que lograron sobrevivir a los tratamientos activaron sus mecanismos de reparación y es probablemente gracias a la activación de estos mecanismos y la proliferación celular que conforme pasa el tiempo existe un mayor número de células viables, aunque esto no quiere decir que estas células no hayan tenido un daño y sean células sin mutaciones.

#### ELECTROFORESIS UNICELULAR ALCALINA EN GEL.

Existen numerosas técnicas para detectar daño al ADN como por ejemplo la prueba de micronúcleos, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, entre otras, los resultados obtenidos por estas pruebas pueden ser

usados para identificar sustancias que tengan actividad genotóxica (Tice *et al.*, 2000).

La técnica de Electroforesis Unicelular en Gel es una prueba capaz de detectar rompimiento de cadena sencilla, sitios álcali lábiles, rupturas de cadena doble y sitios incompletos de reparación por escisión con alta sensibilidad en células individuales. Desde entonces el número de aplicaciones y de investigadores que usan esta técnica ha crecido exponencialmente (Tice *et al.*, 2000).

En estudios previos la electroforesis unicelular en gel muestra que la exposición a la Casiopeína IIgly induce daño al ADN que se refleja en el incremento de la longitud de los cometas, así como la aparición de células con daño total, ambos con un comportamiento dependiente de la concentración (Martínez, 2008).

Cuando se utiliza el ensayo cometa el número de células con daño es un parámetro utilizado para evaluar el efecto genotóxico, producido por agentes químicos (Altamirano-Lozano *et al.*, 1999). En los resultados obtenidos se encontró que el número de células con daño aumento cuando comparamos al grupo testigo con los grupos tratados, todos los tejidos presentaron un aumento de células con daño por encima del 40% en los tratamientos de 1/8, 1/16 y 1/32 de la DL<sub>50</sub>, y en los tres tiempos que se analizaron con excepción de las células del testículo en donde aunque existe un aumento de células con daño no sobre pasa el 35%. Es probable que el testículo sea el órgano menos afectado por la Cas III-Ea debido a la distribución del compuesto en el organismo y a que este tejido es de alta proliferación y cuenta con la barrera hemotesticular como protección adicional.

Estos resultados nos permiten comprobar que la Casiopeína III-Ea es un fármaco genotóxico por lo menos en las concentraciones que se probaron en este trabajo, similar a lo reportado por, Alemón-Medina *et al.* (2007) el cual encontró que la Cas-III-Ea es la más genotóxica cuando esta se reduce seguida de la Cas Igly y finalmente la Cas III-Ha.

Como ya se mencionó antes, se ha observado que las casiopeínas provocan muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis. Se sabe que las células apoptóticas muestran cambios morfológicos típicos como la contracción de la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear (Ormerod *et al.*, 1996), En nuestros resultados el ADN de las células no tratadas, es decir, el grupo testigo se mantuvo con daño que puede ser considerado como daño basal, mientras que las células tratadas con la Casiopeína III-Ea mostro un grado mayor de fragmentación del ADN, esto confirma un posible mecanismo de acción que sería la inducción de apoptosis. Estos resultados son reforzados por lo obtenido por De Vizcaya-Ruiz *et al.* (2000), ellos encontraron que la Casiopeína II es capaz de inducir muerte celular por apoptosis en células de leucemia (L1210) y de igual manera ellos observaron un aumento en el escalonamiento del ADN. Por lo tanto creemos que una posible vía por la cual la Casiopeína III-Ea produce daño es que al entrar al organismo estas no interactúan con el ADN directamente, sino que muy probablemente producen daño oxidante generalizado (Serment *et al.*, 2006), lo que a su vez concuerda con los niveles de citotoxicidad obtenidos en este estudio y en estudios previos en donde los niveles de supervivencia son menores al 50% (Alemón-Medina *et al.*, 2007). Sin embargo también existe la posibilidad de que el daño que se observa en el material genético sea dado por un daño directo a la molécula de ADN. Haría falta realizar pruebas más específicas para poder determinar que mecanismo de acción tiene la Casiopeína evaluada en este trabajo.

Una posible vía La mayoría de los estudios realizados en el entorno de las casiopeínas son llevados a cabo con cultivos celulares ya sea de linfocitos o en líneas celulares tumorales o murinas tales como CH1, L1210, pocos son los reportes en donde se trabaja con modelos *in vivo* y con células de diferentes órganos. Los resultados obtenidos de estos experimentos son importantes ya que arrojan datos del comportamiento de los fármacos en el organismo, nos pueden ayudar a encontrar algún órgano blanco, que finalmente es lo que se busca para poder lanzar un nuevo medicamento al mercado.

Cermeño-García *et al.*, (2006) encontraron que la Casiopeína II-gly y la Casiopeína III-ia provocó un incremento significativo de la longitud de los cometas de las células de todos los tejidos u órganos que evaluaron.

Dentro de los órganos que se eligieron para este estudio se encuentra el bazo que su función principal es la de la destrucción de las células sanguíneas rojas viejas, y mantiene un reserva de sangre, es por esto que es importante este órgano ya que tiene una interacción directa con la sangre que es un tejido que se encarga de la transportación de nutrientes y una probable vía de dispersión de la Cas III-Ea hacia todo el organismo. En los resultados que se obtuvieron (Figura 4) observamos que las células sin daño disminuyen y las células con daño aumentan. Este daño se mantiene y aumenta conforme pasa el tiempo y el tratamiento.

Se ha demostrado que la administración intravenosa de Cas IIgly en ratas produce daño hemolítico de manera dosis-dependiente (Gracia-Mora *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la viabilidad de las células sanguíneas disminuyó hasta un 39% en la dosis de 1/8 de la DL<sub>50</sub>, y el porcentaje de células con daño se mantuvo de 48 a un 66%, lo que quiere decir que el tratamiento que se aplicó fue demasiado agresivo llevando a un gran número de células a la muerte por ejemplo en el tratamiento de 1/16 de la DL<sub>50</sub> rebasa el 40% del total de células evaluadas.

Por otro lado en otro estudio se evaluó la respuesta hematológica de ratas cepa Wistar, utilizando esquemas de aplicación de dosis de 1.3 y 5 mg/Kg de Casiopeína IIgly. El mayor efecto observado, en la administración de una dosis simple intravenosa de la Cas IIgly (5mg/Kg), fue una anemia hemolítica debida a un daño directo de eritrocitos. Probablemente esta anemia se deba al estrés oxidante causado por las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas a partir de la reducción del cobre de la Casiopeína. Se observó que una de las estructuras más sensibles a las ERO es la membrana celular de los eritrocitos (De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2003). Los resultados permiten suponer que es por este mismo mecanismo (el de las ERO), que las células sanguíneas de los ratones presentaron tanto daño, además de que es sabido que la Cas III-Ea es mucho más citotóxica que la Cas

Ilgly, por lo tanto nosotros esperaríamos que si en vez de las dosis aplicadas por De Vizcaya-Ruiz *et al.*, (2003) de la Cas Ilgly se aplicaran las mismas concentraciones pero de Cas III-Ea, exista un gran número de organismos muertos.

Es posible que el mecanismo por el cual se está observando daño en nuestros ratones sea debido a que la Cas III-Ea, provoca toxicidad subcelular este tipo de toxicidad ya se ha encontrado con otras casiopeínas. Se expusieron mitocondrias aisladas de varias células de rata (Wistar) de hígado, riñón, corazón y hepatoma AS-30D a estos fármacos para medir los índices de respiración, gradiente de H<sup>+</sup> y las actividades del succinato, la 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la ATP-asa. Los resultados mostraron que las mitocondrias del hígado, riñón y hepatoma fueron sensibles a la Cas Ilgly (Trejo-Solís *et al.*, 2005). También fue posible observar que las Casiopeínas pueden interactuar directamente con la mitocondria aislada o intacta en las células provocando efectos como la inhibición de la fosforilación oxidativa y eventualmente una disminución del ATP. Algo que se encontró y que es importante para los estudios de toxicología de estos fármacos es que las Casiopeínas no fueron específicas para las mitocondrias tumorales sino que también afectaron a las mitocondrias sanas.

De la misma forma Marín-Hernández (2003), describió que la administración intra-peritoneal o intravenosa de las Casiopeínas en ratas provoco una acumulación de estos fármacos en diversos órganos, principalmente en hígado, riñón y corazón.

También se han realizado estudios preclínicos para evaluar los efectos tóxicos agudos en perros de las casiopeínas Ilgly y III-ia. Los datos muestran que existe un desarreglo de las miofibrillas, mientras que las mitocondrias estaban aumentadas de tamaño y había una pérdida de las crestas mitocondriales. Esto indica que probablemente las casiopeínas están afectando directamente a las mitocondrias de las células musculares, desencadenando así un insuficiencia cardiaca aguda (De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2003, García-Otuño y Leal-García., 2006). Nosotros encontramos daño de las células del corazón por encima del 50%, así como la disminución de la viabilidad de estas células por debajo del 50%. El

mecanismo por el cual las casiopeínas puedan dañar las mitocondrias del corazón no se conoce con precisión, sin embargo estudios publicados sugieren que la producción de radicales libres puede jugar un papel importante (Marín-Hernández, 2003).

Como ya se ha mencionado con anterioridad existen pocos trabajos realizados con respecto a la Cas-III-Ea, sin embargo los trabajos realizados alrededor de otras casiopeínas nos pueden ayudar a esclarecer el comportamiento de esta casiopeína, y corroborar si este fármaco produce daño al material genético y así poder respaldar los resultados de este trabajo y poder reforzar los resultados de otros autores.

Haciendo un análisis general de los datos que se obtuvieron, tanto de la prueba de viabilidad como de la técnica de Electroforesis Unicelular, podemos observar que no existe una afinidad marcada por alguno de los órganos que se analizaron.

Cermeño-García (2007), comparando sus resultados encontró que existía un incremento en la longitud de la migración constante desde las 3 y hasta las 24 horas de exposición en todos los órganos excepto de testículo. De la misma manera nosotros encontramos un incremento de la longitud en todos los órganos incluyendo la testículo, sin embargo el porcentaje de células con daño tanto de las células chicas como de las células grandes del testículo, es mucho menor que el del resto de los órganos, esto es probablemente porque el tiempo de exposición de nuestros ratones fue mucho más prolongado además de que la Casiopeína III-Ea es una de las más tóxicas.

---

## VIII.CONCLUSIONES:

---

- La disminución de células viables en los diferentes órganos que se estudiaron nos indica que la Casiopeína III-Ea es un fármaco citotóxico.
- Pudimos observar un aumento significativo tanto en el número de células con daño como en las longitudes de los cometas, es por esto que nosotros en base a lo que encontramos decimos que la Casiopeína III-Ea es un agente genotóxico.
- Apegándonos a los resultados encontrados en este estudio la Casiopeína III-Ea no presenta afinidad por algún órgano.
- El testículo fue el órgano en el que se encontró menos daño, esto es posiblemente a que esté cuenta con una barrera hemotesticular que le da una protección extra a agentes externos, en comparación con los otros órganos.

---

## IX. REFERENCIAS.

---

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. D. (1996). Biología molecular de la célula. 3° edición. Ediciones Omega. Barcelona.
- Alemón-Medina R., Breña-Valle M., Muñoz-Sánchez J. L., Gracia-Mora Ma. I. y Ruiz-Azuara L. (2007). Induction of Oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®). *Cancer Chemother Pharmacol.* 60:219-228.
- Altamirano B. A. (1994). Manual de Manejo de Animales de Laboratorio. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 1a Edición. México D.F.
- Altamirano-Lozano M., Valverde M., Álvarez-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. *Teratog Carcinog Mutag* 19:243-255.
- Baños D. J. E. y Farré A. M. (2002). Principios de Farmacología Clínica. Editorial MASSON S.A. Barcelona Madrid. pp.4-5.
- Barrón-Sosa L. R., Gracia-Mora I., Gómez-Ruiz C. y Ruiz-Azuara L. (2006). Influencia del Metabolismo en la Actividad Antiproliferativa y Apoptótica del Quelato Mixto de Cobre Casiopeína III-Ia® en tres Líneas Tumorales y en Linfocitos Humanos. 2do Congreso Nacional de Química Médica, Simposio de Cáncer Básico en 2do Congreso Nacional de Química Médica. México. Facultad de Química, UNAM.
- Bellido G. D. y A. de Luis R. D. (2006). Manual de Nutrición y Metabolismo. Editorial Díaz de Santos, S. A. España.



- Bocanegra-Astivia D. y Altamirano-Lozano M. (2006). Toxicología Reproductiva Inducida por la Casiopeína III-la en Ratones Macho de la Cepa Cd-1. En 2do Congreso Nacional de Química Médica. México. Facultad de Química, UNAM. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.
- Carson L. B., Ellis III V. H. y McCann L. J. (1987). Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans Including feasibility and Need. Lewis Publishers INC. Chelsea Michigan.
- Castañeda P. A., Aragón Martínez A. y Altamirano Lozano M. (2004). Toxicidad Reproductiva Masculina de la Casiopeína II-GLY. 1º Congreso Nacional De Química Médica. Oaxaca, Oaxaca. pp. 135-138.
- Celorio J. A., Calero F. y Armas A. (1986), Fundamentos de Oncología Ginecológica. Ediciones Díaz de Santos, S. A. Bilbao, Madrid.
- Cermeño García J.R. (2007). Estudio del efecto genotóxico inducido *in vivo* por la Casiopeína II-gly y por la Casiopeína III-ia. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México, D.F.
- Cermeño García J.R., Rodríguez Mercado J.J. y Altamirano Lozano M. (2006). Estudio del efecto genotóxico inducido *in vivo* por la Casiopeína II-gly y por la Casiopeína III-ia. 2º Congreso Nacional de Química Médica.
- De Las Heras G. M. (2008). Oncología, radioterapia mini manuales prácticos. Editorial Arán. Madrid.
- De Vizcaya Ruiz A. y Rivero Müller A. (2003). Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeína II. Toxicology. 194: 103-113.

- De Vizcaya Ruiz A., Rivero Muller A., Ruiz Ramírez L., Kass G.E.N., Kelland L. R., Orr R. M. 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. *Toxicology in Vitro* 14: 1-5.
- Díaz R. E. y García C. J. (2000). *Oncología clínica básica*. Ediciones Arán. España.
- García-Ortuño L.E. y Leal-García M. (2006). Estudio de los efectos tóxicos agudos de las Casiopeínas en perros. Segundo congreso Nacional de Química Medica. Querétaro, México.
- Gracia Mora I., Bravo Gomez M.E., Ruiz Ramirez L., Tinoco Mendez M., y Huerta L. (2004). New antineoplastic in vitro and in vivo screening of mixed chelate copper(II) coordination compounds (casiopeinas) in several tumoral models. *BIOORGANIC & Medicinal CHEMISTRY*. Vol 98:n6: 1045-1053
- Gracia Mora I., Ruiz Ramírez L., Gómez Ruiz C., Tinoco Méndez M., Márquez Quiñones A., Romero De Lira L., Marín Hernández Á., Macías Rosales L. y Bravo Gómez Ma. E. (2001). Knighth's Move In The Periodic Table, From Copper To Platinum, Novel Antitumor Mixed Chelate Copper Compounds, Casiopeinas, Evaluated By An In Vitro Human And Murine Cancer Cell Line Panel. *Metal Based Drugs*. Vol. 8(1):19-28.
- Grillo C. A., Reigosa M. A. y Lorenzo de Mele F. M. (2009). Effects of Copper ions released from metallic copper on CHO-K1 cells. *Mutat Reserch* 672(1): 45-50.

- Guevara C. S. (2008). Efectos de la Casiopeína Ilgly en el genético de linfocitos humanos in vitro de sangre periférica. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campus II, México, D.F.
- Guyton A. C. (1984). Tratado de Fisiología Medica. 6°ed. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México D.F.
- Hilton A. S. y Thomas C. J. (1962). Patología Veterinaria. Editorial Hispano Americana. México. 223-227.
- Illera M. M., Illera del P. J. y Illera del P. J. C. (2000). Vitaminas y Minerales. Editorial Complutense. Madrid.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México. (2010). Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2750&ep=27>, [Fecha de consulta: 10 de febrero de 2010].
- Karlsson O. M., Anehall T., Friberg E. L., Henningsson A., Kloft C., Sandström M. y Xie R., (2005). Pharmacokinetics/Pharmacodynamic Modelling in Oncological Drug Development, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 96(3): 206-211.
- Lars F., Gunnar F.N., Velimir B. V. (1986). Handbook on the toxicology of Metals. 2° edición. Editorial Elsevier Science. Ámsterdam.
- Leal-García M., García-Ortuño L., Ruiz-Azuara L., Gracia-Mora I., Luna del Villar J. y Sumano H. (2007). Assessment of Acute respiratory and Cardiovascular Toxicity of Casiopeinas in Anaesthetized Dog. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 101: 151-158.

- Lewis M. S., Heitkemper M. M., Dirksen R. Shannon., Bucher L., Giddens J. F., Graber O. P. (2004). Enfermería medicoquirúrgica: valoración y cuidados de problemas clínicos. Sexta edición. Elsevier España. 2036 paginas.
- Marín Hernández A. y Gracia Mora I. (2003). Toxic Effects of Copper-Bassed Antineoplastic Drugs (Casiopéinas®) on Mithochondrial Functions. *Biochemical Pharmacology*. 65.:1979-1989.
- Martínez C. K. A. (2008) Compilación de los Estudios Químicos y farmacológicos de la Casiopéinas III-ia y IIgly. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F
- Matarese L. E. y Gottschlich M. M. (2004). Nutrición Clínica Practica. Editorial Elsevier Science,. Madrid, España.
- Mattei J.F., Billings P., Dausset J., Manaranche R., Lacadena J.R. y Furness M. (2001). Ethical eye: the human genome. Editorial Complutense S. A. Madrid. pp.- 119.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2010). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. [Fecha de consulta: 10 de febrero de 2010].
- Ormerod M. G., O'Neill C., Robertson D., Kelland L. R. y Harrap K. R. (1996). Cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced cell death through apoptosis in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 37, 463-471.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 123: 291-98.

- Page P. C., Curtis J. M., Sutter C. M., Walker J. A. M. y Hoffman B. B. (1998). *Farmacología Integrada*. Editorial Harcourt. Madrid.
- Pérez M Del R, Dubner D., Michelín S., Gisone P. y Carosella E. (2002). *Telomeros y Reparación de Daño Genómico su Implicancia en Patología Humana*. Medicina Buenos Aires. Vol.62: n6.
- Rahman A. M. S. y Kauffman E. R., (2004) *The integration of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Understanding Dose- Response*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 44:111-136.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. y Flower R.J. (2008). *Farmacología*. Editorial Elsevier Imprint. Barcelona, España.
- Repetto J. M. I. y Repetto K. G., (2009). *Toxicología fundamental*. Ediciones Díaz de Santos. Cuarta edición. España.
- Rivero-Müller A., De Vizcaya-Ruiz A., Plant N., Ruiz L. y Dobrota M. (2007). *Mixed chelate copper complex, Casiopeina Ilgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity*. *Chemico-Biological Interactions*. 165: 189-199.
- Rubin P. (2003). *Oncología Clínica Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. Editorial Saunders Company, an Elsevier Science Imprint. Madrid, España.
- Ruiz-Azuara L. y Gracia-Mora I. (2006). *Casiopeínas, Compuestos de Novo con Actividad Antineoplásica: un ejemplo de desarrollo de medicamentos en química médica*. Simposio de Cáncer Básico en 2do Congreso Nacional de Química Médica. México. Facultad de Química, UNAM. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

- Ruiz Ramírez L., De la Rosa M.E., Gracia Mora I., Mendoza A., Pérez G., Ferrer Sueta G., Tovar A., Breña M., Gutiérrez P., Cruces Martínez M.P., Pimentel E. y Natarajan A.T. (1995). Casiopeinas, metal-based drugs a new class of antineoplastic and genotoxic compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 59(1): 207-207.
- Schwab M. (2001). *Encyclopedic Reference of Cancer*. Editorial Springer-Verlag Berlin. Heidelberg, Italia.
- Senra V. A. (2002), *El cáncer, Epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención*. Ediciones Harcourt, S.A., An Elsevier Science Imprint. Madrid, España.
- Serment Guerrero J., Reyes Pérez E. y Breña Valle M. (2006). Fragmentación de ADN por Diferentes Casiopeínas. 2º Congreso Nacional de Química Médica.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. y Schneider E.L., (1988). A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175(1): 184-191.
- Sirois M. (2005). *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Ediciones. Elsevier Mosby. Estados Unidos de America. p.p. 87-113.
- Strauss G. H. S. (1991). Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte test (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation Research*. 252: 1-15.
- Tice R., Andrews P. y Vazquez M. (1996). Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. Revised. Integrated Laboratory Systems P.O. Box 13501, Research Triangle Park, NC 27709. 1-8pp.

- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C. y Sasaki Y. F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.
- Tovar-Huerta S., Gracia-Mora I. y Ruiz-Azuara L. (2006). Evaluación antineoplásica de dos compuestos de coordinación mediante el empleo de modelos in vitro. En 2do Congreso Nacional de Química Médica. México. Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, UNAM.
- Trejo-Solís C., Palencia G., Zúñiga S., Rodríguez Ropon A., Osorio Rico L., Sánchez Torres Ll., Gracia Mora I., Márquez Rosado L., Sánchez A., Moreno García M. E., Cruz A., Bravo Gómez M. E., Ruiz Ramirez L., Rodríguez Enríquez S. y Sotelo J. (2005). Cas II gly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Neoplasia*. 7. 6:563-574.
- Union for International Cancer Control [UICC]. (2010). Disponible en: <http://www.uicc.org>. [Fecha de consulta: 15 de febrero de 2010]
- William S. K., Michael R. C. y Charlotte A. S. (2006). Conceptos de genética. 8° edición. Editorial Prentice Hall. España. p.p.- 501.