



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

## **Título**

Evaluación antigenotóxica del compuesto LQM 335  
mediante el ensayo de micronúcleos en sangre  
periférica de ratones CD1

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

**Bernabé Oswaldo Hernández Anaya**

ASESORA:

M. EN C. MARITERE DOMINGUEZ ROJAS

DRA. CYNTHIA ORDAZ PICHARDO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO**  
**DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ**  
**Jefa del Departamento de Exámenes**  
**Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Evaluación antígenotóxica del compuesto LQM 335 mediante el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratones CD1

Que presenta el pasante: **Bernabé Oswaldo Hernández Anaya**  
Con número de cuenta: 300139149 obtener el Título de: **Químico Farmacéutico Biólogo**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 11 de noviembre de 2011.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
<b>VOCAL</b>	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>1er SUPLENTE</b>	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
<b>2do SUPLENTE</b>	QFB. Jazmín Flores Monroy	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm

## *Agradecimientos*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por formarme como un profesional que es capaz de retribuir todo lo que le han enseñado...*

*A la vida que me ha dado la oportunidad de disfrutar tantas cosas junto a mis seres queridos...*

*A la profesora Maritere Domínguez Rojas por ser no solo mi asesora de tesis, sino también por ser una amiga, una guía y una gran profesora en mi paso por la universidad, gracias por su paciencia y por darme esta oportunidad...*

*A la Dra. Sandra Díaz Barriga por instruirme y ser una de las personas que más me han enseñado tanto para mi desarrollo profesional como para mi vida diaria, gracias por todos sus consejos...*

*A la profesora Rosalba Bonilla no solo por la dedicación que le dio a la lectura y corrección de este trabajo, sino también por su enseñanza a través de mi vida profesional...*

*A la Dra. Luisa Martínez por los comentarios y las correcciones que ayudaron a enriquecer y mejorar este trabajo...*

*A las profesoras Gabriela Escalante y Jazmín Flores por el tiempo que le dieron a la lectura de esta tesis, para su gran mejora...*

*Gracias a todos espero algún día poder pagarles todo lo que me han dado...*

## Dedicatorias

A mi mamá, por su cariño, sus ánimos, sus regaños, sus consejos, su protección, por darme todo lo que pudiste y más que eso, nunca podré pagarte todo esto que me has dado, lo único que puedo ofrecerte es este triunfo.

A Cristina, bichi hemos pasado tantas cosas juntos y sé que a pesar de lo que pase siempre estarás al pie del cañón para todos, gracias por todo este tiempo y el apoyo que me diste y por la más grande enseñanza que fue la de no importa cuantas veces caigas siempre puedes levantarte. Al pollito que ha sido no solo mi hermano sino también mi amigo, que me apoyó y tomó las riendas en el momento en que era necesario, a pesar de que eres mi hermano menor me has guiado como el mejor de los hermanos mayores. A Edith, gordita han pasado tantas cosas y hemos hecho tantas cosas juntos y ahora que estás esperando al más joven integrante de nuestra familia, no tengo más que pedirte que le enseñes todo lo que aprendí de ti, ya que gracias a esos consejos, pláticas y demás soy lo que ahora, gracias.

Gracias por todas las risas, por estar en los momentos tristes, alegres, en las adversidades, en todo sé que siempre puedo contar con ustedes y que ustedes siempre pueden contar conmigo.

A mi tía Rosa y a mi tío Trino que los considero como mis padres, gracias por todas sus enseñanzas y los momentos que han pasado a mi lado, créanme que todo eso me ha ayudado en los momentos más adversos y a salir adelante.

A mis primos de Laredo, Karina, Meliza, Beto y Trino, yo los considero como mis hermanos y como tales tienen un lugar muy especial en mi vida, gracias.

A mis abuelitos Humberto y Lía que a pesar del poco tiempo que tuvimos juntos, quiero que sepan que todas sus enseñanzas me han servido para mejorar y ser la persona que soy actualmente. A mi tío Gustavo que sé que estarías muy orgulloso de todo lo que he logrado y aunque tuviste que adelantarte tus consejos y momentos que pasamos juntos me han servido de mucho. Los extrañamos tanto....

A mis tías de la Prohogar, Estela, Etel, Fany, Belem, Diana, Violeta, Coco, y claro no me olvidó también de mis tíos Lucio, Avenicio, Ireneo, Pedro, que me han ayudado más de lo que se imaginan.

A mi tía Chabela y mi tío Toño por brindarnos su casa y apoyarnos cuando más lo necesitábamos.

A mis primos Minerva, Magnolia, Paola, Anaid, Marlene, Fabián, Jorge, Albertito, Enrique, Alfonso, Nadia, Julieta, Aída y demás gracias por los momentos que hemos tenido juntos.

A Héctor que ha sido colega, amigo y familiar no solo en la carrera sino en toda mi vida, gracias por todo tú apoyo cuando más lo necesite.

A mis entrañables amigos de la facultad, Raquel, Orquídea y Beto, compartimos tantas cosas desde primer semestre hasta el término de la carrera, todo lo que hicimos juntos siempre serán unos de los mejores recuerdos de mi estancia en la FES, en verdad deseo podamos fortalecer aun mas nuestra amistad.

A Memo, que ha sido mi mejor amigo desde el CCH y del cual he aprendido tantas cosas (tanto buenas como malas), y la especial que aprendí fue: Nunca te rindas...

A mis amigos de la facultad Jesús, Adrian, Abraham, Marco, Uriel, Natalia, Bruno, Karina, Janet, Ana, Almita, Alonso, Paulina, Julio, Guille y demás.

A todos los demás amigos, familiares y conocidos que no pude mencionar les agradezco de corazón su presencia en mi vida.

Por último y no por eso menos importante a Carolina Arias Flores por aparecer en mi vida, tengo tantas cosas que agradecerte, hemos vivido tantas cosas bellas y tenido tantas experiencia, y espero que sigamos escribiendo mas paginas juntos en nuestro libro de vida, se que lo sabes pero no está de más recordarte que eres el amor de mi vida, TE AMO.

Este triunfo no puedo decir que es mío sino de todos ustedes ya que sin ustedes yo no hubiera podido llegar hasta donde estoy...

	Págs.
<b>Índice</b>	
Índice .....	1
Índice de Tablas.....	3
Índice de Figuras .....	4
Índice de Gráficas.....	5
Abreviaturas .....	6
RESUMEN .....	7
1. CÁNCER.....	8
1.1. Epidemiología.....	8
1.2. Generalidades .....	9
1.2.1. Etiología del cáncer .....	9
1.2.2. Prevención y Tratamiento .....	10
1.3. Medicamentos anticancerígenos .....	13
1.4. Fármacos Antihipertensivos con actividad antineoplásica .....	14
1.5. Captopril.....	15
2. Desarrollo de medicamentos .....	16
2.1. Química farmacéutica .....	16
2.2. Etapas .....	17
2.2.1. Descubrimiento .....	17
2.2.2. Estudios pre-clínicos.....	18
2.2.3. Estudios clínicos .....	19
3. Genética toxicológica .....	19
3.1. Usos.....	20
3.2. Batería de pruebas de genotoxicidad.....	20
4.1 Antecedentes Históricos .....	23
4.2- Fundamento de la prueba.....	24
4.3- Ventajas y desventajas.....	25
4.4- Ensayo “In vivo” .....	26
4.4.1- Eritropoyesis .....	27
4.4.2- Parámetros que evalúa .....	29

---

---

	<b>Págs.</b>
4.5- Nuevas pruebas.....	29
Hipótesis.....	32
Objetivo.....	33
Objetivos particulares .....	33
Materiales y Métodos .....	34
Diagrama experimental.....	37
RESULTADOS .....	38
Discusión .....	45
Conclusiones .....	49
Bibliografía .....	50

Índice de Tablas	Págs.
Tabla 1: Estadísticas Vitales. Registro de las defunciones en los últimos 10 años.....	8
Tabla 2: Casos, ventajas y desventajas de los diversos tratamientos.....	11
Tabla 3: Medicamentos no oncológicos, indicación primaria y efectos antitumorales.....	14
Tabla 4: Distribución y administración de los lotes.....	35
Tabla 5: Promedios ( $\chi$ ) de EPC/ENC en 1000 eritrocitos $\pm$ d.e. (desviación estándar) obtenidos a diferentes tiempos y concentraciones en el ensayo de genotoxicidad.....	38
Tabla 6: Promedios ( $\chi$ ) de EPC/ENC en 1000 eritrocitos $\pm$ d.e. (desviación estándar) obtenidos en el ensayo de antigenotoxicidad .....	39
Tabla 7: Promedios ( $\chi$ ) de EPCMN en 1000 eritrocitos $\pm$ d.e. (desviación estándar) obtenidos a diferentes tiempo y concentraciones en el ensayo de genotoxicidad .....	41
Tabla 8: Promedios ( $\chi$ ) de EPCMN en 1000 eritrocitos $\pm$ d.e. (desviación estándar) obtenidos en el ensayo de antigenotoxicidad .....	42

<b>Índice de Figuras</b>	<b>Págs.</b>
Figura 1: Mecanismo de formación de diversas mutaciones.....	10
Figura 2: Fases en el desarrollo de un medicamento.....	17
Figura 3: Ensayo cometa a) in vitro y b) in vivo, e ICH c) in vivo y d) in vitro.....	22
Figura 4: Mecanismo de formación de micronúcleos en médula ósea inducidos por la acción un clastógeno o un aneúgeno.....	24
Figura 5: a) Proceso de eritropoyesis in vivo, b) mecanismo de formación de micronúcleos.....	28
Figura 6: Frotis sanguíneo.....	36
Figura 7: 1) Eritrocito Policromático (EPC), 2) Eritrocito Normocrómico (ENC).....	44
Figura 8: 1) Eritrocito Policromático Micronucleado (EPCMN), 2) Eritrocito Normocrómico (ENC).....	44

<b>Índice de Gráficas</b>	<b>Págs.</b>
Grafica 1: Frecuencia de la relación de EPC/ENC en 1000 eritrocitos en el estudio antígenotóxico del compuesto piperidínico LQM 335 a diferentes concentraciones	39
Grafica 2: Frecuencia de la relación de EPC/ENC en 1000 eritrocitos en el estudio antígenotóxico del compuesto piperidínico LQM 335 a diferentes concentraciones mas la administración de IFF (reto)	40
Grafica 3: Frecuencia de EPCMN encontrados en 1000 EPC en el estudio genotóxico del compuesto piperidínico LQM 335 a diferentes concentraciones	42
Grafica 4: Frecuencia de EPCMN encontrados en 1000 EPC en el estudio antígenotóxico del compuesto piperidínico LQM 335 a diferentes concentraciones mas la administración de IFF(reto)	43

## Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

BrdU: BromodesoxiUridina

CIFF: Ciclofosfamida

CRIOS: Carcinogenic Risk In Occupational Settings (Riesgo carcinogénico en lugares de trabajo)

DMSO: Dimetilsulfóxido

ENC: Eritrocito Normocrómico

EPC: Eritrocito Policromático

EPCMN: Eritrocito Policromático Micronucleado.

FDA: Food and Drug Agency (Agencia reguladora de Alimentos y Drogas)

ICH: International Conference on Harmonization (Conferencia Internacional de Armonización)

IFF: Ifosfamida.

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

IPCS: International Programme on Chemical Safety (Programa internacional de seguridad química)

MN: Micronúcleo

OECD: Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ONU: Organización de las Naciones Unidas.

**RESUMEN**

En los últimos años la investigación de los fármacos antitumorales ha progresado extraordinariamente. La síntesis de nuevos medicamentos ha sido una herramienta de gran importancia para dicho avance, lográndose con esto el desarrollo de nuevos fármacos que constituyen una de las bases para lograr una mayor eficacia en el futuro tratamiento quimioterapéutico.

En el Laboratorio de Química Medicinal se han desarrollado una serie de compuestos orgánicos con diversos fines terapéuticos, todo esto bajo la dirección del Dr. Enrique Angeles Anguiano. Uno de los compuestos sintetizados en dicho laboratorio es el compuesto LQM 335 que presenta actividad hipotensora. Pruebas recientes han demostrado que además muestra actividad citotóxica en líneas celular de cáncer cervico uterino

Para que dicho compuesto siga su camino hacia la comercialización o su posible reutilización como tratamiento alternativo para otras enfermedades es necesario realizar diversos ensayos.

Entre esos ensayos se decidió realizar un estudio genético-toxicológico al compuesto LQM 335, además de observar con esto si dicho compuesto puede presentar un efecto terapéutico alternativo y ser una posible opción como tratamiento anticancerígeno.

Para esto se eligió el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón CD-1 para evaluar dichas actividades. Se probaron 3 dosis (5mg/Kg, 10 mg/Kg y 20 mg/Kg), utilizando como vehículo DMSO (Dimetilsulfoxido) las cuales fueron administradas vía oral, de manera simultánea se retaron las 3 dosis utilizadas con un mutágeno conocido (ifosfamida) para observar la capacidad antigenotóxica del compuesto.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los ratones a las 0 (basal), 24, 48 y 72 horas post-administración, se realizaron frotis con la sangre obtenida, se tiñeron con Giemsa y se fueron observando en el microscopio a diferentes tamaños.

Los resultados que se obtuvieron demostraron que el LQM 335 a las dosis utilizadas no causaron genotoxicidad ni citotoxicidad, ya que no presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto al lote control negativo; en los lotes donde se administró el compuesto más la ifosfamida se demostró que el LQM 335 si muestra actividad antigenotóxica, esto al compararlo con el lote control positivo, mostrando también que a las 72 horas las dosis de 20 mg/Kg muestra actividad citotóxica al alterar la relación de EPC/ENC con respecto del control negativo.

Con los datos obtenidos se concluyó que el compuesto LQM 335 no es genotóxico bajo los estándares de la prueba realizada, además de que si presenta la capacidad de modular el daño genotóxico provisto por la ifosfamida.

## 1. CÁNCER

### 1.1. Epidemiología

El cáncer actualmente es una de las enfermedades con mayor impacto a nivel mundial, según los datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se le atribuyen 7.4 millones de defunciones ocurridas en 2004 posicionándose como una de las principales causas de mortandad en el mundo. Se estima que para el 2030 la tasa de mortalidad llegue a aumentar a 12 millones debida a esta enfermedad (OMS, 2011).

De acuerdo con los datos reportados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en el 2008 se registraron 71 074 defunciones por algún tipo de cáncer de las 539,530 defunciones en general que se reportaron en nuestro país.

En México el INEGI reportó que en el periodo de 1998 al 2008 el número de las defunciones debidas a algún tipo de tumor maligno presentaron un aumento gradual conforme al tiempo.

**Tabla 1: Estadísticas Vitales. Registro de las defunciones en los últimos 10 años. (Fuente INEGI, 2008)**

Año	Número Total de defunciones en general	Defunciones por tumores malignos	Porcentaje (%)
1998	444,665	55,235	12.4
1999	443,950	56,400	12.7
2000	437,667	57,784	13.2
2001	443,127	59,011	13.3
2002	459,687	61,417	13.4
2003	472,140	63,067	13.4
2004	473,417	64,336	13.6
2005	495,240	66,646	13.4
2006	494,471	67,274	13.6
2007	514,420	68,815	13.4
2008	539,530	71,074	13.2

De 1998 al 2008 se observa un incremento paulatino dándose los mayores picos en el 2004 y 2006 aumentando 1.2% con respecto al porcentaje obtenido en 1998. En 10 años se ha tenido un aumento notable de decesos debido a esta enfermedad, pasando de 55,235 muertes por algún tipo de cáncer en el año 1998, a 71,074 muertes registradas a causa de dicha enfermedad en el 2008, convirtiéndolo en uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país.

## 1.2. Generalidades

El cáncer se define como un grupo complejo de enfermedades que se caracterizan por una proliferación irregular de células; este puede resultar progresivamente de diferentes eventos que ocasionan una inestabilidad genética dando como resultado el crecimiento descontrolado, la invasión del tejido y/o a la diseminación a otros órganos dando lugar a la formación de posibles metástasis (Nang, 2001). Los diversos procesos invasivos y metastásicos, aunado a la serie de alteraciones metabólicas que resultan de la enfermedad, pueden llegar a producir la muerte en el paciente.

En los últimos años, la integridad genética de la población humana se ha visto afectada debido a la actividad industrial, que provoca la exposición a diversos agentes químicos (Zalacain, 2005); existen además otros factores que son capaces de afectar la integridad cromosómica como lo son estilo de vida, cambios climáticos, polimorfismos genéticos, tratamientos médicos, entre otros (Dharl, 1996).

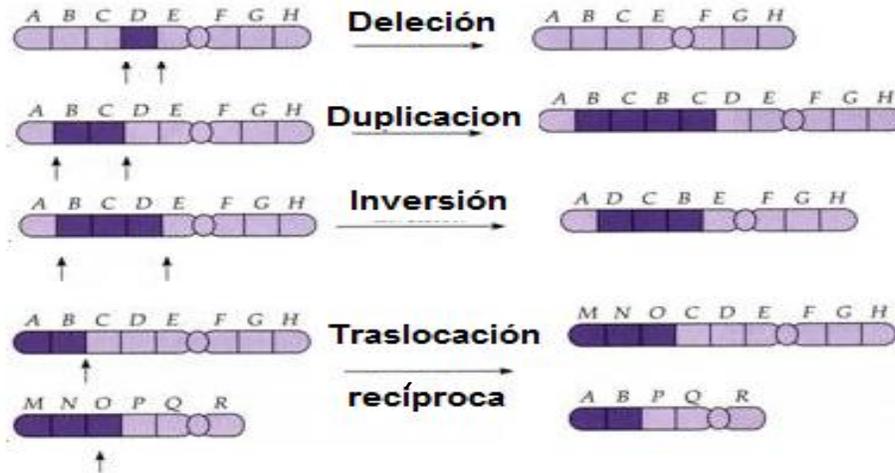
### 1.2.1. Etiología del cáncer

El comportamiento de los diferentes tipos de cáncer está relacionado a múltiples factores como son sexo, edad, raza, predisposición genética y exposición a carcinogénicos ambientales (comida, radiación UV, diversos agentes químicos).

El daño al genoma puede ocurrir en 3 diferentes etapas:

- 1.- En la línea germinal: Cada célula producida tras la meiosis trae algún tipo de mutación.
- 2.- En las células somáticas: Solo la progenie de la célula origen afectada tiene alteraciones.
- 3.- En algún punto intermedio: Un cambio en la célula pluripotencial somática cercana a su diferenciación, afecta a los tejidos que se deriven de éstas (Nang, 2001).

El ADN puede sufrir diversas alteraciones o daños como mutaciones puntuales, deleciones (intersticiales o terminales), inserciones, traslocaciones, inversiones y amplificaciones, las cuales las últimas cuatro son ejemplos de aberraciones cromosómicas estructurales (Figura 1). Muchas de estas alteraciones pueden ocurrir de manera ordenada y secuencial para la iniciación y progresión del cáncer.



**Figura 1: Mecanismo de formación de aberraciones cromosómicas** (disponible en [www.cib.uaem.mx](http://www.cib.uaem.mx))

El origen del cáncer es clonal, es decir una célula del tejido presenta cambios mutacionales a nivel genético que conducen a su inmortalización y transformación, algunos de los agentes que causan dichos cambios son los mutágenos, los cuales aumentan la frecuencia de mutación en los tejidos celulares o en los organismos (ONU, 2005), en la actualidad se han identificado un gran número de agentes que representan un grave peligro para la salud humana. Existen diversas estrategias para atenuar o posiblemente erradicar el problema, uno de ellos es reducir la exposición de los mutágenos como sea posible y el otro es tomar ventaja de los inhibidores de la mutagénesis con el propósito final de su eventual aplicación como agentes quimiopreventivos.

### 1.2.2. Prevención y Tratamiento

El principio terapéutico básico de los tratamientos contra el cáncer es curar al paciente con la menor afectación estructural y funcional posible; la decisión sobre lo radical que deba ser el tratamiento debe considerarse a medida que se reducen las posibilidades de curación (Rubin, 2003).

Las terapéuticas oncológicas actuales (Tabla 2) son multidisciplinarias, con múltiples métodos, solos o combinados, siendo la cirugía el tratamiento que presenta mayor tasa de curaciones (Avances médicos, 2002).

**Tabla 2: Casos, ventajas y desventajas de los diversos tratamientos. (Fuentes: <sup>1</sup>Rubin, 2003; <sup>2</sup>Argiles,1998; <sup>3</sup>Avances Médicos 2002.)**

Tratamiento	Casos	Ventajas	Desventajas
<b>Cirugía</b>	Tumores sólidos o semisólidos localizados y sin extensión a otros tejidos <sup>1</sup> Diagnóstico (biopsia) <sup>3</sup>	Efectos paliativos solucionando complicaciones causadas por tumores dolorosos o compresivos. <sup>3</sup> Extirpación total y definitiva de un tumor localizado y de su drenaje linfático regional <sup>3</sup>	-Localización anatómica del tumor puede impedir la aplicación de la cirugía. <sup>2</sup> -La cirugía depende del estado general del paciente y de su edad. <sup>2</sup>
<b>Radioterapia</b>	Tumores y células tumorales con radiosensibilidad alta o moderada <sup>3</sup> Neoadyuvante( cirugía o quimioterapia) <sup>3</sup> Terapia simultanea (quimioterapia) <sup>1,2,3</sup>	Disminuye los síntomas de los cánceres localmente avanzados e irresecables o de sus metástasis <sup>3</sup> . Evita síntomas inminentes, como hemorragias, obstrucción y perforación <sup>1</sup> .	Diversos efectos secundarios: Reacciones inflamatorias agudas de los órganos irradiados, disfagia, diarrea, disnea <sup>3</sup>
<b>Quimioterapia</b>	Células tumorales, metástasis <sup>2</sup> Neoadyuvante (pre-operatorio) <sup>3</sup> -Terapia simultanea (radioterapia) <sup>1,2,3</sup>	Alta citotoxicidad de células cancerosas <sup>3</sup> Posible eliminación de metástasis subclínicas en el momento del primer tratamiento <sup>3</sup>	Alta citotoxicidad de células normales <sup>1</sup> Inducción de nuevos tumores <sup>2</sup> . Diversos efectos secundarios: Náuseas, vómitos, alopecia, anemia, indefensión frente afecciones, entre otros <sup>2</sup>

Actualmente con los tratamientos que existen se alivia a una tercera parte de los pacientes con medidas locales, esto cuando aún el tumor no ha presentado metástasis durante dicho tratamiento o antes de su diagnóstico (Katzung, 2005). La detección temprana conduce a un posible aumento en el índice de curación en los pacientes tratados, pero cuando se presenta metástasis se necesita de un tratamiento más sistémico como es la quimioterapia, utilizada por lo regular en conjunto con cirugía o radiación, para controlar efectivamente el cáncer.

Los tratamientos quimioterapéuticos actuales son utilizados para curar diferentes tipos de neoplasias que han sufrido algún tipo de engrosamiento o diseminación microscópica, existiendo un aumento considerable de índice de curación cuando la quimioterapia se encuentra combinada con una cirugía al inicio. Desafortunadamente aun hay muchos tipos de cáncer donde el tratamiento de quimioterapia solamente se considera paliativo, causando una mejoría temporal e incrementando en cierta manera la calidad de vida del paciente.

Antes de establecer un tratamiento para el cáncer, se debe establecer el objetivo del tratamiento considerando los siguientes puntos:

- La etapa (extensión) de la enfermedad
- Sitios metastásicos
- Tipo histológico de tumor
- Estado funcional de los órganos vitales
- Estado de nutrición del paciente
- Voluntad de aceptar la toxicidad que pueda conllevar el tratamiento
- Disponibilidad de Instalaciones médicas
- Personal necesario para el tratamiento de cualquier complicación que pueda ocurrir durante el tratamiento (Advani et al., 1994).

Identificar y ampliar las opciones de tratamiento para las personas que padecen esta enfermedad es fundamental para mejorar los resultados y la calidad de vida en el paciente (Winer et al., 2009). En el 2009 la FDA aprobó una serie de medicamentos para tratar diversos tipos de neoplasias (Dalkic, 2010) haciendo importantes avances contra esta enfermedad. Ejemplos de los medicamentos aprobados son:

- Cáncer de seno: Epirubicin, fluoracilo, pamidronato
- Cáncer de riñón: Sunitibib
- Leucemia: Meclorotamina, nilotinib, bendamustina
- Cáncer de pulmón: Nofetumomab, porfirmer, metotrexato
- Cáncer de testículo: Ifosfamida, cisplatino, etopósido
- Cáncer cérvico: Topotecan

Uno de los grandes problemas que atraviesan los tratamientos quimioterapéuticos es la resistencia que presentan algunos tumores a dichos medicamentos. Algunos tipos de tumores muestran una resistencia en la primera exposición a los medicamentos conociéndose como resistencia primaria; mientras que otros tumores pueden adquirir una resistencia a lo largo del tratamiento, lo que se conoce como resistencia adquirida (Katzung, 2005).

Estas manifestaciones representan un impedimento potencial para el éxito del tratamiento de la enfermedad por esta razón en la actualidad se busca desarrollar tratamientos específicos a los diversos tipos de cáncer que existen, proporcionando nuevas opciones de terapias menos tóxicas y con muchos menos efectos secundarios aumentando la efectividad terapéutica de los medicamentos (Nagle et al., 2004).

### **1.3. Medicamentos anticancerígenos**

En las últimas décadas la investigación de fármacos anticancerígenos ha progresado en gran medida conociéndose tanto su espectro de acción como la posibilidad de integrarlos en combinaciones terapéuticas con la cirugía, radioterapia o quimioterapia (Cuevas y Santos, 1985).

El desarrollo de compuestos quimioprotectores efectivos, selectivos y no tóxicos que preferentemente protejan a los tejidos sanos de la toxicidad de la quimioterapia, sin que se evite su acción contra los tejidos que en verdad estén afectados, es el mayor reto en la investigación en el tratamiento contra el cáncer.

Dichos compuestos quimioprotectores podrían proteger potencialmente el daño genético, mutación, alteración al sistema inmune así como efectos teratogénicos que puedan llegar a presentarse (Božica, 2007).

La aprobación de nuevos medicamentos que presentan dicha actividad, otorga diversos beneficios, como el de ampliar las opciones de tratamiento para las personas que presenten esta enfermedad, reducir la recurrencia del cáncer después de haber sido tratado (terapia de mantenimiento), así como evitar que se dé una resistencia al tratamiento cuando la enfermedad este en una etapa muy avanzada (Winer et al., 2009).

Existen diversos estudios que han demostrado que medicamentos que han sido aprobados para el tratamiento de enfermedades no cancerosas y que al reutilizarlos o cambiando su dosis se ha descubierto que poseen características antineoplásicas, siendo ésta una nueva estrategia de desarrollo de medicina alternativa en contra de esta enfermedad. Actualmente más compañías están explorando la farmacopea para evaluar a los posibles candidatos al reposicionamiento (Dueñas, 2008).

#### 1.4. Fármacos Antihipertensivos con actividad antineoplásica

Existen medicamentos con diversos mecanismos de acción que son eficaces para reducir la presión sanguínea (Briones, 2009). La reducción de la presión arterial obtenida con el tratamiento farmacológico ha demostrado que reduce la morbilidad y mortalidad cardiovascular disminuyendo sus complicaciones. En la actualidad se dispone de un número extraordinariamente elevado de fármacos que por mecanismos diferentes en uno u otro caso consiguen un buen control de la presión arterial (Díaz y Tlapalamatl, 2008).

Recientemente se propuso un enfoque en el que los medicamentos ya disponibles son examinados empleando diversos modelos *in vitro* e *in vivo*. El descubrimiento de nuevos usos terapéuticos de medicamentos con una acción farmacológica conocida (como la antihipertensión) mejora la capacidad de diversas entidades para desarrollar diversas opciones de tratamiento para una serie de enfermedades graves (O'Connor y Bryan 2005).

El reposicionamiento normalmente ocurre cuando en un medicamento aprobado se identifica un efecto secundario en los ensayos clínicos y este a su vez proporciona una nueva indicación terapéutica. El proceso de reposición y, en particular en el campo terapéutico del cáncer aún no está sistematizado. Aunque este método puede ser eficaz es parcial y limitada a un solo tipo de droga (Dueñas, 2008).

En la Tabla 3 se muestran ejemplos de medicamentos que presentan una actividad farmacológica sobre el corazón y que se ha descubierto que tienen un efecto potencial en contra del cáncer.

**Tabla 3: Medicamentos no oncológicos, indicación primaria y efectos antitumorales (Dueñas, 2008)**

Medicamento	Indicación primaria	Efecto en sitio de acción	Efectos antitumorales en sitio de acción	Efectos antitumorales fuera del sitio de acción
Verapamilo	Antihipertensivo, antiarrítmico, angina de pecho	Desacelera el flujo de calcio a las células del músculo liso (Antagonista de Canales de Ca <sup>+2</sup> tipo-L)	Inhibición del crecimiento por la interferencia de la acción en la proteína-kinasa C, la calmodulina, y la fosfodiesterasa. Aumenta la citotoxicidad cuando se añade a la quimioterapia.	Bloqueo de Voltaje en canales de K <sup>+</sup>
Hidralazina	Hipertensión	Desconocido	-----	Metilación del DNA

Nitroglicerina	Enfermedades coronarias	Vasodilatador y relajante del musculo liso(GMP)	Hipoxia en las células tumorales	-----
Digitalis	Falla cardiaca	Inhibe el transporte activo del sodio y potasio (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa)	Puede inhibir el crecimiento celular e inducir apoptosis en células cancerosas.	Inhibición de glicolisis

Diversas oportunidades y estrategias para la identificación de nuevos productos basados en los existentes en la farmacopea, están siendo impulsadas por diversos factores de este ámbito y utilizando los recursos adecuados se obtendrán resultados favorables con los medicamentos existentes (Carley, 2005). La estrategia general de investigar las nuevas propiedades terapéuticas que pueda presentar un medicamento, conlleva a una situación con grandes beneficios para los sectores público y privado, y lo más importante para los pacientes.

### 1.5. Captopril

El captopril es un medicamento utilizado en el tratamiento de la hipertensión arterial ya que inhibe la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), provocando una vasodilatación en los diferentes tejidos permitiendo una redistribución de los flujos locales (Díaz y Tlapalamatl, 2008).

Diversos ensayos han demostrado que el captopril presenta la capacidad de modular el daño genético. En el 2005 Hosseinimehr publicó un trabajo en donde se evaluó el efecto quimiopreventivo del captopril contra el efecto genotóxico inducido por la Ciclofosfamida (ciff) en células de médula ósea de ratón, esto mediante la técnica de micronúcleos in vivo, ellos concluyen que el efecto quimiopreventivo se puede deber a la acción de los iones sulfhidrilo que contiene el captopril y que tienen una acción antioxidante.

Hosseinimehr y colaboradores en el 2007 evaluaron nuevamente el efecto antígenotóxico del captopril utilizando esta vez radiaciones gama como agente precursor de genotoxicidad, concluyendo que su efecto antígenotóxico es debido a que reduce la peroxidación de los lípidos inducido por el peróxido de hidrógeno en el hígado del ratón.

## 2. DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

Los fármacos pueden ser considerados como el descubrimiento más importante del siglo XX y su descubrimiento se encuentra conectado estrechamente con el desarrollo de las ciencias experimentales (Avendaño, 2001) y gracias a los avances en los métodos de síntesis, técnicas instrumentales, así como el desarrollo de nuevas ciencias (como es la biología molecular) se ha tenido una idea más clara de la estructura de los receptores y en algunos casos la relación que existe entre la estructura del fármaco y su actividad biológica.

El proceso de investigación y desarrollo de un medicamento es largo y complejo, involucra grandes costos y pocas posibilidades de éxito. De las muchas moléculas identificadas y ensayadas muy pocas llegan a comercializarse. La complejidad del proceso es manejada por una diversidad de disciplinas científicas que incluye químicos orgánicos, biólogos moleculares, toxicólogos, bioquímicos, farmacólogos y científicos de la computación (Marovac, 2001)

Actualmente se dispone de una gran cantidad de terapias que se han desarrollado de un pequeño número de prototipos (cabezas de serie), los cuales a través de su búsqueda, diseño así como de sus modificaciones se ha permitido sintetizar compuestos más eficaces y con menos efectos secundarios.

### 2.1. Química farmacéutica

La química farmacéutica es una disciplina que tiene como objetivo el desarrollo de nuevas sustancias utilizables por la medicina para el tratamiento adecuado de diversas enfermedades, dicha disciplina presenta una serie de pasos que se requieren para desarrollar un fármaco, pasando por el aislamiento, caracterización, síntesis y posterior evaluación biológica de los compuestos que presenten químicamente actividad farmacológica potencial (Galbis, 2004).

La misión del químico farmacéutico es descubrir nuevos fármacos mediante el diseño, la síntesis y desarrollo de medicamentos que tengan como finalidad la curación y/o prevención de las enfermedades ya sea de humanos o de animales (Galbis, 2004); sin olvidar también el estudio de los fármacos que existen actualmente tanto en sus propiedades biológicas así como la relación estructura-actividad que presenten en los seres vivos.

Para que un determinado principio activo pueda comercializarse como medicamento debe de pasar por una serie de rigurosas pruebas de tipo analítico (composición química, pureza, densidad, etc.) y fármaco-toxicológicos (actividad, efectos colaterales, actividad carcinogénica y teratogénica, entre otros).

## 2.2. Etapas

El proceso que abarca el desarrollo de un medicamento va desde su descubrimiento hasta su comercialización (Figura 2). Todo medicamento tiene que demostrar que es seguro y eficaz, teniendo beneficios superiores a los riesgos que puedan presentar, esto antes de que sea aprobado.



Figura 2. Fases en el desarrollo de un medicamento (Tamimi y Ellis, 2009)

### 2.2.1. Descubrimiento

Esta etapa consiste en la identificación, aislamiento y caracterización de una nueva sustancia con actividad biológica que se suele denominar cabeza de serie (Galbis, 2004). Diversos modelos se han encontrado como consecuencia del estudio de la actividad biológica de productos naturales en organismos vivos, del descubrimiento accidental de una actividad en compuestos de síntesis, del descubrimiento de efectos inesperados en la aplicación terapéutica de fármacos conocidos (Avendaño, 2001).

### 2.2.2. Estudios pre-clínicos

Los estudios pre-clínicos se realizan en animales y modelos fisiológicos en el laboratorio, analizando las propiedades físico-químicas y el comportamiento del compuesto *in vivo* e *in vitro*. Las moléculas ensayadas en esta fase evalúan diferentes propiedades como es la estabilidad, niveles plasmáticos, tisulares y propiedades farmacocinéticas (Marovac, 2001).

Durante esta fase se realizan ensayos toxicológicos, genotóxicos (ver cap. 3; pag 19) carcinogénicos y teratogénicas al fármaco a través de pruebas *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio.

Las pruebas más comunes utilizadas *in vitro* que son utilizadas en los estudios de rutina a un compuesto determinado son el ensayo de mutación de genes en bacterias y el ensayo de daño cromosómico en cultivos celulares de roedores. Por parte de las pruebas *in vivo* el daño cromosómico es medido en células de médula ósea de ratones o ratas con la prueba de micronúcleos.

Los resultados de las pruebas genotoxicológicas en combinación con los datos obtenidos de la toxicidad aguda y subcrónica en animales se utilizan como base para aprobar los ensayos pre-clínicos de fármacos candidatos identificando rápidamente a los mutágenos y sacarlos del proyecto de desarrollo (Custer y Sweder, 2008).

Por lo general la FDA (Agencia reguladora de Alimentos y Medicamentos) pide como mínimo que el fármaco en las pruebas pre-clínicas cumpla con lo siguiente (Quiminet, 2006):

- 1.-Presentacion de un perfil farmacológico.
- 2.-Determinación de la toxicidad aguda del fármaco, en al menos en dos especies distintas de animales.
- 3.- Realización de estudios de toxicidad a corto plazo

Una vez que todas las pruebas pre-clínicas hechas al compuesto hayan cumplido con los criterios mínimos de selección, éste es nominado para su progresión a las evaluación clínica (Tamimi y Ellis, 2009).

### 2.2.3. Estudios clínicos

Las fases clínicas en el desarrollo de medicamentos son (Marovac, 2001):

**Fase I:** Se evalúa la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y farmacodinamia del compuesto administrado en voluntarios sanos; en esta etapa también se definen las rutas de administración (vía oral, intravenosa, intramuscular, etc.). Generalmente son realizados en hospitales o unidades de investigación especializadas

**Fase II:** En esta etapa se utilizan voluntarios que presenten la enfermedad para:

- Observar la eficacia del medicamento a través de la relación dosis-respuesta
- Definir la dosis mínima efectiva y la dosis máxima tolerada
- Determinar los efectos adversos

**Fase III:** Los estudios en esta fase se realizan en una población más general y están diseñados para recolectar evidencia adicional sobre efectividad en indicaciones específicas y con una definición más precisa de los efectos adversos que llegase a presentar el medicamento evaluando su potencial riesgo-beneficio. Sólo 2 de cada 3 compuestos aprueban esta fase final.

Existe una cuarta fase donde la evaluación de la seguridad del nuevo medicamento va mas allá de la aprobación inicial, ya que el fármaco debe de seguir un monitoreo post-comercialización para registrar posibles efectos adversos (Tamimi y Ellis, 2009), interacciones medicamentosas, los derivados de usos prolongados y los factores de riesgo adicionales no conocidos.

## 3. GENÉTICA TOXICOLÓGICA

La genética toxicológica es el estudio de las sustancias que puede causar algún daño al ADN y a los cromosomas de las células. Este daño es usualmente medido como mutaciones, aberraciones cromosómicas o interferencias con la reparación de daños (Barow y Malkin, 1992). La evaluación de seguridad de sustancias con respecto a su genotoxicidad, son generalmente basados en la combinación de pruebas que se utilizan para evaluar los daños que pueda causar en el material genético y puede ser medido directamente ó mediante pruebas *in vitro* o *in vivo*.

Los estudios de la genética toxicológica han dado lugar a una batería de pruebas diseñadas para identificar los químicos mutagénicos y caracterizar sus efectos sobre los mecanismos genéticos y el consiguiente riesgo para los organismos (Palajda, 1985). Esto se logra a través de la inducción de mutaciones en las células germinales que puedan afectar la reproducción o que resulte en enfermedades genéticas en futuras generaciones y en el papel que juegan las mutaciones en las células somáticas en la iniciación y progresión del cáncer (Barow y Malkin, 1994).

Actualmente existen un número extenso de pruebas *in vitro* e *in vivo* que han sido desarrolladas con el fin de estudiar los efectos que los compuestos y las radiaciones puedan presentar sobre el ADN y los cromosomas.

### 3.1. Usos

Los ensayos de genética toxicológica son utilizados para:

- Monitorear agentes que puedan desarrollar un potencial carcinogénico.
- Dar prioridad a los agentes que necesiten pruebas adicionales.
- Caracterizar el espectro de efectos genéticos que se pueden producir por compuestos específicos.
- Ayudar en la interpretación de los resultados de las pruebas para toxicidad y carcinogenicidad (Barow y Malkin, 1994).

Los estudios de genética toxicológica son usados rutinariamente como ensayos toxicológicos iniciales en el desarrollo de medicamentos.

### 3.2. Batería de pruebas de genotoxicidad

La batería de pruebas generalmente incluye lo siguiente (Eastmond et al., 2009):

- a) Prueba de mutaciones génica en bacterias (ensayo de mutación bacteriana inversa [AMES]): la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD) recomienda el uso de al menos cinco cepas de bacterias:
  - a. *Salmonella typhimurium* TA1535.
  - b. *S. typhimurium* TA1537 o TA97 o TA97a.
  - c. *S. typhimurium* TA98.
  - d. *S. typhimurium* TA100.
  - e. *Escherichia coli* WP2 o *E. coli* WP2uvrA o *S. typhimurium* TA102.

- b) Ensayos *in vitro* en mamíferos e *in vivo*: Los ensayos *in vitro* se utilizan para evaluar el potencial de una sustancia de inducir puntos de mutaciones, clastogenicidad, aneugenicidad, mediante la utilización de líneas celulares de mamíferos o en cultivos celulares de humanos como los fibroblastos o linfocitos; en cambio los ensayos *in vivo* son usados para la evaluar de dosis respuesta, diferencias entre especies o en la determinación del modo de acción.

Las pruebas más utilizadas para los ensayos de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* son el ensayo cometa, el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y el ensayo de micronúcleos.

**Ensayo Cometa:** Consiste en el análisis de células individuales que son lisadas y se someten a una electroforesis, para así lograr que los fragmentos de cromosomas corran hacia el ánodo y se revelen como la cola de un cometa (Ferreiro et al., 2001).

**Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH):** Prueba en la que se determina la frecuencia de intercambios que puede ocurrir entre cromátidas hermanas debido a alguna ruptura de las cadenas de ADN por acción de algún mutágeno, seguida por un intercambio de ADN dúplex completo (CRIOS, 2008). Para su identificación se utiliza una tinción diferencial con 5-BrdU que permite al investigador distinguir los intercambios producidos en ambas cromátidas.

**Micronúcleos:** Ver cap.4; pág 23.

El uso de cada una de estas pruebas debe evaluarse con base a los riesgos que puedan presentarse, la elección de las pruebas *in vivo* deben estar guiadas por el espectro de eventos genotóxicos observados en los estudios *in vitro* así como con el conocimiento de la biodisponibilidad, distribución, metabolismo y órgano blanco específico de la sustancia que se esté evaluando (Eastmond et al., 2009).

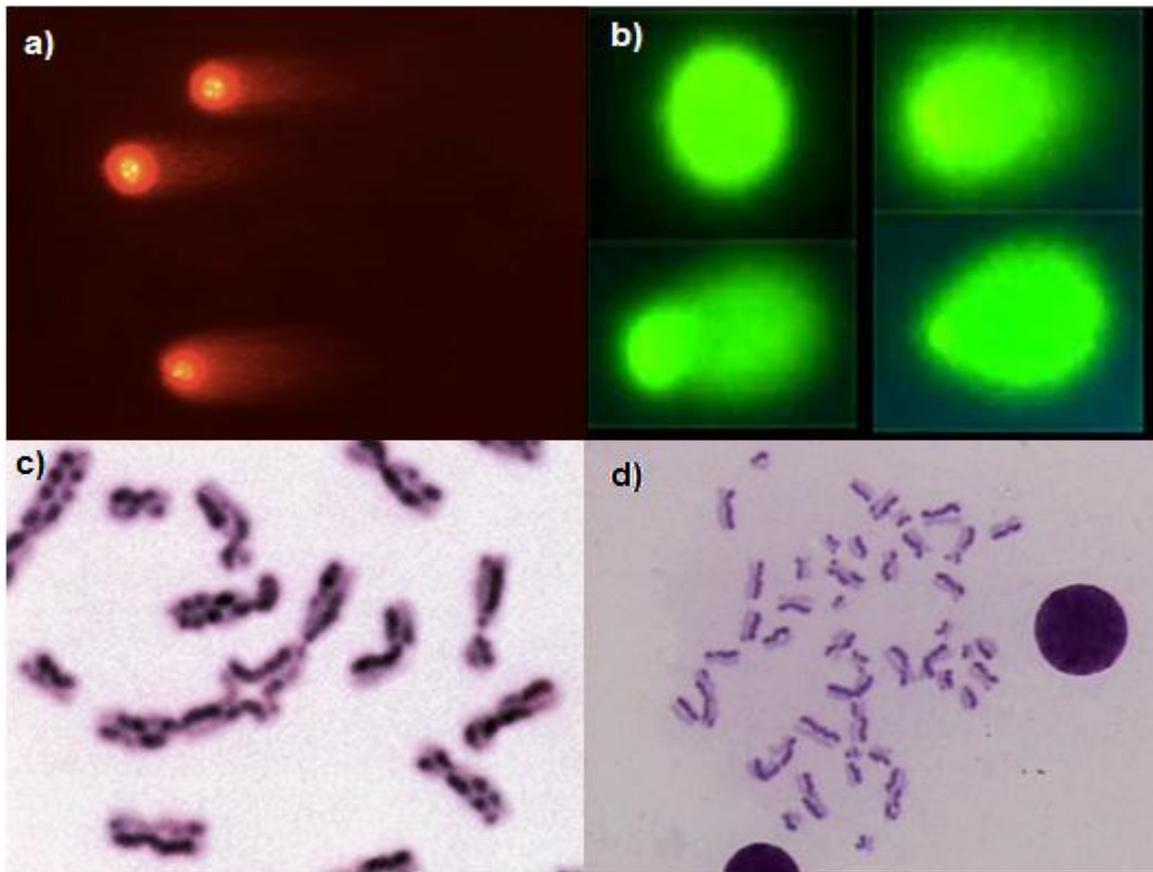


Figura 3: Ensayo cometa a) *in vitro*<sup>1</sup> y b) *in vivo*<sup>2</sup>, e ICH c) *in vivo*<sup>3</sup> y d) *in vitro*<sup>4</sup> ( <sup>1</sup>NPG, 2010; <sup>2</sup>Custer, 2008; <sup>3</sup>Colegio de Medicina de Chicago, 2011 ; <sup>4</sup>Laboratorio-521, FES-Cuautitlán, 2010)

#### 4.- Micronúcleos

Los Micronúcleos (MN) son pequeños cuerpos de cromatina que aparecen en el citoplasma por la condensación de fragmentos de cromosomas acéntricos que se forman a partir de una ruptura o por cromosomas completos que han sufrido un rezago anafásico durante la división celular (Zaizuhana, 2006 y Domínguez, 2005). En hematología son conocidos como cuerpos de Howe-Jolly y no se deben confundir con órganos de Heinz ó Heinz Erlich que son resultado de la lesión oxidativa y la precipitación de la hemoglobina (Gopala y Krishna, 2000). La formación de micronúcleos puede ocurrir en cualquier célula en división, obtenidas de tejidos de diversos organismos tales como mamíferos, plantas, ranas, aves y peces según sea el objeto del estudio (Ahmad y Saleh, 2010).

##### 4.1 Antecedentes Históricos

Los micronúcleos asociados a algún tipo de daño cromosómico fueron observados hace muchos años, mencionándose con frecuencia en los primeros estudios realizados a la radiación. En 1959 Evans y colaboradores utilizaron la frecuencia de micronúcleos en células de *Vicia faba* para medir el daño citogenético provocado por neutrones rápidos y rayos gama en presencia y ausencia de oxígeno.

Schroeder entre 1966-1970 recomendó el uso de frotis provenientes de la medulas ósea para detectar daños *in vivo* causados por mutágenos químicos; demostrando la aparición de micronúcleos en las células de dicho tejido causadas por algún daño citogenético.

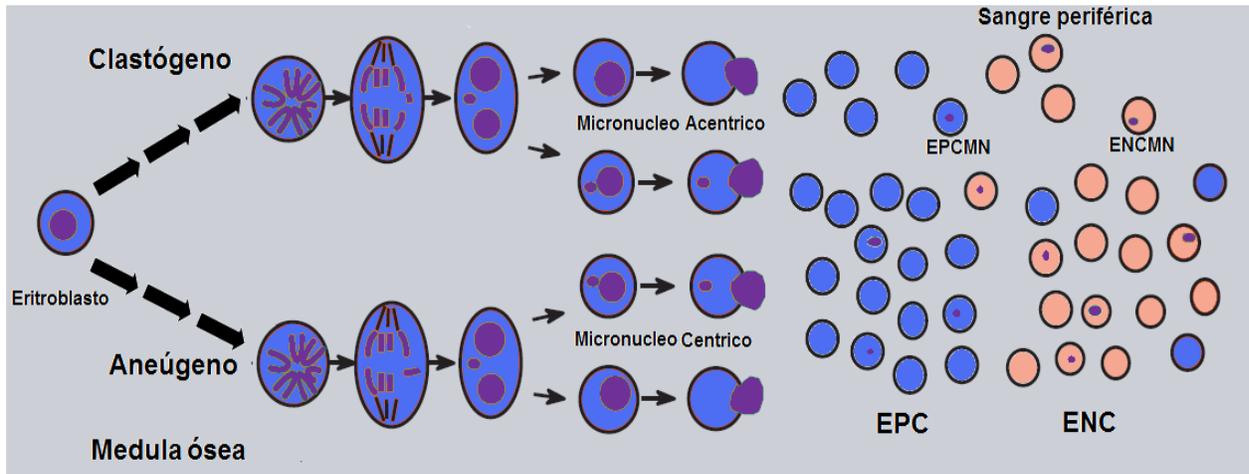
Alrededor de 1970 Schmid, Heddle y diversos colaboradores realizaron una serie de ensayos que se utilizarían para definir los parámetros que servirían como indicadores del daño citogenético producido en la médula ósea *in vivo* (Heddle et al., 1983); demostrando con esto que la incidencia de Eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) provenientes de la médula ósea era un índice muy útil para evaluar el daño en los cromosomas. Gracias a esto se condujo al desarrollo del ensayo de MN *in vivo* basado en la identificación de EPCMN de la médula ósea del ratón.

En la actualidad diversas instituciones encargadas de supervisar a los agentes que pueden causar un daño cromosómico potencial, han establecido la prueba de micronúcleos *in vivo* como uno de los ensayos en la batería de pruebas de la genética toxicológica (Tweats et al., 2007) ya que su uso sirve para observar y evaluar el posible daño genético que pueda provocar algún compuesto.

## 4.2- Fundamento de la prueba

La prueba se basa en la formación de fragmentos de cromatina ocasionados por la acción de un agente, ya sea por la ruptura de cromosomas o por alguna disfunción en la maquinaria mitótica que ocasiona que los cromosomas no migren hacia los polos y no se incorporen al núcleo de la célula durante la división (Figura 4), dando como resultado la formación de uno o más núcleos pequeños en el citoplasma de las células hijas (Miller, 1973).

La utilización de dicho ensayo nos ayuda a evaluar el riesgo de genotoxicidad, permitiendo considerar los factores del metabolismo *in vivo*, farmacocinética y los procesos de reparación de ADN, siendo de utilidad también en la investigación de más de un efecto mutagénico detectado por una prueba *in vitro* de genotoxicidad.



**Figura 4. Mecanismo de formación de micronúcleos en medula ósea inducidos por la acción de un clastógeno o un aneúgeno (Hayashi, 2005).**

Los EPC son células que recientemente han sido objeto de mitosis y síntesis de ADN son un poco mayores que los eritrocitos normocromicos (ENC) y proceden de normoblastos que pierden su núcleo antes que la hemoglobinización del protoplasma sea completa.

Por lo tanto, es fácil distinguir por el color y tamaño de otras células contenidas en la laminilla (Figura 7). Estas características son importantes para establecer los incrementos y la incidencia de micronúcleos que resulten del daño provocado ocurrido durante el tiempo de tratamiento.

Para que las células puedan ser teñidas claramente se deben someter a una tinción supravital o extenderse en un frotis para después teñirse. Existen colorantes específicos con el material genético (naranja de acridina o Hoechst 33258 más pironina-Y) que presentan la ventaja de poder eliminar los artefactos que pueden aparecer cuando se utilizan colorantes no específicos con el ADN, esta ventaja no se opone al uso de colorantes usados convencionalmente (Giemsa, por ejemplo). La coloración azulada que presentan estas células al teñirse es debida a la presencia de ARN en el momento de su diapédesis hacia la circulación y por la falta de aproximadamente 20% del contenido final de hemoglobina, por lo que aún conservan parte del aparato ribosómico para terminar la síntesis y constituir de esta manera una célula madura (Domínguez, 2005).

Los EPC al madurar pierden su ARN transformándose eritrocitos maduros (Eritrocitos Normocrómicos) los cuales al teñirlos con Giemsa presentan un color naranja-rosado debido a la acidofilia que presenta.

#### **4.3- Ventajas y desventajas**

El incremento en el uso del ensayo de MN a través del tiempo se debe principalmente a las ventajas que proporciona siendo las principales, la rapidez y simplicidad; sin embargo existen otras ventajas que cabe destacar. Los micronúcleos se pueden observar durante todo el ciclo celular y el número de células utilizadas puede ser ilimitado; el parámetro que se está midiendo es fácilmente reconocible e incluso por personal que tenga poca experiencia en este ensayo; no se necesita un cariotipo favorable; los MN formados durante la división celular persisten durante la próxima interfase, conduciendo a que el tiempo de muestreo sea menos crítico; no se necesita usar otro agente químico que no sea el que está siendo sometido a prueba, y el número de micronúcleos que se pueda generar espontáneamente es bajo y relativamente uniforme entre las especies

La principal limitación en el uso de dicha prueba es que no se pueden identificar los agentes que causan aberraciones cromosómicas debido a que implican una reorganización (como una traslocación o una inversión) en las cuales no se ha reportado que exista un rezago anafásico ó rupturas en los cromosomas, por lo tanto no presentan un fragmento cromosómico que pueda ser detectado.

#### 4.4- Ensayo *in vivo*

El ensayo de micronúcleos *in vivo* está considerado como un ensayo práctico y útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos.

La médula ósea y la sangre periférica se utilizan rutinariamente en esta prueba, ya que se ha demostrado que los eritrocitos policromáticos (EPC) que se pueden obtener de estos tejidos muestran una sensibilidad adecuada para detectar agentes que provocan daños cromosómicos, además son muy abundantes, fácilmente reconocibles y su incidencia de MN es baja (OECD, 1997; y Heddle et al., 1983)

Se recomienda el uso de ratas o ratones si se utiliza médula ósea y cuando se emplea sangre periférica los ratones son altamente aconsejable, aunque se puede utilizar cualquier otra especie en la que se haya demostrado la incapacidad del bazo para eliminar los eritrocitos policromáticos micronucleados (OECD, 1997).

Si se utiliza médula ósea se sacrifican los animales. Se extrae la médula ósea de la tibia o el fémur se preparan y se tiñe de acuerdo a los convenios, si se utiliza sangre periférica se toma la muestra de la vena caudal o de cualquier otro vaso (Domínguez, 2005).

Este ensayo puede efectuarse de dos maneras cuando la muestra es de sangre periférica: se toma a dos diferentes tiempos a las 48 y 72 h después de la única administración (ensayo agudo), ó se toma una muestra entre las 36 y 48 h posteriores a la última de las 2 o más dosis administradas (ensayo crónico) (Hayashi et al., 1994). Durante el tratamiento crónico los MN inducidos en los ENC se acumulan en niveles significativos en la sangre periférica de estos ratones.

En los ratones los EPC que contienen MN (Figura 8) aparecen por primera vez en la sangre periférica alrededor de 24 h después de su aparición en la médula ósea. Debido a esto el ensayo agudo de un tratamiento químico se puede realizar utilizando EPC de sangre periférica, así como de médula ósea (Mavournin et al., 1990).

#### 4.4.1- Eritropoyesis

En los ratones adultos la médula ósea y el bazo son órganos hematopoyéticos, en los cuales se encuentran las células madre encargadas de la eritropoyesis para la formación y maduración de los eritrocitos.

Durante la proliferación, los proeritroblastos localizados en los órganos hematopoyéticos se comienzan a diferenciar dando lugar a eritroblastos, los cuales se comienzan a dividir. En la etapa de división un agente de prueba administrado puede causar daños a los cromosomas, ya sea actuando como un clastógeno causando una ruptura en los cromosomas o como un aneúgeno interfiriendo en la maquinaria necesaria para la disyunción dando como resultado un rezago anafásico (Figura 5).

En el proceso de maduración el eritroblasto se transforma en un eritrocito joven (EPC) donde su núcleo principal es expulsado (aproximadamente 6 h), teniendo como característica rastros ARN. Los EPC con el tiempo pierden el ARN transformándose en eritrocitos maduros (ENC). Más tarde los ENC se mueven al compartimiento de la sangre periférica a través de la diapédesis, donde persisten en circulación alrededor de un mes. Debido a que la eritropoyesis es un proceso que está en constante producción, hay una progresión continua de eritroblastos que pasan a EPC terminando en ENC (Mavorunin et al., 1990).

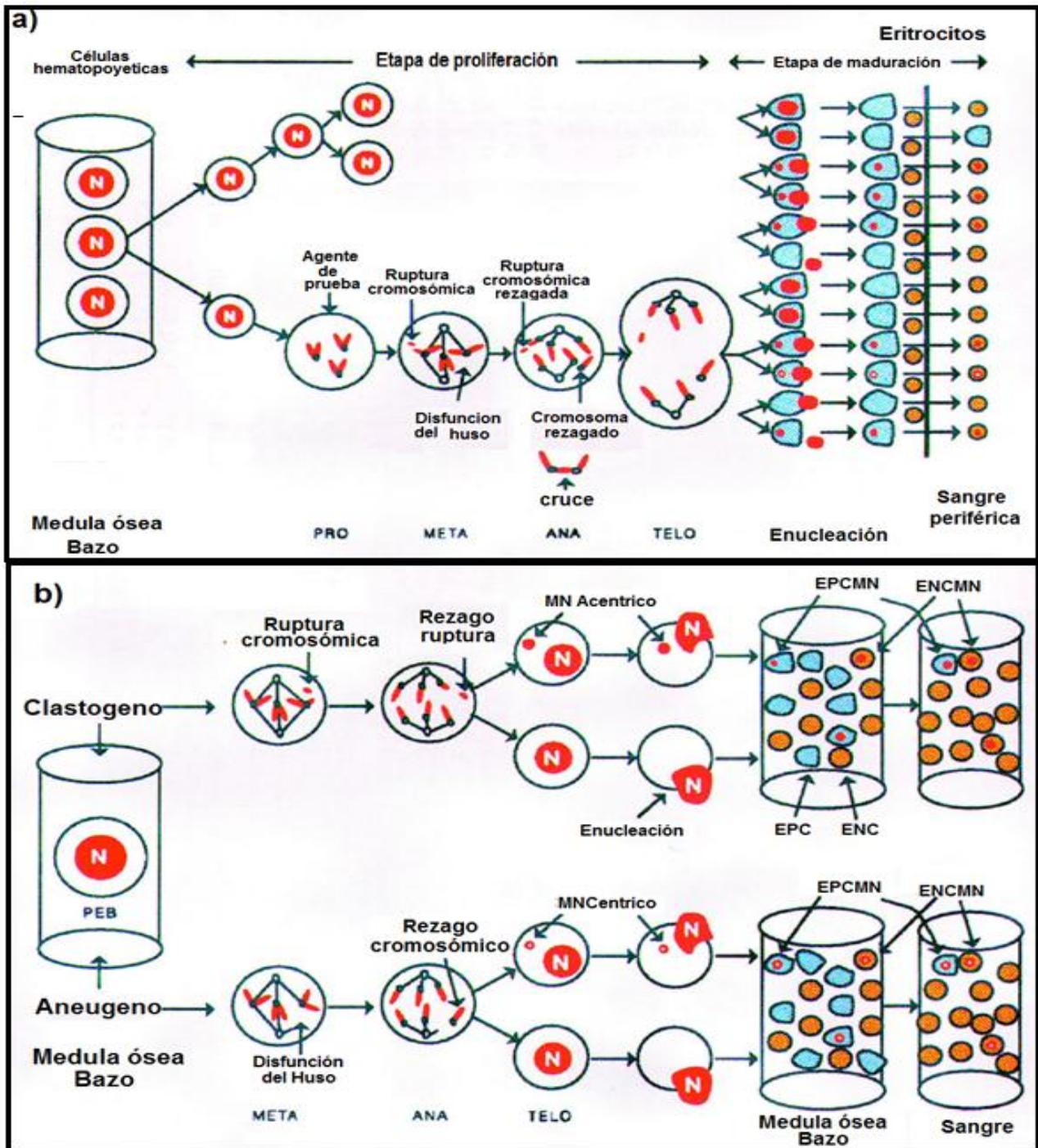


Figura 5. a) Proceso de eritropoyesis in vivo, b) mecanismo de formación de micronúcleos. (Gopala y Makoto, 2000).

#### **4.4.2- Parámetros que evalúa**

La frecuencia de eritrocitos inmaduros micronucleados (EPCMN) constituye el principal punto de referencia para determinar la genotoxicidad y la proporción de EPC es tomado para observar la citotoxicidad el cual ayuda a demostrar el objetivo al cual está expuesta la célula durante la exposición al químico en la prueba (Gopala y Makoto, 2000).

Para determinar la genotoxicidad se establece la cantidad de eritrocitos inmaduros micronucleados en un mínimo de 2000 eritrocitos inmaduros por animal (Dominguez, 2005). Cuando se están analizando las laminillas, se debe tomar en cuenta que la proporción de EPCMN con respecto al total de eritrocitos no debe ser menor al 20% del valor del control. La respuesta a la prueba puede ser considerada positiva si la frecuencia de eritrocitos micronucleados en cualquier tratamiento muestra incrementos estadísticamente significativos (Hayashi et al., 1994).

Para evaluar la citotoxicidad se debe de obtener el porcentaje de EPC con respecto al total de eritrocitos contados (ENC), se debe contabilizar como mínimo 1000 eritrocitos por animal, esto en el ensayo realizado en sangre periférica y no menos de 200 eritrocitos por animal en el caso de médula ósea.

Los eritrocitos maduros (ENC) se consideran una población aceptable para ser analizadas cuando la exposición al agente sea de una duración superior a las 4 semanas, que es aproximadamente la duración de vida del eritrocito (Mavournin, 1990).

#### **4.5- Nuevas pruebas**

En los años siguientes se han propuesto una serie de modificaciones para mejorar dicho ensayo obteniendo una alta eficiencia en la detección de MN. Dichas mejoras incluyen la automatización del proceso de detección (citometría de flujo), la evaluación de la técnica en diversos tejidos y la utilización en conjunto con otras pruebas (ensayo cometa) para obtener resultados más confiables.

- **Citometría de flujo**

La citometría de flujo es un método que es capaz de distinguir entre varias poblaciones celulares diferentes, ofreciendo información simultánea de varios parámetros de cada una de las células analizadas; su fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de laser focalizado (Cytognos, 2001).

Recientemente los métodos de citometría de flujo se han desarrollado para marcar eritrocitos micronucleados (Kissling et al., 2007) elevando el número de células evaluadas hasta 10,000 eritrocitos totales y las proporciones de EPC, ENC, EPCMN y ENCMN puede ser cuantificada dependiendo del propósito de el estudio.

La automatización de métodos para la detección de alteraciones genéticas a través del análisis de un gran número de células relevantes, aumenta la sensibilidad de la prueba además de proporcionar información adicional conllevando con esto a la mejora del ensayo.

- **Diversos Tejidos**

El ensayo de MN en células de sangre periférica o médula ósea, es bastante simple y altamente sensible, sin embargo esta sensibilidad se puede ver limitada por la capacidad que presente el agente de prueba para alcanzar el tejido diana. Debido a esto se ha desarrollado una serie de ensayos de micronúcleos utilizando tejidos diferentes a los antes mencionados (Hayashi et al, 2000):

\*Hígado

\*Espermátides

\*Piel

\*Pulmón

\*Bazo

\*Epitelio del colon

- **Ensayo cometa**

Existen recientes modificaciones a las normatividades que siguen las pruebas de genotoxicidad, proponiendo el uso de 2 pruebas *in vivo* como es el ensayo de MN en conjunto con el ensayo cometa como complementario de una prueba positiva.

La combinación de la prueba de micronúcleos en conjunto con el ensayo cometa, tendería mejorar las capacidad para detectar el potencial genotóxico que presente una sustancia sin la necesidad de requerir animales adicionales.

La ventaja de la utilización de estos 2 ensayos es que se pueden utilizar tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo*, gracias a esta flexibilidad, el ensayo cometa *in vivo* puede ser incorporado o añadido dentro de las baterías de pruebas para proveer datos de blancos de órganos sin el gasto adicional de tiempo y recursos requeridos por un estudio independiente (Vasquez, 2010).

## **Hipótesis**

Sí el compuesto LQM 335 presenta propiedades antígenotóxicas, es decir evita que ocurran daños en el material genético causados por una ruptura a nivel cromosómico o por la acción de un aneúgeno, entonces se observará una disminución de la formación de micronúcleos previamente inducidos por la acción de un mutágeno conocido (ifosfamida), en eritrocitos de sangre periférica de ratones CD1.

## Objetivo

Evaluar la actividad antigenotóxica del compuesto piperidínico LQM 335, mediante el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica en ratones machos CD1.

## Objetivos particulares

- Determinar la actividad genotóxica que presenta el compuesto LQM 335 a diferentes dosis (5, 10 y 20 mg/kg), usando el ensayo de micronúcleos en ratones machos CD1, para determinar la frecuencia de EPCMN.
- Determinar si el compuesto LQM 335 posee una capacidad antigenotóxica mediante el ensayo de micronúcleos *in vivo*, retándolo con un mutágeno conocido como la ifosfamida, para su posible uso como anticancerígeno.
- Administrar diferentes dosis del compuesto LQM 335 a ratones para observar la capacidad citotóxica mediante el conteo de 1000 EPC determinando con esto la relación de EPC/ENC.

**Materiales y Métodos**

Balanza para animales

Portaobjetos

Bebederos

Jaulas

Microscopio óptico

Contador de piano

Vasos coplin

Pinzas

Balanza digital

Vasos de pp

Espátula

Jeringas

**Reactivos**

Compuesto LQM 335

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Ifosfamida (IFF)

Metanol absoluto

Giemsa

Etanol al 70%

Amortiguador de fosfatos (pH=6.8)

Aceite de inmersión

Agua destilada neutra

### Material biológico

El ensayo se realizó con ratones macho de la cepa CD1 de un peso aproximado de 25±5gr donados por el bioterio de la FES Iztacala, los cuales tuvieron acceso libre a agua y alimento durante todo el ensayo.

### Preparación del compuesto

El compuesto LQM 335 empleado en este ensayo fue diseñado, sintetizado y proporcionado por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano jefe del laboratorio de química medicinal de la FES-Cuautitlán C-1.

El compuesto se presenta en forma de cristales blanquecinos los cuales fueron disueltos en un volumen de 0.4 ml de DMSO (el cual se utilizó como vehículo para su administración).

### Pesado, marcaje y distribución

Los ratones macho cepa CD1 se pesaron, marcaron y se distribuyeron en 9 lotes de 4 ratones cada uno y el tratamiento correspondiente a cada lote fue el siguiente de acuerdo a la tabla 4.

**Tabla 4: Distribución y administración de los lotes**

Lotes	Solución Administrada
1 (Control Negativo)	Solución Salina
2 (Control Positivo)	60mg/kg IFF <sup>2</sup>
3 (Vehículo)	0.4 ml DMSO <sup>1</sup>
4 (Concentración 1)	5mg/kg LQM 335 <sup>1</sup>
5 (Concentración 2)	10 mg/kg LQM 335 <sup>1</sup>
6 (Concentración 3)	20 mg/kg LQM 335 <sup>1</sup>
7 (Reto 1)	5mg/kg LQM 335 <sup>1</sup> + 60 mg/kg IFF <sup>2</sup>
8 (Reto 2)	10 mg/kg LQM 335 <sup>1</sup> + 60mg/kg IFF <sup>2</sup>
9 (Reto 3)	20 mg/kg LQM 335 <sup>1</sup> + 60 mg/kg IFF <sup>2</sup>

Vía de administración.: oral<sup>1</sup>; intraperitoneal<sup>2</sup>

### Toma de muestra y Frotis

Se realizó un corte en la porción terminal de la cola del ratón, se obtuvo una gota de sangre periférica la cual se depositó en un portaobjetos limpio y previamente desgrasado (a). Con otro portaobjetos colocado en un ángulo de 45<sup>0</sup> (b) se realizó la extensión de la muestra de sangre(c y d); esto se realizó antes de administrar a los ratones (t<sub>0</sub> o basal) y a las 24, 48 y 72 h post-administración.

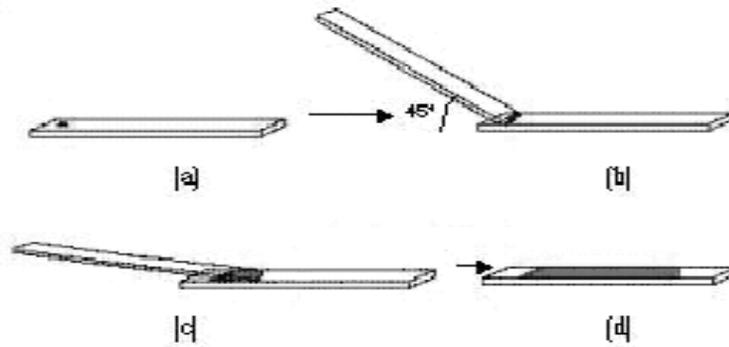


Figura 6. Frotis sanguíneo. Imagen obtenida del Manual de prácticas de genética clínica

### Tinción

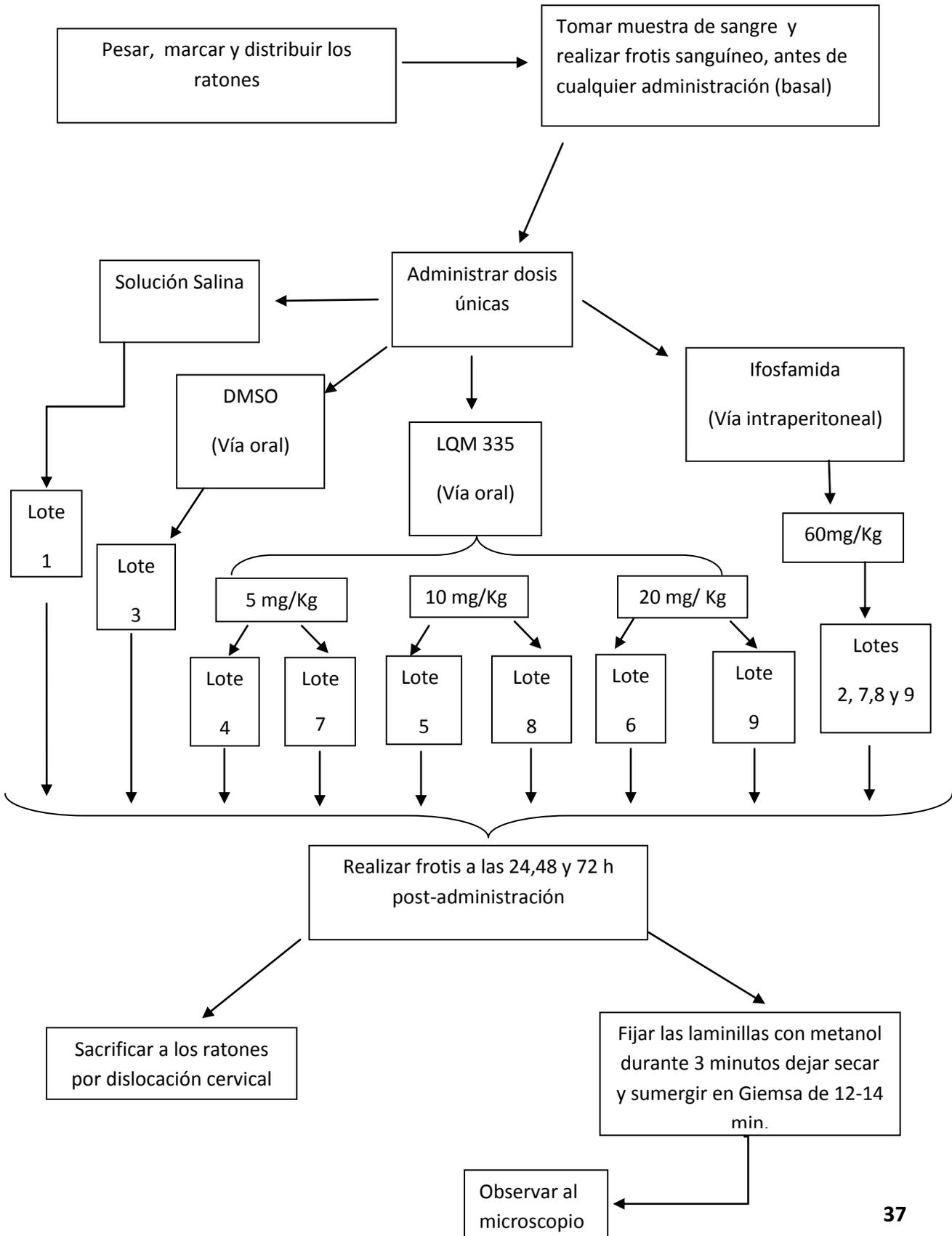
Obtenidas las laminillas se procedió a secarlas al aire; una vez secas las laminillas se fijaron en metanol absoluto aproximadamente por 3 minutos y se dejaron secar.

Pasado dicho tiempo las laminillas se sumergieron en un vaso coplin con colorante Giemsa (preparado con 5 ml de Giemsa, 5 ml de amortiguador de fosfatos y 40 ml de agua destilada neutra) durante 12-14 minutos dependiendo del grosor del frotis.

### Observación al microscopio

Se utilizó un microscopio óptico, del cual se cuidó que el objetivo de inmersión 100x estuviera en buenas condiciones. Se contaron a ciegas 1000 ENC y 1000 EPC, al igual que se observaron los micronúcleos para obtener el índice de genotoxicidad (EPCMN/EPC) y su índice de citotoxicidad (EPC/ENC).

Diagrama experimental general



## RESULTADOS

En la tabla 5 y gráfica 1 se muestra la frecuencia de la relación de EPC/ENC en sangre periférica de ratón durante el ensayo que se realizó para determinar la genotoxicidad.

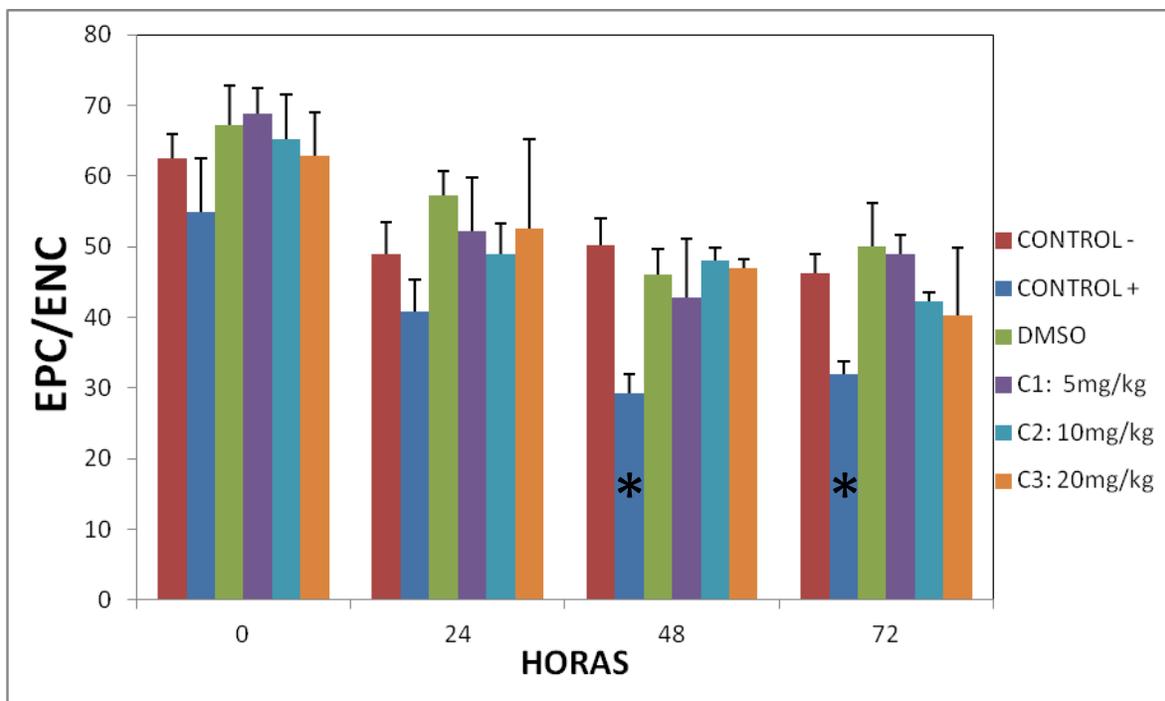
En el tiempo 0 ( $t_0$ ) el lote control negativo y los lotes con los que se experimento se encuentra en un rango que va de los 55 a los 67 EPC sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos, indicando que los animales se encontraban en las mismas condiciones antes del ensayo.

**Tabla 5: Promedios ( $\chi$ ) de EPC/ENC en 1000 eritrocitos  $\pm$  d.e. (desviación estándar) obtenidos a diferentes tiempos y concentraciones en el ensayo de genotoxicidad.**

Lotes	0 h $\chi \pm$ d.e.	24 h $\chi \pm$ d.e.	48 h $\chi \pm$ d.e.	72 h $\chi \pm$ d.e.
<b>Negativo(-)</b>	63 $\pm$ 3.41	49 $\pm$ 4.55	50 $\pm$ 3.78	46 $\pm$ 2.63
<b>Ifosfamida(+)</b>	55 $\pm$ 7.5	41 $\pm$ 4.57	29 $\pm$ 2.63	32 $\pm$ 1.83
<b>DMSO</b>	67 $\pm$ 5.56	57 $\pm$ 3.4	46 $\pm$ 3.74	50 $\pm$ 6.16
<b>C1: 5 mg/Kg(LQM)</b>	69 $\pm$ 3.56	52 $\pm$ 7.6	42 $\pm$ 8.33	49 $\pm$ 2.74
<b>C2: 10 mg/Kg (LQM)</b>	65 $\pm$ 6.29	49 $\pm$ 4.24	48 $\pm$ 1.83	42 $\pm$ 1.26

A las 24 h todos los lotes se comportaron de una manera homogénea, se observa una disminución en la frecuencia de EPCs a las 48 y 72 h donde solo se administró la ifosfamida, presentando diferencias estadísticamente significativas al compararse con el control negativo.

Con respecto a las dosis utilizadas del compuesto LQM 335 en la gráfica 1 se muestra que ninguna mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al índice de EPC en comparación con el grupo control negativo al compararse entre ellos, obteniéndose resultados similares a lo largo de los 3 tiempos evaluados.



Gráfica 1: Frecuencia de la relación de EPC/ENC en 1000 eritrocitos en el estudio antigenotóxico del compuesto piperidínico LQM 335 a diferentes concentraciones. Las líneas representan la desviación estándar.

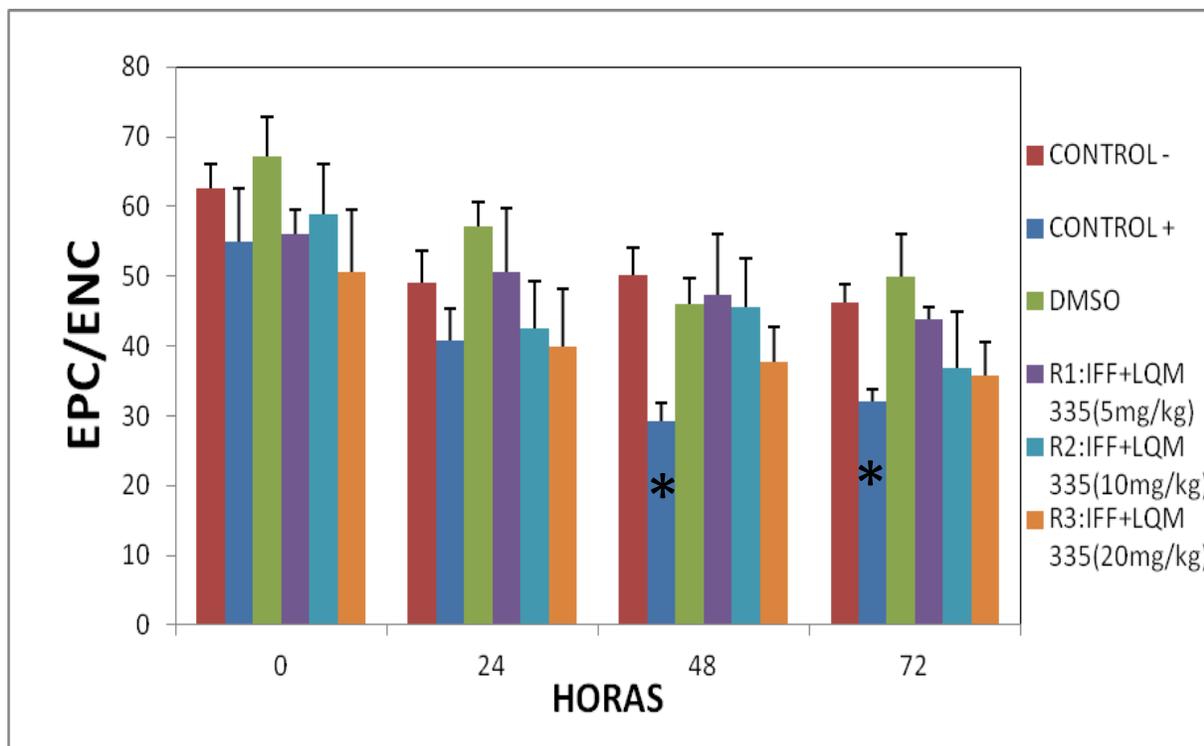
En la gráfica 2 y tabla 6 se muestran los resultados de la relación entre EPC/ENC para determinar la antigenotoxicidad del compuesto LQM 335 al retarlo con un mutágeno conocido como es la ifosfamida

Tabla 6: Promedios ( $\chi$ ) de EPC/ENC en 1000 eritrocitos  $\pm$  d.e. (desviación estándar) obtenidos en el ensayo de antigenotoxicidad

Lotes	0 h $\chi \pm$ d.e.	24 h $\chi \pm$ d.e.	48 h $\chi \pm$ d.e.	72 h $\chi \pm$ d.e.
Negativo(-)	63 $\pm$ 3.41	49 $\pm$ 4.55	50 $\pm$ 3.78	46 $\pm$ 2.63
Ifosfamida(+)	55 $\pm$ 7.5	41 $\pm$ 4.57	29 $\pm$ 2.63	32 $\pm$ 1.83
DMSO	67 $\pm$ 5.56	57 $\pm$ 3.4	46 $\pm$ 3.74	50 $\pm$ 6.16
R1:IFF+LQM (5 mg/Kg)	56 $\pm$ 3.65	51 $\pm$ 9.33	47 $\pm$ 8.77	44 $\pm$ 1.89
R2:IFF+LQM (10 mg/Kg)	59 $\pm$ 7.07	43 $\pm$ 6.8	46 $\pm$ 6.65	37 $\pm$ 2.63
R3:IFF+LQM (20 mg/Kg)	51 $\pm$ 9	40 $\pm$ 8.17	38 $\pm$ 4.99	36 $\pm$ 4.79

En los lotes en los cuales se administró el compuesto a diferentes concentraciones más la ifosfamida (reto) se observa que no presentan datos estadísticamente significativos al compararse con el lote negativo en sus respectivos tiempos.

El efecto citotóxico inducido por la ifosfamida se observó a partir de las 24 h, sin embargo el efecto citotóxico con más diferencias estadísticamente significativas se presentó a las 48 h tomando como referencia al control negativo de este ensayo.



**Gráfica 2:** Frecuencia de la relación de EPC/ENC en 1000 eritrocitos en el estudio antígeno tóxico del compuesto piperidínico LQM 335 a diferentes concentraciones más la administración de IFF (reto). Las líneas representan la desviación estándar.

En la Tabla 7 y gráfica 3 se muestra la frecuencia de EPCMN en sangre periférica de ratón CD1 en el ensayo de genotoxicidad. A tiempo 0 se observa que el lote control (-) y los lotes con los grupos experimentales tienen un número de EPCMN homogéneo que va en un rango de 0 a 0.5 los cuales están dentro del número de MN basales reportados para los ratones macho CD1 (Calderón y Ramirez, 1992).

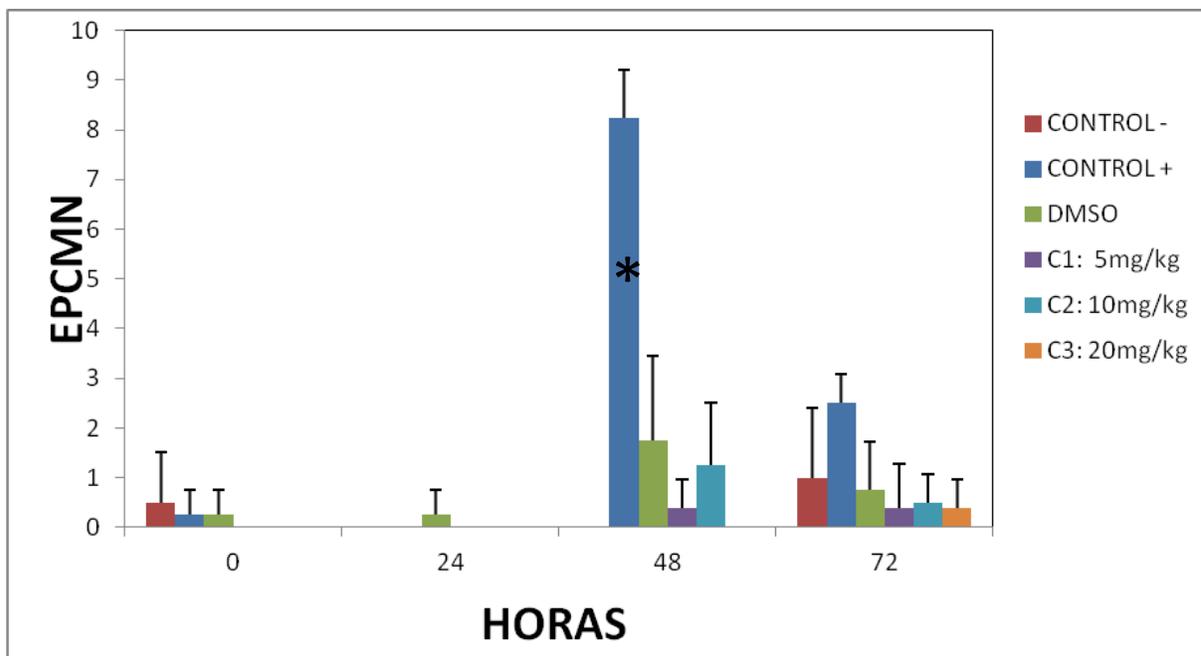
Tabla 7: Promedios ( $\chi$ ) de EPCMN en 1000 eritrocitos  $\pm$  d.e. (desviación estándar) obtenidos a diferentes tiempos y concentración en el ensayo de genotoxicidad.

Lotes	0 h $\chi \pm$ d.e.	24 h $\chi \pm$ d.e.	48 h $\chi \pm$ d.e.	72 h $\chi \pm$ d.e.
<b>Negativo(-)</b>	0.5 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1.41
<b>Ifosfamida(+)</b>	0.25 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0	8.25 $\pm$ 0.96	2.5 $\pm$ 0.58
<b>DMSO</b>	0.25 $\pm$ 0.5	0.25 $\pm$ 0.5	1.75 $\pm$ 1.71	0.75 $\pm$ 0.96
<b>C1: 5 mg/Kg(LQM)</b>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0.4 $\pm$ 0.55	0.4 $\pm$ 0.89
<b>C2: 10 mg/Kg (LQM)</b>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1.25 $\pm$ 1.26	0.5 $\pm$ 0.58
<b>C3: 20 mg/Kg (LQM)</b>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0.4 $\pm$ 0.55

El número de micronúcleos inducidos por la ifosfamida mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (-), a las 24 y 48 h después de la administración del compuesto; el daño genotóxico más alto fue registrado a las 48 h con un promedio de 8.25 EPCMN.

En el lote donde solo se administró el vehículo (DMSO) no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo durante todo el ensayo, al igual que no se observó ninguna diferencia con los demás lotes.

En la gráfica 3 al comparar el lote control negativo con los lotes donde sólo se administró el compuesto LQM 335, no se observó un incremento en la frecuencia de MN, tanto en las tres dosis que se administraron como en los diferentes tiempos en que se tomaron las muestras.



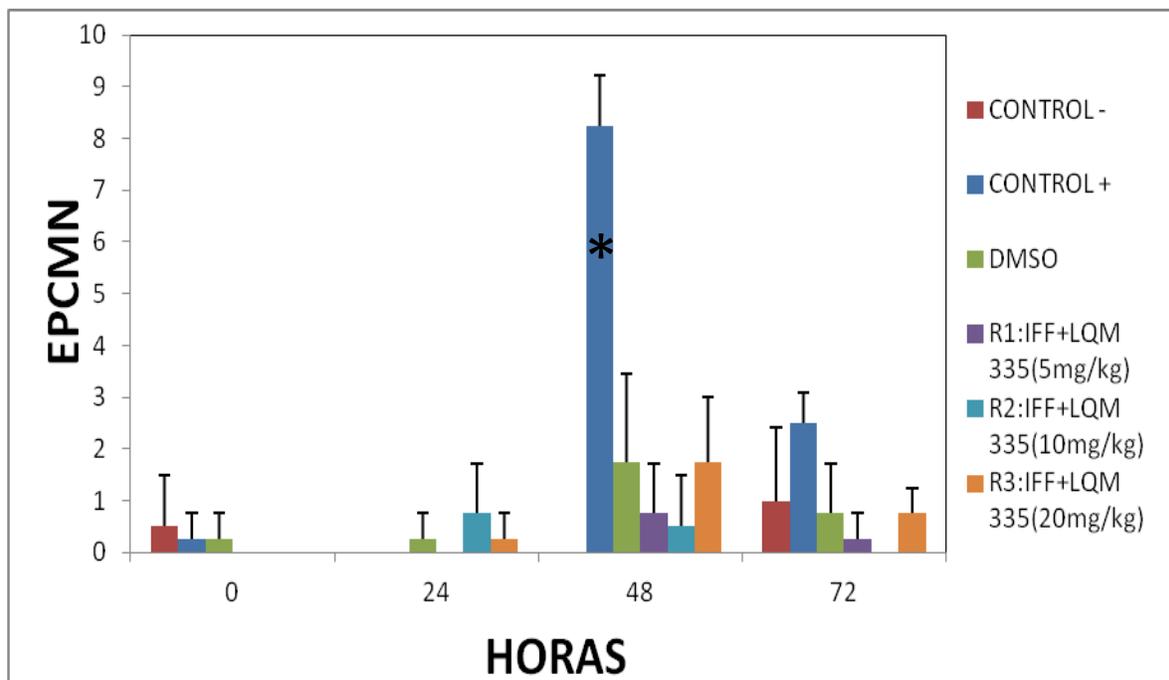
Gráfica 3: Frecuencia de EPCMN encontrados en 1000 EPC en el estudio genotóxico del compuesto piperidínico LQM 335 a diferentes concentraciones. Las líneas representan la desviación estándar.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de antigenotoxicidad en donde se administró ifosfamida como reto junto con el LQM 335 a sus diferentes concentraciones. Como se puede apreciar en la gráfica 4 no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el índice de EPCMN al compararse entre ellos.

Tabla 8: Promedios ( $\chi$ ) de EPCMN en 1000 eritrocitos  $\pm$  d.e. (desviación estándar) obtenidos en el ensayo de antigenotoxicidad.

Lotes	0 h $\chi \pm$ d.e.	24 h $\chi \pm$ d.e.	48 h $\chi \pm$ d.e.	72 h $\chi \pm$ d.e.
Negativo(-)	0.5 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1.41
Ifosfamida(+)	0.25 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0	8.25 $\pm$ 0.96	2.5 $\pm$ 0.58
DMSO	0.25 $\pm$ 0.5	0.25 $\pm$ 0.5	1.75 $\pm$ 1.71	0.75 $\pm$ 0.96
R1:IFF+LQM (5 mg/Kg)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0.75 $\pm$ 0.96	0.25 $\pm$ 0.5
R2:IFF+LQM (10 mg/Kg)	0 $\pm$ 0	0.75 $\pm$ 0.96	0.5 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0
R3:IFF+LQM (20 mg/Kg)	0 $\pm$ 0	0.25 $\pm$ 0.5	1.75 $\pm$ 1.26	0.75 $\pm$ 0.5

A las 48 y 72 h se observa en la gráfica 4 que los lotes donde fueron administradas las tres diferentes dosis de LQM 335 que fueron retadas con la IFF producen un claro efecto inhibitor en los EPCMN inducidos por el mutágeno.



Gráfica 4: Frecuencia de EPCMN encontrados en 1000 EPC en el estudio antígeno-tóxico del compuesto piperidínico LQM 335 a diferentes concentraciones más la administración de IFF (reto). Las líneas representan la desviación estándar.

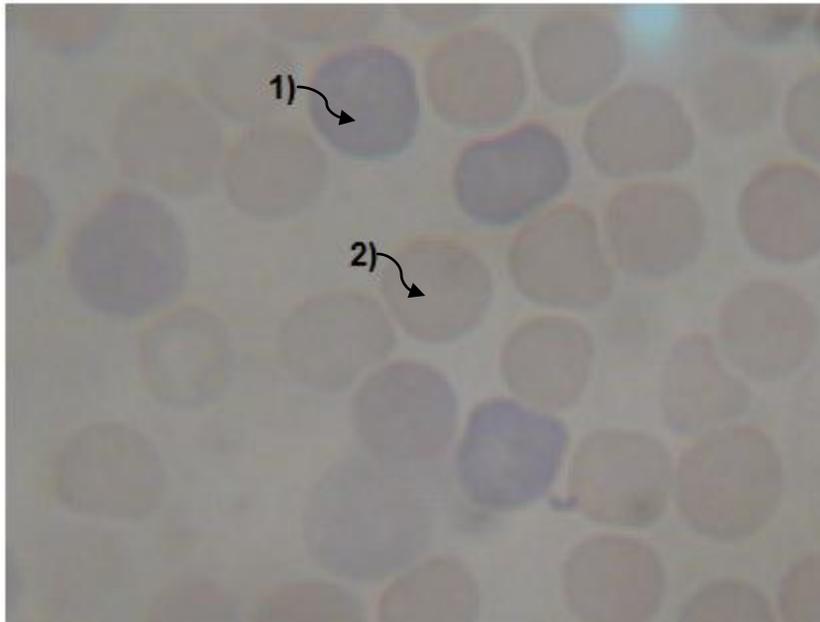


Figura 7. 1) Eritrocito Policromático (EPC), 2) Eritrocito Normocrómico (ENC)

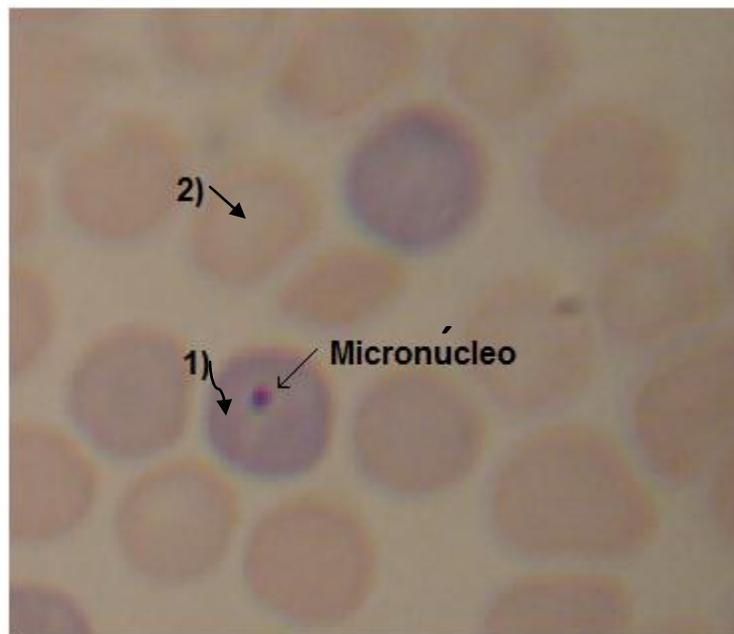


Figura 8. 1) Eritrocito Policromático Micronucleado (EPCMN), Eritrocito Normocrómico (ENC)

## Discusión

El cáncer en nuestros días es considerado como una de las principales causas de mortalidad, ya que ocupa el segundo lugar como causa de decesos en nuestro país, debido a esto se han propuesto diversas alternativas que han conllevado al desarrollo de tratamientos terapéuticos o quimiopreventivos efectivos en contra del cáncer (Kelloff et al, 2005).

El desarrollo de dichos tratamientos (terapéuticos y quimiopreventivos) han mostrado un gran panorama de posibilidades para llegar a resultados satisfactorios, obteniéndose nuevas terapias (ya sea solas o combinadas) que han demostrado ser efectivas y tener menos efectos tóxicos para el paciente.

Una de las propuestas para el desarrollo de las nuevas terapias en contra del cáncer es la reutilización de medicamentos de los cuales su acción farmacológica es conocida, pero que al utilizarse durante tiempo prolongado o al experimentarse en diversos ensayos demuestra cierta capacidad antineoplásica.

Un ejemplo conocido es la utilización de medicamentos los cuales su acción farmacológica radica en la regulación del sistema cardiovascular, como son los *antihipertensivos* que mediante una serie de pruebas demuestran capacidad *antineoplásica*.

En el 2009 Briones y Mondragon evaluaron la capacidad hipotensora y vasodilatadora (respectivamente) de diversos compuestos LQM que fueron sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal reportando que el compuesto LQM 335 presentaba efecto terapéutico como antihipertensivo y vasodilatador al probarlo en un modelo de rata Wistar *in vitro*; debido a esto se ha procedido a realizar los estudios de genotoxicidad correspondientes que forman parte de los ensayos preclínicos que debe tener un nuevo compuesto para que su posterior uso sea seguro y efectivo.

El grupo de investigación de la Dra. Cynthia Ordaz Pichardo comprobó que el LQM 335 presentaba un efecto anticancerígeno al evaluarlo en líneas celulares tumorales que fueron tratadas con dicho compuesto; debido a estos antecedentes previos se decidió evaluar la actividad antigenotóxica del compuesto LQM 335 a diferentes dosis mediante la técnica de micronúcleos en sangre periférica de ratones CD1 usando como agente precursor de genotoxicidad a la ifosfamida a una concentración de 60 mg/Kg de peso.

Los resultados del ensayo de genotoxicidad evaluados por la técnica de MN en sangre periférica en ratones CD1 demostraron que la frecuencia de EPCMN a diferentes dosis de nuestro compuesto (5,10 y 20 mg/Kg) no muestra diferencias estadísticamente significativas

con respecto al lote control negativo, como se puede apreciar en la gráfica 3, el número de micronúcleos del control negativo como en los grupos experimentales se mantuvo dentro de un intervalo de 1 a 3 MN (Tabla 7), siendo éstos los valores normales de la cepa utilizada (Domínguez, 2005). Lo que sugiere que el compuesto no es genotóxico a estas concentraciones y evaluado bajo la técnica de micronúcleos.

El compuesto LQM 335 se solubilizó con DMSO, ya que es un solvente eficiente para compuestos insolubles en agua debido a sus propiedades fisicoquímicas (es una molécula anfipática con dominio altamente polar y dos grupos apolares) y ha sido utilizado para diversos usos en el laboratorio así como vehículo para diversas terapias farmacéuticas (Nuno, 2003).

En un boletín de Gaylord Chemical en el 2007 se reportó que el DMSO presentó un aumento significativo en el número de células aberrantes en ratas que fueron administradas por vía intraperitoneal, sin embargo frotis de medula ósea de primates que recibieron dosis orales no mostraron efectos mutagénicos en dichas células. La evidencia de los estudios de Salmonella y otros datos toxicológicos demuestran que el DMSO no es mutagénico y puede ser ampliamente utilizado como solvente en los ensayos de mutagénesis.

Karlsson en 1991 reportó que el DMSO no produce genotoxicidad ni citotoxicidad a una concentración de 0.1 ml/ 20 g de peso, esto debido a que en su ensayo no se reportó un aumento en el número de micronúcleos ni se alteró la frecuencia de la relación EPC/ENC.

En nuestra investigación, el ligero aumento que se observó en el lote del DMSO no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo, sin embargo esta acción por parte del DMSO se puede atribuir a que en ciertas cantidades llega a actuar como iniciador de la diferenciación celular de eritrocitos (Zhi-Wu y Quiin, 1991), ya que llega a afectar la permeabilidad de las células cambiando la concentración de calcio citoplasmático el cual se cree ayuda a la diferenciación celular de este tipo de células.

Como control positivo se eligió a la ifosfamida, debido a que en nuestro grupo de trabajo este mutágeno se ha utilizado ampliamente y se tiene ya establecido el número de MN que produce. La ifosfamida es un agente alquilante antineoplásico que es un análogo estructural de la ciclofosfamida siendo diferentes sólo en la posición de un grupo tricloroetil que ha sido sintéticamente cambiado, esta modificación explica la diferencia en las propiedades terapéuticas de ambos compuestos donde después de la activación metabólica, los metabolitos activos de la ifosfamida (4-hidroxi-ifosfamida y aldoifosfamida) alquilan o se unen a muchas estructuras moleculares intracelulares, incluyendo ácidos nucleicos. La acción citotóxica se debe principalmente tanto al enlace cruzado de cadenas de ADN y ARN ya sea en una o ambas hebras, como a la inhibición de la síntesis de proteínas. (Florez, 2005), por todas

estas razones se decidió utilizar a la ifosfamida como un agente precursor de genotoxicidad para evaluar el efecto antigenotóxico del compuesto ensayado.

En nuestros resultados se observa que la ifosfamida produce un efecto genotóxico a partir de las 48 h en donde la inducción máxima fue de 8.25 MN en EPCs. Esto concuerda con lo reportado por Rocha en el 2008, realizó el ensayo MN en sangre periférica utilizando ratones cepa CD1 para determinar el efecto genotóxico del compuesto LQM 319 utilizando como control positivo la ifosfamida para dicho ensayo, donde se observa un incremento en el número de EPCMN a las 48 h post-administración.

Wolf y Luepke en 1997, determinaron el efecto genotóxico *in vivo* de la ifosfamida en MN de sangre periférica de embriones gallinas observándose un aumento de MN casi imperceptible a las 24 h post-administración seguida de una elevación máxima a las 48 h MN.

La formación de MN observada con el lote tratado con ifosfamida, está de acuerdo con la cinética que se espera para una exposición aguda; para este tipo de exposición, se considera que el nivel más alto de MN depende del equilibrio entre la producción y la eliminación de las células dañadas.

Durante el ensayo, la ifosfamida también presentó efectos citotóxicos suprimiendo hasta cierto punto la producción de las células jóvenes, siendo perceptible dichos efectos. A las 48 y 72 h en el lote donde se administró el agente genotóxico. Esta observación concuerda con lo reportado por Alvarez-Gonzalez y colaboradores en el 2001, los cuales utilizaron a la ifosfamida como mutágeno en un ensayo de micronúcleos *in vivo*, reportando una disminución en la frecuencia de EPC/ENC en el lote de ifosfamida.

Con respecto al ensayo antigenotóxico, el compuesto LQM 335 a las diferentes dosis (5, 10 y 20 mg/kg) redujo significativamente el número de MN inducidos por la ifosfamida (8.5 MN), mostrando un efecto antigenotóxico en los lotes donde se administraron dichas concentraciones.

Los resultados demuestran que a las 48 y 72 horas las tres dosis presentan diferencias estadísticamente significativas al compararlas con el lote donde solo se administró la ifosfamida como se observa en la gráfica 4. Las tres dosis presentaron un efecto protector manteniendo el número de MN de esta cepa en condiciones basales durante todo el ensayo.

Se observa que a las 72 horas el lote donde se administró la dosis de 20 mg/Kg además de presentar un efecto antigenotóxico, muestra una ligera disminución en el número de EPC/ENC al compararlo con el lote negativo (gráfica 6), esto concuerda con lo reportado por Domínguez en el 2005, la cual utilizó el ensayo de MN en sangre periférica de ratón para determinar la actividad genotóxica del ácido 6-nnonadecil salicílico, donde se observó un efecto citotóxico a las 72 h post-administración, debido a que ambos compuestos pueden estar ejerciendo un efecto citostático, ya que para poder observar EPCMN las células se tienen que dividir y por

tanto al observarse una disminución en la relación de EPC/ENC nos indica una posible supresión de la eritropoyesis.

Debido a que aún no se ha establecido cual sea el mecanismo de acción del compuesto, no es posible determinar con exactitud cómo se está modulando el daño genotóxico inducido por la ifosfamida.

Recordemos que el LQM 335 es un compuesto que presentó una acción antihipertensiva, lo cual puede ayudar a reducir la mortalidad de personas que sufren de problemas cardiovasculares, y que mediante diversos ensayos se le atribuyeron posibles propiedades anticancerígenas, esta clase de descubrimientos ha permitido mejorar la capacidad de desarrollar una alternativa para nuevos tratamientos (O'Connor y Bryan 2005).

En el 2005 Hosseinimehr y Karami en un ensayo de MN utilizaron un antihipertensivo de efecto conocido (Captopril) y lo retaron frente a un genotóxico (Ciclofosfamida) reportando que el antihipertensivo presentaba efectos protectores modulando el impacto genotóxico, este mismo autor junto con otros colaboradores en el 2007 reafirmó la acción antigenotóxica del antihipertensivo retándolo esta vez con radiaciones gama en un ensayo de micronúcleos obteniendo resultados similares.

Debido a la naturaleza de las moléculas de ambos compuestos (captopril y LQM 335) no se pueden tomar como similares los efectos que presente uno y otro, pero se puede considerar y tomar como antecedente la estrategia de tomar un medicamento antihipertensivo e investigar las nuevas propiedades terapéuticas que pueda presentar, trayendo consigo tratamientos posiblemente menos tóxicos y más eficaces para el paciente.

El resultado de este ensayo pone de manifiesto que el compuesto LQM 335 no es genotóxico, y sí demuestra ser antigenotóxico a una concentración de 5, 10 y 20 mg/Kg perfilándolo como una posible propuesta quimiopreventiva. Es de vital importancia realizar los ensayos adicionales para que se pueda considerar como un óptimo candidato para las pruebas clínicas, para su posterior comercialización y uso, así como su posible uso como tratamiento coadyuvante en contra el cáncer.

## Conclusiones

El compuesto LQM 335 a las dosis de 5, 10 y 20 mg/Kg no incremento el número de EPCMN en el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón, lo que indica que el compuesto no es genotóxico.

Al retar al compuesto LQM 335 a la dosis establecidas (5, 10 y 20 mg/Kg) con un mutágeno (ifosfamida) se mostro una disminución en la frecuencia de EPCMN, demostrando que el LQM 335 si presenta capacidad antigenotóxica.

A las dosis de 5, 10 mg/Kg del LQM 335 no se observa una variación en la relación EPC/ENC durante el ensayo, comprobando con esto que el compuesto no es citotóxico a las dosis empleadas.

A las 72 horas se observó un ligero decremento donde se reto a la dosis de 20 mg/Kg, indicando que el compuesto a esta concentración y dicho tiempo es citotóxico.

---

---

## Bibliografía

1. Advani S., M.A. Friedman, I.C. Henderson, L.M. Levy, N. Pavlidis et M.H.N. Tattersall (1994). Medicaments essentiels pour la chimiotherapie Anticancereuse. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Sante, Les demandes de tires a part doivent etre adressees a Cancer et Soins palliatives. 72 (6): pp 835-840
2. Ahmad, Kamel, Jaber Saleh (2010). Clastogenic studies on Tandaha Dam water in Asser. J. Black Sea/Mediterranean Environment. Vol. 16(1): pp 33-42.
3. Alvarez-González, E. Madrigal-Bujaidar, V. Dorado, J.J. Espinosa-Aguirre (2001). Inhibitory effect of naringin on the micronuclei induced by ifosfamide in mouse, and evaluation of its modulatory effect on the Cyp3a subfamily. Mutation Research, 480–481, pp 171–178.
4. Argiles, Huguet Josep Ma., Francisco J. López Soriano (1998). El cáncer y su prevención. EDICIONS UNIVERSITAT de BARCELONA. Barcelona, España: pp 47-60
5. Avances Médicos, Principios de tratamiento oncológico (2002). Disponible en [www.intermedicina.com](http://www.intermedicina.com) revisado el día 24 de mayo del 2011 a las 3:03 hrs.
6. Avendaño, Lopez Carmen (2001). Introducción a la química farmacéutica. 2da ed. Edit. Mc Graw Hill. España. pp 26, 27, 35-38.
7. Barow, J. Ponder, Malkin J. Waring (1992). Cancer biology and medicine. Edit Kluwer Academic Publishers. London. pp 1-3, 6-20 y 29-35.
8. Božica Radić, Ana Lucić Vrdoljak, Davor Želježić, Nino Fuchs, Suzana Berend y Nevenka Kopjar. (2007) Evaluation of HI-6 oxime: potential use in protection of human acetylcholinesterase inhibited by antineoplastic drug irinotecan and its cyto/genotoxicity *in vitro*. ACTA BIOCHIMICAL POLONICA. Vol. 54 No. 3: pp 583–593
9. Briones Beltran Cesar (2009). Determinación de la actividad hipotensora de los compuestos morfolínicos (LQM-302, LQM-312), tiomorfolínicos (LQM-324, LQM-337) y piperidínicos (LQM-335, LQM-336, LQM344, LQM-345) en ratas Wistar anestesiada. Tesis para obtener la Licenciatura de QFB. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.

- 
- 
10. Calderon, M. E. y H. L. Ramirez. (1992). Efecto mutagénico inducido por capsaicina sobre eritrocitos policromáticos de sangre periférica detectado mediante la prueba de micronúcleos en un estudio subagudo in vivo. Tesis para obtener la Licenciatura de QFB. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
  11. Carcinogenic Risk In Occupational Settings (CRIOS); (2008). GENOTOXICITY : SISTER CHROMATID EXCHANGE TEST. Disponible en [www.crios.be](http://www.crios.be) revisado el 17 de junio del 2011 a las 16:07.
  12. Carley, David W. (2005). Drug repurposing: identify, develop and commercialize new uses for existing or abandoned drugs. *IDrugs*; 8(4): pp 306-309.
  13. Colegio de medicina de chicago (2011). Disponible en <http://chicago.medicine.uic.edu> revisado el 9 de agosto del 2011 a las 13: 01 hrs.
  14. Cuevas, Torres J.J., J. A. Santos Miranda (1985). *Oncología Básica*. Edit Vectores Ediciones. Madrid, España: pp 61-63.
  15. Custer, L.L., K.S. Sweder (2008). The Role of Genetic Toxicology in Drug Discovery and Optimization. *Current Drug Metabolism*, 9, pp 978-985.
  16. Cytognos (2001). Disponible en [www.citometriadeflujo.com](http://www.citometriadeflujo.com) revisado el día 9 de junio del 2011 a las 10:15.
  17. Dalkic, Ertugrul, Xuewei Wang, Neil Wright, Christina Chan (2010). Cancer-Drug Associations: A Complex System. *PLoS One*; 5(4): e10031: pp 15.
  18. Dhari S., P. Nygren, K. Csokal, J. Botling, K. Nilsson and R. Larsson (1996). Anti-cancer drug characterisation using a human cell line panel representing defined types of drug resistance. *British Journal of Cancer*, 74, pp 888-896.
  19. Díaz, García Guadalupe, Noemi Tlapalamatl Garcia (2008). Evaluación del efecto antihipertensivo de los compuestos dimorfolínicos (LQM 352), tiomorfolínicos (LQM 324, 328, 329, 337, 341, 343, 353), piperidinicos (LQM 336, 344, 345) y de cobre (LQM 401) en rata hipertensa espontanea. Tesis para obtener la Licenciatura de QFB. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
  20. Dominguez, Rojas Maritere (2005). Actividad genotóxica del ácido 6-nonadecilsalicílico aislado de la corteza del cuachalalate y su éster metílico evaluada en la sangre periférica de ratones CD1 con la prueba de micronúcleos. Tesis para obtener la Licenciatura de QFB. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

- 
- 
21. Domínguez, Rojas Maritere. Manual de prácticas de genética clínica; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México, pp 17.
  22. Dueñas, González Alfonso, Patricia García-López, Luis Alonso Herrera, Jose Luis Medina Franco, Aurora González Fierro, Myrna Candelaria (2008). The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents. *Molecular Cancer*. 7: 82: pp 33.
  23. Eastmond, David A., Andrea Hartwig<sup>1</sup>, Diana Anderson, Wagida A. Anwar, Michael C. Cimino, Ivan Dobrev, George R. Douglas, Takehiko Nohmi, David H. Phillips y Carolyn Vickers (2009). Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis* vol. 24 no. 4 pp 341–349.
  24. Evans H.J., Neary G.J., Tonkinson S.M., Williamson F.S. (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part III. Mitotic delay. *International Journal of Radiation Biology*.1: pp 230-40.
  25. Ferreiro, Gisell Rodríguez, Lourdes Cancino Badías, Elio A. Prieto González' Javier Espinosa Aguirre (2001). El Tinidazol induce roturas de simple cadena en leucocitos de ratón. *Anuario Toxicología*;1(1): pp 57-64.
  26. Florez, Jesus (2005). *Farmacología Humana*. 4ta ed. Editorial MASSON. Barcelona, España. pp 1061 y 1062.
  27. Galbis, Perez Juan Antonio (2004). *Panorama actual de la química farmacéutica*. 2da ed; Edit. Universidad de Sevilla. Sevilla, España pp 167, 168 y 173.
  28. Gaylord Chemical Company (2007). Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Health and Safety Information. Bulletin # 106. Disponible en <http://www.gaylordchemical.com> revisado el 30 de septiembre del 2011 a las 11 hrs.
  29. Gopala, Krishna Makoto Hayashi (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research* 455; pp 155–166.
  30. Hayashi M., Raymond R. Tice, James T. MacGregor, Diana Anderson, David H. Blakey, M. Kirsh-Volders, Frederick B. Oleson Jr., Francesca Pacchierotti, Felix Romagna, Hiroyasu Shimada, Sizuyo Sutou, Bernard Vannier (1994). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research* 312. pp 293-304.

- 
- 
31. Hayashi, Makoto (2005). The rodent micronucleus test: the basic research and application to regulatory use. *Environmental Mutagen Research*. 27: pp 13-20.
  32. Hayashi, Makoto, James T. MacGregor, David G. Gatehouse, Ilse-Dore Adler, David H. Blakey, Stephen D. Dertinger, Gopala Krishna, Takeshi Morita, Antonella Russo, and Shizuyo Sutou (2000). In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay II. Some Aspects of Protocol Design Including Repeated Treatments, Integration With Toxicity Testing and Automated Scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: pp 234-252.
  33. Heddle, John A., Mark Hite , Barbara Kirkhart , Kathleen Mavournin, James T. MacGregor, Gordon W. Newell and Michael F. Salamone (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 123. pp 61-118.
  34. Hosseinimehr Seyed Jalal, Aziz Mahmoudzadeh, Shahram Akhlagpour (2007). Captopril protects mice bone marrow cells against genotoxicity induced by gamma irradiation. *Cell Biochemistry and Function*; 25: pp 389–394.
  35. Hosseinimehr, S. J., M. Karami (2005). Chemoprotective effects of captopril against cyclophosphamide induced genotoxicity in mouse bone marrow cells. *Archives Toxicology*, 79: pp 482–486.
  36. Imagen obtenida en [www.cib.uaem.mx](http://www.cib.uaem.mx), revisada el día 28 de mayo del 2011 a las 01:34 hrs.
  37. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadísticas de Mortalidad. Disponible en [http://www.inegi.org.mx/lib/olap/general\\_ver4/MDXQueryDatos.asp?#Regreso&c=11144](http://www.inegi.org.mx/lib/olap/general_ver4/MDXQueryDatos.asp?#Regreso&c=11144) (Revisado el 31 de Enero del 2011)
  38. Karlsson Nils, Ingrid Fäingmark, Inger Häiggqvist, Britt Karlsson, Lars Rittfeldt and Hans Marchner (1991). Mutagenicity testing of condensates of smoke from titanium dioxide/hexachloroethane and zinc/hexachloroethane pyrotechnic mixtures. *Mutation Research*, 260, pp 39-46.
  39. Katzung, Bertram G. (2005). *Farmacología básica y clínica*. 9ª ed. El Manual moderno. México: pp 885-907.
  40. Kelloff, Gary J., Ernest T. Hawk, Caroline C. Sigman. (2005) *Cancer chemoprevention, Volumen 2: Strategies for cancer chemoprevention*. Edit. Human Press, Totowa, New Jersey. pp 3-5

- 
- 
41. Kissling, Grace E., Stephen Dertinger, Makoto Hayashi, James T. MacGregor (2007). Sensitivity of the Erythrocyte Micronucleus Assay: Dependence on Number of Cells Scored and Inter-animal Variability. *Mutation Research*.1; 634(1-2). pp 235–240.
  42. Marovac Jaqueline (2001). Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos. *Revista Médica de Chile*: V. 129. pp 99-106.
  43. Mavournin, Kathleen H., David H. Blakey , Michael C. Cimino , Michael F. Salamone, John A. Heddle (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 239. pp 29-80.
  44. Miller, Robert C. (1973) The Micronucleus Test as an in Vivo Cytogenetic Method. *Environmental Health Perspectives*. pp 167-170.
  45. Mondragon, García Maithe. (2009). Determinación del efecto de los compuestos morfolínicos (LQM 313, LQM 314, LQM 341 y LQM 352), tiomorfolínicos (LQM 318, LQM 324 y LQM 401) y pieridínicos (LQM 335, LQM 336 y LQM 345) en aorta torácica y abdominal de rata hipertensa espontánea. Tesis para obtener la licenciatura de QFB. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
  46. Nagle, Dale G., Yu-Dong Zhou, Flor D. Mora, Kaleem A. Mohammed, Yong-Pil Kim (2004). Mechanism Targeted Discovery of Antitumor Marine Natural Products. *Current Medical Chemistry*; 11(13): pp 1725–1756.
  47. Nang, Wai Choy (2001). *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. MARCEL DEKKER. New York, EUA. Pag. 1-21: pp 29-35.
  48. Nature Publishing Group (NPG) (2009). Crunching Data Crunch. Disponible en <http://blogs.nature.com> revisado el 9 de agosto del 2011 a las 12:00 hrs.
  49. Nuno C. Santos, J. Figueira-Coelho, J. Martins-Silva, Carlota Saldanha (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology* 65. pp 1035–1041.
  50. O'Connor, Kerry A., Bryan L. Roth (2005). Finding new tricks for old drugs: an efficient route for public-sector drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4(12): pp 1005-14.

- 
- 
51. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Mammalian Erythrocyte Micronucleus test (1997). Disponible en [www.oecd.org](http://www.oecd.org) revisado el 8 de junio del 2011 a las 10:30.
52. Organización de las Naciones Unidas (ONU) (2005). Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Publicaciones de las Naciones Unidas: pp 167.
53. Organización Mundial de la Salud [OMS].Cáncer. Nota descriptiva No 259. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html> (Revisado el 31 de Enero del 2011)
54. Palajda y Herbert S. Rosenkranz (1985). Assembly and preliminary analysis of a genotoxicity data base for predicting carcinogens. *Mutation Research*, 153, pp 79-134.
55. Quiminet (2006). El proceso de desarrollo de un fármaco nuevo. Disponible en <http://www.quiminet.com> revisado el 29 de mayo del 2011 a las 8:00.
56. Rubin, Philip (2003). *Oncología clínica: Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. 8ª Edición. Editorial Elsevier. Madrid, España. pp 62-67, 75-77
57. Schroeder, T. M. (1966). Cytogenetische und cytologische Befunde bei enzymopenischen Panmyelopathien und Pancytopenien. *Humangenetik* 2: pp 287-316.
58. Tamimi, Nihad A. M., Peter Ellis (2009). *Drug Development: From Concept to Marketing*. *Nephron Clinical Practice* ; 113. pp 125–131.
59. Tweats, D.J., D. Blakey, R.H. Heflich, A. Jacobs, S.D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M.R. O'Donovan, Y.F. Sasaki, T. Sofuni R. Tice (2007). Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory *in vivo* tests II. Identification of *in vivo*-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*. 627(1): pp 92–105.
60. Vasquez, Marie Z. (2010). Combining the *in vivo* comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis* vol. 25 no. 2 pp. 187–199.
61. Winer Eric, Julie Gralow, Lisa Diller, Beth Karlan, Patrick Loehrer, Lori Pierce, George Demetri, Patricia Ganz, Barnett Kramer, Mark Kris, Maurie Markman, Robert Mayer, David Pfister, Derek Raghavan, Scott Ramsey, Gregory Reaman, Howard Sandler, Raymond Sawaya, Lynn Schuchter, John Sweetenham, Linda Vahdat and

- 
- Richard L. Schilsky (2009). Clinical Advances 2008: Major Research Advances in cancer treatment, prevention, and screening-A report from American Society of Clinical Oncology. *Journal Clinical Oncology*. 27(5): pp 812-826.
62. Wolf T, Luepke NP. (1997). Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity. *Mutation Research*. 394(1-3): pp 163-75.
63. Zaizuhana Shahrin, Puteri J. Noor M. Baharuddin, Noral 'Ashikin Yahya, Hussin Muhammad, Rohana A. Bakar, Zakiah Ismail (2006). The *in vivo* rodent micronucleus assay of Kacip Fatimah (*Labisia pumila*) extract. *Tropical Biomedicine* 23(2): pp 214–219.
64. Zalacain M., L. Sierrasesúmag, A. Patiño (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 28 (2): pp 227-236.
65. Zhi-Wu Yu y Peter J. Quinn (1994). Dimethyl Sulphoxide: A Review of Applications in Cell Biology. *Bioscience Reports*, Vol. 14, No. 6, pp 1-23.