



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“EFECTO DE LA QUINAZOLINA MLB13 SOBRE EL NIVEL DE
ANTIOXIDANTES, DAÑO AL ADN Y SU REPARACIÓN EN
RATONES TRATADOS CON COMPUESTOS METÁLICOS DE
CROMO HEXAVALENTE: CASO DE UN NUEVO
COMPUESTO QUINOLÍNICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

GRISelda LÓPEZ RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2018.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna **LÓPEZ RAMÍREZ GRISELDA**, con número de cuenta **414108619**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **16 de octubre de 2018** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

VOCAL Dra. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ

SECRETARIO Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

SUPLENTE M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

SUPLENTE Dr. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA

Mario Agustín Altamirano Lozano
María del Carmen García Rodríguez
Lucila Álvarez Barrera
José Misael Vicente Hernández Vázquez
Rodrigo Aníbal Mateos Nava

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de la quinazolina MLB13 sobre el nivel de antioxidantes, daño al ADN y su reparación en ratones tratados con compuestos metálicos de cromo hexavalente: caso de un nuevo compuesto quinolínico.**

Opción de titulación: Actividad de Investigación.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 18 de septiembre de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBI
OFICINA DE EXAMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

La investigación se realizó gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN219216, y como parte del proyecto “Los componentes antioxidantes de la dieta en la modulación y protección *in vivo* del daño genotóxico y citotóxico inducido por metales con potencial cancerígeno: Ensayo Cometa, Micronúcleos, Apoptosis, Enzimas Antioxidantes y 8-hidroxideoxiguanosina”. Se contó con beca de titulación (elaboración de tesis).

El viaje es la recompensa

Agradecimientos

A la UNAM, mi *alma mater*, por albergarme en mis años de formación profesional, y por el apoyo recibido para el desarrollo satisfactorio de la misma, a los profesores y personal que hacen de la Universidad ser lo que es, un espacio libre, autónomo y de excelencia.

A la Dra. María del Carmen García Rodríguez, por haberme aceptado en su equipo de trabajo, por la paciencia y el tiempo dedicado a transmitir sus conocimientos, por exigir lo mejor de nosotros y por su calidez humana.

A la DGAPA-UNAM por el financiamiento brindado para la realización del proyecto (PAPITT-219216).

Al Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava por compartir sus conocimientos durante la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado, por sus valiosas aportaciones y sugerencias:

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dra. Lucila Álvarez Barrera

Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez

Dedicatorias

A mis padres, Aris y Mario, por su esfuerzo, dedicación y cansancio, porque con su apoyo y cariño he logrado cumplir una meta más en la vida, por ser ejemplo de constancia y disciplina, este logro no es solo mío, es nuestro. Gracias.

A mis hermanos. A Damaris, por ser mi compañera de vida, porque siempre estuviste, porque en ti veo a una increíble mujer y un gran ejemplo, A Mario Ángel por ser un motor que me impulsa a ser mi mejor versión, por la confianza y el cariño. Los amo inmensamente.

A mis amigos. A Jorge, Nayely, Thelma, Diana, Bety, Gaby, Ari y Erick, por las risas y lágrimas, por los buenos y malos ratos, porque los amigos son los hermanos que eliges, gracias por compartir su vida conmigo, por su apoyo y sobre todo su confianza, los quiero.

A mis compañeros de laboratorio, Tona, Gaby, Thelma, Fany, Lulú y Manuel, por el apoyo brindado dentro y fuera del laboratorio, ¡por ser un gran equipo!

ÍNDICE

RESUMEN	i
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	ii
I.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 Compuestos quinolínicos	2
1.2 Antioxidantes	5
1.3 Estrés oxidante	6
1.4 Metales inductores de estrés oxidante	7
1.5 Reparación del ADN	9
1.6 Pruebas para evaluar el daño genotóxico	10
1.7 Antioxidantes totales	14
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
III.- HIPÓTESIS	16
IV.- OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo General.....	16
4.2 Objetivos Particulares.....	16
V.- MATERIAL Y MÉTODO.....	17
5.1 Animales	17
5.2 Reactivos.....	17
5.3 Diseño experimental.....	17
5.4 Ensayo de Micronúcleos y relación EPC/ENC	20
5.5 Apoptosis y viabilidad	21
5.6 Ensayo cometa	22
5.7 Antioxidantes totales	24
5.8 Análisis estadístico	25
VI.- RESULTADOS	26

6.1 Toxicidad	26
6.2 Genotoxicidad	27
6.3 Antioxidantes totales	35
6.4 Citotoxicidad	36
VII.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
VIII. CONCLUSIONES	44
IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
X. ANEXOS	52

RESUMEN

Los compuestos quinolínicos han sido ampliamente utilizados debido a sus propiedades antiparasitarias, sin embargo, los tratamientos suelen ser tóxicos. En la Facultad de Química de la UNAM el grupo a cargo del Dr. Francisco Hernández Luis, sintetizó una nueva molécula, la TAQ-MLB13 que es menos tóxica y conserva sus efectos terapéuticos, además se le agregaron grupos metoxilo e hidroxilo para conferirles propiedades antioxidantes. En este estudio se evaluó la genotoxicidad, utilizando la prueba de MN, ensayo cometa y niveles de antioxidantes totales en ratones tratados con TAQ-MLB13 y CrO_3 , con la finalidad de conocer las posibles vías de protección de la TAQ-MLB13. También se realizaron pruebas con los fluorocromos NA/BrEt para evaluar la viabilidad celular y citotoxicidad. Grupos de 5 ratones hembra fueron tratados de la siguiente manera: I) Grupos testigo (agua o DMSO) II) Grupo CrO_3 (20 mg/kg) III) Grupo TAQ-MLB13 (10 mg/kg) y IV) Grupo combinado (TAQ-MLB13 y 4 horas después CrO_3) a todos los grupos se les administró el tratamiento vía intraperitoneal y las muestras fueron tomadas de la vena caudal. Para las pruebas de MN y la relación EPC/ENC se tomaron muestras a las 0 y 48 horas después de administrados los tratamientos, para el ensayo cometa a las 0, 4, 24 y 48 horas, y para las pruebas de apoptosis, viabilidad celular y antioxidantes totales únicamente a la hora 48. Se corroboró la genotoxicidad y citotoxicidad del CrO_3 ya que aumentó las frecuencias de MN, rompimientos de cadena y apoptosis, además de que disminuyó los antioxidantes totales. La TAQ-MLB13 no presentó efectos genotóxicos, citotóxicos, ni efectos en los niveles de antioxidantes totales. Cuando se combinaron los tratamientos de TAQ-MLB13 y CrO_3 se observó una reducción de las frecuencias de MN y de rompimientos de cadena sencilla, lo que podría estar relacionado con la activación de los mecanismos de reparación. En este grupo también se observó una recuperación de los niveles de antioxidantes totales lo que permite sugerir que la vía de protección del daño al ADN podría estar relacionada con la activación del sistema antioxidante y no por apoptosis, ya que estas células no se incrementaron en este grupo.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

8-OxoGua	8-oxo-7-8-dihidroguanina
ABTS	3-etilbenzotiazolina-6-sulfanato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANDEVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
BER	Reparación por escisión de bases
BrEt	Bromuro de Etidio
Cr	Cromo
Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(IV)	Cromo tetravalente
Cr(V)	Cromo pentavalente
Cr(VI)	Cromo hexavalente
CrO ₃	Trióxido de cromo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DHFR	Dihidrofolato reductasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENC	Eritrocitos normocromáticos
EPA	Environmental Protection Agency
EPC	Eritrocitos policromáticos
EPC-MN	Eritrocitos policromaticos micronucleados
ERO	Especies Reactivas de oxígeno
FDA	Food and Drug Administration
H ₂	N6(metilferreno)-2,4,6-triaminoquinazolina
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPβCD	2-hidroxipropil-β-ciclodextrina
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
ImPTR1	Pteridina reductasa 1 de <i>Leishmania mayor</i>
M4	N6-(4-metoxibencil)-2,4,6-trianinoquinazolina

MN	Micronúcleo (s)
NA	Naranja de acridina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NIF	Frecuencia de inducción neta
O ₂	Oxígeno molecular
O ⁻²	Radical superóxido
OECD	Organisation for Economic Co-operation Agency
OH ⁻	Radical hidroxilo
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salina
DSB	Rompimientos de cadena doble
RL	Radicales libres
RLO	Radicales libres de oxígeno
RLN	Radicales libres de nitrógeno
SLA	Sitios lábiles al álcali
SSB	Rompimientos de cadena sencilla
TAQ	2,4,6-triaminoquinazolina
TAQ-MLB13	2,4,6-triaminoquinazoliona MLB13
UA	Unidades arbitrarias

I.- INTRODUCCIÓN

Los compuestos heterocíclicos como las quinazolininas poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, antivirales, analgésicas y se les ha empleado en el tratamiento de la malaria y leishmaniasis. Sin embargo, se ha observado que su administración a mediano y largo plazo presenta efectos tóxicos (Jafari *et al.*, 2016; Wang y Gao, 2013). En el departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, se han diseñado y sintetizado una serie de compuestos derivados de las quinazolininas como la 2,4,6-triaminoquinazolina (TAQ MLB13) con la finalidad de reducir su toxicidad (Hernández, 2016). A estos compuestos también se les han agregado grupos funcionales para conferirles propiedades antioxidantes, sin comprometer su actividad antiprotozoaria (Mendoza-Martínez *et al.*, 2015). En la regulación establecida en el diseño, síntesis o mejora de un fármaco, se deben realizar una serie de estudios para asegurar que el compuesto tiene un deseable perfil de actividad, desde la síntesis o la obtención biotecnológica y toda la fase preclínica, incluida la toxicología, donde entre otras pruebas, se evalúa el daño al material genético o genotoxicidad (Escalona *et al.*, 2003; FDA, 2012). La TAQ-MLB13 no induce daño citotóxico ni genotóxico *in vivo*, sino por el contrario, en hembras de ratones Hsd:ICR es capaz de disminuir el daño genotóxico inducido por compuestos metálicos inductores de estrés oxidante, tales como los compuestos de Cr(VI) (Hernández, 2016; Olguín, 2017). Por ello es de interés indagar sobre las posibles vías de protección contra el daño genotóxico inducido por el Cr(VI). De acuerdo con las modificaciones realizadas a las TAQ y en particular a la MLB13 es posible que su protección esté relacionada con: a) una interacción directa o indirecta del estrés oxidante inducido por la reducción intracelular del Cr(VI), b) inducción de apoptosis de células dañadas (ADN), y c) activación de los mecanismos de reparación del daño al ADN.

1.1 Compuestos quinolínicos

Las enfermedades infecciosas parasitarias causadas por protozoos patógenos constituyen un importante problema de salud mundial en países subdesarrollados. La leishmaniasis, causada por *Leishmania spp.*, y la malaria, causada por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, se encuentran entre las infecciones más graves en las regiones tropicales, con impacto en México, consideradas como desatendidas o rezagadas y que afectan a los sectores más vulnerables y marginales de la población (Mandal, 2014; Mendoza-Martínez *et al.*, 2015; Reguera *et al.*, 2014). En ausencia de vacunas efectivas, la quimioterapia juega un papel crítico, que controla estas enfermedades. Para el tratamiento de la leishmaniasis, el glucantime, miltefosine y amphotericine B, están en uso hasta la fecha; sin embargo, estos compuestos tienen inconvenientes comunes tales como alta toxicidad, alto costo o resistencia emergente (Croft y Coombs, 2003). Respecto a la malaria, la sulfadoxine/pirimetamina, la quinina, la cloroquina y sus derivados, todavía se usan en la actualidad (Mendoza-Martínez *et al.*, 2015); estos fármacos fueron utilizados extensamente por más de 50 años en varios programas de erradicación mundial de la malaria. Sin embargo, en los últimos años se ha observado disminución en la efectividad del fármaco en África, América del Sur y el sureste asiático, principalmente por el desarrollo de resistencia a la cloroquina por parte del parásito *Plasmodium falciparum* perjudicando seriamente su valor terapéutico (Meléndez y Kouznetsov, 2005). Esto ha frustrado los intentos de erradicar estas enfermedades por medio de la quimioterapia y los medicamentos actualmente utilizados tienen un mayor riesgo de quedar obsoletos (Mendoza-Martínez *et al.*, 2015), por lo que se inició la búsqueda de nuevos agentes, más efectivos y menos tóxicos, que poseen como base estructural el sistema quinolínico, sintetizándose nuevos fármacos como los 4-aminoquinolínicos (Epperson *et al.*, 1995; Meléndez y Kouznetsov, 2005; Rolling *et al.*, 2013).

Según su estructura química las quinazolininas están formadas por compuestos heterocíclicos generados por la fusión de un anillo benceno y otro de pirimidina (Figura 1). Estas estructuras se encuentran en muchos alcaloides que presentan

actividad biológica y sus propiedades químicas se determinan principalmente por la unidad de pirimidina (Sainsbury, 2001). Un gran número de medicamentos se han obtenido de plantas que los contienen en hojas, flores, frutos o en la corteza, como es el caso de la quinina, un agente antimalárico (Meléndez y Kouznetsov, 2005).

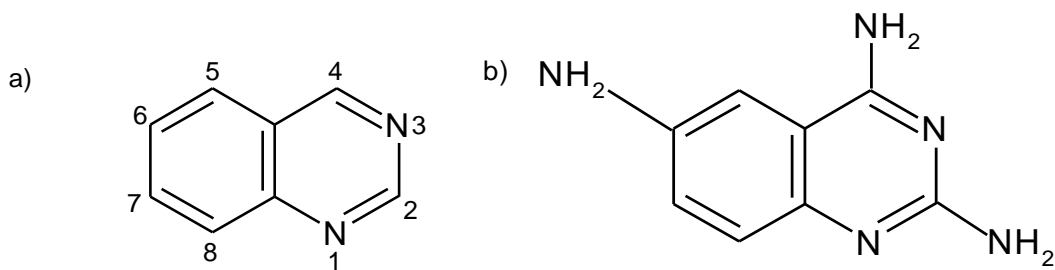


Figura 1. Estructuras químicas básicas de las quinazolininas. a) Quinazolina b) 2,4,6-triaminoquinazolina (TAQ).

La quinina es un compuesto que se aisló por primera vez en 1820 de la corteza del “árbol de la quina” o “cascaquilla”, perteneciente a la familia de las *Rubicaceas*, que comprenden varias especies del género *Cinchona*, entre ellas *C. officinalis*, *C. calisaya* y *C. pubescens*; siendo *Cinchona officinalis* una de las más estudiadas. Se han aislado alrededor de 25 alcaloides entre las diversas especies de *Cinchonas*, siendo los más importantes a nivel biológico y sintético la quinina y su estereoisómero quinidina, ya que son sustancias con mayor actividad biológica (Kouznetsov y Palma, 1997; Córdor *et al.*, 2009), y sus derivados pueden actuar como agentes analgésicos potentes, hipertensores, amebicidas, viricidas y como agentes antitumorales (Abuelizz *et al.*, 2017; Al-Rashood *et al.*, 2006; Alafeefy *et al.*, 2014; El-Messery *et al.*, 2016).

Aunque la quinina ha presentado propiedades terapéuticas importantes también se ha usado para inducir el aborto y ha causado la muerte de mujeres debido a su alto grado de toxicidad general. Tanto la quinina como su isómero quinidina afectan a los canales iónicos y causan arritmia potencialmente mortal en caso de sobredosis (Alvan *et al.*, 2017), desencadenando un número de efectos adversos conocidos como cinchonismo, un envenenamiento caracterizado por tinnitus, dolor de cabeza,

sordera, y el choque anafilactoide. El cinchonismo grave también produce otros efectos en el sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, la piel, y el sistema cardiovascular (Meléndez-Gómez y Kouznetsov, 2005).

2,4,6-Triaminoquinazolinás

La búsqueda de nuevas drogas contra la leishmaniasis y la malaria condujo a la síntesis de una serie de 2,4,6-triaminoquinazolinás (TAQ) (Figura 1). En estudios previos usando TAQ como estructura base, Davooll y colaboradores (1972), sintetizaron una serie de derivados teniendo diferentes sustituyentes en la posición 6. Varios compuestos mostraron una fuerte actividad antiparasitaria contra *Plasmodium berghei* en cultivos de células embrionarias de pollo. Posteriormente, se demostró la capacidad de la N6-(metilferreno)-2,4,6-triaminoquinazolina (H2) para cocrystalizarse con pteridina reductasa 1 de *Leishmania major* (ImPTR1). También se observó que varios derivados de la 2-4-diaminoquinazolina tenían la capacidad de interactuar con dihidrofolato reductasa (DHFR) aislada de *Leishmania mexicana* (ImxDHFR). PTR1 y DHFR están implicados en el metabolismo del folato en los protozoos parásitos (Mendoza-Martínez *et al.*, 2015).

En cuanto a la malaria, estudios previos muestran efectos de la N6-(4-metoxibencil)-2,4,6-triaminoquinazolina (M4) antiplasmodial y su complejo de inclusión (M4/HP β CD) con 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) en cultivos de eritrocitos humanos, que actúan en la etapa intraeritrocítica del parásito. Los resultados indicaron que M4/HP β CD interactuaba principalmente con la capa externa de la membrana, donde perturbaba el ordenamiento de las cadenas de lípidos y aumentaba la hidratación de las interfaces lípido-proteína en el interior de la membrana, razón importante para considerar a M4/HP β CD como formulación promisorio para el tratamiento de la malaria (Rojas-Aguirre *et al.*, 2012). La suma de estos resultados estimuló la búsqueda adicional de otros derivados de TAQ como agentes tripanocida, antileishmanial y antiplasmodial, tal es el caso de las TAQ MLB01, MLB02 y MLB13 (Figura 2), sintetizadas en la Facultad de Química con la finalidad de disminuir la toxicidad de la quinina y conferirle propiedades antioxidantes. En las pruebas *in vivo* realizadas en ratones en nuestro laboratorio

los resultados muestran que a dosis de 10 mg/kg de peso corporal, la TAQ-MLB13 no induce daño citotóxico ni genotóxico, debido probablemente a la adición de grupos metoxilo e hidroxilo a la molécula (Hernández, 2016; Olgúin, 2017).

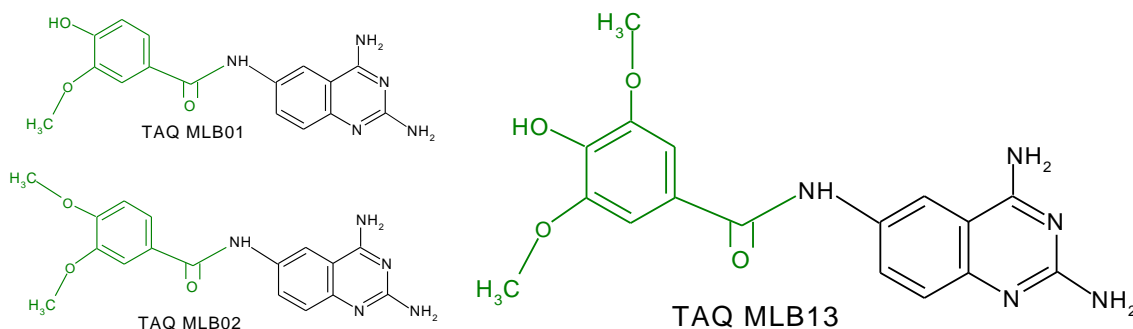


Figura 2. Estructuras químicas sintetizadas de TAQ. En color verde se muestran los grupos antioxidantes que fueron agregados.

1.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que tiene la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación celular, donando electrones para estabilizar a los radicales libres (RL) y neutralizar sus efectos dañinos, pueden ser endógenos (sintetizados por la célula) o exógenos (provenientes de la dieta). Estos compuestos protegen principalmente a los lípidos y las proteínas, y disminuyen la tasa de mutación en las células, mediante la disminución del daño al ADN (González-Torres *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2001). Son un grupo de sustancias que, al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Se pueden considerar como sustrato oxidable casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al interactuar más rápido con los RL y las especies reactivas del oxígeno (ERO) en un determinado microambiente (Thomas, 1994; González-Torres *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2001; Venereo, 2002).

Los antioxidantes endógenos son moléculas nucleofílicas con gran afinidad y que se comportan como compuestos muy susceptibles para que los oxiden las especies reactivas. Se clasifican según su naturaleza química en enzimáticos y no enzimáticos. Ejemplos de estos antioxidantes en los organismos son: el glutatión, el NADPH, la albúmina, el ácido úrico, la coenzima Q, la bilirrubina y la melatonina. Por otra parte, los antioxidantes exógenos son los que provienen de la dieta, tales como la vitamina E (α - tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico) y el β -caroteno (provitamina A). En ambos sistemas los antioxidantes ofrecen electrones con gran afinidad para los oxidantes y para que estos reaccionen con el antioxidante en lugar de que reaccionen y oxiden a las macromoléculas, por lo que se han propuesto como mecanismos de protección de daño genotóxico (Escorza *et al.*, 2009; Forman *et al.*, 2009).

1.3 Estrés oxidante

El concepto de Estrés Oxidante es considerado como un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de ERO y RL o por una disminución de los sistemas antioxidantes, y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante (Elejalde, 2001). Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Los RL son moléculas capaces de existir de forma independiente conteniendo en su última orbita uno o más electrones desapareados, haciéndolos muy inestables y altamente reactivos con capacidad para combinarse inespecíficamente, con las diferentes moléculas que integran la estructura celular y los derivados de estas, y con la capacidad de atacar cualquier tipo de biomolécula incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN (Halliwell, 2000). Resultado del estrés oxidante es una serie de procesos patológicos, atribuibles al ataque de RL, entre los más significativos están el envejecimiento prematuro, la aterosclerosis, catarata senil, insuficiencia renal aguda, diabetes mellitus, hipertensión arterial y cáncer (Elejalde, 2001).

1.4 Metales inductores de estrés oxidante

Según la Comisión Internacional para la Protección contra Mutágenos y Carcinogénicos Ambientales, la genotoxicidad se refiere a la inducción de daño al ADN, que puede ser o no reparado eficientemente. Los agentes causantes del daño, se denominan genotóxicos y pueden ser físicos, químicos o biológicos, y son capaces de atravesar las membranas celulares, una vez dentro, pueden ser de acción directa (es reactivo por sí mismo) o de acción indirecta (deben ser activado por enzimas metabólicas) (Sofoni, 1993).

Actualmente se sabe que la contaminación ambiental es la causa de enfermedades en los seres vivos. En los humanos se ha asociado el desarrollo de múltiples problemas de salud como consecuencia de la exposición a contaminantes provenientes de fuentes físicas, biológicas y químicas, siendo los agentes químicos los principales contaminantes actuando como alquilantes, análogos de bases, agentes de intercalación o inductores de ERO (Teaf y Middendorf, 2000; Escalona *et al.*, 2003). Dentro de los agentes inductores de ERO están los metales pesados como el hierro, cobre, vanadio, cobalto y cromo, que son capaces de hacer ciclos redox en los que un solo electrón puede ser aceptado o donado por el metal. Esta acción cataliza reacciones que producen radicales. Las reacciones más importantes son la reacción Fenton y la reacción de Haber-Weiss, en las que participan el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en la formación del radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Jomova y Valko, 2011).

Cromo hexavalente Cr(VI)

El cromo (Cr) ocupa el puesto 21 de los elementos más abundantes en el planeta (Krauskopf, 1979), y se encuentra prácticamente en todas las fases, incluido el aire, agua, suelo y la biota. El Cr es un contaminante activo redox que puede existir en estados de oxidación que varían de -2 a +6, pero sólo +3 y +6 se encuentran típicamente dentro del rango de pH y potencial redox común en sistemas ambientales (Fendorf *et al.*, 2004; Shupack, 1991). De estos compuestos, el Cr(VI) es uno de los más estudiados ya que sus compuestos son bien conocidos como reactivos de laboratorio y como intermedios en la industria manufacturera. Los principales usos de los compuestos de Cr(VI) incluyen revestimiento de metales, fabricación de pigmentos y colorantes, inhibidores de corrosión, síntesis química, la producción de refractarios, curtido de cuero y preservación de la madera (Blade *et al.*, 2007). Si bien el Cr(III) es considerado como micronutriente esencial implicado en el metabolismo de azúcares y grasas, se ha comprobado que el Cr(VI) es genotóxico (García-Rodríguez *et al.*, 2001). El Cr(VI) es capaz de entrar en la célula a través de los canales aniónicos, en donde el ascorbato, el glutatión, y la cisteína lo reducen a Cr(V), Cr(IV) y Cr(III). La reducción de Cr(VI) a Cr(III) puede dar lugar a RL (Figura 3) que son muy reactivos y afines a las proteínas y al ADN (ATSDR, 2012). Los resultados de estudios de exposición ocupacional a Cr(VI) en seres humanos, proporcionan evidencia de rompimientos de la cadena de ADN, aberraciones cromosómicas, aumento en el intercambio de cromátidas hermanas, reticulación de las proteínas y mutaciones en el gen supresor tumoral *p53*, siendo algunos de los principales factores que pueden desempeñar un papel importante en la genotoxicidad celular. En particular en estudios *in vivo* se ha observado daño genotóxico inducido por Cr(VI) mediante el aumento de las frecuencias de MN a las 24 y 48 horas en grupos de ratones tratados con CrO₃ (ATSDR, 2012; García-Rodríguez *et al.*, 2001; O'Brian 2003).

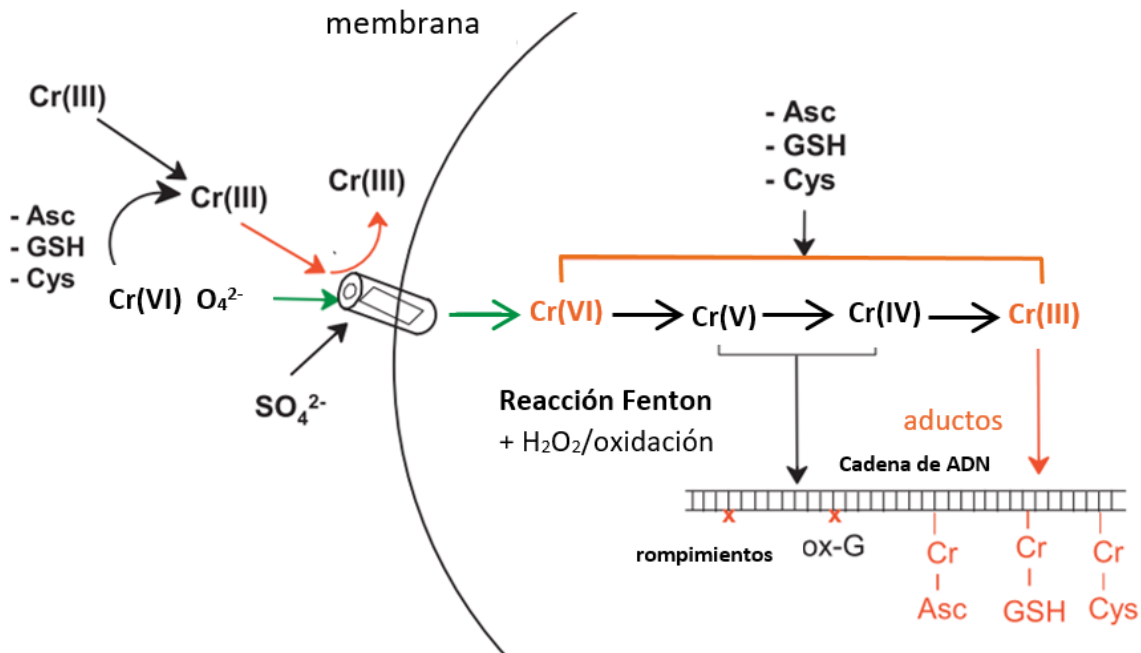


Figura 3. Mecanismo del Cr(VI) para entrar a la célula y causar daño al ADN (modificada de Jomova y Valko, 2011).

1.5 Reparación del ADN

Los daños en el ADN pueden generar cambios en la expresión de genes, crecimiento celular e incluso tumores. Estos daños pueden ser atribuidos a diversos procesos metabólicos endógenos, que producen radicales libres de oxígeno (RLO) y nitrógeno (RLN) altamente reactivos, que alteran bases y atacan directamente el ADN (Barnes y Lindahl, 2004). Además de estos agentes generados endógenamente encontramos los agentes genotóxicos exógenos, tales como la luz ultravioleta y otros tipos de radiación y ciertos metales que generan, directa o indirectamente, daños en la molécula de. La mayoría de estos cambios en el ADN son temporales porque se corrigen de inmediato mediante un conjunto de procesos que colectivamente se llaman reparación del ADN (Alberts *et al.*, 2008; Cardona, Aparecida y Morales, 2014). Los mecanismos de reparación se dividen en tres grandes categorías:

1) Mecanismos por reversión de la lesión

2) Mecanismos por reparación indirecta, dentro de esta categoría existen tres mecanismos: reparación por escisión de bases o BER (por sus siglas en inglés “Base Excision Repair”), reparación por escisión de nucleótidos o NER (por sus siglas en inglés “Nucleotide Excision Repair”) y reparación por apareamiento erróneo (“Mitsmach Repair”). El principio de los tres mecanismos de reparación implica: corte, empalme de la región dañada e inserción de nuevas bases, y

3) Mecanismo de reparación de rompimientos de doble cadena DSB (por sus siglas en inglés “double-strand breaks”) siendo de los daños más severos al ADN, existen dos vías principales para este tipo de reparación, la recombinación homóloga y la recombinación de extremos no homólogos (Azqueta *et al.*, 2013; Barnes y Lindahl, 2004; Cardona *et al.*, 2014; Hartwig y Schwerdtle, 2002).

El daño inducido al ADN por estrés oxidante genera sitios apurínicos o apirimidínicos, y rompimientos de cadena simple (“SSB” por sus siglas en inglés “single-strand breaks”) y de cadena doble DSB. Una de las modificaciones de base de ADN más comunes es la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua). Se origina a partir de la adición del radical hidroxilo a la posición C8 del anillo de guanina (Douki *et al.*, 1997). Por ello, 8-oxoGua es utilizada como marcador para detectar niveles altos de estrés oxidante, estas lesiones en última instancia no son letales para la célula, pero se consideran altamente mutagénicas (Jiranusornkul y Laughton, 2008; Kryston *et al.*, 2011).

1.6 Pruebas para evaluar el daño genotóxico

En la actualidad no existe un único test capaz de proporcionar por sí solo información relevante sobre la actividad de un compuesto, sino que es imprescindible la realización de una serie de pruebas en las que se combinan test *in vitro* junto con otros *in vivo*, que permiten integrar determinados factores que no son considerados en una sola prueba (Repetto y Repetto, 2009). El ensayo *in vivo* es especialmente relevante para evaluar el riesgo de genotoxicidad, pues permite tomar en consideración factores del metabolismo de todo el organismo, farmacocinética, y los procesos de reparación del ADN, también es útil en la investigación adicional de los efectos mutagénicos detectados mediante una prueba

de genotoxicidad *in vitro*. Es importante señalar que los compuestos genotóxicos afectan con mayor frecuencia a las células normales que proliferan rápidamente, como son las células epiteliales y de médula ósea; por lo tanto, existe un gran número de células susceptibles a estos efectos dañinos (Goodman *et al.*, 1996; Krishna y Hayashi, 2000).

Micronúcleos

La prueba de micronúcleos (MN) es un método ampliamente utilizado para la detección del daño genotóxico, producido por diferentes sustancias químicas y agentes físicos. Indica el daño mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados (Figura 4). Los MN son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que por causa de agentes genotóxicos, quedan fuera del núcleo durante la división celular, su forma es generalmente redonda o almendrada y alcanza un diámetro entre 0.4 a 1.6 micras (Fuic y Mijic, 1999; Heddle *et al.*, 1991; Schmid, 1975). La evaluación de MN *in vivo* empleando células de médula ósea o sangre periférica de mamíferos es una de las pruebas recomendadas para evaluar la genotoxicidad por las agencias reguladoras encargadas de valorar la seguridad de un nuevo fármaco, además de pruebas de citotoxicidad como viabilidad celular y apoptosis (Krishna *et al.*, 1994; Krishna y Hayashi, 2000). Esta prueba permite detectar agentes clastogénicos y aneuploidogénicos. El ensayo de MN se puede desarrollar con cualquier tipo de célula en división, sin embargo, los eritrocitos presentan características que le confieren ventajas para analizar. El normoblasto ortocromático, 5 horas después de la última mitosis, expulsa su núcleo al pasar de la médula ósea al torrente circulatorio. Al perder su núcleo, el normoblasto ortocromático se convierte en reticulocito o eritrocito policromático (EPC), que es el eritrocito joven que sale a la circulación. Los EPC tardan aproximadamente 48 horas para convertirse en eritrocitos maduros o eritrocitos normocromáticos (ENC) (Lewin, 2000). La visualización de los EPC con MN es fácil si se utiliza alguna técnica de tinción como May-Grunwald, Giemsa o Naranja de Acridina (NA) (Hayashi *et al.*, 1990).

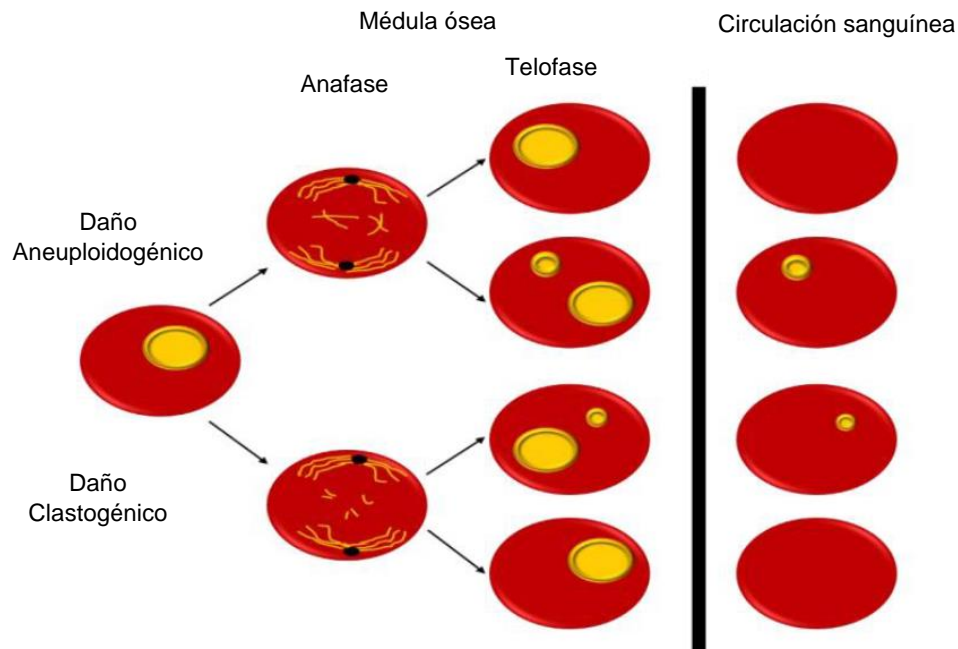


Figura 4. Formación de un MN (tomada de Ramos-León, 2016).

Apoptosis

La muerte celular es un fenómeno que puede ser resultado de mecanismos como la apoptosis y la necrosis. En la muerte celular por apoptosis o también llamada muerte celular programada (ya que requiere de la activación de genes para que se lleve a cabo), la célula muere por la activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de su membrana, y sólo va a presentar pérdida de dicha integridad hacia el final del proceso (Schwartzman y Cidlowski, 1993). Por otra parte, la necrosis es el proceso de muerte que se presenta cuando una célula tiene daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana que la lleva a muerte por lisis. En estas circunstancias se libera el contenido celular, lo que *in vivo* favorece la aparición de procesos inflamatorios (Moreno, Cuéllar, y González, 2000). Desde el punto de vista genético hay clara evidencia de que, a diferencia del proceso necrótico, el fenómeno de apoptosis involucra una dinámica entre genes específicos. Los principales genes que se han reportado por regular de manera positiva o negativa la apoptosis en células humanas incluyen: 1) genes inhibidores: *bcl-2* y *bcl-xL*; y 2) genes promotores: *bax*, *bcl-xs*, *ICE* (por sus siglas en inglés "Interleukin 1- β Converting Enzyme"), *c-myc* y *p53*, mutaciones en estos genes pueden generar procesos patológicos

(Mastrangelo y Betenbaugh, 1995). Existe un conjunto variado de técnicas que permiten valorar diferentes aspectos del proceso de apoptosis, como los cambios en la membrana plasmática, ya que en las células que mueren es permeable a ciertos reactivos (colorantes o fluorocromos) y pueden ser teñidas con ellos. Sin embargo, las células vivas excluyen a los denominados “colorantes vitales”, que no penetran a través de la membrana plasmática. Ejemplos de estas moléculas es el yoduro de propidio, NA y bromuro de etidio (BrEt). La pérdida de viabilidad celular por lo tanto se puede medir como pérdida de la integridad de la membrana (Irachela, 2007; McGahon *et al.*, 1995; Salazar, 2009).

Evaluación de rompimientos de cadena de ADN

La electroforesis de células individuales o ensayo cometa es una prueba rápida, confiable y con una sensibilidad que supera más de 100 veces a las pruebas citogenéticas. Creada por Rydberg y Johanson, y modificada por Singh, permite detectar DSB y SSB, sitios lábiles al álcali (SLA) y detección tardía de sitios de reparación del ADN (Singh *et al.*, 1988; Rojas *et al.*, 1999). Este ensayo puede ser aplicado a cualquier célula eucariota y brinda información más precisa del nivel de daño al ADN, que se determina por la longitud de la cauda del cometa o por el “momento de la cauda” (longitud de la cauda del cometa multiplicado por la intensidad de la fluorescencia) (Rodríguez-Rey *et al.*, 2016).

El ensayo cometa *in vivo* consiste en someter a células a lisis para remover todas las proteínas celulares y permitir el desenrollamiento por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN bajo condiciones alcalina/neutras. A $\text{pH} > 13$ los SLA como los sitiosapurínicos son rápidamente transformados a SSB. En electroforesis los fragmentos negativamente cargados de ADN dañado o cromatina relajada migran fuera del núcleo en dirección al ánodo para formar un halo, que al ser teñidos se aprecia una estructura parecida a la de un cometa. Las células con un aumento de daño muestran un incremento de la migración del ADN siendo los SSB los causantes de mayor frecuencia de migración del material genético (Collins, 2014; Rojas *et al.*, 1999).

1.7 Antioxidantes totales

La suma de los antioxidantes endógenos y exógenos representa la actividad antioxidante total del sistema. La cooperación entre los diferentes antioxidantes proporciona una mayor protección contra el ataque de ERO o nitrógeno, que cualquier compuesto por sí solo, por lo que el sistema antioxidante puede ser evaluado indirectamente como una capacidad antioxidante total. Las técnicas desarrolladas para evaluarla de las muestras biológicas valoran la habilidad de los compuestos antioxidantes (donantes de un hidrógeno o un electrón) presentes en el fluido o célula, para reducir las especies oxidantes introducidas (iniciador) en un sistema de ensayo. Con lo descrito, se puede indicar que la evaluación de la capacidad antioxidante total es un parámetro que puede ser útil al proporcionar más información biológica relevante, ya que considera el efecto acumulativo de todos los antioxidantes presentes en el organismo (Escorza *et al.*, 2009).

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las quinazolininas deben su importancia en la química médica debido a sus propiedades biológicas como potenciales terapéuticos contra la malaria y la leishmaniasis. En el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM se ha sintetizado un grupo de quinazolininas llamadas TAQ, que en pruebas *in vitro* han obtenido resultados prometedores contra estas enfermedades. A estas moléculas además de realizarles modificaciones para hacerlas menos tóxicas, también se les han conferido propiedades antioxidantes.

Como parte del desarrollo, síntesis o mejora de nuevos medicamentos se debe de evaluar su potencial tóxico en modelos experimentales, para ello se emplean baterías de ensayos con especies animales, que comprenden modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Las mismas abarcan diferentes dianas de toxicidad, como la evaluación de la genotoxicidad. La valoración armónica de los resultados de estos estudios permite llegar a un criterio más integral de la toxicidad de la sustancia evaluada y sus posibles consecuencias para el ser humano.

Nuestro grupo de investigación trabaja en colaboración con la Facultad de Química de la UNAM mediante la realización de las pruebas genotóxicas *in vivo*. De las TAQ sintetizadas, se ha observado que la TAQ-MLB13 a la que le han adicionado grupos metoxilo e hidroxilo es la que protege más eficientemente del daño genotóxico inducido por Cr(VI) mediante la disminución de las frecuencias de MN y el incremento de la viabilidad celular. Por ello es de interés indagar los efectos de la administración de la TAQ-MLB13 en ratones expuestos a metales inductores de estrés oxidante como el Cr(VI) mediante la evaluación de la reparación del daño al ADN, las frecuencias de MN, apoptosis y los niveles de antioxidantes totales.

III.- HIPÓTESIS

Si a la TAQ-MLB13 se le han agregado grupos metoxilo e hidroxilo para conferirles propiedades antioxidantes y se ha comprobado que reduce el daño genotóxico inducido por compuestos metálicos asociados a estrés oxidante como los compuestos de Cr(VI), entonces se espera que la TAQ-MLB13 modifique los niveles de antioxidantes totales, active la reparación del ADN, induzca apoptosis y reduzca las frecuencias de MN en ratones tratados con la TAQ-MLB13 previo al tratamiento del CrO₃.

IV.- OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de la TAQ-MLB13 sobre las frecuencias de MN y apoptosis, los niveles de antioxidantes totales y la reparación del daño al ADN en ratones tratados con compuestos metálicos de Cr(VI).

4.2 Objetivos Particulares

- 1.- Evaluar el efecto del CrO₃, TAQ-MLB13 y la combinación CrO₃ + TAQ-MLB13 sobre la inducción de MN en sangre periférica de ratones.
- 2.- Evaluar el efecto del CrO₃, TAQ-MLB13 y la combinación CrO₃ + TAQ-MLB13 sobre la apoptosis y necrosis en sangre periférica de ratones.
- 3.- Evaluar el efecto del CrO₃, TAQ-MLB13 y la combinación CrO₃ + TAQ-MLB13 sobre la reparación del ADN, en sangre periférica de ratones empleando la electroforesis unicelular alcalina en gel.
- 4.- Evaluar el efecto del CrO₃, TAQ-MLB13, y la combinación CrO₃ + TAQ-MLB13 sobre la citotoxicidad en sangre periférica de ratones mediante la relación de los EPC/ENC y viabilidad celular.
- 5.- Evaluar el efecto del CrO₃, la TAQ-MLB13, y la combinación CrO₃ + TAQ-MLB13 sobre los niveles de antioxidantes totales en plasma sanguíneo de ratones mediante el método del ABTS (2,2'-azino-di- [sulfonato de 3-etilbenzotiazolina]).

V.- MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Animales

Se emplearon ratones hembra sexualmente maduras de la cepa Hsd:ICR de entre 45 y 60 días de edad. Se desarrolló el pie de cría en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, con animales provenientes del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones estériles en cajas de plástico, a temperatura y humedad controladas, con fotoperiodo de 12/12 horas luz-oscuridad, alimentación con nutricubos y libre acceso al agua. Los criterios de evaluación y protocolos de trabajo fueron establecidos con base en los lineamientos de los programas GENOTOX, la EPA, la ECETOC y la FDA (Heddle, 1983; FDA, 2000).

5.2 Reactivos

Los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, Mo, USA) Colorante NA [CAS No. 10127-02-3], Colorante BrEt [CAS No. 1239-45-8], CrO_3 [CAS No. 1333-82-0], DMSO [CAS No. 67-68-5], Agarosa de punto bajo de fusión [CAS 39346-81-1], Agarosa de punto normal de fusión [CAS No. 9012-36-6], NaCl [CAS 7647-14-5], EDTA [CAS 60-00-4], NaOH [CAS 1310-73-2], Trizma® Base [CAS 77-86-1], PBS [CAS No.1314-87-0], Triton™ X-100 [CAS No. 9002-93-1] y alcohol etílico [CAS No. 64-17-5]. Para la determinación de antioxidantes totales, se utilizó el Cayman's Antioxidant Assay Kit (Item No 709001).

La TAQ-MLB13 fue proporcionada por el Departamento de Farmacia a cargo del Dr. Francisco Hernández Luis de la Facultad de Química, UNAM.

5.3 Diseño experimental

La TAQ-MLB13 se preparó en una solución estándar mediante su disolución en DMSO (10 mg/ml); mientras que el DMSO y el CrO_3 se disolvieron en agua inyectable. Una vez preparados los reactivos se administraron inmediatamente vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de alrededor de 0.25 ml.

Los organismos se dividieron en grupos de 5 individuos al azar de la siguiente manera:

- 1.- Grupo Testigo Agua, se les administró una dosis de 0.25 ml de agua inyectable.
- 2.- Grupo Testigo DMSO, se les administró en concentración al 11.5%.
- 3.- Grupo CrO₃, se les administró una dosis de 20 mg/kg.
- 4.- Grupo TAQ-MLB13, se les administró una dosis de 10 mg/kg.
- 5.- Grupo combinado TAQ-MLB13 + CrO₃ a los que se les administró la TAQ-MLB13 cuatro horas previas al tratamiento con CrO₃.

Las dosis administradas a cada grupo fueron seleccionadas con base en resultados previamente realizados en nuestro grupo de trabajo. La dosis de 20 mg/kg de CrO₃ induce daño genotóxico y citotóxico (García-Rodríguez *et al*, 2001), mientras que la dosis de 10 mg/kg de la TAQ-MLB13 no induce daño genotóxico ni citotóxico (Hernández, 2016).

Una vez seleccionadas las dosis de TAQ-MLB13, CrO₃ y sus testigos, se administraron de acuerdo con los protocolos. Se evaluó la frecuencia de MN, relación EPC/ENC, viabilidad celular, apoptosis, ensayo cometa y antioxidantes totales como se muestra en la Figura 5.

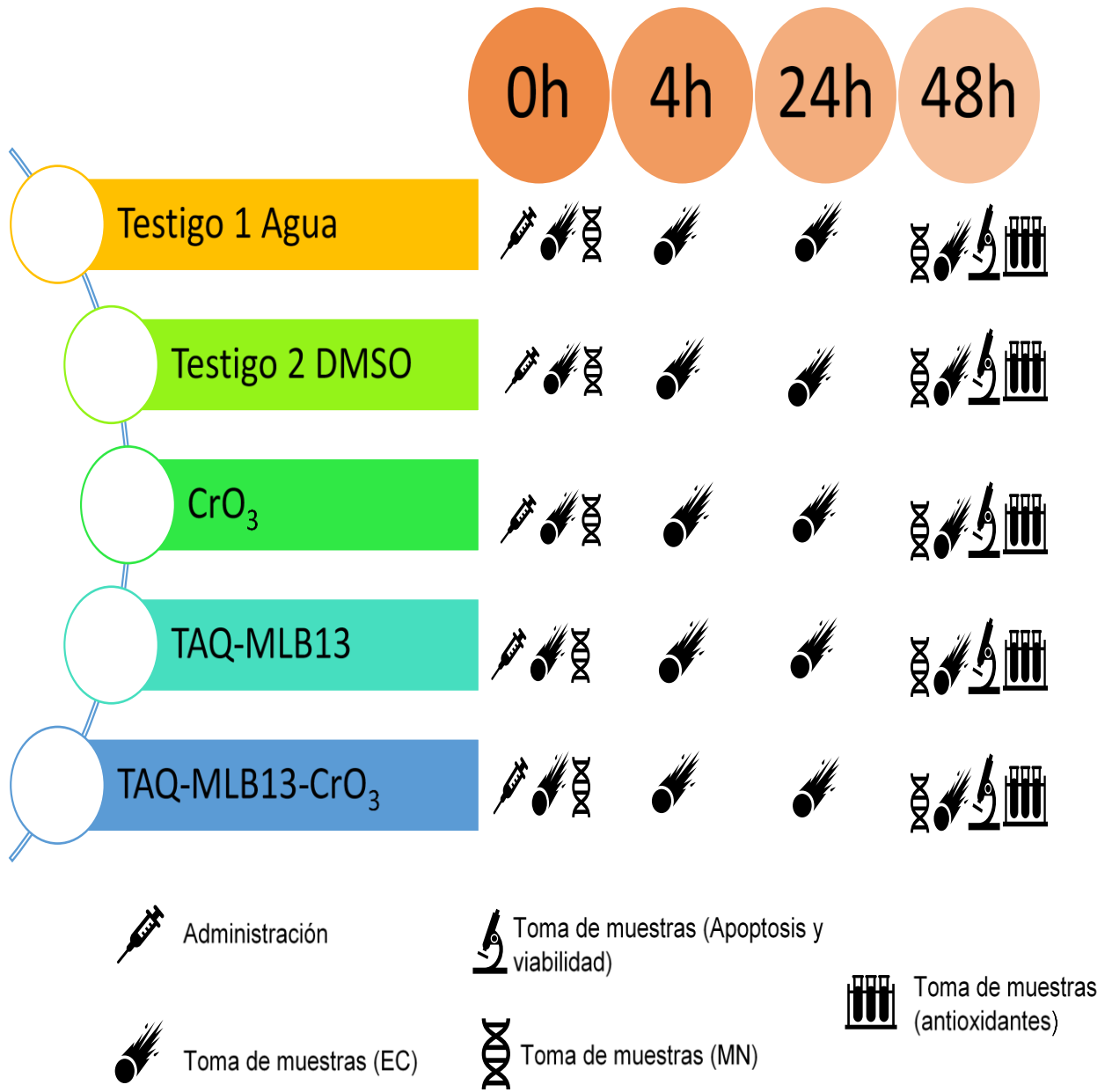


Figura 5. Protocolo empleado para las administraciones por vía i.p. y las evaluaciones de los tratamientos de TAQ MLB13, CrO₃ y sus testigos en ratones de la cepa Hsd:ICR.

5.4 Ensayo de Micronúcleos y relación EPC/ENC

- *Preparación de laminillas*

Portaobjetos limpios y precalentados a 70 °C fueron teñidos con una solución de NA (1 mg/ml), de acuerdo con la técnica descrita por Hayashi (1990), se dejaron secar y se guardaron a temperatura ambiente y en obscuridad hasta su uso.

- *Evaluación de MN y relación EPC/ENC*

Las evaluaciones se realizaron de acuerdo con la técnica descrita por Hayashi (1990). Se tomaron muestras de sangre periférica de ratón y se colocaron en laminillas previamente cubiertas con NA, se guardaron en cajas de plástico a 4 °C y en obscuridad hasta su análisis, al menos 24 horas después y procurando no exceder 8 días. Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión amarilla (Nikon Ophthiphon-2), la tinción de los eritrocitos con NA permite identificar los EPC debido a que contienen ARN-ribosomal y no han degradado el ADN permitiendo al NA intercalarse observándose de color amarillo; y los ENC no teñidos ya que han degradado el material genético (Figura 6). Para la evaluación del daño citotóxico se analizaron 2000 eritrocitos por ratón, de los cuales se identificaron los EPC y ENC. El daño genotóxico se evaluó en 4000 EPC por ratón, entre los cuales se identificaron a los EPC-MN.

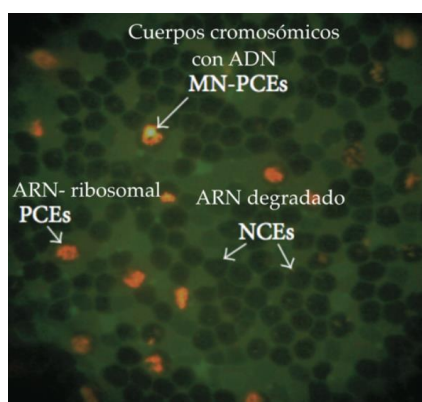


Figura 6. Eritrocitos de sangre periférica de ratón teñidos con la técnica de NA. Se observan los ENC, EPC y EPC-MN (tomada de García-Rodríguez et al., 2014).

5.5 Apoptosis y viabilidad

- *Preparación de reactivos y muestras*

Se preparó una solución de NA/BrEt (100 µg/ml) de acuerdo con McGahon *et al.* (1995) y García-Rodríguez *et al.* (2013). Se tomaron muestras de sangre (100 µl) de la vena caudal y se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 10 µl del colorante NA/BrEt se colocaron sobre portaobjetos limpios y se evaluaron inmediatamente.

- *Evaluación de apoptosis y viabilidad celular*

Mediante un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión amarilla (Nikon Ophthiphon-2), se evaluaron 300 células por ratón, de las que se identificaron las células sanas (color verde y de estructura uniforme), las apoptóticas (fragmentadas, con cuerpos apoptóticos visibles) y las células necróticas (color rojo) (Figura 7). Para el análisis de viabilidad se contabilizaron células viables (teñidas de color verde) y células no viables (teñidas de color rojo).

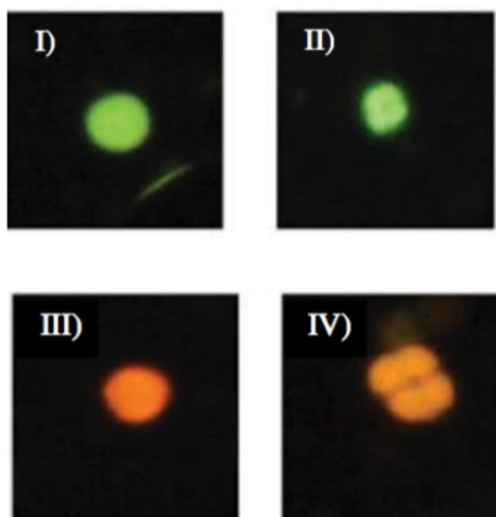


Figura 7. Leucocitos de sangre periférica de ratón teñidos con la técnica por tinción diferencial de los fluorocromos NA/BrEt. Se observan: I) células sanas o normales, II) y IV) células apoptóticas y III) células necróticas (García-Rodríguez *et al.*, 2016).

5.6 Ensayo cometa

- *Preparación de laminillas*

Se preparo una solución de agarosa de punto bajo de fusión al 0.5% en PBS y se reservó en un frasco hermético hasta su uso. También se preparó una solución al 0.7% de agarosa de punto normal de fusión en agua estéril a 50 °C según la técnica propuesta por (Singh *et al.*, 1988), posteriormente se sumergieron en esta solución portaobjetos esmerilados, limpios y previamente desengrasados con etanol/metanol, hasta cubrir el área suficiente para colocar la muestra, y se prosiguió a retirar cuidadosamente la agarosa de la parte no esmerilada, se dejaron secar a temperatura ambiente, y se guardaron en cajas de plástico hasta su uso.

- *Toma de las muestras*

Se tomaron por duplicado muestras de 5 µl de sangre de la vena caudal de los ratones y se homogeneizó con 75 µl de agarosa de punto bajo de fusión al 0.5%, inmediatamente se colocó sobre los portaobjetos previamente cubiertos con agarosa de punto normal de fusión, se cubrieron con cubreobjetos y se dejaron solidificar sobre una cama de hielo, una vez polimerizada la agarosa se retiró el cubreobjetos y se colocó otra capa con 80 µl de agarosa de punto bajo de fusión y se dejó polimerizar. Una vez obtenidas las muestras se sumergieron en solución de lisis a pH 10 durante al menos 2 horas, a 4 °C y en obscuridad (Singh *et al.*, 1988).

- *Electroforesis alcalina*

Las muestras se colocaron en una cámara de electroforesis, se agregó una solución amortiguadora con pH>13 hasta cubrirlas, y se dejó reposar durante 20 min con la finalidad de permitir la desnaturalización del ADN, una vez transcurrido el tiempo se corrió la electroforesis a una corriente de 300 mA y 25 V durante 20 min en total obscuridad. Finalmente se neutralizaron con Tris 0.4 M a pH 7.5 durante 10 min, enseguida se fijaron en alcohol etílico al 70% por 5 min y se dejaron secar a temperatura ambiente.

- *Tinción y evaluación*

Una vez que se fijaron y secaron, las muestras se tiñeron con 75 µl de BrEt a una concentración de 20 µg/ml y se observaron con un microscopio de fluorescencia a 400X con un ocular graduado y calibrado, se evaluaron 300 células por ratón midiendo la longitud total del cometa, el diámetro del núcleo y la longitud de la cauda. Para categorizarlos primero se calculó el porcentaje de ADN en la cauda obtenido con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ADN en la cauda} = \frac{\text{longitud de la cauda}}{\text{longitud total del cometa}} (100)$$

Posteriormente cada cometa fue clasificado en una categoría entre 0 y 4, de acuerdo con el sistema propuesto por Collins (2004) y Muñoz (2009) de la siguiente forma:

Nivel de daño 0 (ninguno): <5% de ADN en la cauda

Nivel de daño 1 (bajo): 5-10 % de ADN en la cauda

Nivel de daño 2 (medio): 10-40% de ADN en la cauda

Nivel de daño 3 (alto): 40-89% de ADN en la cauda

Nivel de daño 4 (total): >90% de ADN en la cauda

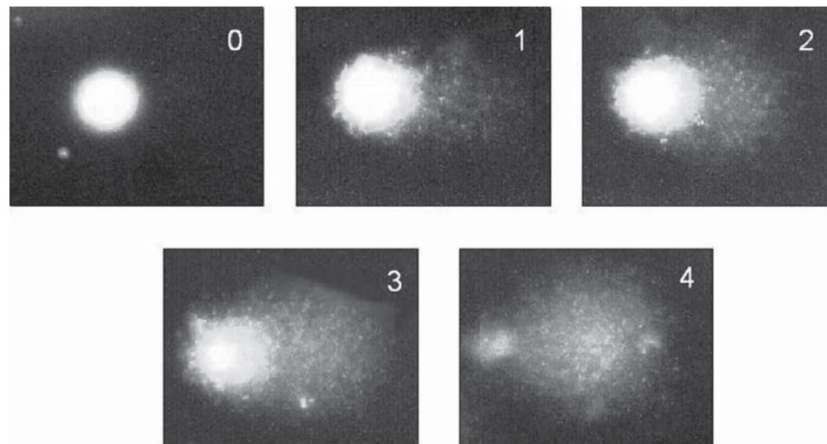


Figura 8. Clasificación de cometas según el nivel de daño observado (tomada de Collins, 2004).

Finalmente, la magnitud del daño en el ADN se expresó en unidades arbitrarias, donde el número de cometas observados fue multiplicado por la clasificación de los mismos (0-4) y los valores obtenidos fueron sumados en cada gel:

$$\text{unidades arbitrarias (UA)} = \sum_i TCG(i)$$

Donde \sum_i es la suma, y $TCG(i)$ es el total de células clasificadas con grado de daño al ADN (Cofiño *et al.*, 2007; Collins, 2004).

5.7 Antioxidantes totales

La determinación de la capacidad antioxidante total se realizó mediante el kit comercial “Antioxidant Assay” (Cayman) que se basa en el método propuesto por Miller y colaboradores (1993), donde se mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para inhibir la oxidación de ABTS (2,2'-azino-di- [sulfonato de 3-etilbenzotiazolina]) incubada con metmioglobina y H₂O₂ para producir ABTS^{•+}, la capacidad de los antioxidantes de la muestra para evitar la oxidación del ABTS se compara con la de Trolox, un análogo del tocoferol soluble en agua, que se utiliza como un estándar antioxidante. La prueba se realizó en plasma sanguíneo obtenido a las 48 horas de administrados los tratamientos, se tomaron 300 µl de sangre con heparina para evitar la coagulación y se centrifugaron a 3,500 rpm a 4 °C durante 10 minutos. posteriormente se tomaron 10 µl de plasma y se diluyeron 1:10 con una solución amortiguadora, de esta muestra se tomaron 10 µl y se colocaron en una placa de 96 pocillos, finalmente se cuantificó la cantidad de ABTS^{•+} producido a través de la absorbancia en el espectrofotómetro a 405 nm. El valor de los antioxidantes se expresó con un equivalente de la concentración milimolar (mM) de la solución Trolox.

5.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos de MN, relación EPC/ENC, viabilidad celular, apoptosis y necrosis, niveles de antioxidantes totales y ensayo cometa se presentan en promedios con su desviación estándar (d.e.), se les aplicó un análisis de varianzas (ANDEVA) seguido de una prueba Tukey o Dunnett de acuerdo con la homogeneidad de varianzas. Con la prueba de MN se realizó el cálculo del NIF y los datos obtenidos se analizaron mediante una prueba de Chi-cuadrada. Para los análisis estadísticos se emplearon los paquetes IBM SPSS, “Statistic” 21 y “GraphPad Prism 5”. Para todos los análisis se consideró una $p < 0.05$ como significativa (Adler *et al.*, 2004; García-Rodríguez *et al.*, 2001).

VI.- RESULTADOS

6.1 Toxicidad

En el Cuadro 1 se muestra el seguimiento de los síntomas que podrían indicar toxicidad clínica en los organismos (pelo erizado, diarrea, pérdida de apetito y disminución de actividad). Se observa que únicamente el grupo tratado con CrO_3 presenta dichos síntomas.

Cuadro 1. Signos de toxicidad clínica observados en los grupos tratados con TAQ-MLB13 y CrO_3

Tratamiento	Pelo erizado	Diarrea	Falta de apetito	Disminución de actividad
Testigo/Agua	+/-	+/-	+/-	+/-
Testigo/DMSO	+/-	+/-	+/-	+/-
TAQ-MLB13	+/-	+/-	+/-	+/-
CrO_3	++	+	++	+++
TAQ-MLB13 + CrO_3	+/-	+/-	+/-	+/-

+/-: sin efecto. +: efecto leve. ++: efecto moderado. +++: efecto severo.

6.2 Genotoxicidad

En el Cuadro 2 se muestra el promedio de MN evaluados en sangre periférica a las 0 y 48 horas. Se observa que la administración sola de TAQ-MLB13 no incrementa los promedios de MN de manera significativa al compararse con su propio testigo (Testigo/DMSO) y contra su propia hora cero. El daño genotóxico del grupo tratado con CrO₃ se corroboró ya que se observó un incremento significativo en los promedios de MN al compararse con su grupo testigo (Testigo/Agua) y contra su propia hora cero. Cuando se administró el tratamiento de TAQ-MLB13 previo al tratamiento con CrO₃, se disminuyeron los MN comparado con el CrO₃, aunque no resultado estadísticamente significativo.

Cuadro 2. Promedio de MN en sangre periférica de los grupos tratados con la TAQ-MLB13 y CrO₃.

Tratamiento	Dosis (mg/kg de peso)	N	Hora	MN/1000 células (media ± d.e.)	ANDEVA
Testigo/Agua	-	5	0	0.45 ± 0.33	
		5	48	0.45 ± 0.11	
Testigo/DMSO	-	5	0	0.70 ± 0.33	
		5	48	0.65 ± 0.14	
TAQ-MLB13	10	5	0	0.55 ± 0.27	
		5	48	0.85 ± 0.14	
CrO ₃	20	5	0	0.80 ± 0.45	
		4	48	2.81 ± 0.63	a,b,
TAQ-MLB13 + CrO ₃	10-20	5	0	0.90 ± 0.58	
		5	48	1.05 ± 0.33	

p<0.05; ^a vs CrO₃ hora 0; ^b vs Testigo/Agua.

Debido a la variabilidad que se observó en los promedios de MN a la hora 0 (antes de administrar los tratamientos), se realizó el cálculo de la Frecuencia de Inducción Neta (“NIF” por sus siglas en inglés), que se basa en la premisa de que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, y consiste en restar el promedio de MN observados a la hora 0, a las siguientes horas de evaluación (48 horas), como lo indica la siguiente formula:

$$NIF = MNaX_1 - MNaX_0$$

Donde:

a = grupo

X₁ = tiempo de evaluación

X₀ = tiempo 0

En la Figura 9 se muestra el análisis por grupo del NIF a las 48 horas de administrados los tratamientos, calculado para 4,000 EPC. Al realizar el análisis se corroboró la disminución de los MN (alrededor del 87%) en el grupo TAQ-MLB13 + CrO₃.

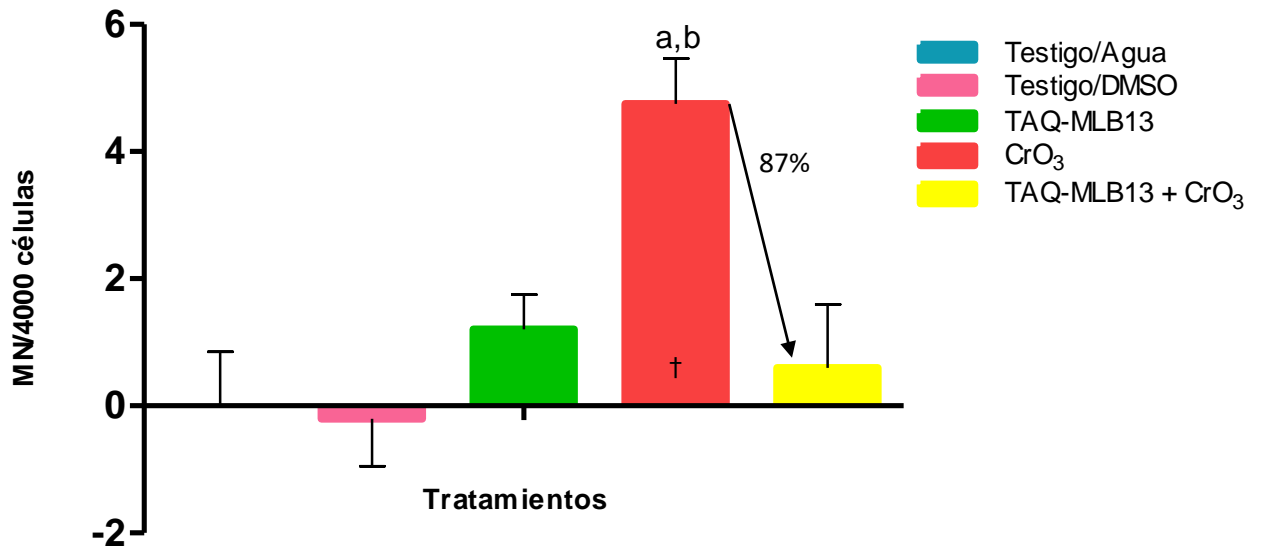


Figura 9. Inducción de Frecuencia Neta (NIF) de MN a las 48h de administrados los tratamientos. Se presentan en promedios. Se muestra el % de disminución de frecuencias comparado entre el grupo CrO₃ y TAQ-MLB13 + CrO₃. p<0.05; ^a vs Testigo/Agua; ^b vs TAQ-MLB13 + CrO₃. †: Muerte de un ratón en el grupo CrO₃.

Apoptosis y Necrosis

En la Figura 10 se muestran los porcentajes de apoptosis (A) y necrosis (B). Se observa que no hay incremento en los promedios de células apoptóticas cuando se administra la TAQ-MLB13 en comparación con los grupos testigo. En el grupo tratado con CrO_3 se observa un aumento significativo de las células apoptóticas al compararse con su testigo. Cuando se administró la TAQ-MLB13 previo al tratamiento del CrO_3 se disminuyeron las células apoptóticas en comparación con el grupo tratado con el CrO_3 , sin embargo, el promedio de células necróticas aumento en comparación con los grupos testigo, aunque no fue significativo.

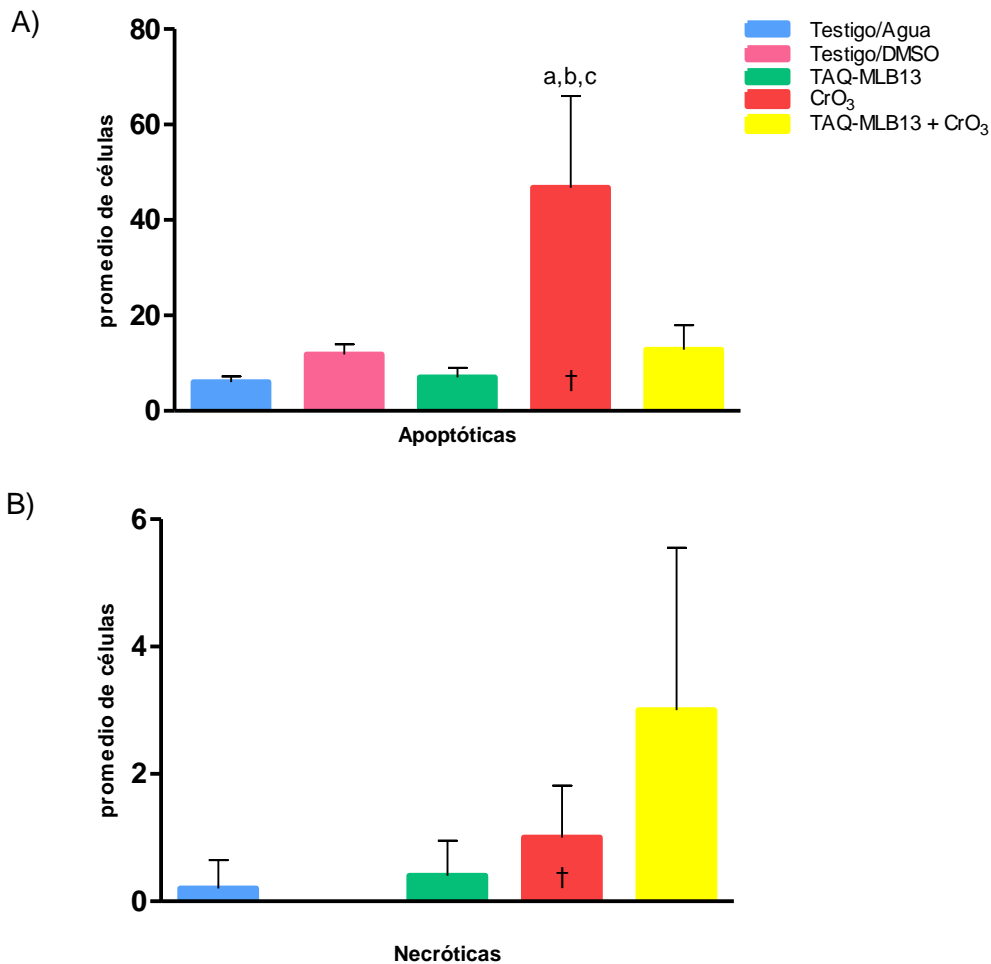


Figura 10. Efecto de la TAQ-MLB13 y CrO_3 sobre el promedio de A) células apoptóticas y B) necróticas. $p < 0.05$; ^a vs Testigo/Agua; ^b vs TAQ-MLB13; ^c vs TAQ-MLB13 + CrO_3 . †: Muerte de un ratón en el grupo CrO_3 .

Ensayo cometa

En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos del análisis del número de cometas observados en 1,500 núcleos en sangre periférica a las 0, 4, 24, y 48 horas después de administrar los tratamientos. Se observa un incremento tiempo/dependiente en el número de cometas en el grupo tratado con CrO_3 el cual resulta significativo a la hora 48 al compararse con su testigo y con el grupo combinado TAQ-MLB13 + CrO_3 .

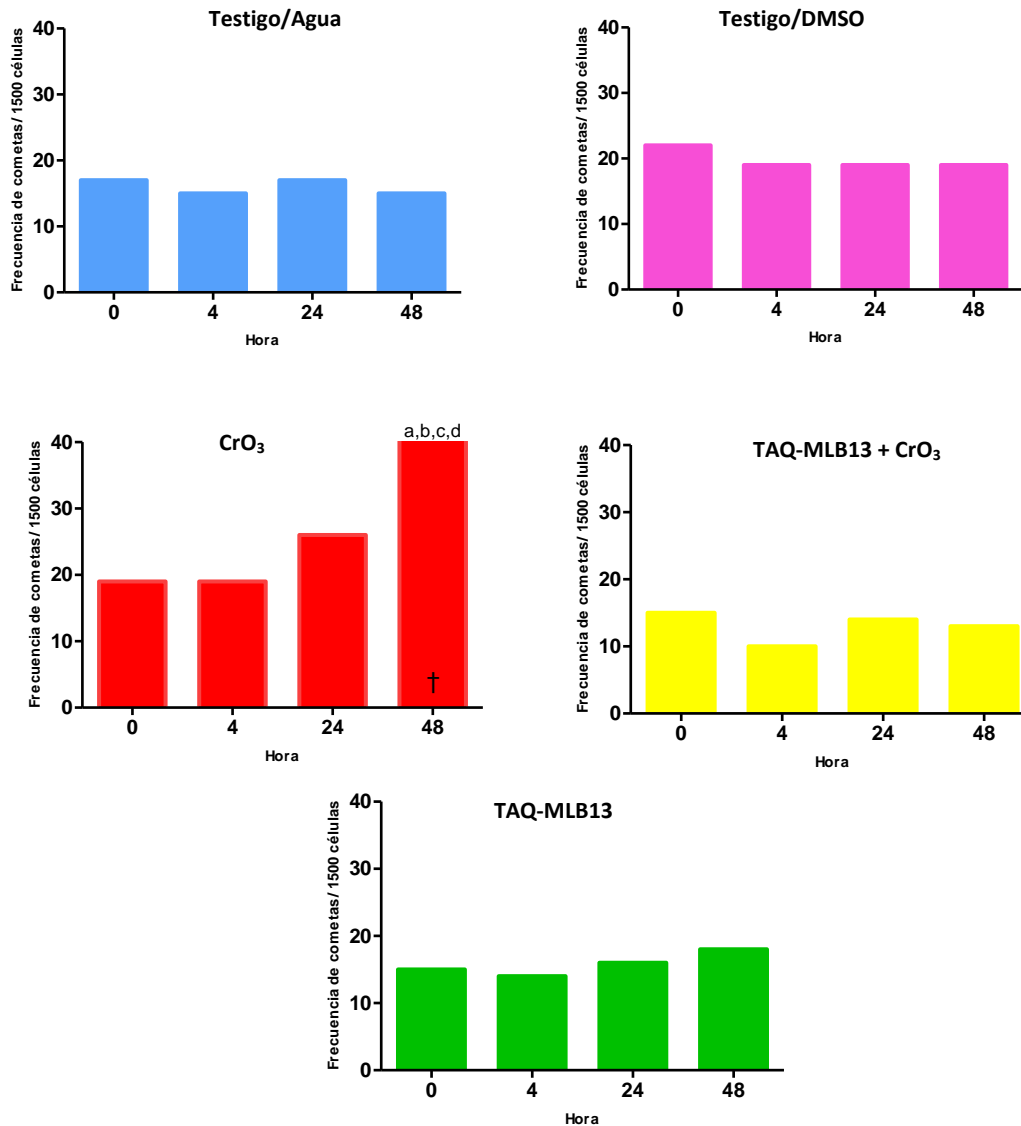


Figura 11. Efecto de la TAQ-MLB13 y CrO_3 sobre el número de cometas. $p < 0.05$; ^a vs CrO_3 hora 0; ^b vs CrO_3 hora 4; ^c vs Testigo/Agua hora 48; ^d vs TAQ-MLB13 + CrO_3 hora 48. †: Muerte de un ratón en el grupo CrO_3 .

En la Figura 12 se presenta la evaluación del porcentaje de ADN presente en la cauda de los cometas observados en sangre periférica a las 0, 4, 24, y 48 horas después de administrar los tratamientos. Solo se observa en el grupo TAQ-MLB13 una ligera disminución a la hora 24 que no resulta significativa.

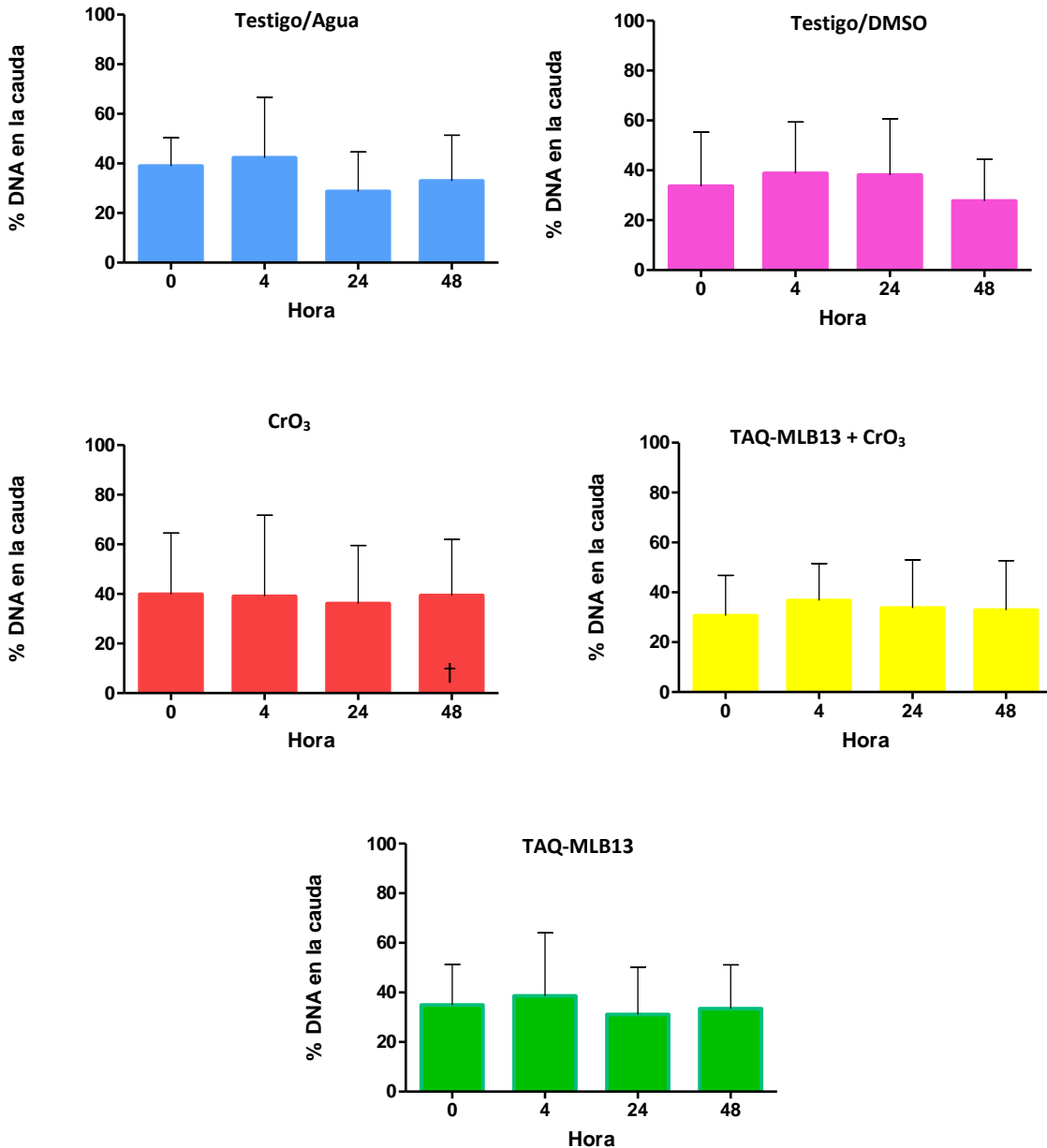


Figura 12. Efecto de la TAQ-MLB13 y CrO₃ sobre los rompimientos de cadena, expresados en el % ADN en la cauda. $p < 0.05$. †: Muerte de un ratón en el grupo CrO₃.

Para obtener datos más claros sobre el nivel de daño al ADN, se realizó el cálculo de las UA. Las UA se obtienen multiplicando el número de cometas por la clasificación de los mismos, por ello a cada cometa se le asignó un valor de 0 a 4 (Fig. 13) según su clase de acuerdo con el sistema propuesto por Collins (2004). Este parámetro nos permite generar información integral sobre los efectos de los tratamientos.

En las Figuras 14 y 15 se muestran las UA por hora y por grupos de tratamiento respectivamente. Se observa que únicamente hay diferencias significativas en el grupo tratado con CrO_3 que presenta un incremento de las UA a la hora 48 contra sus propias horas 0 y 4 (Figura 14) y en comparación con su testigo, y el grupo combinado TAQ-MLB13 + CrO_3 (Figura 15).

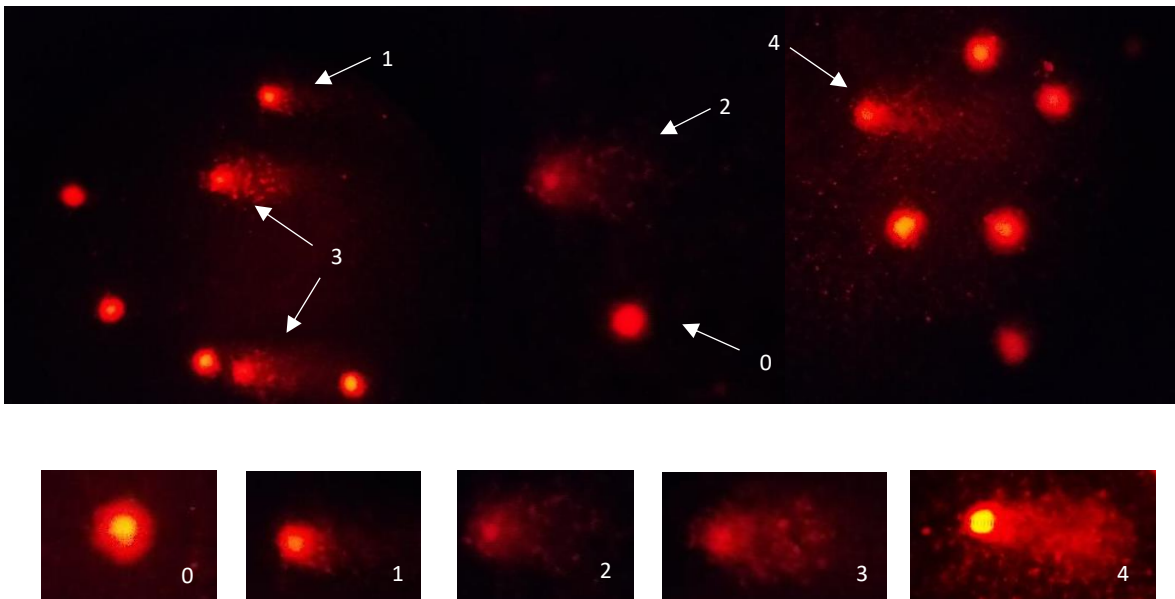


Figura 13. Clasificación del nivel daño al ADN en cometas (a 400X). 0 (ninguno): <5% de ADN en la cauda, 1 (bajo): 5-10 % de ADN en la cauda, 2 (medio): 10-40% de ADN en la cauda, 3 (alto): 40-89% de ADN en la cauda, 4 (total): >90% de ADN en la cauda.

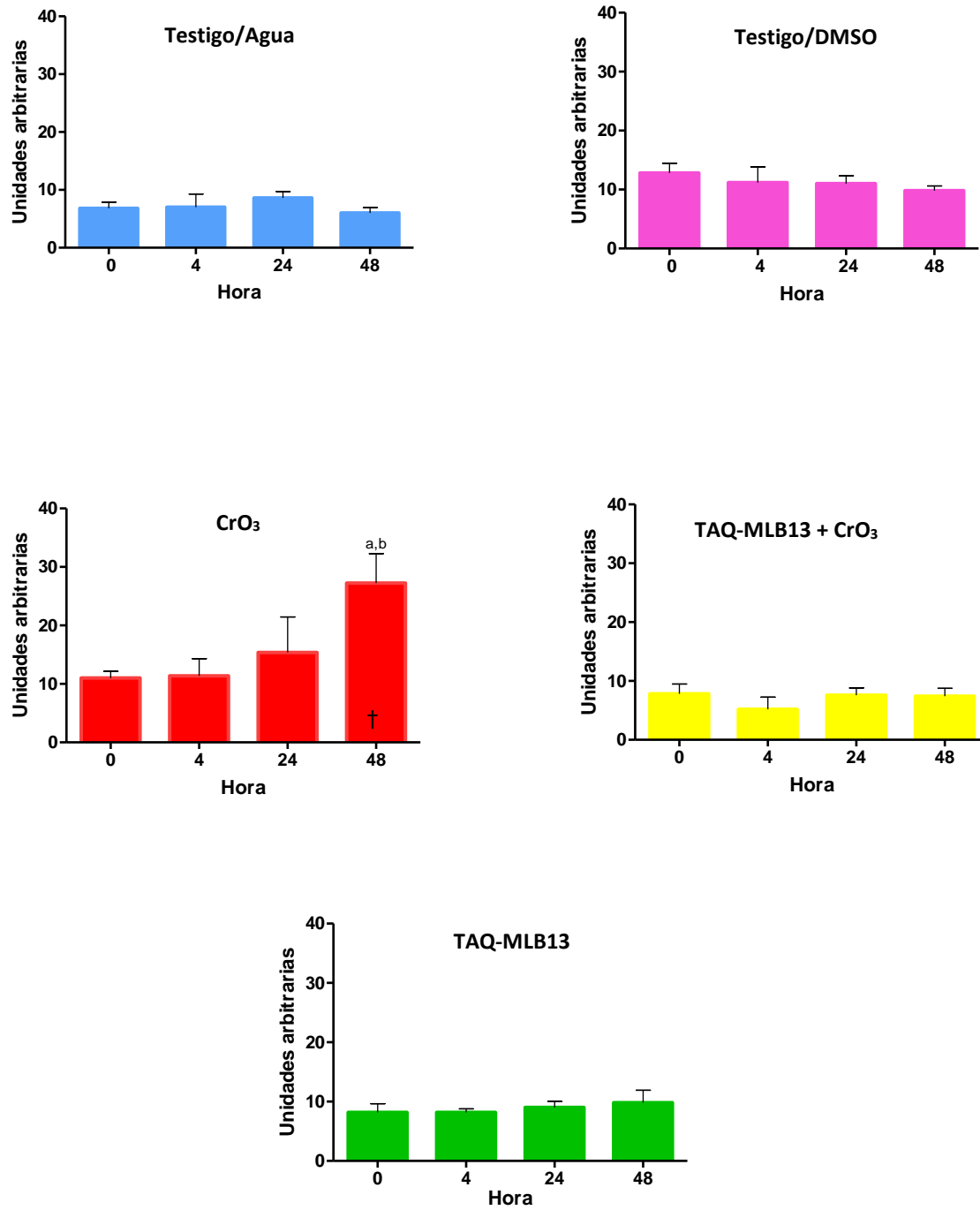


Figura 14. Efecto de la TAQ-MLB13 y CrO₃ sobre las unidades arbitrarias. Se muestra la comparación por hora de cada tratamiento. $p < 0.05$; ^a vs CrO₃ hora 0; ^b vs CrO₃ hora 4. †: Muerte de un ratón en el grupo CrO₃.

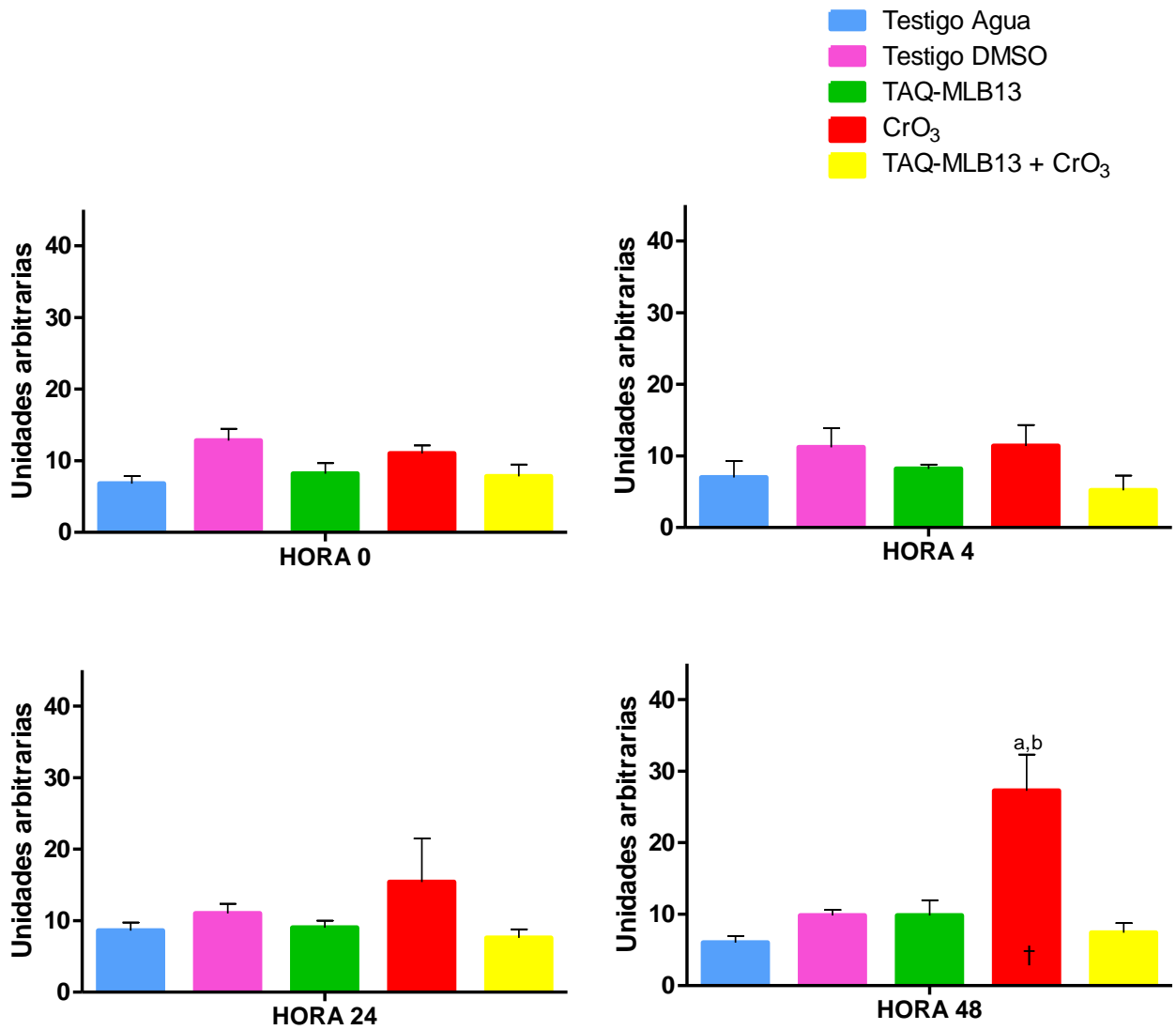


Figura 15. Efecto de la TAQ-MLB13 y CrO₃ sobre las unidades arbitrarias. Se muestra la comparación entre tratamientos. $p < 0.05$; ^a vs Testigo/Agua hora 48; ^b vs TAQ-MLB13 + CrO₃ hora 48. †: Muerte de un ratón en el grupo CrO₃.

6.3 Antioxidantes totales

En la Figura 16 se muestran las concentraciones de antioxidantes totales evaluados en plasma 48 horas después de administrados los tratamientos. Se observa un incremento significativo en los grupos tratados con DMSO y con la combinación de TAQ-MLB13 + CrO₃ en comparación con el Testigo/Agua, y una disminución en el grupo TAQ-MLB13 comparado contra su Testigo/DMSO.

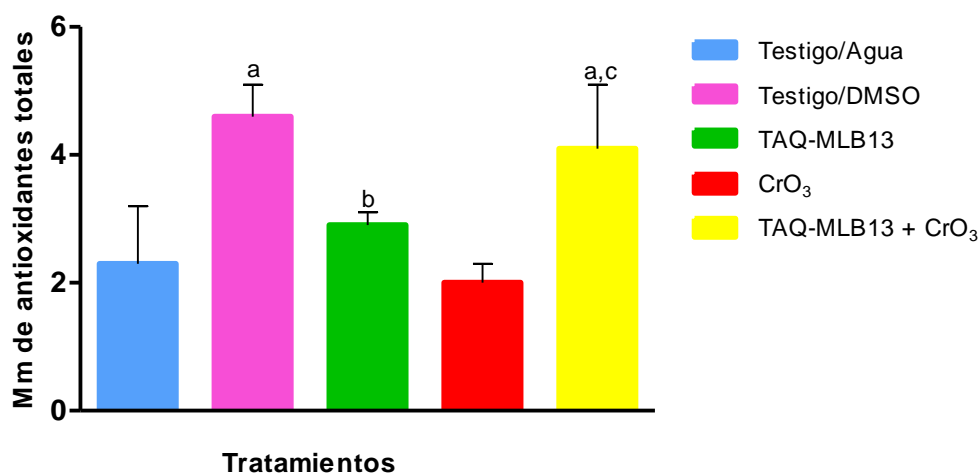


Figura 16. Efecto de la TAQ-MLB13 y CrO₃ sobre las concentraciones en plasma de antioxidantes totales. $p < 0.05$; ^a vs Testigo/Agua; ^b vs DMSO; ^c vs CrO₃.

6.4 Citotoxicidad

Relación EPC/ENC

En el Cuadro 3 se muestran los promedios y desviación estándar de las frecuencias de EPC respecto a los ENC evaluados en sangre periférica después de administrados los tratamientos de TAQ-MLB13, CrO₃, y la combinación TAQ-MLB13 + CrO₃. Se observa que únicamente el grupo al que se le administro CrO₃ presenta disminución estadísticamente significativa de EPC respecto a su hora cero.

Cuadro 3. Promedio y desviación estándar de las frecuencias de EPC en relación con ENC en ratones hembra tratadas con TAQ-MLB13 y CrO₃

Tratamiento	Dosis (mg/kg de peso)	N	Hora	EPC-ENC/ 1000 células (media ± d.e.)
Testigo/Agua	-	5	0	57.8 ± 13.3
		5	48	54.9 ± 4.2
Testigo/DMSO	-	5	0	58.7 ± 10.4
		5	48	65.0 ± 11.6
TAQ-MLB13	10	5	0	62.3 ± 11.6
		5	48	52.9 ± 6.1
CrO ₃	20	5	0	65.3 ± 13.4
		4	48	40.1 ± 6.5 ^a
TAQ-MLB13 + CrO ₃	10-20	5	0	53.7 ± 5.9
		5	48	50.3 ± 6.4

p<0.05; ^a vs CrO₃ hora 0.

Los resultados obtenidos de la evaluación de EPC respecto a los ENC mostraron una alta variabilidad en los datos, por lo que se realizó la evaluación del daño citotóxico mediante la técnica de tinción diferencial con los fluorocromos NA/BrE descrita por McGahon *et al.* (1995) y modificada por García-Rodríguez *et al.* (2013) con la que se puede diferenciar las células viables de las no viables en función de la integridad de la membrana.

Viabilidad celular

En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos del análisis de viabilidad celular cuando se administran los tratamientos. Se observa que la administración de la TAQ-MLB13 no incrementa las células no viables, sin embargo, cuando se administra TAQ-MLB13 + CrO₃ se observa un incremento, aunque no estadísticamente significativo de células no viables respecto a sus grupos testigo.

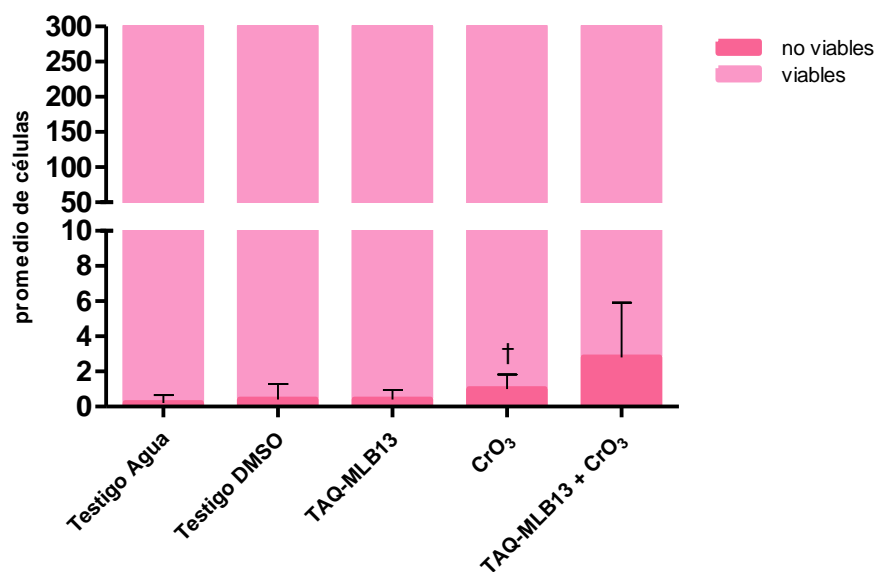


Figura 17. Promedios de células viables y no viables de los grupos tratados con TAQ-MLB13 y CrO₃. $p < 0.05$. †: Muerte de un ratón en el grupo CrO₃.

VII.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la Facultad de Química de la UNAM, el grupo a cargo del Dr. Francisco Hernández Luis, han diseñado y sintetizado la TAQ-MLB13, un derivado de la quinina que conserva sus propiedades antileishmanial y antiplasmodiales. En la unión de esfuerzos para descubrir y desarrollar medicamentos con efectos clínicos benéficos y efectos secundarios mínimos, nuestro grupo de trabajo realizó los experimentos *in vivo*, los resultados obtenidos sugieren que dosis de 10 mg/kg de peso no inducen daño genotóxico ni citotóxico (Hernández, 2016; Olguin, 2017). A este nuevo fármaco también se le han adicionado grupos hidroxilo y metoxilo con la finalidad de conferirles capacidad antioxidante. De ahí que se estudió el efecto de la TAQ-MLB13 sobre el nivel de antioxidantes y la reparación del daño al ADN en ratones tratados con inductores de estrés oxidante como los compuestos metálicos de Cr(VI).

La administración de la TAQ-MLB13 no indujo signos de toxicidad aparente ya que no se presentó falta de apetito, pelaje erizado o inactividad en los organismos. Sin embargo, los organismos tratados con CrO₃ sí presentaron estos signos de toxicidad los cuales ya habían sido observados previamente para los compuestos de Cr(VI) (ATSDR, 2012; Hernández, 2016; Olguín, 2017).

De acuerdo con los resultados obtenidos la administración de 10 mg/kg de peso corporal de TAQ-MLB13 no indujo daño genotóxico, ya que no se incrementaron significativamente las frecuencias de MN, al igual que en estudios previamente reportados (Hernández, 2016; Olguín, 2017). Caso contrario a lo observado en el grupo tratado con CrO₃ donde dosis de 20 mg/kg incrementó la frecuencia de MN, corroborando la genotoxicidad del compuesto previamente reportada (ATSDR, 2012; García-Rodríguez *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2003). El daño al material genético inducido por compuestos de Cr(VI) es complejo y puede ocurrir de manera directa (interacciones Cr-ADN) e indirecta (ERO), y pueden generar daño a las bases de ADN y la cadena principal de azúcar-fosfato, pudiendo presentar efectos sobre la replicación y la transcripción del ADN, desregularizar los puntos de control en el ciclo celular, afectar los mecanismos de reparación del ADN, y generar

disrupción en las redes génicas regulatorias relacionadas con la muerte celular, y las mutaciones en el gen supresor tumoral *p53* (García-Rodríguez *et al.*, 2013; García-Rodríguez *et al.*, 2001; Shi y Dalal, 1992; Zhitkovich *et al.*, 2002). Una de las vías más estudiadas del daño genotóxico de los compuestos de Cr(VI) es mediante la reducción intracelular del Cr(VI) a Cr(III) en la que se generan ERO y RL. El Cr(VI) es capaz de entrar en la célula a través de los canales aniónicos, en donde agentes como el ascorbato, el glutatión, y la cisteína lo reducen a Cr(V), Cr(IV) y Cr(III). El mecanismo más importante involucra a la reacción de Fenton/Haber-Weiss, que genera el radical hidroxilo (OH^\cdot), el cual es altamente reactivo y capaz de dañar al ADN. En el ciclo de Haber-Weiss, el Cr(VI) puede catalizar la formación de radicales OH^\cdot a partir del radical superóxido ($\text{O}^{\cdot-}$), esto es, que el radical ($\text{O}^{\cdot-}$) puede reducir al Cr(VI) para generar Cr(V), el cual puede reaccionar con el H_2O_2 para producir el radical OH^\cdot y generar el radical OH^\cdot hasta generar Cr(III) (García *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2003; Shi y Dalal, 1992).

En el grupo tratado con la TAQ-MLB13 y cuatro horas después con CrO_3 la frecuencia de MN disminuyó alrededor del 87% (hora 48) en comparación con el grupo tratado solo con el CrO_3 . Entre las lesiones que genera la reducción del Cr(VI) a Cr(III) se encuentran los rompimientos de cadena que pueden ser dobles o sencillos (O'Brien *et al.*, 2003). Si el daño es generado en ambas cadenas y no pudo ser reparado, entonces el resultado final puede ser la fragmentación de un cromosoma completo o de una parte de este, generando aumento en la frecuencia de MN como se observó en el grupo tratado únicamente con el CrO_3 , sin embargo, en el grupo combinado la frecuencia de estos disminuyó, lo que sugiere un efecto protector de la TAQ-MLB13 contra el daño genotóxico inducido por el CrO_3 .

En este sentido si el daño ocurre también en una sola hebra, puede ser observado a través de la electroforesis unicelular o ensayo cometa, ya que permite identificar la formación de SSB y SLA así como su reparación al cuantificar la migración del ADN (Rodríguez-Rey, Noris-García, y Fundora Torres, 2016). Comúnmente los parámetros utilizados para medir el daño y reparación con el ensayo cometa son la longitud de la cauda, la intensidad de fluorescencia relativa de la cabeza y la cauda

(normalmente expresada como un porcentaje del ADN en la cauda) y el momento de la cauda. Sin embargo, según (Collins, 2004) la longitud media de la cauda no muestra información útil ya que solo aumenta cuando las caudas se están estableciendo al principio, a niveles de daño relativamente bajo, a medida que aumenta el daño la cauda aumenta en intensidad, pero no en longitud. Por ello la magnitud del daño en el ADN fue expresada además en unidades arbitrarias (UA), donde a cada cometa se le asignó un valor de 0 a 4 según su clase de acuerdo con el sistema propuesto por el mismo autor.

Con estos parámetros se observó que en el grupo tratado con TAQ-MLB13 el número de cometas se mantuvo constante, lo que permite sugerir que no induce rupturas de cadenas que no puedan ser reparadas. Por el contrario, en el grupo tratado con CrO₃ se observó el aumento de cometas durante el tratamiento, siendo la hora 48 la de mayor incidencia, lo que corrobora lo previamente reportado mediante MN y la formación de SSB para este compuesto (Błasiak y Kowalik, 2000; García-Rodríguez *et al.*, 2012; Turan y Sehirli, 2017).

En cuanto al grupo combinado si bien los cambios no fueron estadísticamente significativos, se observó la disminución del número de cometas principalmente a la hora 4 y 48 de administrados los tratamientos. Por otra parte, el porcentaje de ADN en la cauda de los cometas fue constante en todos los tratamientos por lo que se realizó el cálculo de UA, este análisis sugiere que la TAQ-MLB13 no induce la producción de radicales libres, ni modifica negativamente el balance pro-oxidante lo suficiente como para provocar daños a la cadena de ADN o que no puedan ser reparados, ya que la inducción de SSB y la formación de sitios SLA en el ADN están asociados al incremento de ERO (Cofiño *et al.*, 2007). Cuando se administra la TAQ-MLB13 previa a la de CrO₃ se observa la disminución estadísticamente significativa de rompimientos de cadena, esto sugiere que la TAQ-MLB13 está propiciando la eliminación de las células dañadas o activando los mecanismos de reparación.

Debido a que la apoptosis es una muerte fisiológica y se relaciona con daño al material genético irreparable donde la célula muere en beneficio del organismo puede ser considerada como un marcador de daño genotóxico (García-Rodríguez

et al., 2013; Hayashi *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 2000) por ello en el presente estudio también se evaluó la apoptosis. La administración de la TAQ-MLB13 no incrementó significativamente las células apoptóticas en comparación con su testigo/DMSO. Sin embargo, en el grupo tratado con CrO₃ se incrementa significativamente las células apoptóticas. En este sentido se ha planteado que la alteración del estado oxidativo intracelular tiene potencial para activar o sensibilizar a la célula a apoptosis, por lo que las ERO y RL generados a partir de Cr(VI) durante su reducción, pueden jugar un papel importante en la vía de señalización de la apoptosis, así como una forma de eliminar células mutadas o dañadas (García-Rodríguez *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 2004; Irachela, 2007; Ye *et al.*, 1999). Lo anterior sugiere que, si bien el aumento de células apoptóticas en el grupo CrO₃ podría deberse a que las células con daño mueren, en el grupo con TAQ-MLB13 y CrO₃ la vía de eliminación de células con daño al ADN podría no ser a través de la apoptosis, ya que no se observaron cambios significativos respecto a los controles.

Otra de las vías para la protección del daño al ADN es activando el sistema antioxidante endógeno, por esta razón se midieron los niveles de antioxidantes totales en plasma. Los resultados muestran que en el grupo tratado con la TAQ-MLB13 hay un ligero aumento en los niveles de antioxidantes en comparación con el CrO₃, esto podría deberse a la capacidad antioxidante de la TAQ-MLB13 conferida por los grupos metoxilo e hidroxilo que le fueron agregados. Estudios anteriores mostraron que los compuestos derivados de la quinazolina como la hidroxiquinolina actuaban como un quelante eficaz de alta afinidad de hierro en el bloqueo de la formación de H₂O₂ teniendo por tanto un alto potencial de atrapar radicales (Bush, 2008; Jomova y Valko, 2011; Kumar *et al.*, 2011).

Cuando se administra la TAQ-MLB13 previa al CrO₃, se observa un aumento significativo de los niveles de antioxidantes respecto al grupo tratado con CrO₃, este resultado sugiere que la vía de protección del daño al ADN podría ser a través de la activación del sistema antioxidante, sin embargo el efecto observado no puede atribuirse solo a la TAQ-MLB13 ya que si bien en la actualidad es bien sabido que las quinazolininas son fuertes moléculas de aceptación de electrones debido a su alta

afinidad electrónica que se origina de los átomos de nitrógeno (Hei *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2011), también es posible que esté interaccionando con el DMSO al administrarse como vehículo, ya que cuando se administró solo el DMSO se observó incremento significativo de los niveles de antioxidantes. El uso del DMSO como vehículo ha causado controversia durante años, ya que es uno de los disolventes orgánicos más importantes y debido a sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas se ha empleado en medicina y veterinaria (Álvarez y Larqué-Saavedra, 2004). Aunque se ha observado también que como crioprotector tiene efectos secundarios tóxicos (Bekkem *et al.*, 2013). Esta dualidad se debe a su capacidad de penetrar fácilmente en los tejidos animales y vegetales. Según Lee y Mora (1999) esta capacidad puede facilitar la formación de enlaces de hidrógeno y capturar iones nocivos para los organismos vivos (RL).

Por esta razón se sugiere probar la solubilidad de la TAQ-MLB13 en otros vehículos, así como continuar realizando estudios para determinar enzimas específicas que podrían estar relacionadas con el efecto observado en los grupos DMSO y TAQ-MLB13.

En cuanto a la evaluación de la citotoxicidad se realizó el análisis de la relación EPC respecto a los ENC. Únicamente se observó una disminución significativa de los EPC en el grupo tratado con el CrO₃. Si bien la OCDE (2016) indica que al realizar la prueba de MN se determine la frecuencia de EPC/ENC, este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (Hayashi *et al.*, 2000), por ello para corroborar el efecto de los tratamientos se realizó la evaluación de la viabilidad celular, según el protocolo modificado por García *et al.* (2013) mediante la tinción diferencial NA/BrEt. Con este análisis se corroboró que el tratamiento con CrO₃ incrementa las células no viables y provocó la muerte de un organismo. Se ha observado en estudios anteriores que la reducción de Cr(VI) a Cr(III) da como resultado la formación de intermedios reactivos que junto con el estrés oxidante y una cascada de eventos celulares que incluyen la modulación del gen regulador de la apoptosis *p53* contribuyen a la

citotoxicidad de compuestos que contienen Cr(VI). (García-Rodríguez *et al.*, 2013; O'Brien *et al.*, 2003; Shrivastava *et al.*, 2002). También se observó que la administración de la TAQ-MLB13 no incrementa las células no viables, sin embargo, cuando se administra combinada con el CrO₃ se observa un mayor efecto (incremento de células necróticas) mayor que el observado con el tratamiento solo del CrO₃, aunque no resultó significativo, sugiriendo un posible efecto sinérgico entre los compuestos.

VIII. CONCLUSIONES

- Se corroboró que la dosis de 20 mg/kg de CrO₃ induce daño genotóxico y citotóxico ya que se incrementaron las frecuencias de MN, de células apoptóticas, rompimientos de cadena sencilla, así como la disminución de la viabilidad celular.
- La administración de 10 mg/kg de TAQ-MLB13 no es genotóxica ni citotóxica, ya que no incrementaron significativamente las frecuencias de MN, células apoptóticas, rompimientos de cadena, ni altera la viabilidad celular.
- La administración de la TAQ-MLB13 previa al CrO₃ protege del daño al ADN ya que disminuye las frecuencias de MN y SSB, lo que podría estar relacionado con la activación de los mecanismos de reparación.
- La administración de la combinación de TAQ-MLB13 y CrO₃ no aumenta las células apoptóticas, lo que permite sugerir que esta no es la vía de eliminación de células con daño al ADN.
- A diferencia de la administración del CrO₃, la administración de la TAQ-MLB13 no modifica los niveles de antioxidantes totales. La recuperación de los niveles de antioxidantes totales observados en el grupo tratado con la combinación de TAQ-MLB13 y CrO₃ permite sugerir que la vía de protección del daño al ADN podría estar relacionada con la activación del sistema antioxidante.

IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuelizz, H. A., Marzouk, M., Ghabbour, H. y Al-Salahi, R. (2017). Synthesis and anticancer activity of new quinazoline derivatives. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(7), 1047–1054.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K y Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5a edición. United States of America. Garland Science.
- Al-Rashood, S. T., Aboldahab, I. A., Nagi, M. N., Abouzeid, L. A., Abdel-Aziz, A. A. M. y Abdel-hamide. (2006). Synthesis, dihydrofolate reductase inhibition, antitumor testing, and molecular modeling study of some new 4(3H)-quinazolinone analogs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 14(24), 8608–8621.
- Alafeefy, A. M., Ceruso, M., Al-Tamimi, A.-M. S., Del Prete, S., Capasso, C. y Supuran, C. T. (2014). Quinazoline–sulfonamides with potent inhibitory activity against the α -carbonic anhydrase from *Vibrio cholerae*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(19), 5133–5140.
- Alvan, G., Berninger, E., Gustafsson, L., Karlsson, K., Paintaud, G. y Wakelkamp, M. (2017). Response Relationship of Hearing Impairment Caused by Quinine and Salicylate: Pharmacological Similarities but Different Molecular Mechanisms. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 120(1), 5–13.
- Álvarez, M. y Larqué-Saavedra, A. (2004). La supermolécula, el dimetil sulfóxido. *Ciencia 2004*, 20–24.
- ATSDR. (2012). *Toxicological Profile for Chromium*. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Azqueta, A., Langie, S., Slyskova, J. y Collins, A. (2013). Measurement of DNA base and nucleotide excision repair activities in mammalian cells and tissues using the comet assay - A methodological overview. *DNA Repair*. 12(11), 1007–1010.
- Barnes, E. y Lindahl, T. (2004). Repair and Genetic Consequences of Endogenous DNA Base Damage in Mammalian Cells. *Annual Review of Genetics*. 38(1), 445–476.
- Bekkem, A., Selby, G. y Chakrabarty, J. (2013). Retrospective Analysis of Intravenous DMSO Toxicity in Transplant Patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 19(2), 3-13.
- Błasiak, J. y Kowalik, J. (2000). A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 469(1), 135–145.
- Blade LM, Yencken MS, Wallace ME, et al. (2007). Hexavalent chromium exposures and exposure control technologies in American enterprise: Results of NIOSH field research study. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 4(8), 596-618.
- Bush, A. I. (2008). Drug Development Based on the Metals Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 15(2), 223–240.
- Cardona, Y., Aparecida, M. y Morales, M. (2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Biosalud*. 13(2), 95–110.
- Cofiño, G. M., Martínez, A. G., Acosta, B. P. y Gámez, R. (2007). Evaluación del

- efecto genotóxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (Ensayo cometa). *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 38(3), 200–204.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. 26(3), 249–261.
- Collins, A. R. (2014). Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1840(2), 794–800.
- Cóndor, E., H. de Olivera, B., Loayza, K. y Reyna, V. (2009). Chemical study of the stems of *Cinchona pubescens* Vahl. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 75(1), 54-63.
- Croft, S. L. y Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*. 19(11), 502–508.
- Davoll, J., Johnson, A.M., Davies, H.J., Bird, O.D., Clarke, J. y Elslager, E.F. (1972). Folate antagonists. 2. 2,4-Diamino-6-(aralkyl and (heterocyclic)methyl)amino)quinazolines, a novel class of antimetabolites of interest in drug-resistant malaria and Chagas' disease. *Journal of Medicinal Chemistry*. 15(8), 812-826.
- Douki, T., Martini, R., Ravanat, J., Turesky, R. J. y Cadet, J. (1997). Measurement of 2, 6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7, 8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution. *Carcinogenesis*. 18(12), 2385–2391.
- El-Messery, S. M., Hassan, G. S., Nagi, M. N., Habib, E. S. E., Al-Rashood, S. T. y El-Subbagh, H. I. (2016). Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of some new methoxylated 2-benzylthio-quinazoline-4(3H)-ones as nonclassical antifolates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(19), 4815–4823.
- Elejalde Guerra, J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*. 18(6), 326–335.
- Epperson, M. T., Hadden, C. E. y Waddell, T. G. (1995). Mechanistic Basis for Rate Enhancements in the Methanolysis of Aliphatic Esters of Quinine. *Journal of Organic Chemistry*. 60(24), 8113–8114.
- Escalona, J.C., Carrasco, R., Padrón, J.A. (2003). Introducción al diseño de Fármacos. Folleto para la Docencia de la Asignatura de Farmacia, *Universidad de Oriente*. 23(312), 39.
- Escorza, Q., Angélica, M., Salinas, C. y Víctor, J. (2009). La capacidad antioxidante total, bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*. 28(3), 89-101.
- FDA. (2012). Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. USA. *Federal Register*. 77(110), 33748-9.
- FDA. (2000). Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. USA. *Redbook. Center for Food Safety and Applied Nutrition*. 1-6
- Fendorf, S., La Force, M.J. y Li, G. (2004). Heavy metals in the environment: Temporal changes in soil partitioning of and bioaccessibility of arsenic, chromium and lead. *Journal of Environmental Quality*. 33(3), 2049–2055.

- Forman, H.J., Zhang, H. y Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis glutation. *Molecular Aspects of Medicine*. 30(1-2), 1-12.
- Fuic, A. y Mijic, A. (1999). In vitro and in vivo micronucleus tests in genotoxicity research. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*. 50(3), 299-306.
- García-Rodríguez, M. C., Carvente-Juárez, M. M. y Altamirano-Lozano, M. A. (2013). Antigenotoxic and apoptotic activity of green tea polyphenol extracts on hexavalent chromium-induced DNA damage in peripheral blood of CD-1 mice: Analysis with differential acridine orange/ethidium bromide staining. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013, 9.
- García-Rodríguez, M. C., López-Santiago, V. y Altamirano-Lozano, M. (2001). Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 496(1–2), 145–151.
- García-Rodríguez, M. C., Vilches-Larrea, R. E., Nicolás-Mendez, T. y Altamirano-Lozano, M. A. (2012). El té verde en la quimiopreención in vivo del daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (cromo [VI]). *Nutricion Hospitalaria*, 27(4), 1204–1212.
- García-Rodríguez, M. C., Montañó-Rodríguez, A. R. y Altamirano-Lozano, M. A. (2016). Modulation of hexavalent chromium-induced genotoxic damage in peripheral blood of mice by epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its relationship to the apoptotic activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 79(1), 28–38.
- García-Rodríguez, M. C., Nicolás-Méndez, T., Montañó-Rodríguez, A. R. y Altamirano-Lozano, M. A. (2014). Antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), quercetin, and rutin on chromium trioxide-induced micronuclei in the polychromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 77(6), 324–336.
- Goodman, G., Hardman, J., Limbird, L., Molinoff, P. y Ruddon, R. (1996). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9ª ed. México: Mc. Graw-Hill Interamericana.
- González-Torres, M., Betancourt, M. y Ortiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*. 25(1), 3-9.
- Halliwell B. (2000). The antioxidant paradox. *The Lancet London, England*. 355(9210) 1179-1184.
- Hartwig, A. y Schwerdtle, T. (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes : toxicological implications. *Toxicology letters*. 127(1-3), 47–54.
- Hayashi, Y., Kondo, T., Zhao, Q. L., Ogawa, R., Cui, Z. G., Feril, L. B. y Kasuya, M. (2004). Signal transduction of p53-independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 197(2), 96–106.
- Hayashi, M., MacGregor, J.T., Gatehouse, D.G., Adler, I., Blakey, D.H., Dertinge, S.D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A. y Sutuo, S. (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: Some aspects of protocol design including

- repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35(3), 234-252.
- Hayashi, Y., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., e Ishidate Jr, M. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*. 245(4), 245–249.
- Hei, Y.-Y., Xin, M., Zhang, H., Xie, X.-X., Mao, S. y Zhang, S.-Q. (2016). Synthesis and antitumor activity evaluation of 4,6-disubstituted quinazoline derivatives as novel PI3K inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26(18), 4408–4413.
- Heddle, J.A., Hite, M., y Kirkhart, B. (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(1), 61–118.
- Heddle, J., Cimino, M., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M., Tucker, J. y McGregor, J. (1991). Micronuclei as and index of cytogetic damage : past, present and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 18(4), 277- 291.
- Hernández, E. (2016). Efecto genotóxico y citotóxico de nuevos compuestos quinolínicos (quinazolininas MLB01, MLB02 y MLB13) en sangre periférica de ratones: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Irachela, A. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 101(2), 1–33.
- Jafari, E., Khajouei, M. R., Hassanzadeh, F., Hakimelahi, G. H. y Khodarahmi, G. A. (2016). Quinazolinone and quinazoline derivatives: recent structures with potent antimicrobial and cytotoxic activities. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 11(1), 1–14.
- Jiranusornkul, S. y Laughton, C. A. (2008). Destabilization of DNA duplexes by oxidative damage at guanine: Implications for lesion recognition and repair. *Journal of the Royal Society Interface*. 5(3), 191-198.
- Jomova, K. y Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283(2–3), 65–87.
- Krauskopf, K.B. (1979). *Introdution to Geochemicals*. McGraw Hill. 545
- Krishna, K. (1994). Physiologically-based pharmacokinetic modeling in toxicology. en: Hayes AW. *Principles and methods of toxicology*. 3ra edición, New York, NY: Raven Press, Ltd, 149- 188.
- Krishna, G. y Hayashi, M. (2000). *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, 455(1-2), 155-166.
- Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P. y Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 711(1–2), 193–201.
- Kouznetsov, V. y Palma, A.R. (1997). *Química básica de los heterociclos y su importancia práctica*. 1ra ed. Ediciones UIS, Bucaramanga Colombia, 196.
- Kumar, A., Sharma, P., Kumari, P. y Lal Kalal, B. (2011). Exploration of antimicrobial

- and antioxidant potential of newly synthesized 2,3-disubstituted quinazoline-4(3H)-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21(14), 4353–4357.
- Kumar N, Singh G, Yadav AK. (2001). Synthesis of some new pyrido (2,3-d) pyrimidines and their ribofuranosides as possible antimicrobial agents. *Heteroatom Chemistry*. 12(1), 52-56.
- Kondo, K., Kurihara, M. y Fukuhara, K. (2001). Mechanism of antioxidant affect of catechins. *Methods in Enzymology*. 335(1), 203-217.
- Lee, P. y de Mora S. (1999), "Intracellular dimethylsulfoxide (DMSO) in unicelular marine algae: speculations on its origin and posible bio- logical role". *Journal of Phycology*, 35(1), 8-18.
- Lewin, B. (2000). *Genes VII*. 2da. edición. New York, USA. Oxford University Press, Inc.
- Mandal, S. (2014). Epidemiological aspects of vivax and falciparum malaria: global spectrum. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4(1), 13–26.
- Mao, M., Zhang, X., Zhu, B., Wang, J., Wu Guohua y Yin Y. (2016). Comparative studies of organic dyes with a quinazoline or quinoline chromophore as p-conjugated bridges for dye-sensitized solar cells. *Dyes and Pigments*. 124(2016), 72-81..
- Mastrangelo, A.J. y Betenbaugh, M. J. (1995). Implications and applications of apoptosis in cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*. 6(2), 198–202.
- McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R. J. y Green, D. R. (1995). The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro. en *Methods in Cell Biology*. 46(9), 153–185.
- Meléndez-Gómez, C. y Kouznetsov, V. (2005). Alcaloides Quinolínicos: Importancia Biológica Y Esfuerzos Sintéticos. *Revista de La Facultad de Ciencias*. 10(2), 5–18.
- Mendoza-Martínez, C., Correa-Basurto, J., Nieto-Meneses, R., Márquez-Navarro, A., Aguilar-Suárez, R., Montero-Cortes, M. D. y Hernández-Luis, F. (2015). Design, synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives as anti-trypanosomatid and anti-plasmodial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 96(October), 296–307.
- Mendoza-Martínez, C., Galindo-Sevilla, N., Correa-Basurto, J., Ugalde-Saldivar, V. M., Rodríguez-Delgado, R. G., Hernández-Pineda, J. y Hernandez-Luis, F. (2015). Antileishmanial activity of quinazoline derivatives: Synthesis, docking screens, molecular dynamic simulations and electrochemical studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92(October), 314–331.
- Miller, N. J., Rice-Evans, E., Davies, M. j., Gopinathan, V. y Milner, A. (1993) Anovel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 84(4), 407-412.
- Moreno, E. A., Cuéllar, C. G. y González, A. D. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. 46(4), 275–280.
- Muñoz, A. F. (2009). Evaluación del daño en el ADN en dos poblaciones colombianas de agricultores y floricultores. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*. 12(1), 7–16.

- O'Brien, T. J., Ceryak, S. y Patierno, S. R. (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: Role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 533(1–2), 3–36.
- OCDE. (2016). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Guideline for Testing of Chemicals 474.
- Olguin, J. C. (2017). Efecto de nuevos compuestos quinolínicos (quinazolinas, MLB02 y MLB13) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por compuestos metálicos de cromo hexavalente en ratones Hsd:ICR. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Quintanar, M., y Calderón, V. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México*, 28(3), 89-101.
- Rai, D., Eary, L.E. y Zachara, J.M. (1989). Environmental chemistry of chromium. *The Science of the Total Environment*. 86(1-2), 15 –23.
- Ramos-León, J. (2016). Efecto de los flavonoides de *Camellia sinensis* (miracetina, quercetina y rutina) sobre la inducción de MN y apoptosis en ratones tratados con trióxido de cromo. Tesis de licenciatura, UNAM
- Reguera, R. M., Calvo-Álvarez, E., Álvarez-Velilla, R. y Balaña-Fouce, R. (2014). Target-based vs. phenotypic screenings in Leishmania drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 4(3), 355–357.
- Repetto, M. y Repetto, G. (2009). *Toxicología Fundamental*. 4ta edición. España. Ediciones Diaz de Santos.
- Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E. y Fundora Torres, M. T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*. 35(2), 184–194.
- Rojas-Aguirre, Y., Hernández-Luis, F., Mendoza-Martínez, C., Sotomayor, C. P., Aguilar, L. F., Villena, F. y Suwalsky, M. (2012). Effects of an antimalarial quinazoline derivative on human erythrocytes and on cell membrane molecular models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1818(3), 738–746.
- Rojas, E., Lopez, M. C. y Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 722(1–2), 225–254.
- Rolling, T., Wichmann, D., Schmiedel, S., Burchard, G. D., Kluge, S. y Cramer, J. P. (2013). Artesunate versus quinine in the treatment of severe imported malaria: Comparative analysis of adverse events focussing on delayed haemolysis. *Malaria Journal*. 12(1), 1–8.
- Sainsbury, M. (2001). *Heterocyclic chemistry*. London, England. The Royal Society of Chemistry, 142.
- Salazar, M. M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular *in vitro* y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(2), 152–166.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*. 31(1), 9–15.
- Schwartzman, R. A. y Cidlowski, J. A. (1993). Apoptosis: The biochemistry and

- molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*. 14(2), 133–151.
- Shi, X. y Dalal, N. (1992). The Role of Superoxide Radical in Chromium(VI)-Generated Hydroxyl Radical: The Cr(VI) Haber-Weiss Cycle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 292(1), 323–327.
- Shrivastava, R., Upreti, R. K., Seth, P. K. y Chaturvedi, U. C. (2002). Effects of chromium on the immune system. *Immunology and Medical Microbiology*. 34(1), 1–7.
- Shupack, S.I. (1991). The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environmental Health Perspectives*. 92, 7–11.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. y Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175(1), 184-191.
- Sofuni, T. (1993). Japanese guidelines for mutagenicity testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 21(1), 2-7.
- Swenson, M. J. y Reece, W. O. (1999). Fisiología de los Animales Domésticos De Dukes (2ª ed.). México: Limusa.
- Teaf, C. y Middendorf, P. (2000). *Mutagenesis and Genetic Toxicology*. en *Principle of Toxicology*. 2da edición. New York, USA. 239-264.
- Thomas, J.A. (1994). *Oxidative stress, oxidant defense and dietary constituents*. en *Modern nutrition in health and disease*. 8va edición. Philadelphia. Williams and Wilkins 501-512
- Turan, M. K. y Sehirlı, E. (2017). A novel method to identify and grade DNA damage on comet images. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 147, 19–27.
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31(2), 126-33.
- Wang, D. y Gao, F. (2013). Quinazoline derivatives: synthesis and bioactivities. *Chemistry Central Journal*. 7(1), 95.
- Ye, J., Wang, S., Leonard, S. S., Sun, Y., Butterworth, L., Antonini, J. y Shi, X. (1999). Role of Reactive Oxygen Species and p53 in Chromium (VI) induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 274(49), 34974–34980.
- Zhitkovich, A., Quievryn, G., Messer, J. y Motylevich, Z. (2002). Reductive activation with cysteine represents a chromium(III)-dependent pathway in the induction of genotoxicity by carcinogenic chromium(VI). *Environmental Health Perspectives*. 110(5), 729–731.

X. ANEXOS

Los resultados del presente trabajo fueron presentados de manera parcial o total en los siguientes eventos académicos.

✚ Reunión Conjunta del XXXIX Congreso Nacional de Farmacología con el Congreso Estudiantil de Farmacología “Dr. Marte Lorenzana Jiménez” y el XV Congreso de Investigación en Medicina

Título de la ponencia: “Evaluación de micronúcleos, apoptosis y reparación del ADN en ratones tratados con un nuevo compuesto quinolínico (Quinazolina MLB13)”

Autores: Hernández-Cruz EY, López-Ramírez G, Hernández-Luis F, López-Sánchez MA y García-Rodríguez MC.

Organizadores: Asociación Mexicana de Farmacología A.C; Facultad de Medicina, UNAM; Escuela Superior de Medicina, IPN.

Lugar y fecha: Ciudad de México, México. Celebrado del 29 al 31 de mayo de 2017.

✚ XX Foro de Investigación Escolar en Biología

Título de la ponencia: “Evaluación de los efectos de tres compuestos con propiedades antioxidantes (TAQ-MLB13, AA- α toc y proteína de soya) sobre la inducción de micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular en sangre periférica de ratones de la cepa Hsd:ICR”.

Autores: López-Ramírez G, Parra-Aguilar TJ, Valle-Castillo GA, Hernández-Luis F, y García-Rodríguez MC.

Organizadores: Carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Lugar y fecha: Ciudad de México, México. Celebrado del 9 al 11 de octubre de 2017.

Congreso Nacional de Genética 2017

Título de la ponencia: “Evaluación genotóxica y citotóxica de la *TAQ-MLB13* y sus efectos en la reparación del ADN en ratones Hsd:ICR”

Autores: López-Ramírez G, Hernández-Cruz EY, Hernández-Luis F, López-Sánchez MA y García-Rodríguez MC.

Organizadores: Sociedad Mexicana de Genética A.C.

Lugar y fecha: San Francisco de Campeche, Campeche, México. Celebrado del 2 al 5 de octubre de 2017.

XXI Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud

Título de la ponencia: “Evaluaciones genotóxicas en sangre periférica de ratones tratados con antioxidantes incluidos en la dieta humana y de un nuevo compuesto quinolínico”

Autores: Parra-Aguilar TJ, Valle-Castillo GA, López-Ramírez G, Hernández-Luis F, López-Sánchez MA y García-Rodríguez MC.

Organizadores: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Lugar y fecha: Ciudad de México, México. Celebrado el 18 y 19 de septiembre y del 13 al 15 de diciembre de 2017.



XXXIX CONGRESO NACIONAL DE FARMACOLOGÍA

**PRESIDENTE HONORARIO DEL CONGRESO
DR. ARMANDO AHUED ORTEGA**

**CONGRESO ESTUDIANTIL
DE FARMACOLOGÍA
“DR. MARTE LORENZANA JIMÉNEZ”**

**XV CONGRESO DE INVESTIGACIÓN
EN MEDICINA ESM-IPN**

SEDE: FACULTAD DE MEDICINA UNAM CIUDAD DE MÉXICO,
MAYO 29 A 31 DE 2017



**Mc
Graw
Hill
Education**

Credito de autor: McGraw-Hill Education, 2017.

INFORMES

www.amefar.mx
contacto@amefar.mx

Evaluación de micronúcleos, apoptosis y reparación del ADN en ratones tratados con un nuevo compuesto quinolínico (Quinazolina-MLB13)

Hernández-Cruz Estefani Yaquelin¹, López-Ramírez Griselda¹, Hernández-Luis Francisco², López-Sánchez Marcela Alejandra² y García-Rodríguez María del Carmen^{1,*}

¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. CDMX, México,

²Departamento de Farmacia, Facultad de Química. UNAM, CDMX, México.

*carmen.garcia@unam.mx

Con la intención de potenciar los efectos de los compuestos quinolínicos en los tratamientos contra la malaria y la leishmaniasis, así como reducir su toxicidad, en la Facultad de Química se sintetizó la quinazolina-MLB13. A este nuevo compuesto quinolínico se le adicionaron grupos hidroxilo y metoxilo que le confieren propiedades antioxidantes, por lo que en el presente trabajo se evaluó la inducción de micronúcleos (MN), apoptosis y la reparación del ADN en ratones de la cepa Hsd:ICR tratados con la quinazolina-MLB13. Grupos de cinco organismos fueron divididos al azar de la siguiente manera: a) Testigo 1 y Testigo 2, solo se les administraron los vehículos (agua destilada o DMSO); b) Testigo positivo, se les administraron 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. y c) Grupo Quinazolina-MLB13, se les administraron 10 mg/kg por vía i.p. Las muestras se tomaron de sangre periférica de la vena caudal. Las evaluaciones de MN fueron realizadas de acuerdo a Hayashi et al. (1990)[1], mientras que las de apoptosis de acuerdo a García-Rodríguez et al., (2013)[2]. La reparación del ADN se basó en las evaluaciones con la técnica de electroforesis unicelular alcalina de acuerdo a Singh et al. (1988)[3]. La quinazolina-MLB13 disminuyó los MN basales y no presentó efectos sobre la apoptosis. También se observó una disminución en el número e intensidad de células dañadas mediante el ensayo de electroforesis unicelular alcalina. Estos resultados generan grandes expectativas sobre el uso de estos nuevos compuestos tanto en el tratamiento de la malaria y la leishmaniasis, así como en su posible uso en la protección del daño inducido por estrés oxidante.

Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216, y por CB-SEP-CONACyT 220664.

[1]Hayashi *et al.*, 1990. *Mutat Res*; 245:245-249.

[2]García-Rodríguez *et al.*, 2013. *Oxid Med Cell Longev*; 2013:1-9.

[3] Singh *et al.*, 1988. *Exp. Cell Res*; 175-184.



XX FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

Solicitud de registro
Agosto de 2017



Evaluación genotóxica de la administración de compuestos quinolínicos, extractos de soya y vitaminas (C y E) en sangre periférica de ratones de la cepa Hsd:ICR

López-Ramírez Griselda, Parra-Aguilar Thelma Jaqueline, Valle-Castillo Gabriela Abigail, Hernández-Luis Francisco, y García-Rodríguez María del Carmen

Modalidad y Ciclo

Por favor marque con una x

X	Oral		Básico
	Cartel		Intermedio
	Video	X	Terminal

Resumen

Introducción

El estilo de vida se ha asociado con el desarrollo o protección de enfermedades relacionadas con el daño al ADN. En la Facultad de Química (UNAM) se han sintetizado nuevos compuestos quinolínicos con la finalidad de potenciar sus efectos terapéuticos mediante la adición de grupos hidroxilo y metoxilo. Por otra parte, se ha observado que los extractos de soya presentan un alto contenido de antioxidantes, que de igual manera podrían modular el daño al ADN.

Material y Método

El presente trabajo consistió en la evaluación genotóxica de tres compuestos: a) un nuevo compuesto quinolínico (TAQ-MLB13, 10 mg/kg), b) Extractos de soya (40mg/kg) y c) Vitaminas C-E (100-20 mg/kg). A grupos de cinco ratones hembra de la cepa Hsd:ICR se les extrajeron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0 y 48 horas. Las evaluaciones genotóxicas se realizaron mediante el ensayo de micronúcleos (MN) de acuerdo con Hayashi *et al.* (1990)^[1].

Resultados

Se observó que la administración de los tres compuestos no modifica las frecuencias de MN en comparación con los grupos testigo. Se empleó un grupo testigo positivo al que se le administraron 20 mg/kg de CrO₃, el cual mostró un incremento significativo de MN en comparación con el grupo testigo. Al evaluar la relación de los eritrocitos policromáticos y normocromáticos no se observaron efectos significativos en ninguno de los grupos estudiados.

Conclusiones

Estos resultados generan grandes expectativas sobre el uso de estos nuevos compuestos en tratamientos terapéuticos, así como en su posible uso en la protección del daño al ADN. **Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216 y por CB-SEP-CONACyT 220664.**

[1] Hayashi *et al.*, 1990. *Mutat Res*; 245:245-249.

Palabras clave:

Antioxidante, quinazolina, proteína de soya, cromo hexavalente, micronúcleos, apoptosis.

CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA

2017

*"90 años del descubrimiento de la acción
mutagénica de los rayos X"*



Sociedad Mexicana de Genética A.C.
Universidad Autónoma de Campeche
Facultad de Ciencias Químico-Biológicas

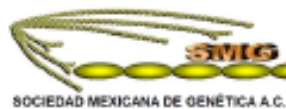
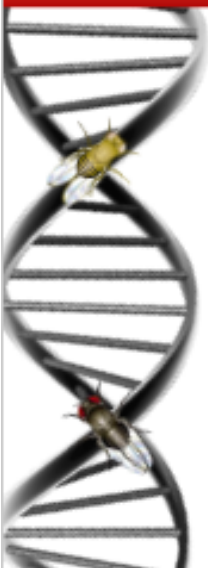


Memoria

Congreso Nacional de Genética 2017

San Francisco de Campeche, Campeche, México

2-5 de octubre, 2017



EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y CITOTÓXICA DE LA QUINAZOLINA TAQ-MLB13 Y SUS EFECTOS EN LA REPARACIÓN DEL ADN EN RATONES Hsd:ICR

López-Ramírez G, Hernández-Cruz EY, Hernández-Luis F, López-Sánchez M A y García-Rodríguez MC¹

¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. CDMX, México,

²Departamento de Farmacia, Facultad de Química. UNAM, CDMX, México

carmen.garcia@unam.mx

La 2,4,6-triaminoquinazolina-MLB13 (TAQ-MLB13), es un nuevo compuesto quinolínico que fue sintetizado en la Facultad de Química (UNAM) con la finalidad de potenciar sus efectos terapéuticos mediante la adición de grupos hidroxilo y metoxilo. El presente trabajo consistió en la evaluación genotóxica de la TAQ-MLB13. Grupos de cinco organismos fueron divididos al azar de la siguiente manera: a) Testigo 1 y 2, solo se les administraron los vehículos (agua destilada o DMSO); b) Testigo positivo, se les administraron 20 mg/kg de CrO₃ por vía i.p. y c) Grupo TAQ-MLB13, se les administraron 10 mg/kg por vía i.p. Las muestras se tomaron de sangre periférica de la vena caudal a las 0 y 48 h. Las evaluaciones genotóxicas se realizaron mediante el ensayo de micronúcleos (MN) de acuerdo a Hayashi *et al.*, (1990)^[1] y de la apoptosis, de acuerdo a García-Rodríguez *et al.*, (2013)^[2]. La reparación del ADN evaluó con la técnica de electroforesis unicelular alcalina de acuerdo a Singh *et al.*, (1988)^[3]. Se observó que la administración de la TAQ-MLB13 no incrementa significativamente la frecuencia de MN basales, además, de no presentar efectos sobre apoptosis. Al realizar el ensayo de electroforesis unicelular alcalina se observó la disminución en el porcentaje de ADN en la cauda y de unidades arbitrarias. Estos resultados generan grandes expectativas sobre el uso de estos nuevos compuestos tanto en el tratamiento de la malaria y la leishmaniasis, así como en su posible uso en la protección del daño inducido por estrés oxidante.

Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216, y por CB-SEP-CONACyT 220664.

[1] Hayashi *et al.*, 1990. *Mutat Res*, 245:245-249.

[2] García-Rodríguez *et al.*, 2013. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:1-9.

[3] Singh *et al.*, 1988. *Exp. Cell Res*, 175-184.



EVALUACIONES GENOTÓXICAS EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATONES TRATADOS CON ANTIOXIDANTES INCLUIDOS EN LA DIETA HUMANA Y DE UN NUEVO COMPUESTO QUINOLÍNICO

Parra-Aguilar Thelma Jacqueline¹, Valle-Castillo Gabriela Abigail¹, López-Ramírez Griselda¹, Hernández-Luis Francisco², López-Sánchez Marcela Alejandra² y García-Rodríguez María del Carmen^{1*}

¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, FES-Zaragoza, UNAM, CDMX, México, ²Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, CDMX, México. *carmen.garcia@unam.mx

En la actualidad el crecimiento de las industrias ha incrementado la exposición de las poblaciones a los agentes genotóxicos, por lo que se ha planteado la necesidad de generar estrategias para la protección del daño al ADN. Una de ellas es la neutralización del estrés oxidante mediante el uso de antioxidantes. En este sentido, se ha observado que tanto las Vitaminas C y E, como los extractos de soya presentan propiedades antioxidantes. Aunado a ello se han diseñado o modificado compuestos para potenciar su capacidad antioxidante; como es el caso de la quinazolina TAQ-MLB13, sintetizada en la Facultad de Química de la UNAM, a la que se le adicionaron grupos hidroxilo y metoxilo. Como parte de la regulación establecida en el diseño, síntesis o mejora de un fármaco, se deben realizar una serie de pruebas donde se incluye la evaluación del daño al material genético. Una técnica ampliamente utilizada para este fin es el ensayo de micronúcleos (MN). El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la actividad genotóxica de la TAQ-MLB13, extractos de soya y vitaminas (C y E) en sangre periférica de ratones de la cepa Hsd:ICR. Grupos de 5 ratones hembra fueron divididos al azar y tratados de la siguiente manera: a) Quinazolina TAQ-MLB13 (10 mg/kg), b) Extractos de soya (40mg/kg) y c) Vitaminas C-E (100-20 mg/kg). También se emplearon dos grupos testigo: d) grupo testigo positivo al que se le administraron 20 mg/kg de CrO₂ y e) testigo negativo (sólo se les administró el vehículo). Después de la administración de los tratamientos, a los organismos se les extrajeron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0 y 48 horas. Las evaluaciones genotóxicas se realizaron mediante el ensayo de MN de acuerdo con Hayashi et al. (1990)^[1]. Al evaluar la relación de los eritrocitos policromáticos (EPC) y normocromáticos (ENC) no se observaron efectos significativos en ninguno de los grupos estudiados con excepción del grupo tratado con CrO₂ que mostró una disminución de los EPC. La administración de CrO₂ mostró un incremento significativo de MN en comparación tanto con el grupo testigo (tratado sólo con el vehículo) como con los otros grupos experimentales. Los grupos tratados con compuestos de soya y vitaminas (C y E) no incrementan los MN, por el contrario se observó una disminución en comparación con su respectivo grupo testigo. Mientras que, el tratamiento con la TAQ-MLB1 incrementa las frecuencias de MN, sin embargo, este incremento no es indicativo de una genotoxicidad clara, ya que organizaciones como la FDA^[2] proponen como agentes genotóxicos claros aquellos que incrementen más de 4 MN por 1000 EPC y la TAQ-MLB1 incrementó alrededor de 1 MN en 1000 EPC. El efecto observado por los compuestos de soya y las vitaminas pudo deberse gracias a sus estructuras moleculares capaces de neutralizar el estrés oxidante celular, disminuyendo a su vez el daño directo al ADN. Mientras que el efecto que presentó la administración de la TAQ-MLB13 podría ser indicativo de daño tóxico indirecto. Estos resultados generan grandes expectativas sobre el uso de estos compuestos en tratamientos terapéuticos, así como en su posible uso en la protección del daño al ADN. **Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216 y por CB-SEP-CONACyT 220664.**

[1] Hayashi et al., 1990. *Mutat Res*; 245:245-249.

[2] FDA, CDER, and CBER. 2012; 1–31. doi:EMA/CHMP/ICH/126642/2008.