



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE LA CASIOPEÍNA III-Ea,
UTILIZANDO COMO SISTEMA DE PRUEBA EL INTERCAMBIO DE
CROMÁTIDAS HERMANAS EN MÉDULA ÓSEA DE RATÓN CD-1 *in vivo*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

LÓPEZ CHAPARRO MICHEL



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA



México, D.F., Febrero del 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión y de dudar cualquier información”.
Julius Robert Oppenheimer



Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Lucila Álvarez Barrera en el laboratorio de Teratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), FES Zaragoza UNAM, a cargo del Dr. Mario Altamirano Lozano.

Durante el desarrollo de este trabajo se conto con el apoyo del CONACYT 101851 y PAPIIT clave 216809.

Agradecimientos

A la Dra. Álvarez Barrera Lucila por su asesoría, apoyo y paciencia en la realización de este trabajo.

A los sinodales, por sus comentarios y sugerencias.

M. en B.E. Enrique Mendieta M.

Dra. Álvarez Barrera Lucila

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dra. Ma. Del Carmen García Rodríguez

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

A mis compañeros del laboratorio, en especial agradezco a M. en C. Mateos Nava. Quienes participaron y apoyaron el término de este trabajo.

Dedicatorias

A mis padres.

A mis amig@s que siempre estuvieron a mi lado.

Índice	pág.
Abreviaturas	3
RESÚMEN.....	4
1.INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Antineoplásicos	6
1.2 Casiopeínas (cas)	8
1.3 La casiopeína III-Ea	11
1.4 Sistemas de prueba	13
1.5 Intercambio de cromátidas hermanas	14
1.6 Mecanismos de formación de los intercambios de cromátidas hermanas.....	16
1.8 El ratón como modelo biológico <i>in vivo</i>	19
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. HIPÓTESIS.....	24
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos particulares	27
5. MATERIAL Y METÓDO	28
5.1 Animales	29
5.2 Compuesto químico	29
5.3 Tratamiento	29



5.3.1 Administración de bromodesoxiuridina	30
5.3.2 Administración de colchicina	30
5.3.3 Obtención de células y preparación de laminillas	30
5.3.4 Tinción diferencial de cromátidas hermanas.....	31
5.4 EVALUACIÓN	31
5.4.1 Índice mitótico.....	31
5.4.2 Tiempo de proliferación celular.....	32
5.4.3 Intercambio de cromátidas hermanas	32
5.4.4 Análisis estadístico	34
5.5 DIAGRAMA DEL MÉTODO	35
5.5.1 Tratamiento con cas III-Ea	35
5.5.2 Obtención de laminillas.....	36
5.5.2 Tinción diferencial	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1 Índice mitótico.....	39
6.2 Tiempo de proliferación celular	43
6.3 Intercambio de cromátidas hermanas	46
7. CONCLUSIONES.....	50
8. REFERENCIAS	52
9. ANEXOS.....	60



Abreviaturas

ADN; ácido desoxirribonucleico

BrdU; bromodesoxiuridina

cas; casiopeína(s)

CF; ciclofosfamida

CI₅₀; concentración inhibitoria media

CPC; Cinética de proliferación celular

DE; desviación estándar

DI₅₀; dosis letal media o dosis letal 50

EPA; Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental)

ERO; Especies reactivas de oxígeno

ICH; intercambios de cromátidas hermanas

IM; índice mitótico

ip; intraperitoneal

KCl; cloruro de potasio

mg; miligramo

n; tamaño de muestra

OMS; Organización Mundial de la Salud

sol; solución

T (-); Testigo negativo

T (+); Testigo positivo

TPC; Tiempo de proliferación celular

UV; ultravioleta



RESÚMEN

Las casiopeínas son una serie de compuestos químicos con centro de cobre (II), que se sintetizaron y patentaron en México por investigadores de la facultad de química de la UNAM con la finalidad de ser empleados en la terapia del cáncer. En particular la casiopeína III-Ea (cas III-Ea) ha presentado una buena actividad antineoplásica en estudios *in vitro* e *in vivo*, lo que genera expectativas para que sea empleada en la medicina.

Debido a que las casiopeínas como la mayoría de los fármacos antineoplásicos, fueron diseñadas para interactuar con el material genético, antes de su salida al mercado, deben ser sometidas a una serie de evaluaciones preclínicas, para identificar sus propiedades en varios modelos y sistemas incluyendo células normales.

Por lo que en este trabajo se evaluó el efecto citostático y genotóxico de la cas III-Ea en células de la médula ósea de ratones machos de la cepa CD-1, utilizando como marcador de efecto sobre el material genético a los intercambios de cromátidas hermanas (ICH).

Se trabajó con cinco grupos de seis ratones a los cuales se les administró vía ip una de las siguientes dosis $1/8$, $1/4$ y $1/2$ de la DI_{50} respectivamente, se contó además con un grupo testigo positivo y uno negativo.

Los resultados obtenidos de la evaluación del índice mitótico mostraron que, los grupos tratados, presentaron una disminución comparados con el grupo testigo (1.97 ± 0.80), siendo de 1.47 ± 0.65 para $1/8$, 1.78 ± 1.04 en $1/4$ y 1.60 ± 0.38 con $1/2$. En la dosis más baja de se observó una diferencia estadísticamente significativa.

El tiempo de proliferación celular de los grupos tratados fue de 11.48, 11.63 y 10.89 horas respectivamente, para las dosis de $1/8$, $1/4$ y $1/2$ presentando un incremento estadísticamente significativo el grupo de $1/4$ comparado con el tiempo del grupo testigo negativo (11.00 horas).



1. INTRODUCCIÓN



1.1 Antineoplásicos

Dentro de los tratamientos que se utilizan para combatir el cáncer se encuentran la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia o una combinación de éstas, siendo la quimioterapia la más empleada, sin embargo no es efectiva en un su totalidad (Hernández y col. 2006).

En la quimioterapia se emplean compuestos antineoplásicos, los cuales son sustancias que se caracterizan por impedir el desarrollo, crecimiento y proliferación de las células cancerígenas o tumorales, dentro de ellos existen diferentes modos de acción

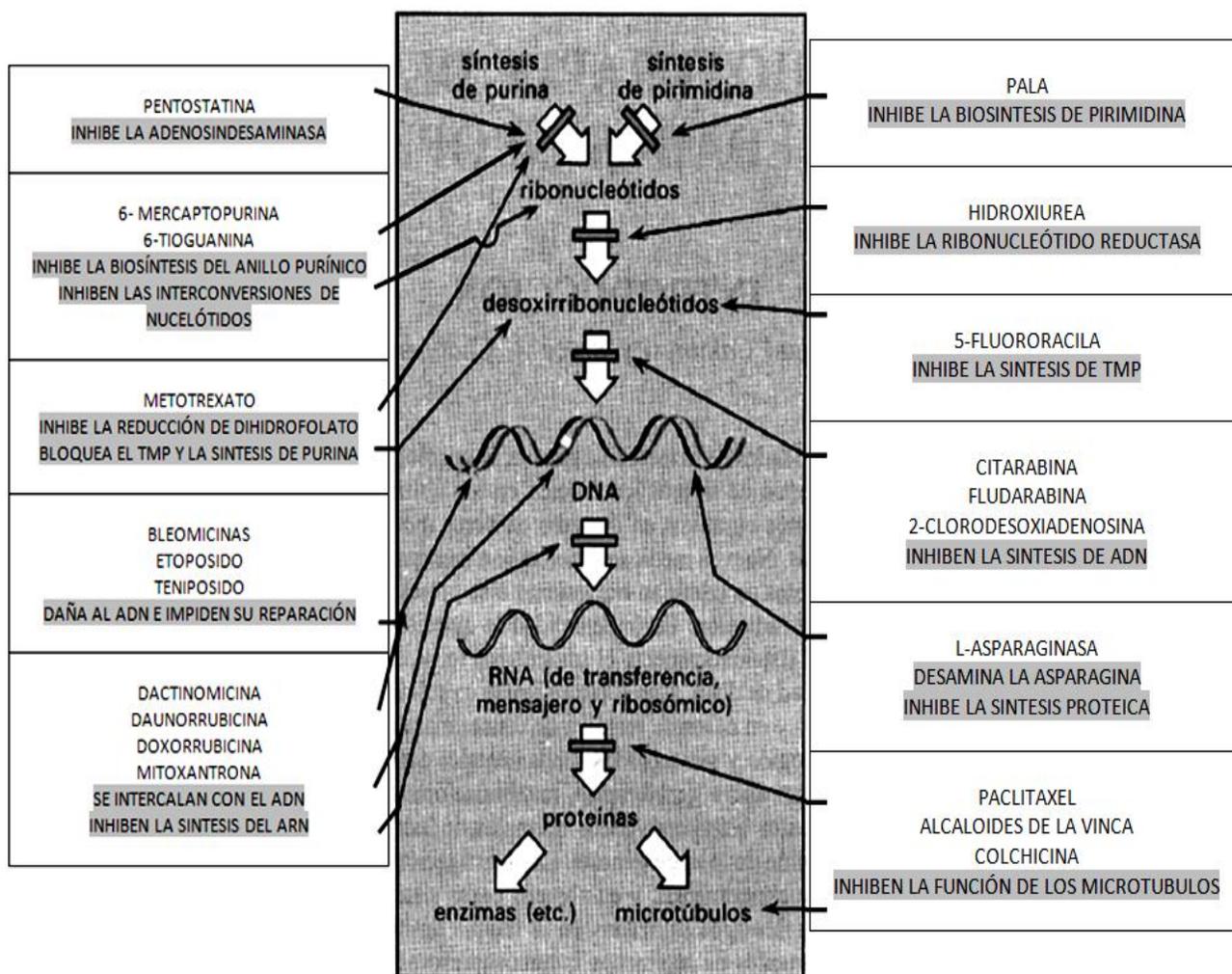


Figura 1. Resumen de algunos modos de acción de los diferentes tipos de antineoplásicos (Goodman y Gilman 2005).



(Figura 1), y dependiendo de la parte del ciclo celular en la que actúan se pueden clasificar en: (Lane 1999)

1. *No específicos para el ciclo celular. Son agentes tóxicos que actúan durante cualquiera de las fases del ciclo de división (G₁, S, G₂ ó M).*
2. *Específicos para el ciclo celular. Son agentes citotóxicos que actúan en solo una de las fases del ciclo de división.*

También se encuentran divididos en otros dos grupos, los que afectan al ácido desoxirribonucleico (ADN) y los que no lo afectan (Lane 1999).

En el grupo de los que afectan al ADN, encontramos como ejemplo a la ciclofosfamida (Figura 2) que es un agente alquilante, citotóxico de origen sintético y tiene mayor utilidad para el tratamiento de linfomas, algunos tipos de leucemia, tumores, así como algunas enfermedades autoinmunes (Salmon y Sartorelli 1998). Además de que es la sustancia que se utilizó como testigo positivo en el presente estudio, debido a que incrementa la frecuencia de ICH *in vivo* en medula ósea de ratón (Charles y col. 1983, Sozzy y col. 1985).

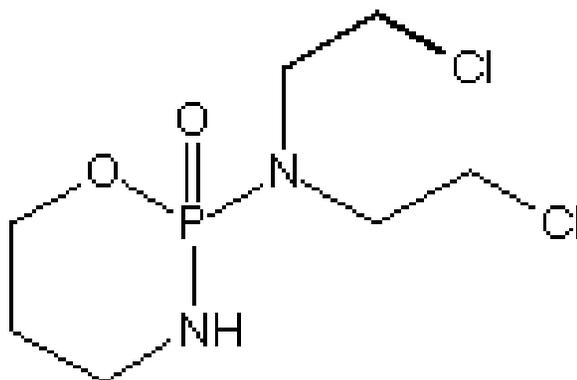


Figura 2. Estructura química desarrollada de la ciclofosfamida (tomado de Netdrugs 2011).

En el grupo de los que no afectan el ADN, encontramos como ejemplo a la vinblastina (Figura 3), un agente antimetabólico, que



reacciona uniéndose a la túbulina inhibiendo el ensamble de los microtúbulos, es usado para el tratamiento del cáncer de pulmón de mama y de testículo (Degraeve 1978).

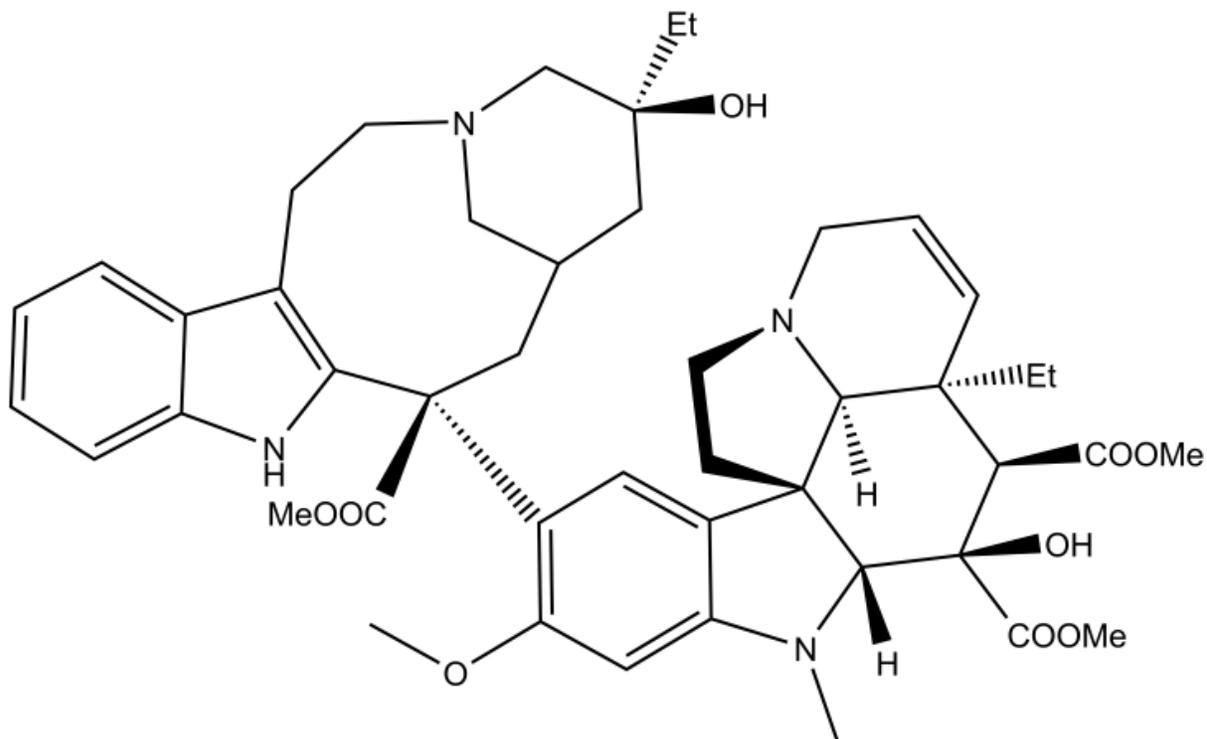


Figura 3. Estructura química desarrollada de la vinblastina (Starling 1976).

En México es importante la innovación de medicamentos antineoplásicos, debido a la necesidad que existe de importar estos productos y a sus elevados costos, la Dra. Lena Ruiz Azuara y sus colaboradores de la Facultad de Química de la UNAM desarrollaron y patentaron una familia de compuestos llamados casiopeínas® o cas (Ruiz 1992, Ruiz 1996, Flood y col. 2006).

1.2 Casiopeínas (cas)

Las cas son una serie de compuestos de coordinación con centro metálico de cobre (Cu) con ligantes bidentados, que pueden variar según la familia, las cuales se caracterizan por su actividad antineoplásica contra el cáncer. Existen alrededor de 100 compuestos diferentes, algunos de los cuales se muestran en el Cuadro I (Gracia y col. 2001, Flood y col. 2006).



Cuadro I. Compuestos de Casiopeínas® familias y formulas

FAMILIA	FORMULA GENERAL	EJEMPLOS
I	[Cu (4,7-difenil-fenantrolina)(N-O)]NO ₃	Cas I gly, Cas I ser, Cas I ala
II	[Cu (4,7-dm difenil-fenantrolina)(N-O)]NO ₃	Cas II gly, Cas II ala, Cas IIser
III-a	[Cu (N-N) (Acac)]NO ₃	Cas III ia, Cas III Ea, Cas III 5a
III-s	[Cu (N-N)(salal)]NO ₃	Cas III Gs, Cas III Cs, Cas III As
IV	[Cu (4,4'-dimetil-bipiridina)(N-O)]NO ₃	Cas IV gly, Cas IV ser, Cas IV ala
V	[Cu (5-R- fenantrolina)(N-O)]NO ₃	Cas V NO ₂ gly, Cas V NO ₂ ser
VI	[Cu (5,6- dimetil- fenantrolina)(N-O)]NO ₃	Cas VI gly, Cas VI ser, Cas VI ala
VII	[Cu (1,10- fenantrolina)(N-O)]NO ₃	Cas VII gly, Cas VII ser, Cas VII ala
VIII	[Cu (3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(N-O)]NO ₃	Cas VIII gly, Cas VIII ser, Cas VIII ala
IX	[Cu (2,2'-bipiridina)(N-O)]NO ₃	Cas IX gly, Cas IX ser, Cas IX ala

(Comunicación personal Dra. Lena Ruiz)



En la Figura 4, se muestra la estructura general de las casiopeínas y sus ligantes. Un ligante de tipo (N-N) diimina (1,10 fenantrolina - 2,2 bipyridina) y un segundo ligante de tipo (N-O) aminoácido ó (O-O) acetilacetato-salicilaldehidato.

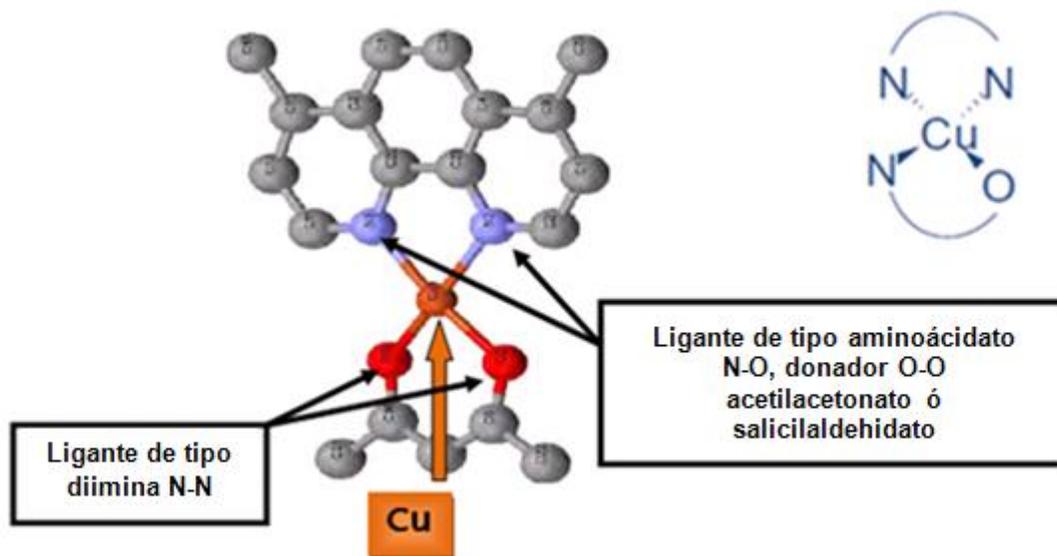


Figura 4. Estructura cristalográfica general de los compuestos de Casiopeínas con centro metálico de Cu (II) (Tovar y Ruiz 2006).

En el diseño de las cas se han considerado varios factores, tales como la existencia de un metal esencial Cu, con la finalidad disminuir la toxicidad, la existencia de quelatos que favorecen la configuración “*cis*”, en torno al ion metálico y también hacen más estables a estos complejos y finalmente el quelato mixto que debe poseer diferentes niveles de hidrofobicidad que influyen directamente en la actividad biológica en un organismo completo, ya que se requiere para su transporte al sitio acción (Gracia y col. 2001).

El cobre es un metal que se encuentra presente en una gran cantidad de alimentos cotidianos, como el hígado, riñón, mollejas, carnes, cereales integrales, frutas secas y legumbres. Contribuye a la formación de los glóbulos rojos, al mantenimiento de los vasos sanguíneos, nervios, sistema inmunológico, huesos, tendones, tejido conectivo y el sistema vascular entre otras, posee dos



estados de oxidación 1+, 2+ (FAO 2012). Y debido a lo anterior se propone que la toxicidad de las cas puede ser menor a otros compuestos antineoplásicos.

Se ha observado que las casiopeínas presentan diferentes grados de actividad y selectividad dependiendo del tipo de complejo, siendo las familias I, II y III las de mayor potencial antineoplásico.

En estudios *in vitro* se encontró que la actividad citotóxica, citostática, pro-apoptótica y antitumoral de estas tres cas fue similar a las del compuesto mitomicina C y superior al cisplatino (Gracia y col. 2001, Trejo y col. 2005, Rodríguez y col. 2006, Carvallo y col. 2008, Mejía y Ruiz 2008, Kachadourian y col. 2010). Mientras que en trabajos *in vivo* de trasplante se ha reportado buena actividad antineoplásica en ratón, rata y perro (Ruiz y col. 1993; Rivera y col. 1998; Vizcaya y col. 2003; Rodríguez y col. 2006).

La casiopeína III-ia y la cas II-gly son las más estudiadas, *in vivo* e *in vitro*, y se reportó que en el año 2011 iniciarían las primeras pruebas con pacientes terminales (Serment y col. 2011).

Se está trabajando para conocer el mecanismo de acción de estos compuestos; sin embargo, la presencia del cobre II, en la estructura sugiere que su modo de acción puede estar relacionado con las especies reactivas de oxígeno ERO, después de la reducción del cobre a través de una reacción Fenton (Bravo y col. 2009).

1.3 La casiopeína III-Ea

En el grupo de la familia III de las casiopeínas se encuentra la cas III-Ea (Figura 5), que en estudios *in vitro* muestra una buena actividad antineoplásica en líneas de células tumorales humanas y leucocitos de personas sanas, superando incluso a los compuestos oxiplatino, carboplatino y cisplatino (Tovar y col. 2006, Gracia y col. 2001, Alemón y col. 2007), mientras que *in vivo* presentó buena actividad antineoplásica en los modelos de isotransplante de melanoma B16 de ratón (Arroyo 2009).



Su fórmula general es, Cu (4,7-dimetil- 1,10- fenantrolina (acetilacetionato) H₂O) NO₃ H₂O, su peso molecular es de 450.94 g/mol, es soluble en agua, solución salina, solución de glucosa y presenta un color azul intenso.

La dosis letal media en ratones CD-1 vía intraperitoneal, fue determinada por Arroyo en el 2009, y es de 13.52 mg/kg para machos y 15.67 mg/kg para hembras.

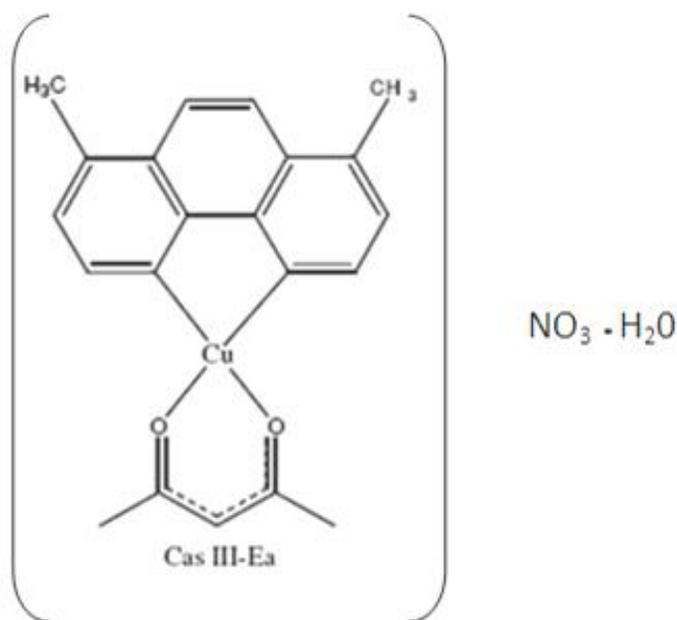


Figura 5. Estructura química desarrollada de la Casiopeina III-Ea (Tovar y col. 2006).

En la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental de la FES Zaragoza, recién se inicio el trabajo experimental con la casiopeína III-Ea utilizando como modelo biológico ratones de la cepa CD-1.

Los primeros trabajos utilizando la técnica de electroforesis unicelular en gel, mostraron que se produce genotoxicidad y citotoxicidad en células de corazón, hígado, pulmón, riñón, sangre y testículo cuando se aplican tratamientos de 15, 30 y 45 días a ratones macho (Camargo 2011). Además se encontró que también afecta parámetros de reproducción y fertilidad en ratones tratados durante 60 días y se observaron malformaciones esqueléticas y



morfológicas en su descendencia (Camargo y col. 2009, García 2011).

Por otra parte como todos los fármacos, antes de su salida al mercado, las casiopeínas deben de ser sometidas a una serie de evaluaciones preclínicas y clínicas para identificar sus propiedades farmacológicas, farmacocinéticas, toxicológicas y genotóxicas, estableciendo una relación estructura actividad con sus posibles efectos a corto plazo así como la dosis optima, los riesgos y su eficacia en el humano (Hernández y col. 2006).

1.4 Sistemas de prueba

Los diferentes sistemas de prueba son utilizados para identificar los efectos tóxicos que producen los agentes ya sean físicos, químicos o biológicos (NRC 1992, Rodríguez 1995).

Para conocer, evaluar y cuantificar los efectos antes mencionados, los sistemas de prueba se apoyan en marcadores biológicos que a su vez se clasifican en cuatro categorías (Moutschen 1985).

Categoría I: Pruebas diseñadas para detectar lesiones a nivel molecular (reacción de los compuestos con las moléculas de ADN).

Categoría II: Pruebas diseñadas para detectar mutaciones a nivel celular, utilizando organismos inferiores y algunos organismos superiores como hámster y ratón.

Categoría III: Pruebas diseñadas para estimar el daño causado a nivel cromosómico (efecto clastógeno o mutagénico), ya sea *in vivo* o *in vitro*, utilizando plantas o animales.

Categoría IV: Finalmente, algunos investigadores prefieren observar los efectos en la progenie de los organismos tratados, usando pruebas mutagénicas a nivel de organismos completos, en plantas como la cebada y el maíz o animales como la *Drosophila* y el ratón.

Dentro de las pruebas de la categoría III, se encuentran los análisis que involucran el estudio del efecto sobre el material genético, como los intercambios de cromátidas hermanas (ICH), los



micronúcleos (MN), las aberraciones cromosómicas (AC), la hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) y el ensayo de electroforesis unicelular en gel entre otras, los cuales son parámetros fácilmente evaluables por ser visibles microscópicamente (Moutschen 1985, Rodríguez 1995, Felipe 2011).

1.5 Intercambio de cromátidas hermanas

Una de las pruebas genotóxicas más utilizadas son los intercambios de cromátidas hermanas (ICH), reconocida por la EPA (de sus siglas en inglés Environmental Protection Agency) como necesaria para el registro de fármacos, plaguicidas y sustancias tóxicas. Se ha empleado para evaluar el efecto de la exposición a radiación y compuestos químicos, tiene excelente relación dosis-respuesta tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* (Tucker y Preston 1996).

Un ICH es la manifestación citológica de un intercambio entre los productos de replicación, que implica la ruptura y reunión entre sitios homólogos (Morales y col. 1995).

Este bioensayo presenta las siguientes ventajas:

1. Es excelente para detectar agentes que producen rompimientos en el ADN.
2. Es mucho más sensible para detectar mutágenos químicos que el método basado en el análisis de aberraciones cromosómicas.
3. Hay ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* para detectar mutágenos directos o indirectos, es decir que requieran o no activación metabólica.
4. Los sistemas *in vivo* permiten el análisis de tejidos diversos incluyendo células germinales.

Las siguientes desventajas:

1. El desconocimiento del significado biológico específico.



2. El efecto sinérgico que puede tener la Bromodesoxiuridina BrdU respecto al mutageno (Olenson 1990).

La primera evidencia directa de los ICH fue obtenida por Taylor y col. en 1957 con la ayuda de técnicas autorradiográficas en células de *Bellevalia romana*. Esta técnica permitió la duplicación de los cromosomas en presencia de la timidina tritiada (^3Hdt) seguido por un ciclo y medio de replicación, observando que los cromosomas presentaban una cromátida marcada y otra sin marca, se detectó que frecuentemente se presentaban alteraciones en el marcaje de los cromosomas de segunda división. El método radiográfico no constituyo un sistema adecuado para determinar la frecuencia de los ICH debido a su resolución limitada.

En 1973, Latt desarrolló otra técnica que se basa en la incorporación del análogo de base 5,2 bromodesoxiuridina (BrdU) durante el primero de dos ciclos de división y la posterior tinción con un colorante fluorescente bibenzimida 33258 Hoechst. El átomo de bromo es un análogo de base que induce la fluorescencia del colorante. Al analizar las preparaciones en el microscopio se observaba una cromátida substituida brillante, mientras la otra cromátida se observa opaca. Esta alternativa constituyo una técnica de alta resolución; sin embargo, tiene la desventaja de que la fluorescencia se desvanece rápidamente.

Las técnicas para detectar ICH se han modificado a través del tiempo y en la actualidad se utiliza la técnica de fluorescencia más Giemsa. Esta consiste en la incorporación de BrdU durante dos ciclos de replicación, la tinción con el colorante Hoechst y posteriormente los cromosomas son expuestos a luz UV para producir una reacción de fotólisis del ADN. Finalmente se realiza un lavado con sales y la tinción con la solución de Giemsa de esta manera la cromátida bifilarmente substituida resalta respecto a la cromátida hermana unifilarmente sustituida, resultando una tinción diferencial (Figura 6), de esta forma se obtienen cromosomas teñidos de forma permanente que facilita la detección de los ICH con el microscopio óptico (Perry y Wolff 1974).



La BrdU puede ser introducida fácilmente *in vitro*; sin embargo, *in vivo* en mamíferos es difícil, sobre todo por la rápida deshalogenación que sufre en el hígado (Qin y Huang 1984).

Existen varias formas para administrar la BrdU *in vivo*, algunas son más invasivas que otras, entre ellas tenemos la aplicación de inyecciones intraperitoneales múltiples (Allen y Latt 1976), infusiones subcutáneas, intravenosas (Schneider y col. 1976) o por implantación de tableta comprimida (Allen y col. 1977).

Morales y col. en 1984 desarrollaron otro método alternativo que consiste en la inyección intraperitoneal del análogo de base BrdU absorbido en carbón activado. Este método, además de ser más sencillo y rápido ha permitido una clara diferencia entre las cromátidas hermanas tanto de espermatogonias como de células de glándula salival y de la médula ósea de ratón. Los resultados obtenidos con este sistema son prácticamente iguales a los reportados con la implantación de la tableta con la ventaja de ser más sencillo.

1.6 Mecanismos de formación de los intercambios de cromátidas hermanas

Existe controversia acerca de cuál es el daño responsable de inducir los intercambios de cromátidas hermanas, algunos autores proponen que los ICH son causados por lesiones discretas que se producen en el sitio de la lesión o en un lugar próximo a ella (Kato 1977, Ishiii y Bender 1980, Rodríguez y Morales 2011) y otros manifiestan que son lesiones múltiples las que los desencadenan y por lo tanto, el sitio en el que ocurren los ICH posiblemente no está asociado con una lesión en particular (Painter 1982, Cleaver 1981).

Actualmente existe gran cantidad de información e investigación acerca de los ICH, aunque el significado biológico no ha sido claramente determinado. La inducción de los ICH requiere del paso de las células por la etapa de síntesis del ADN (Perry y Wolff 1974), ya que los intercambios se producen durante o inmediatamente después de que se ha originado la horquilla de replicación o bifurcación durante la replicación del ADN (Kato 1980).



Se ha observado que la frecuencia de Intercambios es mayor en fase S y decrece cuando la célula pasa a G₂ (Sharvartzman y Gutiérrez, 1980).

El proceso de inducción de los ICH parece producirse de manera espontánea en células que no han sido tratadas o cuando menos no de forma intencional por algún agente inductor de intercambios (McClintock, 1938); esto se ha demostrado *in vitro* (Kato 1977) e *in vivo* (Tice y col. 1976). Se sabe que ocurren con una frecuencia basal para cada tipo celular. En ratones de la cepa Balb/c el valor más bajo se ha obtenido en espermatogonias (1.7 ICH/célula) el más alto en células de la glándula salival (5.6 ICH/célula) y las células de la médula ósea presentan frecuencias basales intermedias (3.5 ICH/célula). Se han encontrado evidencias de que la BrdU requerida para la diferenciación de las cromátidas hermanas es responsable directa o indirectamente del valor basal (Morales y col. 1984).

Existe una gran variedad de especies eucariotas desde plantas, insectos, peces y mamíferos que han sido usados en experimentos para evaluar la capacidad de los agentes físicos y químicos para inducir ICH *in vivo*. El número de ICH inducido por un tratamiento químico depende de: (Tucker y col. 1993)

- La cinética de distribución y metabolismo del compuesto
- La naturaleza de las lesiones al ADN
- La eficiencia de los sistemas de reparación del ADN
- El grado de daño celular asociado con el tratamiento.



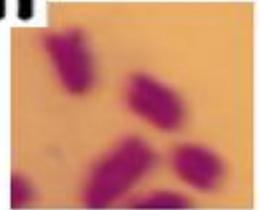
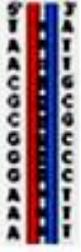
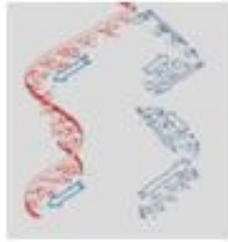
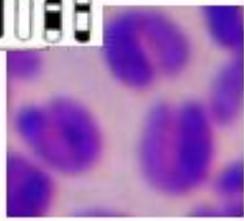
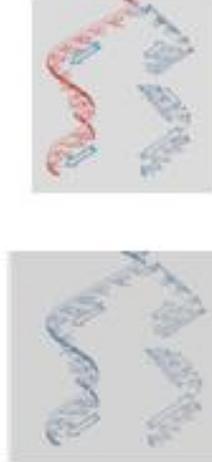
G1	S	G2	M
 <p>PRIMER CICLO DE REPLICACION</p>	 <p>PRESENCIA DE BrdU QUE SE INCORPORA A LA CADENA DE ADN</p>		 <p>SE OBSERVAN CROMOSOMAS CON IGUAL TINCION EN AMBAS CROMATIDAS</p>
 <p>SEGUNDO CICLO DE REPLICACION</p>	 <p>PRESENCIA DE BrdU QUE SE INCORPORA A LA CADENA DE ADN</p>		 <p>SE OBSERVAN CROMOSOMAS CON TINCION DIFERENCIAL E INTERCAMBIOS</p>
 <p>TERCER CICLO DE REPLICACION</p>	 <p>PRESENCIA DE BrdU QUE SE INCORPORA A LA CADENA DE ADN</p>		 <p>SE OBSERVAN CROMOSOMAS CON TINCION DIFERENCIAL Y CON IGUAL TINCION EN AMBAS CROMATIDAS</p>

Figura 6. Representación esquemática de los cromosomas, en las diferentes etapas del ciclo celular en las que es incorporada la bromodesoxiuridina (BrdU) en el ADN del ratón. Las líneas rojas representan la cadena sin marcar. Las líneas azules representan las cadenas de polinucleótidos marcadas con el análogo de base.



1.8 El ratón como modelo biológico *in vivo*

La elección de una especie para las pruebas de toxicidad esta basada en la consideración de un amplio número de variables. Idealmente, si la prueba de toxicidad es destinada a proveer información de la seguridad o uso seguro de la sustancia en humanos, las especies para analizar deberán ser lo más similar posible en cuanto a su cinética toxicológica (Andress 1992).

Actualmente en la investigación una de las especies eucariotas más utilizadas es el ratón, cuyo ancestro es el roedor común (Altamirano 1994).

Existen entre 100 y 120 cepas consanguíneas del ratón. Los ratones del laboratorio constituyen entre 60 y 80 por ciento de los mamíferos utilizados en la investigación, esto debido a su gran proliferación, a su capacidad de adaptación, a los conocimientos que se tienen acerca de su fisiología y a la facilidad de su manejo (Andress y col. 1992).

Los ratones de laboratorio deben pertenecer a una cepa pura, (Figura 7) facilitando la comparación de los efectos de los diferentes tratamientos con fármacos y su entorno físico (Altamirano 1994).



Figura 7. Ratones CD-1



Algunas de las características que han hecho del ratón el modelo biológico y biomédico más utilizado en las investigaciones científicas son: (Pierce 2005)

1. Tamaño apropiado para la crianza y la manipulación
2. Las hembras producen un gran número de óvulos, por lo tanto tienen una reproducción rápida.
3. Poseen un breve período de gestación (19-21 días), y su destete es rápido.
4. Tienen un alto número de crías.
5. Tienen un sistema inmune similar al de los seres humanos.
6. Al ser mamíferos eucarióticos, poseen un genoma muy similar al de los seres humanos.
7. Porcentaje de genes común al de los seres humanos es de un 99%.
8. Se conoce su genoma completo

El periodo de vida de estos roedores es de 1.5 a 3 años nacen sin pelo con los ojos cerrados. A los doce días abren los ojos, comienzan a comer sólido y aprenden a tomar agua de botella por imitación (Lane 1976). Los machos se distinguen de las hembras por los testículos visibles a través de la pared abdominal, la mayor distancia entre el ano y la protuberancia urogenital (Dyban y col. 1991).

El modelo *in vivo* ofrece la ventaja de incorporar el metabolismo del organismo y el análisis de varios órganos y tejidos, uno de los más empleados para pruebas de citogenética es la médula ósea que se encuentra en constante proliferación por lo tanto es ampliamente utilizada para identificar agentes que son capaces de inducir cambios en la proliferación celular y alteraciones en la estructura de los cromosomas (Moutschen 1985; Krishna y col. 1986) (Figura 8).



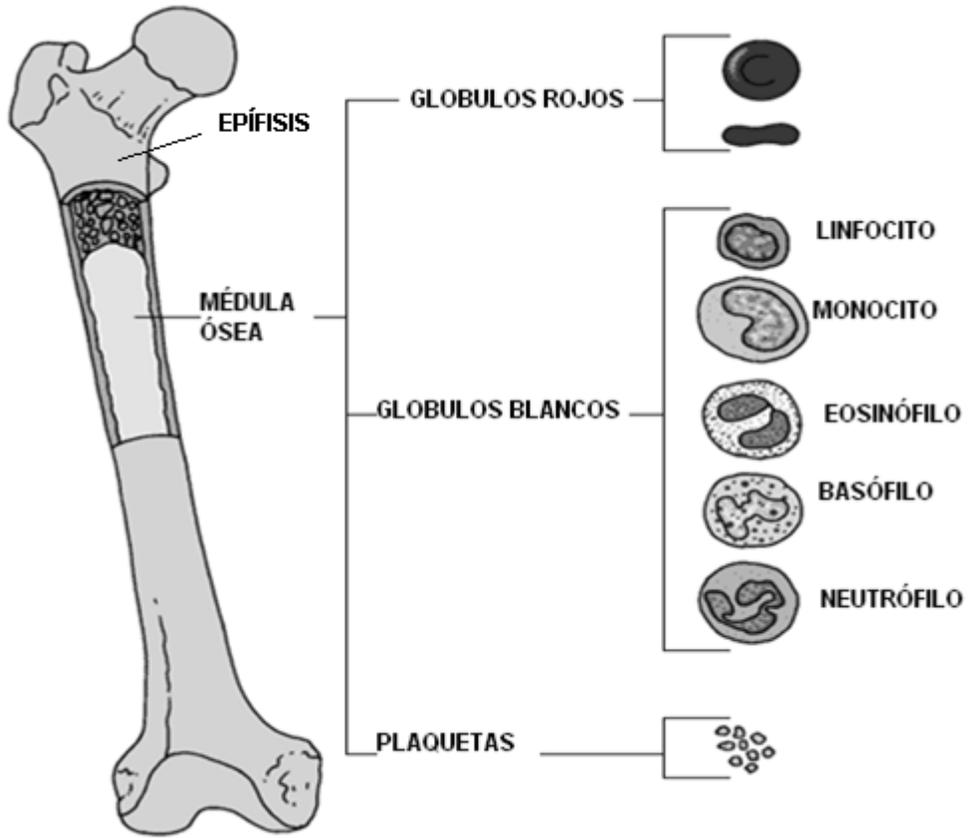


Figura 8. Estructura del fémur y la conformación de la médula ósea (tomado de Infogen 2011).

2. JUSTIFICACIÓN



En el mundo, el cáncer es la principal causa de mortalidad, la OMS informó que en 2008 se produjeron 7,6 millones de defunciones debido a esta enfermedad, lo que representa el 13% de las muertes totales ocurridas. En ese mismo año en México fue la tercera causa de muerte entre las mujeres y el cuarto entre los hombres, por lo tanto es de suma importancia la innovación de medicamentos antineoplásicos.

En el año de 1975 la Dra. Lena Ruiz y sus colaboradores de la Facultad de Química de la UNAM desarrollaron y patentaron una familia de compuestos llamados Casiopeinas®.

Las casiopeínas son compuestos de coordinación con centro metálico de cobre, este elemento fue elegido con el propósito de disminuir la toxicidad y el costo del fármaco. Algunas de estas moléculas entre ellas la Casiopeina III-Ea, han cubierto de forma satisfactoria los requisitos internacionales de actividad antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo*.

Debido a que las casiopeínas como la mayoría de los fármacos antineoplásicos, fueron diseñadas para interactuar con el material genético, antes de su salida al mercado, deben ser sometidos a una serie de evaluaciones preclínicas, para identificar sus propiedades genotóxicas en varios modelos y sistemas incluyendo células normales.

Por lo tanto en este trabajo se evaluó el efecto genotóxico y citostático de la casiopeína III-Ea utilizando como sistema de prueba el Intercambio de cromátidas hermanas, en células de la médula ósea de ratón CD-1 *in vivo*.



3. HIPÓTESIS



Los antineoplásicos son sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento y proliferación de las células cancerígenas o tumorales, actuando sobre la célula en división, afectando o no al ADN y así provocando un daño celular irreparable y por lo tanto muerte celular.

La casiopeína III-Ea ha demostrado tener una buena actividad antineoplásica en ensayos *in vitro* en líneas celulares tumorales humanas, por lo tanto al tratar ratones de la cepa CD-1 se espera que el compuesto a diferentes dosis, sea capaz de modificar el índice mitótico, la tasa de proliferación celular y la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas de las células de medula ósea, atribuidos a un probable efecto citostático y genotóxico.



4. OBJETIVOS



4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto genotóxico y citostático de la casiopeína III-Ea utilizando como sistema de prueba el Intercambio de cromátidas hermanas, en células de la médula ósea de ratón CD-1 *in vivo*.

4.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el índice mitótico, en células de médula ósea de ratones tratados vía intraperitoneal durante 24 horas con diferentes dosis de casiopeína III-Ea $1/8$, $1/4$ y $1/2$ de la DI_{50} .
2. Evaluar el tiempo de proliferación celular, contando el número de células en primero, segundo y tercer ciclo de replicación, en ratones tratados con las diferentes dosis de casiopeína III-Ea.
3. Evaluar la frecuencia y tipo de intercambios de cromátidas hermanas en células de segundo ciclo de división de los ratones tratados con las diferentes dosis de casiopeína III-Ea.



5. MATERIAL Y METÓDO



5.1 Animales

Se emplearon ratones macho de la cepa CD-1, de 8-10 semanas de edad, de 30-45 g de peso, los cuales se mantuvieron bajo condiciones estándar de bioterio y con libre acceso al agua y al alimento (FES Zaragoza, UNAM).

5.2 Compuesto químico

Se empleó la casiopeína III-Ea sintetizada en la Facultad de Química de la UNAM, cuya fórmula es: Nitrato de acua (4,7 dimetil-1,10 fenantrolina) (acetilanoato) cobre (II). Cuya abreviatura es, cas III-Ea, disuelta en agua inyectable para su aplicación.

Todos los reactivos que se emplearon en este trabajo fueron de Sigma Aldrich (San Luis Misuri EUA) excepto la Giemsa (Hycel de México), citrato de sodio y cloruro de sodio (JT Baker de México).

5.3 Tratamiento

Se trabajo con cinco grupos de seis ratones cada uno, a los cuales se les administró cas III-Ea, vía intraperitoneal (ip) en las siguientes dosis:

- Testigo negativo. Al cual se el administro agua inyectable.
- 1/8 de la DI_{50} correspondiente a 1.69mg/kg de peso de ratón.
- 1/4 de la DI_{50} correspondiente a 3.38mg/kg de peso de ratón.
- 1/2 de la DI_{50} correspondiente a 6.76mg/kg de peso de ratón (de acuerdo con Arroyo 2009).
- Testigo positivo ciclofosfamida al cual se le administró 20 mg/kg de peso de ratón.

Las soluciones se prepararon de tal forma que se aplicara siempre 0.1ml por cada 10 gr. de peso de ratón.



5.3.1. Administración de bromodesoxiuridina

El tratamiento con 5,2 bromodesoxiuridina (BrdU) se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Morales y col. (1984), con algunas modificaciones. Los animales fueron inyectados por vía ip con una solución que contenía 45 mg de BrdU en 1.5 mililitros de agua destilada, dosis que fue mezclada con 100 mg de carbón activado y administrada una hora después de la aplicación de la casiopeína III-Ea.

5.3.2 Administración de colchicina

Transcurridas 21.5 horas después de la inyección de BrdU a los ratones se les aplicó 0.1 ml por cada 10 gramos de peso, de una solución de colchicina al 0.2%.

5.3.3 Obtención de células y preparación de laminillas

Dos horas y media después de aplicar colchicina a los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a extraer la medula ósea del fémur con una jeringa que contenía 5 ml de solución hipotónica de cloruro de potasio al 0.075 M, precalentada a 37°C, se dejó reposar por 20 minutos y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en agitación en vortex. Se le agregaron 5 ml del fijador (metanol-ácido acético 3:1 frío) dejándose reposar por 20 minutos. Este paso se realizó dos veces más. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos y el botón se resuspendió en 0.4 ml de fijador. A partir de esta suspensión las preparaciones se realizaron por goteo en portaobjetos y se dejaron secar al ambiente por 48 horas mínimo.



5.3.4 Tinción diferencial de cromátidas hermanas

La tinción diferencial de cromátidas hermanas se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Morales y col. 1984, con algunas modificaciones.

Las preparaciones se tiñeron con una solución de Hoechst 33258 (0.5 µg/ml) en una caja coplin colocada en la oscuridad durante 35 min, después se lavaron con abundante agua y se sumergieron en una solución citrato-salina 2XSSC (cloruro de sodio 0.30 M + citrato de sodio 0.03 M) y se irradiaron con luz ultravioleta y negra durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente las laminillas fueron colocadas en una caja coplin con solución citrato salina 2XSSC a 57 °C colocada en un baño de agua, durante 20 min, para finalmente lavar las preparaciones con agua corriente y teñirlas con una solución Giemsa (1:10 en agua) durante 5 min y observarlas al microscopio.

5.4 EVALUACIÓN

5.4.1 Índice mitótico

Para calcular el índice mitótico (IM) se revisaron 4000 células al azar por ratón y se utilizó la siguiente formula (Rojas y col. 1992).

$$IM = \frac{\text{Número de células en metafase}}{\text{Número de células totales}} \times 100$$

Para calcular el porcentaje de inhibición del índice mitótico (IM) se utilizó la siguiente formula.

$$\%I-IM = 1 - \left(\frac{IM \text{ del grupo observado}}{IM \text{ del grupo control}} \right) \times 100$$



5.4.2 Tiempo de proliferación celular

Se observaron 100 células en metafase, por ratón, al azar y se cuantificaron, las células en primera, segunda, tercera división (Figura 10, 11 y 12). A partir de estos datos se obtuvo el tiempo de proliferación celular (TPC) siguiendo el método propuesto por Tice e Ivette 1982. También se determinó la cinética de proliferación celular.

$$\text{TPC} = \frac{24 \text{ HORAS}}{1(\text{cel. } 1^{\circ}) + 2(\text{cel. } 2^{\circ}) + 3(\text{cel. } 3^{\circ})} \times 100$$

5.4.3 Intercambio de cromátidas hermanas

Se observaron 60 metafases en segundo ciclo de división por ratón y se cuantificó el número y tipo de ICH de acuerdo a la siguiente clasificación Carrano y Natajara 1988:



- a) Cromosoma de segundo ciclo sin ICH (Incorporación de BrdU por dos ciclos completos)
- b) Cromosoma con un rompimiento = 1, ICH
- c) Cromosoma con dos rompimientos = 2, ICH
- d) Cromosoma con tres rompimientos = 3, ICH
- e) Cromosoma con un rompimiento = 1, ICH
- f) Posible artefacto de la tinción. no hav

Figura 9. Cuantificación de los ICH en metafases de segundo ciclo de replicación (Álvarez 1992).





Figura 10. Fotografía de células en metafase en primer ciclo de división.

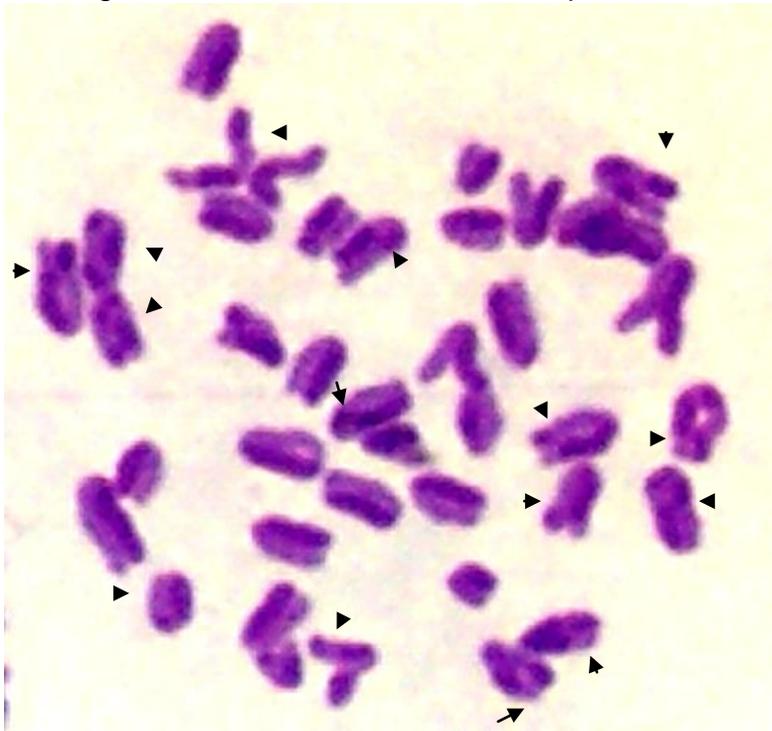


Figura 11 Fotografía de células en metafase en segundo ciclo de división las flechas señalan intercambios.

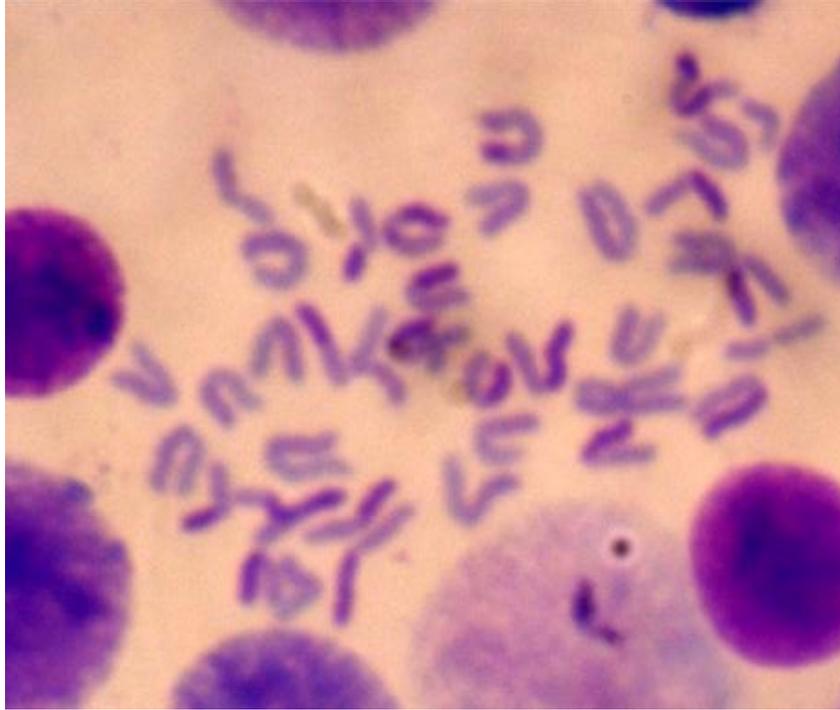


Figura 12. Fotografía de células en metafase en tercer ciclo de división.

5.4.4 Análisis estadístico

Para la evaluación estadística de los datos experimentales, se realizó, una prueba estadística Z de diferencia de proporciones para los datos de IM (Spiegel 1969; Marques 1988). Para los datos de CPC se utilizaron las proporciones de células en primera, segunda y tercera división, a partir de ellos se calculo la TPC y se aplicó la prueba estadística Ji cuadrada (Tice e Ivette 1982), mientras que a los datos de frecuencia de ICH se les aplicó la prueba estadística de t de Student.

5.5 Diagrama del método

Tratamiento con cas III-Ea

1) Se trató con la casiopeína III-Ea vía ip

2) Se administró BrdU + carbón activado.



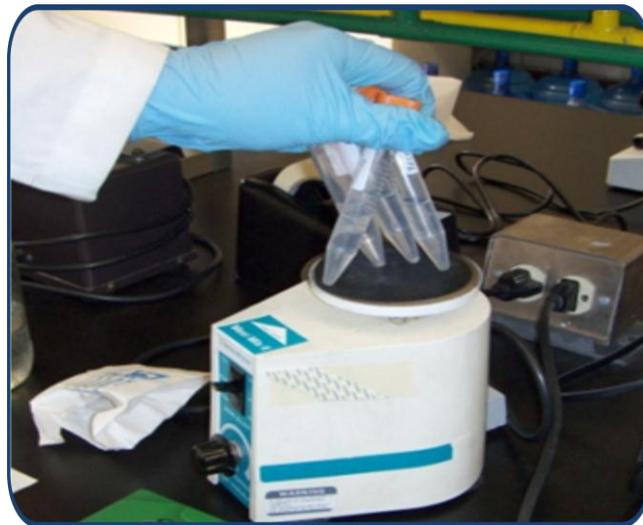
4) Se sacrificó el ratón y se obtuvo la médula ósea.

3) Se inyectó colchicina

5.5.2 Obtención de laminillas

5) Se dejó reposar el botón celular en KCl.

6) Se fijó el botón celular con metanol ac. Acético 3:1.



7) Se goteó las laminillas.

5.5.2 Tinción diferencial

9) Se realizó la tinción con solución Hoechst.

10) Se irradió las laminillas con luz U.V. y negra sumergidas en sol. citrato salina



12) Se tiñó con solución Giemsa.

11) Se sumergió las láminas en sol. Citrato salina y se colocaron en un baño de agua.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



La variedad de funciones de los iones metálicos en la biología han estimulado la creación de nuevas metalodrogas, que tienen como objetivo actuar como una vía alternativa con un mecanismo diferente de acción. Actualmente, se investigan compuestos a base de cobre, con la premisa de que son metales endógenos que pueden ser menos tóxicos (Serment y col. 2011).

En este trabajo, se evaluó el efecto genotóxico y citostático de la casiopeína III-Ea utilizando como sistema de prueba el intercambio de cromátidas hermanas, en células de la médula ósea de ratón CD-1 tratadas con diferentes dosis $1/8$, $1/4$ y $1/2$ de la DI_{50} , durante 24 horas, una sola administración.

6.1 Índice mitótico

El índice mitótico es un marcador biológico sensible, el cual nos permite determinar si existen alteraciones en la progresión del ciclo celular (Di Saia y Cresman 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo para cada ratón al aplicar casiopeína III-Ea se muestran en el cuadro 1, donde se puede observar que el grupo testigo presentó un valor de 1.97 mientras que en los grupos tratados se encontró una disminución con los siguientes valores, 1.47, 1.78 y 1.60 para las dosis de $1/8$, $1/4$ y $1/2$ respectivamente, siendo estadísticamente significativo sólo el grupo de $1/8$.

Por otra parte también se calculó el porcentaje de inhibición del índice mitótico se siguió la referencia de Rojas 1992, tomando al grupo testigo como parámetro de referencia, de acuerdo a esto se obtuvo para la dosis de $1/8$ un valor de 25.38%, para $1/4$ 9.64% y para un $1/2$ 18.78% (cuadro II).



Cuadro II. Efecto de la casiopeína III-Ea sobre el índice mitótico (IM) de las células de médula ósea de ratón.

Tratamiento (mg/kg)	Ratón	IM %	IM % (Media ± DE)	(%) Inhibición IM
T. NEGATIVO (0)	R1	1.4369	1.97 ± 0.80	0
	R2	2.6884		
	R3	3.1686		
	R4	1.6941		
	R5	1.0066		
	R6	1.844		
1/8DI₅₀ (1.69)	R7	0.8794	1.47 ± 0.65*	25.38
	R8	2.2642		
	R9	0.7775		
	R10	1.0704		
	R11	2.1406		
	R12	1.7092		
1/4DI₅₀ (3.38)	R13	0.8266	1.78 ± 1.04	9.64
	R14	1.0068		
	R15	1.9449		
	R16	3.663		
	R17	1.2153		
	R18	2.0257		
1/2DI₅₀ (6.76)	R19	1.9991	1.60 ± 0.38	18.78
	R20	1.1826		
	R21	1.824		
	R22	1.8622		
	R23	1.0728		
	R24	1.6976		
T. POSITIVO CF (20)	R25	0.8055	1.18 ± 0.42*	40.10
	R26	1.129		
	R27	0.9628		
	R28	1.1695		
	R29	2.0036		
	R30	1.0363		

*P<0.05 con la prueba estadística de Z de diferencia de proporciones vs. Testigo negativo
n = 4000 células analizadas por ratón



En la Figura 12, se muestra el promedio de los tres tratamientos, en donde se observa la disminución de los grupos tratados con respecto al grupo testigo negativo.

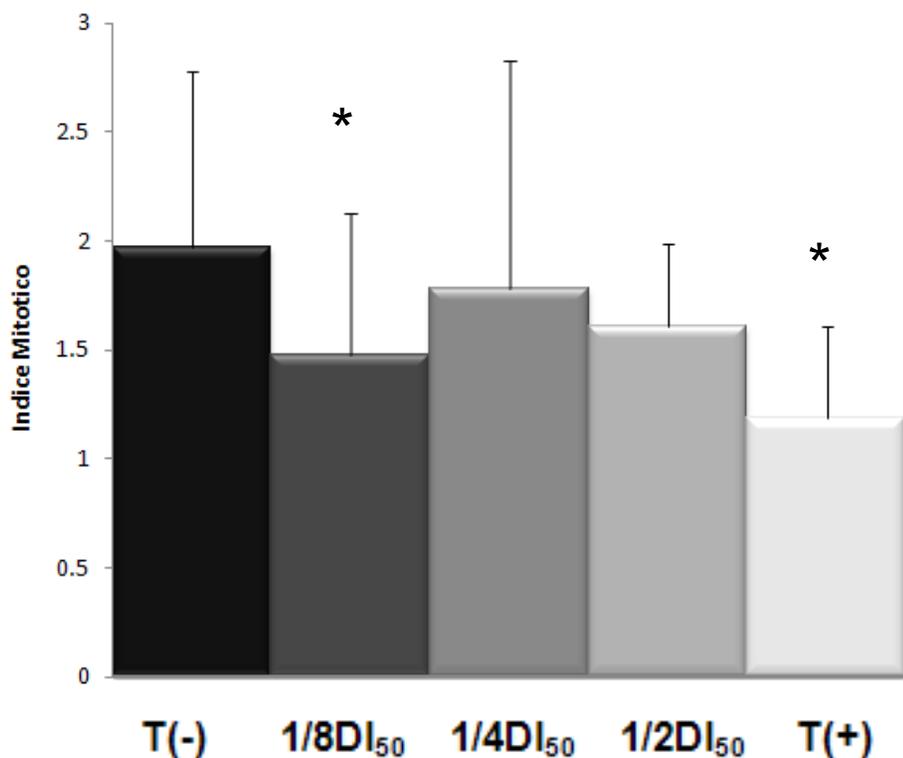


Figura 12. Efecto de la cas III-Ea sobre el índice mitótico de las células de médula ósea de ratón.

En la dosis mas baja de 1.69 mg/kg ($1/8$ DL₅₀) se observó una diferencia estadísticamente significativa, lo cual nos indica que la casiopeína en esta dosis tiene la capacidad de suprimir las funciones de la célula impidiendo su proliferación, pero sin afirmar si hubo o no, muerte celular.

La disminución del número de metafases es generalmente una consecuencia de un retraso en la mitosis por un arresto en alguna de las fases del ciclo celular o por la pérdida permanente de la capacidad de proliferación que finalmente puede conducir a la muerte celular (Scott y col. 1991, Kirkland y Müller, 2000).

La casiopeína III-Ea presenta buena actividad antineoplásica, *in vitro* en líneas tumorales humanas Hela, PC-3, HCT-15, SKLU-1, superando incluso la actividad del oxiplatino, carboplatino y cisplatino (Tovar y col. 2006, Gracia y col. 2001, Alemón y col.



2007) e *in vivo* en el modelo de Melanoma B16 en ratón (Arroyo 2009). En este trabajo el IM disminuyó en las tres dosis, como se esperaba para un agente antineoplásico, pero no se obtuvieron valores estadísticamente significativos como esperábamos. No sabemos a que se deba esto, pero probablemente pueda ser porque las células que utilizamos en este trabajo sean de médula ósea de ratones sanos.

Lo anterior lo proponemos en base a lo que postula Serment y colaboradores en el 2011 en su trabajo sobre citotoxicidad de las Casiopeínas, donde evaluaron la viabilidad, en células Hela y linfocitos de donadores sanos y encontraron mayor sensibilidad en la línea tumoral. Por lo tanto proponen que las casiopeínas no son específicas para las células tumorales como la mayoría de los quimioterapéuticos pero, producen un efecto más drástico en las células tumorales, debido tal vez a la diferencia de las características bioquímica de las células normales y de las células cancerígenas.

Algunos ejemplos de las características que diferencian a las células tumorales, de las células normales es que proliferan más rápidamente, tienden a incrementar sus niveles de estrés oxidativo y existe evidencia de que por lo tanto son más vulnerables a los niveles elevados de EROS (Nicco y col. 2005, Leitner y col. 2007). Los complejos de cobre de las casiopeínas podrían probablemente contribuir a intensificar el desequilibrio redox por activación del H_2O_2 que lleva al daño celular y en consecuencia a muerte celular por apoptosis y otros mecanismos (Schumaker 2006).

Lo mencionado anteriormente también coincide con otro estudio realizado con Cas II gly (Rodríguez y col. 2006) *in vitro* donde se evaluó el crecimiento celular en líneas Hela y As-30D sus resultados demostraron valores inferiores de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) en las células tumorales, mientras en los linfocitos este parámetro no se vio afectado por estos medicamentos.

Este es el primer trabajo *in vivo* donde se evaluó el índice mitótico, por lo tanto no tenemos referencias con que comparar los



resultados obtenidos. Sin embargo un parámetro relacionado es el de la viabilidad celular, que indica si la célula esta viva o no.

Camargo en el año 2011 evaluó la viabilidad con el método de Strauss 1991, en células de ratón con tratamientos largos de 15, 30 y 45 días con las dosis de $1/8$ y $1/32$ DI_{50} y obtuvo como resultado una disminución del porcentaje de células vivas en algunos casos hasta por debajo del 50% en hígado, pulmón riñón, sangre, médula ósea y testículo de los animales tratados. Tal vez en tratamientos más largos también se afecte el IM de los animales tratados.

6.2 Tiempo de proliferación celular

Cuando se analiza el efecto de un compuesto químico se puede evaluar su acción sobre la proliferación celular, ya que aunque un blanco principal de muchos clastógenos es el ADN, esta evaluación puede ser un reflejo importante del daño que están provocando las sustancias (Brewen y Stetka, 1982).

En este trabajo se contó el número de células que se encontraban en primer, segundo y tercer ciclo de división (Figura 10, 11 y 12), los resultados obtenidos en los grupos tratados para el tiempo de proliferación celular fueron de 11.48, 11.63 y 10.89 horas respectivamente, para las dosis de $1/8$, $1/4$ y $1/2$ con un incremento estadísticamente significativo solo en el grupo de $1/4$ comparado con el tiempo del grupo testigo negativo 11.00 horas (cuadro III).

El TPC se incrementó solo en las dosis más bajas, pero no se obtuvieron valores significativos como se esperaba, comportamiento que si presento el compuesto empleado como testigo positivo (ciclofosfamida), ya que una de las características principales de los agentes antineoplásicos es impedir el desarrollo y proliferación de las células, con lo cual se tenía la expectativa de un mayor incremento de este parámetro con un menor numero de células en tercer ciclo de división (cinética de proliferación celular).



Cuadro III. Efecto de la casiopeína III-Ea sobre la cinética de proliferación celular (CPC) y el tiempo de proliferación celular (TPC) de la médula ósea de ratón.

Tratamiento (mg/kg)	Ratón	CPC %				TPC (HORAS)	Media \pm DE
		n	M1	M2	M3		
T. NEGATIVO (0)	R1	112	26.78	54.46	18.74	11.1627	11.00 \pm 0.73
	R2	104	27.1	42.98	29.9	11.05	
	R3	104	24.16	43.33	32.49	9.6	
	R4	107	19.81	55.66	24.52	11.05	
	R5	120	18.26	66.34	15.38	11.7073	
	R6	106	18.26	62.49	19.23	11.4832	
1/8DI₅₀ (1.69)	R7	105	23.8	53.32	22.85	11.4832	11.48 \pm 0.69
	R8	102	34.31	48.03	17.64	12.3711	
	R9	108	22.42	61.67	15.88	11.59	
	R10	107	15.74	68.51	15.74	11.8811	
	R11	103	17.11	55.85	27.02	10.3004	
	R12	111	22.32	48.54	29.12	11.26	
1/4DI₅₀ (3.38)	R13	110	35.45	59.08	5.45	12.8342	11.63 \pm 1.51*
	R14	101	20.79	62.37	16.83	12.1212	
	R15	104	22.11	63.45	14.42	12	
	R16	131	17.92	66.03	16.03	11.42	
	R17	106	28	55	17	12.69	
	R18	100	19.08	51.9	29	8.72	
1/2DI₅₀ (6.76)	R19	131	16.36	55.44	28.17	10.3	10.89 \pm 0.99
	R20	109	17.55	71.75	10.68	9.4861	
	R21	105	23.89	49.55	26.54	10.48	
	R22	110	27.52	55.96	16.51	11.65	
	R23	113	15.23	65.71	19.04	11.21	
	R24	105	39.04	35.23	25.71	12.24	
T. POSITIVO CF (20)	R25	102	22.42	71.96	5.6	12.2448	13.93 \pm 1.50*
	R26	101	21.78	71.28	6.93	12.8342	
	R27	103	35.92	46.6	17.47	12.8342	
	R28	101	55.33	39.8	4.85	15.5844	
	R29	103	50	37.25	12.74	14.45	
	R30	107	61.38	25.74	12.87	15.68	

*P<0.05 con la prueba de ji cuadrada (χ^2) (diferencia de varianzas) vs. Testigo negativo

n = Número de células en metafase analizadas por ratón

M1= Metafases en primer ciclo de división

M2= Metafases en segundo ciclo de división

M3= Metafases en tercer ciclo de división



La Figura 13 se muestra los promedios obtenidos con este tratamiento.

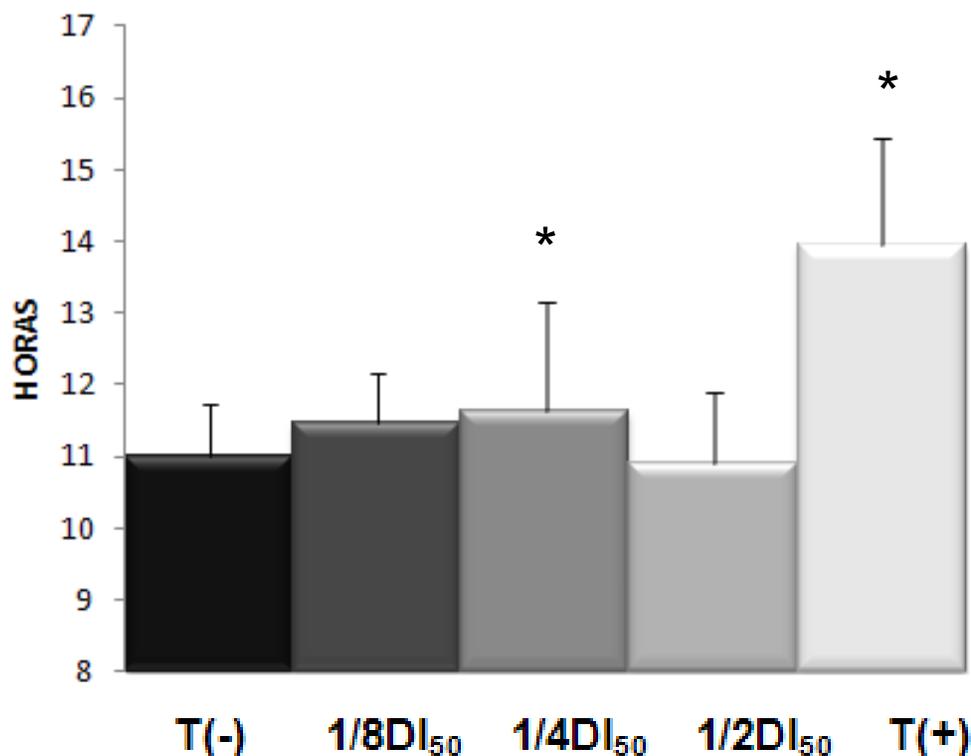


Figura 13. Efecto de la cas III-Ea sobre el tiempo de proliferación celular de la médula ósea de ratón.

El análisis del TPC junto con el análisis del IM nos indica si hubo daño en las proliferación celular ocasionado por el tratamiento, esto esta relacionado con el número de metafases tal vez detenidas en algún punto de su ciclo de división, sin embargo en este trabajo ninguno de estos parámetros fue drásticamente modificado como era esperado. Probablemente esto pueda ser explicado con el párrafo donde comentamos el trabajo de Serment y col. 2011, que esto podía deberse a las diferencias fisiológicas entre las células sanas y las transformadas (Sánchez y col. 2006).



6.3 Intercambio de cromátidas hermanas

Dentro de los indicadores de daño a nivel cromosómico se encuentran los ICH, los cuales son considerados como un parámetro altamente sensible para detectar alteraciones en el ADN (EPA 2011).

Los ICH son la expresión citogenética de eventos de recombinación homóloga, que se producen por lesiones en el ADN no reparadas, antes de la replicación, que son producidos por agentes mutágenos y carcinógenos (Rodríguez y Morales 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo de la frecuencia de ICH en los animales tratados vía i.p. con Cas III-Ea durante 24 horas (Figura 11), fueron de 2.70 ICH/cel para $1/8$, 2.58 para $1/4$ y 3.40 para $1/2$, con un incremento estadístico en la dosis de $1/2$ con respecto al grupo testigo (cuadro IV).

En la dosis mas alta de 6.76 mg/kg ($1/2$ DI_{50}) se observó una diferencia estadísticamente significativa, lo cual nos indica que la casiopeína en esta dosis es genotóxica; sin embargo, la inducción del daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varios pasos.

Las sustancias genotóxicas son aquellas que afectan la estructura del ADN, pudiendo unirse directamente o indirectamente con él, afectando enzimas que se involucran en sus procesos de replicación, recombinación y/o reparación (University 2011), se ha demostrado que diferentes agentes antineoplásicos con diferentes modos de acción son capaces de inducir ICH, algunos ejemplos son la mitomicina C (MMC), metilmetano sulfonato (MMS), etilmetano sulfonato (EMS) y la ciclofosfamida (Morales 1980).



Cuadro IV. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH) por célula, inducidos con casiopeína III-Ea en médula ósea de ratón.

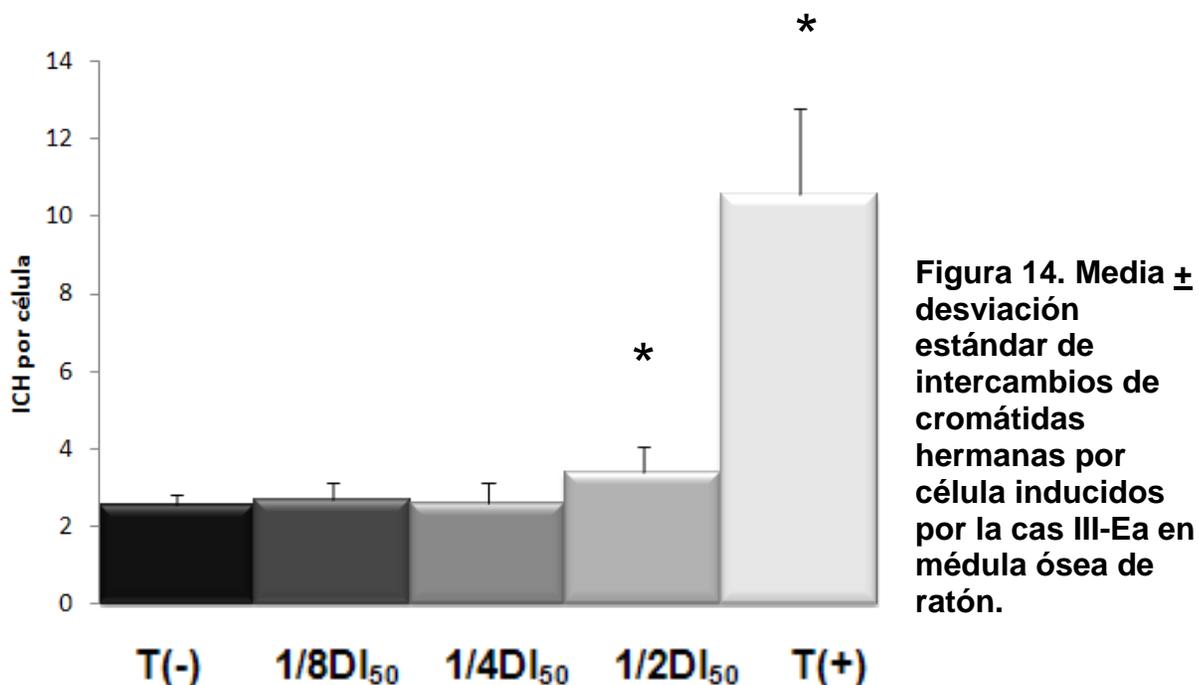
Tratamiento (mg/kg)	Ratón	ICH Totales	ICH/cel	ICH/cel Media \pm DE	Incremento
T. NEGATIVO (0)	R1	151	2.5166	2.54 \pm 0.28	0
	R2	141	2.35		
	R3	135	2.25		
	R4	141	2.35		
	R5	175	2.9166		
	R6	173	2.8833		
1/8DI₅₀ (1.69)	R7	149	2.4833	2.70 \pm 0.42	0.16
	R8	200	3.3333		
	R9	134	2.23		
	R10	166	2.7666		
	R11	182	3.0333		
	R12	142	2.36		
1/4DI₅₀ (3.38)	R13	149	2.4833	2.58 \pm 0.56	0.04
	R14	130	2.1666		
	R15	158	2.6333		
	R16	123	2.05		
	R17	218	3.6333		
	R18	154	2.56		
1/2DI₅₀ (6.76)	R19	215	3.58	3.40 \pm 0.66*	0.86
	R20	254	4.2333		
	R21	112	2.66		
	R22	226	3.7666		
	R23	220	3.6666		
	R24	152	2.53		
T. POSITIVO CF (20)	R25	722	12.0333	10.55 \pm 2.22*	8.01
	R26	647	10.7833		
	R27	605	10.0833		
	R28	836	13.95		
	R29	488	8.13		
	R30	500	8.33		

*P<0.05 con la prueba estadística de t de Student (diferencia de medias) vs. Testigo negativo

n = 60 células analizadas por ratón



En la figura 14 se muestra la media de los intercambios por célula.



Al realizar un análisis de los ICH totales presentados en el cuadro 3 se puede apreciar un incremento de hasta 100 intercambios por individuo, lo cual nos indica una clara diferencia entre los datos del grupo testigo y los del grupo tratado con la dosis de 6.76 mg/kg.

Existe evidencias de que los ICH se llevan a cabo durante la síntesis del ADN, en la horquilla de replicación o en lugar próximo a ella. Otros datos sugieren que son causados por lesiones múltiples, no habiendo por lo tanto relación topográfica entre el sitio donde ocurre el ICH y alguna lesión en particular (Cruz 1996).

Sin embargo aún existe controversia acerca de cuál es el daño responsable de inducir los Intercambios de Cromátidas hermanas. Ishii y Bender en 1980 propusieron que los enlaces entre el ADN y las proteínas eran los más probables en la inducción de ICH. Oikawa y col. 1980 atribuyen su formación a la inhibición de enzimas involucradas en el proceso de reparación. Otros autores



propusieron que los enlaces cruzados son el tipo de lesión más eficiente para producir ICH (Kano y Fujiwara 1981, Cassel y Latt 1980).

En estudios anteriores realizados con la Cas III-Ea ya se ha encontrado que presenta una interacción con el ADN con la prueba de electroforesis unicelular en gel en células Hela (Serment y col. 2011), en linfocitos humanos (Alemón y col. 2007) y en varios tejidos de ratón (Camargo 2011), por lo tanto se sabe que la Casiopeina III- Ea induce daño genotóxico.

Un posible mecanismo de acción para las casiopeínas propuesto por Bravo y col. 2009 es através de la producción de EROS durante la reducción del cobre (Rivero y col. 2007).



7. CONCLUSIONES



- En este trabajo en la dosis mas baja de 1.69 mg/kg ($1/8$ DI₅₀) se observó una disminución estadísticamente significativa en el IM, lo cual nos indica que la casiopeína III-Ea en esta dosis tiene la capacidad de suprimir las funciones de la célula impidiendo su proliferación, por un arresto en alguna de las fases del ciclo celular que finalmente puede conducir a la muerte de la célula.
- Por otra parte la casiopeína III-Ea también fue capaz de incrementar el TPC solo en las dosis más bajas pero no se obtuvieron valores significativos como se esperaba para un agente antineoplásico. Lo anterior probablemente pueda ser por la distribución y la farmacocinética del compuesto en las células de médula ósea de ratón.
- La frecuencia de ICH por célula se incremento significativamente solo en la dosis mas alta de 6.76 mg/kg ($1/2$ DI₅₀), lo cual nos indica que la casiopeína III-Ea en esta dosis es genotóxica.



8. REFERENCIAS



- Altamirano, B.A., (1994). Manual de manejo de animales de laboratorio. México, Fes Zaragoza. UNAM.
- Andress, J. M., Frith, C. H., Goodman, D. G., Boysen, B. G., Cook, C. S., (1992). The mouse. En: Cox G.S. y Chengelis, C.P. (Eds.). *Animal Models in Toxicology*. Nueva York. Marcel Dekker: 165-294.
- Albertini, R.D., Anderson, D., Douglas, G., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natajaran, A., Norppa, H., Shuker, D., Tice, R., Waters, M., Antero, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, 463: 111-172.
- Alemón, M.R., Breña, V. M., Muñoz, S.J.L., Gracia, M.I., Ruiz, A. L., (2007). Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopéinas). *México, D.F. UNAM*. 60:219-228.
- Allen, J. y Latt S., (1976). *In vivo* BrdU-33258 Hoechst analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchange formation in mouse somatic and meiotic cells. *Chromosoma*. 58:325-340.
- Allen, J., Shuler C., Mendes R. y Lati S., (1977). A simplified technique for *in vivo* analysis of sister-chromatid exchanges using S-Bromodeoxyuridine tablets. *Cytogenetic No. 18 Cell Genetic*: 231-237.
- Álvarez, B.L., (1992). Efecto del pentóxido de vanadio sobre la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en médula ósea de ratón. Tesis de licenciatura, México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Arroyo, A.A., (2009). Toxicidad aguda y evaluación antineoplásica *in vivo* de la Casiopéina III-Ea en modelos murinos. Tesis de licenciatura, México. Facultad de Química, UNAM.
- Bravo, G.M.E., García, R.J.C., Gracia, M.I., Ruiz, A.L., (2009). Antiproliferative activity and QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu (N-N)(acetilacetato)]NO₃ and [Cu(N-N)glicinato]NO₃ complexes, (casiopéinas). *Journal of Organic biochemistry*: 2999-3009.
- Brewen, J.G. y Stetka, D.G., (1982). Cytogenic events *in vivo*, en: *Mutagenicity new horizons in genetic toxicology*, cap.13, Academic Press, Nueva York.
- Cai, X., Pan, N., Zou, G., (2007). Copper 1-10 phenantroline-induced apoptosis in liver carcinoma Bel-7402 cells associates with copper overload, reactive oxygen species production, glutathione depletion and oxidative DNA damage. *Biometals*. 20: 1-11.
- Carvallo, C.F., Trejo, S.C., Gómez, R.C., Rodríguez, A.E., Macías, R.L., Cortés, B.E., Cedillo, P.C., Gracia, M.I., Ruiz, A.L., Madrid, M.V., Constantino, C.F., (2008). Casiopéina III-ia induce apoptosis in HCT-15 cells *in vitro* through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect *in vivo*. *Biometals*:17-28.
- Camargo, S.A.O., García, Z.P., Altamirano, B.A., Hernández, M.R. y Altamirano, L.A., (2009). Efectos de la casiopéina III-Ea en el desarrollo embriológico y fetal en ratón. Congreso nacional de Genética. Unidad. Xalapa, Veracruz.



- Camargo, S.A.O., (2011). Evaluación del daño genotóxico provocado por la Cas III-Ea y efecto en varios órganos de ratón macho Cepa CD-1. Tesis de licenciatura, México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Carrano, A. V., Natajara, A.T., (1988) Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research*: 379-406.
- Cassel, D.M., Latt S.A., (1980) Relationship between DNA adduct formation and sister chromatid exchange induction by [³H]8-methoxypsoralen in Chinese hamster ovary cells. *Experimental cell research*, 128: 15-22.
- Charles, J.L., D.J. Kram, J.F. Borzelleca and R.A. Carchman (1983). The kinetics of in vivo sister chromatid exchange induction in mouse bone marrow cells by alkylating agents: cyclophosphamide. *Environ. Mutagen.*, 5: 825-834.
- Cleaver J.E. (1981). Correlation between sister chromatid Exchange frequencies and replicon size. *Experimental cell research*. 135:27-30.
- Cruz, V.V.L., (1996) Estudio *in vivo* sobre la validez del modelo replicativo de reproducción de intercambios de cromátidas hermanas. Tesis de maestría, México. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Degraeve, N., (1978) Genetic and related effects of Vinca Rosea alkaloids. Belgica. Universite de Liege *Mutation research*: 31-42.
- Di Saia, P.J. y Creasman, W.T., (2002). "Principios básicos de la quimioterapia oncológica, ginecología clínica". 6° Ed. Madrid España.
- Dyban, A. P., Punchkov, V. F., Samoshkina, N. A., Khozhai, L. I., Chebotar, N. A. y Baranov, V. S., (1991). Laboratory mammals: mouse (*Mus musculus*), rat (*Rattus norvegicus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and golden hamster (*Crisetus auratus*). En: Dettlaff, T. A. y Vassetzky, S. G. Eds. *Animal species for development studies. Vertebrates. EUA.* 2:353-437.
- Ehling, R.H., (1976). Mutagenicity testing and risk estimation with mammals, Vol.4 *Mutation research*:113-122.
- EPA (Environmental Protection Agency) Enero de 2011. Revisado el 12 de Enero de 2011 en: <http://www.epa.gov/lawsregs/>.
- Fawcett D. W., (1978), Tratado de histología, Interamericana Mc. Graw Hill: 995.
- FAO, Food and Agriculture Organization (2012). Glosario de la gestión integrada de los nutrientes, (02/2012) URL http://www.fao.org/ag/agp/ipns/index_es.jsp?term=c410&letter=c
- Felipe, R.M., (2011). Valoración de la toxicidad del acetato de talio (CH₃COOTl) in vitro mediante tinción diferencial de cromátidas hermanas. Tesis de licenciatura, México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Flood, G.J., Bravo, M.E., Ruiz, A.I., (2006). Síntesis y evaluación biológica in vitro de compuestos de coordinación [Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO₃ (casiopeínas) en diferentes líneas tumorales humanas. En: 2° Congreso Nacional de Química Médica. México D.F.



- García, O.L., (2007). Estudio de los efectos tóxicos agudos de las Casiopeinas III-ia y II gly en perros Tesis de maestría, México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- García, Z.P.B., (2011). Toxicología reproductiva inducida por la Casiopeina III-Ea en ratón macho de la cepa CD-1. Tesis de licenciatura, México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Goodman y Gilman., (2005). Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª Edición. Mc Graw Hill Interamericana, México: 1302-1309.
- Gracia, M.I., Ruiz, R.L., Gómez, R.C., Tinoco, M. M., Marquez, Quifiones A., Romero De Lira, L., Marín, H. A., Madas, R.L., Bravo, G.M.E., (2001) .Knigth's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeinas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel. México, D.F.: National Cancer Institute. Facultad de Química UNAM: 19-28.
- Ishii, Y. y Bender, M.A., (1980). Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells. Mutation Research. 79:19-32.
- Infogen, (2011). Médula ósea. [en línea] [Fecha de acceso] (09/2011) URL <http://www.infogen.org.mx>
- Kachadourian, R., Brechbuih, H.M., Ruiz, A.L., Gracia, M.I., Day, B.J., (2010) Casiopeina II gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cáncer A549 and H157 cells. Toxicology in vitro: 176-183.
- Kano, Y. y Fujiwara Y., (1981). Roles of DNA interstrand crosslinking and its repair in the induction of sister-chromatid Exchange and a high induction in Fanconi's anemia cells. Mutation Research. 81:365-375.
- Kato. (1977) Mechanism for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. Chromosoma. 59:179-191.
- Kato. (1980) Evidence that the replication point is the of sister chromatid exchange and repair following treatments with crosslinking agents. Mutation Research. 2.:69-77.
- Kirkland, D. y Müller L., (2000). Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. Mutation Research: 137-147.
- Krishna, G., Nath, J., Soler, L., Ong, T., (1986). Comparative in vivo and in vitro genotoxicity studies of airborne particles in mice. Mutation Research: 81-87.
- Lane, L. L., (1999).Farmacología En Enfermería. 2ª edición. Elsevier, España: 649-655.
- Lane, W. P., (1976). The laboratory mouse. En: Handbook of the care and management of laboratory animals. 5ª edicion EUA: Universities Federation for Animal Welfare UFAW.
- Latt, A., (1973).Microfluorometric detection of desoxiribonucleic acid replication in human metaphase chromosomis. No. 70. Proceedings of the National Academy of Sciences.70:3395-3399.



- Leitner, H.M., Kachadourian, R., Day, B.J., (2007). Harnessing drug resistance. Using ABC transporter proteins to target cancer cells. *Biochemistry Pharmacology*.: 1677-1685.
- McClintock, B., (1938). The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics*. 23:315-376.
- Marques, M.J.,(1988). Probabilidad y estadística para ciencias químico biológicas. México. Editorial UNAM.
- Márquez, A., Romero, L., Marín A., (2002).Evaluación antineoplásica in vitro de nuevos fármacos Casiopeinas empleando líneas tumorales humanas y murinas. 4a Jornada de trabajo de casiopeinas. México, D.F.
- Mejia, C., Ruiz, A. L., (2008). Casiopeinas II-gly and III-ia induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Pathol. Oncol*: 467-472.
- Morales R.P. (1980) Analysis in vivo of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. *Mutation research*. 74:61-69.
- Morales, R.P., Vallarino, K.T. y Rodriguez, R.R., (1984).Detection of SCE in rodent cells using the activated charcoal bromodeoxy uridine system en: *Sister chromatid exchanges*, Ed. Tice R.R. y Hollaender A. Plenum Publishing Corporation.
- Morales, R.P., Rodriguez, R.R., Vallarino K. T., (1995). Fate of lesions that elicit sister chromatid exchanges (FLE-SCE) produced in DNA by alkylating agents in vivo. *Mutation research*, 344:13-26.
- Moutschen J., (1985), *Introduction to genetic Toxicology*, John Wiley y Sons., Nueva York.
- NetDrugs, Medicamentos., (2011). Coclofosfamida. [en línea] [Fecha de acceso] (09/2011) URL <http://www.netdrugs.info/index.shtml>
- Nicco, C., Laurent, A., Chereau, C., Weill, B., Batteux, F., (2005). Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomed central, Pharmacother*: 169-174.
- NRC, National Research Council. (1992). *Biologic markers in immunotoxicity*. The national academies press. Washington, D.C.: 9-22.
- Olenson, B.F., (1990). Overview of *in vivo* mammalian testing systems. *Mutation and the Environment*, pp. 171-184
- O.M.S. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Julio de 2008. Revisado el 12 de Febrero de 2011 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.
- Oikawa, A., Thoda, H., Kanai, M., Miwa, M. Sugimura, T., (1980). Inhibitors of poly, adenosine, diphosphate ribose, polymerase induce sister chromatid exchanges. *Biochemistry Biophysical. Research*: 1311-1316.
- Painter, R.B. (1982). Replication model for sister chromatid exchanges . Ed. *Progress and topics in Cytogenetics Sister Chromatid Exchange*. Nueva York. 2:67-97.
- Perry, P. y Wolffs., (1974). A new giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 251: 156-158.



- Pierce, B.A., (2005) .Genética. Un enfoque conceptual, 3ª edición. Ed. Médica Panamericana : 627.
- Qin S. y Huang C.C., (1984).A new method for sister chromatid exchange studies in vivo, a single injection of BrdU in melted agar. *Mutation Research*. 141:189-193.
- Rivera, H. M., Rovira, I. A., Gracia , M. I., Tinoco, M. M., Sumano, L. H., Macías, R. L. y Ruiz, A. L., (1998). Determinación de dosis letal 50 aguda (DL50) de la Casiopeína III y V en rata y ratón por vía intravenosa e intraperitoneal y búsqueda de terapia adyuvante. En: 3ª jornada de trabajo en casiopeínas. México: 32-35.
- Rivero, M.A., De Vizcaya, R.A., Planc, N., Ruiz, L., Dobrota, M., (2007). Mixed chelate copper complex, casiopeina II-gly, binds and degrades nucleic acids: a mechanism of cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact*. 165:189-199.
- Rodríguez, A.R., (1995).Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. México, D.F.: Subsecretaría de educación superior e investigación científica de la SEP y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
- Rodriguez, E.S., Vital, G.P.A., Flores, R.F.L., Marin, H.A., Ruiz, A.L., Moreno, S.R., (2006) Control of celular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast growing tumor cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*: 208-217.
- Rodriguez, R.R. y Morales, R.P., (2011). The in vivo induction of sister chromatid exchange by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mutagenesis*. 26:551-554.
- Ruiz, A.L. United States Patent 1992, vol. RE35458.
- Ruiz, A.L. United States Patent 1996, vol. 5576326.
- Ruiz, A. L., Gracia, L., de la Rosa M.E., Sumano, H., Gómez C., Arenas F., Gómez E., Pimentel E., y Cruces M., (1993). Citostatic, Mutagenic, antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) new drugs: casiopeinas I, II, and III. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 51:406.
- Salmon, S., Sartorelli, A., (1998).Quimioterapia del cáncer. En: Katzung B. *Farmacología básica y clínica*. 7 ed. México DF: El Manual Moderno: 1015-1017
- Sánchez, B. F., Gracia, M. I., Roldan, R. E., Ruiz, A.L., (2006). .Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las casiopeína Igly, IIgly y III-ia en linfocitos humanos en cultivo, médula ósea y linfocitos de sangre periférica de ratón. 2º Congreso Nacional de Química Médica. México, D.F.
- Schavartzman, J.B., Gutierrez, C., (1980).The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of damaging treatment in provoking the formation of sister chromatid exchanges. *Mutation Research*: 483-489.
- Schneider, E., Chaillet, J., Ticer, R., (1976). In vivo BrdU labeling of mammalian chromosomes. *Exp. Cell Research*. 100:396-399.
- Schumacker, P.T., (2006).Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer cell*. 10: 175-176.



- Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R. Ishidate M Jr, Brusick D, Ashby J, Myhr BC. (1991). Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, 257: 147--204.
- Serment, G.J., Cano, S.P., Reyes, P.E., Velazquez, G.F., Bravo, G.M.E., Ruiz, A.L., (2011) Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeínas. No.25 *Toxicology in vitro*. 25:868-873.
- Sozzi, G., T.A. Dragani, M. Presutti, G.D. Porta, (1985). Kinetics of sister-chromatid exchange induction by different carcinogens in C57BK/GJ and DBA/2 mice, *Mutation research.*, 156, 177-180.
- Spiegel, M.R., (1969). *Teoría y Problemas de Estadística*. Ed. Mc. Graw Hill, Colombia.
- Starling, D., (1976). Two ultrastructurally distinct tubulin paracrystals induced in sea-urchin eggs by vinblastine sulphate: 79–89.
- Strauus, G.H.S., (1991). Non random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte test (BLT). Toxic and immunotoxic effects. *Mutation research*. 252:1-15.
- Tardito, S., Marchio, L., (2009). Copper compounds in anticancer strategies. *Current Medicinal Chemistry*:1325-1348.
- Taylor, H., Woods, P.S. y Hughes, W.L., (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium- labeled thymidine. No. 43 EUA. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*: 122-128
- Tice, R., Chaillet, J. y Schneider, E.L., (1976). Demonstration of sister chromatid of sister chromatid exchanges in vivo. *Exp. Cell Research.*: 426-429.
- Tice, R.P. e Ivett, J.L., (1982). Average Generation Time: A new method of analysis and quantitation of cellular Proliferation Kinetics. *Environmental Mutagen*: pp. 358.
- Tovar, H.S., Gracia, M.I., Ruiz, A.L., (2006). Evaluación antineoplásica de dos compuestos de coordinación mediante el empleo de modelos in vitro. En: 2º Congreso Nacional de Química Médica. México D.F.
- Tovar, A. y Ruiz, A.L., (2006). Estudio estructural y electrónico de una serie de complejos metálicos de Cu(II) casiopeínas con actividad antineoplásica. 2º Congreso Nacional de Química Médica. Mexico, D.F. Facultad de Química. UNAM.
- Trejo, S.C., Palencia, G., Zuñiga, S., Rodriguez, R. A., Osorio R. L., Sanchez, T.L., Gracia, M.I., Marquez, R.L., Sanchez, A., Moreno, G.M.E., Cruz, A., Bravo, G.M.E., Ruiz, R.L., Rodriguez, E.S., Sotelo, J., (2005). Cas Ilgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia*: 563-574.
- Tucker, J.D., Auletta a Cimno M.C. Dearfiled K. L. Jacobson Kram D., Tice R.R., Carrano A. V., (1993). Sister chromatid exchange. Second report of the Genotox Program. *Mutation research*. 297:101-180.
- Tucker, J.D. y Preston, J.R., (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation research*: 365:147-159.



- University, E. (Enero 2011). Cancer quest. De: <http://www.cancerquest.org/index.cfm?lang=spanish&page=482> .
- Uribe, L., (2010). Estudio de la muerte celular y daño genotóxico inducidos in vitro por un nuevo compuesto de cobre casiopeína I gly. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Vizcaya, R.A., Rivero, M. A., Ruiz, R. L., Howarth, J. A. y Dobrota, M., (2003). Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeína II. Toxicology in vitro: 103-113.



9. ANEXOS



El presente trabajo fue presentado de manera parcial en el Congreso Nacional de Genética 2011, celebrado del 28 al 30 de Septiembre en Cholula Puebla, con el título: EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO (INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS, ICH) DE LA CASIOPEÍNA III-Ea *in vivo*

SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA
UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

CONGRESO NACIONAL

Genética
2011
CHOLULA, PUEBLA

A 50 años
DEL Poli-Uracilo
Y EL Operón lac

Del 28 al 30 de septiembre del 2011
en Ex hacienda Sta. Catarina Mártir
CP 72810 Cholula, Puebla, México

UDLAP

SMG
VelaQuin
Accesolab
SALVADOR FOTOGRAFÍA



C-052 EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO (INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS, ICH) DE LA CASIOPEÍNA III-Ea *in vivo*

López-Chaparro M, Álvarez-Barrera L*, Rodríguez-Mercado JJ, Mateos-Nava RA, Altamirano-Lozano M.

Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Laboratorio de Teratogénesis. UMIE de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. Campus II.

*E-mail: alvarezbarreralucila@gmail.com

Las Casiopeínas son una serie de compuestos químicos con centro de cobre (II), que se sintetizaron y patentaron en México por investigadores de la Facultad de Química de la UNAM con la finalidad de ser empleados en la terapia del cáncer. En particular la Casiopeína III-Ea ha presentado actividad antineoplásica en estudios *in vitro* e *in vivo*, lo que genera buenas expectativas para que sea empleada en la medicina. Cabe mencionar que todos los fármacos de nueva creación deben de ser evaluados con diversas pruebas como está especificado por las diferentes agencias internacionales, para que posteriormente puedan ser utilizados. Por lo que en este trabajo se evaluó el efecto citostático y genotóxico de la Casiopeína III-Ea en células de la médula ósea de ratones machos de la cepa CD1, utilizando el ensayo de Intercambios de Cromátidas Hermanas. Se trabajo con cinco grupos de seis ratones a los cuales se les administró vía i.p. una de las siguientes dosis 1.69, 3.38, y 6.76 mg/Kg de peso corporal, que corresponden a $1/8$, $1/4$ y $1/2$ de la LD₅₀ respectivamente, se contó además con un grupo testigo positivo y uno negativo. Los resultados obtenidos en el índice mitótico de los grupos tratados presentaron una disminución en el número de metafases comparado con el grupo testigo (1.97 ± 0.80), siendo de 1.47 ± 0.65 para $1/8$, 1.78 ± 1.04 en $1/4$ y 1.60 ± 0.38 con $1/2$. Respecto a la frecuencia de ICH sólo en la dosis de un $1/2$ de la LD₅₀ se encontró un incremento estadísticamente significativo, por lo tanto la Casiopeína III-Ea *in vivo* en este modelo tiene efecto citostático y es potencialmente genotóxica a altas concentraciones.

Este trabajo contó con el apoyo de PAPIIT-DGAPA-UNAM IN-216809.

