



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

¿ES LA TECNICA DE ELECTROFORESIS UNICELULAR
(ENSAYO COMETA) CAPAZ DE PREDECIR EL EFECTO
DE FARMACOS ANTINEOPLASICOS? ESTUDIO
INICIAL SOBRE LA INDUCCION DE DAÑO AL ADN DE
SUSTANCIAS ANTINEOPLASICAS CON
MECANISMOS DE ACCION CONOCIDOS.

292309

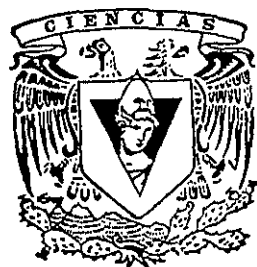
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

PATRICIA MUSSALI GALANTE



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

DIRECTOR DE TESIS DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO





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

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: *¿Es la técnica de electroforesis unicelular (ensayo cometa) capaz de predecir el efecto de fármacos antineoplásicos? Estudio inicial sobre la inducción de daño al ADN de sustancias antineoplásicas con mecanismos de acción conocidos.*

realizado por *Patricia Mussali Galante*

con número de cuenta *9550377-4*, pasante de la carrera de *Biología*

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario *Dr. Emilio Rojas del Castillo*

Propietario *M. en N. Teresa Imelda Fortoul Van der Goes*

Propietario *Dra. Sandra Luz Gomez Arroyo*

Suplente *Dr. Rene Cardenas Vazquez*

Suplente *Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta*

Sandra Gómez Arroyo
Rene Cardenas V.

Consejo Departamental de *Biología* FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

p.a. Luisa Alba
Dra. Estela María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Esta tesis esta dedicada.....

A.....mi misma

Por lograr la meta que me fije desde que era una niña, “ser bióloga”.
Por defender siempre mi ideología, buena o mala, pero mía.
Por que el tamaño de mis alas esta determinado por el tamaño de mis sueños.

A.....mis padres

Porque sin ellos no sería quien soy ni podría estar escribiendo estas palabras, gracias por darme lo más valioso que tengo: la vida. Gracias por haberme hecho inmensamente feliz los años que tuvimos la oportunidad de compartir nuestras vidas. Mi corazón esta lleno de ustedes. Los amo y amaré siempre.

A.... Efraín

Por llenar mi existencia, por ser la esencia de mi espíritu, el color de mi alma, la luz de mis ojos y el camino a seguir, pero sobre todo, por ser mi cielo y en él la única estrella.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Emilio Rojas del Castillo, mi más sincero y profundo agradecimiento a quien ha guiado mi carrera desde hace tres años, por abrirme las puertas de tu laboratorio y no solo brindarme ayuda profesional sino también personal. Tu enorme y gigantesca paciencia con migo, tus ganas de enseñarme y la atención que pusiste en mí desde el primer momento, hicieron posible un camino de logros y esta tesis . Gracias por ser mi asesor y mi amigo. Nunca me cansaré de agradecerte todo lo que me has enseñado y tanto que has hecho por mi,. Definitivamente has dejado en mi, una gran huella.
¡LO LOGRAMOS!

A mi maestro de carcinogenesis, por alimentar mi deseo de explorar este campo del conocimiento de una manera alentadora. ¡Gracias Emilio!

A la **Dra. Mahara Valverde**, ¡A MI GRAN MAESTRA! definitivamente, esta tesis y todo lo que he logrado en el laboratorio, *no habría sido posible sin tu ayuda en todo momento*, gracias por haber estado con migo todos los días en el preciso instante, gracias por haber sido en tantas ocasiones mi salvavidas y por ser siempre mi guía de referencia. Te debo lo que sé. Te quiero mucho.

A la **Biol. Maricarmen López**, *por tantos momentos buenos y malos compartidos*, gracias por tu comprensión, tu paciencia, tus consejos y tu ayuda incondicional, pero sobre todo por tu honestidad y amistad. Te quiero mucho.

Al Dr. Enrique Miranda por abrirme las puertas de su laboratorio, interesarse en mi trabajo, por sus críticas constructivas, *por tener siempre una gran disposición y ser tan buena onda*. ¡Gracias!

A la **Dra. Teresa Fortoul**, por tus valiosos comentarios acerca de este trabajo y por tu excelente disposición, ¡Mil Gracias!

A la **Dra. Sandra Gómez Arroyo**, por poner tanta atención al escrito de esta tesis, ya que sus comentarios fueron muy importantes para mejorarlo , gracias por ser tan amable.

Al Dr. Renee Cárdenas Vázquez, *por sus excelentes sugerencias para mejorar la tesis*.

A la **Dra. Patricia Ostrosky-Wegman**, por sus acertados comentarios acerca del trabajo y orgullo de todos nosotros.

A la **Q.F.B. Monserrat Sordo**, a maravillosas personas como tú, no nada más hay que agradecerte que hayas sido indispensable para la realización de este trabajo, por ser mi "donadora estrella", sino también por ser un gran apoyo y una buena amiga, de verdad....muchisisisimas gracias.

A **Luis Serrano**, por ayudarme infinitas veces a sacar la sangre, por ser siempre tan amable y tener una excelente disposición. ¡Gracias!

A mi gran ejemplo, a un ser digno de admiración, **Al Dr. Efraín Tovar**, por hacer tuya esta tesis, *tan mía como tuya, la concepción de este trabajo fue posible, gracias a tu existencia, a tu amor, a tu paciencia, a tu persona, a tus conocimientos, a tus consejos, a tus regañíos, a nuestras largas discusiones frente a la computadora, a tu memoria para aprenderte las gráficas, los cometas, los resultados etc....en pocas palabras.....lo que hizo de esta tesis.....nuestra tesis.*

A mis **amigos y compañeros** del laboratorio: Quienes convierten la vida ordinaria, en extraordinaria.

Emilio, Mahara, Maricarmen, Adriana G., Lilia, Silivia, Ernesto, Rodrigo, Anselmo, Io, Daniela, Monica, Tzutzuy, Gaby, Monse, Auro, Adrianita, Daniel, Luis, Betty, Carolina, Annie, Carmen, Fransisco, Sandra, Andrés y Andrea,

Es difícil tener la suerte de encontrar a una gran amiga como tú, Gracias **Luli** por tantas experiencias vividas durante toda la carrera, ¡te adoro!. (Aunque estés lejos yo se que esta amistad es para siempre)

A **Tzutzuy**, a una increíble persona a quien hay que conocerla para quererla, eres para mí muy importante, gracias por tu confianza y amistad y por escucharme siempre. Te quiero mucho.

A mis amigos de la carrera: Luli, Tzutzuy, Julio, Lorena, Graciela, Wendy, Brenda, Helga, Alejandra G.N., Margarita, Dorys Joseluis, Edgar, Jeronimo, Carla, Mariana, Jessica, Alejandro y Rodrigo. Un agradecimiento muy especial a **Inti y Ernesto**, por hacer de las clases toda una diversión, por deberles gran parte de mi destino, y la calificación de fisico-química.....entre tantas otras cosas. ¡Los aprecio mucho!

Al laboratorio de Genética Y Toxicología, a mis fármacos, al etopósido y al cometa, por ser mi vida diaria.

A la UNAM, especialmente a la Facultad de Ciencias, por enseñarme más que Biología,

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi **abuelita Renéé**, gracias por siempre demostrarme tu enorme cariño, por ser la mejor de las abuelitas, por ser mi ejemplo de fortaleza y esfuerzo, por decirme siempre "te quiero" y nunca juzgarme, ojalá haya heredado un poquito de tu enorme corazón. Te quiero con toda mi alma.

A una persona increíblemente especial, aquel que no solo entiende si no que comprende, aquel que escucha detenidamente, no juzga y siempre aconseja, a lo que *representa el amor que no hace daño y solo reconforta*, a quien nunca me ha dejado sola, a quien me ha enseñado valores inolvidables. G R A C I A S, por todo ésto y por ser un gran amigo. A ti, mi queridísimo, **tio Simón**.

A mis hermanas, **Aurora y Rina**

"La tragedia de la vida es lo que muere dentro de el hombre mientras vive"
Albert Einstein

"Una parte de la bondad es amar a la gente más de lo que se merece y jamas dejarlo de hacer."
Joseph Joubert

A mis sobrinos: **Salo, Jessie, Alberto, Alex, Ade, Jaime, Liz, Beto y Elías**, los llevaré siempre en mi corazón.

A mis **abuelitos Emilio y Aurora**, con todo mi amor.

A **Emilio y Mahara** por creer en mi.

A la familia Tovar-Sánchez por su enorme cariño.

A mi **KK**, por una vida compartida, y ser mi mayor deseo, lo que hace que valga la pena vivir cada día. Te amo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Aspectos históricos de la quimioterapia	5
Clasificación de agentes antineoplásicos	9
Agentes alquilantes e intercalantes	9
Actinomicina-D	10
Adriamicina	12
Carboplatino	14
Melfalan	15
Agentes antimetabolitos	18
5-Fluoruracilo	19
Hidroxiurea	20
Metotrexato	22
Agentes inhibidores de los microtúbulos	23
Vinblastina	24
Agentes inhibidores de la función de la cromatina	26
Etopósido	26
Agentes hormonales	29
Pruebas de genotoxicidad	29
Electroforesis unicelular alcalina	31
Ensayo cometa y Quimioterapia	33
OBJETIVOS	38
METODOLOGÍA	40
Selección de fármacos	40
Preparación de medicamentos	40
Selección de donadores	43
Obtención de la muestra de sangre	43
Tratamiento "in-vitro" de 2 y 24 horas	43
Método de viabilidad por fluorocromos	44
Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa pH >13	45
Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa pH 12.3	46
Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa para detección de rompimientos específicos	47
Análisis estadístico	47
RESULTADOS	
Ensayo de viabilidad por fluorocromos	48
Electroforesis unicelular alcalina pH >13	49
Inducción de rompimientos y sitios álcali-lábiles en el DNA por efecto del etopósido	54
Inducción de rompimientos en el DNA por efecto del etopósido	58

DISCUSIÓN	69
Melfalan	69
Carboplatino	71
Antimetabolitos (5-FU, MTX, N-HU)	73
Adriamicina	76
Actinomicina-D	79
Vinblastina	81
Etopósido	85
CONCLUSIONES	91
PERSPECTIVAS	93
LITERATURA CITADA	95

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5-FU	5-fluoruracilo
6-MP	6-mercaptipurina
6-TG	6-tioguanina
ACT	actinomicina-D
ADRI, ADR	adriamicina
AP	apurínico/apirimidínico
ATP	adenosin tri fosfato
CACU	cáncer cervico uterino
CARBO	carboplatino
DHFR	dihidrofolato reductasa
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dUMP	desoxiuridina monofosfato
dUTP	trifosfato de desoxiuridina
EDTA	ácido etil diamino tetra acético
Et-Br	bromuro de etidio
ETO, VP16	etopósido
EXO III	exonucleasa III
FDA	5,6-carboxiacetato de fluoresceina
FdUMP	fluordesoxiuridina monofosfato
Fe	hierro
GTP	guanosin tri fosfato
HPRT	hipoxantin-guanosin-fosforribosil transferasa
IARC	International Agency for Research in Cancer

MELF	melfalan
MTX	metotrexato
N	nitrógeno
N-HU	N-hidroxiurea
PHA	fitohemaglutinina
RCS	rompimientos de cadena sencilla
RDC	rompimientos de cadena doble
RNA	ácido ribonucleico
RNA _r	ácido ribonucleico ribosomal
SAL	sitios alcali-lábiles
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
TK	timidin cinasa
TMP	timidin monofosfato
TRIS	tris hidroximetil-amino-metano
TS	timidilato sintetasa
TTP	trifosfato de timidina
VBL	vinblastina

Mussali, P. 2001. **¿Es la técnica de electroforesis unicelular (ensayo cometa) capaz de predecir el efecto de fármacos antineoplásicos? Estudio inicial sobre la inducción de daño al ADN de sustancias antineoplásicas con mecanismos de acción conocidos.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

RESUMEN

Una de las formas más eficaces para combatir el cáncer es la quimioterapia, sin embargo, los agentes utilizados tienen una alta toxicidad inespecífica, por lo que los sistemas para predecir sus efectos genotóxicos, cada vez adquieren más importancia. Este estudio tiene por objeto determinar si el ensayo "cometa" es capaz de predecir los efectos de agentes antineoplásicos con diferentes mecanismos de acción. Para ello, se evaluó el daño producido al DNA por fármacos ampliamente utilizados en la clínica y con mecanismos de acción conocidos para el tratamiento de enfermedades malignas de tipo hematológico como son las leucemias y los linfomas, esto se realizó en linfocitos estimulados y sin estimular de dos donadores sanos. Los fármacos utilizados son: Melfalan, Carboplatino, Adriamicina, Actinomicina-D, 5-Fluoruracilo, Metotrexato, N-hidroxiurea, Etopósido y Vinblastina. Los resultados obtenidos muestran que esta técnica es sensible para la detección de daño al DNA (rompimientos de cadena sencilla) producido por cada agente, sin embargo, su comportamiento no refleja el mecanismo de acción de cada uno de ellos. Si bien todos los agentes registraron inducción de daño en linfocitos estimulados, el etopósido causó los mayores niveles de daño. Así mismo, este agente provocó el mayor daño en los linfocitos sin estimular. El comportamiento del etopósido llamó nuestra atención, por lo que se hicieron experimentos más específicos para encontrar otros mecanismos de

acción de este fármaco, los cuales indicaron que el daño generado por el etopósido involucra mecanismos de acción distintos que dependen de la fase del ciclo celular.

INTRODUCCIÓN

En el mundo moderno, el cáncer se ha vuelto una de las enfermedades más temidas, aunque no sea la causa más común de muerte, sin embargo, lo que ha provocado este temor es su reputación de ser un mal progresivo y fatal. Además no se ha encontrado un tratamiento para su cura, lo cual hace que se incremente este temor.

El término cáncer se usa para designar colectivamente alrededor de 300 tipos de desórdenes celulares, los cuales, se caracterizan por multiplicación y crecimiento desmesurado de las células. Por lo tanto, el cáncer es una enfermedad relacionada con la regulación de la división celular, y como tal presenta aspectos citológicos como: (1) un número mayor de células mitóticas en el contexto histológico, (2) evidencias de células que rompen las barreras tisulares, (3) presencia de células completa e incompletamente diferenciadas, así como la pérdida de la inhibición de la proliferación por contacto con otras células y (4) células que pueden tener núcleos y/o nucleólos prominentes. Por otro lado, las características bioquímicas más relevantes son: (a) la existencia de receptores específicos o alterados en la superficie celular, (b) células que muestran secreciones de enzimas líticas, (c) la presencia anormal de componentes de la matriz extracelular (i.e. laminina y fibronectina), (d) secreción de factores de crecimiento, los cuales pueden estimular su propio crecimiento (i.e. estimulación autócrina) y (e) tienen una mayor tasa en la biosíntesis de los ácidos nucleicos, así como de los productos químicos asociados a éstos. Por último, las principales características genéticas son las alteraciones estructurales de los cromosomas y

las alteraciones a nivel génico, involucrando principalmente a los genes supresores de tumores y a los oncogenes (Sager, 1989; Pratt *et al.*, 1994).

Si bien todos estos procesos celulares están claramente reconocidos en el desarrollo del cáncer, se desconoce en muchos casos cuáles son los estímulos por los que se llevan a cabo estos cambios. Sin embargo, históricamente se ha asociado al cáncer con ciertos factores tales como el género, edad, raza, situación geográfica, grupo socioeconómico, estilo de vida, exposición ocupacional, etc. (Cairns, 1978).

Mundialmente más de dos millones de personas mueren al año debido al cáncer (<http://www.cancer.org>). Esta patología está registrada dentro de las tres primeras causas de mortalidad a nivel mundial y si se considera únicamente a la población mayor de 40 años, ocupa el segundo lugar (<http://www.cancer.org>). Tan solo en los Estados Unidos alrededor de 500,000 personas mueren de cáncer anualmente, de las cuales 76,000 corresponden a niños entre 3 y 14 años (Pratt *et al.*, 1994).

En nuestro país el cáncer es considerado como la segunda causa de muerte (Secretaría de Salud, 1992), En 1983 se notificaron 4,382 defunciones por tumores malignos, esto representó el 9% de muertes totales. En 1984 fueron informados 16,377 casos de cáncer por la red hospitalaria. Sin embargo en 1986 se registraron 15,144 casos y en 1987 éstos aumentaron a 16,262, de los cuales el 65.5% se manifestó en mujeres y el 34.5% en hombres (<http://www.ssa.gob.mx>).

Los cánceres más frecuentes en nuestro país son: el cáncer cervico-uterino,

(CaCu) mama, linfomas, próstata, estómago, leucemias y pulmón, de los que el CaCu obtuvo el mayor número de casos, representando el 30.7% del total de neoplasias en mujeres. Por otro lado, en el sexo masculino se encuentra en primer lugar el cáncer de próstata, registrando el 12.5% (Reg. Nal. Cáncer, 1987).

Con respecto a las neoplasias malignas de tipo hematológico como las leucemias y los linfomas, se presentan los siguientes datos a nivel mundial:

Para el linfoma tipo Hodgkin la mayor incidencia se observa en Italia y la menor en China y Japón, con respecto a las leucemias linfocíticas, la mayor incidencia la tiene Australia y la menor se encuentra en China, para el caso de las leucemias mieloides, E.U.A. tiene la más elevada y Gambia la más baja (<http://www.cancer.org>).

En EUA la incidencia de linfomas en el sexo masculino es de 27,200 casos, lo que corresponde a 10,900 muertes, mientras que para el sexo femenino es de 21,200 lo que corresponde a 10,000 muertes. En leucemias para el sexo masculino se reportó una incidencia de 16,000 lo que corresponde a 9,900 muertes y para el sexo femenino fue de 12,200, lo que significa 8,300 muertes (Pratt *et al.*, 1994).

Se estima que en el año 2000 se registraron 30,800 nuevos casos de leucemia (28,200 en adultos) y (2,600 en niños) y que aproximadamente 21,700 personas murieron por este mal. Con respecto a los linfomas, se describieron aproximadamente 62,300 nuevos casos, de los cuales, 7,400 casos fueron de tipo Hodgkin (<http://www.cancer.org>).

En México, durante 1987 se refirieron 16,262 casos de cáncer, de los cuales, el 5.1% corresponde a linfomas, dentro de estos el 59.35 % correspondió al sexo

masculino, y el 40.64 % restante al sexo femenino (Reg. Nal. Cáncer, 1987).

Por su parte, las leucemias registraron un 3.9 %, de las cuales, el sexo masculino presentó la mayor incidencia (55.5%), mientras que el sexo femenino registró 44.4% (Reg. Nal. Cancer, 1987).

El Instituto Nacional del Cáncer en EUA, registró en la década de los 90 un decremento en los índices de mortalidad, sin embargo, el cáncer sigue siendo un problema importante de salud pública tanto a nivel mundial como en nuestro país.

Para hacer frente a esta enfermedad, la ciencia dispone clásicamente de cuatro armas: la cirugía, la radioterapia, las terapias biológicas (i.e., trasplante de médula ósea, inmunoterapia, terapia génica etc.) y la más utilizada, la quimioterapia. Es importante mencionar que estos tratamientos se han utilizado de manera individual o bien en combinación.

La cirugía es el tratamiento más conocido y uno de los más antiguos (Skeel, 1982). Se emplea en casos donde el cáncer es de tipo no hematológico y se encuentra en un sitio bien definido y localizado. Este tratamiento es muy usado cuando no existen metástasis y el tumor primario está en un lugar accesible para la intervención quirúrgica. Se sabe que la cirugía en ciertos casos puede ser una medida curativa, sin embargo, conlleva muchos riesgos, como puede ser la diseminación de células cancerosas a otros tejidos (Cooper, 1992).

Otro tratamiento ampliamente utilizado es la radioterapia, cuyo efecto en el organismo es el resultado de una larga serie de eventos siempre iniciados por la ionización o la excitación de unas pocas de sus moléculas (Brandan, 1986). Este tratamiento es frecuentemente utilizado en cánceres como: seminomas,

mielomas, neoplasias de la laringe, cavidad oral, linfoma tipo Hodgkin y tumores cerebrales (Skeel 1982; Cooper, 1992).

En las últimas décadas se han desarrollado tratamientos conocidos como “terapias biológicas”, dentro de éstos, se conoce al trasplante de médula ósea como uno de los tratamientos más efectivos para las leucemias y los linfomas, también se encuentran los moduladores biológicos, que son componentes naturales producidos en el cuerpo que regulan la función de las células del sistema inmune (Pratt *et al.*, 1994). Si bien, esta área se encuentra en pleno desarrollo su importancia radica en la teórica especificidad que ofrece.

Por otro lado, las terapias génicas además de ser una potente herramienta para el tratamiento del cáncer, ofrecen aportaciones en todos los ámbitos de la investigación biológica. La terapia génica a grandes rasgos consiste en la eliminación de genes mutados y la inserción de genes normales en células con división descontrolada.

Por último, se sabe que a principios del siglo pasado los investigadores han tratado de encontrar agentes químicos capaces de matar o detener a las células tumorales (Rojas, 1992), bajo éste principio, fue como comenzó el desarrollo de uno de los tratamientos más importantes para esta patología, conocido como la quimioterapia.

Aspectos históricos de la quimioterapia. La utilización de productos químicos contra el cáncer se ha registrado desde hace unos 500 años, pero fue hasta 1865 cuando Lissauer reportó por primera vez el uso efectivo de sustancias contra

esta enfermedad utilizando arsenito de potasio en un paciente leucémico (Pratt *et al.*, 1994).

El desarrollo del primer fármaco antineoplásico se realizó durante la Primera Guerra Mundial, como un agente químico utilizado para fines bélicos, el cual, era un gas llamado mostaza nitrogenada, derivado de la mostaza de azufre (gas H) (Pratt *et al.*, 1994), más tarde Aldair y Bagg (1931) aplicaron la mostaza de azufre a carcinomas escamosos encontrando que ésta es muy tóxica para su uso sistémico.

Por su parte, Gilman estudió los efectos antitumorales de la mostaza nitrogenada en linfosarcomas de ratón, detectando un efecto positivo. Pero fue hasta 1942 que se comenzó a probar clínicamente en pacientes. En 1946 con la publicación de este trabajo se marca el inicio de la quimioterapia moderna (Rojas, 1992; Pratt *et al.*, 1994).

La segunda droga anticancerígena que se utilizó con éxito, fue la aminopterina, o mejor conocida como Metotrexato, el cual es un antagonista del ácido fólico (Kamen *et al.*, 2000), y fue Farber quien investigó sus efectos, encontrando que era citotóxico en células de médula ósea de niños con leucemia, induciendo la remisión de la enfermedad en la mayoría de los casos. Aunque la búsqueda de agentes menos tóxicos y más poderosos continuaba (sueño de Farber), ningún compuesto similar ha superado al Metotrexato. El primer ejemplo de la eficacia de este fármaco es la curación del coriocarcinoma (Hertz *et al.*, 1961).

Hitchings y Elion después de haber sintetizado y probado más de 100 análogos de purina en agentes microbianos, descubrieron que la 6-mercaptopurina (6-MP) y la

6-tioguanina (6-TG) podrían ser agentes útiles en el tratamiento para el cáncer, por lo que, éstos fueron probados clínicamente durante 1953 en niños con leucemia aguda. Actualmente, el uso de la 6-MP en combinación con otras sustancias para una terapia de inducción y mantenimiento puede curar hasta un 80% de niños con leucemia linfocítica aguda. Mientras que la 6-TG se ha usado en leucemias mielocíticas agudas en combinación con el citosin-arabinosido, mejor conocido como Ara-c (Pratt *et al.*, 1994).

También Farber (1954) introduce a la clínica la Actinomicina-D, la cual es aislada de una especie de *Streptomyces*; su efectividad antitumoral en roedores y humanos condujo al desarrollo de otros fármacos, por ejemplo: Mitramicina, Bleomicina, Daunorrubicina y Doxorrubicina (Adriamicina) utilizadas en leucemias principalmente y en una gran variedad de tumores sólidos (Pratt *et al.*, 1994).

Las antipirimidinas fueron desarrolladas durante los intentos de sintetizar análogos que pudieran inhibir el empleo del nucleótido uracilo por los tumores. Heidelberg (1965) pensó que pudiera haber una sustitución posible en las posiciones 5 y 6 del anillo del uracilo; pero el derivado sustituido en la posición 5 era más fácil de obtener y mucho más estable, por lo que, predijo que un sustituto en la posición 5 podría bloquear la formación de nucleótidos de timina a partir de nucleótidos de uracilo. El resultado fue una nueva sustancia antineoplásica llamada 5-Fluoruracilo, la cual ha sido tan relevante que hasta la fecha se sigue administrando.

Posteriormente, se introducen a la clínica los productos alcaloides derivados de la planta *Vinca rosacea*, de aquí se conocen actualmente la vincristina y la

vinblastina, parte medular de los regímenes quimioterapéuticos de leucemias y linfomas principalmente (Pratt *et al.*, 1994).

Dentro de los regímenes quimioterapéuticos, un agente que ha causado un gran impacto fue el encontrado por Rosenberg *et al.* (1965) donde al someter a *Escherichia coli* a un campo eléctrico con electrodos de platino, la replicación bacteriana se detenía, descubriendo así que las sales de platino eran las causantes de este fenómeno. Fue hasta 1972 que se probó este compuesto en cánceres humanos con resultados positivos. Actualmente, el cis-platino continua arrojando resultados alentadores, ya que es parte integral de los regímenes quimioterapéuticos para la curación del cáncer de testículo, cánceres ováricos, de cabeza, cuello, vejiga, pulmón y cervicales. A partir de éste se obtiene el carboplatino presentando la misma actividad que su antecesor pero con menor toxicidad (Rose y Schuring, 1985).

Posteriormente, se descubren los antiestrógenos (agentes hormonales) para el tratamiento del cáncer de mama, por lo que, se comenzaron a desarrollar bioensayos de compuestos estrogénicos en roedores, con la finalidad de observar alguna actividad tanto estrogénica como antiestrogénica. De esta manera, un gran número de compuestos fenólicos y trifenólicos se han desarrollado y dentro de éstos se encuentran el dietilelbestrol, tamoxifetol (Mer-25) y tamoxifen (ICI46, 474) (Pratt *et al.*, 1994).

Recientemente, se aprobó el uso del etopósido (VP-16213), que es un derivado semi-sintético de la podofilotoxina, el cual es extraído de la planta *Podophyllum peltatum*. El Instituto Nacional del Cáncer en EUA a partir de extractos de esta

planta ha obtenido resultados que reflejan una actividad antitumoral (US-INC). Se han sintetizado dos compuestos: el etopósido y el tenipósido. El primero, es usado para el tratamiento del cáncer de testículo, pulmón, enfermedad de Hodgkin y algunos linfomas, el segundo se utiliza para la leucemia linfocítica aguda y tumores cerebrales (Pratt *et al.*, 1994).

Los agentes empleados en la quimioterapia se clasifican de acuerdo a diferentes criterios, el que nosotros adoptamos se basa en su mecanismo de acción (De Vita, 1993).

Clasificación de agentes antineoplásicos

Agentes alquilantes e intercalantes. Compuestos altamente reactivos que pueden o no formar enlaces covalentes con diversos grupos nucleofílicos, estos agentes pueden sustituir un grupo alquil (i.e. R-CH₂-CH₂) por átomos de hidrógeno de varios grupos orgánicos. Varias sustancias celulares pueden ser alquiladas de esta manera, por lo que las evidencias sugieren que así se lleva a cabo la alquilación de los ácidos nucleicos, principalmente de DNA (debido a lo anterior, es que se produce un efecto citotóxico). Estas alquilaciones provocan rompimientos en la molécula del DNA, de la siguiente manera: (Strauss *et al.*, 1976).

DNA alquilado → Sitio apurínico en el DNA → rompimientos de cadena sencilla.

Estos sitios apurínicos en el DNA son rápidamente convertidos "*in-vivo*" en rompimientos de una sola cadena por la acción de las AP endonucleasas, esto es

considerado como la lesión de alquilación de mayor toxicidad para el DNA. Estos agentes también pueden producir entrecruzamientos de las cadenas del DNA, de ésta manera se interfiere con la replicación y con la transcripción (Strauss *et al.*, 1976). Las diferencias en la actividad entre varios agentes alquilantes radican aparentemente en la cantidad, sitio de absorción del fármaco, la tasa metabólica y la afinidad histológica (Cline, 1971). Los agentes alquilantes son ciclo celular específicos y son activos en contra de un gran número de tumores con diferentes tasas de proliferación (Cline, 1971).

Por su parte, Pratt y colaboradores (1994) clasifican a algunos de los agentes en dos grupos dependiendo del enlace que forman con el DNA (covalentes y no covalentes). Dentro de los primeros podemos encontrar a las mostazas nitrogenadas (i.e. meclorotamina, cloroambucil, melfalan, ciclofosfamida e ifosfamida), las aziridinas (i.e. tiotepa, altretamina y mitomicina-C), los alcanosulfonatos (i.e. busulfán), las nitrosureas (i.e. carmustina, lomustina, semustina y streptozotocina), los compuestos de platino (i.e. cisplatino y carboplatino) y los agentes metilantes (i.e. decarbazina y procarbazona). En el segundo grupo encontramos a las antraciclinas (i.e. daunorrubicina, doxorubicina e idarrubicina), las mitoxantinas, la actinomicina-D, la bleomicina y la plicamicina. De este grupo de agentes en nuestro estudio trabajamos con:

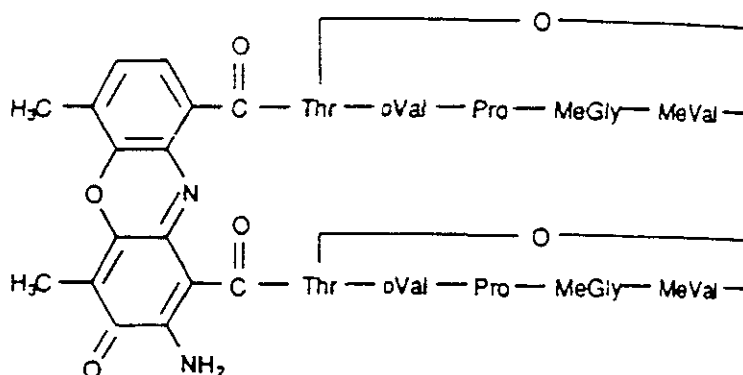
- **Actinomicina-D.**

- i. .Otros nombres. D-actinomicina, act-D, cosmegen.

- ii. Peso molecular. 1,255.5

iii. Tipo de agente. Antibiótico derivado de *Streptomyces parvulus* (unión no covalente al DNA) (Cline, 1971; Carter *et al.*, 1977; Skeel, 1982; Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994).

iv. Fórmula.



v. Dosis para personas adultas. 0.40-0.45 mg/m² (Skeel, 1982)

0.40-0.60 mg/m² (Cvitkovic *et al.*, 1993)

vi. Especificidad en el ciclo celular. No fase específico, presenta mayor sensibilidad en células en división (Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1999).

vii. Mecanismo de acción. Presenta afinidad por la guanina, se une al DNA fuertemente en el surco menor de la doble hélice, interfiriendo con la síntesis del DNA dependiente del RNA. Inhibe síntesis de RNA (RNAr específicamente), en altas concentraciones es inhibida la síntesis de DNA y probablemente altera su elongación (Chiao y Krug, 1977; Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994, Chang *et al.*, 1999). A bajas concentraciones inhibe la reacción de la RNA polimerasa formando complejos con las guaninas de DNA (Cline, 1971). La fuerte unión entre actinomicina y DNA se ha demostrado por espectroscopía, por la densidad del DNA, así como por experimentos en su punto de fusión y por estudios de cinética.

Por lo anterior, se ha observado que la región de la molécula donde se encuentra el cromóforo de fenoxazona se intercala entre las bases del DNA y que el grupo 2-amino de la guanina es importante para la formación del complejo estable entre el fármaco y el DNA (Pratt *et al.*, 1994, Robles y Adami, 1998; Sato *et al.*, 1999).

Viii. Uso. Se utiliza principalmente para tratar tumores sólidos en pacientes pediátricos, incluyendo el tumor de Wilms, sarcoma de Ewing y el rabdomiosarcoma embrionario, donde puede ser curativo. Se han observado respuestas positivas en pacientes con linfomas tipo Hodgkin y no Hodgkin, cáncer testicular metastásico y sarcoma de Kaposi (Skeel, 1982; Cvitkovic *et al.*, 1993).

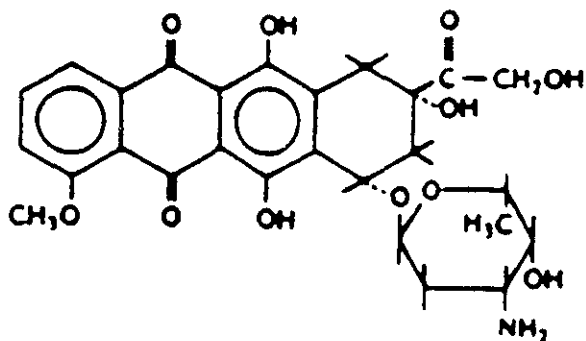
• Adriamicina.

i. Otros nombres. Doxorrubicina, adriblastina y ADR.

ii. Peso molecular. 579.9

iii. Tipo de agente. Antibiótico antracíclico derivado de *Streptomyces peucetius* (Cline, 1971, Carter *et al.*, 1977; Skeel, 1982; Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994).

iv. Fórmula.



v. Dosis para personas adultas. 30 mg/m² (Carter *et al.*, 1977; Skeel, 1982, Uziely *et al.*, 1995).

vi. Especificidad en el ciclo celular. No fase específico, presenta mayor sensibilidad en células en división (Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994).

vii. Mecanismo de acción. Es un agente que se intercala entre las bases del DNA inhibiendo su síntesis (Carter *et al.*, 1977). Se une al DNA intercalándose en la doble hélice haciendo que ésta se desestabilice y este daño lleva a la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos (Cvitkovic *et al.*, 1993). Otro mecanismo de acción propuesto es la producción de radicales libres provocando una peroxidación de lípidos, alquilación de proteínas y del DNA (Eliot *et al.*, 1984, Muindi *et al.*, 1985, Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994, Shen *et al.*, 1998).

El cromóforo de esta antraciclina contiene una hidroxiquinona que es una estructura quelante del hierro, la unión adriamicina-Fe forma un complejo ternario con el DNA, el cual, es diferente al complejo constituido entre el fármaco intercalado y el DNA. El complejo ADR-Fe-DNA cataliza la transferencia de electrones del glutatión al oxígeno, resultando la formación de especies de oxígeno reactivas, este complejo también genera radicales hidroxilo del peróxido de hidrógeno (Eliot *et al.*, 1984; Muindi *et al.*, 1985; Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1998). También, interfiere con la función de la membrana, *in vitro* altera la biosíntesis lipídica de las células cardíacas que resultan en la modificación de la composición de la membrana pudiendo ser los blancos de este fármaco la cardiolipina y la espectrina (Cvitkovic *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1998).

viii. Uso. Se utiliza principalmente para tratar la leucemia aguda no linfocítica, así como para el cáncer de mama, vejiga, endometrio, pulmón, ovario, estómago y tiroideo, así como sarcoma de hueso y tejidos blando. Además, para tumores

sólidos en pacientes pediátricos (Skeel, 1982; Pratt *et al.*, 1994), También se emplea para el linfoma de Burkitt y la leucemia linfocítica aguda (Reiter *et al.*, 1995). Así como para otros linfomas (Skeel, 1982; Pratt *et al.*, 1994; Canellos, 1995).

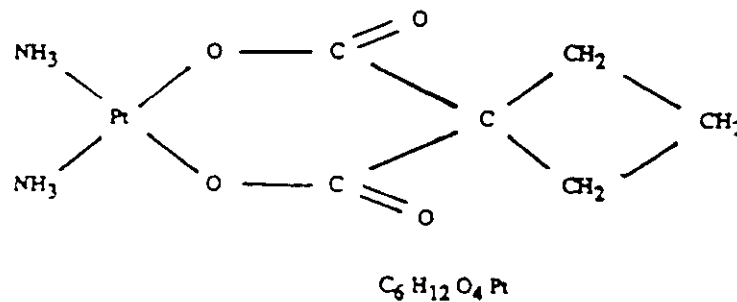
• **Carboplatino.**

i. Otros nombres. CBDCA. JM8

ii. Peso molecular. 371.25

iii. Tipo de agente. Alquilante, entrecruzador (Carter *et al.*, 1977; Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994).

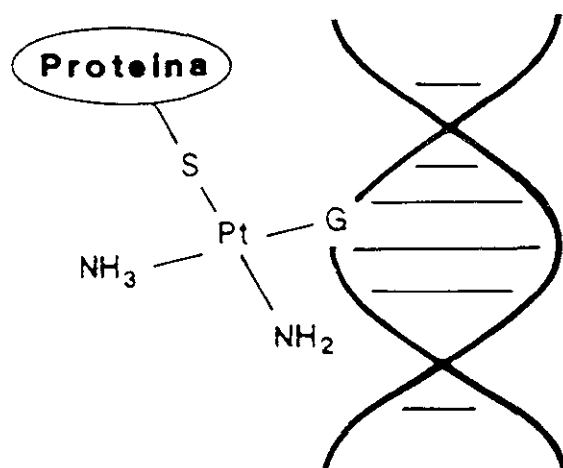
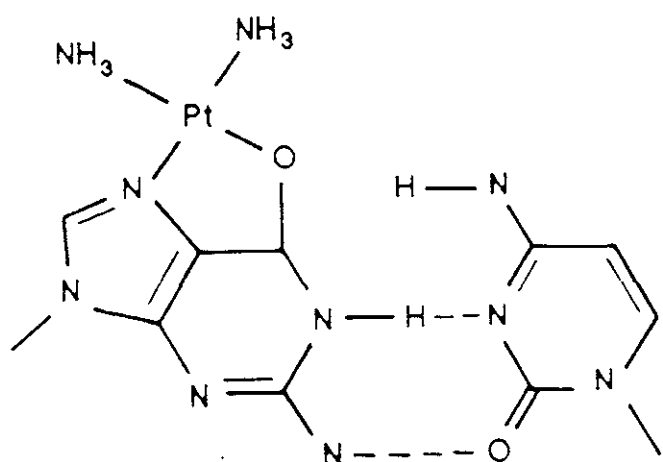
iv. Fórmula.



v. Dosis para personas adultas. 250-500 mg/m² (Cvitkovic *et al.*, 1993 Chatelut *et al.*, 1995).

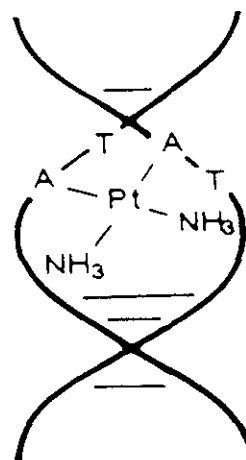
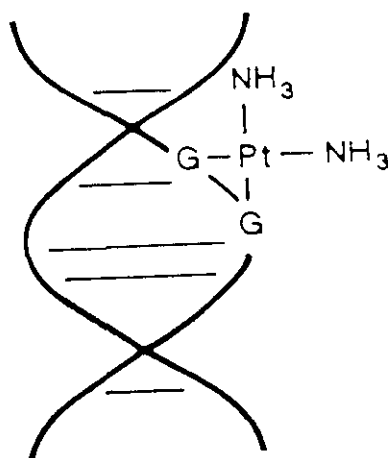
vi. Especificidad en el ciclo celular. No fase específico, presenta mayor sensibilidad en células en división (Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994).

vii. Mecanismo de acción. Existen evidencias de que el principal blanco de este agente es el DNA, los principales sitios de reacción a un pH fisiológico son el nitrógeno-7 de la guanina y adenina formando así aductos con el DNA, lo cual, conlleva a la formación de entrecruzamientos intracadenas por la unión del



A

B



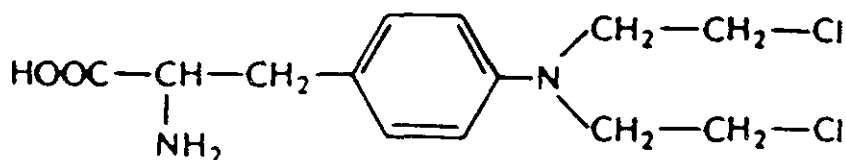
C

D

Figura 1. Posibles ejemplos de la formación de aductos involucrando al DNA por parte de los agentes bifuncionales Cis-platino y Carboplatino. (A) unión bifuncional a una base del DNA, (B) entrecruzamiento DNA-proteína, (C) entrecruzamiento intracadena y (D) entrecruzamiento intercadena.

iii. Tipo de agente. Alquilante bifuncional (Cooper, 1992; Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994)

iv. Fórmula.



v. Dosis para personas adultas. 0.05-0.1 mg/kg (Cline, 1971)

0.25-1.0 mg/Kg (Carter *et al.*, 1977)

8 mg/m² (Skeel, 1982)

2 – 8 mg/m² (Cvitkovic *et al.*, 1993)

vi. Especificidad en el ciclo celular. No fase específico (Mol *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994).

vii. Mecanismo de acción. Una reacción de máxima importancia para los efectos citotóxicos de las mostazas es la formación de un enlace covalente entre la sustancia y el nitrógeno-7 de la guanina. Después de formar este enlace con una molécula los agentes bifuncionales (aquellos que contienen dos lados reactivos cloroetil) pueden formar un enlace covalente con algún otro grupo nucleofílico (i.e. amino, carboxil, sulfhidril, imidazol), esta segunda reacción puede involucrar al nitrógeno-7 de otra guanina o algún otro grupo nucleofílico (Mol *et al.*, 1993, Pratt *et al.*, 1994).

Esta secuencia de reacciones puede tener diferentes consecuencias, por ejemplo, reaccionar con otra guanina y poco probable con una adenina o citocina, lo cual, puede resultar en un entrecruzamiento intra o intercadena. El segundo lado de la

cadena puede reaccionar con H₂O un nucleófilo débil para producir unidades de guanina monoalquiladas (Pratt *et al.*, 1994).

viii. Uso. Se utiliza para tratar el mieloma múltiple (Skeel, 1982; Pratt *et al.*, 1994; Browman *et al.*, 1995), carcinomas de mama, ovario, testículo (Skeel, 1982; Pratt *et al.*, 1994) y el glioma (Kurpad *et al.*, 1995).

Agentes antimetabolitos. Son aquellos que interfieren con la producción de los ácidos nucleicos principalmente por dos mecanismos: (1) por la incorporación de la sustancia como un compuesto químico esencial de la célula (Rojas, 1992; Duthie y McMillian, 1997) y (2) por la inhibición enzimática (Rojas, 1992; Pratt *et al.*, 1994; Kasamatsu *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1999). Algunos de éstos agentes inhiben la producción de los desoxirribonucleótidos trifosfatados, los cuales, son precursores inmediatos para la síntesis del DNA, inhibiendo así el proceso de replicación. Se ha observado que algunos agentes antimetabolitos son estructuralmente muy parecidos a las purinas o pirimidinas, por lo que, son capaces de sustituirlas. Los derivados nucleotídicos de los antimetabolitos compiten con las enzimas anabólicas y así inhiben la formación de precursores normales. Además, ellos mismos pueden ser usados como sustrato (Pratt *et al.*, 1994).

Dentro de estos agentes se encuentran los antagonistas del folato (i.e. Metotrexato y trimetexato), los antagonistas de las pirimidinas (i.e. fluoruracil, fluordesoxiuridina y azacitidina), los antagonistas de las purinas (i.e. mercaptopurina, tioguanina, tiazofurina, clorodeoxiadenosina y pentostatina), los

análogos modificados del azúcar (i.e. citarabina y fludarabina) y los inhibidores de la ribonucleótido reductasa (i.e. hidroxiurea) (Pratt *et al.*, 1994). Dentro de este grupo de agentes, para este estudio utilizamos los siguientes:

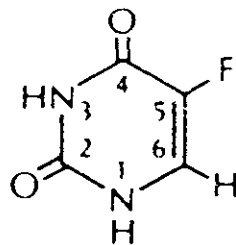
• **5-Fluoruracilo.**

i. Otros nombres. 5-FU, adrucil, fluoruracil.

ii. Peso molecular. 130.1

iii. Tipo de agente. Antimetabolito de las pirimidinas.

iv. Fórmula.



v. Dosis para personas adultas. 500-600 mg/m² (Skeel, 1982; Kohne *et al.*, 1995)

vi. Especificidad en el ciclo celular. Fase S específico (Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994).

vii. Mecanismo de acción. El ácido timidílico es un desoxirribonucleótido de la timina una de las bases pirimidicas del DNA; por medio de la enzima timidilatosintetasa (TS) se metila el 2-desoxiuridina 5-fosfato, el 5-FU cuando se convierte “*in-vivo*” al desoxinucleótido, tiene una cierta afinidad por la TS, por lo que, la bloquea cuando ésta utiliza el fluordesoxiuridina monofosfato (fdUMP) como sustrato, ya que normalmente la TS cataliza la metilación del desoxiuridina monofosfato (dUMP). Cuando fdUMP es utilizado en lugar de dUMP el proceso se paraliza en un paso intermediario atrapando a la enzima, al seudosustrato, y al

cofactor del folato en un complejo ternario covalente (Cooper, 1992; Pratt *et al.*, 1994).

viii. Uso. Se utiliza para tratar los cánceres: colorrectal (Kohne *et al.*, 1995), mama, cabeza y cuello, gástrico, tumores pancreáticos y carcinoma de células basales de la piel (Skeel, 1982; Pratt *et al.*, 1994). Además cáncer de esófago, hígado y vejiga (Skeel, 1982),

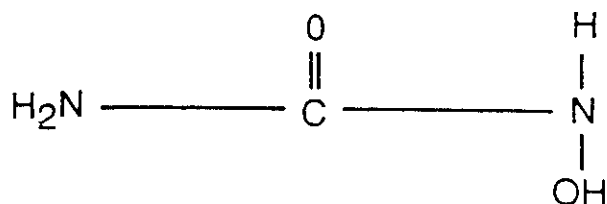
• **Hidroxiurea.**

i. Otros nombres. N-Hidroxiurea, Hydrea, N-HU, HU

ii. Peso molecular. 76.05

iii. Tipo de agente. Antimetabolito (inhibidor de la ribonucleótido reductasa) (Pratt *et al.*, 1994)

iv. Fórmula.



v. Dosis para personas adultas. 80 mg/Kg (Carter *et al.*, 1977)

800-2,000 mg/m² (Skeel, 1982)

2 mg/m² (com. pers. Dra. A.M. Mejía)

vi. Especificidad en el ciclo celular. Fase S específico (Pratt *et al.*, 1994).

vii. Mecanismo de acción. Inhibe la síntesis de DNA ya que reduce el "pool" de

nucleótidos inhibiendo la reducción enzimática de purinas y pirimidinas de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos (Cole, 1970; Skeel, 1982). Específicamente, la NHU tiene como blanco la enzima ribonucleótido reductasa, la cual, ocupa una posición única en el metabolismo de los nucleótidos ya que es la única enzima altamente regulada y su actividad está involucrada en la síntesis “de novo” de todos los precursores utilizados en la síntesis de DNA, esto lo lleva a cabo convirtiendo los ribonucleosidos-difostatos a desoxirribonucleótido-difosfatos. Por lo anterior, esta enzima está relacionada con el estado de proliferación de las células tumorales, por lo que, es un blanco para los fármacos antineoplásicos. La ribonucleótido reductasa está formada por dos dímeros llamados M1 y M2. La subunidad M2 contiene dos grupos que son importantes para su actividad catalítica: (a) un radical libre de tirosil, el cual inicia la reacción al quitar un átomo de hidrógeno del sustrato, que es un centro de hierro, el cual, es necesario para generar y estabilizar el radical tirosil. La NHU como otros compuestos inhiben a esta enzima por medio de la desestabilización del centro de hierro y así inactivar la subunidad M2 (Carter *et al.*, 1977; Pratt *et al.*, 1994). También, interfiere con los mecanismos de reparación, pero esto es a concentraciones mucho mayores a las utilizadas en este estudio (Martin *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1999).

viii. Uso. Se utiliza principalmente para la leucemia granulocítica crónica con resistencia al busulfán, se emplea en combinación con radioterapia para en tratamiento de carcinomas de cabeza y cuello y cervicouterino (Skeel, 1982; Pratt *et al.*, 1994) También, se utiliza para el tratamiento de la leucemia mielógena crónica (Hehlmann *et al.*, 1994)

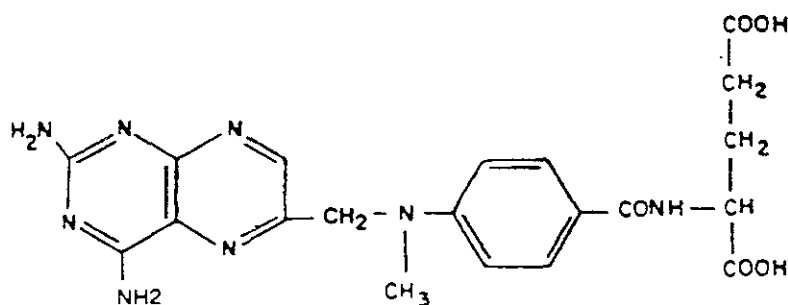
• **Metotrexato.**

i. Otros nombres. Aminopterin, MTX, mexate

ii. Peso molecular. 454.4

iii. Tipo de agente. Antimetabolito (antagonista del folato)

iv. Fórmula.



v. Dosis para personas adultas. 15-20 mg/m² y 20-30 mg/m² (Skeel, 1984; Cvitkovic *et al.*, 1993; Kamen *et al.*, 2000).

vi. Especificidad en el ciclo celular. Fase S específico (Pratt *et al.*, 1994).

vii. Mecanismo de acción. Los folatos existen en las células de los mamíferos en diferentes formas, la estructura principal de todos es el ácido fólico, el cual, para ser utilizado por la célula como coenzima tiene que reducirse por la enzima dihidrofolatreductasa (DHFR). Por lo anterior, esta sustancia entra a la célula por la ruta de transporte de la reducción del folato, inhibiendo la enzima DHFR, que es importante en la reducción del dihidrofolato a tetrahydrofolato, el último es un cofactor necesario para la síntesis de timina (timidilato) una de las bases nitrogenada del DNA (Skeel, 1982; Cvitkovic *et al.*, 1993). Una vez que el Metotrexato actúa y el "pool" preexistente de tetrahydrofolatos es usado para la síntesis del TMP (timidinmonofosfato) de "novo" la producción de nucleótidos

(purina y timidina) se bloquea arrojando así la síntesis de DNA pero también afectando la síntesis de RNA y proteínas (Pratt *et al.*, 1994)

viii. Uso. Se utiliza para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades neoplásicas, por ejemplo, coriocarcinoma gestacional, leucemia linfocítica aguda, sarcoma osteogénico. En combinación con otros agentes se emplea para el cáncer de mama (Skeel, 1982; Pratt *et al.*, 1994), así como para la leucemia linfoblástica aguda en adultos (Larson *et al.*, 1995; Reiter *et al.*, 1995) y en niños (Reiter *et al.*, 1994; Chessells, 1995). También, existe una respuesta positiva en algunos pacientes con cáncer de pulmón, de cervix, carcinomas epidérmicos y algunos otros tumores sólidos (Skeel, 1982; Pratt *et al.*, 1994).

Agentes inhibidores de microtúbulos

Una gran cantidad de agentes químicos, de los cuales muchos son de origen natural, presentan actividad antitumoral ya que son capaces de unirse a la tubulina o a los microtúbulos, estas estructuras son polímeros proteínicos del citoesqueleto, esenciales para el crecimiento celular, división celular, movilidad, transducción de señales, desarrollo y mantenimiento celular. Al interactuar con estas proteínas causan inhibición de la proliferación celular específicamente en la transición de metafase a anafase durante la mitosis, ya que dañan al citoesqueleto principalmente (Jordan *et al.*, 1991; Jordan y Wilson, 1993). Algunos de estos agentes son: Colchicina, Taxol, Taxotere, Epotilones y los derivados de la planta *Vinca rosea* (Vincristina, Vinblastina, Vindesina), los cuales, principalmente, son parte medular de los protocolos de quimioterapia para

cánceres hematológicos. En este trabajo utilizamos a la vinblastina.

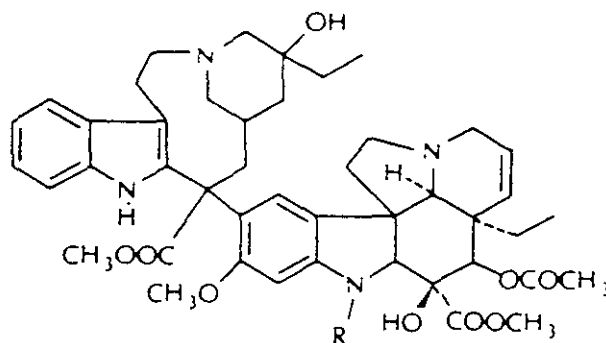
- **Vinblastina.**

i. Otros nombres. Velbe, Velban, VBL

ii. Peso molecular. 811

iii. Tipo de agente. Alcaloide derivado de la planta *Catharanthus rosea* (*Vinca rosea*), inhibidor de microtúbulos (Cooper, 1992, Pratt *et al.*, 1994; Jordan y Wilson, 1998).

iv. Fórmula.



v. Dosis para personas adultas. 2mg/m² (Samuels *et al.*, 1997).

vi. Especificidad en el ciclo celular. Los agentes inhibidores de los microtúbulos, son específicos para la fase "M" (metafase) ya que arrestan a la célula en esta fase (Pratt *et al.*, 1994; Jordan y Wilson, 1998).

vii. Mecanismo de acción. Este producto natural, como ya se mencionó, inhibe la acción de los microtúbulos, y por lo tanto afecta las funciones del huso mitótico, esto lo logra ya que se une directa y específicamente a los dímeros libres de la tubulina, esto hace que se rompa el equilibrio de polimerización y

despolimerización de los microtúbulos (Wilson, 1990; Jordan *et al.*, 1991; Livezey *et al.*, 1993; Panda *et al.*, 1996; Scala *et al.*, 1996), ya que se forman agregados de tubulina con la droga, causando así un arresto en metafase, (Wilson, 1990; Jordan *et al.*, 1991; Livezey *et al.*, 1993, Panda *et al.*, 1996; Scala *et al.* 1996) que es un proceso muy complejo, el cual, depende de varios factores como son: la fuerza iónica, la concentración del ion magnesio, interacción con otras proteínas (diferentes de la tubulina), la concentración de nucleótidos y los niveles de GTP (guanosin-trifosfato), entre otros. Por su parte, Jordan y Wilson (1998) plantean que el efecto antimitótico de este compuesto es gracias a la estabilización cinética, del huso mitótico, más que la desestabilización del proceso de polimerización de la tubulina.

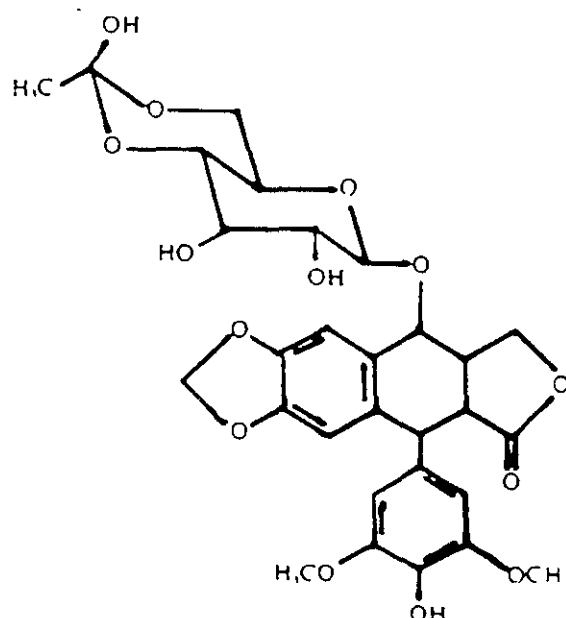
Otros mecanismos de acción propuestos para este compuesto están relacionados con varios procesos celulares, los cuales, parecen no tener relación con el daño en microtúbulos. Por ejemplo, afectar la biosíntesis de ácidos nucleicos y lípidos, el metabolismo de los nucleótidos y del glutatión, también afectar la actividad de la calmodulina dependiente de ATP (Adenosin trifosfato) (Creasey, 1968; Klein *et al.*, 1975, Jordan *et al.*, 1991).

viii. Uso. Se utiliza principalmente para los linfomas tipo Hodgkin y no Hodgkin (Liang *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994; Canellos, 1995), Así como en combinación con otros fármacos para el tratamiento de cánceres de ovario y testículo y su empleo es limitado en el cáncer del tracto urinario, de mama y en el sarcoma de Kaposi (Pratt *et al.*, 1994).

Agentes inhibidores de la función de la cromatina. Los cromosomas eucarióticos son estructuras complejas que cambian de conformación y posición intracelular durante el ciclo celular, estos cambios son necesarios para la replicación del DNA y la división mitótica. Además, se ha encontrado que los agentes que interfieren con las proteínas responsables de estos cambios son selectivamente tóxicas a las células en proliferación. Dentro de estos agentes podemos citar a los inhibidores de las topoisomerasas (i.e. etopósido, tenipósido, amsacrina y camptotesina) (Pratt *et al.*, 1994). El fármaco utilizado dentro de estos agentes fue:

• **Etopósido.**

- i. Otros nombres. VP-16-213, verapamil y epipodofilotoxina.
- ii. Peso molecular. 588.6
- iii. Tipo de agente. Es una podofilotoxina derivada de raíces y rizomas de *Podophyllum pellatum* y *P. emodii* (Cvitkovic *et al.*, 1993).
- iv. Fórmula.



v. Dosis para personas adultas. 50 mg/m² (Carter *et al.*, 1977)

50-100 mg/m² (Skeel, 1982)

300 mg/m² (Cvitkovic, 1993)

vi. Especificidad en el ciclo celular. Fase específico (S-G2) (Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994).

vii. Mecanismo de acción. Bloquea el ciclo celular en la fase S tardía y G2 temprana, causa rompimientos de una y dos cadenas del DNA ya que su principal blanco es la enzima topoisomerasa-II (enzima nuclear responsable de los cambios topológicos del DNA). También, se une al DNA de manera covalente y directamente para formar un fuerte complejo topoisomerasa-II-DNA; para que así esta enzima no sea capaz de resellar los rompimientos de las cadenas. Se ha observado que reduce el índice mitótico (Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994). Además, se ha observado que el tratamiento con etopósido previene la activación de la proteína cinasa p34^{cdc2}. Esta cinasa que normalmente se activa al final de la fase G2 del ciclo celular, juega un papel crítico en permitir a las células la entrada a la mitosis (Pratt *et al.*, 1994), debido a lo anterior después del tratamiento con etopósido se observa un arresto celular en la fase G2.

Otro aspecto importante es que induce genotoxicidad, debido a que el VP-16 contiene un grupo fenólico, el cual es crucial para su actividad antitumoral (Gantchev *et al.*, 1994; Kagan *et al.*, 1994; Ritov *et al.*, 1995; Tyurina *et al.*, 1995). Se ha reportado que varios sistemas enzimáticos como peroxidasas, tirosinasas, prostaglandin sintasas y P-450, así como fuentes exógenas de radicales peroxilos (como los compuestos AZO), activan al VP-16 por medio de la oxidación de un

electrón del grupo fenólico para generar metabolitos reactivos (quinonas), los cuales pueden actuar como mutagénicos, carcinogénicos y citotóxicos por la interacción directa con blancos macromoleculares como el DNA y proteínas, así como la generación de radicales hydroxilo en la catálisis de metales, causando estrés oxidante (Haim *et al.*, 1987; Guntchev *et al.*, 1994; Kagan *et al.*, 1994; Ritov *et al.* 1995; Tyurina *et al.*, 1995). Cuando se forma el radical fenoxilo, éste puede ser convertido a productos de oxidación o de reducción a su estado original, estos pasos son críticos para suprimir o activar sus efectos citotóxicos (Guntchev *et al.*, 1994). Los compuestos azo se pueden descomponer unimolecular y no enzimáticamente para generar N_2 y dos radicales idénticos con un centro de carbón que podrían reaccionar con oxígeno molecular para formar radicales peroxilos, éstos pueden sustraer el átomo de hidrógeno de los fenoles para inducir radicales fenoxilos (Gantchev *et al.*, 1994).

viii. Uso. Se utiliza principalmente contra el cáncer de testículo (Cvitkovic *et al.*, 1993; Pratt *et al.*, 1994). Aunque, también presenta actividad contra el carcinoma de células pequeñas del pulmón, así como para la leucemia aguda no linfocítica (Skeel, 1982; Cvitkovic *et al.*, 1993), leucemia mieloide aguda (Archimbaud *et al.*, 1995). Además, se usa para tratar los linfomas de Hodgkin (Cvitkovic *et al.*, 1993; Canellos, 1995), no Hodgkin (Cvitkovic *et al.*, 1993; Haioun, 1994) y linfoma de Burkitt (Reiter *et al.*, 1995).

Agentes Hormonales

Se les conoce de esta manera, porque los tumores originados en órganos sexuales pueden responder de manera positiva a las hormonas ya que presentan receptores hormonales, por lo que, el crecimiento de varios tipos de tumores puede ser modificado con hormonas esteroideas o sus antagonistas (i.e. los estrógenos, las progestinas y los andrógenos). En algunos casos, los tumores son hormona-dependientes y la terapia se enfoca en remover el órgano productor de la hormona, o bien previniendo la síntesis hormonal en otros sitios, bloqueando la acción endógena hormonal de las células tumorales por tratamiento con sustancias antihormonales. Otras clases de hormonas esteroideas son los glucocorticoides los cuales presentan un efecto linfocitolítico (Pratt *et al.*, 1994).

Como ya hemos mencionado, la mayoría de los agentes químicos utilizados para el tratamiento del cáncer inducen daño directo o indirecto en el DNA. Por lo anterior, se han incrementado, en los últimos años, el desarrollo de pruebas que detecten el daño inducido por los agentes antineoplásicos y muchos otros agentes químicos, dentro de éstas podemos citar las pruebas que determinan la inducción de genotoxicidad.

Pruebas de genotoxicidad. La exposición de los seres vivos a los diferentes agentes capaces de causar un daño genotóxico ha generado un creciente interés para desarrollar técnicas capaces de detectar dicha alteración.

Los primeros ensayos surgieron en la década de los 70. Una de las primeras

pruebas, y con vigencia hasta nuestros días, es la de Ames o conocida como “revertantes de histidina” (en *Salmonella*) que evalúa el efecto a nivel genético causado por los agentes físicos en bacterias auxótrofas, causando la reversión a protótrofas (Brusick, 1987). Posteriormente, se comenzaron a realizar pruebas en células eucariontes (levaduras), para obtener modelos cada vez más similares a las células humanas.

Uno de los ensayos utilizados es la evaluación de mutaciones en genes conocidos, y un ejemplo de esto son la hipoxantina-guanosin fosforibosil transferasa (HPRT) y la timidina cinasa (tk). El tipo de mutaciones que aquí se detectan son en cantidad de información (inserción y deleción) y estructura génica (sustitución de bases y rearrreglos) (Brusick, 1987).

Otro tipo de prueba es la búsqueda de aberraciones cromosómicas, esta prueba es una de las más utilizadas para detectar genotoxicidad.

Existen dos tipos de aberraciones: numéricas y estructurales. En este tipo de análisis se evalúan diversos parámetros que proporcionan una clara idea sobre el tipo de daño que se produce. Entre los parámetros considerados se encuentran:

- número cromosómico (aberraciones de tipo numérico)
- deleciones, duplicaciones, inserciones, inversiones y translocaciones (aberraciones de tipo estructurales), y
- alteraciones capaces de producir formaciones en anillos por recombinación y no disyunción.

Otro tipo de pruebas de genotoxicidad son:

- micronúcleos, producidos por la pérdida de cromosomas enteros o fragmentos

de estos durante la división celular.

- intercambio de cromátidas hermanas, producidas por el rompimiento y la reunión del material genético entre las cromátidas en el mismo "locus" sin alterar la estructura (Brusick, 1987).

Se conocen también otro tipo de ensayos, los cuales, evalúan la reparación del DNA después de la exposición a un xenobiótico, lo que puede descubrir mecanismos de acción de los agentes químicos que dificultan la reparación, así como encontrar a las personas que son más susceptibles a los efectos a largo plazo por dificultades reparadoras (Li *et al.*, 1991).

En la última década se ha propuesto la técnica de electroforesis unicelular o ensayo cometa como un sistema sensible para la detección de daño genotóxico, que se manifiesta a manera de rompimientos en la cadena de DNA.

Electroforesis unicelular alcalina

Ostling y Johanson (1984) propusieron una técnica para la detección de daño genotóxico al DNA en células individuales, en la que realizan una electroforesis en microgel, donde las células son embebidas en agarosa y posteriormente lisadas en una solución rica en detergentes; posteriormente, se someten a un campo eléctrico bajo condiciones neutras (pH 9.5) y por último se añade un fluorocromo para observar al microscopio de fluorescencia, lo que aparentemente se asemeja a la imagen de un cometa. En los últimos años, la técnica ha sufrido modificaciones las cuales le proporcionan una mayor sensibilidad para la detección del daño en material genético por agentes genotóxicos, las

modificaciones más relevantes son: (1) el pH de la solución de lisis, (2) el pH del amortiguador de electroforesis, (3) las condiciones de electroforesis (amperaje, voltaje), (4) tiempo de desenrollamiento de las cadenas del DNA y (5) el tiempo de corrimiento de la electroforesis (Rojas *et al.*, 1999).

Actualmente existen tres versiones para el uso de esta técnica, la primera fue propuesta por Singh *et al.* (1988) y recibió el nombre de "single cell gel electrophoresis technique" (SCGE) o ensayo cometa, la cual utiliza una electroforesis alcalina (pH 13) que es capaz de detectar rompimientos de una cadena, sitios álcali lábiles y sitios retardados de reparación del DNA en células individuales. La segunda fue propuesta por Olive *et al.* (1990) en la cual desarrollan una modificación a la técnica de Ostling y Johanson, en la que utilizan una solución de lisis alcalina seguida por una electroforesis ya sea en condiciones neutras para ver rompimientos de doble cadena del DNA, o bien, en condiciones alcalinas (pH 12.3) para la detección de rompimientos de una cadena del DNA y sitios retardados de reparación.

Los resultados obtenidos con este ensayo están caracterizados por las condiciones de pH de la solución de lisis y electroforesis, ya que cambiadas éstas, la sensibilidad del ensayo se ve afectada. En condiciones neutras para las dos variables antes mencionadas se pueden detectar rompimientos de dos cadenas del DNA. Mientras que a pH 12.3 se detectan los de una cadena, así como sitios retardados de reparación y a $\text{pH} > 13$ se puede evaluar el rompimiento de una cadena, sitios retardados de reparación y sitios sensibles al álcali (Rojas *et al.*, 1999).

En células animales (i.e. roedores, perro, oveja, pez) se ha utilizado cualquier tipo de tejido u órgano ya que unas pocas células son suficientes para este ensayo. Dentro de éstos las células más utilizadas son las sanguíneas, médula ósea, cerebro, mucosa gastrointestinal, hígado, riñón, mucosa nasal, ovario, piel, bazo y testículo. También, se han utilizado líneas celulares provenientes de roedores, donde el cultivo de los hepatocitos ha sido el más reportado (Rojas *et al.*, 1999). Entre las ventajas que le han dado gran éxito al ensayo cometa se encuentran el poder trabajar con células individuales, ya que se necesita una pequeña muestra celular (10,000-50,000 células), la mayoría de las células eucariontes se pueden utilizar, el ensayo es sensible, simple y económico, los resultados se obtienen a corto plazo (en promedio 3 horas después de colectadas las células) y además se puede detectar daño en células sin proliferar (Rojas *et al.*, 1999).

Ensayo cometa y quimioterapia. En los últimos años, se ha utilizado la técnica de electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa, en diversos estudios para observar los distintos efectos de algunas de las sustancias antineoplásicas usadas en el tratamiento contra el cáncer. De los trabajos relacionados con los fármacos empleados en este estudio podemos citar a Tice *et al.* (1992), los cuales, trabajaron con linfocitos criopreservados de 11 pacientes con cáncer de mama tratados con altas dosis de agentes alquilantes, como la ciclofosfamida y el cisplatino (agente precursor del carboplatino), ésto con el objeto de evaluar la aplicación de la técnica para la detección de los diferentes niveles de daño en el DNA inducidos por agentes utilizados en la quimioterapia. Estos autores

describieron que estos compuestos son capaces de inducir diferentes niveles de daño en el DNA, los cuales, no están correlacionados con las concentraciones de los fármacos en el suero o los niveles de la toxicidad linfocítica, con respecto a las muestras post-tratadas, la mayoría de las células no presentaron daño en el DNA. Estos autores concluyen que el ensayo cometa es capaz de medir el daño genotóxico durante el tratamiento con agentes quimioterápicos, permitiendo así, hacer modificaciones en la dosis y el tiempo de tratamiento para obtener el efecto deseado.

Olivé y Banath (1993) utilizaron etopósido entre otros agentes químicos, para provocar rompimientos de doble cadena en células en S, G1 ó G2/M, con el objeto de detectar el daño en estas células por medio del ensayo cometa en condiciones neutras, encontrando que las de fase S presentan de 2 a 3 veces menos daño que en otras fases del ciclo, concluyendo que las diferencias estructurales del DNA son las responsables de que la sensibilidad de detección de los rompimientos de dos cadenas en células en fase S del ciclo sea más difícil.

Por su parte, Kasamatsu *et al.* (1996) utilizaron el ensayo cometa para observar los efectos de distintos agentes químicos directos (sin activación metabólica) e indirectos (con activación metabólica). Por ejemplo, agentes directos como: el H₂O₂, N-metil-N-nitrosurea y bleomicina, y de los agentes indirectos usaron el 5-FU, Metotrexato y la 4-nitroquinoleína-1-óxido. Los autores modificaron la versión original del cometa para obtener células intactas y sin membranas celulares (DNA desnudo) para dar el tratamiento, reportando que esta técnica puede aportar conocimiento acerca de las propiedades químicas y biológicas de distintos

agentes, así como una sensibilidad diferencial de células con y sin membranas celulares, encontrando que sólo los agentes directos producen un efecto en la migración del DNA.

Pfuhler y Wolf (1996), reportaron que la técnica del cometa en condiciones alcalinas es un método rápido y sensible para la detección de agentes entrecruzadores como el cis-platino y la mitomicina-C.

Por su parte, Anderson *et al.* (1997) emplearon la electroforesis unicelular alcalina para observar el daño genotóxico producido después de un tratamiento con adriamicina, las células son tratadas después de estimularlas con PHA durante 20 h, lo que resulta en una actividad dosis-respuesta sólo en células estimuladas.

Por otro lado, Olive y Banath (1997) exponen diferentes líneas celulares (tumoraes) a agentes genotóxicos, para determinar si el daño provocado por éstos en el DNA, podría ser predictivo para la muerte celular y resistencia a los fármacos que utilizaron (adriamicina, etopósido y actinomicina-D). Concluyen que en condiciones alcalinas se observa un daño que sí puede ser correlacionado con la muerte celular independientemente del tiempo de tratamiento o la concentración del fármaco. Para el etopósido y la adriamicina, no se pudo determinar la muerte celular, pero en general para la mayoría de los fármacos el ensayo cometa fue una herramienta efectiva y cuantitativa para la predicción de la citotoxicidad en sistemas multicelulares.

Con el objetivo de validar la electroforesis unicelular como un sistema para detectar genotoxicidad, Sasaki *et al.* (1997) emplearon diferentes órganos de ratón, usando 11 mutágenos químicos distintos, de los cuales tres eran agentes

En 1999 Romanet *et al.* utilizaron el ensayo cometa para medir hipoxia celular y RCS (rompimiento de cadena sencilla) en linfocitos de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello bajo un régimen quimioterapéutico en combinación, los resultados muestran dos poblaciones, una con poco daño correspondiente a las células hipóxicas y otra con mucho daño correspondiente a las células aeróbica. También, observaron a través del cometa una relación entre los aductos formados con el DNA por parte del átomo de platino y la respuesta del tumor, sugiriendo que la resistencia clínica a los compuestos del platino es atribuible a funciones de reparación del DNA.

Por todo lo anterior y considerando que en los últimos años se ha incrementado la necesidad de búsqueda de nuevos y mejores sistemas para la detección de antineoplásicos, en este trabajo se propone a la técnica de electroforesis unicelular o ensayo cometa como un posible sistema de detección de antineoplásicos, con mecanismos de acción conocidos, siendo éste el basamento para en un futuro poder proponer dicha técnica como un posible sistema de predicción de los efectos de la quimioterapia. Por lo que en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de la técnica de electroforesis unicelular, que detecta daño al DNA, como un sistema sensible para la predicción de los efectos de agentes antineoplásicos con mecanismos de acción diferentes.

En 1999 Romanet *et al.* utilizaron el ensayo cometa para medir hipoxia celular y RCS (rompimiento de cadena sencilla) en linfocitos de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello bajo un régimen quimioterapéutico en combinación, los resultados muestran dos poblaciones, una con poco daño correspondiente a las células hipóxicas y otra con mucho daño correspondiente a las células aeróbica. También, observaron a través del cometa una relación entre los aductos formados con el DNA por parte del átomo de platino y la respuesta del tumor, sugiriendo que la resistencia clínica a los compuestos del platino es atribuible a funciones de reparación del DNA.

Por todo lo anterior y considerando que en los últimos años se ha incrementado la necesidad de búsqueda de nuevos y mejores sistemas para la detección de antineoplásicos, en este trabajo se propone a la técnica de electroforesis unicelular o ensayo cometa como un posible sistema de detección de antineoplásicos, con mecanismos de acción conocidos, siendo éste el basamento para en un futuro poder proponer dicha técnica como un posible sistema de predicción de los efectos de la quimioterapia. Por lo que en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de la técnica de electroforesis unicelular, que detecta daño al DNA, como un sistema sensible para la predicción de los efectos de agentes antineoplásicos con mecanismos de acción diferentes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar e identificar el daño producido por agentes antineoplásicos que interactúan directamente con el DNA (agentes alquilantes e intercalantes).
- Evaluar e identificar el daño producido por agentes antineoplásicos que interactúan indirectamente con el DNA (inhibidores de la función de la cromatina, inhibidores de los microtúbulos, antimetabolitos).

METODOLOGÍA

Selección de Fármacos:

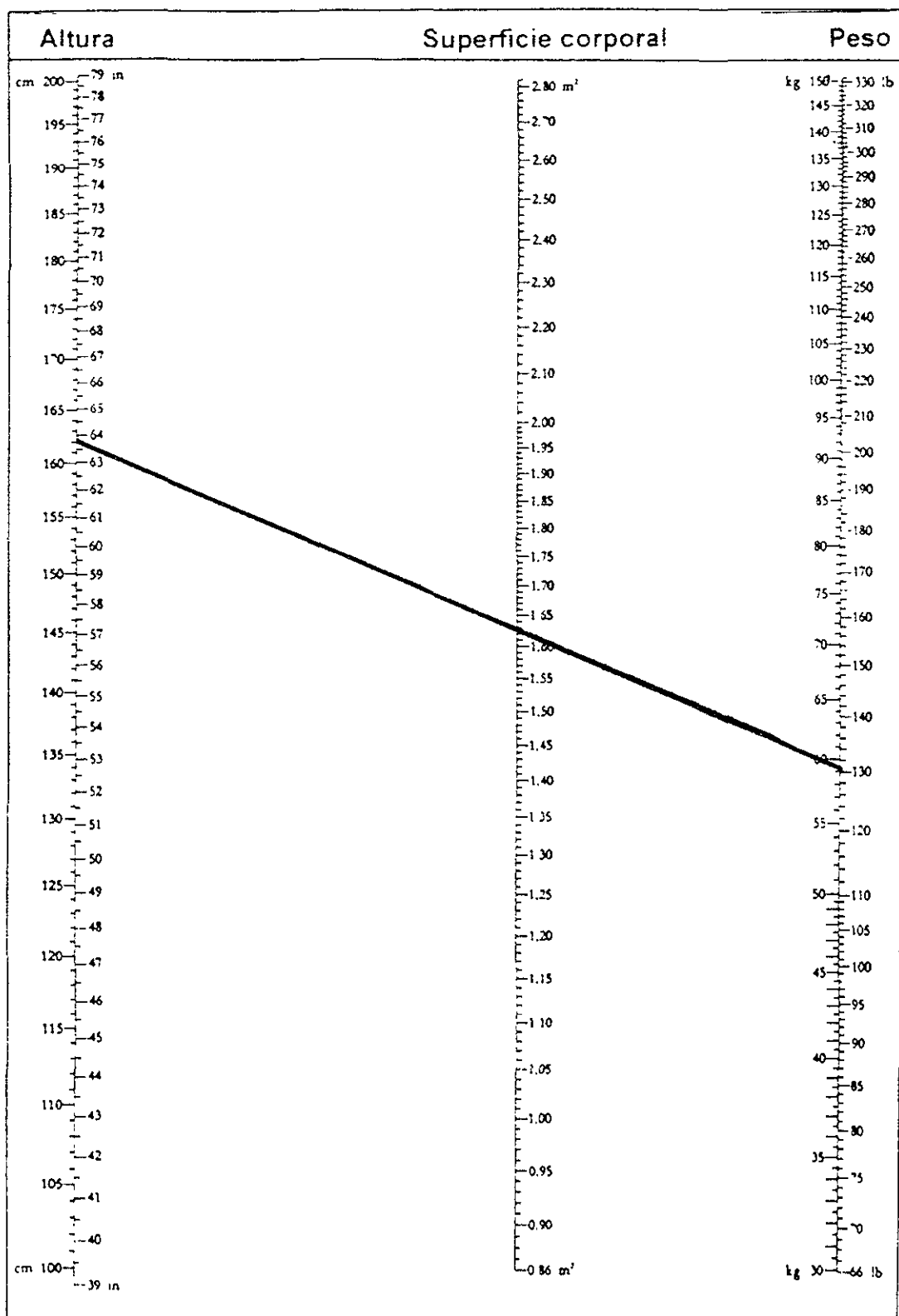
Los agentes utilizados en este estudio se seleccionaron por las siguientes razones:

- a) Son compuestos caracterizados por su mecanismo de acción (interacción con el DNA), lo que hace posible predecir ciertos resultados en nuestro sistema de estudio.
- b) Son empleados con mucha frecuencia en los protocolos de quimioterapia para cánceres del tejido hematopoyético como las leucemias y los linfomas.
- c) Son compuestos clasificados en grupos distintos de antineoplásicos (antimetabolitos, antibióticos, alquilantes, entrecruzadores, inhibidores de la función de la cromatina, inhibidores de microtúbulos), lo que permite tener un sistema detector de antineoplásicos con un amplio espectro de mecanismos de acción.

Preparación de los medicamentos:

La concentración de cada sustancia fue calculada para un equivalente en m^2 , ya que las dosis de los tratamientos en los pacientes se administran en mg/m^2 , para ésto se calculó la superficie corporal en m^2 , utilizando la tabla de relación entre peso corporal y estatura para personas adultas, que establece el manual de quimioterapia del cáncer (Skeel, 1982) (Tabla 1).

Tabla 1. Método para calcular la superficie (m^2) de individuos adultos, utilizando peso y altura (Skeel, 1982).



Para la preparación de cada sustancia se utilizaron como medidas promedio de peso 60 kg y la altura 1.63 m, las cuales se calcularon a partir de los donadores, además, se tomó en cuenta que una persona adulta tiene aproximadamente 4 L de sangre entera, obteniendo así la concentración de cada sustancia antineoplásica en mg/m^2 , siendo la dosis reportada un equivalente equimolar de las dosis empleadas en el tratamiento clínico.

La dosis utilizada para cada sustancia fue la que con mayor frecuencia se emplea terapéuticamente para cánceres del tejido hematopoyético como las leucemias y los linfomas (Tabla 2).

Tabla 2. Dosis (mg/m^2) utilizadas con mayor frecuencia para el tratamiento clínico de cada antineoplásico y su correspondiente concentración micromolar en el cultivo "in-vitro". Para cánceres del tejido hematopoyético.

FÁRMACO	DOSIS TERAPEÚTICA mg/m^2	TRATAMIENTO μM
METOTREXATO	30	0.260
CARBOPLATINO	500	0.055
ADRIAMICINA	30	0.023
ACTINOMOCINA-D	0.6	19.40
N-HIDROXIUREA	2	0.107
ETOPOSIDO	300	0.021
5-FLUORURACILO	600	0.002
VINBLASTINA	2	1.000
MELFALAN	8	0.010

Posteriormente, las sustancias se disolvieron en 10 ml de agua estéril, con excepción del 5-fluoruracilo, el cual se disolvió en 10 ml de DMSO (dimetilsulfóxido), se pasaron por un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ para evitar contaminación

por bacterias, con estas soluciones se hicieron alicuotas en tubos eppendorf de 1 ml, y se guardaron en congelación a -20 °C.

Selección de donadores:

Se seleccionaron dos donadores con las siguientes características: sexo femenino, personas sanas que no se encontraran expuestas a medicamentos o a otras sustancias por lo menos un mes previo a cada uno de los experimentos, con una dieta balanceada y no fumadoras. Las edades correspondientes son de 24 años para el donador 1 y de 45 años para el donador 2, el intervalo de altura se encuentra entre 1.61-1.67 m y el del peso corporal oscila entre 58-62 kg.

Obtención de muestras de sangre:

Se obtuvo una muestra de sangre entera por punción venosa con una jeringa previamente heparinizada, esta muestra se puso en un tubo eppendorf estéril quitando la aguja a la jeringa previamente para evitar la hemólisis de la muestra. Rápidamente se midió la viabilidad celular basal por medio del método de viabilidad por fluorocromos (Strauss, 1991). Si era mayor al 80% se procedía con el experimento.

Tratamiento “*in-vitro*” de 2 y 24 h

En condiciones de esterilidad:

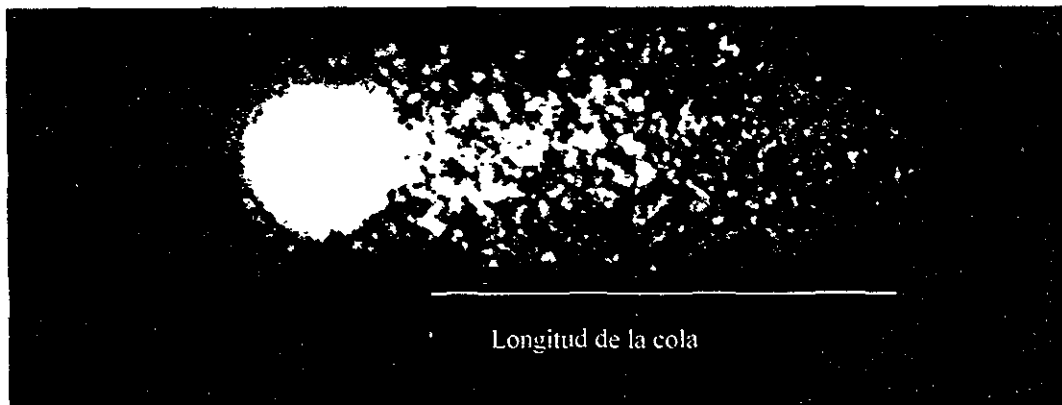
Para cada tratamiento se utilizó un tubo eppendorf estéril de 1 ml., al cual se le adicionó lo siguiente:

Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa: pH>13

Se llevó a cabo la versión alcalina propuesta por Singh *et al.* (1988) con algunas modificaciones. Consistiendo en obtener 10 μ l de sangre entera de cada una de las condiciones de los tratamientos de 2 y 24h, se mezclaron con 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión 0.5% (Sigma USA), se colocó en una laminilla que previamente fue cubierta con 200 μ l de agarosa regular 0.5% (Sigma USA).

Se llevó a 4°C para que se gelificara, se removió el cubreobjetos y se le adicionó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión, después de gelificada se remueve el cubreobjetos y se lleva a una solución de lisis (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10 y se adiciona fresco: 10% DMSO y 1% Triton X-100, (Sigma) a 4°C durante al menos 1 h; posteriormente se pusieron las laminillas en una cámara de electroforesis, conteniendo un amortiguador alcalino (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, Sigma a un pH>13), las laminillas estuvieron en contacto con este amortiguador durante 20 min para que las hebras del DNA se puedan desenrollar, y posteriormente se llevó a cabo la electroforesis durante 20 min a (0.8 V/cm), (este procedimiento se realizó bajo condiciones de luz amarilla), posterior a la electroforesis las laminillas fueron lavadas en un amortiguador de neutralización (0.4M Tris pH 7.5) durante 15 min y deshidratadas con etanol (100%) por 10 min y secadas al aire. A cada laminilla, se le adicionó 20 μ l de bromuro de etidio (Et-Br) de una solución patrón de 75 (μ g/ml), y cubiertas con un cubreobjetos. Se observaron células individuales a un aumento de 20X con un ocular graduado en un microscopio de fluorescencia (Olimpus BMX-60, con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm). Se midió la

longitud de las colas de los cometas, esto es, de donde termina el último punto fluorescente de la cabeza hasta el último punto fluorescente de la cola. Se evaluaron 100 células por condición (Figura 2).



Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa: pH 12.3

Se llevó a cabo el ensayo cometa a pH 13 como se mencionó anteriormente, las dosis utilizadas de etopósido fueron, la inicial 2.07×10^{-4} , 2.07×10^{-5} y 2.07×10^{-6} .

El ensayo cometa a pH 12.3, se llevó a cabo como lo reportan Rojas *et al.* (2000) (fig. 2). Brevemente, después de la lisis a 4°C durante 1 h [2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10 mM Tris pH 10 y fresco se le adiciona: (10% DMSO, 1% Triton X-100)]; las laminillas se colocaron en una cámara horizontal de electroforesis, con una solución de corrida (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA pH 12.3). Las laminillas se dejaron en esta solución durante 1 h para desenrollar las cadenas del DNA. La electroforesis se llevó a cabo durante 25 min (0.8 v/cm), posteriormente, las laminillas se lavaron en una solución de neutralización (0.4M TRIS pH 7.5) a temperatura ambiente (15min), después de deshidrataron con etanol (100%)

durante 10 min, se secaron al aire y se tiñeron con Bromuro de etidio (20 μ l de una solución patrón de 75 μ g/ml). Se evaluaron 100 células por condición.

Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa para detección de rompimientos específicos.

Esta metodología se llevó a cabo según lo reportado por Green *et al.* (1996), en esta se evidencia el daño oxidante como rompimientos de cadena sencilla de DNA, utilizando la enzima de restricción Exonucleasa III (EXO III). Después de sumergir las laminillas en la solución de lisis, se lavan en la solución amortiguadora de la enzima (Tris-HCl 0.66mM, MgCl₂ 0.66mM, 2-Mercaptoetanol 1mM, pH 8.0) por 5 min, posteriormente, se le adiciona el amortiguador de incubación y/o éste con la enzima, según sea el caso (50 μ l), se sella con un cubreobjetos y se incuban durante 1 h a 37°C, los pasos siguientes de electroforesis y neutralización, con excepción del desenrollamiento, el cual, en este protocolo no se realiza, se llevaron a cabo como se describió anteriormente a un pH>13.

Análisis estadístico:

Para determinar si las diferencias entre el comportamiento de cada una de las sustancias empleadas con su respectivo testigo, se utilizó la prueba no paramétrica de U-Mann-Whitney, debido a que los datos no presentan una distribución normal (Zar, 1984). Para el análisis de datos se utilizó el programa de software STATISTICA versión 5.0.

RESULTADOS

Ensayo de viabilidad por fluorocromos:

Las viabilidades basales para ambos donadores se registraron por arriba del 95% en todos los experimentos. Ésta se obtuvo como el porcentaje promedio de células vivas de tres experimentos por donador.

En la tabla 3 se observa que en linfocitos sin estimular, después de 2 h de tratamiento, el menor porcentaje se registró en la vinblastina (89.24 ± 13.0), mientras que los porcentajes más altos se presentaron en adriamicina e hidroxiurea (100 ± 4.5 y 100 ± 3.0 , respectivamente). Por su parte, en los linfocitos estimulados, después de 24 h de tratamiento, la vinblastina volvió a registrar los porcentajes más bajos de viabilidad (68.24 ± 15.0) y los mayores porcentajes fueron para el carboplatino y 5-FU (100 ± 4.9 y 100 ± 11.01 , respectivamente).

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad mediante el método de viabilidad por fluorocromos, promedio de tres experimentos por donador a 2 y 24 h de tratamiento con distintos fármacos ($pH > 13$).

AGENTE	2 H			24 H		
	Donador 1 (%±d.e)	Donador 2 (%±d.e)	X (%±d.e)	Donador 1 (%±d.e)	Donador 2 (%±d.e)	X (%±d.e)
CTRL	100	100	100	100	100	100
MELF	100±7.0	98.2±5.0	99.0±1.3	95.9±9.0	88.4±4.1	92.2±5.3
MTX	100±9.7	95.7±8.0	97.8±3	87.7±18	75.3±2.0	81.5±8.7
CARBO	91.1±15	99.1±2.3	95.1±5.6	100±4.9	100±4.8	100±4.9
ADRI	100±6.0	100±3.0	100±4.5	90.77±1.9	87.4±3.6	89.1±2.0
VBL	78.5±18	100±8.0	89.2±13	73.86±16	62.7±15	68.3±15
NHU	100±4.0	100±2.2	100±3.0	90.2±6.0	100±6.6	95.1±6.9
ACT-D	96.2±6.5	87.9±9.9	92.1±5.8	89.6±5.0	100±9.0	94.8±7.0
VP16	95.8±7.8	95.1±9.1	95.5±8.5	99.1±3.5	92.4±7.3	95.8±5.4
5-FU	99.7±8.0	100±2.2	99.8±0.2	100±7.0	100±15	100±11

En la tabla 4 se observa que los porcentajes de viabilidad para ambos tratamientos (2 y 24 h) con diferentes concentraciones de etopósido estuvieron por arriba del 91%.

Tabla 4. Porcentaje de viabilidad mediante el método de viabilidad por fluorocromos después de 2 y 24 h de tratamiento con diferentes concentraciones (207, 20.7 y 2.07 micromolar) de etopósido.

[] ETOPÓSIDO μM	2 H			24 H		
	Donador 1 (% \pm d.e.)	Donador 2 (% \pm d.e.)	X (% \pm d.e.)	Donador 1 (% \pm d.e.)	Donador 2 (% \pm d.e.)	X (% \pm d.e.)
CTRL	100	100	100	100	100	100
207	85.3 \pm 8.0	96.8 \pm 8.3	91.1 \pm 8.2	97.8 \pm 11	85.0 \pm 8.8	91.4 \pm 9.9
20.7	100 \pm 3.3	98.3 \pm 1.2	99.2 \pm 2.2	100 \pm 4.0	93.4 \pm 2.8	96.7 \pm 3.4
2.07	95.9 \pm 8.0	95.1 \pm 9.1	95.5 \pm 8.5	99.1 \pm 3.5	92.4 \pm 7.3	95.8 \pm 5.4

Electroforesis unicelular alcalina pH > 13

Las figuras 2 y 3 muestran que en general los antineoplásicos no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo en los rompimientos de DNA bajo condiciones alcalinas pH > 13. Exceptuando a la actinomicina-D y la adriamicina que presentaron un efecto positivo ($p < 0.001$) para el donador 2 en linfocitos sin estimular (Figura 3) y el etopósido que mostró los niveles más altos de daño para ambos donadores.

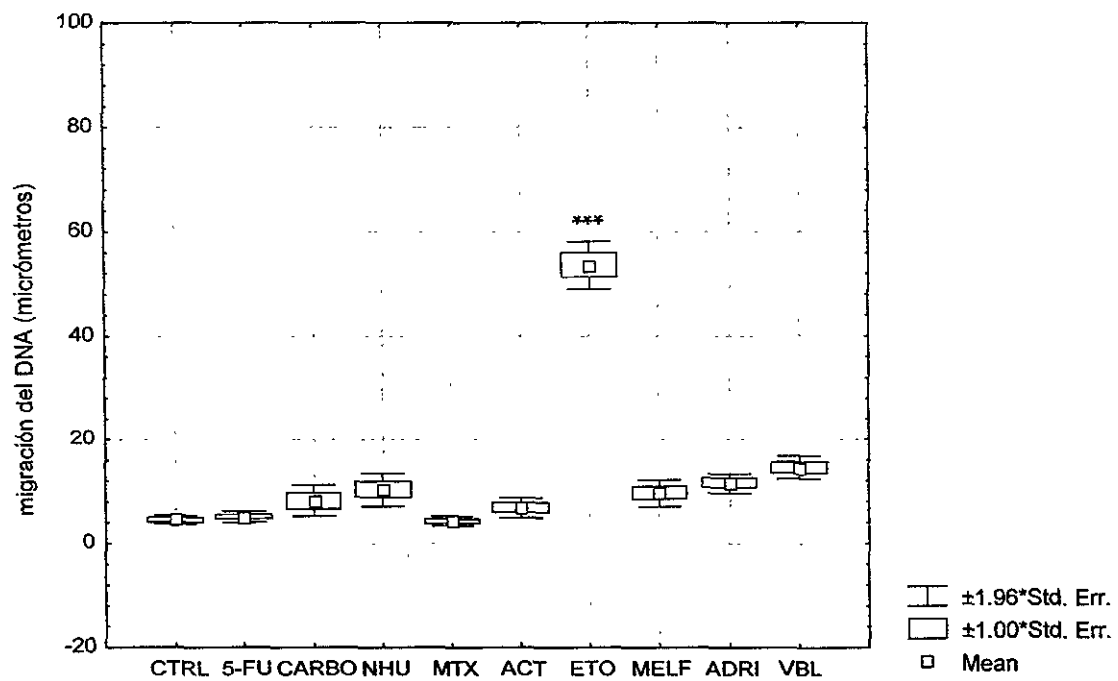


Figura 3. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a $\text{pH} > 13$, por efecto de distintos antineoplásicos, después de 2 horas de tratamiento. Promedio de 3 experimentos (donador 1). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias Entre el testigo vs. Antineoplásicos. *** = $p < 0.0001$.

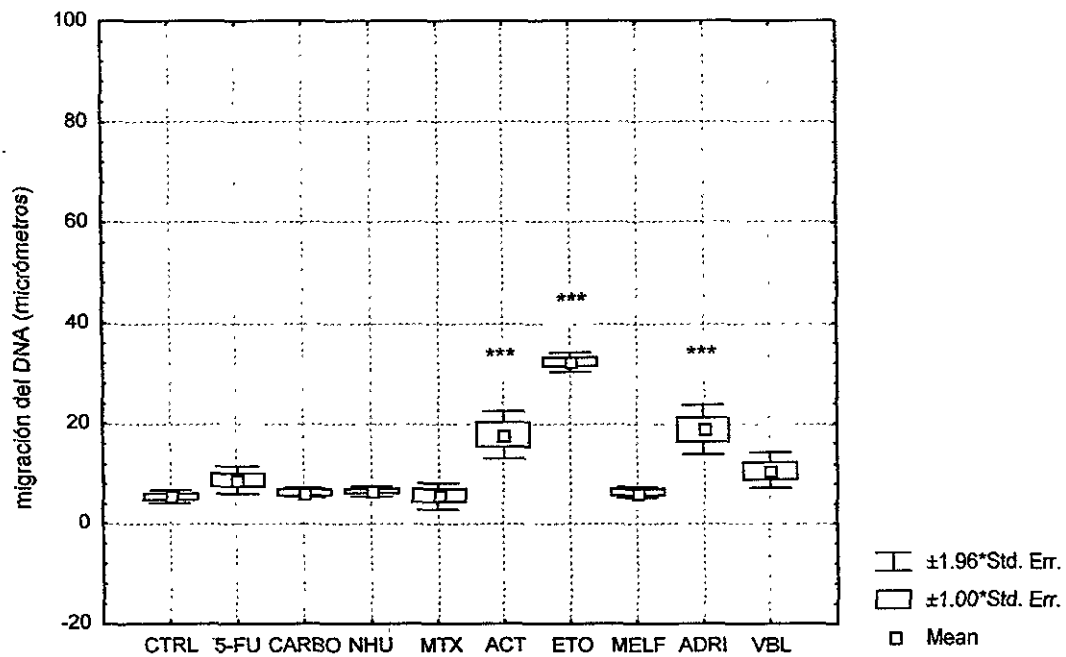


Figura 4. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a pH>13 por efecto de distintos antineoplásicos, después de 2 horas de tratamiento. Promedio de 3 experimentos (donador 2). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. Antineoplásicos. ***= $p < 0.0001$.

Para las 24 h de tratamiento en las figuras 5 y 6 se aprecia que todos los fármacos fueron más genotóxicos en células en división para ambos donadores. Sin embargo, la inducción de daño por parte del etopósido vuelve a ser la de mayor magnitud en ambos donadores.

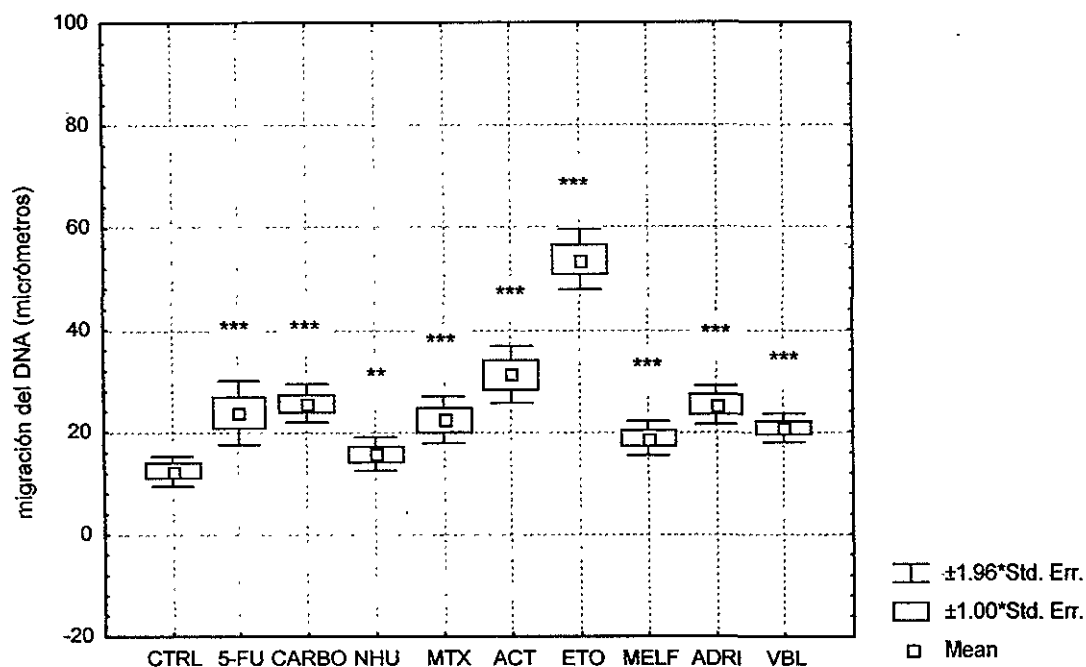


Figura 5. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a pH>13 por efecto de distintos antineoplásicos, después de 24 horas de tratamiento. Promedio de 3 experimentos (donador 1). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. Antineoplásicos. *** = $p < 0.0001$, ** = $p < 0.001$.

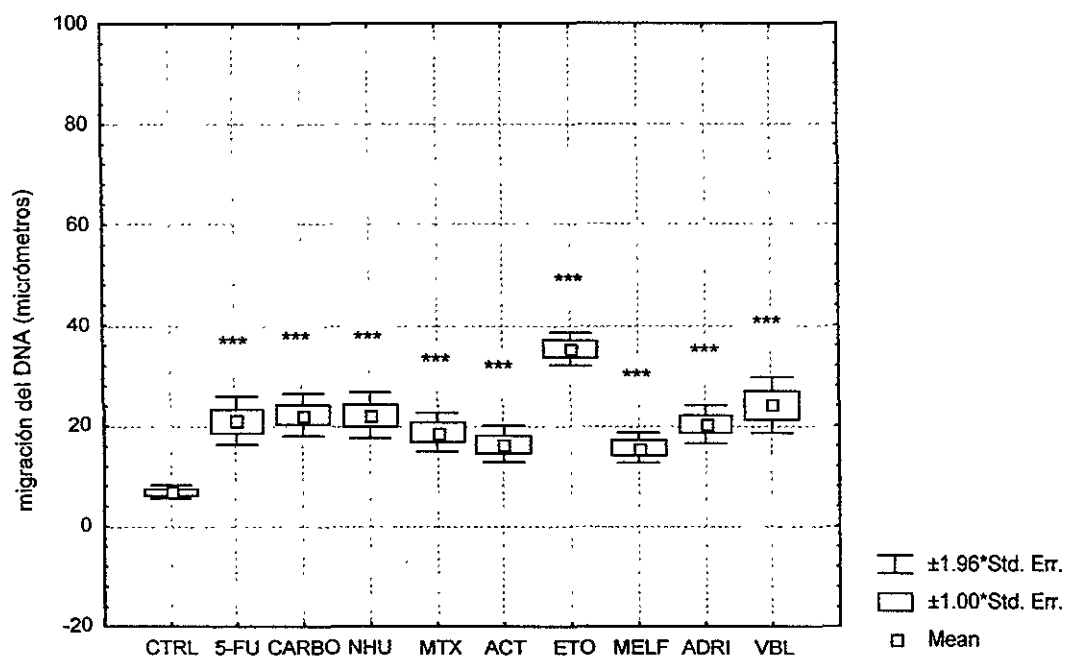


Figura 6. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a $\text{pH} > 13$ por efecto de distintos antineoplásicos, después de 24 horas de tratamiento. Promedio de 3 experimentos (donador 2). Prueba de U de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. Antineoplásicos. *** = $p < 0.0001$.

Inducción de rompimientos y sitios alcali-lábiles en el DNA por efecto del etopósido.

Estos experimentos muestran claramente un efecto positivo entre el valor del testigo y las tres concentraciones de etopósido utilizadas en linfocitos sin estimular (figuras 7 y 8). Cabe señalar que se presentó un efecto dosis-respuesta en el donador 2.

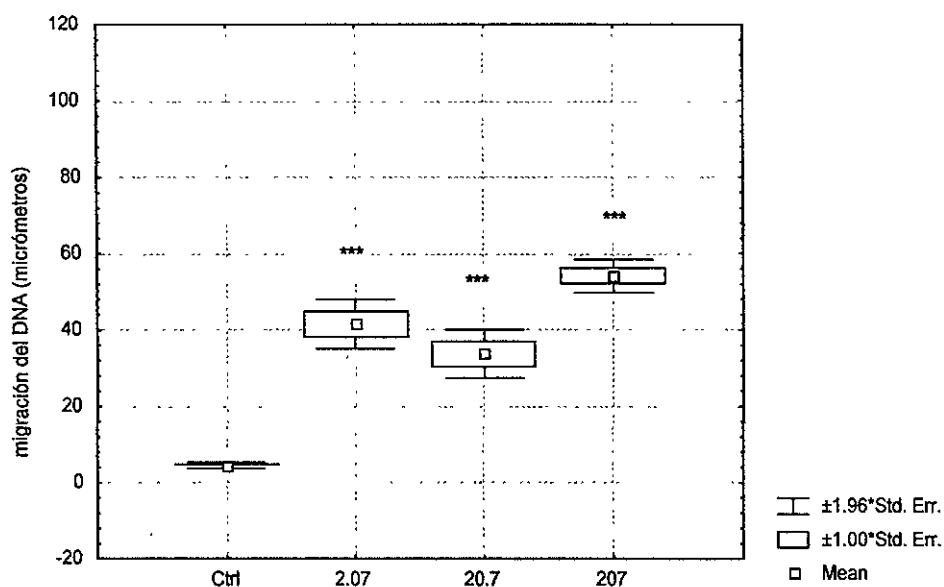


Figura 7. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a pH>13 por efecto de distintas dosis de etopósido, después de 2 h de tratamiento. Promedio de 3 experimentos (donador 1). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. etopósido. *** = $p < 0.0001$.

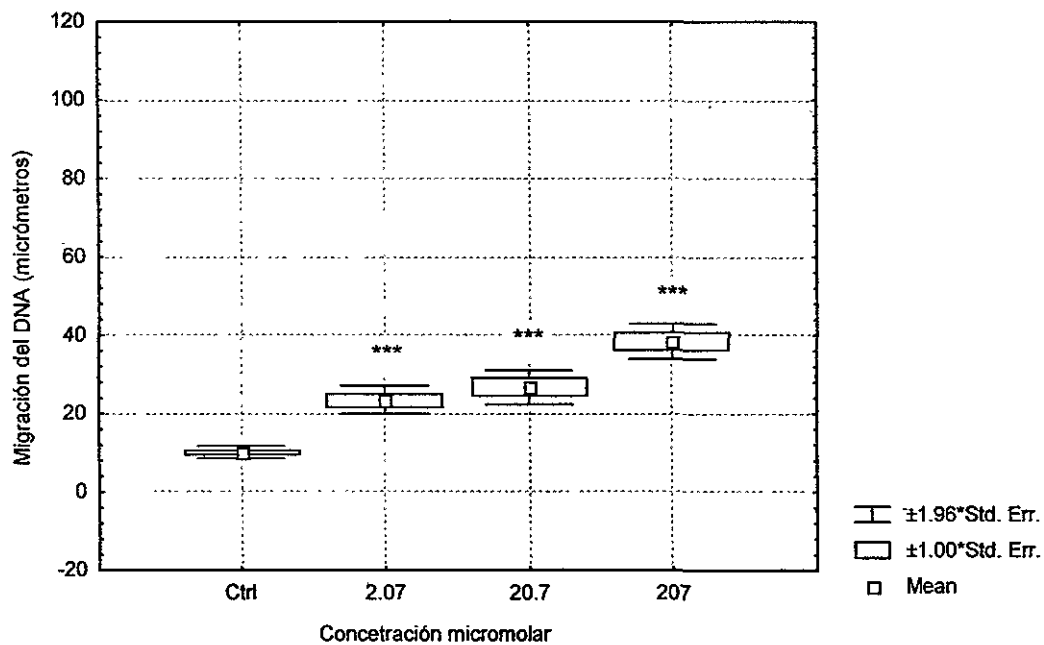


Figura 8. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a $\text{pH} > 13$ por efecto de distintas dosis de etopósido, después de 2 h de tratamiento. Promedio de 3 experimentos (donador 2). Prueba de U de Mann-Whitney para detectar diferencias entre testigo vs. etopósido. *** = $p < 0.0001$.

En linfocitos estimulados cuyo tratamiento fue de 24 h, también se observaron diferencias significativas entre el testigo y las distintas concentraciones de etopósido utilizadas para ambos donadores. Además se volvió a presentar un efecto dosis respuesta para el donador 2 (Figuras 9 y 10)

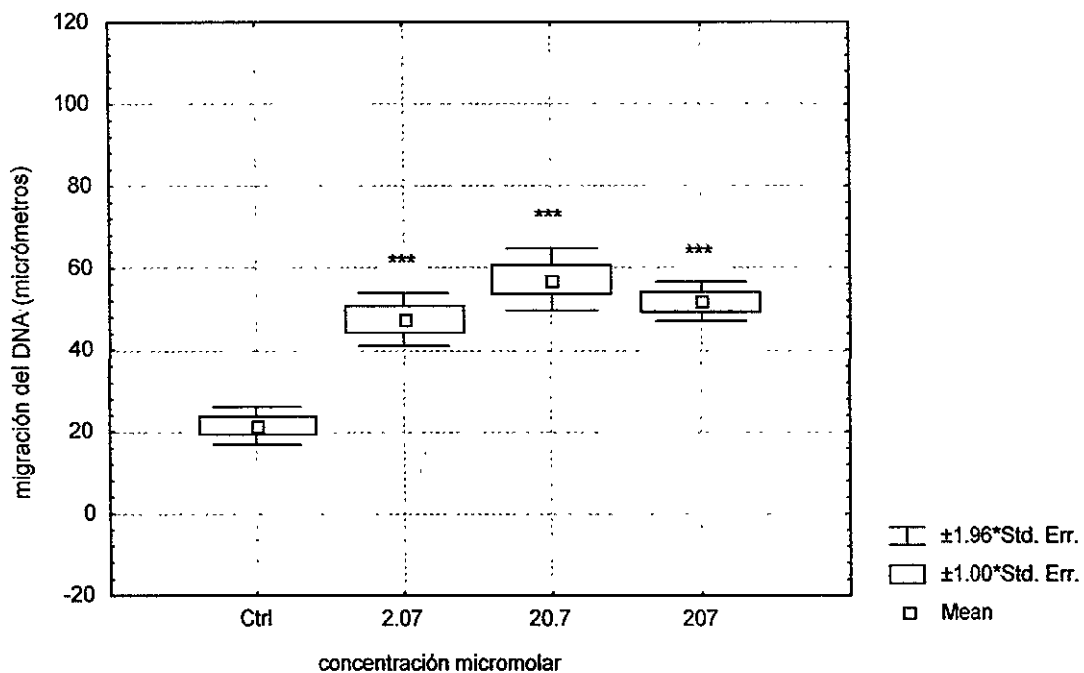


Figura 9. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a $\text{pH} > 13$ por efecto de distintas dosis de etopósido, después de 24 h de tratamiento. Promedio de 3 experimentos (donador 1). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. etopósido. *** = $p < 0.0001$.

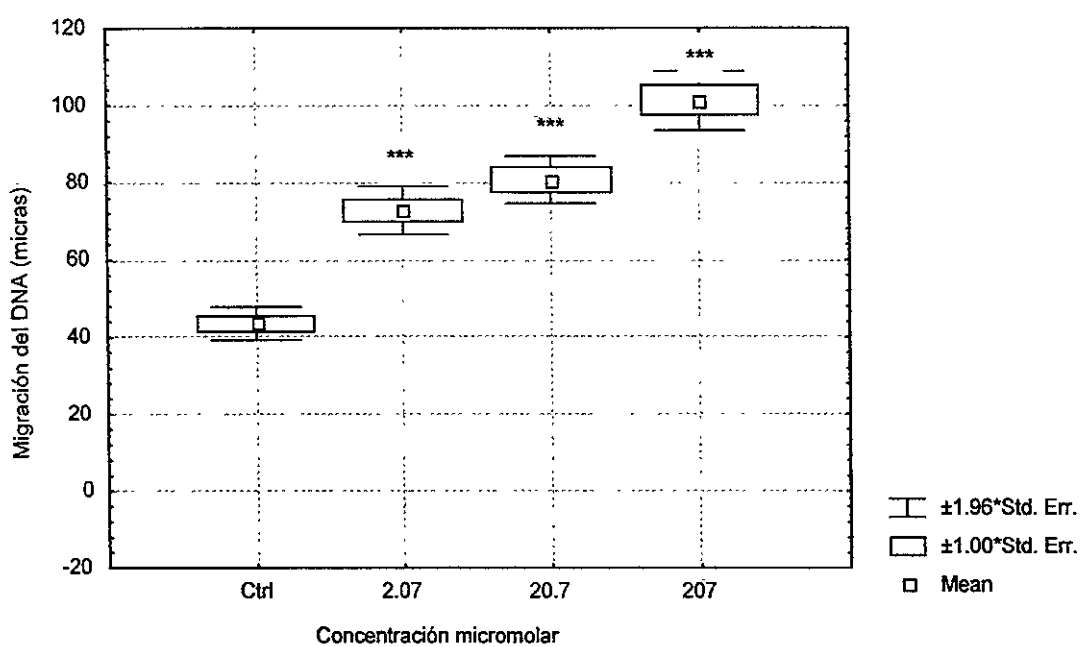


Figura 10. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a pH>13 por efecto de distintas dosis de etopósido, después de 24 h de tratamiento. Promedio de 3 experimentos (donador 2). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. etopósido. *** = $p < 0.0001$.

Inducción de rompimientos en el DNA por efecto del etopósido.

En las figuras 11 y 12 se muestra que no hay efecto entre el testigo y las diferentes dosis de etopósido para ambos donadores en linfocitos sin estimular, bajo condiciones de pH 12.3.

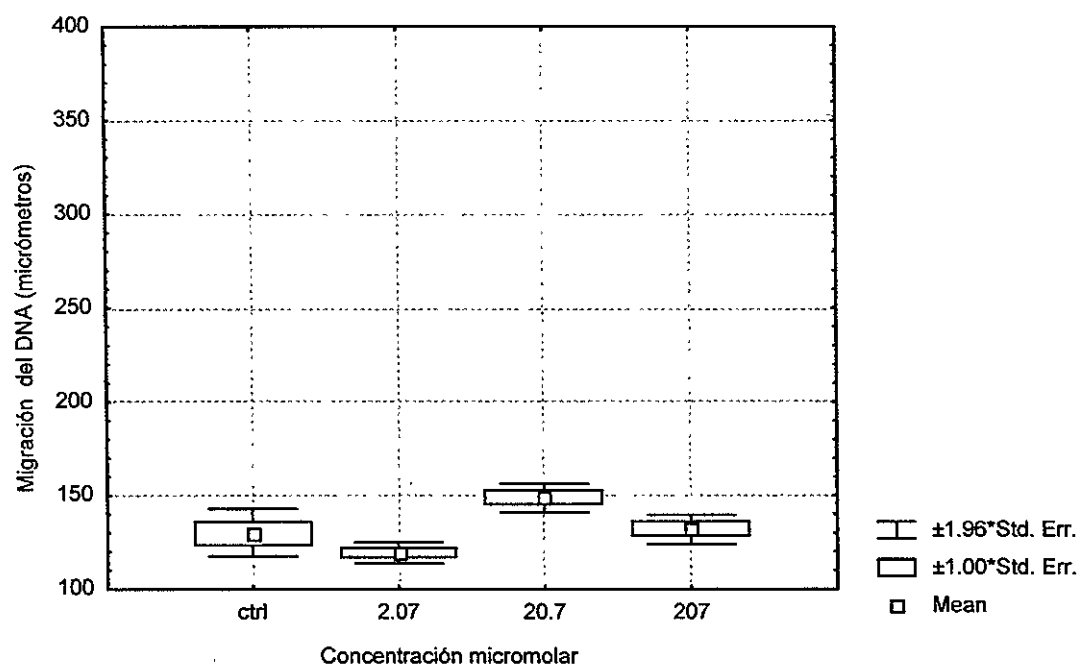


Figura 10. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a pH 12.3 por efecto de distintas dosis de etopósido, después de 2 h de tratamiento. Promedio de 3 experimentos (donador 1). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. etopósido. *** = $p < 0.0001$.

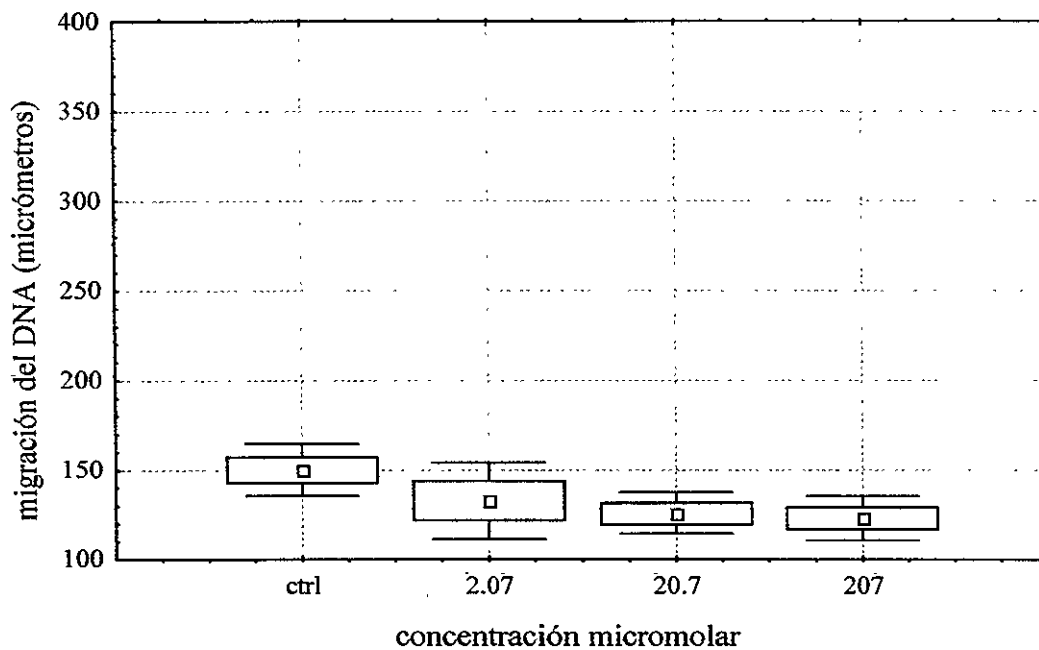


Figura 12. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a pH 12.3 por efecto de distintas dosis de etopósido, después de 2 h de tratamiento. Promedio de 3 experimentos (donador 2). Prueba de U de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. etopósido. *** = $p < 0.0001$.

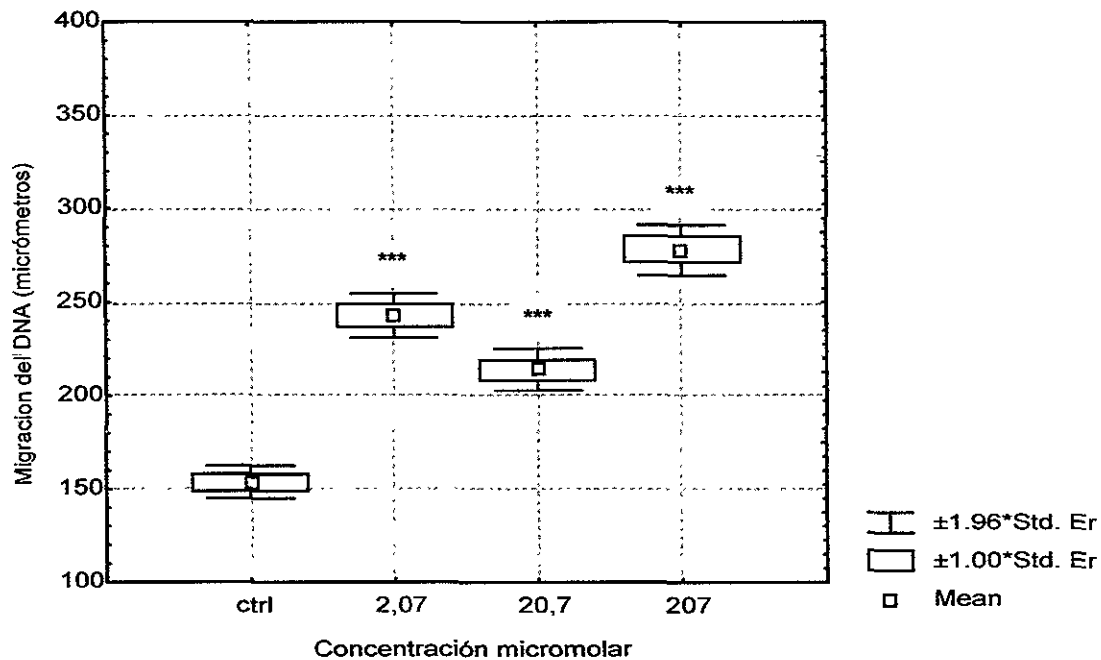


Figura 14. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a pH 12.3 por efecto de distintas dosis de etopósido, después de 24 h de tratamiento. Promedio de 3 experimentos (donador 2). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. etopósido. *** = $p < 0.0001$.

A partir de estos resultados se obtuvo el porcentaje de inducción de daño producido por el etopósido tanto a $\text{pH} > 13$ como a 12.3, para linfocitos estimulados (24 h de tratamiento) y sin estimular (2 h de tratamiento), posteriormente, se hizo una resta de los resultados obtenidos a $\text{pH} > 13$ menos los observados a pH 12.3, para así obtener el índice de sitios álcali-lábiles (SAL), al graficar esto se nota una correlación positiva y significativa, así como un efecto dosis-respuesta entre las distintas concentraciones de etopósido y la inducción de SAL, en linfocitos sin estimular (2 h de tratamiento), tanto para el donador 1 ($r = 0.85$, $p < 0.05$) como para el donador 2 ($r = 0.97$ $p < 0.05$). Sin

embargo, en linfocitos estimulados no se presentó este tipo de correlación.
(Figura 14).

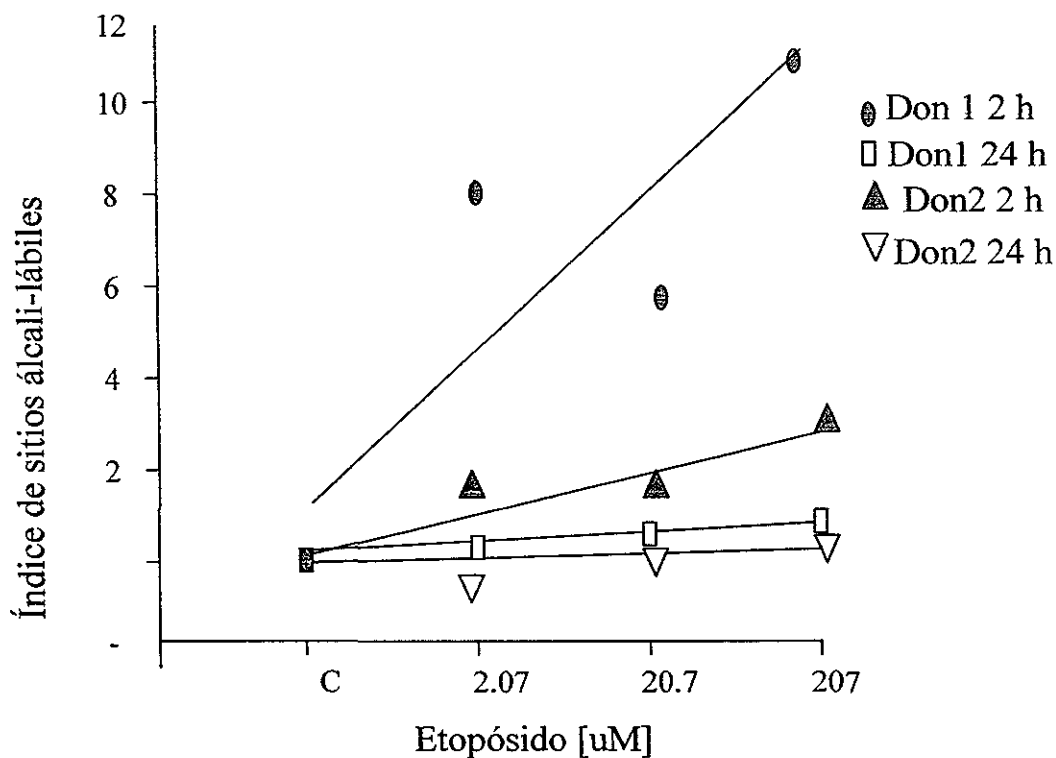


Figura. 15. Análisis de correlación entre las diferentes concentraciones de etoposido y el índice de sitios álcali-lábiles, tanto para linfocitos sin estimular como para linfocitos estimulados.

$$r(\text{don 1}) 2 \text{ h} = .85$$

$$r(\text{don 1}) 24 \text{ h} = .90$$

$$r(\text{don 2}) 2 \text{ h} = .97$$

$$r(\text{don 2}) 24 \text{ h} = .66$$

En las figuras. 16 y 17 podemos observar que en linfocitos sin estimular se presentan bases oxidadas en el genoma inducidas por el etopósido con las tres concentraciones utilizadas y reconocidas por la enzima EXO III, para ambos donadores.

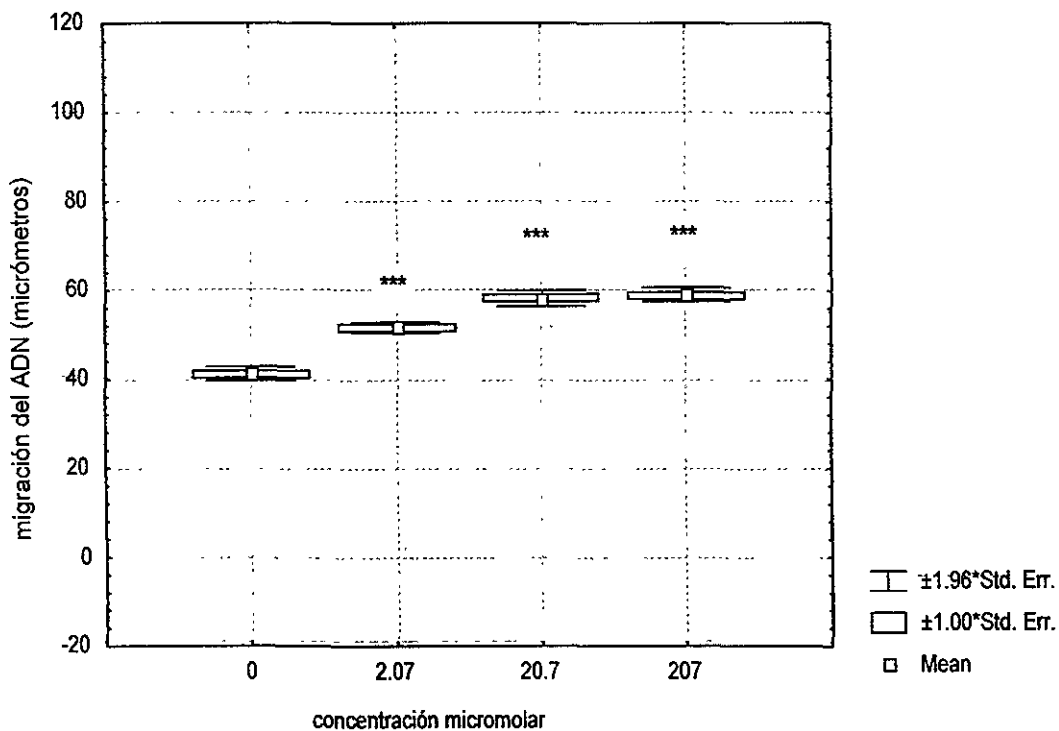


Figura 16. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a pH >13 por efecto de distintas dosis de etopósido, después de 2 h de tratamiento, presencia de bases oxidadas en el genoma reconocidas por la enzima de restricción exonucleasa III. Promedio de 2 experimentos (donador 1). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. etopósido. *** $p < 0.0001$.

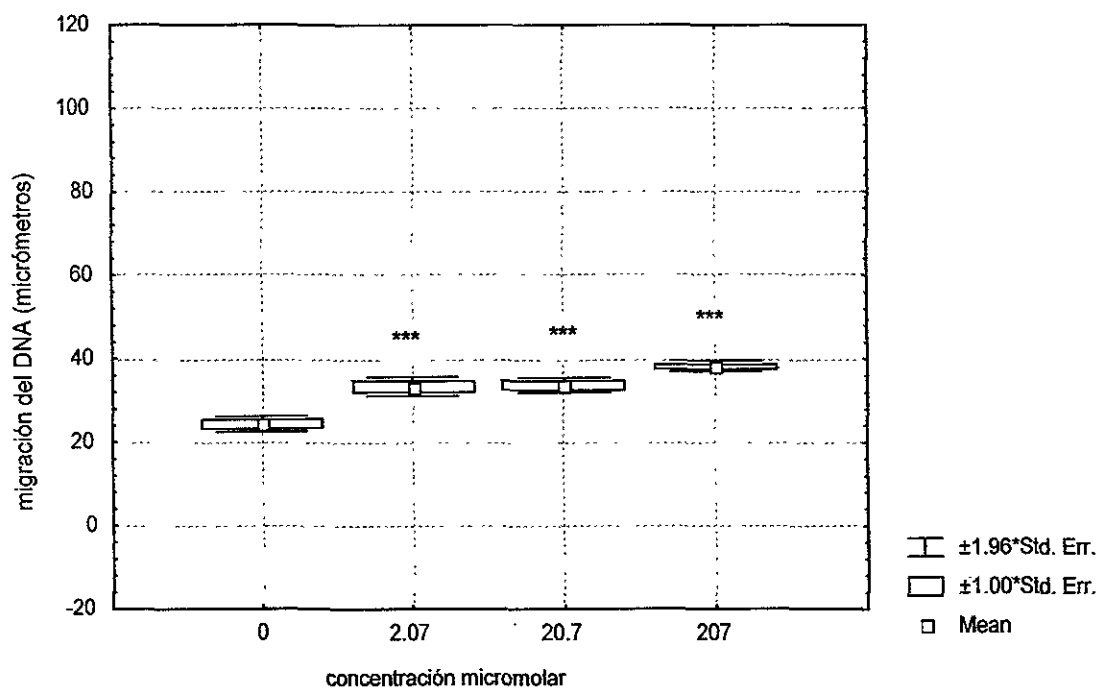


Figura 17. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a pH >13 por efecto de distintas dosis de etopósido, después de 2 h de tratamiento, presencia de bases oxidadas en el genoma reconocidas por la enzima de restricción exonucleasa III. Promedio de 2 experimentos (donador 2). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. etopósido. *** = $p < 0.0001$.

Sin embargo, en linfocitos estimulados los resultados obtenidos no muestran la generación de bases oxidadas por el etopósido con ninguna de las dosis utilizadas para ambos donadores (Figuras 18 y 19)

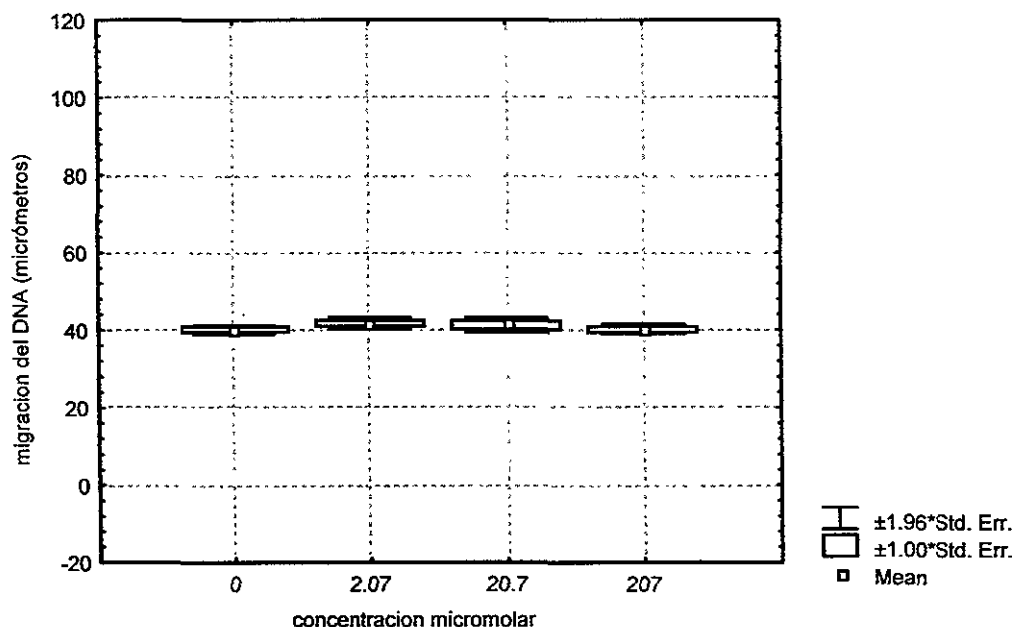


Figura 18. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a pH >13 por efecto de distintas dosis de etopósido, después de 24 h de tratamiento, presencia de bases oxidadas en el genoma reconocidas por la enzima de restricción exonucleasa III. Promedio de 2 experimentos (donador 1). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. etopósido. *** = $p < 0.0001$.

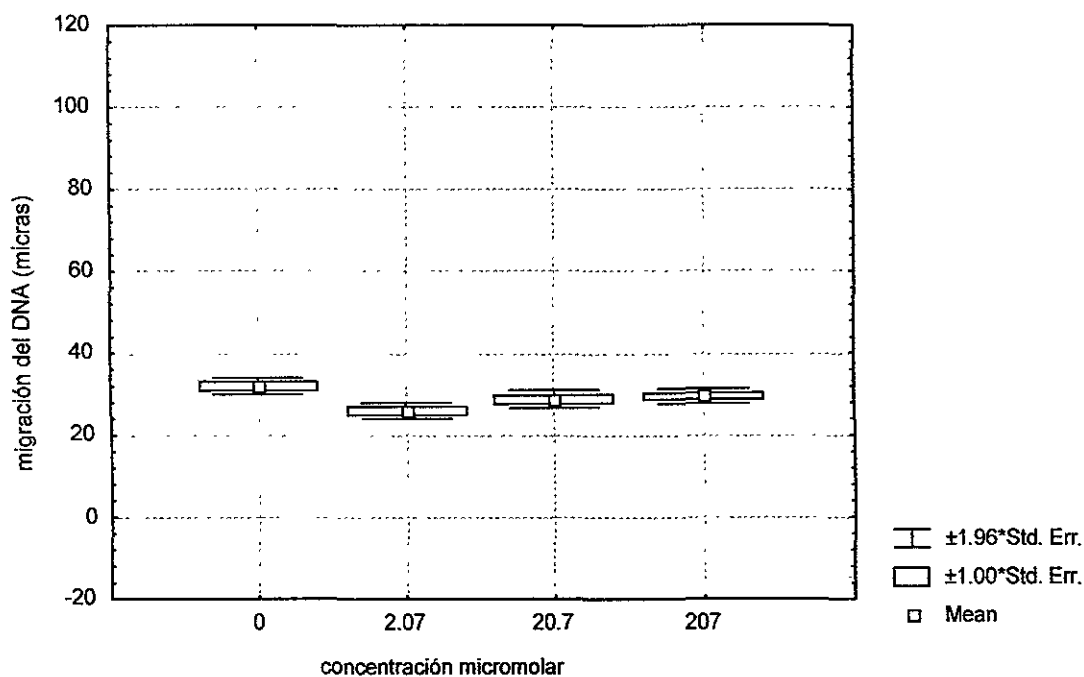


Figura 19. Daño al DNA detectado por el ensayo cometa a pH >13 por efecto de distintas dosis de etopósido, después de 24 h de tratamiento, presencia de bases oxidadas en el genoma reconocidas por la enzima de restricción exonucleasa III. Promedio de 2 experimentos (donador 2). Prueba de *U* de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el testigo vs. etopósido. *** = $p < 0.0001$.

En la figura 20 se observa una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de inducción de daño por efecto del etopósido, reconocido por la EXO III y las diferentes concentraciones del etopósido en linfocitos sin estimular, tanto para el donador 1 ($r = 0.84$, $p < 0.05$) como para el 2 (0.85 , $p < 0.05$). Por otro lado, los linfocitos estimulados no presentaron este tipo de correlación.

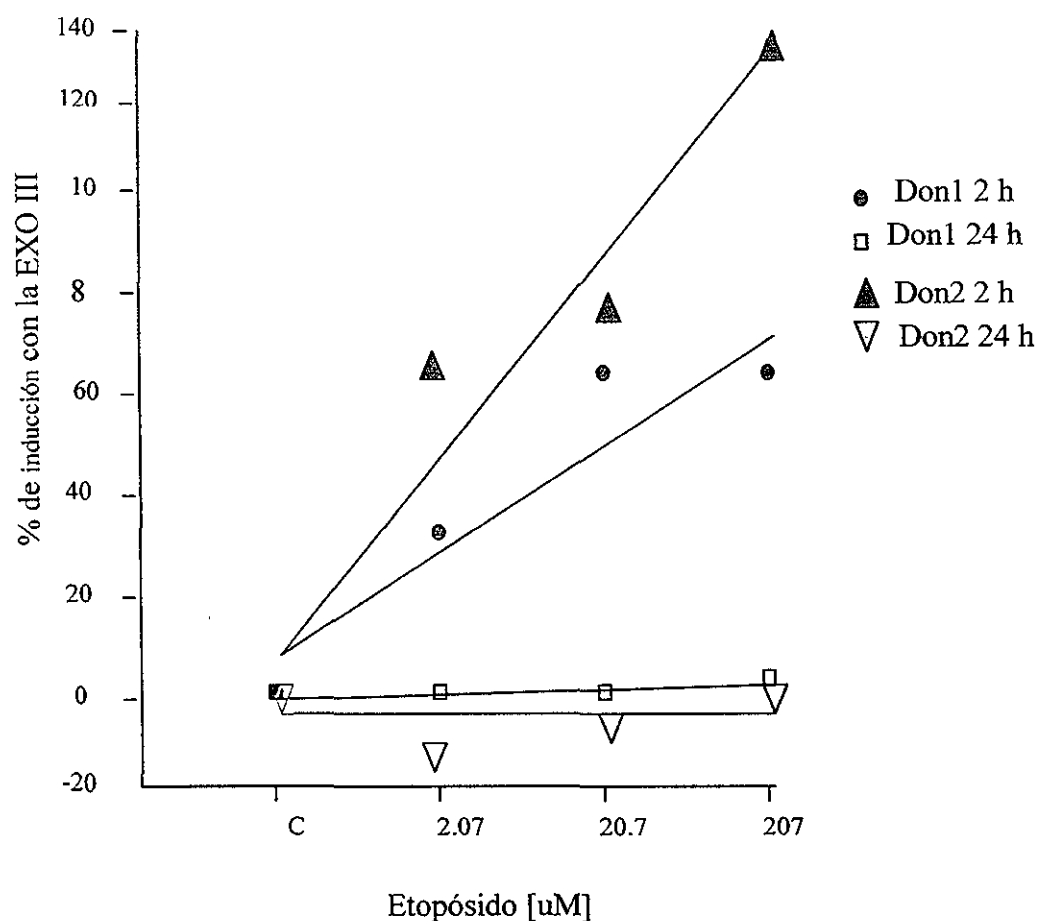


Figura 20. Anàlisi de correlació entre el dany al DNA obtingut amb les diferents dosis d'etopósido i el percentatge d'inducció obtingut amb l'enzim exonucleasa III., tant per a linfocits sense estimular com per a linfocits estimulats.

$$r(\text{don 1}) 2 \text{ h} = .84, r(\text{don 2}) 2 \text{ h} = .85$$

Por último, en la figura 20 se presentó una correlación positiva y significativa entre la inducción de daño reconocido por la enzima EXO III y la inducción de sitios álcali-lábiles, en linfocitos sin estimular (2 h), tanto para el donador 1 ($r = 0.80, p < 0.05$) como para el 2 ($r = 0.90, p < 0.05$).

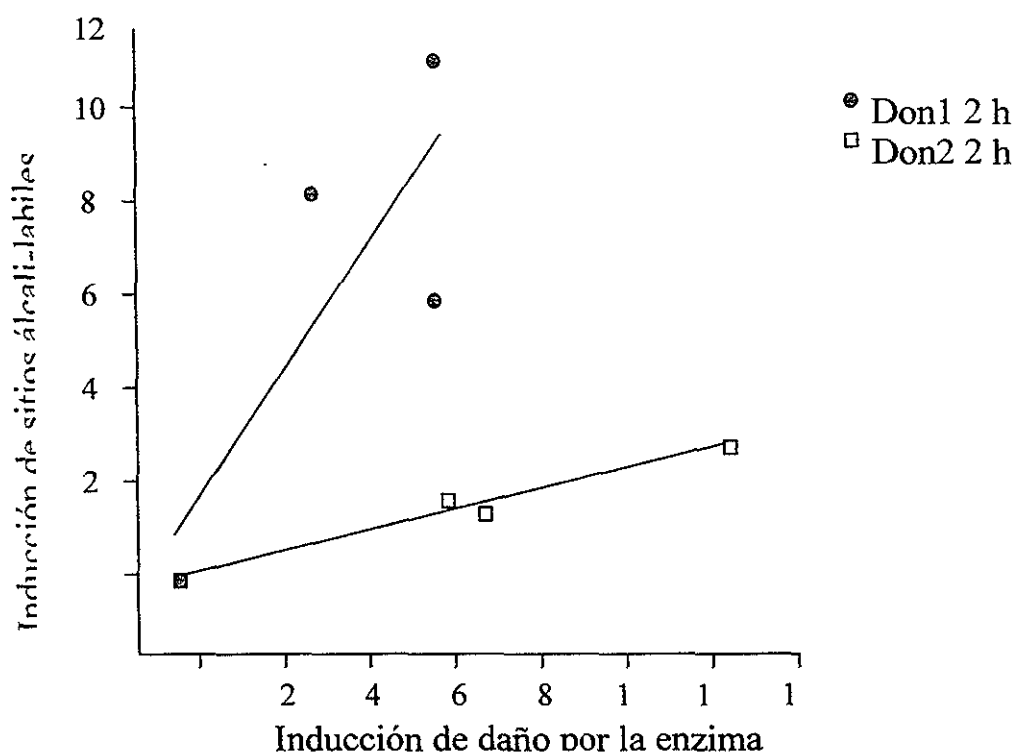


Figura 21. Análisis de correlación entre la inducción obtenida con la enzima exonucleasa III y la inducción de sitios álcali lábiles por efecto del etopósido, linfocitos sin estimular (2 h).

DISCUSIÓN

En las últimas décadas se ha observado que el tratamiento para las leucemias y linfomas con agentes químicos genera una gran heterogeneidad en la respuesta celular a estos fármacos, observándose una respuesta individual a un mismo agente genotóxico, lo que hace difícil, entre otros factores, la predicción de la respuesta al tratamiento. Por lo anterior, se han incrementado los esfuerzos para entender cómo los agentes antineoplásicos pueden dañar de diferente manera al material genético con base en sus mecanismos de acción.

Los resultados obtenidos por otros autores y los logrados en este estudio con base en la sensibilidad y especificidad que ofrece el ensayo cometa para la detección de los efectos genotóxicos que producen los antineoplásicos, se discuten a continuación.

MELFALAN: este fármaco con actividad bifuncional ya sea la de alquilación al DNA o bien, por entrecruzamientos, es uno de los agentes mejor conocidos por su alto potencial carcinogénico para humanos (IARC, 1987). Por lo anterior, para este fármaco, se esperaba daño inducido al DNA tanto en células en ciclo como en células sin ciclar, primeramente por el hecho de que este agente es fase no específico, aunque como todo buen quimioterápico atacará mayormente a las células en "S", por lo que, se dice que éstas son más sensibles (Van Putten y Lelieveld, 1971; Cooper, 1992; Pratt *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos en células sin estimular no muestran el efecto esperado, ya que el resultado no fue significativo después de 2 h de tratamiento para ningún donador, consideramos

que el tiempo de tratamiento fue suficiente para la inducción de rompimientos por parte de un agente de este tipo, ya que estas lesiones ocurren inmediatamente después de la exposición al agente en el DNA "*in vitro*", (Papirmeister *et al.*, 1985; Mol *et al.*, 1993). Es importante tomar en cuenta que su mayor efecto genotóxico es debido principalmente a la actividad alquilante y no a la formación de entrecruzamientos, ya que éstos representan el 15% del total de los entrecruzamientos al ADN y $\frac{1}{4}$ de ellos son intercadena (Mol *et al.*, 1993), de tal forma que si estuviera actuando de manera entrecruzadora se debería observar una reducción en las colas de los cometas con respecto al testigo (mecanismo explicado detalladamente más adelante), sin embargo, esto no se presentó en linfocitos sin estimular. Por lo que, es posible pensar que esto se debe a la concentración del fármaco utilizado en nuestro estudio, ya que es mucho más baja ($0.010 \mu\text{M}$) que las reportadas para la inducción de rompimientos o entrecruzamientos en el DNA, por ejemplo, Mol *et al.* (1993) encontraron un efecto lineal dosis-respuesta con mostaza de azufre, respecto a la inducción de rompimientos de cadena sencilla del DNA u otro tipo de daño genotóxico como el intercambio de cromátidas hermanas por agentes de este tipo (Morris *et al.*, 1982). Sin embargo, los resultados obtenidos en células estimuladas eran de esperarse y el mecanismo de acción involucrado es definitivamente por alquilación o bien, como consecuencia de esta lesión que es la reparación por escisión de bases del DNA alquilado (Regan y Setlow, 1974; Pratt *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1999.), de la siguiente manera: la modificación de bases por un efecto alquilante debilita el enlace N-glicosílico que resulta en la despurinización/despirimidización de las

bases y por lo tanto, favorece la aparición de los sitiosapurínicos/apirimidínicos dentro del DNA (sitios AP). Los sitios AP también pueden resultar de la escisión por acción de las glicosilasas específicas al reparar la base dañada. La remoción de los sitios AP se logra cuando las AP endonucleasas, que se anclan junto a los sitios AP en el DNA, crean rompimientos de cadena sencilla (Mol *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1999).

CARBOPLATINO: A este agente al igual que el anterior, se le ha atribuido una bifuncionalidad, cuya actividad citotóxica más importante resulta de las reacciones directas con el material genético, estas modificaciones resultan en su inactivación como molde necesario para la replicación del DNA (Roberts y Friedlos, 1981). Sin embargo, la actividad genotóxica más importante es por la formación de entrecruzamientos con el DNA, los cuales, pueden ser de dos tipos, intra o intercadena (Tice *et al.*, 1992; Pfuhler y Wolf 1996). En experimentos realizados para identificar los aductos producidos entre el platino y el DNA, se demostró que los entrecruzamientos intercadenas ocurren entre el N7 de las dos guaninas de las cadenas opuestas y que este tipo de daño constituye menos del 1% del total de aductos entre el platino y el DNA (Roberts y Friedlos, 1981; Sherman y Lippard, 1987). Por otro lado, los cruzamientos intracadenas es posible que sean los responsables de la genotoxicidad del fármaco ya que son alrededor del 50% del total de los aductos formados entre el platino y el DNA (Sherman y Lippard, 1987). Por lo anterior, y porque este agente es derivado directo del antineoplásico cisplatino, que es uno de los más conocidos por su efecto entrecruzador, en nuestro

sistema no se esperaba migración del DNA, o bien un menor daño que en los testigos, ya que al interactuar el platino con el DNA y formar estos entrecruzamientos, se pensaba que habría una menor movilidad en el gel de agarosa del DNA roto, ya que el material genético está "sujetado" por estos aductos y por cuestiones físico-químicas este pedazo grande de DNA casi no puede desplazarse en el gel y por lo tanto, produce un retardo o ninguna migración. (Tice *et al.*, 1992; Pfuhrer y Wolf, 1996), lo que se vería reflejado en el patrón de daño en este sistema ya que el DNA aparecería como si no tuviera daño alguno, aunque, realmente si existe un daño en el DNA. Definitivamente esto no fue lo observado tanto en células sin ciclar como en células estimuladas en ambos donadores, en ninguna repetición, lo cual se podría explicar de la siguiente manera:

Es posible que en linfocitos sin ciclar, la duración del tratamiento (2 h) es suficiente para la formación de los entrecruzamientos, tal y como lo reportan (Mol *et al.*, 1993; Hartley *et al.*, 1999), es importante mencionar también que el primer autor describe la formación de entrecruzamientos después de 30 min de tratamiento con un agente alquilante bifuncional, sin embargo, las dosis utilizadas en ese estudio son mucho más elevadas (entre 1 y 12 μM) en comparación a la utilizada por nosotros (0.055 μM) este hecho es de considerable importancia ya que dependiendo de la dosis del fármaco utilizada será la respuesta a la formación de entrecruzamientos. Por su parte, Pfuhrer y Wolf (1996) mencionan que sólo se formarán entrecruzamientos con el empleo de concentraciones citotóxicas, esto concuerda con nuestros resultados ya que en la tabla de viabilidad celular

necesarios para llevar a cabo la síntesis de los ácidos nucleicos (Pratt *et al.*, 1994; Kasamatsu *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1999), También, son bien conocidos como análogos de base (Rojas, 1992; Duthie y McMillian, 1997) lo que significa que muchos de estos compuestos se parecen estructuralmente en gran medida a las bases puricas o pirimidicas del DNA, lo que hace posible que se puedan sustituir en los procesos metabólicos de los nucleótidos.

Es por lo anterior, que se les ha atribuido una alta toxicidad celular, (principalmente por la primera vía) (Pratt *et al.*, 1994) y una especificidad de fase "S" dentro del ciclo celular (Cvitckovic, 1993; Pratt *et al.*, 1994; Kasamatsu *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996).

Debido al mecanismo de acción de estos agentes no se esperaba daño con ninguno de los tres agentes utilizados en células sin ciclar, después de 2 h de tratamiento, lo cual concuerda con los resultados obtenidos y con estudios realizados con estas sustancias, los cuales, no reportan daño con agentes antimetabolitos como el 5-FU y el MTX, después de 1 h de tratamiento (Kasamatsu *et al.*, 1996), a dosis para el 5-FU mucho mayores ($5 \mu\text{M}$) a las empleadas en este estudio ($0.0019 \mu\text{M}$) y para el MTX utilizan una dosis más baja ($0.05 \mu\text{M}$) a la usada en este estudio ($0.26 \mu\text{M}$), aún así tampoco encuentran daño después de 1 h de tratamiento en la línea celular leucémica L1210. En otro estudio "*in-vivo*" llevado a cabo por Sasaki *et al.* (1997), en ratones tampoco encuentran daño con el 5-FU después de 3 h de tratamiento (100 mg/kg), en ningún órgano analizado (i.e. hígado, pulmón, bazo, riñón y médula ósea).

Se sabe que después de tomar las muestras de sangre entera la mayoría de los linfocitos se encuentran en fase G₀, por lo que, tampoco se esperaba daño en ellos.

Con respecto a lo observado después de 24 h de tratamiento en linfocitos estimulados, el comportamiento fue lo esperado ya que si se registraron diferencias significativas entre los testigos y las células tratadas con ambos donadores. El mecanismo por medio del cual los antimetabolitos generan daño, traducido en rompimientos, es cuando por ejemplo el MTX inhibe la DHFR y el "pool" pre-existente de tetrahidrofolatos es utilizado por la síntesis del timidin-mono-fosfato (TMP), los procesos *de novo* de la síntesis y producción de purinas y pirimidinas se paran y se inhibe la síntesis de DNA (Cooper, 1992; Cvitckovic 1993; Pratt *et al.*, 1994), al igual que cuando el 5-FU inhibe la enzima timidilato sintetasa (TS) (son requeridas concentraciones micromolares) (Pratt *et al.*, 1994), entonces, no hay timina disponible y se inhibe la síntesis de DNA, pero la generación de rompimientos de una y dos cadenas se da después de esto. El mecanismo propuesto se basa en la observación de que bajo circunstancias normales el trifosfato de deosxiuridina (dUTP) se podría incorporar de forma errónea en el DNA en vez del trifosfato de timidina (TTP), es entonces, cuando se activan los mecanismos de reparación por escisión, los cuales, cortan y resintetizan el pedazo de DNA que contenía el error. Cuando es mayor la cantidad de dUTP en comparación a los TTP (por ejemplo, después de una inhibición de la TS), los sistemas de reparación se pueden saturar, esto sucede cuando insertan más uracilo del que puede remover durante cada intento de resintetizar la región

escindida, lo que lleva a la acumulación de regiones de porciones de una hebra de DNA sin reparar (Barclay *et al.*, 1982; Goulian *et al.*, 1986). Por estas observaciones, se ha propuesto que, en general, la respuesta celular a un desbalance en la cantidad de nucleótidos es la inducción de la actividad de las endonucleasas lo que genera rompimientos en el DNA (Pratt *et al.*, 1994). Kasamatsu *et al.* (1996) reportan que para que el DNA comience a verse degradado deben pasar por lo menos 10 h de tratamiento con 5-FU ó MTX por lo que, podemos decir que los rompimientos observados después de 24 h de tratamiento son la consecuencia de la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos al activarse los sistemas de reparación.

ADRIAMICINA: Este agente de origen natural es uno de los mejores estudiados por su amplio uso en enfermedades hematológicas malignas, al cual, se le han atribuido dos mecanismos de acción principales: Por intercalación en el DNA y por la generación de radicales libres (Waring, 1970; Eliot *et al.*, 1984; Muindi *et al.*, 1985; Cvitkovic 1993; Anderson *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1998)

Por las características estereoquímicas y eléctricas de las antraciclinas es posible que este agente se intercale entre la hebra del DNA, provocando una distorsión local en la doble hélice, lo cual, conlleva a la formación de rompimientos del DNA (Austin y Marsh, 1998; McPpherson y Goldenberg, 1998; Kingma y Osheroff, 1998).

Ross *et al.* (1978) muestran que estos rompimientos están asociados con una proteína fuertemente unida a la DNA, la cual, fue identificada como topoisomerasa II.

En los últimos años se ha visto que esta respuesta es detectada o mediada por esta enzima (topoisomerasa II), responsable del mantenimiento de los cambios topológicos del DNA (Austin y Marsh, 1998; McPherson y Goldenberg, 1998; Kingma y Osheroff, 1998).

Los detalles del mecanismo por el cual esto sucede se desconocen, pero lo que sí se sabe, es que de alguna manera este agente interviene en el proceso de resello de los rompimientos realizados por la topoisomerasa II (Tewey *et al.*, 1984; Myers *et al.*, 1988; Pratt *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1998), lo cual, genera que los rompimientos realizados por la enzima se vuelvan permanentes al estabilizar e inducir el complejo adriamicina- topo II- DNA (Cvitkovic *et al.*, 1993), éstos son de doble cadena los cuales se convierten en rompimientos de cadena sencilla cuando el DNA se abre (Pratt *et al.*, 1994). Se estima que los rompimientos asociados con la topoisomerasa II ocurren en bajos intervalos de concentraciones de la antraciclina para tener un efecto citotóxico (Tewey *et al.*, 1984).

Se considera que el proceso de intercalación por sí mismo podría explicar la actividad citotóxica de las antraciclinas en general, a pesar de que varios de estos fármacos no pueden matar con facilidad a las células eucariontes, esto se dedujo a partir de que durante la inhibición de la síntesis de DNA y RNA que ocurre durante el tratamiento con las antraciclinas, hay una disminución en la actividad por parte de las DNA y RNA polimerasas, como consecuencia del disturbio sufrido

en la estructura de la doble hélice al intercalarse el agente químico (Cvitkovic *et al.*, 1993).

Otra explicación para entender su alta citotoxicidad es que este tipo de compuestos son capaces de inducir y mediar el anclaje de la topoisomerasa II con el DNA en sitios específicos ya sean los niveles de intercalación bajos o altos, entonces pueden inhibir la enzima. Cuando se han comparado las interacciones moleculares de varias antraciclinas con el DNA, parece claro que su actividad citotóxica está más relacionada con su habilidad de inducir rompimientos en el DNA que con su afinidad de unión con éste (Cvitkovic *et al.*, 1993).

El otro mecanismo de acción por medio del cual la adriamicina puede producir rompimientos de cadena sencilla es la generación de radicales libres (Eliot *et al.*, 1984; Muindi *et al.*, 1985; Cvitkovic *et al.*, 1993, Anderson *et al.*, 1998) (ver introducción). El cual, también puede ser consecuencia de la interacción con la topoisomerasa II.

Se ha observado que las antraciclinas, especialmente la adriamicina, pueden sufrir reducción de un electrón resultando en un radical de semiquinona, el cual en presencia de O₂ resulta en la formación de especies de oxígeno reactivas, como: el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, los cuales pueden ser los responsables de los rompimientos directos en el DNA (Keizer *et al.*, 1990; Cvitkovic *et al.*, 1993, Yu *et al.*, 1999). También, hay evidencia de la formación de radicales libres por la reducción del complejo adriamicina-Fe³⁺ por el glutatión o por las enzimas dependientes del NADPH, o en la ausencia de un

complejo de reducción por la alta afinidad de la adriamicina por los iones de los metales (Cvitkovic *et al.*, 1993, Pratt *et al.*, 1994)

Por lo anterior, se explican los rompimientos observados en el ensayo cometa en linfocitos estimulados después de 24 h de tratamiento con esta sustancia, para ambos donadores, aunque en estas condiciones no se puede discernir entre rompimientos por estrés oxidativo o por la interacción con la topoisomerasa II α .

En linfocitos tratados 2 h con el fármaco casi no hubo rompimientos para el donador 1, en tanto que para el donador 2 se registraron rompimientos en el DNA, por lo que consideramos que esto se deba probablemente a un estrés oxidante el cual es posible que se lleve a cabo durante este tiempo, más que a una interacción con la topoisomerasa II lo que se da en mayor medida en células en fase "S" del ciclo celular (Sandri *et al.*, 1996, Herzog *et al.*, 1998) que en células no estimuladas.

Con estas diferencias entre donadores podemos también pensar que el balance de las enzimas antioxidantes puede variar entre donadores, lo que produciría una respuesta diferencial de cada donador a este tipo de agentes, lo cual, se vería reflejado en nuestro sistema (Anderson *et al.* 1994).

ACTINOMICINA-D: Este fármaco derivado de un cultivo de *Streptomyces*, y comúnmente referido como un antibiótico antineoplásico, inhibe la síntesis de DNA y RNA, ésta actividad es dependiente de la concentración utilizada (Roots y Smith, 1976; Pratt *et al.*, 1994; Olive y Banath, 1997), a concentraciones bajas esta sustancia puede detener a la célula en G1 en cambio a concentraciones altas

impide que la célula entre en fase de síntesis (Kastan *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1999). También, su alta toxicidad está dada por la fuerte unión de esta sustancia con el DNA de doble cadena (Robles y Adami, 1998), esta unión depende de la presencia de guanina (Chiao y Krugh, 1977; Pratt *et al.*, 1994) y se intercala preferentemente en los surcos menores, de las regiones ricas en G-C (Brown *et al.*, 1984; Takusagawa *et al.*, 1984).

Después de 24 h de tratamiento con este fármaco se observaron rompimientos en el DNA de ambos donadores, lo cual concuerda con su mecanismo de acción conocido, ya que se ha observado que la actinomicina-D forma un complejo con el DNA el cual previene la síntesis de RNA dependiente de DNA, esto es, la fuerte unión con el DNA, la alteración de la estructura de la doble cadena, así como la *interferencia con la actividad de las polimerasas para copiar el DNA y comenzar la síntesis* es lo que puede generar los rompimientos, detectados con nuestro sistema (Olive y Banath, 1997). También la IARC informa que esta sustancia produce rompimientos de cadena sencilla en células tratadas *in vitro*, lo que coincide con lo reportado por Robles y Adami (1998) y Sato *et al.*, (1999) acerca de la inducción de rompimientos por este fármaco, también se ha observado que no es específico para ninguna fase del ciclo celular (Cooper, 1992; Cvitkovic *et al.*, 1993) y entre más se aumenta el tiempo de tratamiento, más cometas se formarán (Olive y Banath, 1997) o sea que a 24 h de tratamiento habría más daño que después de 2 h, lo que corresponde a lo observado en nuestros resultados. Sin embargo, se nota claramente que este compuesto tuvo efecto en el donador 2 en linfocitos sin estimular, lo cual, concuerda con que puede causar daño en

cualquier fase del ciclo celular. Principalmente, este agente se conoce por ser un inductor de rompimientos, tanto de una como de dos cadenas del DNA (Piret y Piette 1996; Olive y Banath, 1997; Limoli *et al.*, 1998) y las diferencias entre donadores en la generación de rompimientos de cadena sencilla en estas células, podría deberse a que esta sustancia produce apoptosis y que este proceso esta acompañado por un incremento en los niveles intracelulares de radicales peroxilo y algunos productos de la peroxidación lipídica, lo que está relacionado típicamente con un estrés oxidante, cabe señalar que la actinomicina-D es un agente capaz de bloquear la transcripción de genes necesarios para las defensas antioxidantes, lo que se puede relacionar con el balance de enzimas antioxidantes de cada donador (Piret y Piette 1996; Limoli *et al.*, 1998; Pierce *et al.*, 2000), el cual, se refleja en el donador 2, ya que es más sensible a este tipo de agentes como se observa también en la respuesta a la adriamicina y al etopósido (Figura 4)

VINBLASTINA: Los derivados de la planta *Vinca*, son potentes inhibidores de la proliferación celular, por lo que, son ampliamente utilizados en terapias anticancerígenas.

De acuerdo al mecanismo de acción de este fármaco en particular, estudios realizados en los años 80 sugieren una interacción con los microtúbulos, por agentes como la colchicina, colcemida, VBL y vincristina principalmente. Un estudio realizado por Crossin y Carney (1981), describe un incremento de la síntesis (dos veces más) de DNA en células no estimuladas, tratadas con

colchicina, argumentando una posible relación entre el daño en los microtúbulos con la desencadenación de la síntesis de DNA y eventos relacionados con la división celular.

Chov *et al.* (1984) reportan que la VBL activa a las células 3T3 ya que induce la síntesis del DNA, sugiriendo que el desensamblaje de los microtúbulos por acción de la VBL o colchicina, expande dramáticamente los "pools" de UTP (uridin trifosfato) y decrece los "pools" de ATP, lo que resulta en un desbalance total de los niveles de nucleótidos. También, se afecta la síntesis de RNA lo que puede alterar a las células en G1, en un momento antes de la fosforilación de uridina que usualmente se da cuando una célula es estimulada.

Asimismo, Shinohara *et al.* (1989) observan algo muy parecido a lo anterior y concluyen que se puede inducir la iniciación de la síntesis de DNA y de la división celular en células quiescentes (sin factores de crecimiento), por medio de la disrupción del equilibrio de polimerización de los microtúbulos, con concentraciones altas de VBL y de la combinación de VBL y colchicina, lo que sugiere que un daño en el citoesqueleto (particularmente en los microtúbulos) puede desencadenar señales intracelulares capaces de iniciar la proliferación celular.

Sin embargo, aunque el mecanismo de acción mejor conocido y al cual se le atribuye su acción antiproliferativa es el de la inhibición de la mitosis por la interacción con la tubulina (Jordan y Wilson, 1990; Jordan *et al.*, 1991; Livezey *et al.*, 1993; Panda *et al.*, 1996; Scala *et al.*, 1996). También, se ha propuesto que este fármaco puede actuar de otras maneras, poco estudiadas, ya que

posiblemente afecta varios procesos celulares que quizá tienen relación con el daño conocido a los microtúbulos, como: la biosíntesis de ácidos nucleicos, de lípidos, metabolismo de nucleótidos y del glutatión y de la actividad de la calmodulina dependiente de ATP (Creasey, 1968; Klein *et al.*, 1975; Jordan *et al.*, 1991)

Por lo anterior, es posible explicar los resultados obtenidos después de 24 h de tratamiento con VBL, ya que de acuerdo a su mecanismo de acción principal, no se esperaba la inducción de daño (rompimientos de DNA) con este fármaco ya que se conoce bien que no interactúa con el DNA, aunque seguramente hubo un arresto en metafase de la mayoría de las células estimuladas, por dos razones principales: que la dinámica de los microtúbulos es mucho mayor en células en fase M, ya que la actividad se incrementa de 20 a 100 veces más (Cassimeris *et al.*, 1986; Jordan y Wilson, 1998) y la segunda razón es que a partir de dosis más bajas hasta la utilizada en este estudio se ha mencionado este arresto en metafase (Jordan *et al.*, 1991).

Otra posible explicación es que después del bloqueo en mitosis, la célula entre en apoptosis ya que este agente es capaz de inducir este proceso (Takano *et al.*, 1993; Tsukidate *et al.*, 1993; Panda *et al.*, 1996; Srivastava *et al.*, 1998; Balagoskony *et al.*, 2000) y específicamente puede inducir la fosforilación de Raf-1/Bcl-2, lo cual, es un paso esencial para llevar a cabo la apoptosis (Blagosklonny *et al.*, 2000), y así pensar que estos fragmentos son debidos a la degradación del DNA. Tal y como lo reportan Tsukidate *et al.* (1993), quienes tratan con VBL o colchicina a hepatocitos de rata y muestran claramente como después de 24 h de

tratamiento con los fármacos el porcentaje de células muertas es del 44.8% y la fragmentación del DNA es de 40.9%, lo que indica que hay una importante cantidad de fragmentos de DNA en estas células, a lo que atribuyen que es apoptosis, también mencionan que la VBL produce una baja viabilidad por un estrés oxidante y por la inhibición del transporte de electrones en la mitocondria.

Estos resultados apoyan los resultados observados después de 24 h de tratamiento, ya que la viabilidad celular obtenida con este fármaco fue la más baja para las células estimuladas (24 h de tratamiento) ($x = 68.28 \pm 15$) en comparación con los demás fármacos, lo cual, posiblemente correlaciona con los fragmentos debidos a la apoptosis. Sin embargo, no podemos atribuir todos los rompimientos a este evento. Las otras probables explicaciones residen en lo expresado anteriormente acerca de otros mecanismos de acción propuestos para la VBL, que, pueden afectar la síntesis de ADN y desequilibrar los "pools" de nucleótidos, así como activar la proliferación celular, los cuales también afectarían, o serían más sensibles para las células estimuladas, y de esta manera generar rompimientos. También, existen reportes en la literatura que apoyan nuestros resultados, acerca de que, los agentes disruptores de microtúbulos como la hidroquinona, son capaces de inducir clastogenicidad (Xu y Adler, 1990), así como la colcemida con la cual se ha observado un efecto clastógeno después de 48 h de tratamiento en células de médula ósea (Satya-Prakash *et al.*, 1986). Por tales razones, nuestros resultados apoyarían más estas propuestas acerca de mecanismos de acción alternos de la VBL.

ETOPÓSIDO: Este fármaco considerado antes como un inhibidor de microtúbulos, hoy se sabe que lo que realmente afecta es la función de la cromatina a través de la inhibición de la enzima topoisomerasa II α , la cual es muy importante en el mantenimiento topológico de la doble hebra de DNA (Austin y Marsh, 1998), o sea de los cambios conformacionales que sufre el DNA en procesos normales de replicación y transcripción. También, se le ha atribuido la función de ser un compuesto esencial requerido para la condensación y segregación de los cromosomas (McPherson y Goldenberg 1998).

Cuando el etopósido interactúa con esta enzima la inhibe evitando que se lleven a cabo estos procesos adecuadamente, esta enzima se encuentra en mayor medida en la fase "S", o sea su estatus depende de la fase del ciclo celular (Negri *et al.*, 1992; Sandri *et al.*, 1996; Herzog *et al.*, 1998; Stacey *et al.*, 2000), por lo cual, se esperaba daño en células ciclando, lo que, coincide con los resultados obtenidos para estas células, ya que debido a que la topoisomerasa II efectúa rompimientos transitorios en el DNA que, serán después resellados (Pratt *et al.*, 1994; Kingma y Osheroff, 1998), cuando está en contacto la enzima con este fármaco, se inhibe su función y se forman rompimientos de una y dos cadenas del DNA. Esto se lleva a cabo debido a la constitución de un complejo intermediario y estable (fármaco-enzima-DNA), en el cual, una subunidad del homodímero de la enzima se une covalentemente al extremo 5' del ADN roto, por medio de un residuo de tirosina, lo cual hace que mientras dure este complejo entonces los rompimientos no podrán ser resellados (Lock y Ross, 1990; Pratt *et al.*, 1994) esto explicaría los fragmentos observados en nuestro sistema en linfocitos estimulados (24 h de

tratamiento). Otras propuestas para la generación de daño en células estimuladas son las siguientes:

Los sitios AP son lesiones de gran importancia biológica ya que se pueden producir de manera normal en la célula (se estima que se forman $\approx 10,000$ sitios AP al día en cada célula de mamífero) o por un daño externo (Kingma y Osheroff, 1998). Se considera, que la presencia de éstos incrementa la actividad de anclaje de la topoisomerasa II (Kingma y Osheroff, 1998). Sin embargo, se ha observado en estudios realizados con sistemas oligonucleotídicos que contienen lesiones específicas, que el sitio de anclaje de la topoisomerasa II en el DNA no se modifica por la presencia de los sitios AP, o aparentemente estas lesiones actúan a través de la alteración de las interacciones entre la enzima y los sitios preexistentes de anclaje. También, observan que para que estos sitios puedan estimular el anclaje de la topoisomerasa II, deben localizarse como a 4 bases de distancia del sitio escindido, en contraste cuando se localizan inmediatamente después del pedazo cortado de DNA, entonces estas lesiones inhiben el proceso de escisión (Kingma y Osheroff, 1998), estos mismos autores estiman que la presencia de un solo sitioapurínico en una secuencia dada de anclaje incrementa la escisión de doble cadena del DNA de 10 a 20 veces. Por estas observaciones, plantean que estas lesiones aumentan la formación de los complejos entre la topoisomerasa II y el DNA, en el caso particular de los sitiosapurínicos debe ser porque estimulan la afinidad de la unión de la enzima con el ADN dañado. También, cuando son reconocidos por una AP-endonucleasa para reparar este daño entonces los corta y genera rompimientos.

Si bien existen estas propuestas, en nuestro sistema, la inducción de daño en linfocitos estimulados fue similar tanto a pH>13 como 12.3, por lo que consideramos que los rompimientos observados son rompimientos reales de cadena sencilla, y no sitios AP, mientras que en linfocitos sin estimular esto no sucede así.

Sorprendentemente, los resultados obtenidos en células sin estimular no se esperaban, de acuerdo al mecanismo de acción propuesto para este fármaco (inhibición de la topoisomerasa II) con los resultados obtenidos a pH>13 no podíamos explicar estos efectos, por lo que decidimos probar este compuesto para saber si había un efecto dosis-respuesta tanto a pH>13 como a 12.3 y también para conocer si se trataba de otro tipo de daño; ya que fue tan grande con la dosis inicial, que entonces se utilizaron otras dos dosis con un orden de magnitud inferior (dosis inicial: 2.07×10^{-4} , 2.07×10^{-5} , 2.07×10^{-6} M), (tanto a 2 como a 24 h con las mismas condiciones anteriores) con el objetivo de estimar si los rompimientos observados podrían deberse a otro evento molecular, como el que podría generar el etopósido, ya que a pH de 12.3 se detectan los rompimientos de cadena sencilla y los sitios retardados de reparación. Al comparar los resultados obtenidos tanto a pH>13 como a 12.3, se puede apreciar que en linfocitos estimulados hay una gran inducción de daño con las dos condiciones mientras que no lo hubo a pH 12.3 en células sin ciclar, lo cual indicaría que el daño observado se debe a sitios álcali lábiles (SAL) (Figura 21), los cuales, pueden ser generados por estrés oxidante:

PH>13 rompimientos de cadena sencilla
 sitios retardados de reparación
 - sitios álacali-lábiles (SAL)

pH 12.3 rompimientos de cadena sencilla
 sitios retardados de reparación

R= sitios álcali-lábiles

Figura. 22. Sustracción de los resultados obtenidos a pH>13 menos los resultados obtenidos a pH 12.3 para obtener la diferencia, la cual esta dada por los sitios álcali-lábiles.

Los SAL, pueden deberse a la generación de radicales libres como consecuencia de estrés oxidante y éstos pueden ser revelados en un medio alcalino, en realidad se puede decir que los SAL son sitios apurínicos o apirimidínicos (sitios AP) (Mol *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1999).

Por todo lo expresado anteriormente, acerca de la inducción de SAL y principalmente por la observación de la presencia de estas lesiones en linfocitos sin estimular y porque no hay inducción de SAL en linfocitos estimulados, creemos que en parte a esto se deben los rompimientos observados a 2 h. Otra probable explicación es la propuesta realizada por Tronov *et al.* (1999) acerca de que el etopósido puede causar la inhibición de la topoisomerasa II β , cuya función no esta relacionada con el ciclo celular (Negri *et al.*, 1992; Herzog *et al.* 1998; Tronov *et al.*, 1999; Stacey *et al.*, 2000), sugiriendo que el etopósido puede interactuar con

esta enzima y de alguna manera inducir un daño oxidante como consecuencia de esta interacción, lo cual, podría explicar nuestros resultados.

Por lo anterior, y por los reportes que existen acerca de la utilización de esta técnica con diferentes enzimas para elevar la sensibilidad y especificidad del ensayo, decidimos realizar pruebas más específicas para corroborar si se trataba de un daño oxidante el cual podría estar generando los SAL, para ésto se utilizó la enzima de restricción exonucleasa III (ver metodología), que reconoce bases oxidadas en el genoma y corta la base que esta oxidada y estos rompimientos son detectados por medio del ensayo cometa.

Los resultados corroboran la presencia de bases oxidadas en el genoma de los linfocitos sin estimular, tratados con las tres concentraciones del etopósido (2.07, 20.7 y 207 μM) para ambos donadores, mientras que en linfocitos estimulados esto no sucede así, por lo que podemos decir que los eventos moleculares por medio de los cuales se generan estos rompimientos son distintos.

Con los resultados obtenidos en estos experimentos podemos atribuir el daño observado inicialmente en linfocitos sin estimular en ambos donadores a $\text{pH} > 13$ a la presencia de bases oxidadas en el genoma reconocidas por la enzima exonucleasa III, las cuales, pueden generar los SAL. Éstos pueden ser debidos al estrés oxidante generado por los intermediarios metabólicos del etopósido, los cuales, pueden dar origen a especies altamente reactivas, incluyendo la ortoquinona (Mans *et al.*, 1990; Kagan *et al.*, 1994; Gantchev y Hunting 1998; Van Maanem *et al.*, 1998). Otra cuestión importante, es que nuevamente se observaron diferencias entre donadores en la generación del daño oxidante por

parte de agentes que inducen radicales libres lo que podría deberse a un estatus diferencial del balance de las enzimas antioxidantes entre donadores. También, podemos corroborar que existe una relación directa entre la generación de SAL, y el número de bases oxidadas en el genoma y podemos inferir que los rompimientos tanto en células en ciclo como en aquellas que no lo están se deben a un mecanismo de acción diferencial del etopósido, el cual depende de la fase del ciclo celular en la cual se encuentre la célula.

CONCLUSIONES

- La viabilidad celular no mostró un daño citotóxico por parte de los antineoplásicos, tanto en linfocitos no estimulados como estimulados (con excepción de la vinblastina), lo cual, podría indicar que para que un agente antineoplásico mate o dañe severamente a una célula, se necesitan de más de una dosis y más de un ciclo de administración y en la mayoría de los casos la combinación de los agentes.
- La técnica de electroforesis unicelular alcalina o "ensayo cometa" es un sistema sensible para la detección de daño al DNA inducido por fármacos antineoplásicos con diferentes mecanismos de acción. Sin embargo, no refleja un patrón de daño particular de cada uno de ellos.
- En general los linfocitos en división mostraron mayor daño con todos los agentes utilizados que los linfocitos no estimulados (fase G0).
- Tanto los fármacos que interactúan de manera directa con el ADN (melfalan, carboplatino, adriamicina y actinomicina-D) como aquellos que interactúan de manera indirecta, (5-fluoruracilo, metotrexato, n-hidroxiurea, vinblastina y etopósido) registraron daño en linfocitos estimulados, lo que indica que la técnica, también puede detectar fármacos que dañen indirectamente al DNA.

- El etopósido fue el agente que mayor inducción de daño mostró en linfocitos estimulados y sin estimular (fase G0), con una alta repetitividad para ambos donadores.
- El etopósido es considerado principalmente como un agente "S" dependiente que inhibe la acción de la topoisomerasa II, sin embargo, nuestros resultados indican que puede producir daño en ambas condiciones celulares a pH>13, mientras que a pH 12.3 no se observó daño en linfocitos no estimulados, lo cual, indicaría que este fármaco produce un daño generado por sitios álcali-lábiles, los que podrían generar sitios AP que se revelan en nuestro sistema a manera de rompimientos, como consecuencia de un probable daño oxidativo en linfocitos sin estimular.
- Existe una relación directa entre el daño inducido por el etopósido y la generación de sitios álcali-lábiles presentes en linfocitos no estimulados.
- Los resultados obtenidos con la enzima de restricción Exonucleasa III, corroboran la presencia de bases oxidadas en el genoma de linfocitos no estimulados generadas con las tres concentraciones utilizadas de etopósido, indicando un daño oxidante por parte de éste.

- El mecanismo de acción del etopósido es dependiente de la fase del ciclo celular, ya que los eventos moleculares por los cuales se generaron los rompimientos son distintos tanto en linfocitos estimulados como sin estimular.
- La técnica de electroforesis unicelular es un sistema reproducible, sensible y que en combinación con otras técnicas podría ser mucho más específico y servir para la predicción de los efectos genotóxicos de agentes antineoplásicos.

PERSPECTIVAS

- De un estudio inicial como este, ahora ya con conocimiento acerca del sistema utilizado y de cómo responde se pueden realizar numerosos estudios acerca de la predictibilidad de los efectos de estos y otros fármacos antineoplásicos de preferencia que interactuen directamente con el DNA o bien, procesos relacionados con éste, de la siguiente manera:
 - Sería útil probar estos fármacos en otro sistema "*in-vitro*", como son las líneas celulares transformadas de cánceres de tipo hematológico, como las leucemias y los linfomas, para observar y comparar el daño producido por las sustancias antineoplásicas tanto en cultivo de linfocitos como en las líneas celulares.
 - También para redondear este trabajo, sería de gran importancia trabajar con muestras de pacientes que padezcan este tipo de cánceres, a los cuales

se les trate "*in-vitro*" con el mismo protocolo que serán tratados in vivo, tratando de semejar lo mas posible las condiciones in vivo para tratar de correlacionar los resultados obtenidos "*in-vitro*" con los resultados obtenidos "*in-vivo*" acerca de la toxicidad generada por los fármacos. Seria conveniente utilizar marcadores de prognosis, tanto moleculares como clínicos y evaluarlos antes y después del tratamiento.

- Sería interesante utilizar el ensayo cometa en combinación con otras técnicas de biología molecular para evaluar resistencia a medicamentos, y así tener otro parámetro de predicción de los efectos de los fármacos.

LITERATURA CITADA

- Adair, F. E. y H. J. Bagg. 1931.** Experimental and clinical studies on the treatment of cancer by dichloroethylsulfide (mustard gas). *Ann. Surgery.* 93: 190
- Anderson, D., T. W. Yu, B. J. Philips y P. Schmezer. 1994.** The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat. Res.* 307: 261-271.
- Anderson, D., T. W. Yu y M. A. Browne. 1997.** The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the comet and fluorescence in situ hybridisation (FISH) assays. *Mut. Res.* 390: 69-77.
- Anderson, D., A. Yardley-Jones, T. W. Yu, J. A. Hughes, y M. H. Brinkworth. 1998.** Modulation of ras p21 oncoprotein levels and DNA strand breakage in human cells with chemotherapeutic agents and/ or deferoxamine. *Teratog Carcinog. Mutagen.* 18: 219-230.
- Archimbaud, E., X. Thomas, V. Leblond, M. Michallet, P. Fenaux, C. Cordonnier, F. Dreyfus, X. Troussard, J. Jaubert, P. Travade, J. Troncy, D. Assouline y D. Fiere. 1995.** Timed sequential chemotherapy for previously treated patients with acute myeloid leukemia: long-term follow-up of the etoposide, mitoxantrone, and cytarabine-86 trial. *J. Clin. Oncol.* 13: 11-18.
- Austin, C. A. y K. L. Marsh. 1998.** Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays* 20: 215-226.
- Barclay, B. J., B. A. Kunz, J. G. Little y R. H. Haynes. 1982.** Genetic and biochemical consequences of thymidylate stress. *Can. J. Biochem.* 60: 172.

- Blagosklonny, M. V., R. Robey, S. Bates y T. Fojo. 2000.** Pretreatment with DNA-damaging agents permits selective killing of checkpoint-deficient cells by microtubule-active drugs. *J. Clin. Invest.* 105: 533-539.
- Brandan, M E. 1986.** *La radiación.* SEP-UNAM. México, D.F. 92 pp.
- Brown, S. C., K. Mullis, C. Levenson y R. H. Shafer. 1984.** Aqueous solution structure of an intercalated actinomycin D-dATGCAT complex by two-dimensional and one-dimensional proton NMR. *Biochemistry* 23: 403.
- Browman, G. P., D. Bergsagel, D. Sicheri, S. O'Reilly, K. S. Wilson, S. Rubin, A. Belch, C. Shustik, R. Barr, L. Walker, K. James, B. Zee y D. Johnston. 1995.** Randomized trial of interferon maintenance in multiple myeloma: A study of the National Cancer Institute of Canada Clinical trials group. *J. Clinical Oncol.* 13: 2354-2360.
- Brusick, D. 1987.** *Principles of genetic toxicology.* Plenum Press. Nueva York. 284 pp.
- Cairns, J. 1978.** *CANCER Science and Society.* W.H. Freeman and Co. San Francisco, USA. 199 pp.
- Canellos, G. P. 1995.** Etoposide, vinblastine, and doxorubicin: An active regimen for the treatment of hodgkin's disease in relapse following MOPP. *J. Clin. Oncol.* 13: 2005-2011.
- Carter, S. K., M. T. Bakowski y K. Hellmann. 1977.** *Chemotherapy of Cancer.* John Wiley and Sons. New York. 305 pp.
- Cassimeris, L., S. Inou'e y E. D. Salmon. 1988.** Cell Motil. *Cytoskeleton* 10: 185-196.

- Chang, D., F. Chen, F. Zhang, D. C. McKay y M. Ljungman. 1999.** Done dependent effects of DNA damaging agents on p53-mediated cell cycle arrest. *Cell growth and Differentiation* 10: 155-162.
- Chatelut, E., P. Canal, V. Brunner, C. Chevreau, A. Pujol, A. Boneu, H. Roché, G. Houin y R. Bugat. 1995.** Prediction of carboplatin clearance from standard morphological and biological patient characteristics. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 573-580.
- Chessells, J. M. 1995.** Intisification of treatment and survival in all children with lymphoblastic leukemia: Results of UK medical research council trial UKALL X. *Lancet* 345: 143-148.
- Chiao, Y. C. C: y T. R. Krugh. 1977.** Actinomycin D complexes with oligonucleotides as models for the binding of the drug to DNA. Paramagnetic induced relaxation experiments on drug-nucleic acid complexes. *Biochemistry* 16: 747.
- Chov, I. N., J. Zeiger y E. Rapaport. 1984.** Imbalance of total cellular nucleotide pools and mechanisms of the colchicine-induced cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 2401-2405.
- Cole, M. D. 1970.** *Chemotherapy of Cancer.* Lea and Febiger. Philadelphia. 349 pp.
- Cooper, G. M. 1992.** *Elements of human cancer.* Jones and Barlett Publishers. Boston. 354 pp.
- Creasey, W. A. 1968.** Modifications in biochemical pathways produced by the *Vinca* alkaloids. *Cancer Chemother. Res.* 52: 501-507.

- Crossin, K. L. y D. H. Carney. 1981.** Evidence that microtubule depolymerization early in the cell cycle is sufficient to initiate DNA synthesis. *Cell*. 23: 61-71.
- Cline, M. J. 1971.** *Cancer Chemotherapy*. W. B. Saunders Company. Philadelphia. 205 pp.
- Cvitkovic, E., J. P. Droz, J. P. Armand y S. Khoury. 1993.** *Handbook of chemotherapy in clinical oncology*. Houston, 753 pp.
- De Vita, V.T., S. Hellman y S.A. Rosenberg. 1993.** *Cancer: Principles and practice of oncology*. Lippincott, Philadelphia.
- Duthie, S. J. y P. McMillan. 1997.** Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis. *Carcinogenesis* 18: 1709-1714.
- Eliot, H., L. Gianni y C. Myers. 1984.** Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron complex. *Biochemistry* 23: 928.
- Gantchev, T.G., J.E. Van Lier, D.A. Stoyanovsky, J.C. Yalowich y E. Kagan. 1994.** Interactions of phenoxy radicals of antitumor drug etoposide, with reductants in solution and in cell and nuclear homogenates: electron spin resonance and high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymol* 234: 631-643.
- Gantchev, T. G. y D. J. Hunting. 1998.** The ortho-quinone metabolite of the anticancer drug etoposide (VP-16) is a potent inhibitor of the topoisomerase II/DNA cleavable complex. *Mol Pharmacol*, 53: 422-428.
- Gieseler, F., E. Bawer, V. Neussler, M. Clark, y S. Valsamas. 1999.** Molecular effects of topoisomerase II inhibitors in AML cell lines: correlation of apoptosis with topoisomerase II activity but not with DNA damage. *Leukemia* 13: 1859-63.

- Goulian, M., B. M. Bleile, L. M: Dickey, R. H. Grafstrom, H. A. Ingrham, S. A. Neynaber, M. S. Peterson y B. Y. Tseng. 1986.** Mechanims of thymineless death. *Adv. Exp. Med. Biol.* 195: 89.
- Green, M.H., J.E. Lowe, R.A. Delaney y I.C. Green. 1996.** *Methods in enzymology.* 296: 243p.
- Hartley, J. M., V. J. Spanswick, M. Gander, G. Giacomini, J. Whelan, Souha y J. A. Hartley. 1999.** Measurement of DNA cross-linking in patients on ifosfamide therapy usin cell gel electrophoresis (comet) assay. *Clin Cancer Res.* 5: 507-512
- Haim, N., J. Nemeč, J. Roman. y B. Sinha. 1987.** Peroxidase-catalyzed metabilosm of etoposide (VP-16-213) and covalent binding of reactive intermediates to cellular macromolecules. *Cancer. Res.* 47: 5835-60.
- Haïoun, C. 1994.** Comparison of autologous bone marrow transplantation with sequential chemotherapy for intermediate-grade and high-grade non-hodgkin's lymphoma in first complete remission: A study of 464 patients. *J. Clin. Oncol.* 12: 1543-2551.
- Hartmann, A. y G. Speit. 1995.** Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat. Res.* 346: 49-56
- Hertz, R., J. Lewis y M. B. Lippsett. 1961.** Five years experience with the chemotherapy of metastasic choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women. *Ann. J. Obstet. Gynec.* 82: 631.
- Hehlmann, R. 1994.** Randomized comparison of interferon- α with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 84: 4064-4077.

- Heidelberger, C. 1965.** Fluorinated pyrimidines. Pp. 1-50. *In: J. N. Davidson y W. E. Cohn (eds.) Progress in Nucleic acid Research and Molecular Biology.* New York.
- Herzog, C. E., K. A. Holmes, L. M. Tuschong, R. Ganapathi y L. A. Zwelling. 1998.** Absence of topoisomerase ii β in an amsacrine-resistant human leukemia cell line with mutant topoisomerase II α^1 . *Canc. Res.* 58: 5298-5300.
- Hung, P., P. L. Olive y R. E. Durand. 1998.** Use of the comet assay for assessment of drug resistance and its modulations in vivo. *Br. J. Cancer.* 77: 412-416.
- IARC International Agency for Research in Cancer Monographs. 1987.** 6: 363-365.
- Jordan, M. A. y L. Wilson. 1990.** Kinetic analysis of tubulin exchange at microtubule ends at low vinblastine concentrations. *Biochemistry* 29: 2730-2739.
- Jordan, M. A. D. Thrower y L. Wilson. 1991.** Mechanism of inhibition of cell proliferation by *Vinca* alkaloids. *Can. Res.* 51: 2212-2222.
- Jordan, M. A. y L. Wilson. 1998.** Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current Opinion in Cell biology* 10: 123-130.
- Kagan, V. E., J. C. Yalowich, B. W: Day, R. Goldman, T. G. Gantchev y D. A. Stoyanovsky. 1994.** Ascorbate is the primary reductant of the phenoxyl radical of etoposide in the presence of thiols both in cell homogenates and in model systems. *Biochemistry* 33: 9651-9660.

- Kamen, B. A., P. D. Cole y J. R. Bertino. 2000.** Chemotherapeutic Agents. Pp. 612-652. *In*. R. C. Bast, D. W. Kufe, R. E. Polluck, R. R. Weichselbaum, J. F. Holland y E. Frei (eds.). *Cancer Medicine* ^e5. B. C. Decker Inc. London.
- Kasamatsu, T., K. Kohda y Y. Kawazoe. 1996.** Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay. *Mutat. Res.* 369: 1-6.
- Kastan, M. B., O. Onyekwere, D. Sidransicy, B. Vogelstein, y R. W. Craig. 1991.** Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51: 6304-6311.
- Kingma, P. S. y N. Osheroff. 1998.** The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. *Biochem. Biophys. Acta* 1400: 223-232.
- Klein, W., F. Kocsis y H. Altmann. 1975.** Influence of some cytostatic drugs on semiconservative DNA-synthesis and DNA-repair in normal and cancer cells. *Arzneimittelforschung* 25: 1623-1628.
- Kohne, C. H., W. Hiddemann, J. Schuller, J. Weiss, H. P. Lohrmann, U. Schmitz-Hubner, H. Bodensteing, C. Schobr, H. Wilke, J. Grem y H. J. Schmoll 1995.** Failure of orally administered dipyridamole to enhance the antineoplastic activity of fluoruracil in combination with leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: A prospective randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 13: 1201-1208.
- Kurpad, S. N., H. S. Friedman, G. E. Archer, R. E. MacLendon, W. M. Petros, H. E. Fochs, A. Guaspari y D. D. Bigner. 1995.** Intraarterial administration of

melphalan for treatment of intracranial human glioma xenografts in athymic rats.

Cancer Res. 55: 3803-3809.

Larson, R. A., R. K. Dodge, C. P. Burns, E. J. Lee, R. M. Stone, P. Schulman, D. Duggan, F. R. Davey, R. E. Sobol, S. R. Frankel, A. L. Hooberman, C. A. Westbrook, D. C. Arthur, S. L. George, C. D. Bloomfield y C. A. Schiffer. 1995. A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: Cancer and leukemia group B study 8811. *Blood* 85: 2025-2037.

Li, A. P., R. H. Helhelflich, 1991. *Genetic toxicology*. CRC press. USA.

Liang, J. C., N. M. Bailey, G. J. Gabriel, M. W. Kattan, R. Y. Wang, F. B. Hagemester, F. F. Cabanillas y L. M. Fuller. 1993. A new chemotherapy regimen for treatment of Hodgkin's disease associated with minimal genotoxicity. *Leuk. Lymphoma* 9: 503-508.

Limoli, C.L., A. Hartmann, L. Shephard, C.R. Yang, D.A. Boothman, J. Bartholomew y W.F. Morgan. 1998. Apoptosis, reproductive failure and oxidative stress in chinese hamster ovary cells with compromise genomic integrity. *Can. Res.* 56: 3712-3718.

Livezey, K. W., L. Wilson y M. A. Jordan. 1993. Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes. *J. Cell Sci.* 104: 261-274.

Lock, R. B. y W. E. Ross. 1990. Inhibition of p34^{cdc2} kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G₂ arrest in chinese hamster ovary cells. *Can. Res.* 50: 3761-3766.

- Mans, D. R., J. Ret'el, J. M: van Maanen, M. V. Lafleur, M. A. van Schaik, H. M: Pinedo y J. Lankelman. 1990.** Role of the semi-quinone free radical of the anti-tumour agent etoposide (VP-16-213) in the inactivation of single- and double-stranded phi X174 DNA. *Br. J. Cancer.* 62: 54-60.
- Martin, F. L. K. J: Cole, M. H. Orme, P. L: Grover, D. H: Phillips y S. Venitt. 1999.** The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline single-cell gel electrophoresis ("comet") assay in metabolically-competent MCL-5 cells. *Mutat. Res.* 445: 21-43.
- Martin, F. L. S. Venitt, P.L. Carmichael, C. Crofton-Sleigh, E.M. Stone, K. J. Cole, B.A. Gusterson, P. L. Grover y D. H: Phillips. 1997.** DNA damage in breast epithelial cells: detection by single cell gel (comet) assay and induction by human mammary lipid extracts. *Carcinogenesis* 18: 2299-305.
- McPherson, J. P: y G. J. Goldenberg. 1998.** Induction of apoptosis by deregulated expression of DNA topoisomerase II α ¹. *Can. Res.* 58: 4519-4524.
- Mol, M. A. E., G. P: Van der Schans y P. H. M. Lohman. 1993.** Quantification of sulfur mustard-induced DNA interstrand cross.links and single-strand breaks in cultured human epidermal keratinocytes. *Mutation Research, DNA Repair.* 294: 235-245.
- Morris, S.M., R.H. Heflich, D.T. Beranek y R.L. Kodell. 1982.** Alkylation-induced sister-chromatid exchanges correlate with reduced cell survival, not mutations. *Mutation Research* 105: 163-168.

- Muindi, J., B. K. Sinha, L. Gianni y C. Myers. 1985.** Thiol-dependent DNA damage produced by anthracycline-iron complex: The structure-activity relationships and molecular mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 27: 356.
- Myers, C. E., E. G. Mimnaugh, G. C. Yeh y B. K. Sinha. 1988.** Biochemical mechanisms of tumor cell kill by the anthracyclines, Pp. 527-569. *In.* J. W. Lown (ed.). *Anthracycline and Anthracenediones-Based Anticancer Agents.* Amsterdam. Elsevier.
- Negri, C., R. Chiesa, A. Cerino, M. Bestagno, C. sala, N. Zini, N. M. Maraldi y R. G. Astaldi. 1992.** Monoclonal antibodies to human DNA topoisomerase I and the two isoforms of DNA topoisomerase II: 170 and 180 kDa isozymes. *Exp. Cell Res.* 200: 542-459.
- Olive, P. L., J. P. Banáth, y R. E. Durand. 1990.** Detection of Etoposide Resistance by Measuring DNA Damage in Individuals Chinese Hamster Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 779-783.
- Olive, P. L. y J. P. Banáth. 1993.** Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ¹²⁵I-Urd. *J. Radiat. Biol.* 64: 349-358.
- Olive, P. L. y J. P. Banáth. 1995.** Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Exp. Cell Res.* 221: 19-26.
- Olive, P. L. y J. P. Banáth. 1997.** Multicell spheroid response to drugs predicted with the comet assay. *Cancer Res.* 57: 5528-5533.

- Ostling O. y K. J. Johanson. 1984.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 291-298
- Papirmeister, B. Y C. L. Gross, H. L. Meier, J. P. Petrali y J. B. Johnson. 1985.** Molecular basis for mustard-induced vesication. *Fund. Appl. Toxicol.* 5: 134-149.
- Panda, D., M. A. Jordan, K. C. Chin y L. Wilson. 1996.** Differential effects of vinblastine on polymerization and dynamics at opposite microtubule ends. *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.* 271: 29807-29812.
- Pfuhler, S. y H. U. Wolf. 1996.** Detection of DNA-Crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Env. Mol. Mutagenesis* 27: 196-201.
- Pierce, R.H., J.S. Campbell, A.B. Stephenson, C.C. Franklin, M. Chaisson, M. Poot, T.J. Kavanagh, P.S. Rabinovitch y N. Fausto. 2000.** Disruption of redox homeostasis in tumor necrosis factor induced apoptosis in murine hepatocyte cell line. *Am. J. of Pathology.* 157: 221-236.
- Piret, B. y J. Piette. 1996.** Topoisomerase poisons activate the transcription factor NF-KappaB in ACH-2 and CEM cells. *Nucleic Acid Res.* 24: 4242-4248.
- Poli, P., A. Buschini, A. Spaggiari, V. Rizzoli, C. Carlo-Stella y C. Rossi. 1999.** DNA damage by tobacco smoke and some antiproliferative drugs evaluated using the comet assay. *Toxicol. Letters* 108: 267-276.
- Pratt, W. B., R. W. Ruddon, W. D. Ensminger y J. Maybaum. 1994.** *The anticancer drugs.* Oxford University Press. New York. 352 pp.
- Regan, J. D. y R. B. Setlow. 1974.** Two forms of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogens and mutagens. *Cancer Res.* 34: 3318-

Registro Nacional del Cáncer. 1987. Secretaría de Salud, Dirección general de Epidemiología. México.

Reiter, A., M. Schrappe, W. D. Ludwig, W. Hiddemann, S. Sauter, G. Henze, M. Zemmermann, F. Lampert, W. Havers, D. Niethammer, E. Odenwald, J. Ritter, G. Mann, K. Welte, H. Gadner y H. Riehm. 1994. Chemoterapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 84: 3122-3133.

Reiter, A., M. Schrappe, R. Parwaresch, G. Henze, S. Müller-Weihrich, S. Sauter, K. W. Sykora, W. D. Ludwig, H. Gadner y H. Riehm. 1995. Non-hodgkin's lymphomas of childhood and adolescence: results of a treatment stratified for biology subtypes and stage. A report of the Berlin-Frankfurt-Munster grup. *J. Clin. Oncol.* 13: 359-372.

Ritov, V.B., R. Goldman, D.A. Stoyanovsky, E.V. Menshikova, y V.E. Kagan. 1995. Antioxidant paradoxes of phenolic compounds: peroxy radical scavenger and lipid antioxidant, etoposide (VP-16), inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase via thiol oxidation by its phenoxyl radical. *Arch. Biochem. Biophys* 321: 140-52.

Robles, S. J. y G. R. Adami. 1998. Agents that cause DNA double strand break lead to p16 (INK4a) enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16: 1113-1123.

Roberts, J. J. y F. Friedlos. 1981. Quantitative aspects of the formation and loss of DNA interstrans crosslinks in chinese hamster cells following treatment with

- cis-diamminedichloroplatinum (II) (Cisplatin). *Biochimica et Biophysica Acta*. 655: 146-151.
- Rojas, E. C. 1992.** Evaluación de sustancias antineoplásicas. El cultivo de linfocitos como sistema de prueba. Tesis de doctorado. Facultad de ciencias, U.N.A.M. 89 pp.
- Rojas, E., M. C. López y M. Valverde. 1999.** Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatography B*. 722: 225-254.
- Rojas, E, M. Valverde, S.B. Kala, G. Kala, M. W. Liberman. 2000.** Accumulation of DNA damage in the organs of mice deficient in γ -glutamyltranspeptidase. *Mutat. Res.* 447: 305-316.
- Romanet, T., J. L. Re, M. De Meo, F. Serre-Debeauvais, J. P. Lavielle, E. Reyt y C. Riva. 1999.** Detection of hypoxia by measurement of DNA damage and repair in human lymphocytes (comet assay): a predictive variable for tumor response during chemotherapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo* 13: 343-348.
- Roots, R. y K. C. Smith. 1976.** Effects of actinomycin D on cell cycle kinetics and the DNA of Chinese hamster and mouse mammary cells cultivated *in vivo*. *Cancer Res.* 36: 3654-3658.
- Rose, W.C. y J. E. Schuring. 1985.** Preclinical antitumor and toxicologic profile of carboplatin. *Cancer Treat Rev.* 12: 1-19.
- Rosenberg, B., L. VanCamp y T. Krigas. 1965.** Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205: 698

Sager, R. 1989. Tumor suppressor genes: The puzzle and promise. *Science* 246: 1406

Sandri, M.I., D. Hochhauser, P. Ayton, R. C. Camplejohn, R. Whitehouse, H. Turley, K. Gatter, I. D. Hickson y A. L. Harris. 1996. Differential expression of the topoisomerase II alpha and beta genes in human breast cancers. *Br. J. Cancer.* 73: 1518-1524.

Scala, S. K. Wosikowski, P. Giannakakou, P. Valle, J. L: Biedler, B. A. Spengler, E. Lucarelli, S. E. Bates y C. Thiele. 1996. Brain-derived neurotrophic factor protects neuroblastoma cells from vinblastine toxicity. *Cancer Res.* 56: 3737-3742.

Samuels, B.L., D.R. Hollins, G.L. Rosner, D.L. Trump, C.L. Shapiro, N.J. Vogelzang y R. I. Schilsky. 1997. Modulation of vinblastine resistance in metastatic renal carcinoma with cyclosporine A or tamixifen: a cancer and leukemia group B study. *Clin Cancer Res.* 3: 1977-84.

Sasaki, Y. F., E. Nishidate, F. Izumiyama, N. Matsusaka y S. Tsuda. 1997. Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). *Mutat. Res.* 391: 215-231.

Sato, M., Y. Abe, M. Noguchi, K. Kurokawa y M. Sakai, 1999. Inhibitory effect of thyrotropic hormone on apoptosis induced by Act-D in a functioning rat thyroid cell line. *Endocrine J.* 46: 309-315.

- Satya-Parkash, K.I. J.C. Liang, T.C. Hsu y D.A. Johnston. 1986.** Chromosome aberrations in mouse bone marrow cells following treatment *in vivo* with vinblastine and colcemid. *Environ. Mutagenesis. 8: 273-282.*
- Seeger, D. R., D. B. Cosulich, J. M. Smith y E. M. Hultquist. 1949.** Analogs of pteroylglutamic acid. III. 4-amino derivatives. *J. Am. Chem. Soc. 71: 1753.*
- Shen, H., M. Schultz, G. D. Krubs y K. D. Tew. 1998.** Increased expression of DNA-dependent protein kinase confers resistance to adriamycin. *Biochem. Biophys. Acta 1381: 131-138.*
- Sherman, S. E. y S. S. Lippard. 1987.** Structural aspects of platinum, anticancer drug interactions with DNA. *Chem. Rev. 87: 1153-1181.*
- Shinohara, Y. Nishida., y H. Sakai. 1989.** Initiation of DNA synthesis by microtubule disruption in quiescent rat 3Y1 Cells. *Eur. J. Biochem. 183: 275-280.*
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice y E. L. Schneider. 1988.** A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res. 175: 184-191.*
- Skeel, R. T. 1982.** *Manual of cancer chemotherapy.* Little Brown and Co. Boston. 279 pp.
- Srivastava, R. K, A. R. Srivastava, S. J. Korsmeyer, M. Nesterova, Y. S. Cho-Chung y D. L. Longo. 1998.** Involment of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell Biol. 18: 3509-3517.*

- Stacey, D. W., M. Hitomi y G. Chen. 2000.** Influence of cell cycle and oncogene activity upon topoisomerase II α expression and drug toxicity. *Molecular and Cellular Biology*. 20: 9127-9137.
- Strauss, B., D. Scudiero y E. Henderson. 1976.** The nature of the alkylation lesion in mammalian cells. Pp. 13-24. *En: P. C. Hanwalt y R. B. Setlow (eds.). Molecular mechanism for repair of DNA, part A.* Plenum Publishing Co. New York.
- Strauss, G. H. S. 1991.** Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mut Res.* 252: 1-15.
- Takano, Y., M. Okudaira y B. V. Harmon. 1993.** Apoptosis induced by microtubule disrupting drugs in cultured human lymphoma cells. Inhibitory effects of phorbol and zinc sulphate. *Pathol. Res. Pract.* 189: 197-203.
- Takusagawa, F., B. M. Goldstein, R. Yougster, A. Jones, H. M. Berman. 1984.** Crystallization and prelini-actinomycin D. *J. Biol. Chem.* 259: 4214.
- Tice, R. R., G. H. Strauss y W. P. Peters. 1992.** High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individuals peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 271: 101-113.
- Tewey, K. M., G. L. Chen, E. M. Nelson y L. F. Liu. 1984.** Interactive antitumor drugs interfere with the break-age-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* 259: 9182.

- Tronov, V. A., M. A. Konoplyannikov, T. A. Nikolskaya y E. M. Konstantinov. 1999.** Apoptosis of unstimulated human lymphocytes and DNA strand breaks in topoisomerase II inhibitor etoposide (VP-16). *Biochemistry* 64: 345-352.
- Tsukidate, K., K. Yamamoto, J. W. Snyder y J. L. Farber. 1993.** Microtubule antagonists activate programmed cell death (apoptosis) in cultured rat hepatocytes. *Am. J. Pathol.* 143: 918-924.
- Tyurina, Y., V.A. Tyurin, J.C. Yalowich, P.J. Quinn, H.G. Claycamp, N.F. Schor, B.R. Pitt, y V.E. Kagan. 1995.** Phenoxyl radicals of etoposide (VP-16) can directly oxidize intracellular thiols: protective versus damaging effects of phenolic antioxidants. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 131: 277-88.
- Uziely, B., S. Jeffers, R. Isacson, K. Kutsch, D. Wei-Tsao, Z. Yehoshua, E. Libson, F. M. Muggia y A. Gabizon. 1995.** Liposomal Doxorubicin: Antitumor activity and unique toxicities during two complementary phase I studies. *J. Clin. Oncol.* 13: 1777-1785.
- Van Maanem, J. M., M. V: Lafleur, D. R. Mans, E. van den Akker, C. de Ruiter, P. R. Kootstra, D. Pappie, J. de Vries, J. Ret'el y H. M. Pinedo. 1998.** Effects of the ortho-quinone and catechol of the antitumor drug VP-16-213 on the biological activity of single-stranded and double-stranded phi X174 DNA. *Biochem Pharmacol* 37: 3579-3589.
- Van Putten, L. M. y P. Lelieveld. 1971.** Factors determining cell killing by chemotherapeutic agents in vivo-II. Melphalan, chlorambucil and nitrogen mustard. *Eur. J. Cancer.* 7: 11

- Vigreux, C., J. M. Poul, E. Deslandes, P. Lebailly, T. Godard, F. Sichel, M. Henry-Amar y P. Gauduchon. 1998.** DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOKI cells. *Mutat. Res.* 419: 79-90.
- Walker, L. J, C. N: Robson, E. Black, D. Gillespie y I. D. Hickson. 1993.** Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAPI (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 13: 5370-5376.
- Waring, M. 1970.** Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: Evidence for molecular models involving intercalation. *J. Mol. Biol.* 54: 247.
- Wilson, J. M. 1990.** Kinetic analysis of tubulin exchange at microtubule ends at low vinblastine concentrations. *Biochemistry* 29: 2730-2739.
- Xu W. y I.D. Adler. 1990.** Clastogenic effects of known and suspect spindle poisons studied by chromosome analysis in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis.* 5: 371-374.
- Yu, Z., J. Chen, B. N. Ford, M. E. Brackley y B. W. Glickman. 1999.** Human DNA repair system: an overview. *Env. Molec. Mutagenesis.* 33: 3-20.
- Zhang, C. C., J. M. Yang, J. Bash-Babula, E. White, M. Murphy, A. J. Levine y W. N: Hait. 1999.** DNA damage increases sensitivity to vinca alkaloids and decreases sensiiivity to taxanes through p53-dependent repression of microtubule-associated protein 4. *Cancer Res.* 59: 3663-3670.

Zar, J. H: 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 718 pp.

SITIOS WEB

International Agency for Research in Cancer (Monographs)

[http:// 193.51.164.11/htdocs/Monographs/Suppl7.html](http://193.51.164.11/htdocs/Monographs/Suppl7.html)

National Cancer Institute

<http://www.nci.nih.gov/cancerinfo/index.html>

<http://cancernet.nci.nih.gov>

Cancer Organization

<http://www.cancer.org/>