



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA DE LA CASIOPEÍNA[®]
III-Ea EN UN MODELO TUMORAL DE RATA”**

TRABAJO DE TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA

LUIS ARTURO MENDOZA MARTÍNEZ

TUTORES

M. en C. MA. ISABEL GRACIA MORA.

DRA. en C. GRACIELA GUADALUPE TAPIA PÉREZ

MÉXICO D.F.

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.

DEDICATORIA

A todos los animales de experimentación, por que sin ellos el avance de la ciencia no seria posible.

AGRADECIMIENTOS

A la U.N.A.M., por formarme y darme la oportunidad de superación académica y personal a lo largo de mi carrera.

A CONACYT, por darme la oportunidad y los medios para hacer posible este posgrado.

A las Doctoras Isabel Gracia, Graciela Tapia y Laura Romero, que hicieron posible con su apoyo, enseñanzas y solidaridad la conclusión de este trabajo.

A la Dra. Sara Rodríguez del Instituto Nacional de Cardiología, por la donación de la línea tumoral empleada en este trabajo.

Al Departamento de Patología y Diagnóstico Clínico por las facilidades y ayuda proporcionada en el desarrollo de este trabajo.

A Héctor Rico por sus valiosos consejos ayuda y amistad.

A Celedonio Gómez por toda la asesoría y apoyo proporcionado.

A Mabel Tinoco, Lucía Macías y Francisco Sánchez por toda la ayuda recibida para el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, por lo que la búsqueda de agentes quimioterapéuticos ha tomado relevancia en las últimas décadas. En este marco, se han realizado diferentes investigaciones alrededor de una familia de compuestos de cobre denominadas Casiopeínas[®], de las cuales algunos integrantes ya han demostrado actividad citostática y antineoplásica en modelos *in vitro* e *in vivo*. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad de la Casiopeína[®] III-Ea (nitrato de 4,7-dimetil, 1-10-fenantrolina, acetilacetato, cobre (II)) en ratas con hepatocarcinoma de rata AS-30D ya que ha sido señalada como una de las más prometedoras en los estudios de correlación estructura-actividad (QSAR). Se inocularon 30 ratas Hsd:Wistar con una suspensión de células del hepatocarcinoma y posteriormente se dividieron en 5 grupos de 6 animales cada uno y se les administró a cada grupo uno de los siguientes 5 tratamientos: I-Control tratado con agua inyectable. II-Control con Mitoxantrona[®], III, IV y V con 3 diferentes dosis de Casiopeína[®] III-Ea 0.2, 0.4 y 0.8 mg/kg respectivamente. Los tratamientos se administraron los días 0, 2, 4, 6, los animales se sacrificaron el día 7 y se colectaron los tumores. La respuesta al tratamiento se determinó por la densidad celular total. Adicionalmente se realizaron, prueba de TUNEL e inmunohistoquímica para el marcador Ki-67, determinando el porcentaje de positividad. Se encontró que hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el grupo I y los grupos II y V y no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los grupos II y V. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la prueba de TUNEL y en la expresión del marcador Ki-67 entre el grupo I y los grupos II y V. Se concluye que la dosis de 0.8 mg/kg de Casiopeína[®] III-Ea presentó una actividad antineoplásica similar a la mitoxantrona.

Palabras Clave: Cáncer, Casiopeína[®] III-Ea, Mitoxantrona[®], Hepatocarcinoma AS-30D, Antineoplásica, Citostática, TUNEL, Inmunohistoquímica, Antígeno Ki-67.

ABSTRACT

Cancer is one of main death causes worldwide; therefore, the searches of chemotherapy agents have taken relevance in the last decade. In the area, research has been made around the copper compound family named Casiopeína[®], where some of the members have shown, cytostatic and antineoplastic activity at *in vitro* and *in vivo* models. The objective of this study was to evaluate the activity of the Casiopeína[®] III-Ea in rats with the hepatic carcinoma of the rats AS-30D, which has been regarded as one of the most promising in studies on Structures-Activity correlation by QSAR method. Thirty Hsd:Wistar rats were inoculated with a cellular suspension of hepatic carcinoma AS-30D and they were divided in 5 groups of 6 animal each to administer one of the following 5 treatments: I Control without treatment, II Control with Mitoxantrone[®] and III, IV y V receiving three different doses of the Casiopeína[®] III-Ea 0.2, 0.4 and 0.8 mg/kg, respectively. The treatments were administrated at day 0, 2, 4, 6 and the animals were euthanized on the 7th day to collect the tumors. The total cellular density determined the treatment response. In addition, TUNEL assay and immunohistochemistry for Ki-67 marker were performed to determine the percentage of the positivity. It was found that there were significant differences ($P < 0.05$) between the group I and groups II and V; and there were no significant differences ($P > 0.05$) between the groups II and V. Both, the TUNEL test and the Ki-67 expression showed significant differences ($P < 0.05$) among the groups I, II and V. In conclusion, Casiopeína[®] III-Ea at a dose of 0.8 mg/kg presented an antineoplastic activity similar to mitoxantrone.

Key Words: Cancer, Casiopeína[®] III-Ea, Mitoxantrone[®], Hepatocarcinoma AS-30D, Antineoplastic, Cytostatic, TUNEL, Immunohistochemistry, Antigen Ki-67.

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
A. Tratamientos contra el cáncer.....	1
A1. Casiopeína® III-Ea.....	2
A2. Mitoxantrona.....	3
B. El cáncer en el mundo.....	4
C. El cáncer en México.....	5
C1. Morbilidad.....	5
C2. Defunciones.....	6
D. Carcinoma Hepatocelular.....	8
D1. Síntomas.....	9
D2. Diagnóstico.....	9
D3. Clasificación histológica.....	9
D4. Tratamiento.....	10
E. Modelo de Carcinoma Hepatocelular AS-30D.....	11
F. Apoptosis.....	12
F1. TUNEL.....	12
G Ciclo Celular.....	13
G1. Ciclinas.....	14
G2. Expresión diferencial de ciclinas en las distintas fases del ciclo.....	15
G3. Transición G₁/S.....	15
G4. Transición G₂/M.....	16
G5. Regulación y Desregulación del Ciclo Celular.....	17
H. Proliferación Celular.....	19
H1. Antígeno Ki-67.....	19
II. Justificación.....	21
III. Objetivos.....	22
IV. Hipótesis.....	23
V. Material y Metodología.....	24

VI. Resultados.....	33
VII. Discusión.....	45
VIII. Conclusiones.....	50
IX. Bibliografía.....	51
X Apéndices.....	56

Tabla de Abreviaturas

ADN- Ácido desoxirribonucleico.

APC-Ligasa de Ubiquitina.

ARN- Ácido ribonucleico.

Agua Iny.- Agua Inyectable.

Cas. III-Ea- Casiopeína III-Ea [Cu(4,7-dimetil-1,10-

fenantrolina)(acetilacetato)(H₂O)]NO₃.

Cas. III-Ea 0.2- Tratamiento de Casiopeína[®] III-Ea a dosis de 0.2 mg/kg.

Cas. III-Ea 0.4- Tratamiento de Casiopeína[®] III-Ea a dosis de 0.4 mg/kg.

Cas. III-Ea 0.8- Tratamiento de Casiopeína[®] III-Ea a dosis de 0.8 mg/kg.

CDK-Enzimas del ciclo celular dependientes de Ciclina.

cm-Centímetros.

DL₅₀ Dosis letal 50 %.

dUTP.- Deoxyuridin Trifosfato.

FMVZ- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

g-Gramos.

hrs-Horas.

INEGI- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.

kDa-Kilodaltones.

L-Litro.

Kg-Kilogramos.

mg- Miligramos.

min-Minutos.

mL-Mililitros.

mm²-Milímetros cuadrados.

Mitos. Mitoxantrona.

r.p.m.-Revoluciones por Minuto.

TdT.- Deoxythimidina Transferasa.

TUNEL.- Ensayo inmunohistoquímico por sus siglas en ingles Terminal

Deoxythymidine Transferase-Mediated dUTP Nick-End Labeling.

UNEXA- Unidad de Experimentación Animal.

μ-Micras.

μl-Microlitros.

μm-Micrometros.

°C- Grados Centígrados.

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Distribución Porcentual de Egresos Hospitalarios por Tipo de Tumor Maligno para cada Sexo, 2006.

Cuadro 2. Esquemas de Tratamiento.

Cuadro 3. Inhibición del Crecimiento por Grupo.

Cuadro 4. Razón de Momios por Grupo.

Cuadro 5. Diferencia del Promedio de Densidad Celular Vs. Grupo I (Agua Iny.).

Cuadro 6. Diferencia del Promedio de Densidad Celular Vs. Grupo II (Mitox.).

Cuadro 7. Valores Hematológicos de Referencia.

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura Química de la Casiopeína[®] III-Ea.

Figura 2. Estructura Química de la Mitoxantrona.

Figura 3. El Cáncer en el Mundo.

Figura 4. Porcentaje de Defunciones por Tumores Malignos por Sexo según Año de Ocurrencia, 1998-2007.

Figura 5. Distribución Porcentual de las Defunciones por Tumores Malignos para cada Sexo 2006-2007.

Figura 6. Carcinoma Hepatocelular Multinodular.

Figura 7. Carcinoma Hepatocelular Bien Diferenciado.

Figura 8. Citología que se muestra positiva a la prueba de TUNEL (Apoptosis).

Figura 9. Ciclo Celular.

Figura 10. Expresión de Ciclinas en el Ciclo Celular.

Figura 11. Señalización, Expresión y Regulación de Ciclinas.

Figura 12. Inhibición del Desarrollo Tumoral Total por Grupo.

Figura 13. Promedio de la Densidad Celular por Grupo.

Figura 14. Porcentaje de Positividad para Tunel por Grupo.

Figura 15. Porcentaje de Positividad para Ki-67 por Grupo.

Figura 16. Promedio de la Densidad Celular, TUNEL y Ki 67 por Tratamiento.

Figura 17. Promedio por Grupo de Hematocrito.

Figura 18. Promedio por del Conteo de Eritrocitos por Grupo.

- Figura 19.** Promedio por Grupo de la Determinación de Hemoglobina por Grupo.
- Figura 20.** Promedio por Grupo del Conteo de Plaquetas por Grupo.
- Figura 21.** Promedio de Sólidos Totales por Grupo.
- Figura 22.** Promedio del Conteo de Leucocitos Totales por Grupo.
- Figura 23.** Promedio del Conteo de Neutrófilos por Grupo.
- Figura 24.** Promedio del Conteo de Linfocitos por Grupo.
- Figura 25.** Promedio del Conteo de Monocitos por Grupo.
- Figura 26.** Promedio del Conteo de Eosinófilos por Grupo.
- Figura 27.** Papanicolau de Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con agua inyectable con Agua inyectable 40X.
- Figura 28.** Papanicolau de Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con Mitoxantrona 40X.
- Figura 29.** Papanicolau de Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con Casiopeína[®] III-Ea 0.2 mg/kg 40X.
- Figura 30.** Papanicolau de Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con Casiopeína[®] III-Ea 0.4 mg/kg 40X. A.
- Figura 31.** Papanicolau de Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con Casiopeína[®] III-Ea 0.4 mg/kg 40X. B.
- Figura 32.** Papanicolau de Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con Casiopeína[®] III-Ea 0.8 mg/kg 40X. A.
- Figura 33.** Papanicolau de Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con Casiopeína[®] III-Ea 0.4 mg/kg 40X. B.
- Figura 34.** Células de Hepatocarcinoma AS-30D Procesadas con la Prueba de TUNEL. Tratamiento con Agua inyectable.
- Figura 35.** Células de Hepatocarcinoma AS-30D Procesadas con la Prueba de TUNEL. Tratamiento con Mitoxantrona.
- Figura 36.** Células de Hepatocarcinoma AS-30D Procesadas con la Prueba de TUNEL. Tratamiento con Casiopeína[®] III-Ea 0.2 mg/kg.
- Figura 37.** Células de Hepatocarcinoma AS-30D Procesadas con la Prueba de TUNEL. Tratamiento con Casiopeína[®] III-Ea 0.4 mg/kg.
- Figura 38.** Células de Hepatocarcinoma AS-30D Procesadas con la Prueba de TUNEL. Tratamiento con Casiopeína[®] III-Ea 0.8 mg/kg.

Figura 39. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Inmunohistoquímica. Antígeno Ki-67.
Tratamiento con Agua Iny.ectable.

Figura 40. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Inmunohistoquímica. Antígeno Ki-67.

Figura 41. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Inmunohistoquímica. Antígeno Ki-67.

Figura 42. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Inmunohistoquímica. Antígeno Ki-67.

Figura 43. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Inmunohistoquímica. Antígeno Ki-67.
Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.8 mg/kg.

I. Introducción

Antecedentes.

A. Tratamiento del Cáncer

El cáncer puede tratarse con cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal o con terapia biológica. El médico puede usar un método o una combinación de estos, dependiendo de varios factores como: tipo y ubicación del cáncer, si ha invadido tejidos aledaños o distantes, la edad y salud general del paciente, entre otros [1].

La quimioterapia es una de las alternativas más utilizadas en el tratamiento del cáncer. Este tipo de tratamiento consiste en el uso de fármacos de tipo orgánico e inorgánico para destruir células cancerosas en todo el cuerpo. Las células sanas también pueden ser dañadas, especialmente las que se dividen rápidamente. La quimioterapia puede ser administrada por diferentes medios, los más frecuentes son la vía oral y la intravenosa, pero también es posible administrar los fármacos de manera intramuscular o a través de catéteres [1].

Dependiendo del medicamento elegido, la quimioterapia afecta a las células malignas en una de tres formas:

- 1) Dañando el ADN de las células cancerosas de tal modo que éstas ya no puedan reproducirse. Esto sucede por la alteración de la estructura del ADN en el núcleo de la célula, evitando así la replicación [2].
- 2) Durante la fase S del ciclo celular, inhibiendo la síntesis de cordones de ADN nuevo de tal manera que no sea posible replicación celular alguna. Esto ocurre cuando los fármacos bloquean la formación de los nucleótidos necesarios para la creación de ADN nuevo [2].
- 3) Deteniendo el proceso mitótico de tal modo que la célula cancerosa no pueda dividirse en dos células [2].

Los medicamentos se ubican en una categoría específica según el mecanismo de acción que utilizan. Las categorías son:

1. Agentes alquilantes: Son fármacos que funcionan atacando directamente el ADN de una célula. Estos medicamentos pueden operar en cualquier momento del ciclo celular [3-5].
2. Antimetabolitos: Son estructuralmente similares a importantes químicos en el cuerpo. Esta similitud les permite competir con los metabolitos normales por enzimas vitales, bloqueando reacciones que son esenciales para la función y la vida [3-5].
3. Antibióticos Antitumorales: Antibióticos efectivos contra el cáncer, son un heterogéneo grupo de compuestos procedentes de diversos organismos bacteriales y fungales. En general interfieren con la síntesis de ADN, al unirse con el ADN para evitar la síntesis de ARN [3-5].
4. Productos Derivados de Plantas: Son compuestos que son capaces de prevenir e inhibir el crecimiento del cáncer y la metástasis, inhibiendo la división celular por diversos mecanismos de acción [3-5].
5. Hormonas y Fármacos que afectan la acción o secreción de hormonas: El crecimiento de diversos tipos de tumores pueden ser modificados por el tratamiento con hormonas esteroides y sus antagonistas [3-5].
6. Antineoplásicos Misceláneos: Como por ejemplo enzimas (asparaginasa) que degradan sustratos esenciales el metabolismo de la célula cancerosa [3-5].

Un grupo de investigadores mexicanos encabezados por la Doctora Lena Ruiz Azuara ha desarrollado y diseñado un grupo nuevo de agentes quimioterapéuticos patentados nacional e internacionalmente y registrados con el nombre de Casiopeínas[®] [6-10], buscando disminuir la toxicidad de la quimioterapia sobre las células sanas del paciente; éste grupo de nuevos agentes quimioterapéuticos ha mostrado tener actividad, citostática y antineoplásica; lo que ha motivado a continuar su estudio con el objetivo de emplearlas en la clínica.

A1. Casiopeína[®] III-Ea

El tema central de este estudio será la Casiopeína[®] III-Ea [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)(H₂O)]NO₃ que ha mostrado tener una buena actividad antineoplásica *in vitro* en *in vivo* [10, 11] y ha sido señalada como una de las más prometedoras en los estudios QSAR de Correlación Estructura-Actividad cuantitativa [12].

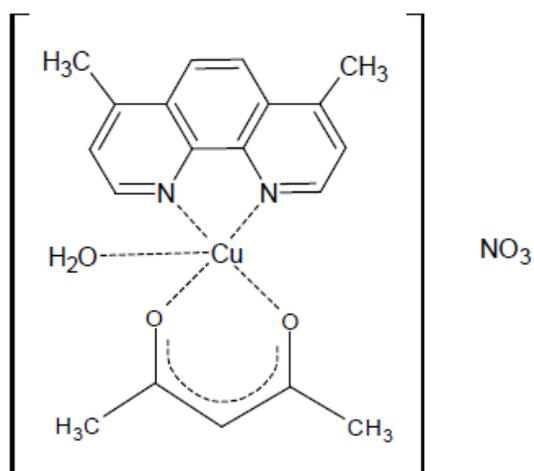


Figura 1. Estructura de la Casiopeína® III-Ea.

Las Casiopeínas®, han demostrado actividad antiproliferativa *in vivo* e *in vitro*, por diferentes mecanismos: Fragmentación del ADN, generación de especies reactivas del oxígeno, daño oxidativo citosólico y alteración a las mitocondrias inhibiendo la fosforilación oxidativa [12-21].

A2. Mitoxantrona

Es un miembro de la familia de las antraquinonas que esta estructuralmente relacionada con la doxorubicina y la daunubicina, carece de la fracción aminoazúcar de la doxorubicina, pero conserva un anillo policíclico aromático en su estructura [23-26].

Mecanismo de Acción: La Mitoxantrona no produce radicales libres, es un agente reactivo de ADN que se intercala dentro del ADN a través de los puentes de hidrógeno, causando puentes cruzados y ruptura de la cadena de ADN. La mitoxantrona además interfiere con el ARN y es un potente inhibidor de la topoisomerasa II, una enzima responsable del desenroscamiento y reparación del daño del ADN. Esto tiene un efecto citocida en cultivo de células humanas proliferativas y no proliferativas [23-26].

Indicaciones: Está indicado en esquemas de tratamiento de estados avanzados de cáncer de mama, en leucemias agudas mieloblásticas, linfoma no-Hodgkin y en carcinoma hepatocelular con frecuencia en asociación con otros quimioterápicos [27, 28].

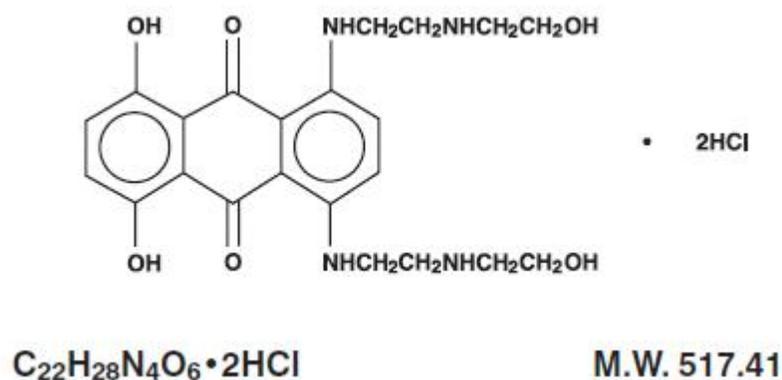


Figura 2 Estructura de la Mitoxantrona [25]

B. El cáncer en seres humanos en el mundo

Hoy en día todos somos susceptibles al desarrollo del cáncer; nadie está exento de sufrir esta enfermedad. El cáncer puede ser padecido, en sus diferentes variantes, por mujeres y hombres de cualquier edad, raza, situación económica o condición física. A pesar de que el cáncer es una enfermedad muy antigua, nunca había llegado a generar tanta morbilidad y mortalidad como las que existen actualmente [29].

Aún con el notable progreso en el conocimiento de las bases biológicas y bioquímicas del cáncer, así como de su diagnóstico y tratamiento, éste sigue siendo un problema de salud pública mundial no sólo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta mortalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo (individuales y ambientales) con los que se asocia [29].

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados después de las enfermedades cardiovasculares. En el año 2008, se tenía estimado que existen 25 millones de personas con cáncer. Cada año más de 12.4 millones de nuevos casos de cáncer son diagnosticados y más de 7.5 millones de personas mueren al año a causa de él. Se ha proyectado que para el año 2030 el número de casos nuevos aumentará a 26 millones por año y más de 17 millones morirán. Esta tendencia empieza a observarse también en el mundo menos desarrollado, particularmente en los países de medianos ingresos de Sudamérica y Asia. Más de la mitad de los casos de cáncer ya se generan en los países en desarrollo [30].

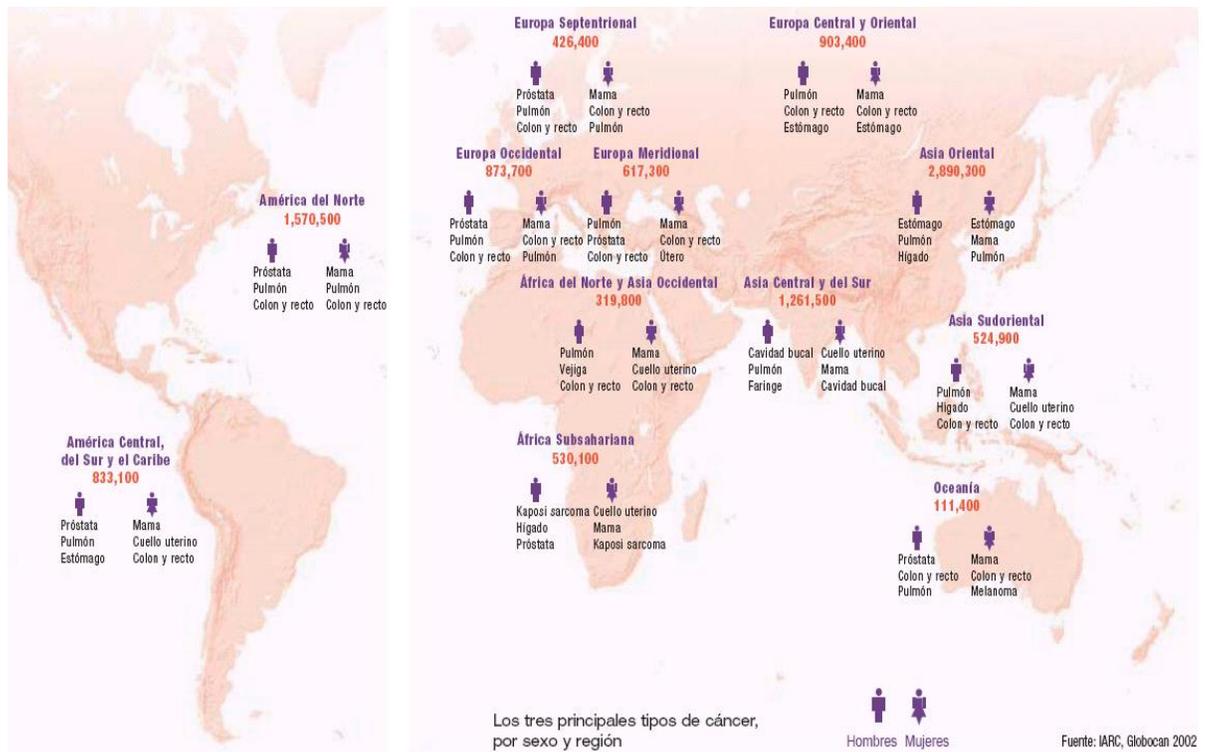


Figura 3 Cáncer en el Mundo [31]

C. El cáncer en seres humanos en México

C1. Morbilidad

La morbilidad en hospitales por tumores o neoplasias malignas se refieren a los egresos hospitalarios suscitados por cáncer, es decir, el número de casos que fueron atendidos en instituciones de salud durante un periodo de tiempo determinado. En 2006, 81 704 mujeres y 63 440 hombres tuvieron egreso hospitalario por tumores malignos. Entre las mujeres, de cada 100 egresos 20 fueron por cáncer de mama, 13 por el de cuello del útero y 12 por leucemias, mientras que en los hombres, 19 de cada 100 egresos se debieron a leucemias, cerca de 8 a cáncer de próstata y 6 al de tráquea, bronquios y pulmón [32].

Cuadro 1 Estadísticas en Humanos [32]

Distribución porcentual de egresos hospitalarios por tipo de tumor maligno para cada sexo, 2006

Tipo de tumor maligno	Hombres	Mujeres
Total	100.0	100.0
Del estómago	4.0	2.7
Del colon	3.7	2.8
Del rectosigmoides, recto y ano	2.4	1.6
Tráquea, bronquios y pulmón	6.0	2.6
Mama	0.4	19.8
Cuello del útero	0.0	13.1
Leucemias	18.8	11.9
Labio, cavidad bucal y faringe	2.3	1.2
Esófago	1.5	0.4
Hígado	2.4	1.9
Páncreas	1.9	1.5
Melanoma y otros tumores de la piel	0.8	0.8
Cuerpo del útero	0.0	2.8
Ovario	0.0	7.3
Próstata	7.8	0.0
Vejiga	2.9	0.9
Otros	45.1	28.7

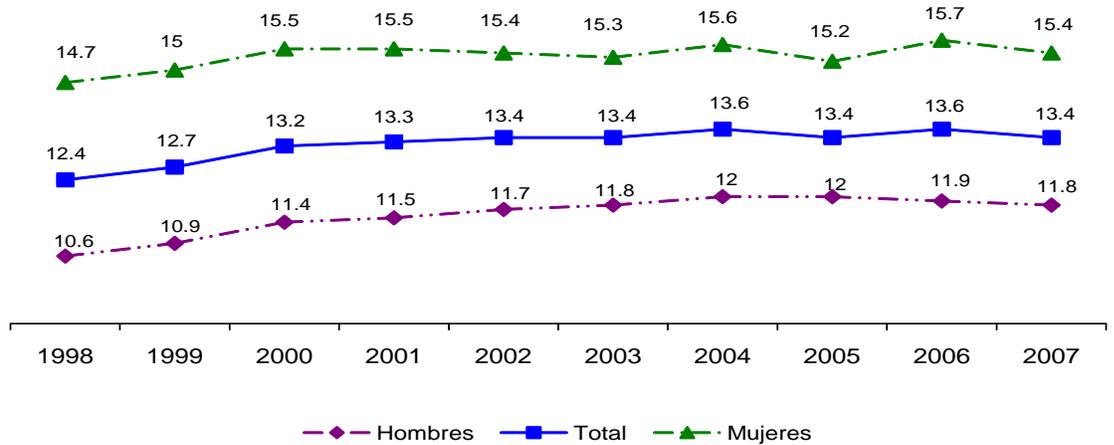
Fuente: SSA, DGIS. Egresos Hospitalarios, 2006. Base de datos. Procesó INEGI.

C2. Defunciones

En México, durante 2007 se registraron 514 420 defunciones, 55.4% fueron hombres y 44.6% mujeres; de las cuales, los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de muerte del país con 68 815 casos (13.4%), por debajo de los decesos por las enfermedades del sistema circulatorio y las enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas [33].

De 1998 a 2007 se observa que las defunciones por tumores malignos tienden a incrementarse, siendo las mujeres las que presentan los porcentajes más altos en el periodo [33].

Porcentaje de defunciones por tumores malignos por sexo según año de ocurrencia, 1998-2007



Nota: El porcentaje está en relación con el total de defunciones registradas en cada año, en general y por sexo.
 Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, 1998-2007. Bases de datos.

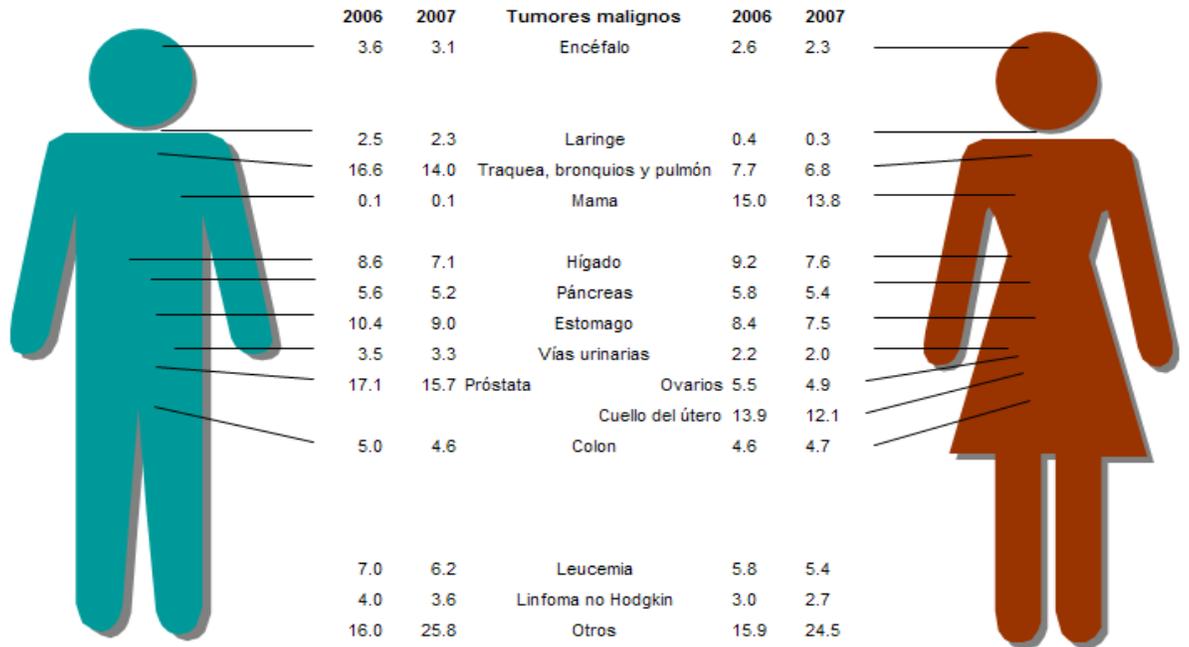
Figura 4 Estadísticas en Humanos [33]

En el ámbito nacional, para 2007 el cáncer representó la tercera causa de muerte entre las mujeres con 35 303 defunciones (15.4%), mientras en los hombres fue la cuarta causa con 33 509 muertes, lo que representa 11.8% del total de defunciones entre los varones [33].

Algunos tipos de cáncer se localizan de forma diferenciada en mujeres y hombres, ya sea por factores biológicos o de riesgo, lo que influye en su prevalencia. En las mujeres los tres principales tipos de cáncer que causaron fallecimientos durante 2007 fueron: el de mama (13.8%), cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%); es importante señalar que si bien disminuyó el porcentaje de muertes por estos tipos de cáncer en comparación con 2006, se continúan manteniendo en los primeros lugares [33].

En los hombres, el cáncer de próstata (15.7%), de tráquea, bronquios y pulmón (14%) y de estómago (9%) fueron las principales causas de muerte por neoplasias malignas durante 2007; al igual que en las mujeres, estas causas son similares a las de 2006, aunque el porcentaje de muertes que se les atribuyen ha disminuido [33].

Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada sexo 2006-2007



Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales. Defunciones 2006 y 2007. Base de datos.

Figura 5 Distribución Porcentual de las Defunciones por Tumores Malignos para cada Sexo 2006-2007 [34]

D. Carcinoma Hepatocelular

El Carcinoma Hepatocelular es responsable de la mayoría de los cánceres del hígado. Este tipo de cáncer es más frecuente en los hombres que en las mujeres y generalmente se observa en personas entre los 50 y los 60 años de edad [35].

Esta enfermedad es más común en partes de África y Asia que en Norteamérica, Sudamérica y Europa [35].

En la mayoría de los casos, la causa del cáncer hepático generalmente es la cicatrización del hígado (cirrosis). La cirrosis puede ser causada por: consumo excesivo de alcohol, ciertas enfermedades autoinmunitarias del hígado, enfermedades que causan inflamación prolongada del hígado, infección por el virus de la hepatitis B o C, demasiado hierro en el cuerpo (hemocromatosis), los

pacientes con hepatitis B o C están en riesgo de cáncer del hígado, incluso si no tienen cirrosis [35].

D1. Síntomas

Sensibilidad o dolor abdominal, especialmente en el cuadrante superior derecho, tendencia al sangrado o a la formación de hematomas, agrandamiento del abdomen y coloración amarillenta de la piel o los ojos (ictericia) [35].

D2. Diagnóstico

Los exámenes abarcan: Tomografía computarizada del abdomen, ecografía abdominal, biopsia del hígado, enzimas del hígado (pruebas de la función hepática), gammagrafía del hígado y alfa-fetoproteína en suero [35].

D3. Clasificación histológica

Los carcinomas hepáticos se pueden originar en las células parenquimatosas (carcinomas hepatocelulares) o en los conductos biliares intrahepáticos (colangiocarcinoma). La mayor parte de los tumores (85 - 95 %) se originan en las células parenquimatosas hepáticas y se han descrito 8 variantes histológicas: infantil, de células fusiformes, carcinosarcoma, de células claras, esclerosante, de células gigantes, fibrolamelar y mixto; la forma fibrolamelar es mas frecuente en mujeres jóvenes. Los demás tumores (5 - 15%) se suelen originar en el conducto biliar y corresponden a adenocarcinomas. Se distinguen de los carcinomas hepatocelulares en que muestran igual incidencia en ambos sexos, afectan a pacientes más viejos, muestran mucha menos asociación con la cirrosis y la alfa fetoproteína suele ser normal. El hemangioendoteloma maligno (angiosarcoma o sarcoma de células de Kupffer) es un tumor maligno hepático poco frecuente, pero tiene importancia por su asociación con Thorotrast, con el arsénico y con el cloruro de vinilo [36].

Estos tumores se diseminan por extensión directa dentro del hígado y a estructuras adyacentes, pero también pueden afectar a los linfáticos y a los vasos, produciendo metástasis en los huesos y los pulmones [36].

D4. Tratamiento

Cirugía: La resección del cáncer hepatocelular localizado varía de resección segmentaria a resección trisegmentaria (80% del hígado). El carcinoma hepático, es con frecuencia multifocal y podría involucrar sitios múltiples a través del hígado al momento de la exploración, aún cuando se encuentra una masa dominante en la evaluación preoperatoria, también deberá incluir la búsqueda de metástasis extrahepáticas, ya que esta condición también excluirá la resección hepática planificada. La resección que implica una porción mayor que una cuña no anatómica del hígado, no es bien tolerada y conlleva a una tasa alta de mortalidad en pacientes con cirrosis grave. Una cirrosis grave podría constituir una contraindicación para la resección hepática mayor, pero podría no ser contraindicada en el trasplante hepático [35].

Opciones de tratamiento bajo evaluación clínica: Quimioterapia o bioterapia: debido a la alta proporción de pacientes que sufren recaídas después de la cirugía de cáncer del hígado localizado, se han empleado enfoques adyuvantes usando quimioembolización, infusión arterial regional del hígado o terapia sistémica con fármacos quimioterapéuticos. [35].



Figura 6 Carcinoma Hepatocelular Multinodular de Perro [Cortesía de del Departamento de Patología FMVZ]

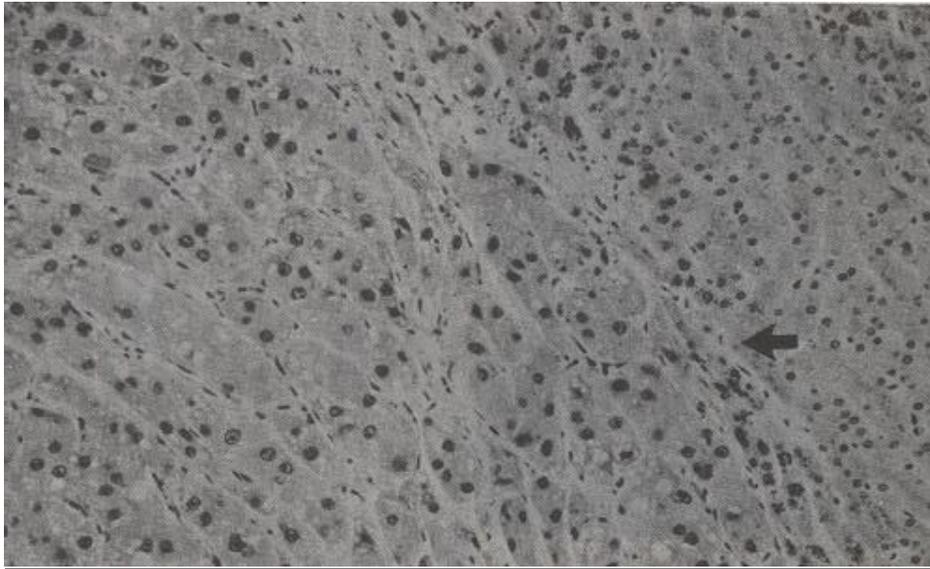


Figura 7 Carcinoma Hepatocelular Moderadamente Bien Diferenciado H.E. 40X. El borde de crecimiento de la masa está indicado por la flecha [37]

E. Modelo de Carcinoma Hepatocelular AS-30D

En 1967 fue establecida una variante de un tumor ascítico designado como AS-30D. Es un hepatocarcinoma de rata que fue inducido por la administración de 3'-Metil-4-dimetilaminoazobenzeno [38, 39]. Fue clasificado como un hepatocarcinoma. Han sido descritas características ultraestructurales e histológicas de un hepatocarcinoma con afinidad a las tinciones a base de nitrógeno. El tumor AS-30D crece primariamente en racimo o islas de células en el líquido ascítico como células aisladas, en pares o triplete siendo este último un componente menor del tumor ascítico. Las células aisladas miden 11 a 15 μm de diámetro, aunque han sido observados hasta de 23 μm de diámetro. Las células tumorales crecen formando cordones esféricos o elipsoidales. El diámetro promedio de las islas esféricas es de aproximadamente 50 μm ; los racimos elipsoidales promedian 50 μm de ancho y 50-100 μm de largo. Las características morfológicas de estas células indican que tiene un origen epitelial. Estas células tienen en general una apariencia de hepatocitos, aunque el tamaño del núcleo varía. Similar a las células hepáticas, los racimos tumorales consisten de matriz celular clara y oscura. Las células ascíticas parecen epiteliales en origen. Aunque las islas varían en forma y tamaño no representan una inespecífica agregación de células. Este sistema produce una alta densidad celular esencialmente libre de células no tumorales y tejido conectivo [40].

F. Apoptosis

Las células de un organismo pluricelular son miembros de una comunidad muy organizada. La cantidad de células que componen esta comunidad está regulada, en forma estricta no sólo por el control de la velocidad de división celular, sino también por el control de la velocidad de la muerte celular. Las células que no son necesarias se suicidan mediante la activación de un programa de muerte intracelular. En consecuencia este proceso se denomina “muerte celular programada”, aunque con mayor frecuencia se le designa con el nombre de “apoptosis” [41].

La apoptosis es esencial en muchos procesos fisiológicos incluidos maduración y acción de los mecanismos del sistema inmunológico, desarrollo embrionario de los tejidos y órganos, desarrollo del sistema nervioso, remodelación hormona dependiente de los tejidos, etc. La regulación inapropiada de la apoptosis puede jugar un papel importante en muchas condiciones patológicas como: isquemia, enfermedades del corazón, cáncer, enfermedades autoinmunes, hepatotoxicidad, enfermedades degenerativas del sistema nervioso central, entre otras. [42-50].

La célula que experimenta un proceso de apoptosis muere sin provocar daño a las células adyacentes. Una célula en vía de apoptosis se retrae y se condensa, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura nuclear se desensambla y el ADN nuclear se fragmenta. Más importante aún, el proceso de apoptosis altera la superficie celular de tal forma que inmediatamente atrae células fagocíticas, por lo general fagocitos especializados denominados macrófagos. Estas células engloban a la célula apoptótica antes de que pueda derramar su contenido. La eliminación rápida de la célula moribunda evita las secuelas deletéreas de la necrosis celular y permite que el fagocito recicle los componentes de la célula apoptótica [41].

F1. TUNEL

Por sus siglas en inglés Terminal Deoxythymidine Transferase-Mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL), es un ensayo que toma ventaja de la enzima involucrada en la fragmentación del ADN, pudiendo detectar células en proceso de apoptosis [47]. El ensayo puede detectar enzimáticamente la doble o sencilla ruptura de la cadena de ADN. La enzima Deoxythimidina Transferasa (TdT) marca la 3'OH libre de nueva generación en el final de la cadena de ADN con un dUTP nucleótido. Este nucleótido puede ser detectado por métodos directos e indirectos. Los métodos directos de

detección usan un dUTP conjugado con una molécula de fluoresceína, mientras que el método indirecto usa una digoxigenina-11-dUTP nucleótido que es después detectado con un anticuerpo antidigoxigenina conjugada con una molécula de peroxidasa o fluoresceína [51].

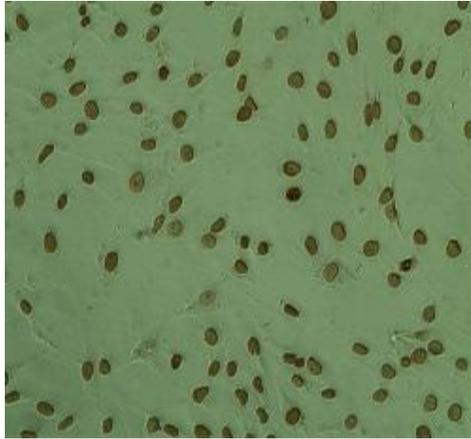
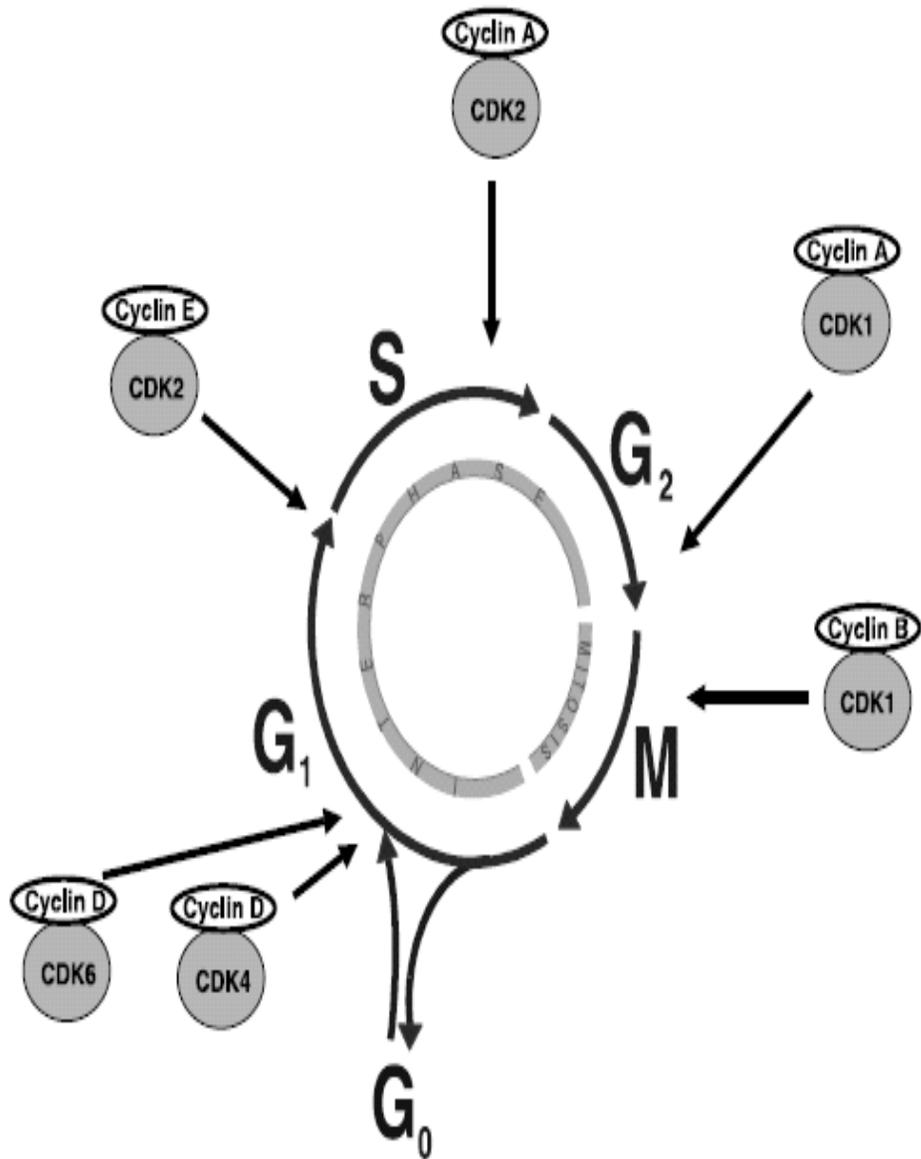


Figura 8. Citología de Glioma C6 de Rata que se muestra positiva a la prueba de TUNEL 40X (Apoptosis)

G. Ciclo Celular.

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. Las células que no están en división no se consideran que estén en el ciclo celular. Las etapas, mostradas en la figura 8, son G_1 -S- G_2 y M. El estado G_1 quiere decir "GAP 1"(Intervalo 1). El estado S representa "Síntesis". Este es el estado cuando ocurre la replicación del ADN. El estado G_2 representa "GAP 2"(Intervalo 2). El estado M representa (la fase M), y agrupa a la mitosis (reparto de material genético nuclear) y citocinesis (división del citoplasma). Las células que se encuentran en el ciclo celular se denominan "proliferantes" y las que se encuentran en fase G_0 se llaman células quiescentes [52, 53].



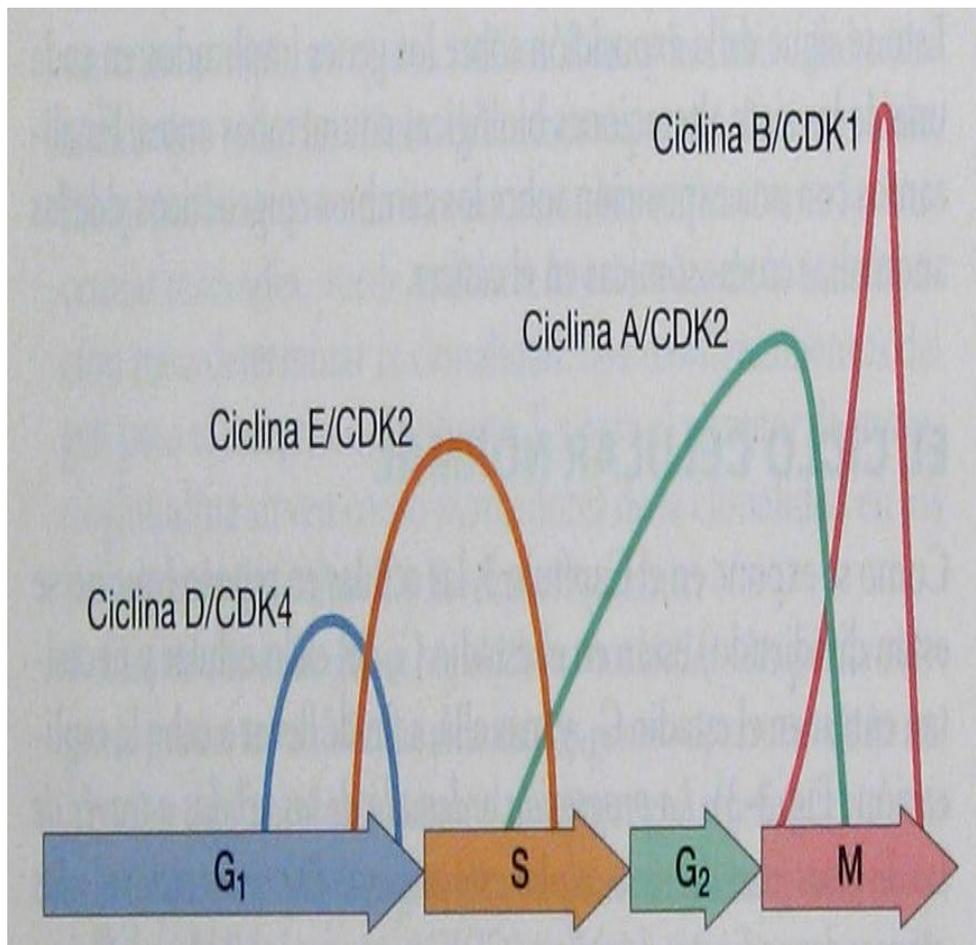
G₀ Célula fuera del ciclo celular
 G₁ Intervalo 1 del ciclo celular
 S Fase de Síntesis
 G₂ Intervalo 2 del ciclo celular

M Fase de Mitosis
 CDK 1, 2, 4 y 6 Proteínas cinasas dependientes de Cyclina

Figura 9. Ciclo Celular [53]

G1. Ciclinas

Las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina (CDK), son sintetizadas a partir de protooncogenes y trabajan en cooperación para regular el ciclo positivamente. Estas fosforilan serinas y treoninas de proteínas diana para desencadenar procesos celulares [53-55].



G₁ Intervalo 1 del ciclo celular
 S Fase de Síntesis
 G₂ Intervalo 2 del ciclo celular

M Fase de Mitosis
 CDK 1, 2, 4 y 6 Proteínas cinasas dependientes de Ciclina

Figura 10. Expresión de Ciclinas en el Ciclo Celular [54]

G2. Expresión diferencial de ciclinas en las distintas fases del ciclo

Las ciclinas son un grupo heterogéneo de proteínas con una masa de 36 a 87 kDa. Se distinguen según el momento del ciclo en el que actúan. Las ciclinas son proteínas de vida muy corta: tras disociarse de sus cinasas asociadas, se degradan con extrema rapidez [52].

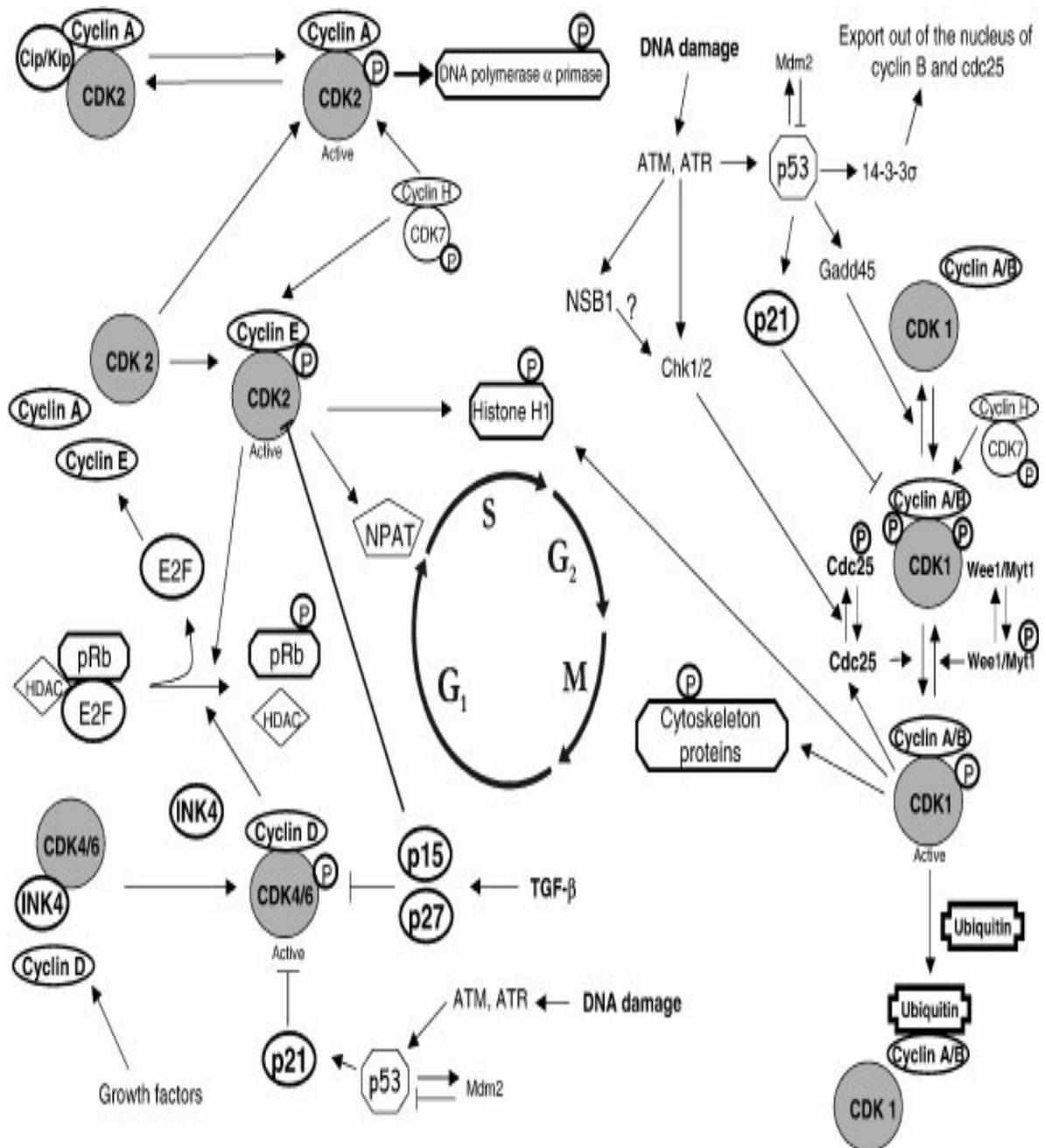
G3. Transición G₁/S

La producción de ciclina D promueve el inicio del recorrido por las fases del Ciclo Celular. Al formar un complejo con la CDK adecuada (4 ó 6) se activa la acción cinasa de esta última, cuyo sustrato principal es la proteína Rb [50, 52-55]. La proteína Rb (denominada por la contracción de la palabra retinoblastoma, lugar donde fue descubierta) juega un importante papel en el control de la proliferación celular. Se trata de una proteína supresora de tumor que en su forma hipofosforilada

bloquea a los factores de transcripción E2F1, E2F2 y E2F3a, que son esenciales para la expresión de genes que le darán continuidad al ciclo (E2Fs activantes) [53-55, 56, 57].

La fosforilación parcial de Rb por el complejo ciclina D/CDK deja en libertad a los E2Fs activantes, los cuales tienen la capacidad de reemplazar al complejo represor p107/E2F4 de sus promotores blanco en etapa G₁ temprana (figura 9). Esta acción desemboca en la activación transcripcional de la ciclina E y la fosfatasa cdc25A. Es importante aquí destacar que si la ciclina D estuviera ausente, la ciclina E tendría la capacidad suficiente para promover el inicio del Ciclo Celular ya que su producción no requiere forzosamente la intervención del complejo ciclina D/CDK y además, como marcaremos enseguida, posee otras proteínas blanco de gran importancia. La fosfatasa cdc25A remueve grupos fosfatos inhibidores de CDK2 y permite así la formación del complejo ciclina E/CDK2, que culmina la inactivación de la proteína Rb. Se ha visto también que el complejo ciclina E/CDK2 ejerce una acción cinasa sobre p107 y p130 (los otros dos miembros de la familia Rb) además de fosforilar parte de la maquinaria de replicación como la proteína cdc6 (figura 10) [53, 55, 57-59].

Los E2Fs activantes promueven también la expresión de ciclina A, ciclina B y proteínas de la maquinaria de replicación (como cdc6 y orc1) en la misma transición G₁/S. La formación del complejo ciclina A/CDK2 permite activar parte de la maquinaria para iniciar la replicación (por fosforilación de cdc6) y el bloqueo de los E2Fs activantes, de este modo se inhibe la producción de proteínas que intervienen en la progresión de la etapa S, asegurando que se sinteticen solo las necesarias (figura 12) [53-55, 56, 60].



G₁ Intervalo 1 del ciclo celular
 S Fase de Síntesis
 G₂ Intervalo 2 del ciclo celular
 M Fase de Mitosis
 CDK 1, 2, 4 y 6 Proteínas cinasas dependientes de Ciclina
 Rb Proteína supresora de tumor (retinoblastoma)
 E2F1, E2F2 y E2F3a factores de transcripción
 cdc25A fosfatasa

TGF-β Factor de Crecimiento Transformante β
 p15, p21, p27 y p53 Genes supresores tumorales
 Mdm2 Proteína reguladora del gen p53
 ATM/ATR Proteínas quinasas involucradas en la apoptosis por daño de ADN
 NPAT Proteína nuclear con acción promotora de la división celular
 HDAC Enzima Histona desacetilasa

Figura 11. Señalización, Expresión y Regulación de Ciclinas [53]

G4. Transición G₂/M

La fase G₂ del Ciclo Celular es el lapso entre el fin de la replicación (fase S) y el inicio de la fase M (figura 8). Al igual que en G₁ la célula aumenta en tamaño y duplica sus organelos citosólicos. Por su parte la fase M o de división celular comprende la división nuclear (mitosis) y la división citoplásmica (citocinesis), siendo esta última la etapa final del Ciclo Celular [61].

El actor principal de esta transición es el complejo ciclina B/CDK1, antiguamente conocido como factor promotor de la meiosis, pero dado que también fue encontrado en los procesos de mitosis de las células animales, hoy es más correctamente llamado factor promotor de la fase M o MPF por sus siglas en inglés (M-promoting factor). El MPF es activado por la cinasa Polo y translocado al núcleo en prometafase coincidiendo con la desintegración de la membrana nuclear, por lo cual se ha sugerido que uno de sus trabajos es fosforilar a las proteínas de la lamina nuclear, un paso fundamental para que el núcleo se disocie en vesículas y deje libres a los cromosomas que también son formados por intervención del MPF, pues observaciones *in vitro* revelan por parte de este una acción cinasa sobre la histona H1. No obstante, reportes recientes indican que pueden existir otros mecanismos de condensación mediados por las proteínas survivina y la cinasa Aurora B, importantes también para la segregación cromosómica [56, 62].

Ciclina A, que puede formar un complejo con CDK1, también fosforila a proteínas de la membrana nuclear además de estabilizar a ciclina B (figura 10) [54, 60].

La citocinesis para la separación de las células hijas ocurre sólo después de que finalizo la mitosis, pues ambos procesos están vinculados espacial y molecularmente de una manera altamente precisa y no menos compleja. Un punto de control entre ambos procesos esta a nivel de la ciclina B. Se ha observado que la introducción de la ciclina B que no puede ser degradada por carecer de la secuencia de reconocimiento por el complejo APC, arresta a las células en anafase y no se procede a la citocinesis. Así, el final de la citocinesis (la formación de dos células hijas) marca el final de un Ciclo Celular [63-65].

G5. Regulación y Desregulación del Ciclo Celular

Los tumores malignos son extremadamente diversos y heterogéneos, sin embargo, la gran mayoría de ellos comparte una pequeña cantidad de procesos críticos necesarios para el proceso carcinogénico. La desregulación de la proliferación celular y supresión de la apoptosis proveen del sustento para la progresión neoplásica. El punto principal es identificar como las células tumorales difieren de las normales y como esto puede ser explicado terapéuticamente [66].

La maquinaria básica del ciclo celular está constituida por proteínas capaces de fosforilar otras proteínas (proteínas quinasas o, abreviadamente, quinasas) mediante la transferencia de grupos fosfato a aminoácidos específicos. Durante las distintas fases se forman y destruyen diferentes complejos activos de ciclinas y CDKs cuya actividad es fosforilar determinadas proteínas que dirigen el avance del ciclo celular. El ciclo presenta diversos mecanismos de control que permiten el adecuado término de la división celular. La principal restricción de la fase G_1 es el punto R. El evento fundamental que regula el punto R es el nivel de fosforilación de la proteína codificada por el gen supresor de tumores *Rb* (retinoblastoma) [54, 66, 67].

El segundo punto de restricción es el de regulación G_2 -M, en este intervienen complejos formados por los dos tipos de ciclinas B (B1 y B2) y la quinasa Cdc2, estas moléculas controlan el estado del ADN celular que ha sido previamente duplicado en la fase S y son necesarias para finalizar la mitosis [54, 66, 67].

Existe un tercer punto de control durante la transición de metafase a anafase en la mitosis denominado punto M, que asegura que no haya errores en la formación del huso acromático o en el alineamiento de los cromosomas en la placa ecuatorial y se produzca un reparto igualitario de cromosomas entre las dos células hijas [54, 66, 67].

Aún cuando las interacciones intercelulares y con la matriz extracelular son importantes en el control de la proliferación celular, mayoritariamente ésta es regulada por agentes químicos, generalmente proteínas, presentes en el suero, que son activas a concentraciones muy reducidas y que reciben el nombre genérico de factores de crecimiento. Los factores de crecimiento actúan mediante su unión reversible de alta afinidad a moléculas específicas denominadas receptores que se encuentran en la membrana celular [54, 66, 67].

La función de los receptores de los factores de crecimiento es la de sensibilizar a las células de la llegada de éstos y, por tanto, de enviar una señal al interior celular, conocidos genéricamente como de transmisión o transducción que finalmente debe alcanzar el núcleo, donde se encuentra la maquinaria responsable del control del ciclo celular y el propio ADN que debe replicarse [54, 66, 67].

Cada una de las vías que comanda la respuesta proliferativa normal celular está alterada en la mayoría de los tipos de cáncer. Las alteraciones genéticas que la afectan se pueden agrupar básicamente en dos:

a) Mutaciones que permiten saltarse los estímulos mitogénicos externos o internos necesarios para el inicio de la división celular.

- Mutaciones que inactiven factores que limitan la proliferación celular.
- Mutaciones que activen mitogénos como *ras*.
- Mutaciones que afecten alguno de las señales intermedias de moléculas de transducción que llevan información mitogénica.

b) Mutaciones que actúan sobre la etapa tardía de la etapa G₁ del ciclo celular, relacionado con el punto regulador del gen *Rb*.

- Deleciones de gen *Rb*.
- Mutaciones que producen la desregulación de ciclinas dependientes de kinasas encargadas de la fosforilación de pRb.
- Expresión descontrolada de gen *c-myc* [53, 54, 66, 68].

H. Proliferación Celular

La tasa de proliferación celular de un tumor se determina por la diferencia entre la tasa de división celular y la tasa de pérdida celular. Es así como tumores que presentan tasas de proliferación celular inferiores a las células normales pueden crecer y progresar debido a una vida media prolongada de las células tumorales [66].

H1. Antígeno Ki-67

En la actualidad, la medición de la tasa de expresión del antígeno Ki-67, es uno de los métodos más usados para determinar el índice de proliferación, lo que permite correlacionar la tasa proliferativa tumoral con variables clínico-patológicas. El anticuerpo monoclonal anti-Ki-67 detecta un antígeno nuclear que se expresa en células que se encuentran en las fases “activas” del ciclo celular, es decir, en las fases G₂, S, M y en la parte ulterior al umbral mitogénico, no siendo detectable en la fase preumbral (fase G_{1c}) o para algunos fase G₀ o de reposo del ciclo. La naturaleza exacta de este antígeno nuclear se desconoce aunque se ha establecido similitud con ADN polimerasa-alfa. Este antígeno es codificado por un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25). La expresión de Ki-67 se correlaciona con otros índices de proliferación celular, tales como la medición de la fracción S + G₂M mediante citometría de flujo, e incorporación de timidina tritiada y bromodeoxiuridina. Este parece ser uno de los pocos marcadores de proliferación celular que se correlaciona con pronóstico y estadio del tumor. De este modo tenemos que altos índices de marcación con Ki-67 se correlacionan con mayor posibilidad de metástasis en tumores incipientes además de peor pronóstico en pacientes con tumores avanzados [66, 69-71].

II. Justificación

El cáncer en seres humanos se ha convertido en una de las primeras causas de muerte a nivel mundial y por esta razón, los sistemas de salud alrededor del mundo han concentrado sus esfuerzos en la investigación de este padecimiento, resultando en grandes avances en el desarrollo de fármacos con actividad antineoplásica. Sin embargo, a pesar de estos progresos, las alternativas quimioterapéuticas con las que se cuenta hoy en día ven su eficacia mermada en parte por las diversas desventajas que se les han demostrado, tales como: los altos costos, la baja selectividad, la severa toxicidad aguda y crónica, además de los intensos efectos colaterales que se han comprobado ya en el uso clínico la mayoría de ellos. Adicionalmente se debe de considerar el desarrollo de resistencia y la reaparición del cáncer después de haber seguido una terapia aparentemente exitosa debido a que no se eliminaron todas las células tumorales. Así pues, resulta importante e imperiosa la investigación y el desarrollo de nuevos antineoplásicos que ofrezcan una alternativa más eficaz y que al mismo tiempo minimicen los efectos colaterales y la toxicidad de los que ya se encuentran en uso actualmente.

III. Objetivos Generales

Evaluar la actividad de la Casiopeína[®] III-Ea, en el modelo *in vivo* de Hepatocarcinoma AS-30D en ratas.

Determinar si la Casiopeína[®] III-Ea a dosis terapéuticas induce alteraciones hematológicas en los animales experimentales.

Objetivos Particulares

Determinar los efectos citotóxicos o citostáticos atribuibles a los tratamientos experimentales con Casiopeína[®] III-Ea sobre las células del Hepatocarcinoma AS-30D.

Determinar si existen alteraciones en los valores del hemograma de los sujetos experimentales, adjudicables a los tratamientos con Casiopeína[®] III-Ea.

IV. Hipótesis

La estimación de la actividad biológica en estudios QSAR, como los resultados obtenidos *in vitro* en modelos de isotransplatación en ratón han sido prometedores para la Casiopeína III-Ea, entonces mostrará actividad en el modelo *in vivo* de Hepatocarcinoma de rata AS-30D y se obtendrán datos clínicos necesarios como parte de los estudios de seguridad de un fármaco.

V. Material y Metodología

El experimento fue realizado en las instalaciones de la UNEXA de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue aprobado tanto por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química como por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Reactivos

Azul Tripano (GIBCO®), Agua Destilada (Pisa®), Anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ki-67, Clona SP6, Isotipo IgG (Bio SB®), Casiopéina® III-Ea que fue sintetizada por la Dra. María Elena Bravo Gómez, en el laboratorio 210 del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (para detalles de su síntesis consultar [6-9]), Hematoxilina (Meyer®), *In Situ* Kit de detección de muerte celular (Roche®), Kit de Inmunodetección ratón/conejo (Bio SB®: 1) Peroxido de Hidrógeno al 3%, 2) Anticuerpo Biotinado, 3) Anticuerpo con peroxidasa conjugada, 4) Cromógeno), Mitoxantrona (Mitoxgen®), Recuperador Antigénico 10X (Dakocytomation®), Resina para montaje de laminillas (Merck®), Solución Amortiguada de Fosfatos sin calcio y magnesio (ICN Biomedical INC®), Solución de lavado 20X (Spring Biociencie®).

Líneas Tumorales

Hepatocarcinoma AS-30D congelado donado por la Dra. Sara Rodríguez del Instituto Nacional de Cardiología-Ignacio Chávez, Ssa.

Equipo

Campana de flujo laminar para animales (Veco®), Campana de flujo laminar Mini-V/PCR (Telstar®) Centrifuga, Hemocitómetro, Microscopios, Agitador, Kit de Camaras Coverplate para inmunohistoquímica (Shandon®), Olla de presión, Instrumental Básico de Cirugía.

Cálculo de Tamaño de Muestra

El tamaño de muestra se calculó con base en el método publicado en Kirkwood [72] por medio del programa EpiCalc 2000 Versión 1.02 [73]. Para su cálculo se utilizaron los promedios y desviaciones estándar de la variable Densidad Celular de un experimento publicado [74] y un Experimento Piloto realizado en las instalaciones de la UNEXA. Los datos fueron: promedio y desviación estándar del grupo control de la literatura: $1.5 \times 10^{10} \pm 0.4 \times 10^{10}$ y del Experimento Piloto: $0.52 \times 10^{10} \pm 0.1 \times 10^{10}$ con las desviaciones estándar de la publicación y el experimento piloto se obtuvo la desviación estándar común de la siguiente manera:

$$S_c = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad \text{donde: } n_1 \text{ es el tamaño de muestra del grupo control de la}$$

literatura; n_2 es el tamaño de muestra del Experimento Piloto; s_1^2 y s_2^2 son las varianzas del grupo control de la literatura y del Experimento Piloto respectivamente. Se usó una potencia de 99% y una significancia de 0.01. Se obtuvo un resultado de 3 unidades para cada grupo que fue aumentado a 6 ratas. Se plantea la formación de 5 grupos por ensayo que corresponderán a: Grupo I Control, Grupo II Tratado con Mitoxantrona, y 3 esquemas de tratamiento con la Casiopeína® III Ea.

Animales

32 Ratas Hsd:Wistar macho de entre 260 a 290 g, adquiridas a Harlan Laboratories-México y certificadas como “Libres de Patógenos Específicos”. Los animales fueron alojados bajo condiciones ambientales controladas que incluyen extracción e inyección de aire con 18 recambios por hora; éste se realizó mediante filtros HEPA filtrándose partículas hasta de $5 \mu\text{m}$ en el aire de inyección. La temperatura se mantuvo a $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y la humedad relativa en 55%, los ciclos de luz-oscuridad serán de 12/12 hrs. Se les proporcionó alimento esterilizable para ratón/rata Harlan Teklad 20185 y agua *ad-libitum*, la cual se filtro mediante filtros millipore y posteriormente recibe un tratamiento de cloración a fin de desinfectar el agua, las jaulas para su alojamiento fueron de acrílico cristal transparente con las dimensiones siguientes para ratas: 32 x 47 x 20 cm. (1 caja para 5 ratas), la cama (Aspen 7083) se cambió cada tercer día, los bebederos se lavaron un día a la semana y se esterilizaron.

Determinación de las Dosis Experimentales de Casiopeína® III-Ea

Debido al prometedor desempeño de la Casiopeína® III-Ea en los estudios de correlación estructura-actividad [11], así como en los estudios en líneas tumorales *in vitro* [69, 70] e *in vivo* [11], se tenía una alta expectativa del resultado de su desempeño en este experimento. Debido a lo anterior, se partió de la DL₅₀ por vía intraperitoneal para machos Wistar, que es de 5.92 mg/kg [75], y se tomó como base para las dosis experimentales la décima parte de ésta (0.6 mg/kg redondeado). Sin embargo, ante la posibilidad de que el tratamiento fuera tan eficaz que no dejara células en cantidades suficientes como para obtener muestras para practicarles la prueba de TUNEL y del anticuerpo anti-Ki-67, se decidió probar con tres dosis: dos por debajo de la décima parte de la DL₅₀ (0.6 mg/kg), una 0.4 mg por debajo (Casio III-Ea 0.2 / 0.2 mg/kg o 0.44 micromol/kg), una de 0.2 mg/kg por debajo (Casio III-Ea 0.4 / 0.4 mg/kg o 0.88 micromol/kg), y otra de 0.2 mg por arriba (Casio III-Ea 0.8 / 0.8 mg/kg o 1.76 micromol/kg).

Cultivo Celular

Descongelamiento Celular

A) Descongelamiento de las Células: Se extrajo el tubo de Eppendorf del ultracongelador y se introdujo cuidadosamente en un baño de agua a 37°C y en el momento que se observó el descongelamiento se colocó la suspensión celular en un tubo con 10 ml de solución isotónica preparado en el interior de una campana de flujo laminar, el cual se agitó vigorosamente hasta disolver la alicuota y se centrifugó durante 2 minutos a 1500 r.p.m. Posteriormente, el sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en un mililitro de solución isotónica.

B) Cuantificación de las Células: Por separado en un tubo de Eppendorf se colocaron 20 µl de la suspensión de células y 80 µl de solución de azul tripano; se mezcla perfectamente y se transfiere cuidadosamente a las dos secciones de la cámara de Neubauer. Se colocó en el hemocitómetro en el microscopio óptico utilizando el objetivo de 10X, y se procedió a contar el número de células teñidas y no teñidas por mm² utilizando los recuadros de conteo de leucocitos, la cuenta se repite en las otras secciones y después se hacen los cálculos correspondientes a la viabilidad y al número de células por ml de suspensión.

$$C = \tilde{N} * 10^4 * FD$$

Donde: C= Células por ml, \tilde{N} = Promedio de las células contadas, 10^4 = Factor de conversión de la cámara, FD= Factor de Dilución.

C) Viabilidad: La viabilidad puede ser calculada a partir del conteo anterior utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de Viabilidad} = \frac{(\text{Tot} - \text{Teñ})}{\text{Tot}} * 100$$

Donde: Tot= Total de células contadas, Teñ= Células teñidas

Proliferación *in vivo*

Una vez descongeladas las células, en el primer pase se realizó proliferación *in vivo* con la finalidad de reavivar a las células tumorales después del congelamiento y alcanzar el número necesario de células para inocular a los 30 animales experimentales.

Primer Pase: Se tomaron un mínimo de 4.5×10^7 células previamente descongeladas y se inoculan por vía intraperitoneal en 2 ratas macho Hsd:Wistar de entre 230 a 260 g, Siete días después, se desarrolla un tumor peritoneal en forma de líquido ascítico. Los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂, y llevados a una cámara de flujo laminar en donde se les realizó una incisión en línea media y el líquido ascítico fue extraído en condiciones estériles y finalmente se contó el número de células por mililitro [74].

Segundo Pase: Del líquido ascítico obtenido se inocularon 4.5×10^7 células por vía intraperitoneal a 30 machos Hsd:Wistar de entre 230 a 260 g [74].

Trascurridos 15 minutos después de la inoculación del tumor, se administraron los respectivos tratamientos (Cuadro 2) a cada uno de los animales de los diferentes grupos.

A los 7 días de tratamiento, los animales de todos los grupos se anestesiaron y sangraron por punción intracardiaca para obtener muestras para su estudio hematológico. Los animales aún anestesiados fueron trasladados a la cámara de CO₂ para ser sacrificados de manera humanitaria.

A todos los individuos se les realizó una incisión en línea media y se extrajo el líquido ascítico. Posteriormente se realizó un lavado de la cavidad peritoneal con 10 ml una solución isotónica amortiguada y se incluyó al resto del líquido colectado. A continuación se contabilizó la densidad celular total: multiplicando, la densidad celular por ml (determinado por medio de la cámara Neubauer con el método anteriormente descrito) por el volumen total del líquido ascítico.

Diseño Experimental

El diseño fue completamente aleatorizado. El ensayo constó de 6 animales por grupo. A las ratas se les aleatorizarán cada uno de los 5 tratamientos bajo el siguiente esquema:

Cuadro 2. Esquemas de Tratamiento por Vía Intraperitoneal

Tratamiento	n	Día 0 ¹	Día 2	Día 4	Día 6
Tratamiento I	6	Agua Iny.	Agua Iny.	Agua Iny.	Agua Iny.
Tratamiento II	6	Mitox. 2.5 mg/kg	Mitox. 2.5 mg/kg	Mitox. 2.5 mg/kg	Mitox. 2.5 mg/kg [76]
Tratamiento III	6	Cas III Ea 0.2 mg/kg-	Cas III Ea 0.2 mg/kg	Cas III Ea 0.2 mg/kg	Cas III Ea 0.2 mg/kg
Tratamiento IV	6	Cas III Ea 0.4 mg/kg	Cas III Ea 0.4 mg/kg	Cas III Ea 0.4 mg/kg	Cas III Ea 0.4 mg/kg
Tratamiento V	6	Cas III Ea 0.8 mg/kg	Cas III Ea 0.8 mg/kg	Cas III Ea 0.8 mg/kg	Cas III Ea 0.8 mg/kg

Patología

Enseguida se les practicó la necropsia a cada uno de los sujetos experimentales y se tomaron muestras de pulmón, riñón, hígado y bazo.

Los líquidos ascíticos que se les observó una elevada turbidez (indicativo de alta densidad celular), las muestras se agitaron y se les realizaron extendidos directos; a los que presentaron escasa turbidez (indicativo de baja densidad celular), para concentrar la suspensión de células se les centrifugó a 1500 r.p.m., se decantó y les agregó 1 ml de solución isotónica amortiguada, las

muestras se agitaron y se les realizaron extendidos. En todos los casos se les realizaron estudios citológicos, el ensayo de TUNEL y el marcador inmunohistoquímico para el antígeno Ki-67.

Citología

Después de realizados los extendidos se fijaron en alcohol al 96 % por 30 min, se enviaron para su procesamiento Citológico en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, donde fueron teñidos con la tinción de Papanicolau. Por último, con microscopía óptica de luz se examinaron el núcleo y el citoplasma celular para evaluar los cambios citológicos con relación a la respuesta al tratamiento en cada uno de los grupos [77].

Inmunohistoquímica

Las muestras fueron procesadas para detectar el marcador inmunohistoquímico: para el antígeno Ki-67.

Procesamiento de las muestras para Ki-67: A partir del líquido ascítico se realizaron extendidos los cuales fueron fijados en alcohol al 96 %. Se rehidrataron con pases desde alcohol absoluto, alcohol al 90%, alcohol al 70%, alcohol al 50%, y finalmente agua destilada en un tren de tinción. Posteriormente se sumergieron las muestras en el recuperador antigénico 10X (Dakocytomation[®]), y a continuación se sometió a calor en olla de presión durante 20 minutos. Las laminillas se dejaron enfriar por 20 minutos, éstas se lavaron con solución amortiguada de fosfatos a un pH 7 durante 5 minutos. El bloqueo de peroxidasas endógenas se realizó con H₂O₂ al 3 % por 5 minutos. Nuevamente se lavó con solución amortiguada de fosfatos y se adicionó el anticuerpo primario (Anticuerpo anti-antígeno Ki-67 Bioselec[®]) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron las laminillas con solución amortiguada de fosfatos durante 5 minutos. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario biotinilado por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron las muestras y se agregó el complejo estreptavidina conjugada con peroxidasas por 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, se lavaron las muestras con solución amortiguada de fosfatos, se agregó el cromógeno por 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con solución amortiguada de fosfatos, se tiñeron con hematoxilina por 1 minuto y se lavaron. Las muestras se secaron al aire y se cubrieron con resina y cubreobjetos para su observación [77].

Ensayo de TUNEL

Las muestras fueron procesadas para realizar el ensayo de TUNEL.

Procesamiento de las muestras para TUNEL: A partir del líquido ascítico se realizaron extendidos los cuales fueron fijados en alcohol al 96 %. Se rehidrataron con pases desde alcohol absoluto, alcohol al 90%, alcohol al 70%, alcohol al 50%, y finalmente agua destilada en un tren de tinción. Posteriormente se sumergieron las muestras en el recuperador antigénico 10X (Dakocytomation[®]), y a continuación se sometió a calor en olla de presión durante 20 minutos. Las laminillas se dejaron enfriar por 20 minutos, éstas se lavaron con solución amortiguada de fosfatos a un pH 7 durante 5 minutos. El bloqueo de peroxidasas endógenas se realizó con H₂O₂ al 3 % por 5 minutos. Nuevamente se lavó con solución amortiguada de fosfatos. Se agregó la enzima Deoxythimidina Transferasa (TdT) y el sustrato de digoxigenina-11-dUTP nucleótido, se incubó en cámara húmeda a 37 °C, durante 30 minutos. Se realizaron 3 lavados con solución amortiguada de fosfatos. Enseguida se agregó el anticuerpo antidigoxigenina conjugada con una molécula de peroxidasa (Roche[®]) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con solución amortiguada de fosfatos y se agregó el cromógeno por 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con solución amortiguada de fosfatos y se tiñeron con hematoxilina por 1 minutos, se lavaron y se secaron al aire. Se cubrieron con resina y cubreobjetos para su observación [78].

Determinación de las proporciones de células positivas para la prueba de TUNEL y el antígeno Ki-67

De los extendidos realizados se obtuvieron de dos tipos: 1) Los que tenían alta densidad de células y 2) Los que tenían una muy baja densidad de células. Por lo que para la contabilización de las células se emplearon dos métodos: 1) Para el caso de los extendidos con alta densidad de células, se dividió la laminilla en 10 sectores y se contaron la totalidad de las células con marcaje positivo y las que no presentaron positividad de dos campos por sector. 2) Para el caso de los extendidos con baja densidad de células, se contabilizaron las células con marcaje positivo y las que no presentaron positividad hasta llegar a un total de 100 células.

De la totalidad de células contadas (positivas y negativas) por cualquiera de los dos métodos, se determinó que porcentaje representaba las células positivas.

Los resultados de las diferentes técnicas inmunohistoquímicas se correlacionaron con la densidad celular total y los hallazgos histopatológicos de cada caso.

Hematología

Las muestras de sangre obtenidas fueron inmediatamente procesadas en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Determinándose los valores de hematocrito, conteo de eritrocitos, determinación de hemoglobina, conteo de plaquetas, determinación de sólidos totales, conteo de leucocitos totales, conteo de neutrófilos, conteo de linfocitos, conteo de monocitos, conteo de eosinófilos y conteo de basófilos.

Los resultados obtenidos en la hematología, se compararán con los valores de referencia y entre grupos.

Análisis estadístico

Para determinar el riesgo de inhibir el desarrollo tumoral se realizó un análisis de regresión logística.

Las variables categóricas porcentaje de positividad a TUNEL y antígeno Ki-67, fueron analizadas por medio de Ji-cuadrada.

Las variables continuas densidad celular total, determinación de hematocrito, conteo de eritrocitos, determinación de hemoglobina, conteo de plaquetas, conteo de leucocitos totales, conteo de neutrófilos, conteo de linfocitos, conteo de monocitos y conteo de eosinófilos, se les realizaron las pruebas de normalidad y de homogeneidad de varianzas.

Las variables densidad celular total, conteo de plaquetas, conteo de monocitos y conteo de eosinófilos, cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se les realizó la prueba de análisis de varianza y en el caso de la variable densidad celular total, para comparar los controles contra los grupos tratados se les realizó la prueba de Dunett.

Las variables conteo de plaquetas y conteo de monocitos, presentaron diferencias en la prueba de análisis de varianza por lo que se les realizó una prueba de Tukey.

Las variables determinación de hematocrito, conteo de eritrocitos, determinación de hemoglobina, determinación de sólidos totales, conteo de leucocitos totales, conteo de neutrófilos y conteo de linfocitos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se les realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Las variables determinación de hemoglobina, conteo de leucocitos totales, conteo de neutrófilos y conteo de linfocitos presentaron diferencias en la prueba de Mann Whitney, por lo que se les realizó una prueba no paramétrica de comparaciones múltiples de Mann Whitney.

El análisis se realizó en el programa SPSS Versión 16[®]. Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0.05$. Para los casos en que no se encontró diferencias significativas se calculó la potencia ($1-\beta$) con el programa G*Power Versión 3.1.2[®].

VI. Resultados

Necropsias

No se encontraron evidencias de masas, inflamación o necrosis a nivel de tejido subcutáneo, musculatura abdominal u órganos de la cavidad abdominal que sugieran un error en la técnica de inoculación del tumor o la administración de los tratamientos.

Los resultados del examen histopatológico obtenidos en este trabajo, serán utilizados en estudios posteriores.

Inhibición del Crecimiento Tumoral

Se evaluó la capacidad cada unos de los tratamientos para inhibir completamente el desarrollo del tumor, obteniendo los siguientes resultados.

Cuadro 3. Inhibición del Crecimiento por Grupo

Tratamiento	Animales en que se Inhibió el Desarrollo Tumoral Completamente		Porcentaje en que se Inhibió el Desarrollo Tumoral Completamente
	Si	No	
Agua Inyectable	1	5	16.66 %
Mitoxantrona	4	2	66.66 %
Casiopeína [®] III-Ea 0.2 mg/kg	1	5	16.66 %
Casiopeína [®] III-Ea 0.4 mg/kg	1	5	16.66 %
Casiopeína [®] III-Ea 0.8 mg/kg	4	2	66.66 %

Cuadro 4. Riesgo de Inhibición del Tumor de los Fármacos vs Tratamiento con Agua Inyectable

Tratamiento	Riesgo de la inhibición del Crecimiento Tumoral en la Comparación con el Tratamiento con Agua Inyectable	Intervalo de Confianza 95 %	
Mitoxantrona	2.5	0.763	8.192
Casiopeína® III-Ea 0.2 mg/kg	1	0.603	1.659
Casiopeína® III-Ea 0.4 mg/kg	1	0.603	1.659
Casiopeína® III-Ea 0.8 mg/kg	2.5	0.763	8.192

Se determinó que en comparación con el grupo tratado con agua inyectable, los tratamientos de Casiopeína® III-Ea de 0.4 y 0.8 mg/kg, presentaron el mismo riesgo de inhibir completamente el desarrollo del Hepatocarcinoma AS-30D. En el caso de los tratamientos con Mitoxantrona y de Casiopeína® III-Ea a dosis de 0.8 mg/kg presentaron el mismo riesgo de inhibir el desarrollo tumoral y tienen 2.5 veces más riesgo de inhibir el Hepatocarcinoma AS-30D en comparación con el grupo tratado con agua inyectable.

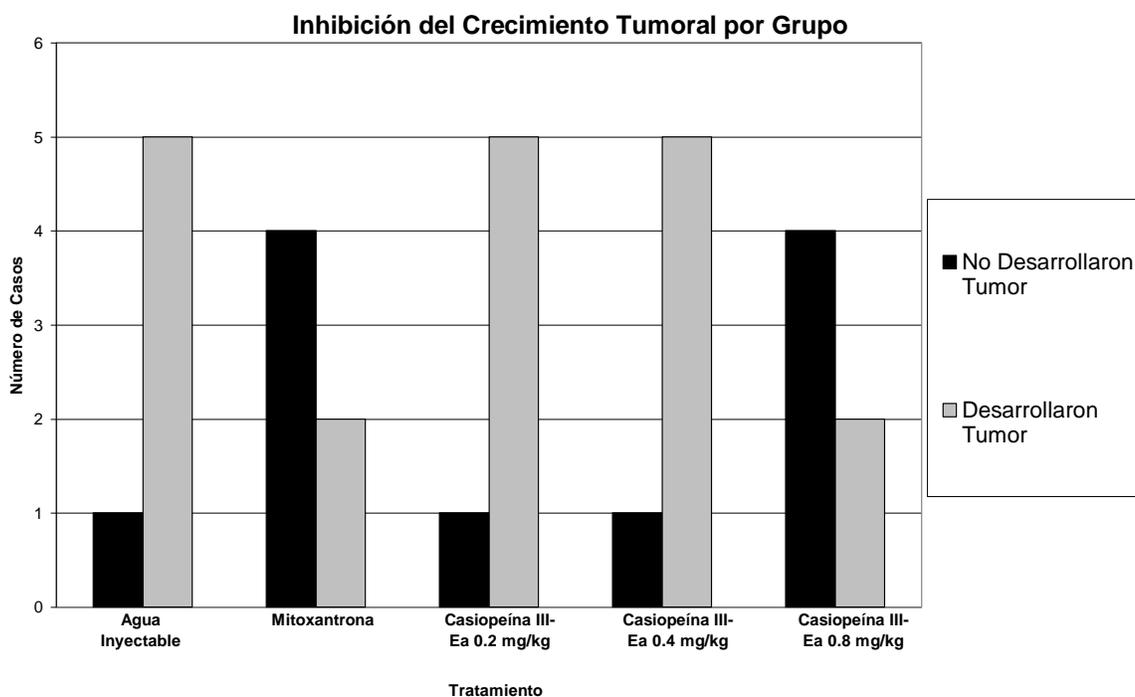


Figura 12. Inhibición del Desarrollo Tumoral Total por Grupo

Citología

Los extendidos para citología fueron teñidos con tinción de Papanicolau y se encontraron los siguientes hallazgos por grupo.

Grupo I Agua inyectable: En 5 de los 6 individuos se observa abundante material conformado por eritrocitos y células redondas, las cuales de manera predominante se encuentran de manera aislada y en menor proporción formando dobletes o tripletes. Las características celulares predominantes incluyen marcada anisocitosis, anisocariosis, escaso citoplasma, núcleo grande con cromatina granular fina, uno o dos nucléolos prominentes; se pueden observar una o dos mitosis por campo, de las cuales la mayoría son aberrantes (Figura 27). Para el caso del sexto individuo se observa un moderado infiltrado de leucocitos y ninguna evidencia de las células del Hepatocarcinoma AS-30D, por lo que se supone que el individuo rechazó las células tumorales.

Grupo II Mitoxantrona: Sólo en dos de los seis individuos de prueba se pudo detectar evidencia de material celular a las que se les observa las siguientes características: Escaso material conformado por eritrocitos, leucocitos que en su mayoría son monocitos y células redondas, las cuales de manera predominante se encuentran aisladas. Las características celulares predominantes incluyen escaso citoplasma, núcleo grande con cromatina granular fina, uno o dos nucléolos muy prominentes (Figura 28). En el caso de los cuatro individuos a los que no se les encontró evidencia de células tumorales o de infiltrado leucocitario (que sugiera rechazo de parte del individuo experimental a las células tumorales), se asume que el desarrollo del tumor fue completamente inhibido por efecto del tratamiento.

Grupo III Casiopeína[®] III-Ea 0.2 mg/kg: En 5 de los 6 individuos se observa evidencia de material celular el cual es abundante conformado por eritrocitos y células redondas, las cuales de manera predominante se encuentran de manera aislada y en menor proporción formando dobletes o tripletes. Las características celulares predominantes incluyen marcada anisocariosis, escaso citoplasma, núcleo grande con cromatina granular fina, uno o dos nucléolos prominentes; se pueden observar una o dos mitosis por campo, algunas de las cuales son aberrantes (Figura 29). En el caso del sexto individuo, al no encontrarse evidencia de células tumorales o de infiltrado leucocitario

(que sugiera rechazo de parte del individuo experimental a las células tumorales), se asume que el desarrollo del tumor fue completamente inhibido por efecto del tratamiento.

Grupo IV Cas. III-Ea 0.4 mg/kg: En 5 de los 6 individuos se observa abundante material conformado por eritrocitos y células redondas, las cuales de manera predominante se encuentran aisladas y en menor proporción formando dobletes o tripletes. Las características celulares predominantes incluyen marcada anisocariosis, escaso citoplasma, núcleo grande con cromatina granular fina, uno o dos nucléolos prominentes, además se pueden observar una o dos mitosis por campo algunas de las cuales son aberrantes (Figura 30). Así mismo, se observan indicios de algunos cuerpos apoptóticos en las células tumorales (Figura 31). En el caso del sexto individuo, al no encontrarse evidencia de células tumorales o de infiltrado leucocitario (que sugiera rechazo de parte del individuo experimental a las células tumorales), se asume que el desarrollo del tumor fue completamente inhibido por efecto del tratamiento.

Grupos V Casiopeína[®] III-Ea 0.8 mg/kg: Sólo en dos de los 6 individuos de prueba se pudo detectar evidencia de material celular, de los cuales se observan las siguientes características: abundante material conformado por eritrocitos y células redondas, las cuales se encuentran de manera aislada y en menor proporción formando dobletes o tripletes. Las características celulares predominantes incluyen marcada anisocariosis, escaso citoplasma, núcleo grande con cromatina granular fina, uno o dos nucléolos prominentes; se pueden observar una o dos mitosis por campo algunas de las cuales son aberrantes (Figura 32), Así mismo se apreciaron cuerpos apoptóticos en las células tumorales (Figura 33). En el caso de los cuatro individuos a los que no se les encontró evidencia de células tumorales o de infiltrado leucocitario (que sugiera rechazo de parte del individuo experimental a las células tumorales), se asume que el desarrollo del tumor fue completamente inhibido por efecto del tratamiento.

Evaluación de la Actividad Antitumoral

Los resultados por grupo y la contrastación de la densidad celular total entre los grupos, son presentados en la figura 13.

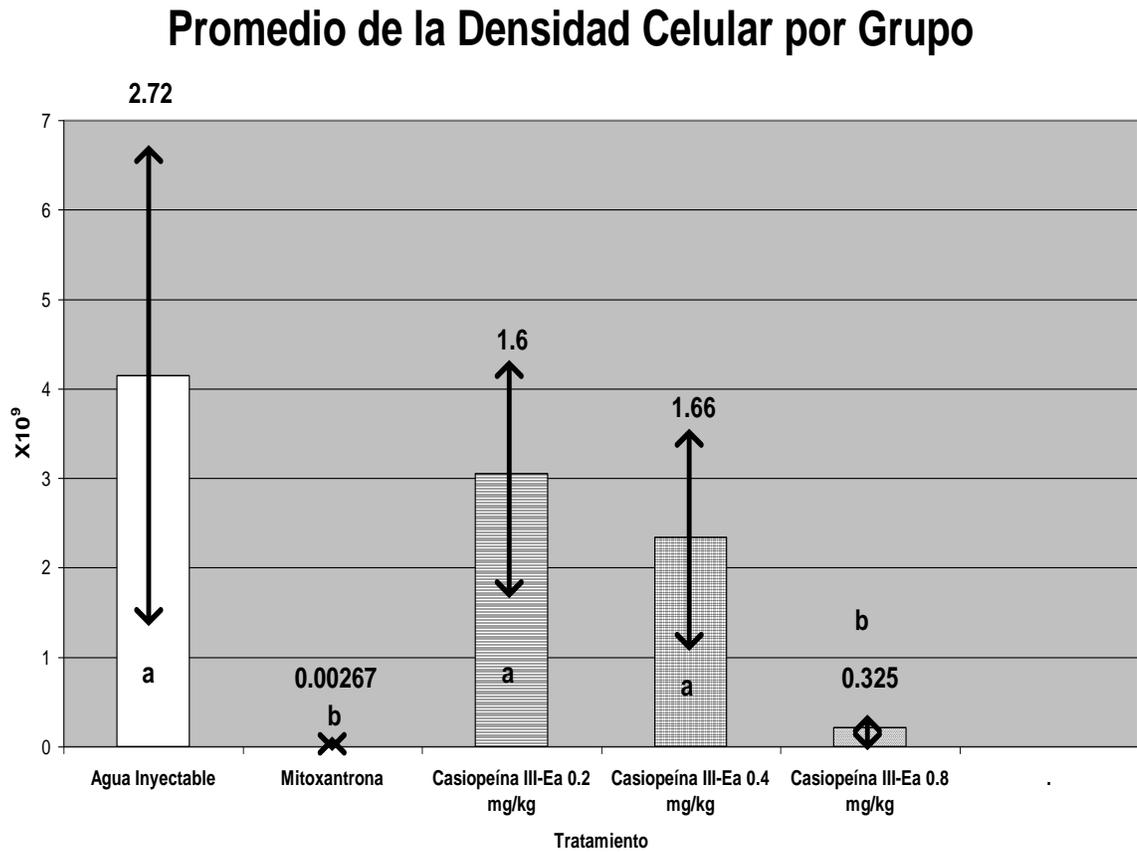


Figura 13. Promedio de la Densidad Celular por Grupo

a y b = Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba de Dunnett t_1
1- β de a = Casio 0.2 III-Ea (0.84) y Casio 0.4 III-Ea (0.75)
1- β de b = 0.85

Prueba de TUNEL

Los resultados por grupo y la contrastación de los porcentajes de positividad para la prueba de TUNEL entre los grupos, son presentados en la figura 14.

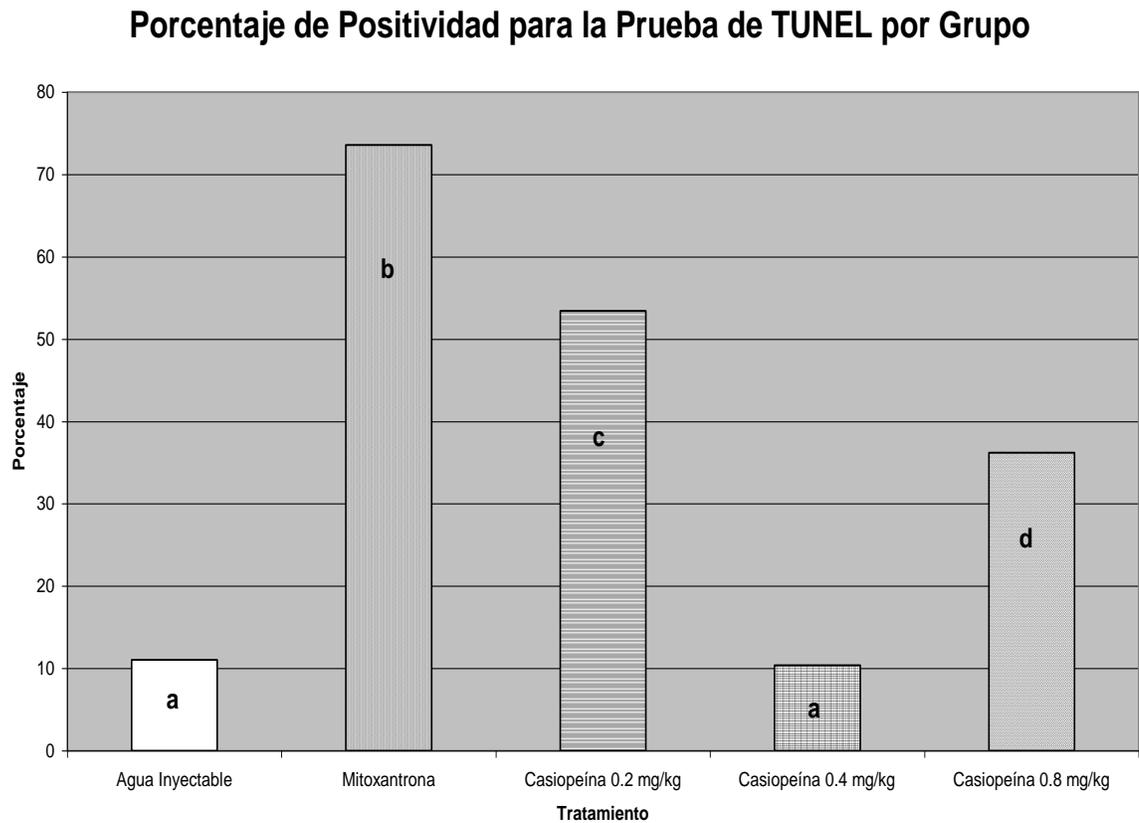


Figura 14. Porcentaje de Positividad para la Prueba de Tunel por Grupo

a, b, c y d = Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba de χ^2_1
 $1-\beta$ de a = 0.97

Inmunohistoquímica

Antígeno Ki-67

Los resultados por grupo y la contrastación de los porcentajes de positividad para Ki-67 entre los grupos, son presentados en la figura 15.

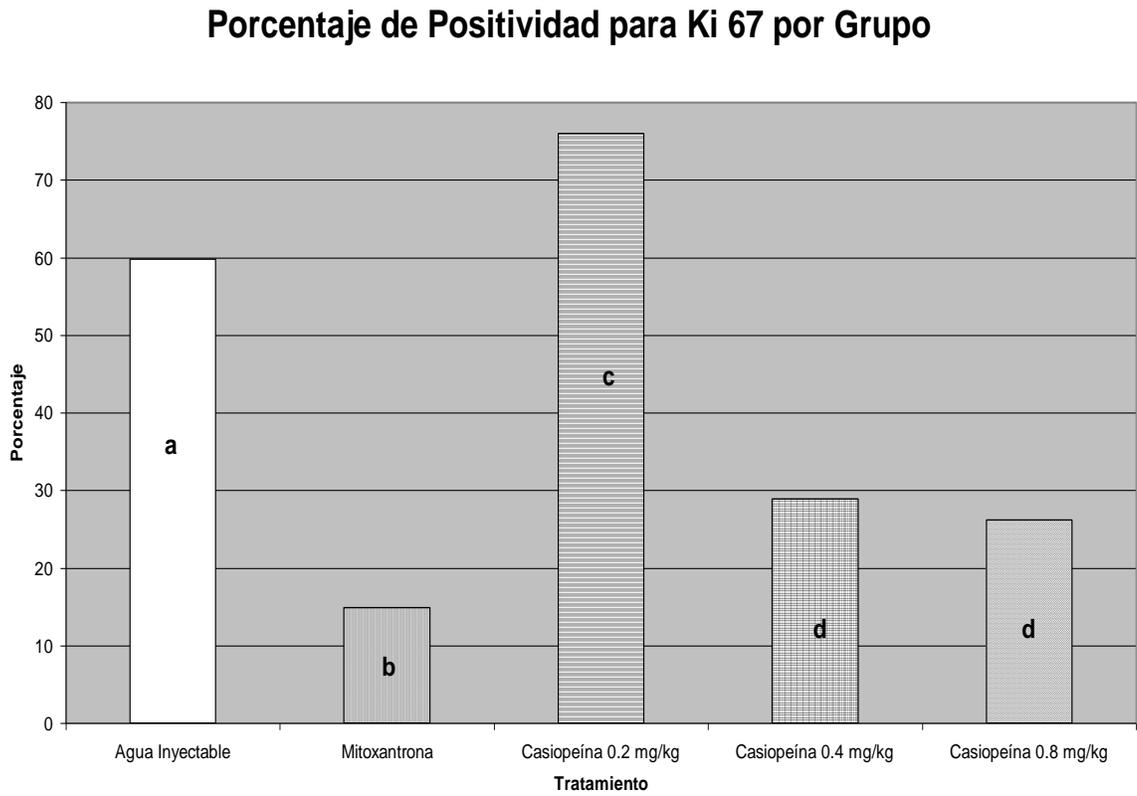


Figura 15. Porcentaje de Positividad para Ki-67

a, b,c y d = Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba de χ^2_1
 $1-\beta$ de d = 0.95

Los resultados integrados y la contrastación de la densidad celular total, porcentaje de positividad a la prueba de TUNEL y Ki-67 se presentan en la figura 16

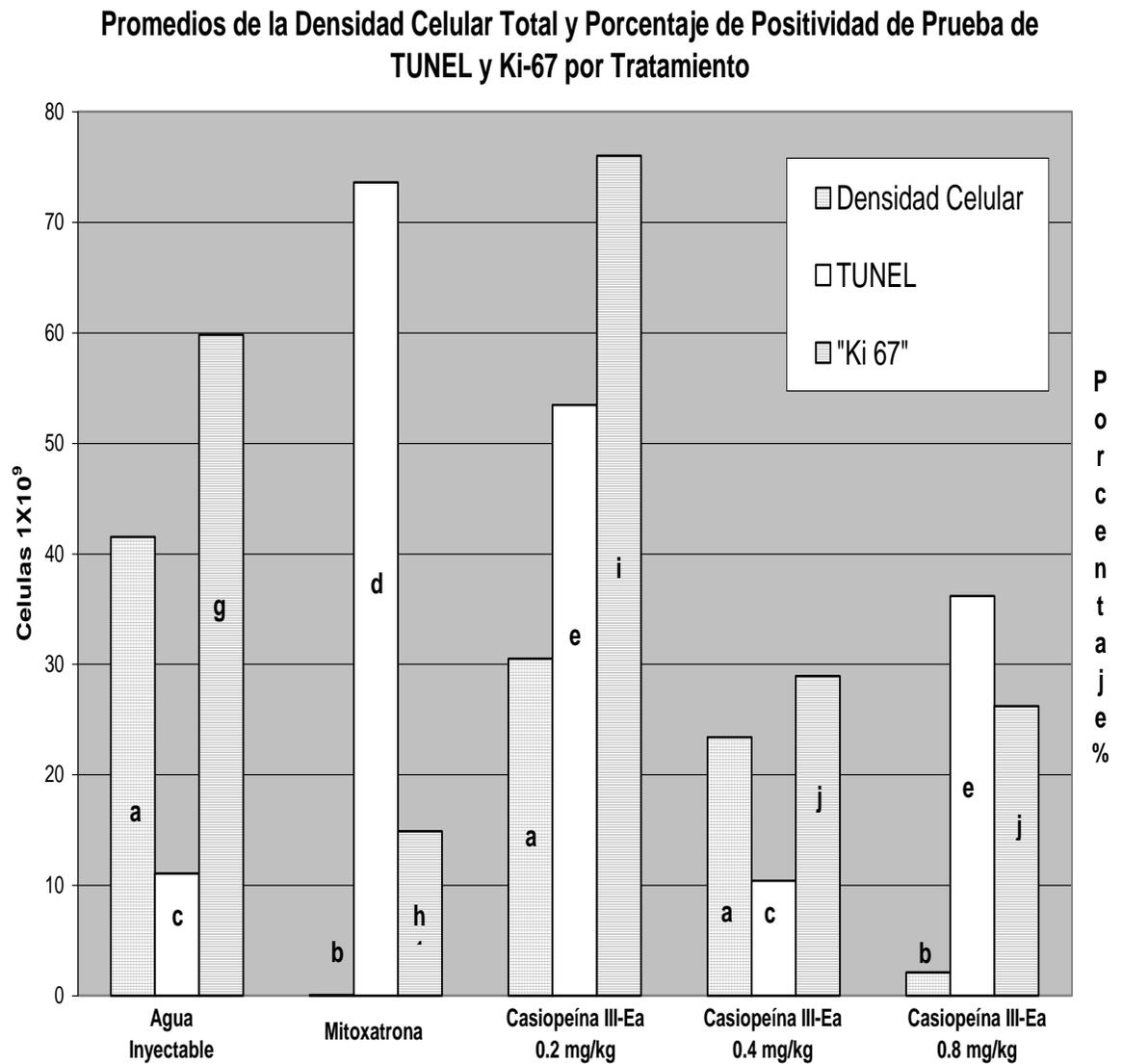


Figura 16. Promedio de la Densidad Celular, Porcentaje de Positividad a la Prueba de TUNEL y Ki 67 por Tratamiento

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j = Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) Dunett t_1 (Densidad Celular) y prueba de χ^2_1 (TUNEL y Ki-67)
 $1-\beta$ de a = Casio 0.2 III-Ea (0.84) y Casio 0.4 III-Ea (0.75)
 $1-\beta$ de b = 0.85
 $1-\beta$ de c = 0.97
 $1-\beta$ de j = 0.95

Hematología

Cuadro 7. Valores Hematológicos de Referencia en Ratas

Analito	Rangos	Unidad
Hematocrito	0.35-0.57	L/L
Eritrocitos	5-10	$\times 10^{12}/L$
Hemoglobina	110-190	g/L
Plaquetas	200-1500	$\times 10^9/L$
Sólidos Totales	72-82	g/L
Leucocitos Totales	3-17	$10^9/L$
Neutrófilos	0.5 – 4.5	$10^9/L$
Linfocitos	2 - 14	$10^9/L$
Monocitos	0.03 – 0.17	$10^9/L$
Eosinófilos	0.03 – 0.17	$10^9/L$
Basófilos	Raros	$10^9/L$

Burns KF. 1966 [79]

Hematocrito

Los resultados por grupo y la contrastación de la determinación del hematocrito entre los grupos, son presentados en la figura 17.

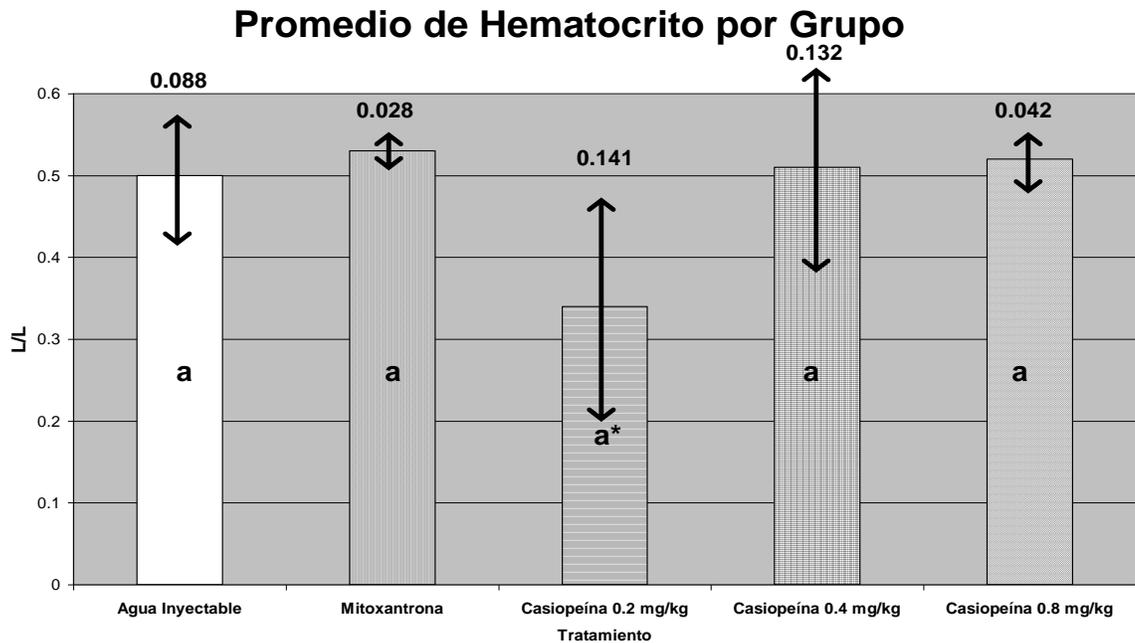


Figura 17. Promedio por Grupo de Hematocrito

Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba de Kruskal Wallis χ^2_4

* Están fuera de Rango [0.35-0.57 L/L][79]

$1-\beta$ de $a = 0.78$

Eritrocitos

Los resultados por grupo y la contrastación de los conteos de eritrocitos entre los grupos, son presentados en la figura 18.

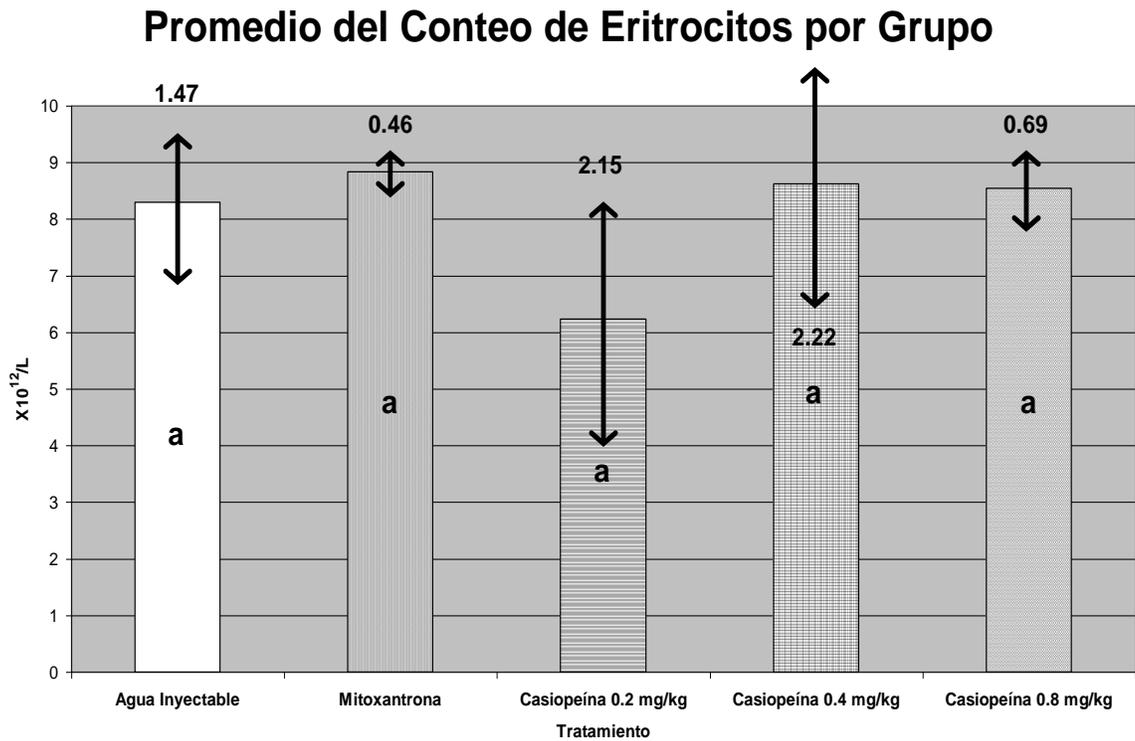


Figura 18. Promedio por Grupo del Conteo Eritrocitos

Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba de Kruskal Wallis χ^2_4
 $1-\beta$ de $a = 0.74$

Hemoglobina

Los resultados por grupo y la contrastación de la cuantificación de la hemoglobina entre los grupos, son presentados en la figura 19.

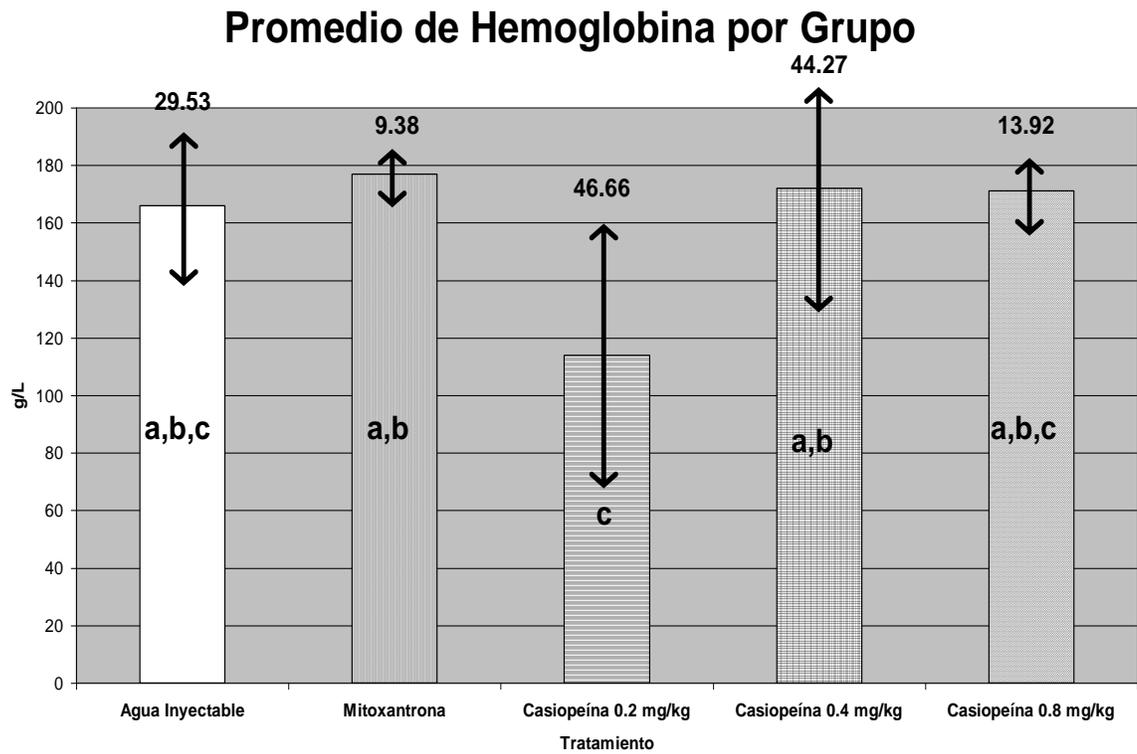


Figura 19. Promedio por Grupo de la Determinación de Hemoglobina

a, b, c = Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba de Mann Whitney χ^2_1
1- β de a = Mitox (0.99), Casio III-Ea 0.2 (0.36) Casio III-Ea 0.4 (0.91) y Casio 0.8 III-Ea (0.99)
1- β de b= Casio III-Ea 0.4 (0.84) y Casio 0.8 III-Ea (0.98)
1- β de c = 0.51

Plaquetas

Los resultados por grupo y la contrastación de los conteos de plaquetas entre los grupos, son presentados en la figura 20.

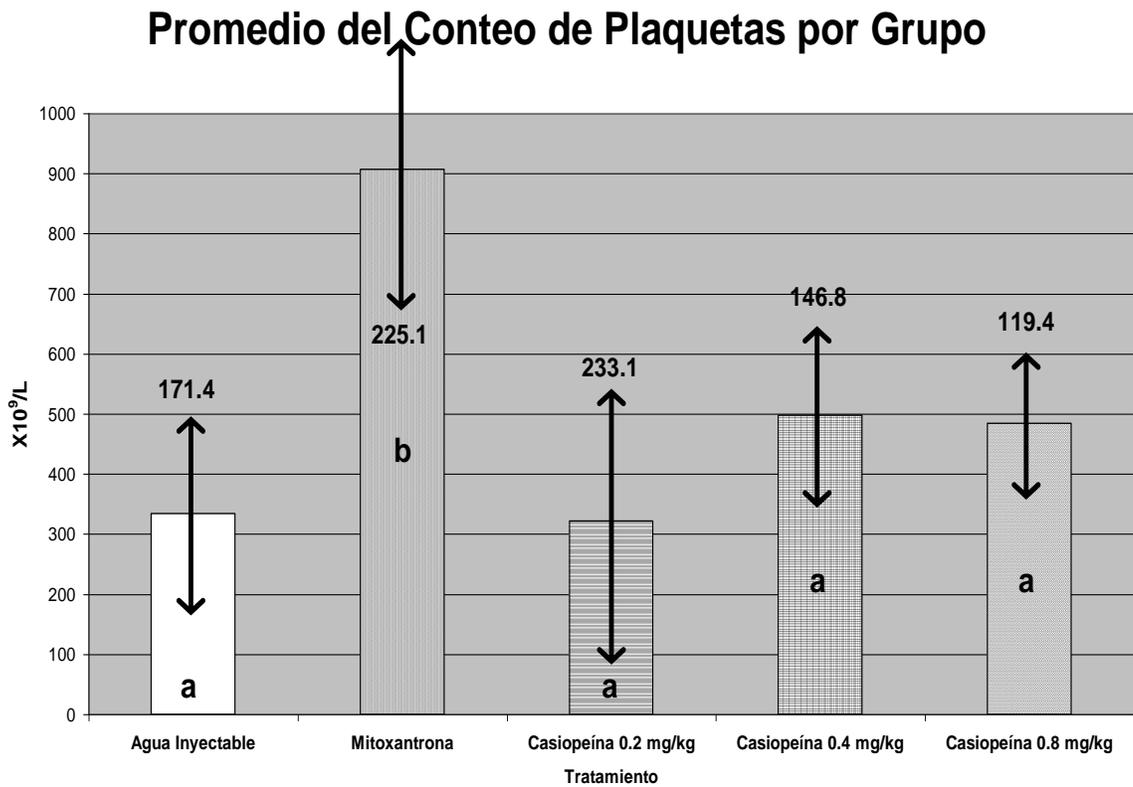


Figura 20. Promedio por Grupo del Conteo de Plaquetas por Grupo

Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba Tukey Z
1- β de a = Casio III Ea 0.2 (0.99), Casio III-Ea 0.4 (0.94), Casio III-Ea 0.8 (0.95)

Sólidos Totales

Los resultados por grupo y la contrastación de la determinación de los sólidos totales entre los grupos, son presentados en la figura 21.

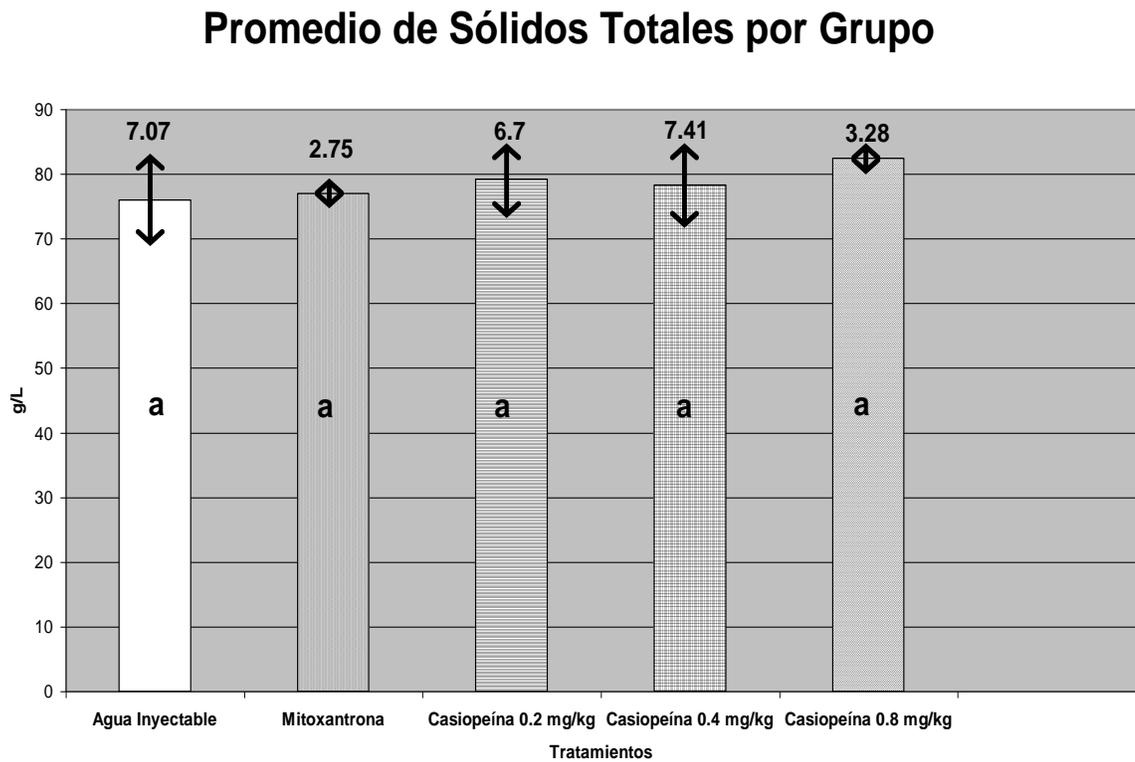


Figura 21. Promedio de Sólidos Totales por Grupo

Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba de Kruskal Wallis χ^2_4
 $1-\beta$ de $a = 0.78$

Leucocitos Totales

Los resultados por grupo y la contrastación de los conteos totales de leucocitos entre los grupos, son presentados en la figura 22.

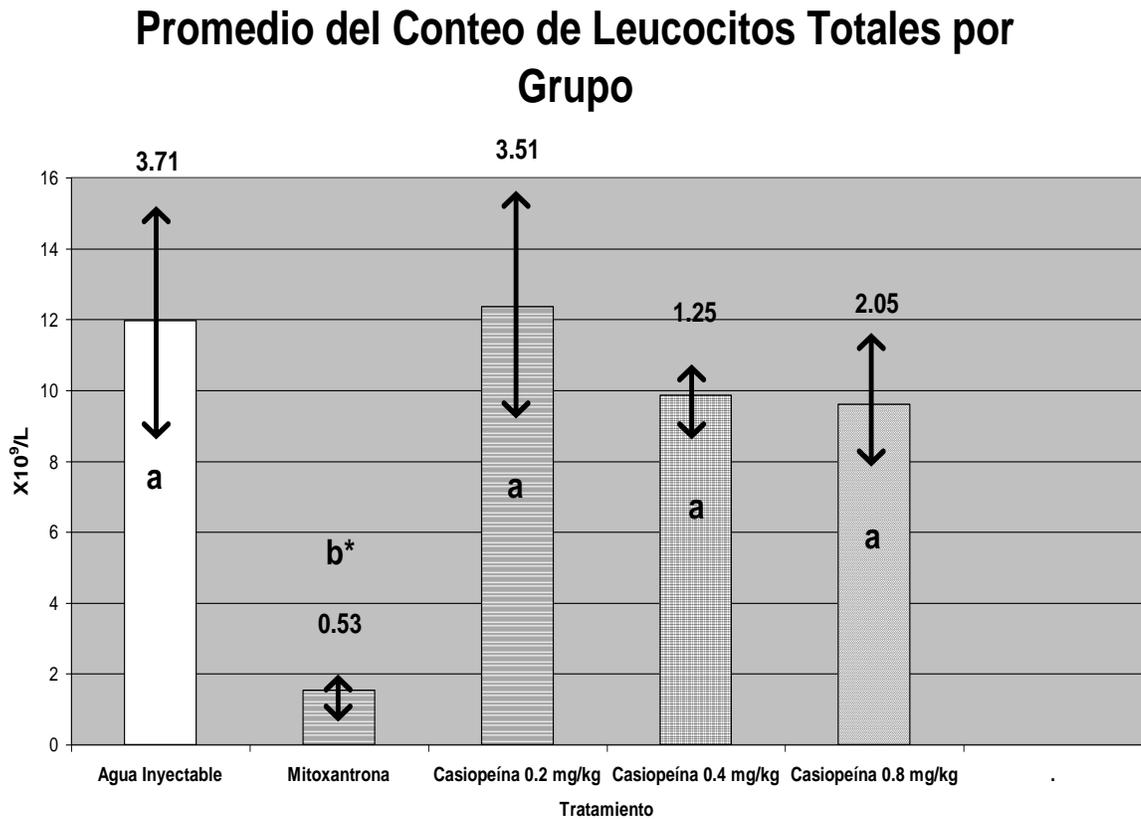


Figura 22. Promedio del Conteo de Leucocitos Totales por Grupo

a, b = Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba de Mann Whitney χ^2_1

* Están fuera de Rango [3-17 X 10⁹/L] [79]

1- β de a = Casio III Ea 0.2 (0.99), Casio III-Ea 0.4 (0.91), Casio III-Ea 0.8 (0.89)

Neutrófilos

Los resultados por grupo y la contrastación de los conteos de neutrófilos entre los grupos, son presentados en la figura 23.

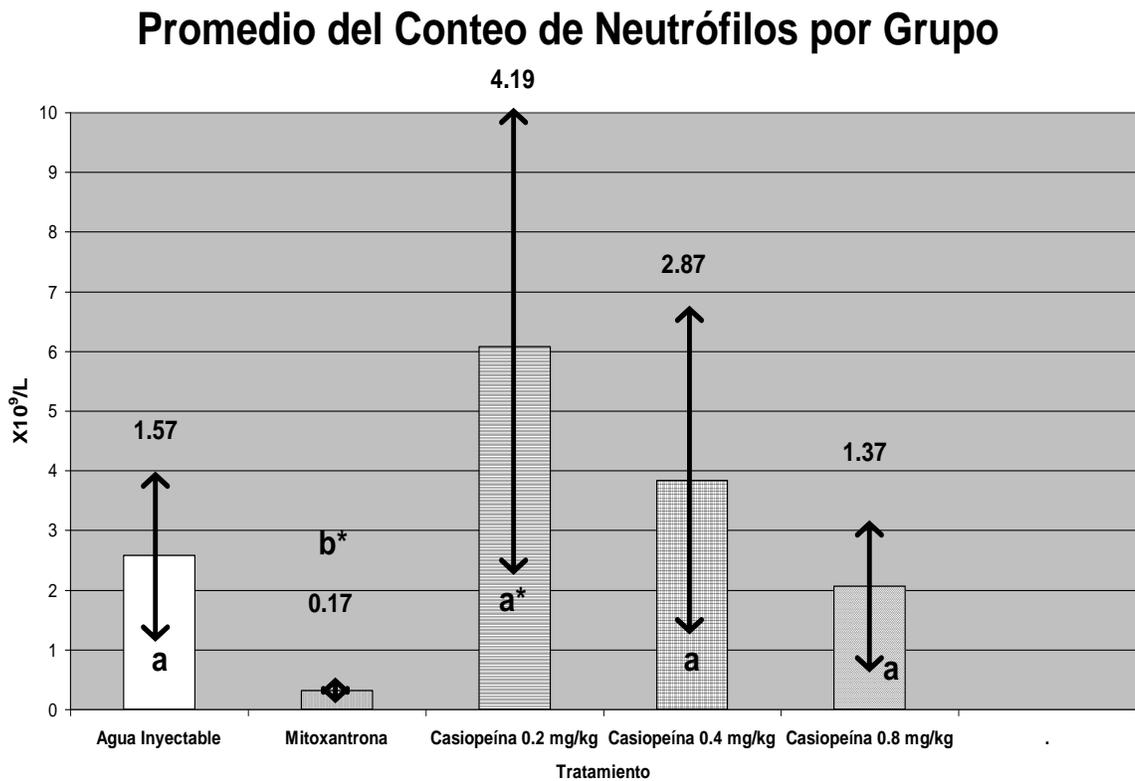


Figura 23. Promedio del Conteo de Neutrófilos por Grupo

a, b = Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba de Mann Whitney χ^2 1

* Están fuera de Rango [$0.5 - 4.5 \times 10^9/L$] [79]

1- β de a = Casio III Ea 0.2 (0.21), Casio III-Ea 0.4 (0.95), Casio III-Ea 0.8 (0.84)

Linfocitos

Los resultados por grupo y la contrastación de los conteos de linfocitos entre los grupos, son presentados en la figura 24.

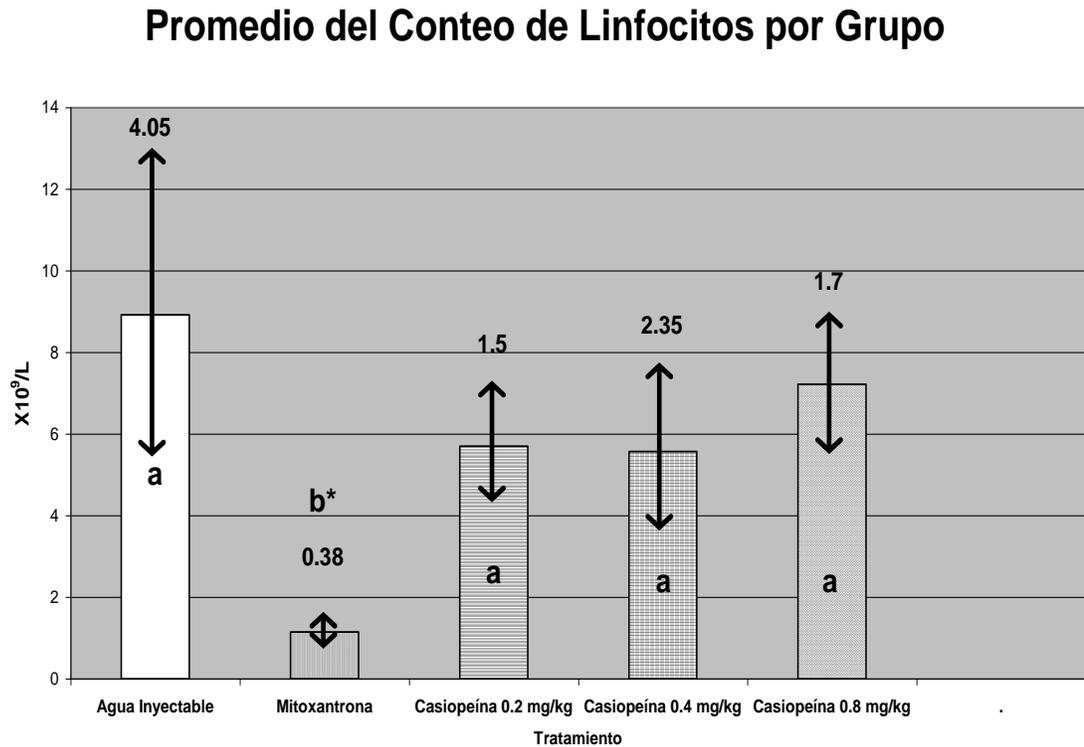


Figura 24. Promedio del Conteo de Linfocitos por Grupo

a, b = Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba de Mann Whitney χ^2_1

* Están fuera de Rango [2 - 14 X 10⁹/L] [79]

1- β de a = Casio III Ea 0.2 (0.53), Casio III-Ea 0.4 (0.89), Casio III-Ea 0.8 (0.88)

Monocitos

Los resultados por grupo y la contrastación de los conteos de monocitos entre los grupos, son presentados en la figura 25.

Promedio del Conteo de Monocitos por Grupo

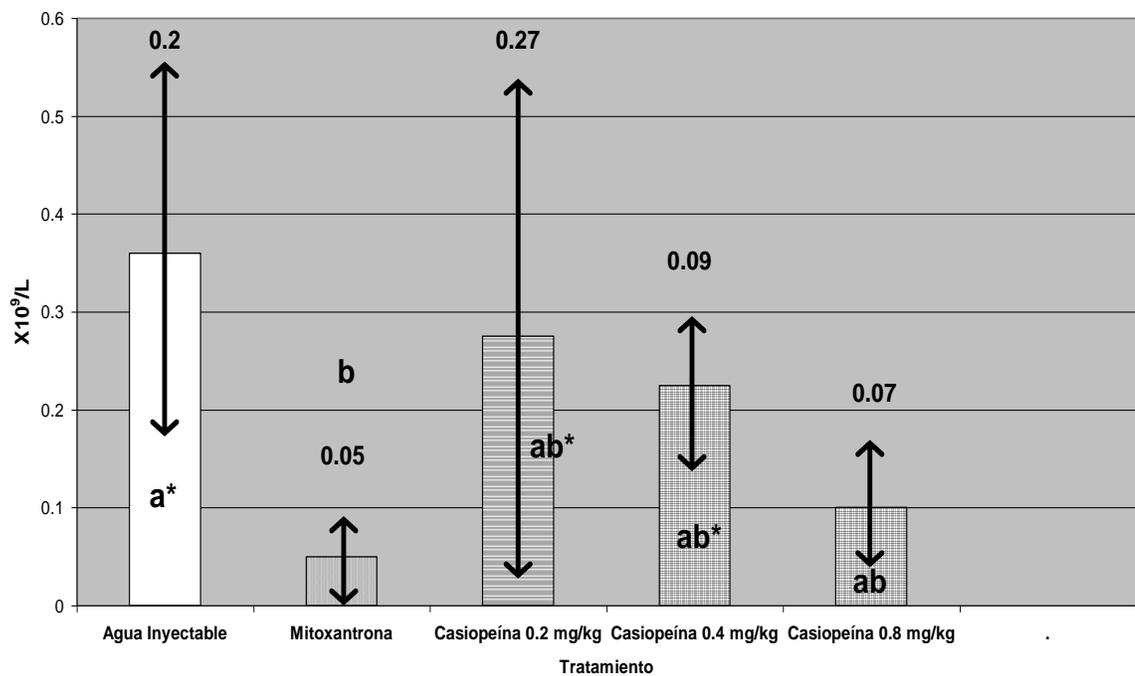


Figura 25. Promedio del Conteo de Monocitos por Grupo

a, b = Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba Tukey Z

* Están fuera de Rango [$0.03 - 0.17 \times 10^9/L$] [79]

$1-\beta$ de a = Casio III Ea 0.2 (0.95), Casio III-Ea 0.4 (0.85), Casio III-Ea 0.8 (0.22)

$1-\beta$ de b = Casio III Ea 0.2 (0.45), Casio III-Ea 0.4 (0.87), Casio III-Ea 0.8 (0.99)

Eosinófilos

Los resultados por grupo y la contrastación de los conteos de eosinófilos entre los grupos, son presentados en la figura 26.

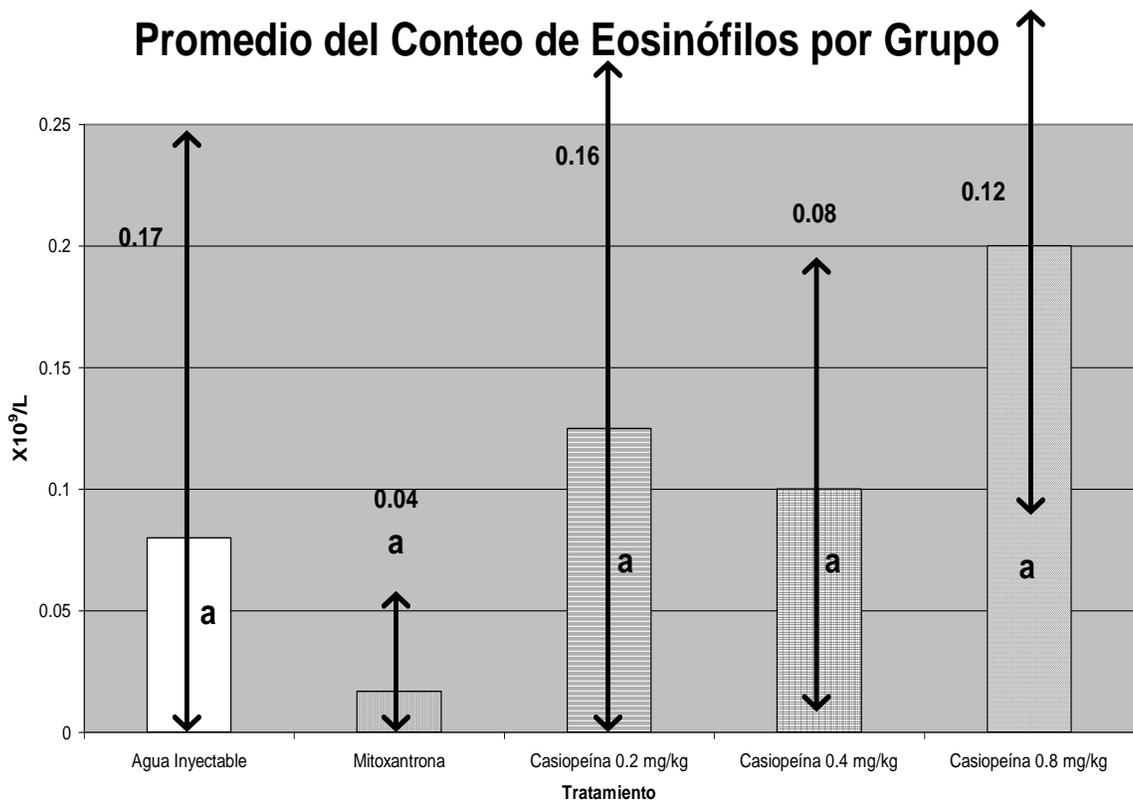


Figura 26. Promedio del Conteo de Eosinófilos por Grupo

Literales diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) prueba ANOVA Z
 $1-\beta$ de $a = 0.44$

Para el caso del conteo de Mielocitos, Metamielocitos y Basófilos, en todos los individuos de todos los grupos los conteos fueron de 0.

VII. Discusión

En este estudio, la Casiopeína[®] III-Ea a dosis de 0.8 mg/kg intraperitoneal tuvo un desempeño similar al del tratamiento con el fármaco comercial Mitoxantrona (Mitoxgen[®]) en la inhibición del desarrollo tumoral y la densidad celular en el Hepatocarcinoma AS-30D *in vivo*.

Los hallazgos citológicos de los tumores, en todos los casos fueron compatibles con las características descritas por la literatura para el Hepatocarcinoma AS-30D, tanto en morfología celular como en el hecho de que las células tumorales son el grupo celular predominante y en la escasez de leucocitos [38-40].

Integración de Resultados la Inhibición del Desarrollo Tumoral, Densidad Celular, Citología, TUNEL y Ki 67

El tratamiento con Mitoxantrona intraperitoneal fue el que presentó un mejor desempeño en todas las variables medidas en este estudio, es decir, fue el que presentó un mayor efecto inhibitor del desarrollo del tumor, (junto con el grupo V Cas. III-Ea 0.8, Figura 12), menor celularidad observable en las citologías (Figura 28), un menor promedio de densidad celular, una mayor proporción de células tumorales muriendo con fragmentación de ADN (TUNEL) y menor proporción de células en proliferación (Ki-67, Figura 16), por lo que se le puede considerar como un fármaco con efectos antineoplásicos, inductores de muerte celular con fragmentación de ADN y actividad antiproliferativa en el Hepatocarcinoma AS-30D *in vivo*, lo cual coincide con lo reportado por otros autores en diversos tumores tratados con mitoxantrona [80-83].

En el caso del tratamiento con Casiopeína[®] III-Ea se hacen las siguientes observaciones por tratamiento:

Para la dosis de 0.2 mg/kg, no se observaron diferencias con el grupo tratado con agua inyectable en lo que respecta al efecto inhibitor del desarrollo del tumor (Figura 12), las citologías (Figura 29) y la densidad celular (Figura 16), sin embargo, se observa una mayor proporción de células en muerte celular con fragmentación de ADN que cualquiera otra de las dosis de Casiopeína[®] III-Ea, pero con una mayor proporción de células en proliferación que el grupo tratado con agua

inyectable (Figura 16). Todo lo anterior se traduce en que la dosis de 0.2 mg/kg intraperitoneal de Casiopeína® III-Ea no tiene actividad antitumoral en el Hepatocarcinoma AS-30D *in vivo*.

En el caso de las dosis de 0.4 mg/kg no se observaron diferencias con el grupo tratado con agua inyectable en cuanto al efecto inhibidor del desarrollo del tumor (Figura 12), las citologías (Figura 30), densidad celular y la proporción de células en muerte celular con fragmentación de ADN, sin embargo, sí presentó una menor proporción de células en proliferación que el grupo tratado con agua inyectable (Figura 16). Todo lo anterior se traduce en que la dosis de 0.4 mg/kg intraperitoneal de Casiopeína® III-Ea no tiene actividad antitumoral en el Hepatocarcinoma AS-30D *in vivo*, aunque se observa cierto efecto citostático.

Respecto a la dosis de 0.8 mg/kg, fue la dosis de Casiopeína® III-Ea la que presentó mejor desempeño, puesto que el efecto inhibidor del desarrollo del tumor (Figura 12) y su promedio de densidad celular no fue diferente al del tratamiento con Mitoxantrona; además presentó una mayor proporción de muerte celular con fragmentación de ADN y una menor proporción de células en proliferación que el grupo tratado con agua inyectable (Figura 16). Lo anterior se traduce como que la Casiopeína® III-Ea a dosis de 0.8 mg/kg intraperitoneal tiene una acción antineoplásica, inductora de la muerte celular con fragmentación de ADN, así como citostática en el Hepatocarcinoma AS-30D *in vivo*, lo que confirma los resultados *in vitro* e *in vivo* de otros autores en diversas líneas tumorales [10, 11, 13, 14, 17, 19, 74]. Sin embargo, su acción inductora de la muerte celular con fragmentación de ADN y citostática es menor al demostrado por la Mitoxantrona en este experimento (Figura 16).

Se sugiere realizar estudios adicionales para probar el desempeño de la dosis de Casiopeína® III-Ea 0.8 mg/kg por vía intravenosa, así como probar dosis más altas para determinar si se puede igualar el desempeño con la Mitoxantrona en las variables en que el desempeño de esta última fue superior.

Hematología

Debido a causas fuera de nuestro alcance no se pudieron obtener muestras sanguíneas de 3 de los 6 individuos del grupo III (Cas III-Ea0.2). Agregado a lo anterior tenemos que el tamaño de muestra de este estudio se calculó con base en la variable densidad celular, por lo que, para el caso de las

variables hematológicas, la muestra fue insuficiente para parte de los analitos de alguno de los grupos, especialmente el grupo III (Cas III-Ea0.2); en consecuencia, los datos obtenidos de los estudios hematológicos en unos analitos no fueron concluyentes, lo cual será indicado en cada caso.

Línea Roja, Sólidos Totales y Conteo de Plaquetas

En lo relativo al hematocrito y conteo de eritrocitos (Figuras 17 y 18), no se encontraron diferencias entre los diferentes tratamientos.

Con respecto a la hemoglobina, el grupo III (Cas. III-Ea 0.2) presentó una menor concentración que los grupos II (Mitox.) y IV (Cas. III-Ea 0.4), además de estar por debajo de los valores de referencia. Sin embargo, entre el grupo tratado con agua inyectable y los otros grupos II (Mitox.), III (Cas. III-Ea 0.2), IV (Cas. III-Ea 0.4) y V (Cas. III-Ea 0.8) no se encontraron diferencias, por lo que esta disminución en la concentración de hemoglobina no se puede asociar al tratamiento (Figura 19). Se debe señalar que debido al pequeño tamaño de la muestra del grupo III (Cas. III-Ea 0.2) la potencia fue de tamaño mediano, por lo que estos resultados deben ser tomados con reserva.

En lo concerniente a los sólidos totales no se demostró evidencia alguna de impacto nocivo en ninguno de los tratamientos probados.

En el caso del conteo de plaquetas se encontró que el tratamiento con Mitoxantrona presentó un mayor promedio en el conteo de plaquetas que cualquiera de los otros grupos, sin embargo, en la comparación entre el grupo tratado con agua inyectable y los grupos tratados con Casiopeína® III-Ea no se encontraron diferencias. Además, como se puede observar en las citologías (Figuras 27 a 31), en las que corresponden a los tratamientos de Casiopeína® III-Ea y el tratado con agua inyectable es evidente la presencia de un gran número de elementos sanguíneos, mientras que en el caso del tratamiento con Mitoxantrona prácticamente no los hay (Figura 28). Esto se puede asociar al impacto del desarrollo del tumor en los individuos experimentales y no a los tratamientos (Figura 20).

En resumen, los resultados sugieren que no hay impacto de ninguno de los tratamientos en la línea roja, sólidos totales y el conteo de la plaquetas del hemograma. Estos resultados contradicen lo encontrado por otros autores, quienes reportan una hemotoxicidad como efecto colateral al

tratamiento de otras Casiopeínas[®] [84]. Sin embargo, en estos estudios la vía de administración fue intravenosa y las dosis fueron superiores a las utilizadas en el presente trabajo, razón por la cual se puede argumentar que este efecto hemotóxico podría ser dependiente de la dosis, la vía de administración o ambas; empero, con base en los resultados encontrados en este trabajo no hay evidencias de impacto en la línea roja del hemograma a las dosis probadas de Casiopeína[®] III-Ea intraperitoneal *in vivo*. No obstante, en el caso del apartado de hemoglobina para el grupo III (Cas. III-Ea 0.2) esta aseveración se debe tomar con reserva (debido a que no se pudieron muestrear todos los individuos), por lo que se sugiere realizar futuros estudios con un tamaño de muestra significativamente mayor.

Línea Blanca

Se encontró que el tratamiento de Mitoxantrona presentó menores conteos de leucocitos totales, neutrófilos y linfocitos (Figuras 22-24) que todos los otros tratamientos, y en el caso de los monocitos mostró menores conteos que el grupo tratado con agua inyectable (Figura 25), lo cual se interpreta como que el tratamiento con Mitoxantrona causa una leucopenia, que en la literatura está reportada como consecuencia de mielosupresión por efecto colateral del fármaco [20, 22, 85].

En el caso de los tratamientos con Casiopeína[®] III-Ea, en ninguna de las dosis probadas se encontraron diferencias con el grupo tratado con agua inyectable: leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos (Figuras 22-27), lo que se interpreta como que el tratamiento con Casiopeína[®] III-Ea a dosis de 0.2, 0.4 y 0.8 mg/kg intraperitoneal no presentan impacto en la línea blanca del hemograma. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos de otros autores para la Casiopeína[®] II [84].

Sin embargo, en el caso del conteo de monocitos se observa una monocitosis en los grupos III (Cas. III-Ea 0.2) y IV (Cas. III-Ea 0.4) (Figura 25), pero como ya se mencionó, no se encontraron diferencias con el grupo tratado con agua inyectable (el cual también presenta una monocitosis); además se debe tener en cuenta que estos tres grupos son los que presentaron mayor desarrollo tumoral (Figura 25). Con base en estos argumentos, esta monocitosis se puede asociar a una respuesta inespecífica del sistema inmune de los individuos experimentales al propio desarrollo tumoral y no a los tratamientos.

Debido a lo pequeño del tamaño de muestra para el grupo III (Cas. III-Ea 0.2) en los apartados de neutrófilos y linfocitos, el grupo V con los monocitos, y para todos los grupos los eosinófilos, estas aseveraciones no son concluyentes, por lo que se sugiere realizar futuros estudios con un tamaño de muestra significativamente mayor para estas variables.

Basados en el escaso impacto demostrado con el tratamiento de Casiopeína® III-Ea en el hemograma y el impacto nocivo de la Mitoxantrona se sugiere probar los tratamientos combinados de estos dos fármacos, con el objetivo de determinar si mejora el efecto antineoplásico y disminuye los efectos colaterales.

VIII. Conclusiones

El efecto citotóxico en el Hepatocarcinoma AS-30D *in vivo* del tratamiento con Casiopeína® III-Ea en la dosis de 0.8 mg/kg intraperitoneal es significativamente superior al grupo tratado con agua inyectable.

El efecto citostático en el Hepatocarcinoma AS-30D *in vivo* del tratamiento con Casiopeína® III-Ea en las dosis de 0.4 y 0.8 mg/kg intraperitoneal es significativamente superior al grupo tratado con agua inyectable.

El efecto citotóxico y citostático en el Hepatocarcinoma AS-30D *in vivo* del tratamiento con Mitoxantrona es significativamente superior al tratamiento con Casiopeína® III-Ea intraperitoneal en cualquiera de las dosis probadas.

El tratamiento con Mitoxantrona y Casiopeína® III-Ea a dosis de 0.4 y 0.8 mg/kg intraperitoneal no implicó un impacto nocivo significativo en los valores de la línea roja del Hemograma.

El tratamiento con Casiopeína® III-Ea a dosis de 0.4 mg/kg intraperitoneal no implicó un impacto nocivo significativo en los conteos de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos y monocitos.

Los tratamientos con Casiopeína® III-Ea a dosis de 0.8 mg/kg intraperitoneal no implicó un impacto nocivo significativo en los conteos de leucocitos totales, neutrófilos y linfocitos.

El tratamiento con Mitoxantrona tuvo un impacto nocivo sobre el conteo de leucocitos.

Se comprobó el efecto antineoplásico de la Casiopeína® III-Ea que se había reportado *in vitro*, en otras líneas tumorales.

IX Bibliografía

1. Instituto Nacional de Cáncer [pagina de internet]. E.U.A: Institutos Nacionales de Salud [datos cargados 2005 Sep 23; citados 2009 Aug 12]. El cáncer: preguntas y respuestas [Después de 2 pantallas]. Available from: www.cancer.gov/espanol/cancer/hojas-informativas/cancer-respuestas.
2. The Oral Cancer Foundation [homepage on the internet]. The Oral Cancer Foundation Inc [update 2009 May 29; cited 2009 Aug 12]. Chemotherapy [About 3 screen]. Available from: <http://oralcancerfoundation.org/facts/chemotherapy.htm>
3. Johnson GE. PDQ Pharmacology. 2^a ed. Canada: PMPH-USA, 2002 p.p. 293-297.
4. Johnson BL, Gross J. Handbook of Oncology Nursing. ed. 3^a ed. Canada: Jones & Bartlett Publishers, 1998 p.p. 68-69, 99-100.
5. Lupulescu A. Cancer Cell Metabolism and Cancer Treatment. Netherlands: Hardwood Academic, 2001 p.p. 272.
6. Ruiz L. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II. Patente de invención, SECOFI no. 172248. Dic. 9 1993.
7. Ruiz L. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo I. Patente de invención, SECOFI no. 172967. Enero 26 1994.
8. Ruiz L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complex from phenylphenantroline to be used as anticancerigenic agents. U.S. patent, Ap21 (1992) Number 5,107,005. U.S. patent Re 35,458, Feb 18 1997
9. Ruiz L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate from methylate phenantroline complex to be used as anticancerigenic agents. U.S. Patent, Patent No. 5,576,326. Nov 19 1996
10. Tovar S, Gracia I, Ruiz L. Evaluación Antineoplásica de dos Compuestos de Coordinación Mediante el Empleo de Modelos *In vitro*. 2do Congreso Nacional de Química. Qro, Qro, México 2006.
11. Arroyo A, Ruiz L, Rivera M, Gracia I, Sánchez F. Evaluación Antineoplásica *In Vivo* de la Casiopeína[®] III-Ea en un Modelo Murino con Melanoma B16. 1er Congreso Innovación Salud y Química Médica, Boca del Río Veracruz, México 2009.
12. Bravo M. E, García J. C, Gracia I, Ruiz L. Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes,(Casiopeínas₂). Journal of Inorganic Biochemistry 2009; 103: 299–309.
13. Trejo C, Palencia G. Cas IIgly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells *In Vitro* and *In Vivo* through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. Neoplasia. June 2005; 7: (6); 563-574.
14. Radamés A. M, Muñoz J.L. et al. Casiopeina IIgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. Toxicology *In Vitro*. 2008; 22: 710-715.
15. Carvallo F.R. Efectos Antiproliferativos y Apoptoticos de las Casiopeínas[®] IIgly y III-ia en Líneas Tumorales Humanas (tesis de doctorado). Distrito Federal (México): Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
16. Ramírez F, Rodríguez D, J. et al. Evaluación de los rompimientos en el DNA inducidos por la Casiopeína IIgly y en leucocitos humanos de sangre periférica. Primer Congreso de Química Médica. Dedicado a la Investigación en Cáncer. Productos Naturales, Sintéticos, Orgánicos e Inorgánicos. Oaxaca, México. Noviembre. 2004. 41-43 pp.

17. Müller R, Vizcaya A. A. *et al.* Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*. 2007; 165: 189-199.
18. Marín A, Gracia I. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas[®]) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology*. 2003; 65: 1979-1989.
19. Serment J, Reyes E, Breña M. Fragmentación del ADN por diferentes Casiopeínas. 2do Congreso Nacional de Química Médica, Qro, Qro, México 2006.
20. Serment J, Cano P, Reyes E, Velazquez F, Bravo M.E, Ruiz L. Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas[®]. *Toxicology in Vitro* 2011; 25: 1376–1384.
21. Alemón R, Muñoz J. L, Ruíz L, Mendiola M. T. Determinación de la Actividad Oxidativa de las Casiopeínas CAS IIgly, CAS III-Ia, y CAS III-Ea. 2do Congreso Nacional de Química Médica, Qro, Qro, México 2006.
22. Alemón R, Bravo M.E, Gracia M. I, Ruiz L. Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína IIgly and cisplatin in murine melanoma B16 cells. *Toxicology in Vitro* 2011; 25: 868–873.
23. Curtis M.J, Clive P.P, Morley S. *Farmacología integrada*. España: Elsevier, 1998 p.p. 521-522.
24. Pasqualini J.R. *Breast Cancer: Prognosis, Treatment, and Prevention*. 2^a ed. Informa Health Care, 2008 p.p. 463, 464.
25. Drugs.com © 2000-2010 [homepage on the internet] Food and Drugs Administration [Updated 16 December 2009; cited 2010 Jan 12] Agentes genotóxicos [About 2 screen]. Available from: <http://www.drugs.com/pro/mitoxantrone.html>
26. Dorland B. *Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina*. 30^a ed Madrid: Elsevier, 2005. p.p. 1244.
27. Livraghi T, Makuuch M, Buscarini L. *Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma*. Ed. Cambridge University Press, 1997.
28. González H., editor. *Diccionario de Especialidades Farmacética*. Thomson. 54^a ed. México: Ediciones PLM, 2008 p.p. .
29. Olaiz, G. Hernández M, et al. *Cuaderno de Salud: Cáncer. Un encuentro con el futuro epidemiológico*. 1^a ed. México: Secretaria de Salud. 1994 p.p.12-15.
30. UICC[®] [homepage on the internet]. Geneva: International Union Against Cancer 2009 [update 2009; cited 2009 Aug 12]. About Cancer [about 2 screen]. Available from: http://www.uicc.org/index.php?option=com_content&task=view&id=13&Itemid=113
31. Organización Mundial de la Salud. *Acción Mundial Contra el Cáncer*. Ed. Organización Mundial de la Salud y de la Unión Internacional Contra el Cáncer. Versión Revisada, 2005, p.p. 4, 5. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/media/AccionMundialCancerfull.pdf>
32. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. *Estadísticas a Apropósito del Día Mundial Contra el Cáncer*. México (DF): INEGI, 2009.
33. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. *Estadísticas Vitales 1998-2007 Base de datos*. México (DF): INEGI, 2009.
34. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. *Estadísticas Vitales. Defunciones 2006-2007 Base de datos*. México (DF): INEGI, 2007.
35. National Cancer Institute [homepage on the internet]. National Institutes of Health [update 2009 May 22; cited 2010 Jan 12]. *Chemotherapy* [About 3 screen]. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adult-primary-liver/healthprofessional>
36. Rubin P. *Oncología Clínica*. 8^a ed. España: Elsevier, 2003 p.p. 773.
37. Robbins S. L, Cotran R.S. *Patología Estructural y Funcional*. 3^a ed. México D.F.: Nueva Editorial Interamericana, 1987 p.p. 923.

38. Chang, J. P. Ultrastructure of a Chemically Induced Hepatoma and Its Transplants of Early Passages. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1967 p.p. 535-556.
39. Chang, J. P., Gibley, C. W., and Ichinoe, K. Establishment of Transplantable Hepatomas Induced by 3-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene with Special Reference to the Histology Features of the Transplants of Early Passages. *Cancer Research*. 1967; 27: 2065-2071.
40. Smith D. F, Walborg E. F, and Chang J. P. Hepatoma Induced by 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Research*. September 1970; 30: 2306-2309.
41. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. *Introducción a la Biología Celular*. 2 ed. España, Médica Panamericana 2006, p 625-626.
42. Allen, P. D., Bustin, S. A. and Newland, A. C. The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Reviews*. 1993; 7: 63-73.
43. Cohen J.J, Duke R.C, Fadok V.A, Sellins K.S. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol*. 1992; 10: 267-293.
44. Clarke, P. G. H. Developmental Cell Death: Morphological Diversity and Multiple Mechanisms. *Anatomy and Embryology*. 1990; 181: 195 - 213.
45. Johnson, E. M. and Deckwerth, T. L. Molecular Mechanisms of Developmental Neuronal Death. *Annual Review of Neuroscience*. 1993; 16: 31 - 46.
46. Batistatou, A. and Geene, L. A. J. Internucleosomal DNA Cleavage and Neuronal Cell Survival/Death. *The Journal of Cell Biology*. 1993; 122: 523 - 532.
47. Strange, R. Li F, Saurer S, Burkhardt A, and Friis R.R. Apoptotic Cell Death and Tissue Remodelling During Mouse Mammary Gland Involution. *Development*. 1992; 115: 49-58.
48. Carson, D. A. and Ribeiro, J. M. Apoptosis and Disease, *The Lancet*. 1993; 341: 1251-1254.
49. Edgington, S. M. Looking death in the eye: apoptosis and cancer research. Is cancer really caused by cells refusing to commit suicide on cue?. *Biotechnology*. 1993; 11: 787-792.
50. Michael Tsokos, editor. *Forensic Pathology Reviews*. New Jersey: Humana Press, 2006, p.p. 334-335.
51. Hugh J. M. Brady editor. *Apoptosis methods and protocols*. Vol. 282. New Jersey: Humana Press, 2004 p.p. 5-6.
52. Lodish H, Berk A, et al. *Biología celular y molecular*. 5ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana 2005 p.p. 854-856.
53. Vermeulen K, Dirk R, Bockstaele V, Berneman Z. N. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Proliferation*. 2003; 36: 131-149.
54. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V: *Patología Estructural y Funcional*. 7ª ed. España: McGraw-Hill-Interamericana 2009 p.p. 293-
55. Quezada, M. A. El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *Contactos*: 2007; 65: 5-12.
56. Verschuren, E. W.; Jones, N. and Evan, G. The cell cycle and how it is steered by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin. *Journal of General Virology*. 2004; 85: 1347-1361.
57. Kim, Y. T. and Zhao, M. Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. *Yonsei Medical Journal*. 2005; 46: (5); 597-613.
58. Attwooll, C; Denchi, E. L. and Helin, K. The E2F family: specific functions and overlapping interests. *The EMBO Journal*. 2004; 23: (24); 4709-4714.
59. Burdon, T. Smith, A. and Savatier, P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in Cell Biology*, 2002; 12: (9); 432-438.
60. Golias, C. H; Charalabopoulos, A. and Charalabopoulos, K. Cell Proliferation and Cell Cycle Control: a mini review. *International Journal of Clinical Practice*. 2004; 58: (12); 1134-1141.

61. Alberts, B. Essential Cell Biology. New York and London: Garland Publishing, Inc., 1998, p.p. 547-562 y 582-584.
62. Stephano-Hornedo J. L. El factor promotor de la fase M y el control de la división celular. *Ciencia*. 1993; 44: 305-322.
63. Pardo, M. Citoquinesis en células eucariotas. *Investigación y Ciencia*. 2005; julio: 40-49.
64. Gupta P.K. Cellular and Molecular Biology. 3^a ed. India: Rastogi Publications, 2008 p.p. 299-327.
65. Karp G. Cellular and Molecular Biology: Concepts and Experiments. 6^a ed. John Wiley and Sons, 2009 p.p 560-604.
66. Roa J.C. Marcadores Moleculares: Proliferación Celular e Inestabilidad Microsatelital. *Gastr Latinoam* 2003; 14: (3); 195-199.
67. González F. Patología Molecular. España: Elsevier, 2003 p.p. 3-60.
68. Jorde I.B, Carey J.C. Genética Médica. España: Elsevier, 1998, p.p. 212-230.
69. Montuenga L. Técnicas en Histología y Biología Celular. España: Elsevier, 2009, p.p. 324-325.
70. Weiss S.W. Tumores de Tejidos Blandos. Ed. Elsevier, España, 2009, p.p. 164.
71. Winchester D.J. Cáncer de Mama. Atlas de Oncología Clínica. España: Elsevier, 2001 p.p 117.
72. Kirkwood BR, Essentials of Medical Statistics. Blackwell Scientific Publications, 1988, ISBN 0-632-01052-5, pp. 191–200.
73. Gilman, J., and M. Myatt. EpiCalc 2000, version 1.02. London: Brixton Books, 1998.
74. Rodríguez S, Vital P.A., Flores F. L, Marín A, Ruiz L, Moreno R. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 215: 208–217.
75. Rivera M, Arroyo A, Esquivel A, Vértiz G, Macías L, Ruiz L, Gracia I. Toxicidad Aguda (DL₅₀) de las Casiopeínas[®] III-La y III-Ea en Rata y Ratón por Vía Intraperitoneal e Intravenosa. 1er Congreso Innovación Salud y Química Médica, Boca del Río Veracruz, México 2009.
76. Los G, Nagel J.D, and McVie J.G. Anti-Tumor Effect of Cisplatin, Carboplatin, Mitoxantrone, and Doxorubicin on Peritoneal Tumor Growth After Intraperitoneal and Intravenous Chemotherapy: A Comparative Study. *Selective Cancer Therapeutics*. 1990; 6: (2); 73-82.
77. Rico H. A. Actividad Antineoplásica de la Casiopeína[®] III-Ia Sobre Diferentes Líneas Celulares Humanas Xenotrasplantadas al Ratón Desnudo. (tesis de Maestría). México (D.F). Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.
78. *In Situ* Cell Death Detection Kit, AP. Instruction Manual. Ed. Roche, Version 2, Versión April 2006.
79. Burns KF, De Lannoy C.W. Compendium of Normal Blood Values of Laboratory Animals, with Indication of Variations. I. Random-sexed populations of small animals. *Toxicology. Applied. Pharmacology* Compendium of normal blood values of laboratory animals, with indication of variations. I. Random-sexed populations of small animals. 1966; 8: (May); 429-437.
80. Chunyu Cao, Yu Han, Yushan Ren and Yanlin Wang. Mitoxantrone-Mediated Apoptotic B16-F1 Cells Induce Specific Anti-tumor Immune Response. *Celular and Molecular Immunology*. 2009; 5: (6); 468-475.
81. Bhalla K, Ibrado A.M, Tourkina E, Tang C, Grant S, Bullock G, Huang Y, Ponnathpur V. and Mahoney M.E. High-dose Mitoxantrone Induced Programmed Cell Death or Apoptosis in Human Myeloid Leukemia Cells. *Blood Journal*. 1993; 82: (10); 3133-3140.

82. Ferrer A, Marcé S, Bellosillo B, Villamar N, Bosch F, López A.G, Espinet B, Solé F, Montserrat E, Campo E, and Colomer D. Activation of Mitochondrial Apoptotic Pathway in Mantle Cell Lymphoma: High Sensitivity to Mitoxantrone in Cases with Functional DNA-Damage Response Genes. *Oncogene*. 2004; (23): 8941-9849.
83. Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S, and Hara I. Optimal Timing and Dosage of Chemotherapy as a Combined Treatment with Androgen Withdrawal in the Human Prostate LNCaP Tumour Model. *British Journal of Cancer*. 2001; 84: (6), 859-863.
84. De Vizcaya A, Rivero A, Ruiz L, Howarth J.A, Dobrota M. Hematotoxicity Response in Rats by the Novel Copper-Based Anticancer Agent: Casiopeina II. *Toxicology*. 2003; 194: 103–113.
85. MedlinePlus [homepage on the internet]. American Society of Health-System Pharmacists, Inc [update 2009 July 01; cited 2011 Aug 12]. Mitoxantrone Injection [About 2 screen]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a608019.html>.

X. Anexos

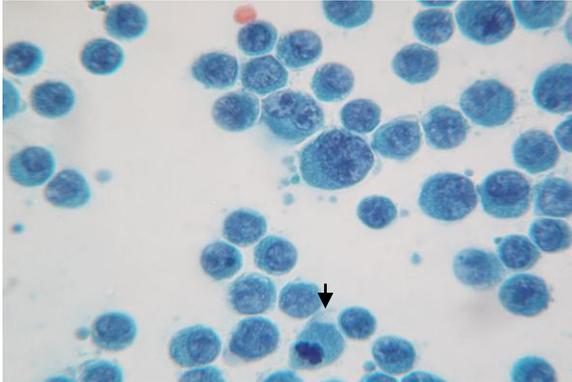


Figura 27. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con agua inyectable. Obsérvese la anisocitosis, anisicariosis, escaso citoplasma, núcleos y los nucleolos prominentes. Flechas Negras: Células en mitosis. Papanicolaou, 100X

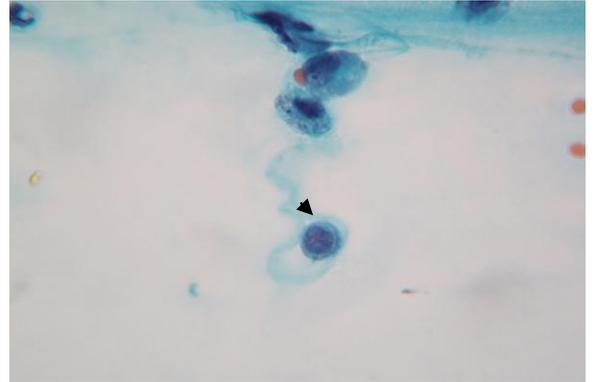


Figura 28. Célula de Hepatocarcinoma AS-30D (Flecha) Obsérvese el escaso citoplasma, núcleo y nucleolo prominente. Tratamiento con Mitoxantrona. Papanicolaou, 100X

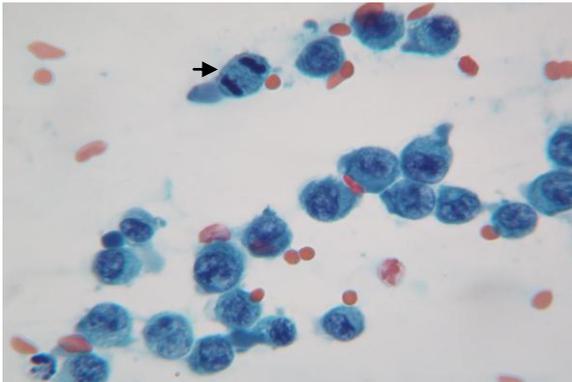


Figura 29. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.2 mg/kg. Obsérvese la anisocitosis, anisicariosis, escaso citoplasma, núcleos y los nucleolos prominentes. Flechas Negras: Células en mitosis. Papanicolaou, 100X

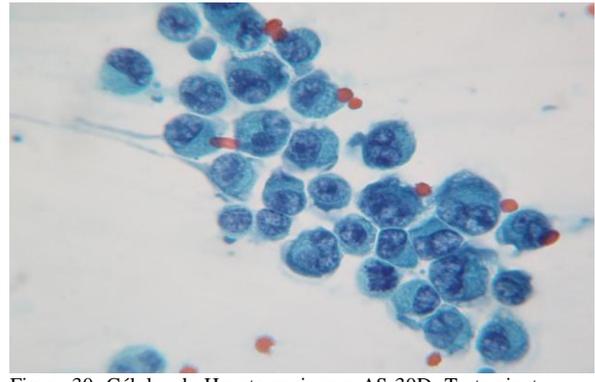


Figura 30. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.4 mg/kg. Obsérvese la anisocitosis, anisicariosis, escaso citoplasma, núcleos y los nucleolos prominentes. Papanicolaou, 100X.

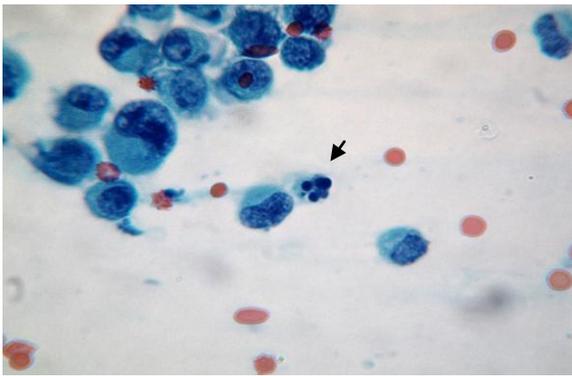


Figura 31. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.4 mg/kg. Obsérvese la anisocitosis, anisicariosis, escaso citoplasma, núcleos y los nucleolos prominentes. Flecha negra: Cuerpos apoptóticos. Papanicolaou, 100X.

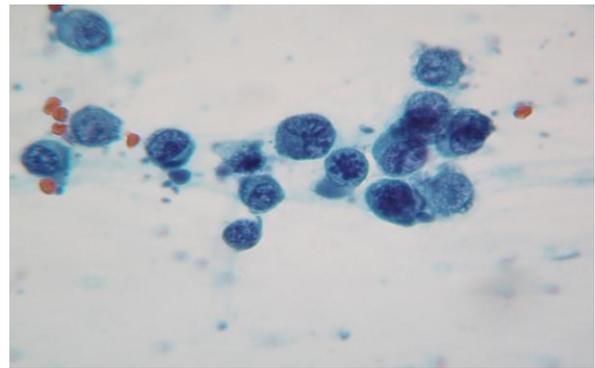


Figura 32. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.8 mg/kg. Obsérvese la anisocitosis, anisicariosis, escaso citoplasma, núcleos y los nucleolos prominentes. Papanicolaou, 100X.

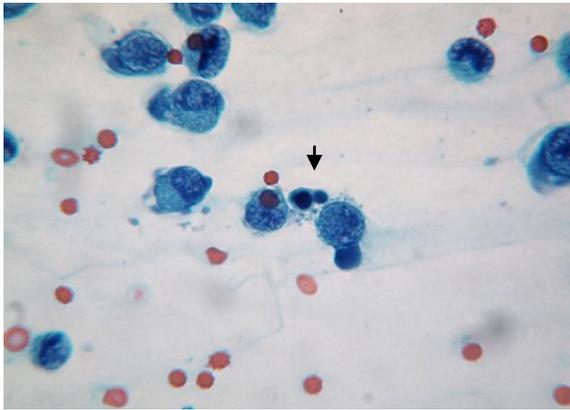


Figura 33. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.8 mg/kg. Obsérvese la anisocitosis, anisocariosis, escaso citoplasma, núcleos y los nucleolos prominentes. Flechas negras: Cuerpos Apoptóticos. Papanicolaou, 100X.

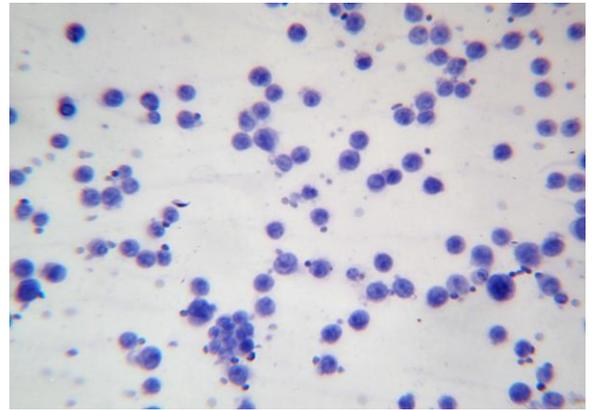


Figura 34. Células de Hepatocarcinoma AS-30D Procesadas con la Prueba de TUNEL. Tratamiento con Agua iny.ectable. Células con núcleos sin positividad 40 X

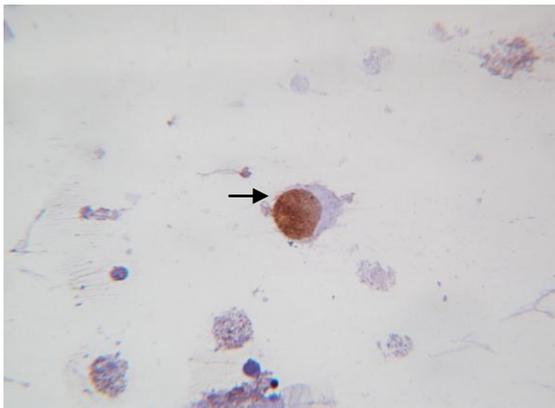


Figura 35. Células de Hepatocarcinoma AS-30D Procesadas con la Prueba de TUNEL. Tratamiento con Mitoxantrona. Flecha: Célula con núcleo intensamente positivo 40 X

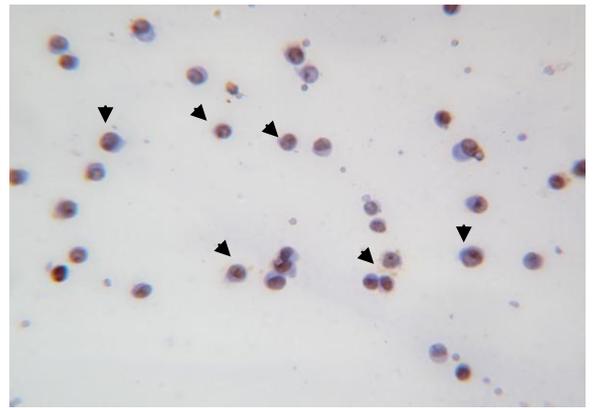


Figura 36. Células de Hepatocarcinoma AS-30D Procesadas con la Prueba de TUNEL. Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.2 mg/kg. Flechas: Células con núcleos intensamente positivos 40 X

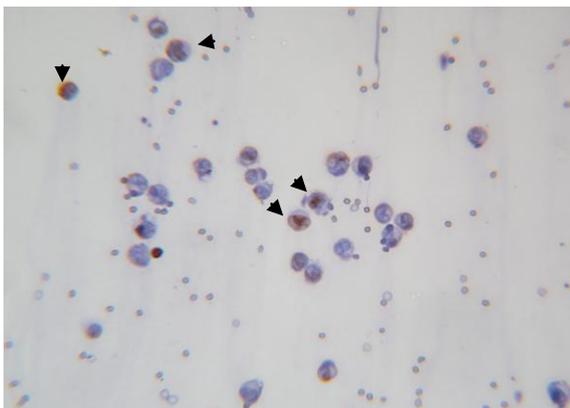


Figura 37. Células de Hepatocarcinoma AS-30D Procesadas con la Prueba de TUNEL. Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.4 mg/kg. Flechas: Células con núcleos medianamente Positivos 40 X

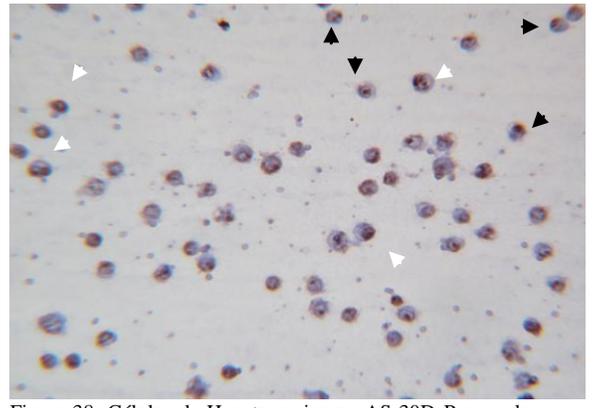


Figura 38. Células de Hepatocarcinoma AS-30D Procesadas con la Prueba de TUNEL. Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.8 mg/kg. Células con núcleos con positividad ligera (flechas negras) y media (flechas blancas) 40 X

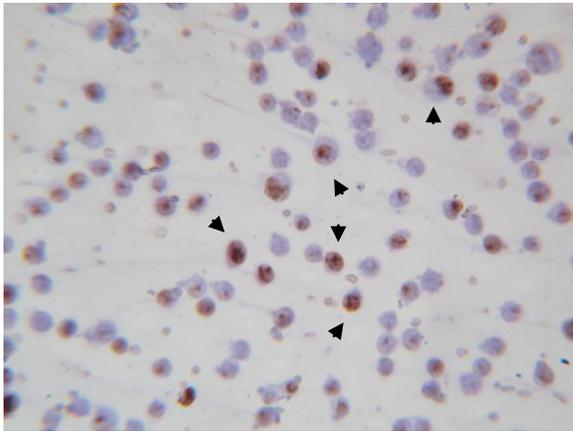


Figura 39. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Inmunohistoquímica. Antígeno Ki-67. Tratamiento con Agua Iny.ectable. Flechas: Células con núcleos intensamente positivos 40 X

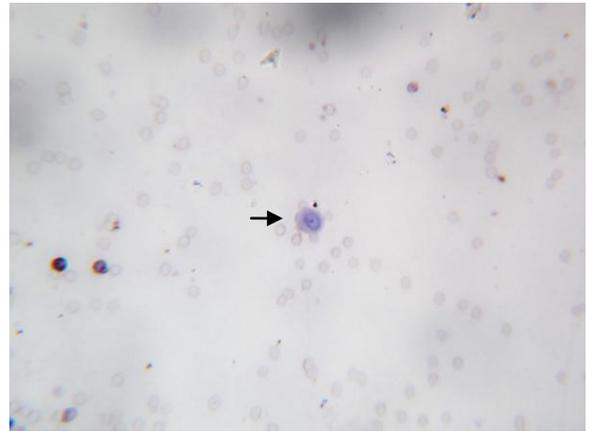


Figura 40. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Inmunohistoquímica. Antígeno Ki-67. Tratamiento con Mitoxantrona. Flecha: Célula sin positividad 40 X

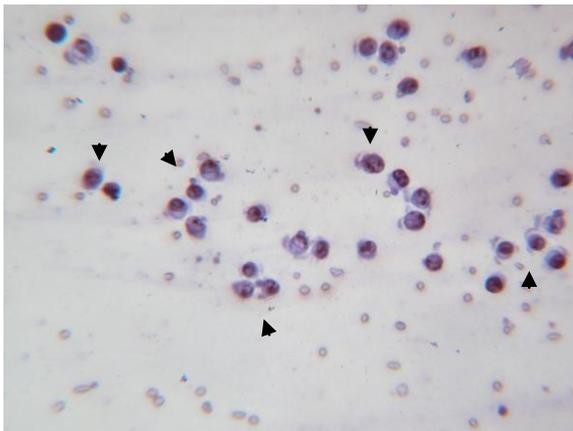


Figura 41. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Inmunohistoquímica. Antígeno Ki-67. Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.2 mg/kg. Flechas: Células con núcleos intensamente positivos 40 X

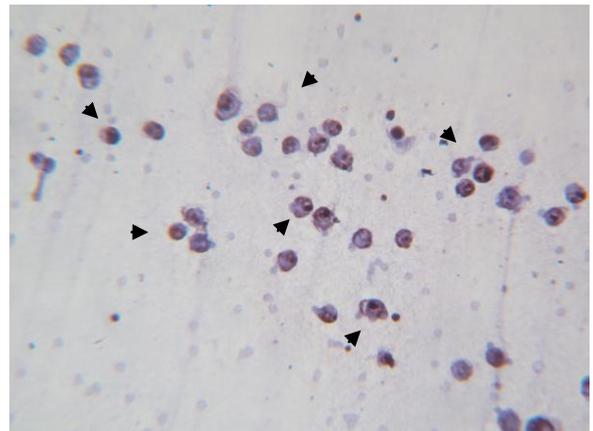


Figura 42. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Inmunohistoquímica. Antígeno Ki-67. Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.4 mg/kg. Flechas: Células con núcleos intensamente positivos. 40X.

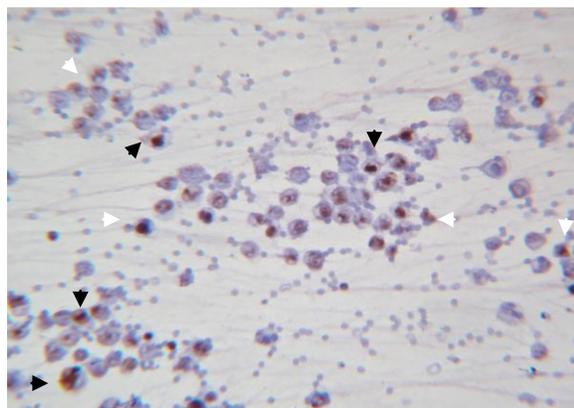


Figura 43. Células de Hepatocarcinoma AS-30D. Inmunohistoquímica. Antígeno Ki-67. Tratamiento con Casiopeína® III-Ea 0.8 mg/kg. Flechas negras: Células con núcleos intensamente o medianamente positivos. Flechas blancas: Células con núcleos ligeramente positivos 40 X