



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**“EFECTO DE NUEVOS COMPUESTOS QUINOLÍNICOS
(QUINAZOLINAS MLB02 Y MLB13) SOBRE EL DAÑO
GENOTÓXICO Y CITOTÓXICO INDUCIDO POR
COMPUESTOS METÁLICOS DE CROMO HEXAVALENTE
EN RATONES Hsd:ICR”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

OLGUIN GALINDO JULIO CÉSAR

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL, 2017



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. El proyecto se realizó en colaboración con el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM.

El proyecto fue financiado por la DGAPA mediante el programa PAPIIT-IN219216 y por CB-SEP-CONACyT 220664.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco la confianza, paciencia y apoyo a la **Dra. María del Carmen García Rodríguez**. Por creer en mi, compartirme sus conocimientos y haberme dado la oportunidad de crecer académicamente con la culminación de mi licenciatura.

Agradezco a los miembros del jurado por sus valiosas sugerencias y consejos:

M. en C. Alfonso Macario Luna Vásquez
Dra. María del Carmen García Rodríguez
Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
Biól. Aida Zapata Cruz
M. en C. Rodrigo Anibal Mateos Nava

Le doy gracias a mis padres por apoyarme incondicionalmente en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida académica y personal. Además de ser inmejorables ejemplos de vida a seguir.

A mis hermanas Jessica y Sofía por ser parte importante de mi vida en todo momento y darnos tantas alegrías y unión familiar.

A mis abuelos, y en especial a mi abuelita Ofelia que aunque ya no se encuentre con nosotros físicamente, siempre estará presente, por haber sido un admirable ejemplo de vida y motivación.

A mis tíos y tías que siempre se han mantenido a la expectativa del transcurso de mis metas, y me han ayudado a corregir mis errores.

A mis amigos por todos los buenos momentos que pasamos juntos. Por todas las experiencias y apoyo que nos hemos brindado. En especial a la Yan, Orlando y Humberto que han estado desde el principio de nuestra carrera, hasta ahora, y seguro mucho después.

A mis compañeras de laboratorio Tona, Fany, Lulu, Gaby, Gris y Thelma, por los buenos momentos, además de las enseñanzas y apoyo que me proporcionaron.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	II
I. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1. Alcaloides (Quinina).....	- 2 -
2. Tratamientos contra malaria y leishmaniasis.....	- 4 -
3. Quinazolinas	- 6 -
4. Antioxidantes	- 8 -
5. Estrés oxidante	- 8 -
6. Cromo	- 9 -
7. Daño genotóxico	- 12 -
8. Pruebas y ensayos para evaluar genotoxicidad.....	- 12 -
9. Micronúcleos.....	- 13 -
10. Apoptosis y Necrosis	- 15 -
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	- 17 -
III. HIPÓTESIS	- 17 -
IV. OBJETIVOS	- 18 -
1. General.....	- 18 -
2. Particulares.....	- 18 -
V. MATERIAL Y MÉTODO	- 19 -
1. Animales	- 19 -
2. Reactivos.....	- 19 -
3. Diseño experimental	- 20 -
3.1. Tratamientos.....	- 20 -
3.2. Tiempos de evaluación.....	- 20 -
4. Ensayo de MN y relación EPC/ENC	- 23 -
4.1. Preparación de laminillas	- 23 -
4.2. Evaluación de MN y relación de EPC/ENC.....	- 23 -
5. Apoptosis y viabilidad celular	- 23 -
6. Análisis estadístico.....	- 25 -

VI. RESULTADOS	- 26 -
1. Evaluación de daño genotóxico (MN).....	- 26 -
1.1. Quinazolina MLB02.....	- 26 -
1.2. Quinazolina MLB13.....	- 34 -
2. Evaluación de apoptosis y necrosis.....	- 41 -
2.1. Quinazolina MLB02.....	- 41 -
2.2. Quinazolina MLB13.....	- 43 -
3. Evaluación del daño citotóxico.....	- 45 -
3.1. Relación EPC/ENC.....	- 45 -
3.2. Viabilidad celular.....	- 51 -
VII. DISCUSIÓN	- 55 -
VIII. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES	- 63 -
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 65 -
X. ANEXOS	- 72 -

La malaria y la leishmaniasis son enfermedades parasitarias que a menudo pueden conducir a la muerte, en México presentan una amplia distribución afectando en al menos 17 estados del país. La probabilidad de contraer estas infecciones ha incrementado debido a la existencia de algunas cepas resistentes a los fármacos empleados en los tratamientos convencionales. La alta incidencia de casos fomentó la búsqueda de soluciones que las contengan, y que además no ejerzan un efecto adverso hacia el paciente como algunos de los tratamientos usados actualmente. Diversos investigadores se han dado a la tarea de sintetizar nuevos fármacos con el fin de combatir estos y otros padecimientos, en particular los derivados quinolónicos han generado grandes expectativas debido a los efectos en tratamientos clínicos y las amplias propiedades terapéuticas que han presentado. En la Facultad de Química, UNAM, se sintetizaron quinazolininas, a partir de los derivados quinolónicos; siendo la MLB02 y MLB13 las que presentaron mejores resultados en pruebas de toxicidad. Su síntesis tuvo como propósito potenciar los efectos terapéuticos contra malaria y leishmaniasis, reducir la toxicidad ejercida por los compuestos quinolónicos, y al mismo tiempo, con la adición de grupos hidroxilo y metoxilo se espera conferirles propiedades antioxidantes y proteger contra daño cancerígeno. De acuerdo a la “Food Drug Association” (FDA), a los nuevos fármacos se les deben realizar una secuencia de pruebas genotóxicas y citotóxicas antes de iniciar las pruebas pre-clínicas. Partiendo de esto, se evaluó la posible protección contra genotoxicidad y citotoxicidad *in vivo* de las quinazolininas MLB02 y MLB13 contra el efecto inducido por compuestos de cromo hexavalente. Grupos de cinco ratones hembra y macho de la cepa Hsd:ICR fueron divididos al azar en los siguientes grupos: a) Testigo agua, se le administró vía i.p. alrededor de 0.25 mL de agua inyectable; b) Testigo dimetilsulfóxido (DMSO) al 11.5%, se le administró el vehículo por vía i.p.; c) Quinazolininas, se les administró por vía i.p. 10 mg/kg de las quinazolininas MLB02 o MLB13; d) CrO₃ se les administró por vía i.p. 20 mg/kg y e) Grupo combinado, se les administró la quinazolinina, y cuatro horas después se administró CrO₃. Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. El daño genotóxico se evaluó mediante la frecuencia de MN y apoptosis, mientras que la citotoxicidad se evaluó mediante la relación EPC/ENC y la viabilidad celular, de acuerdo a la técnica propuesta por Hayashi et al., (1990) y la técnica modificada por García-Rodríguez et al., (2012). Los resultados muestran que las quinazolininas no generan genotoxicidad ni citotoxicidad. Al combinar los tratamientos, la MLB02 no disminuyó las frecuencias de MN, se observó disminución de la apoptosis, y la citotoxicidad al aumentar la frecuencia de necrosis en conjunto con los efectos inducidos por el CrO₃ para el caso de machos, en hembras no mostró efecto sobre la viabilidad celular. Por su parte, la quinazolinina MLB13 si mostró efecto modulador sobre la genotoxicidad: disminuyó los MN basales y también los que fueron producto del efecto del CrO₃, redujo las células apoptóticas tempranas para el caso de las hembras, y al igual que la primera quinazolinina, no tuvo efecto en la viabilidad celular al combinar los tratamientos ni en machos ni en hembras. La MLB13 en particular, genera grandes expectativas para comenzar con las pruebas pre-clínicas, y en un futuro próximo para los tratamientos de malaria y leishmaniasis en México y otros países afectados a nivel mundial.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATSDR	“Agency for Toxic Substances and Disease Registry”
BrEt	Bromuro de etidio
Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(VI)	Cromo hexavalente
CrO ₃	Trióxido de cromo
DIF	Frecuencia diferencial de inducción de MN (por sus siglas en inglés)
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECETOC	“European Centre for Ecotoxicology of Chemicals”
ENC	Eritrocitos normocromáticos
EOx	Estrés oxidante
EPA	“Environmental Protection Agency”
EPC	Eritrocitos policromáticos
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FDA	“Food and drugs Administration”
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
i.p.	Intraperitoneal
IARC	“International Agency for Research on Cancer”
mg/kg	Miligramos sobre kilogramos
MN	Micronúcleo (s)

NA	Naranja de acridina
NIF	Frecuencia de inducción neta de MN (por sus siglas en inglés)
OCH ₃	Radical metoxilo
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OH	Radical hidroxilo
RL	Radicales libres
TAQ	2,4,6-triaminoquinazolininas
WHO	“World Health Organization”

I. INTRODUCCIÓN

La malaria y la leishmaniasis son enfermedades infecciosas que han desarrollado cierta resistencia hacia algunos fármacos que se utilizan en tratamientos para combatirlas; pertenecen al repertorio de enfermedades tropicales más importantes para la WHO, y son causa de miles de muertes cada año, se presentan sobre todo en países con desequilibrios económicos, de acceso a la salud, educación y saneamiento medioambiental. En México representan un serio problema de salud al menos en 17 estados del país (Kumate *et al.*, 2001; WHO, 2016).

La química farmacéutica explora la síntesis de moléculas a partir de compuestos bioactivos modificados químicamente para reproducir y acrecentar sus efectos, para que así puedan convertirse en soluciones definitivas hacia estas y otras afecciones (Mouret, 2016). Tal es el caso de los alcaloides quinolínicos: compuestos extraídos de la corteza del árbol de la quina, cuyo uso ha proporcionado beneficios farmacológicos y ansiolíticos, y algunos de sus derivados se han empleado en tratamientos de diversas patologías, sin embargo, a altas dosis pueden resultar tóxicos (Redolar, 2012). En el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM, el grupo de investigación del Dr. Francisco Hernández-Luis, modificó la estructura de los compuestos quinolínicos y diseñó las 2,4,6-triaminoquinazolina (TAQ): quinazolinas MLB01, MLB02 y MLB13, con la finalidad de potenciar sus propiedades terapéuticas contra la malaria y la leishmaniasis, disminuir la toxicidad de los compuestos quinolínicos, y al mismo tiempo conferirles propiedades como antioxidantes mediante la adición de grupos hidroxilo y metoxilo; dicho comportamiento antioxidante parece estar relacionado con la capacidad para quelar metales y captar radicales libres (RL), estas propiedades dependen de la estructura química, de acuerdo al número y localización de los grupos hidroxilo donadores de electrones (Siquet *et al.*, 2006). Los antioxidantes de origen fenólico son capaces de retardar la formación de RL, donar hidrógeno a partir de los grupos hidroxilo, y así modular las reacciones en cadena ejercidas por los RL. Los grupos fenólicos adicionados a las moléculas de quinazolina podrían reproducir los efectos de los grupos antioxidantes (Shimada *et al.*, 1992).

Dentro de las pruebas para evaluar nuevos compuestos dentro del ámbito toxicológico se encuentra la evaluación de MN; el propósito de esta prueba es registrar daño cromosómico, puesto que evidencia alteraciones en el huso mitótico o en la estructura de los cromosomas, y así permite identificar sustancias que causan daño citogénético. Aunado a estas pruebas se recomienda realizar evaluaciones de citotoxicidad (Müller *et al.*, 1999; Krishna y Hayashi, 2000). En pruebas que se realizaron con los primeros derivados de la TAQ se obtuvieron resultados positivos contra los efectos de la malaria y leishmaniasis (Rojas-Aguirre *et al.*, 2012; Mendoza-Martínez *et al.*, 2015). Y posteriormente en pruebas de genotoxicidad y citotoxicidad se determinaron las dosis a las que las TAQ no inducen daño genotóxico ni citotóxico, siendo las quinazolininas MLB02 y MLB13 las que presentaron mejores resultados (Hernández-Cruz, 2016).

1. Alcaloides (Quinina)

La búsqueda de compuestos naturales con actividades terapéuticas ha promovido el estudio de diversos compuestos nitrogenados como péptidos, aminas y alcaloides. Los alcaloides resultan de gran importancia, debido a que presentan efectos fisiológicos potenciales y algunos llegan a ser constituyentes de fármacos (Valentao *et al.*, 2002; Shamsa *et al.*, 2008). Se encuentran fundamentalmente en plantas, localizados en hojas, flores, frutos, semillas, cortezas y raíces (Roberts y Wink, 1998). Su estructura química se constituye por bases orgánicas que contienen uno o más nitrógenos, la mayoría presenta una estructura heterocíclica, y los nitrógenos pueden conformar grupos funcionales distintos en la misma molécula (Figura 1) (Shamsa *et al.*, 2008).

Existen alcaloides con múltiples propiedades farmacológicas, como los extraídos de la planta de la quina; muchos de sus derivados presentan una amplia gama de actividades biológicas y han sido aprovechados en tratamientos contra diversos padecimientos (Kouznetsov *et al.*, 2005).

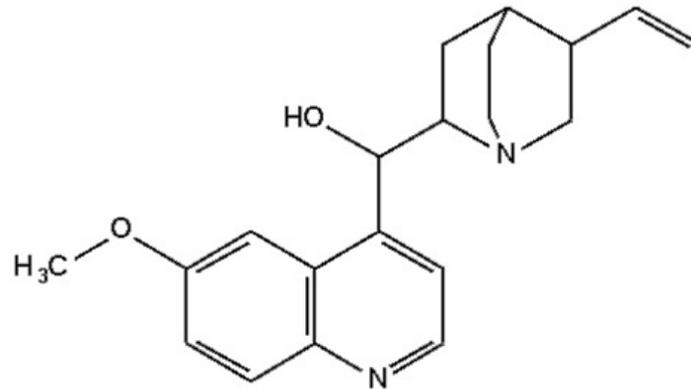


Figura 1. Estructura química del alcaloide quinolina. Se muestra que el nitrógeno se incluye en un sistema heterocíclico (Tomada de <http://triplenlace.com/2014/03/13/la-quimica-de-la-quina>)

El género *Cinchona* comprende varias especies de plantas medicinales con alto contenido de alcaloides, las más importantes desde el punto de vista medicinal son las del árbol de la quina. A la mezcla de sus cuatro principales alcaloides (Figura 2) se le conoce como totaquina, y fue el medicamento antimalárico utilizado antes del aislamiento de la quinina. En particular la quinina destaca debido a que ejerce mayores efectos contra la malaria y otros desórdenes infecciosos. Algunas especies de *Cinchona* contienen entre 1-2% de alcaloides totales, mientras otras como la *Cinchona pubescens* sobrepasan el 13% en porcentaje de peso en la corteza seca (Hodge, 1947; Cuví, 2009).

Desde el siglo XVII en España, los extractos de este árbol se utilizaron como agentes médicos, cuando la condesa de Cinchón fue tratada y curada de malaria (Epperson *et al.*, 1995). Pero fue hasta 1820 que la quinina se aisló de la especie *Cinchona officianilis*, y desde entonces se convirtió en parte importante de diversos tratamientos médicos. El análisis detallado de los elementos de la quina permitió la identificación de más de 20 alcaloides, entre los que sobresalen por su mayor actividad biológica la quinina, la cinchonidina, la quinidina y la cinconina (Kouznetsov y Palma, 1997).

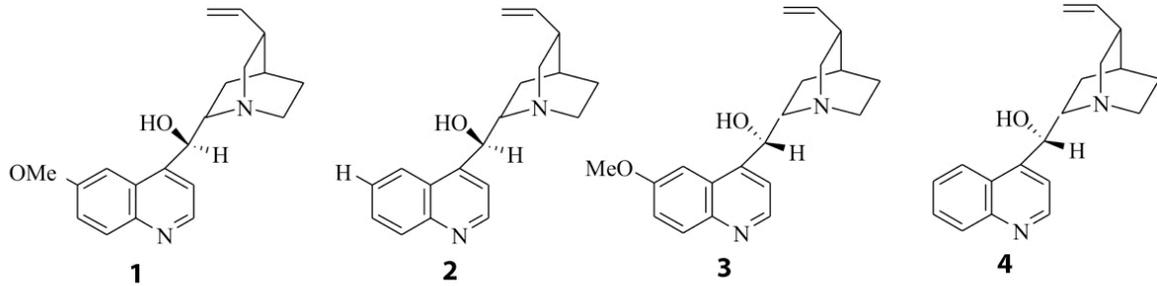


Figura 2. Moléculas quinolínicas de mayor actividad biológica aisladas del árbol de la quina: (1) quinina, (2) cinconidina, (3) quinidina y (4) cinconina (Modificada de Meléndez-Gómez y Kouznetsov, 2016).

2. Tratamientos contra malaria y leishmaniasis

La malaria es una enfermedad producida por el protozoo parásito *Plasmodium* y es transmitida por la picadura del mosquito hembra *Anopheles* para la incubación de sus huevos. Los parásitos se multiplican en el hígado, y mediante replicación asexual infectan los eritrocitos circulantes (Figura 3). Si no se trata adecuadamente esta infección puede progresar, y a menudo conduce a la muerte (Cox *et al.*, 2008; WHO, 2011).

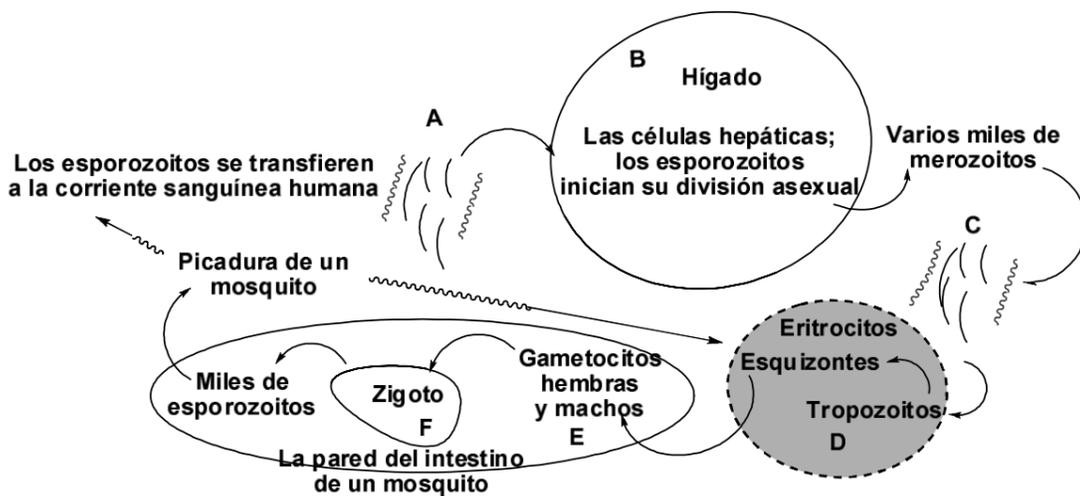


Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*, transmitido mediante su vector: mosquito *Anopheles* hembra (Tomada de Kouznetsov y Amado, 2008).

La leishmaniasis también es resultado de un parásito intracelular, puede ser causada por más de 20 especies de protozoarios del género *Leishmania*. El parásito infecta y se multiplica principalmente en el bazo, el hígado, la médula ósea y los ganglios linfáticos del huésped (Samiran *et al.*, 2005). Los síntomas incluyen úlceras espontáneas en la piel cuando hay leishmaniasis cutánea, lesiones no cicatrizantes en la mucosa para el caso de la leishmaniasis mucocutánea y debilitamiento crónico del sistema reticuloendotelial debido a la leishmaniasis visceral (Chappuis *et al.*, 2007). Para contener la infección se usan antimoniales pentavalentes, tales como antimoniato de meglumina (*Glucantime*®) y estibogluconato de sodio (*Pentostam*®), sin embargo, ejercen acción tóxica que generalmente se manifiesta por anorexia, náusea, vómito, cefalea, mialgias, polineuritis y letargia. Las contraindicaciones incluyen tuberculosis pulmonar, insuficiencia hepática, pancreática o renal graves y severa alteración de la función cardíaca (WHO, 2010).

La quinina actúa combatiendo los protozoarios a nivel de eritrocitos. Posee la capacidad de inhibir su crecimiento y reproducción, al mismo tiempo que presenta propiedades analgésicas. Hay estudios que demuestran la subsistencia de parásitos resistentes a la quinina, en el tratamiento con Pirimetamina-sulfadoxina, que no ofrece resultados favorables hacia ciertas cepas de malaria (Goldsmith, 1998; Barat y Bloland, 1997). Mediante los tratamientos médicos se puede combatir la afección, pero al mismo tiempo la quinina puede generar efectos secundarios, desarrolla patologías como el cinchonismo: enfermedad que se caracteriza por el deterioro de la audición, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, e incluso pérdida parcial de la visión (Karlsson *et al.*, 1990; Cuví, 2009). Además se ha comprobado que a ciertas dosis genera toxicidad, pero la limitada disponibilidad de otros compuestos y el aumento de cepas resistentes a diferentes derivados han aumentado su uso (Yeka *et al.*, 2009).

La búsqueda de nuevos compuestos más efectivos y menos tóxicos que evadan el mecanismo de resistencia que emplean los parásitos de la malaria y la leishmaniasis, y que posean la base estructural del sistema quinolínico, promovió la síntesis de nuevas moléculas, de este modo surgen las TAQ para tratamientos contra estas enfermedades infecciosas.

3. Quinazolininas

Estos compuestos fueron sintetizados a partir de los alcaloides quinolínicos, y muchos derivados han demostrado una amplia gama de actividades biológicas y terapéuticas: se pueden emplear como relajantes musculares, agentes antivirales, anticancerígenos, antimicrobianos, antimaláricos, antivirales, entre otros. La estructura de las quinazolininas está conformada por anillos heterocíclicos de benceno y pirimidina (Figura 4). Se ha demostrado que el empleo de derivados heterocíclicos de quinazolina actúan como antidiabéticos, anticancerígenos, contra enfermedades neurodegenerativas debido a su efecto neuroprotector, y son componentes de fármacos utilizados en la industria: tal es el caso del *Erlotinib*® y *Prazosin*® (Figura 4). A partir de la necesidad de otras alternativas que permitieran modular o detener el desarrollo de diversas enfermedades, la síntesis de las quinazolininas genera grandes expectativas para futuros tratamientos (Gundla *et al.*, 2008; Poewe, 2009; Abida *et al.*, 2011; Hassanzadeh *et al.*, 2012).

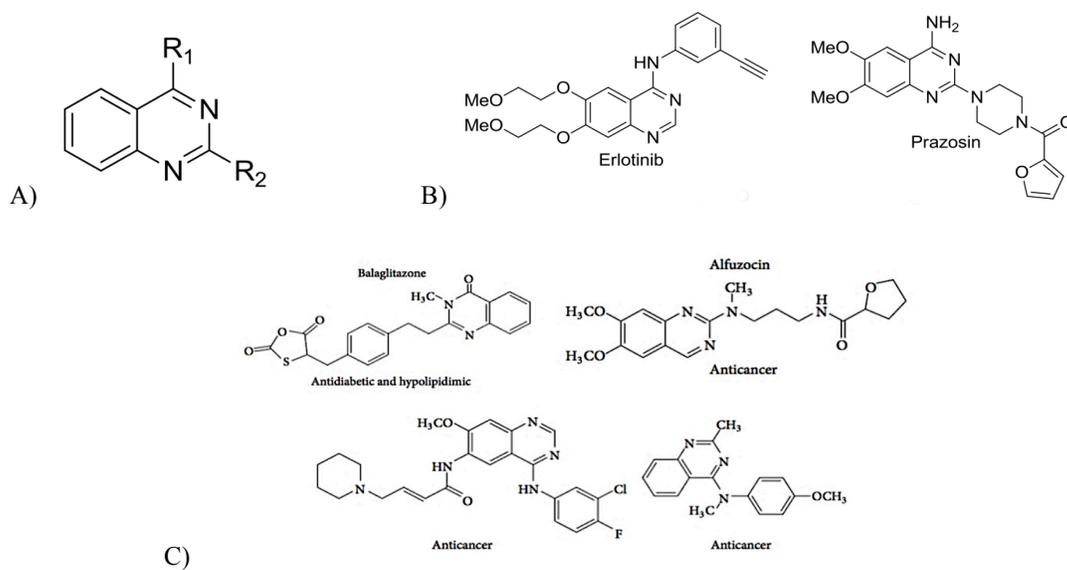
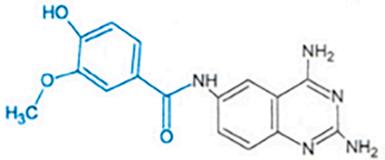
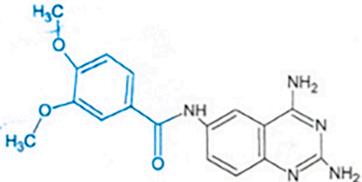
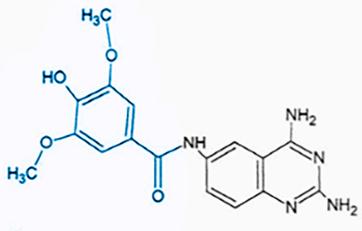


Figura 4. A) Estructura de la quinazolinina (1,3-Benzodiazina, Benzopyrimidina) (Tomada de Roughley y Jordan, 2011); B) Quinazolininas sintetizadas industrialmente como compuestos en fármacos: *Erlotinib* contra varios tipos de tumores; *Prazosin*: bloqueador α -adrenérgico (Tomada de Harim, 2013); C) Compuestos derivados de quinazolininas: utilizados en tratamientos anticancerígenos y antidiabéticos (Tomada de Asif, 2014).

Existe la posibilidad de que la administración de las nuevas quinazolininas por sí solas pudieran inducir daño al ADN, por lo que primeramente se establecieron las dosis a las que no indujeran daño genotóxico ni citotóxico. En dicho estudio, se demostró que la dosis de 10 mg/kg de las quinazolininas no induce daño. Se observaron mejores resultados con las quinazolininas MLB02 y MLB13 (Hernández-Cruz, 2016). Otro de los aportes otorgados mediante la modificación química y la síntesis de las quinazolininas fue la adición de grupos hidroxilo y metoxilo, lo que podría conferirles propiedades como antioxidantes (Tabla 1).

Cuadro 1. Quinazolininas sintetizadas por el grupo de investigación del Dr. Hernández-Luis, adicionadas con grupos OH y CH₃. A) MLB01, B) MLB02, C) MLB13.

Quinazolinina	Estructura
A) MLB01	
B) MLB02	
C) MLB13	
Antioxidante ●	Quinazolinina ●

4. Antioxidantes

Los antioxidantes tienen la capacidad de preveer del daño celular mediante la neutralización de la acción oxidante causada por moléculas potencialmente dañinas llamadas “radicales libres” (RL), incluidas dentro de las especies reactivas de oxígeno (EROs), a través de mecanismos en donde anulan la reactividad o inhiben la generación de dichas moléculas. El mecanismo de deterioro ocasionado por el agente oxidante se da al promover su reducción cuando reacciona con aquella molécula que oxida, el proceso resulta cotidiano en el organismo humano y representa el conocido par óxido-reductor o balance redox, pero la producción desmedida puede producir daño. El antioxidante, entonces, actúa al colisionar con el RL cediéndole un electrón, al mismo tiempo se oxida y se transforma en un RL débil no tóxico y que, en algunos casos, puede generarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (Quintanar y Calderón, 2009; Rodríguez *et al.*, 2001). El origen de los antioxidantes proviene de fuentes endógenas y exógenas (Thornalley y Vasak, 1985).

5. Estrés oxidante

Cuando se generan alteraciones de la señalización y el balance redox causado por el exceso de EROs, incluyendo a los RL y a todas las moléculas altamente reactivas que contienen oxígeno, se produce un estado de desequilibrio bioquímico denominado estrés oxidante, dicha inestabilidad puede alterar las proteínas, carbohidratos, lípidos y ADN presentes en los distintos componentes celulares. Los RL, al tener un electrón desapareado o libre, tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Cuando el RL consigue sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un RL por quedar con un electrón desapareado, y de este modo se inicia una reacción en cadena (Jones, 2006). La vida media biológica del RL es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando daño a moléculas, membranas celulares y tejidos.

El propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus, sin embargo, los excesos de RL deben ser controlados mediante la protección de antioxidantes para minimizar sus efectos (Finkel y Holbrook, 2000). El estrés oxidante se frecuente en diversos estados patológicos en donde se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías y enfermedades neurológicas, incluso se relaciona con la aceleración general del proceso normal de envejecimiento y la carcinogénesis (Winston y Di Giulio, 1991; Gutteridge y Halliwell, 1999).

Los metales pueden inducir genotoxicidad por múltiples vías, se ha descrito que causan daño en el ADN por la generación de estrés oxidante en las células, y también pueden causar la inhibición de los mecanismos de reparación. El mecanismo de acción tóxica por el que generan daño en el organismo surge a nivel de la membrana celular, en donde se fijan sobre la superficie externa y afectan a los fenómenos de permeabilidad, y mediante la acción de los RL al ingresar a la célula, promueven roturas de cadena simple y modificaciones de las bases del ADN, y a su vez pueden afectar el funcionamiento normal de enzimas implicadas en el transporte de diversos constituyentes (Elis, 2001; Ercal *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2005).

6. Cromo

El Cr es un elemento que se encuentra de manera natural en organismos, rocas, plantas, suelos, gases y cenizas volcánicas. En el ambiente se localiza principalmente en compuestos trivalentes (III), como óxido crómico y sulfato crómico, mientras que su forma hexavalente (VI) presenta compuestos de trióxido crómico, ácido crómico y dicromatos (Jiménez, 2005). El Cr(III) es un nutriente esencial, resulta indispensable para la supervivencia de la célula y participa en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, de igual modo en la estabilización de proteínas y ácidos nucleicos (Pas *et al.*, 2004; Cecil y Goldman, 2013). Por otro lado, en su estado de oxidación hexavalente (VI) es tóxico, incluso clasificado por la IARC como carcinogénico para los seres humanos (WHO, 2003).

En la Figura 5 se muestran las diferentes vías por las cuales el Cr(VI) ingresa al organismo. La vía mas despejada y facilitada para su ingreso es por medio de la vía respiratoria, por donde se absorbe aproximadamente el 50% del Cr(VI) inhalado. La vía digestiva y parenteral resultan insuficientes, ya que no alcanzan más del 6% de absorción (Hemberg, 1988).

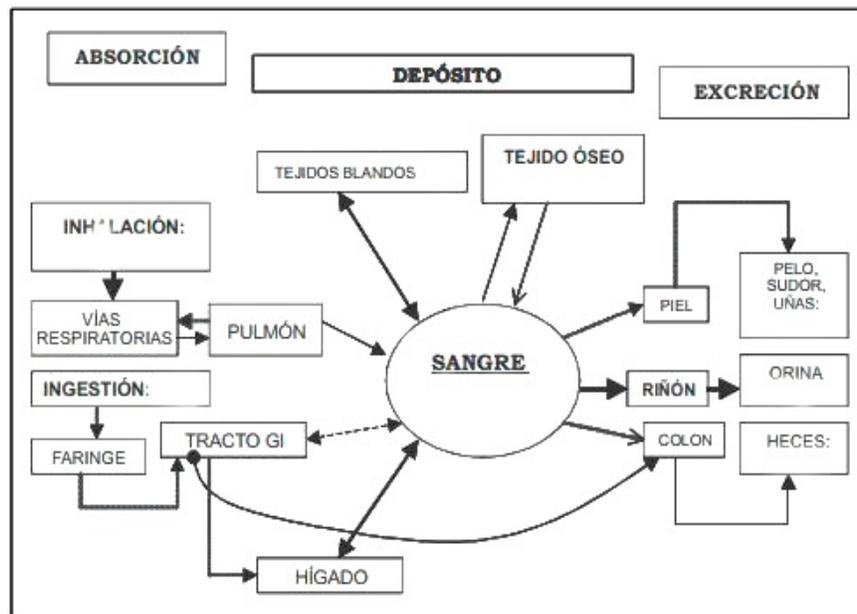


Figura 5. Vías de exposición al Cr(VI) (Modificada de Hemberg, 1988).

En la Figura 6 se muestra la manera en que el Cr(VI) se introduce mediante difusión a través de la membrana celular, y la Figura 7 señala las principales rutas involucradas en las lesiones genéticas. Una vez dentro de la célula se reduce a Cr(III), originando productos intermediarios que generan EROs, daño oxidativo a lípidos y proteínas, entrecruzamientos entre cadenas de ADN, mutaciones y posteriormente la posibilidad de ocasionar cáncer (U.S. EPA. IRIS, 2010).

Al utilizar el CrO₃ (VI) como testigo positivo con potencial mutagénico y cancerígeno, y combinando las quinazolinas con este agente, se pueden verificar si la modificación química de los compuestos quinolínicos se logró, mediante sus propiedades antioxidantes, mediante la modulación del daño genotóxico y citotóxico inducido.

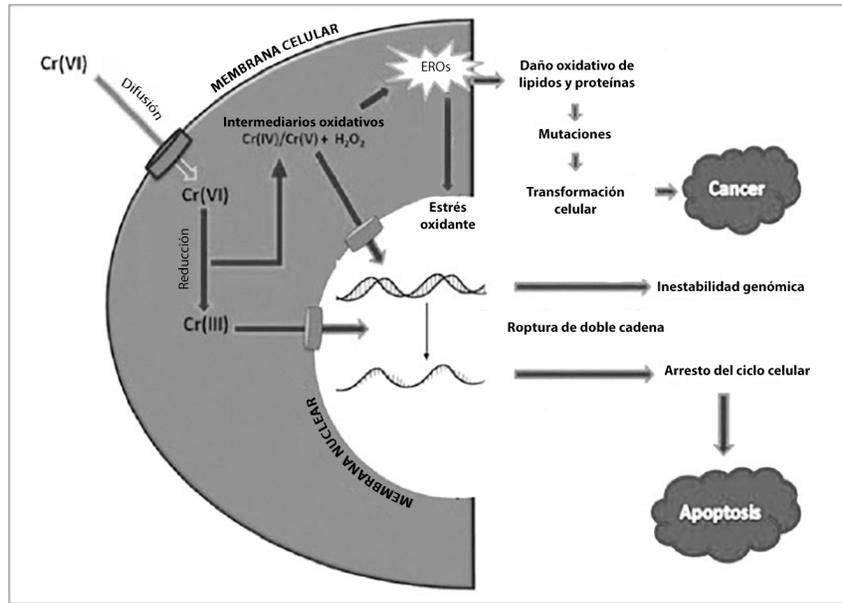


Figura 6. Genotoxicidad ocasionada por Cr(VI) (Modificada de U.S. EPA. IRIS, 2010).

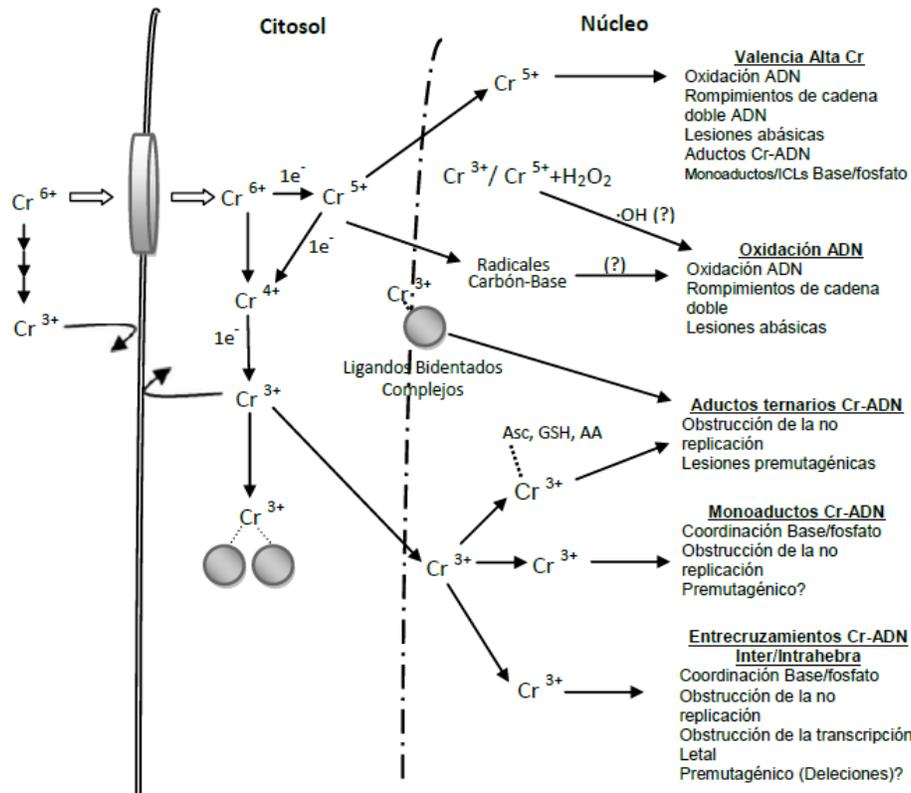


Figura 7. Ruta de acceso del Cr(VI) al interior celular y principales rutas involucradas en las lesiones genéticas (Modificada de O'Brien y Patierni, 2003).

7. Daño genotóxico

La exposición a sustancias contaminantes o tóxicas como el cromo en su forma hexavalente, provoca daño a la estructura del ADN durante la división celular y afecta los mecanismos de reparación. Dichos agentes tóxicos ocasionan el deterioro del ADN a distintos niveles, desde cambios o eliminación de bases nitrogenadas, pasando por la modificación de genes o grupos de genes, hasta la eliminación de cromosomas completos o grupos de cromosomas (Heddle, 1983).

Existen efectos adversos sobre la salud que no pueden ser detectados de manera inmediata, resultado del daño genético inducido por los agentes genotóxicos, y afectan tanto en células somáticas como en germinales, existen claras evidencias de que pueden contribuir negativamente en el envejecimiento y en la aparición de enfermedades cardiovasculares (Bridges, 1990). Parte de estos daños consiguen repararse de manera natural cuando la célula entra en un proceso de eliminación llamado apoptosis, que es una muerte regulada y no produce daño en otras células; en cambio, si el daño no se repara y las células afectadas siguen en división, ocurre la transformación maligna de las células, que puede derivar en dos consecuencias (Sişman, 2010):

- 1) Si el daño se da en células somáticas, se pueden producir alteraciones metabólicas o fisiológicas, o bien puede darse el crecimiento celular desmesurado y desordenado denominado cáncer.
- 2) Si el daño irreversible se presenta en células germinales, estas alteraciones son heredadas a la siguiente generación y son causa de padecimientos genéticos.

8. Pruebas y ensayos para evaluar genotoxicidad

Las pruebas de genotoxicidad se emplean para detectar sustancias que induzcan daño genético, pueden efectuarse evaluaciones con bioindicadores que ponen de manifiesto la manera en que está siendo dañado el material genético. Existen pruebas *in vitro*

esencialmente para células o bacterias, e *in vivo*, donde se emplean principalmente especies de roedores como la rata o el ratón (Vega, 1985; Hernández y Moreno, 2011). El agente genotóxico es administrado al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas celulares. Se da entonces la interacción con el ADN produciéndose daño que puede ser reparado eficiente o ineficientemente (Ames, 1989).

Representación de estas pruebas es el ensayo de MN, puede realizarse en médula ósea de roedores y en sangre periférica para registrar la capacidad que puedan tener las sustancias de prueba en inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas (Alamone, 1994).

9. Micronúcleos

Los MN son cuerpos extra nucleares que pueden estar constituidos por fragmentos acéntricos de cromosomas o de cromátidas, o por cromosomas completos que se encuentran separados durante el anafase y no son incluidos en el núcleo principal de la célula hija. Su tamaño es muy pequeño en comparación al núcleo principal (Figura 8) (Sedelnikova *et al.*, 2007). El ensayo de MN en sangre periférica ofrece ventajas con respecto al análisis en médula ósea; es una prueba más sencilla y más rápida, se analiza el mismo tipo de células y se puede evaluar la cinética al tomar muestras cada determinado tiempo sin la necesidad de sacrificar al animal de prueba. Se recomienda su aplicación en organismos en donde no participe la actividad del bazo en la eliminación de los eritrocitos micronucleados (CSGMT, 1995). La presencia de MN es un indicador de daño cromosómico y de inestabilidad del genoma, puesto que evidencia alteraciones en el huso cromático o en la estructura de los cromosomas. Un incremento en las frecuencias de MN indica que los agentes de prueba son inductores de daño (Krishna y Hayashi, 2000; Zalacain, 2005; Ngan, *et al.*, 2007).

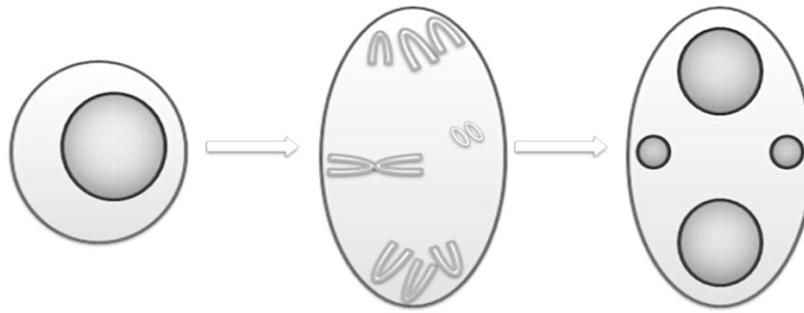


Figura 8. Formación de MN en el curso de la división celular (Tomada de Matheus, 2014)

Los MN se pueden originar por estos eventos:

- Cromosomas completos rezagados por daño al huso mitótico (efecto aneuploidógeno) (Figura 9A).
- Aberraciones cromosómicas que conllevan a la formación de fragmentos de cromosomas sin centrómero (daño clastógeno) (Figura 9B) (Terradas *et al.*, 2010).

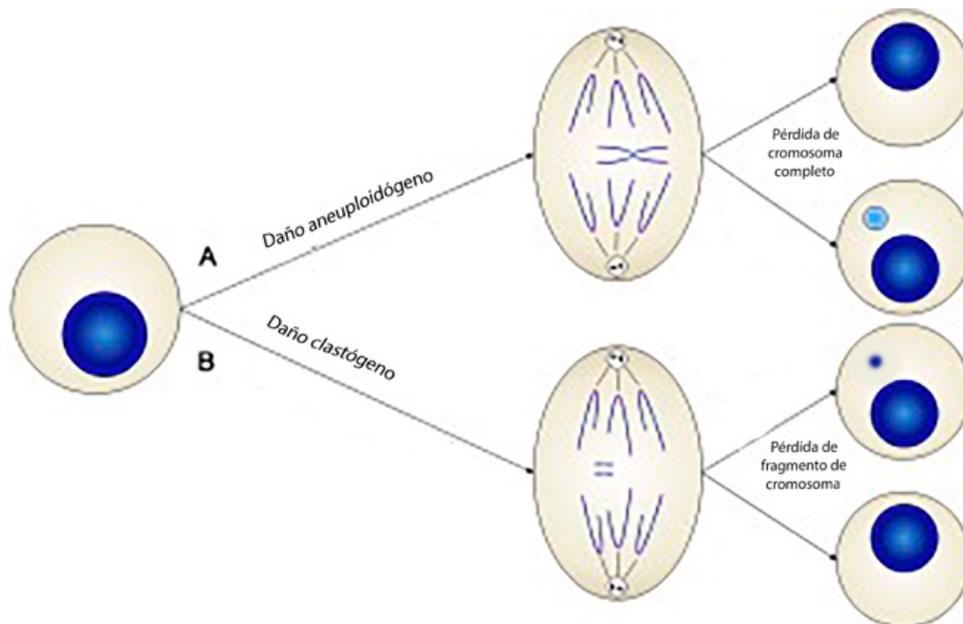


Figura 9. Mecanismos de formación de MN (Modificado de Terradas *et al.*, 2010).

10. Apoptosis y Necrosis

La apoptosis provoca la eliminación de células dañadas o no necesarias, ocurre por un proceso activo controlado genéticamente y se origina por daño o modificación del ADN nuclear, la cual genera modificación en la estructura que conducen a la fragmentación celular. Es un mecanismo de respuesta biológica cuando la célula percibe conflicto entre las señales que recibe, procedentes del interior o del exterior. Por ello no es correcto interpretarla como una muerte celular programada, ya que también es inducida por agentes externos. La necrosis es un fenómeno pasivo, no programado genéticamente, se inicia por un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, que se traduce en entrada de iones y agua acompañada de disminución en la capacidad para bombear iones, lo que genera la posibilidad de rotura de membranas y fragmentación de orgánulos, con hinchazón y estallido celular, cuyo contenido afecta a las células vecinas, lo que induce una respuesta inflamatoria en el tejido (Repetto, 2009). En la Figura 10 se muestran los procesos que dan origen a la muerte por apoptosis y necrosis, y las principales características citomorfológicas en la Tabla 2.

Cuadro 2. Comparación de características de los procesos de muerte celular: apoptosis y necrosis (Modificada de Elmore, 2007).

Característica	Apoptosis	Necrosis
Volumen celular	Encogimiento celular	Hinchamiento celular, citólisis
Efecto de integridad de membrana plasmática	Membrana celular intacta	Membrana celular comprometida
Efecto en citoplasma	Retenido en cuerpos apoptóticos	Liberado al espacio extracelular
Procesos de inflamación tisular	No hay presencia de inflamación	Inflamación usualmente presente

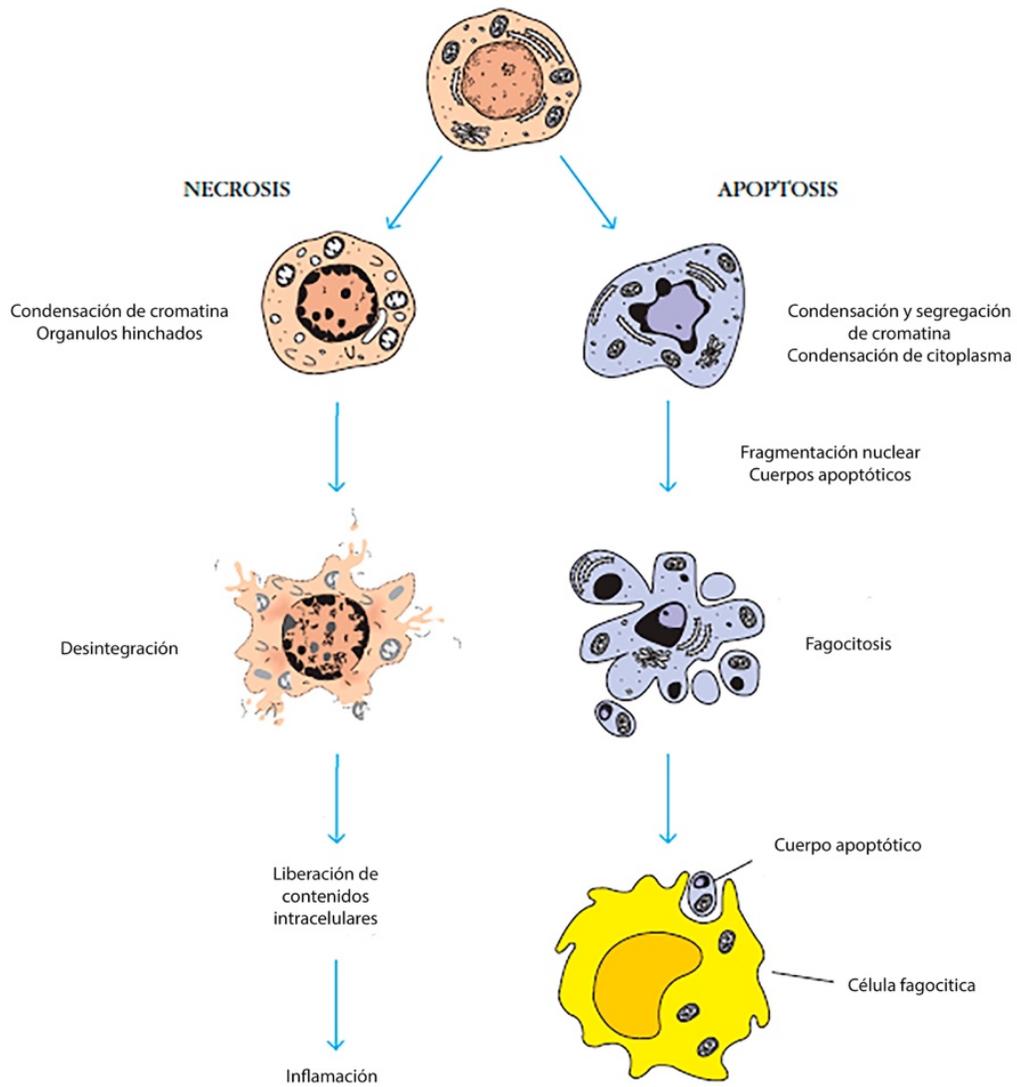


Figura 10. Morfología de la necrosis y de la apoptosis (Modificada de Cheng, 2013).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria y la leishmaniasis son de las enfermedades tropicales más importantes para la WHO y representan un serio problema de salud pública a nivel mundial. En México se ha podido controlar la transmisión, sin embargo, siguen siendo un problema en varias zonas del país. La quinina ha presentado una actividad potente en tratamientos contra malaria, pero también ha mostrado un alto grado de toxicidad, razón por la cual se buscó la síntesis de nuevos compuestos, más efectivos y menos tóxicos, que posean la base estructural de los compuestos quinolónicos. Basándose en esto, se sintetizaron las quinazolininas MLB02 y MLB13, que *in vitro*, han mostrado actividad contra malaria y leishmaniasis. Por otra parte, la mayoría de los metales inducen daño genotóxico y citotóxico, particularmente se ha demostrado que los compuestos de Cr(VI) tienen potencial mutagénico y cancerígeno. Gracias a la modificación química de las quinazolininas, existe la posibilidad de otorgarles propiedades como antioxidantes mediante la adición de grupos hidroxilo y metoxilo, por lo que resulta de interés estudiar si son capaces de proteger del daño oxidante al ADN inducido por compuestos de Cr(VI).

III. HIPÓTESIS

Las quinazolininas MLB02 y MLB13 fueron sintetizadas a partir de la estructura de los compuestos quinolónicos, y con las modificaciones químicas se pretende volverlas menos tóxicas y agresivas durante los tratamientos. Además, mediante la adición de grupos hidroxilo y metoxilo se espera que a las moléculas se les pudieran conferir propiedades como antioxidantes. Entonces, se espera que la administración de la MLB02 y MLB13, no induzca daño genotóxico ni citotóxico, y modulen el daño generado por compuestos inductores de estrés oxidante con potencial cancerígeno, como son los compuestos de cromo hexavalente, mediante las evaluaciones de MN, relación de EPC/ENC, apoptosis y viabilidad celular.

IV. OBJETIVOS

1. General

Estudiar el efecto de los nuevos compuestos quinolínicos (quinazolinas MLB02 y MLB13) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por compuestos de cromo hexavalente con potencial cancerígeno, en sangre periférica de ratones Hsd:ICR, mediante el ensayo de MN, la relación de EPC/ENC, apoptosis y viabilidad celular.

2. Particulares

- 1.- Evaluar la cinética de MN en sangre periférica obtenida cada 24 horas durante tres días en ratones hembra y macho tratados con las quinazolinas MLB02 y MLB13.
- 2.- Evaluar el efecto de las quinazolinas MLB02 y MLB13 sobre la inducción de MN en ratones hembra y macho tratados con CrO_3 .
- 3.- Evaluar la inducción de apoptosis y necrosis de las quinazolinas MLB02 y MLB13 en sangre periférica obtenida a las 48 horas de ratones hembra y macho.
- 4.- Evaluar el efecto sobre la apoptosis y necrosis de las quinazolinas MLB02 y MLB13 en ratones hembra y macho tratados con CrO_3 .
- 5.-Evaluar la citotoxicidad mediante la relación de EPC/ENC y la viabilidad celular en sangre periférica obtenida cada 24 horas durante tres días en ratones hembra y macho tratados con las quinazolinas MLB02 y MLB13.
- 6.- Evaluar el efecto de las quinazolinas MLB02 y MLB13 sobre la citotoxicidad, mediante la relación de EPC/ENC y viabilidad celular en ratones hembra y macho tratados con CrO_3 .

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Animales

Se emplearon ratones hembra y macho de la cepa Hsd:ICR, de entre 60 a 90 días de edad con un peso de 25 a 45 g. Los ratones se obtuvieron del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM y fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo condiciones ambientales de temperatura (22° C) y circulación de aire controladas, así como períodos de luz-oscuridad 12-12 horas. Los ratones se alimentaron a base de alimento comprimido (NUTRI-CUBOS, Purina®), y tuvieron libre acceso al agua.

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo fueron establecidos con base a los lineamientos de los programas GENOTOX, la EPA, la ECETOC y la FDA (Heddle *et al.*, 1983; EPA, 1984; Hayashi *et al.*, 1990; FDA, 2000).

2. Reactivos

Los reactivos empleados en el estudio se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Colorante Naranja de Acridina (NA) [CAS No. 10127-02-3], Bromuro de etidio (BrEt) [CAS No. 1239-45-8], Trióxido de cromo [CAS No. 1333-82-0] y Dimetilsulfóxido (DMSO) [CAS No. 67-68-5].

Las quinazolinas MLB02 y MLB13 utilizadas en el presente estudio fueron proporcionadas por el Departamento de Farmacia a cargo del Dr. Francisco Hernández-Luis en la Facultad de Química de la UNAM.

3. Diseño experimental

3.1. TRATAMIENTOS

Las quinazolininas fueron preparadas en una solución estándar de DMSO (10 mg/ml) ya que no son solubles en agua, y se administró una dosis de 10 mg/kg. Mientras que el DMSO y CrO_3 se prepararon por separado mediante su disolución en agua destilada estéril. El CrO_3 se administró en una dosis de 20 mg/kg. Los tratamientos fueron aplicados vía intraperitoneal (i.p.) con base en los resultados obtenidos previamente (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

Se conformaron grupos de 5 ratones tratados de la siguiente manera:

- a) Grupo testigo, se administró agua inyectable en una cantidad de 0.25 ml
- b) Grupo testigo negativo, se les aplicó el vehículo DMSO en una concentración de 11.5%
- c) Grupo testigo positivo, se les administró CrO_3 en una dosis de 20 mg/kg
- d) Grupo quinazolinina, se les administró una dosis de 10 mg/kg de las quinazolininas MLB02 o MLB13
- e) Grupo combinado, se les administraron las quinazolininas MLB02 o MLB13, y cuatro horas después CrO_3 .

3.2. TIEMPOS DE EVALUACIÓN

Se evaluó el daño genotóxico mediante la frecuencia de MN, y la citotoxicidad con la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) con respecto a la de eritrocitos normocromáticos (ENC), así como la apoptosis y la viabilidad celular.

Las muestras se tomaron cada 24 horas durante tres días (0-72 horas), para establecer la cinética de MN y la relación de EPC/ENC. Mientras que solo se tomó una muestra a la hora 48 para el análisis de la viabilidad celular, apoptosis y necrosis (Figuras 11 y 12).

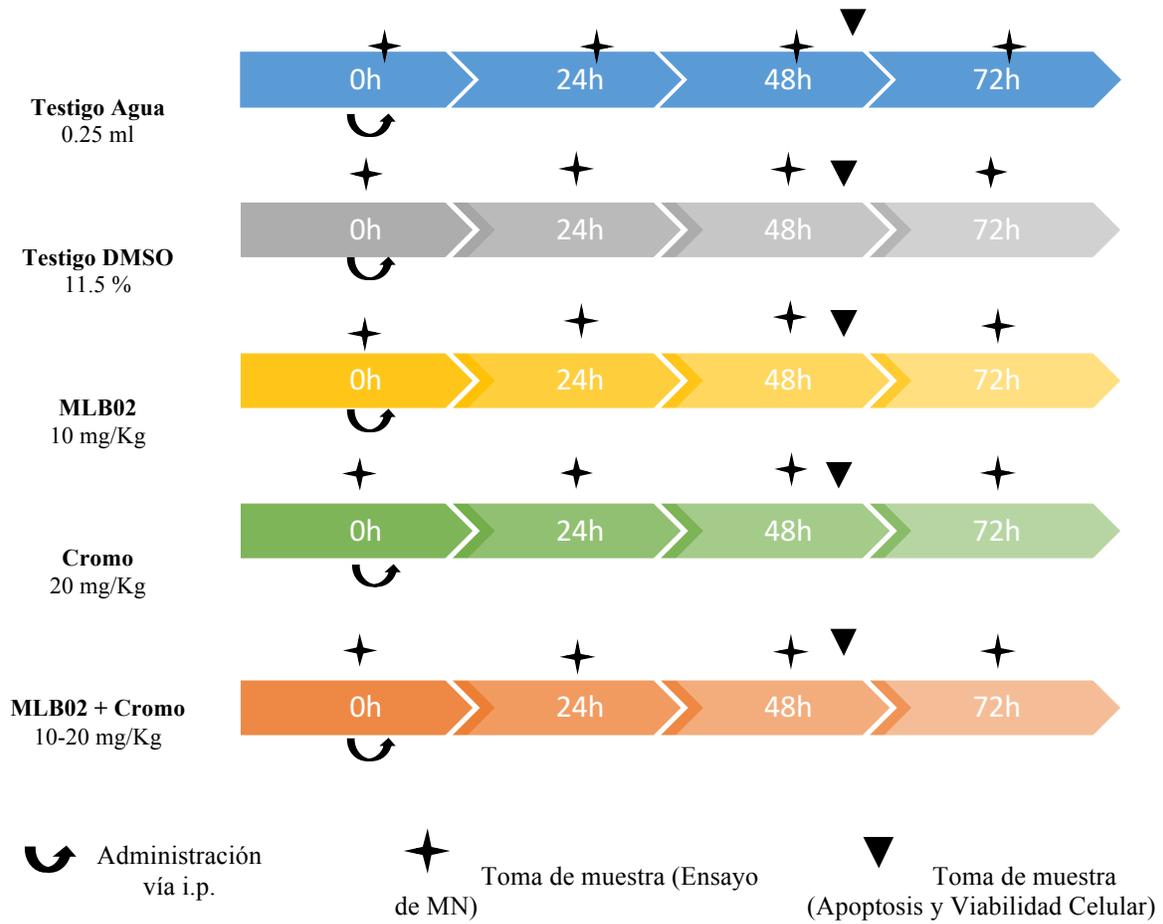


Figura 11. Protocolo de quinazolina MLB02 para la evaluación del daño genotóxico y citotóxico. Se tomó el mismo protocolo tanto para hembras, como para machos.

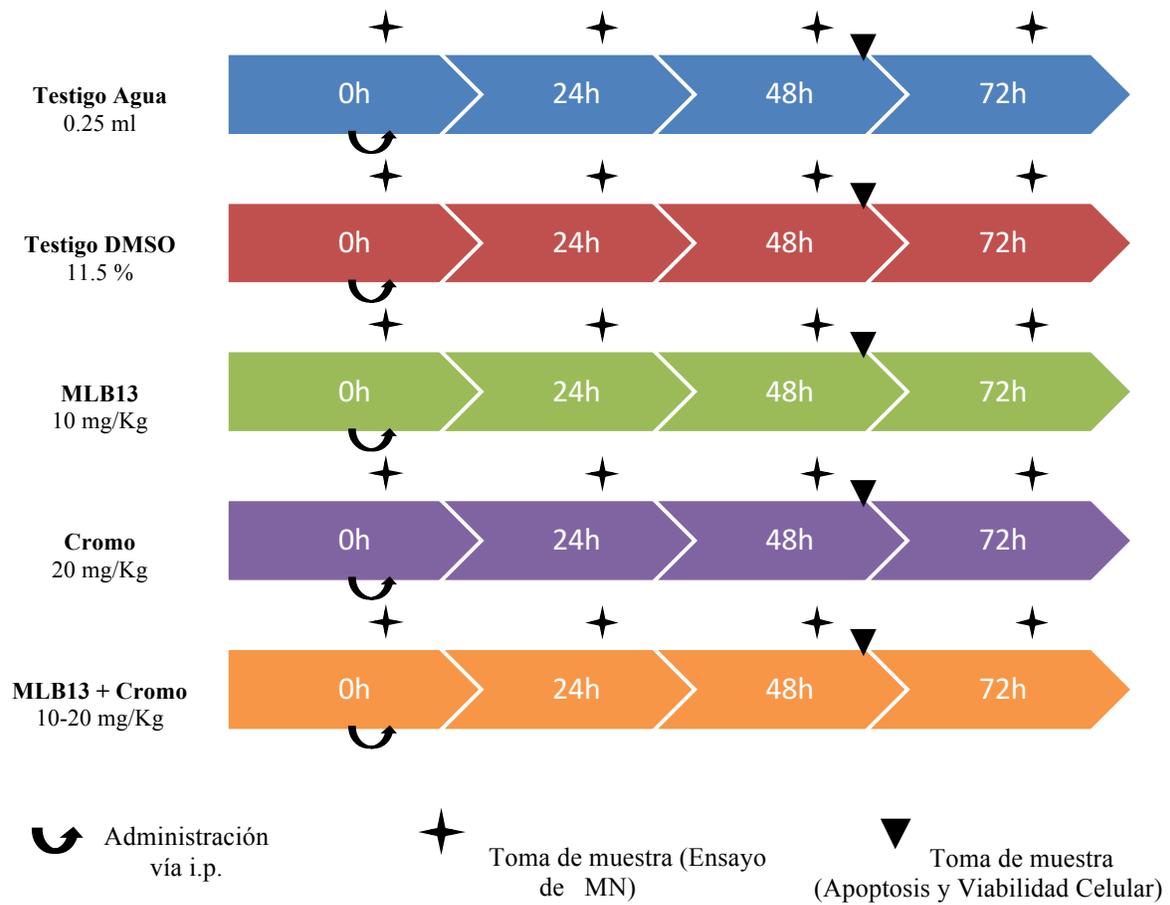


Figura 12. Protocolo de quinazolina MLB13 para la evaluación del daño genotóxico y citotóxico. Se tomó el mismo protocolo tanto para hembras, como para machos.

4. Ensayo de MN y relación EPC/ENC

4.1. PREPARACIÓN DE LAMINILLAS

Se preparó una solución de naranja de acridina (NA: 1 mg/ml) y se colocaron 10µl de esta disolución en laminillas precalentadas a 70° C de acuerdo a la técnica de Hayashi (1990).

4.2. EVALUACIÓN DE MN Y RELACIÓN DE EPC/ENC

Una vez preparadas las laminillas, se colocaron las muestras de sangre periférica obtenidas de la vena caudal del ratón (5 µl) y se guardaron en cajas de plástico a 4° C aproximadamente en la oscuridad hasta su análisis (Hayashi *et al.*, 1990). Las muestras se evaluaron con ayuda de un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión amarilla (Olympus CX31). La tinción de los eritrocitos con NA, permite diferenciar los eritrocitos policromáticos (EPC) teñidos de rojo por su contenido de ARN ribosomal, y los eritrocitos normocromáticos (ENC) no teñidos. El daño genotóxico fue evaluado en 4000 EPC por ratón, entre los cuales se identificaron a los eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) con el ADN teñido de color amarillo fluorescente (Figura 13A).

5. Apoptosis y viabilidad celular

Se preparó una solución de NA:BrE (100:100 µg/mL) de la cual se tomaron 10 µl y se agregaron a las muestras de sangre (100 µl) obtenidas de la vena caudal de acuerdo a McGahon *et al.*, (1995) y García-Rodríguez *et al.* (2013). Se evaluaron 300 células por ratón mediante un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión amarilla (Olympus CX31), de las que se identificaron las células sanas, apoptóticas tempranas (viables); apoptóticas tardías y necróticas (no viables). Para el análisis de viabilidad se contabilizaron únicamente células viables (vivas) y células no viables (muertas) (Figura 13B).

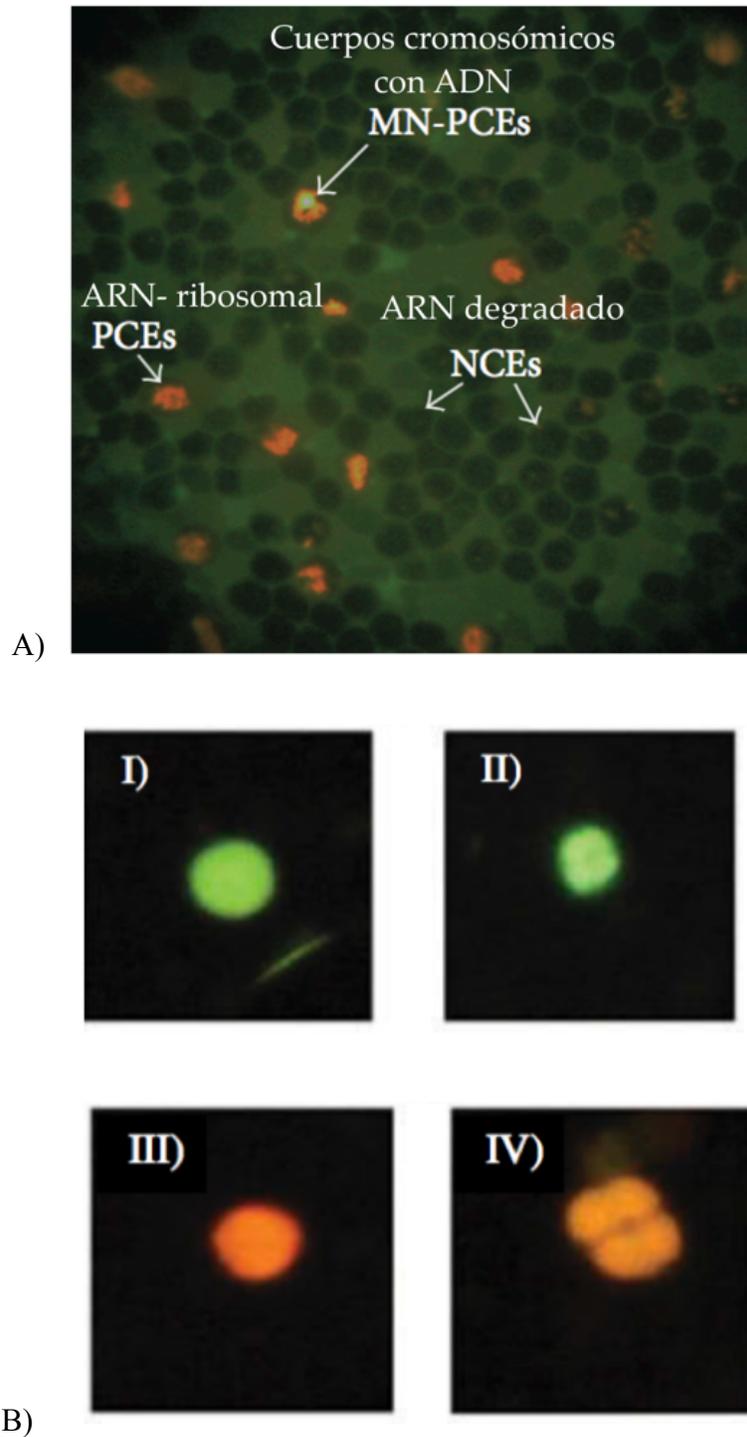


Figura 13. A) Eritrocitos de sangre periférica de ratón teñidos con la técnica de NA. Se observan los ENC, EPC y EPC-MN (Tomada de García-Rodríguez *et al.*, 2014) B) Leucocitos de sangre periférica de ratón teñidos con la técnica de NA/BrEt. Se observan las células: I) viables o normales, II) apoptóticas tempranas, III) apoptóticas tardías y IV) necróticas (Tomada de García-rodríguez *et al.*, 2015).

6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos de MN y relación de EPC/ENC se presentan en media \pm desviación estándar, y se les aplicó un análisis de varianzas (ANOVA), seguido de una prueba Tukey o Dunnett para determinar la significancia entre las medias de cada grupo mediante el paquete estadístico Graphpad Prism 6.

Para la inducción de MN se calculó la Frecuencia de Inducción Neta de MN (NIF por sus siglas en inglés) para descartar la inducción espontánea que obtengan los grupos a la hora 0 partiendo de la premisa de que, al no haberles aplicado ningún tratamiento, los MN a la hora 0 corresponden a su propio testigo. Además, se calculó la Frecuencia Diferencial de Inducción de MN (DIF por sus siglas en inglés), restando los MN de los testigos a las horas correspondientes para cada tratamiento, esto para descartar los MN que fueron inducidos a los ratones durante la experimentación, así permitimos descartar la posibilidad de los MN que fueran producto de la manipulación (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

Los datos obtenidos para los análisis del NIF y DIF, así como los resultados de viabilidad celular, apoptosis y necrosis se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrada, utilizando el mismo paquete estadístico. Se tomaron únicamente los datos con una $p < 0.05$ como significativos estadísticos (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001).

VI. RESULTADOS

1. Evaluación de daño genotóxico (MN)

1.1. QUINAZOLINA MLB02

En el cuadro 3 se muestran los promedios con su desviación estándar de los MN evaluados en sangre periférica de las 0 a las 72 horas, obtenidos en los tratamientos con la quinazolina MLB02 y el CrO_3 en hembras. Se observa que el grupo tratado con la quinazolina MLB02 presenta un aumento en la frecuencia de MN que resulta estadísticamente significativa a la hora 48 al compararse contra el testigo de DMSO, y contra su hora 0. En el grupo CrO_3 se observaron incrementos en los promedios de MN que resultaron estadísticamente significativos a las 48 y 72 horas al comparar contra el testigo de agua y contra su propia hora 0. Mientras que, al combinar los tratamientos hubo similitud en los promedios de MN en todas las horas respecto al grupo tratado únicamente con CrO_3 . En el cuadro 4 se muestran los promedios de MN evaluados en machos. Se observa que el grupo tratado con la quinazolina MLB02 no presenta efectos en la frecuencia de MN. Al igual que en hembras el CrO_3 induce incrementos significativos en los promedios de MN a las 48 y 72 horas. Cuando se combinaron los tratamientos, tampoco se observó reducción en los promedios de MN respecto al grupo tratado únicamente con CrO_3 .

Cuadro 3. Frecuencia de MN en ratones hembra tratados con la quinazolina MLB02 y el CrO₃.

Tratamiento	Dosis	N	Hora	MN/ 1000 células (media ± d.e.)
Testigo agua	--	5	0	0.9 ± 0.3
			24	1.0 ± 0.6
			48	1.2 ± 0.4
			72	1.2 ± 0.5
Testigo DMSO (11.5%)	--	5	0	1.1 ± 0.4
			24	1.6 ± 0.6
			48	1.8 ± 0.4
			72	1.5 ± 0.5
MLB02	10 mg/kg	5	0	1.7 ± 0.3
			24	2.2 ± 0.5
			48	2.9 ± 0.3 ^{a, c}
			72	2.6 ± 0.6
CrO₃	20 mg/kg	5	0	1.3 ± 0.5
			24	3.4 ± 0.8
			48	6.1 ± 1.0 ^{a, b}
			72	3.6 ± 0.4 ^{a, b}
MLB02-CrO₃	10-20 mg/kg	5	0	1.0 ± 0.2
			24	2.8 ± 1.0
			48	6.1 ± 0.3 ^c
			72	4.1 ± 1.6

Significancia estadística p<0.05; p^a: vs Hora 0; p^b: vs testigo agua; p^c: vs testigo DMSO.

Cuadro 4. Frecuencia de MN en ratones macho tratados con la quinazolina MLB02 y el CrO₃.

Tratamiento	Dosis	N	Hora	MN/ 1000 células (media ± d.e.)
Testigo agua	--	5	0	1.1 ± 0.4
			24	1.2 ± 0.2
			48	1.5 ± 0.2
			72	1.4 ± 0.3
Testigo DMSO (11.5%)	--	5	0	1.3 ± 0.6
			24	1.5 ± 0.3
			48	1.7 ± 0.2
			72	1.3 ± 0.2
MLB02	10 mg/kg	5	0	1.5 ± 0.3
			24	1.6 ± 0.4
			48	1.5 ± 0.6
			72	2.3 ± 0.2
CrO₃	20 mg/kg	5	0	1.4 ± 0.5
			24	2.0 ± 0.4
			48	5.0 ± 1.0 ^{a, b}
			72	2.7 ± 0.3 ^{a, b}
MLB02-CrO₃	10-20 mg/kg	5	0	1.3 ± 0.4
			24	1.9 ± 0.7
			48	5.0 ± 1.1 ^c
			72	2.1 ± 0.4

Significancia estadística p<0.05; p^a: vs Hora 0; p^b: vs testigo agua; p^c: vs testigo DMSO.

NIF = (MN observados en "A" a la hora X_1) - (MN observados en "A" a la hora X_0)
los tratamientos, por esta razón se realizó el cálculo de la Frecuencia de Inducción Neta

Dónde: "A" = grupo evaluado; X_1 = tiempo de evaluación; X_0 = tiempo 0.
Por lo tanto, por las siglas en inglés, este cálculo parte de la premisa de que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que al restar el número de MN evaluados en la hora 0 a las demás horas restantes, se asume que se obtiene la inducción neta de MN (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

Este cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:



En la Figura 14 se muestra el análisis del NIF, calculado para 20,000 EPC cuando se administraron los tratamientos en hembras de la quinazolina MLB02 y el CrO₃. Se observa que, con este análisis la quinazolina MLB02 ya no presenta efectos significativos sobre las frecuencias de MN. Sin embargo, en el tratamiento combinado se observó aumento de las frecuencias de MN en las horas 48 y 72 en comparación con el grupo CrO₃, aunque no resultaron significativas. Podría sugerirse entonces, que esta quinazolina no ejerce efectos protectores contra el daño inducido por CrO₃.

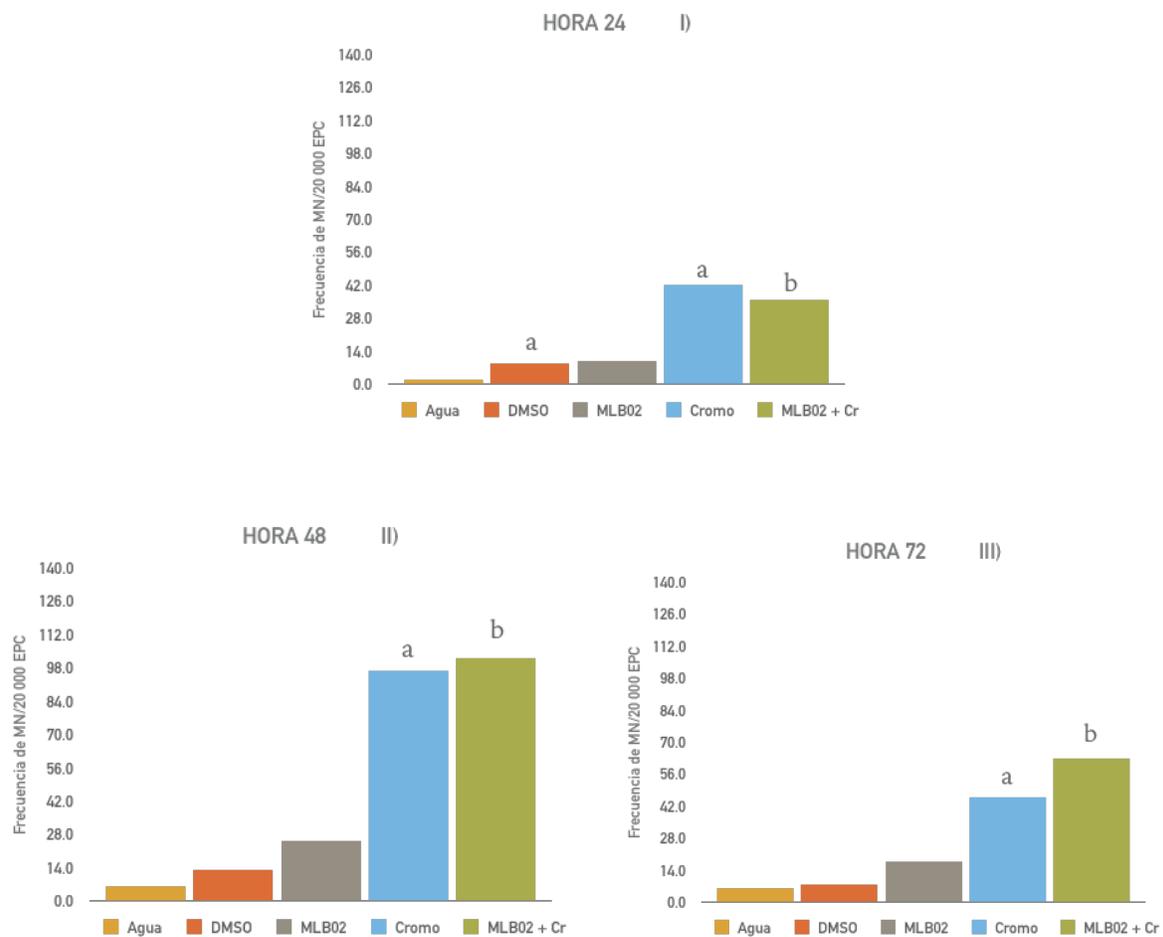


Figura 14. Análisis de la inducción de frecuencia neta de MN (NIF) calculada por grupo de hembras en los diferentes tiempos evaluados: I) 24, II) 48 y III) 72 horas. $p < 0.05$; ^ap: vs Testigo agua; ^bp: vs. Testigo DMSO.

En la Figura 15 se muestra el análisis del NIF para los tratamientos de la quinazolina MLB02 y el CrO₃ en machos. Se puede observar que la MLB02 reduce la frecuencia de MN basales en las horas 24 y 48. Sin embargo, para la hora 72, la quinazolina MLB02 presenta un aumento de las frecuencias de MN contra el testigo de DMSO. Al combinar los tratamientos, la quinazolina MLB02 disminuye la frecuencia de MN únicamente a la hora 72, aunque la disminución no resulta significativa.

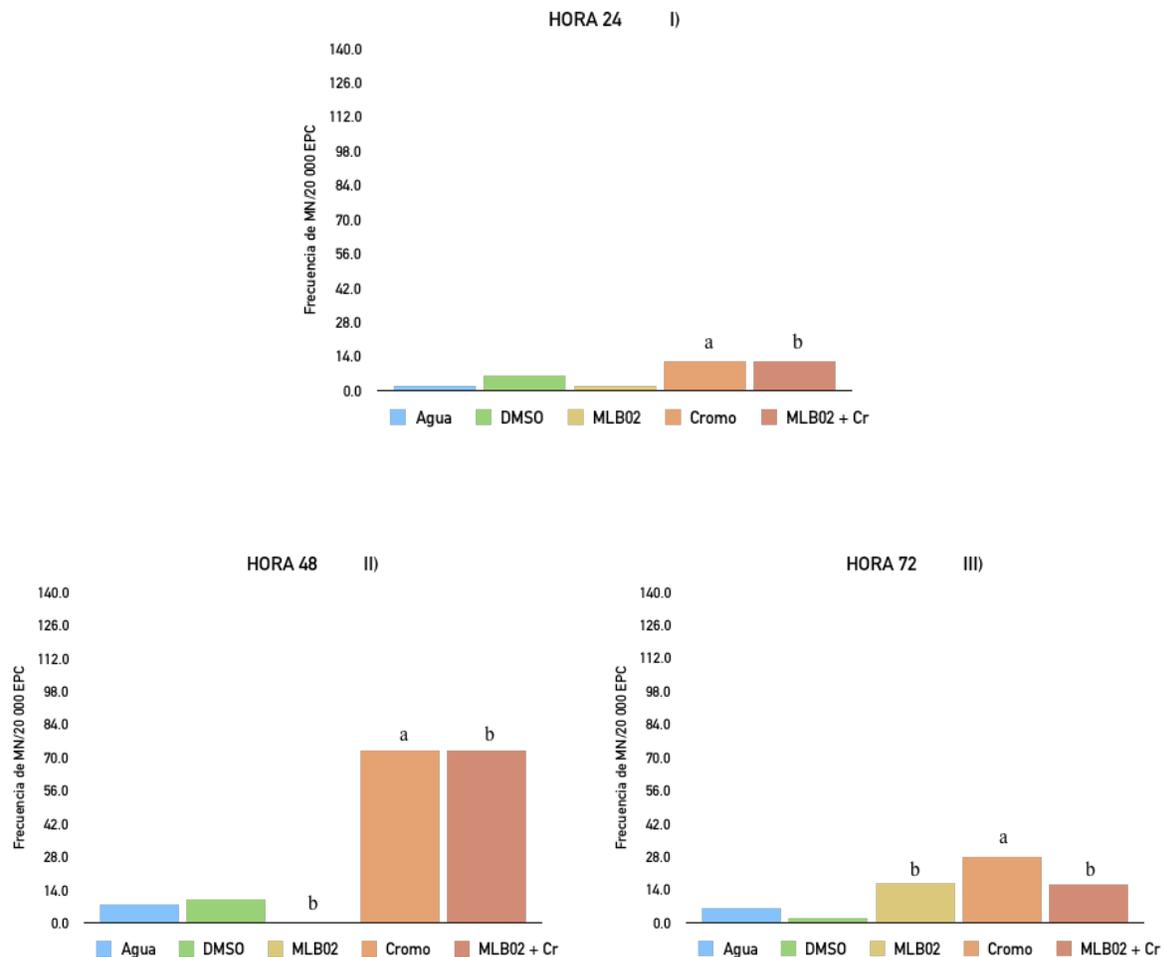


Figura 15. Análisis de la inducción de frecuencia neta de MN (NIF) calculada por grupo de machos en los diferentes tiempos evaluados: I) 24, II) 48 y III) 72 horas. $p < 0.05$; ^ap: vs Testigo agua; ^bp: vs. Testigo DMSO.

Se calculó la Frecuencia Diferencial de Inducción de MN (DIF por sus siglas en inglés), esto para descartar los MN que fueron inducidos a los ratones durante la experimentación.

$$\text{DIF} = (\text{MN observados en "A" a la hora } X_1) - (\text{MN observados en "T" a la hora } X_1)$$

Dónde: "A" = grupo evaluado; X_1 = tiempo de evaluación; T = grupo testigo
grupos correspondientes tanto de quinazolinas como de CrO_3 , así podemos descartar los MN inducidos por acción de los diferentes vehículos.

Se utilizó la siguiente fórmula:



En la Figura 16 se muestra el análisis del DIF para los tratamientos de la quinazolina MLB02 y el CrO_3 en hembras. Después de realizar este análisis se observó un efecto modulador de la MLB02 sobre el daño inducido por el CrO_3 . En el grupo combinado se presentó menor frecuencia de MN que resultó significativa a la hora 24, al comparar con el grupo únicamente tratado con CrO_3 . Tanto el grupo CrO_3 , como el grupo combinado presentan aumentos significativos en las frecuencias de MN a las 24, 48 y 72 horas, al comparar con su hora 0. En la Figura 17 se muestran los resultados para los grupos de machos. Al comparar las frecuencias del grupo CrO_3 contra el grupo combinado cuando se han restado los MN inducidos por sus respectivos testigos, se observa que, aunque el efecto fue bajo, se modula el daño inducido, además en la administración sola se muestra una disminución en las frecuencias a la hora 48.

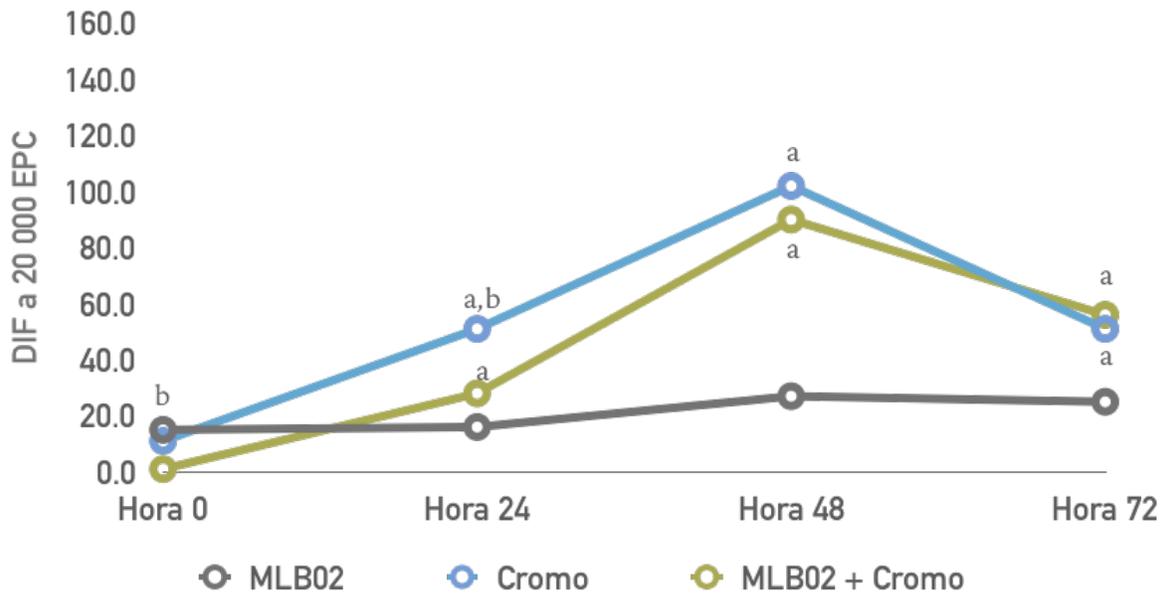


Figura 16. DIF absoluto calculado por tiempo y grupos de hembras para 20 000 EPC en el tratamiento de quinazolina MLB02. $p < 0.05$; ^ap: vs hora 0; ^bp: vs. MLB02 + CrO₃.

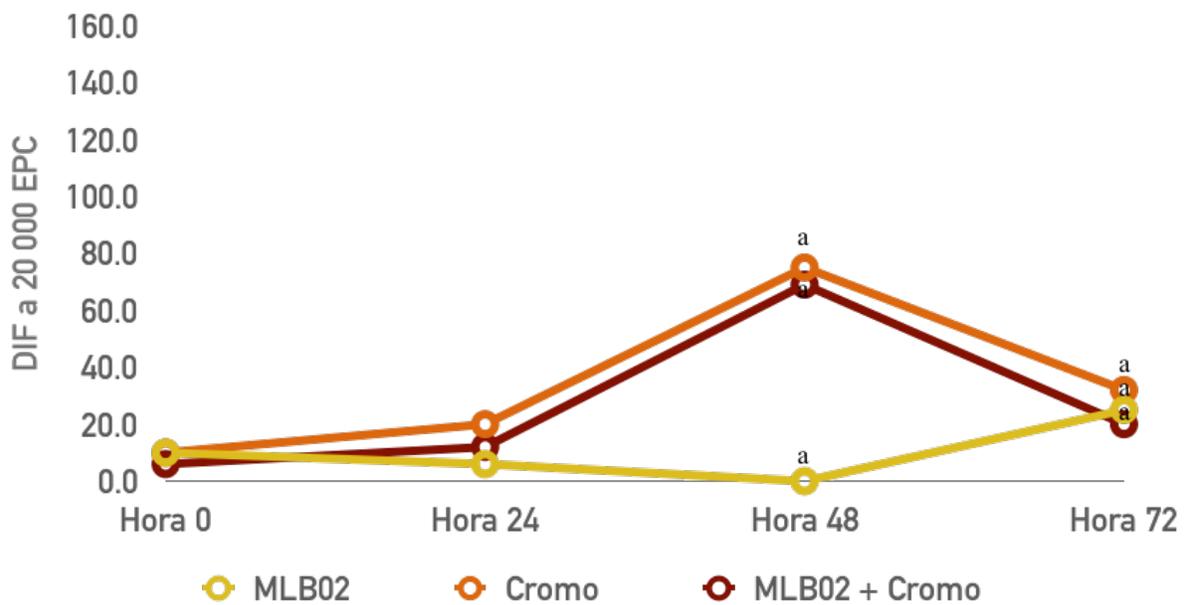


Figura 17. DIF absoluto calculado por tiempo y grupos de machos para 20 000 EPC en el tratamiento de quinazolina MLB02. $p < 0.05$; ^ap: vs hora 0.

1.2. QUINAZOLINA MLB13

En el cuadro 5 se muestran los promedios con su desviación estándar de los MN evaluados en sangre periférica de las 0 a las 72 horas en hembras tratadas con la quinazolina MLB13 y el CrO₃. Se observa que el grupo tratado con la quinazolina MLB13 no presenta efecto significativo en las frecuencias de MN al comparar contra el testigo de DMSO. El grupo CrO₃ mostró aumento en las frecuencias que resultaron significativas a las 24, 48 y 72 horas, comparando contra su testigo agua. Por su parte, en el grupo donde se combinaron los tratamientos disminuyen las frecuencias de MN al comparar con el grupo tratado únicamente con CrO₃ a las horas 24 y 48, sugiriendo una protección hacia el daño genotóxico. En el cuadro 6 se muestran los promedios de MN en las evaluaciones de machos. Se observa que la quinazolina MLB13 incrementa la frecuencia de MN a la hora 48 al comparar con su propia hora 0. El CrO₃ aumenta de forma significativa las frecuencias a las 24, 48 y 72 horas. Mientras que, al combinar los tratamientos de la quinazolina MLB13 y el CrO₃ se observó similitud en los promedios de MN comparando con el grupo tratado únicamente con CrO₃, aunque los MN basales son mayores en el grupo combinado, por lo que los resultados pueden tener una mejor interpretación después de los análisis del NIF y DIF.

Cuadro 5. Frecuencia de MN en ratones hembra tratados con la quinazolina MLB13 y el CrO₃.

Tratamiento	Dosis	N	Hora	MN/ 1000 células (media ± d.e.)
Testigo agua	--	5	0	0.4 ± 0.2
			24	0.4 ± 0.3
			48	0.7 ± 0.4
			72	0.7 ± 0.2
Testigo DMSO (11.5%)	--	5	0	0.9 ± 0.4
			24	1.2 ± 0.5
			48	1.7 ± 0.3
			72	1.8 ± 0.5
MLB13	10 mg/kg	5	0	0.4 ± 0.2
			24	0.3 ± 0.3
			48	1.4 ± 0.3
			72	0.7 ± 0.2
CrO₃	20 mg/kg	5	0	1.1 ± 0.3
			24	3.6 ± 1.7 ^{a, b}
			48	7.4 ± 0.4 ^{a, b, d}
			72	3.6 ± 0.8 ^{a, b}
MLB13-CrO₃	10-20 mg/kg	5	0	1.0 ± 0.2
			24	2.6 ± 0.7 ^{a, c}
			48	5.6 ± 1.1 ^{a, c}
			72	3.0 ± 0.6 ^a

Significancia estadística p<0.05; p^a: vs Hora 0; p^b: vs testigo agua; p^c: vs testigo DMSO; p^d: vs MLB13 + CrO₃.

Cuadro 6. Frecuencia de MN en ratones macho tratados con la quinazolina MLB13, CrO₃ y la combinación de los tratamientos.

Tratamiento	Dosis	N	Hora	MN/ 1000 células (media ± d.e.)
Testigo agua	--	5	0	1.3 ± 0.4
			24	1.2 ± 0.4
			48	1.7 ± 0.2
			72	1.2 ± 0.3
Testigo DMSO (11.5%)	--	5	0	0.9 ± 0.4
			24	1.4 ± 0.3
			48	2.0 ± 0.5
			72	1.7 ± 0.1
MLB13	10 mg/kg	5	0	1.3 ± 0.2
			24	2.1 ± 0.2
			48	3.0 ± 1.1 ^a
			72	1.8 ± 0.6
CrO₃	20 mg/kg	5	0	0.7 ± 0.4
			24	3.0 ± 1.1 ^{a, b}
			48	5.9 ± 1.5 ^{a, b}
			72	3.0 ± 0.6 ^{a, b}
MLB13-CrO₃	10-20 mg/kg	5	0	1.2 ± 0.4
			24	2.3 ± 0.3
			48	6.2 ± 0.5 ^{a, c}
			72	3.4 ± 0.9 ^{a, c}

Significancia estadística p<0.05; p^a: vs Hora 0; p^b: vs testigo agua; p^c: vs testigo DMSO.

En la Figura 18 se muestra el análisis del NIF para los grupos de hembras, calculado para 20,000 EPC cuando se administraron los tratamientos de la quinazolina MLB13 y el CrO_3 . Se observa que la quinazolina MLB13 presenta reducción en las frecuencias de MN en las horas 24 y 72, significativas al comparar con el testigo de DMSO. Cuando se administraron los tratamientos combinados, se observó un efecto modulador del daño inducido por el CrO_3 , en comparación con el grupo tratado sólo con CrO_3 .

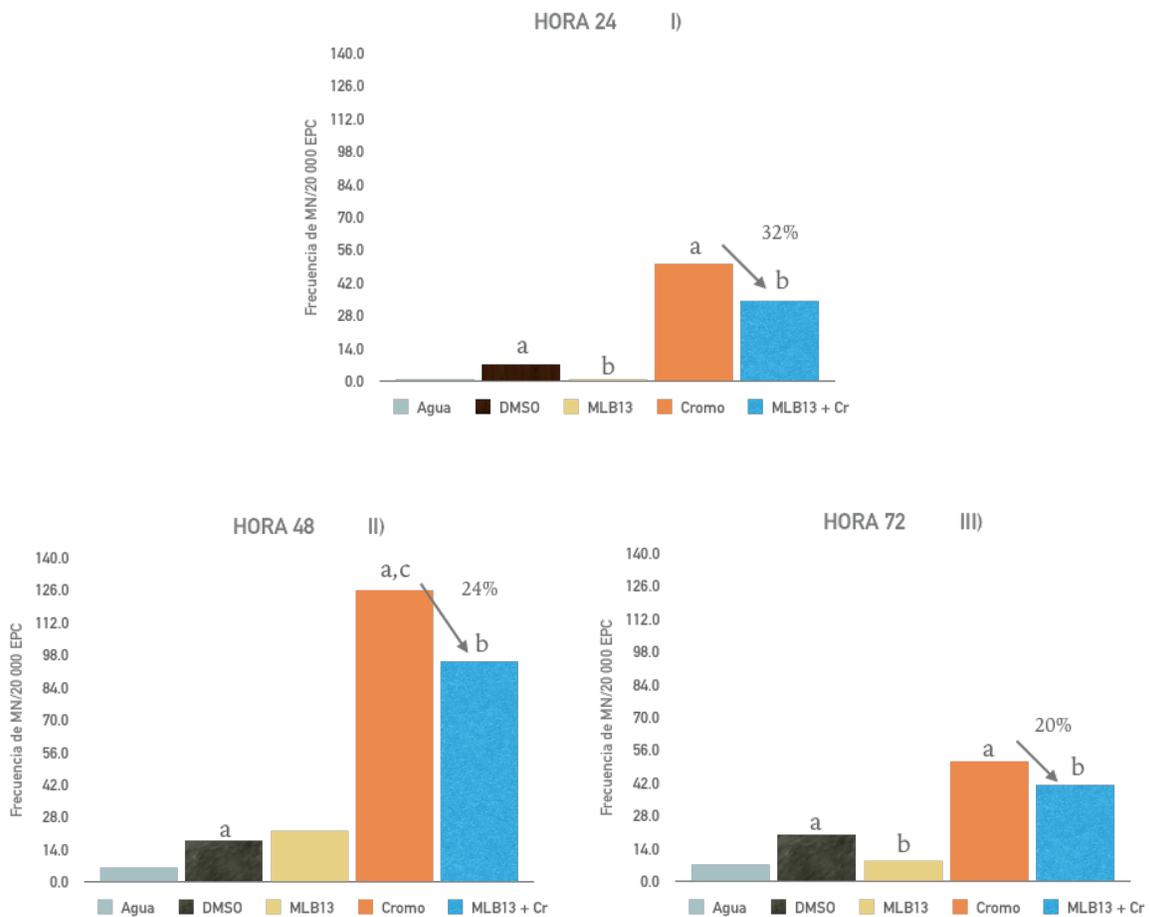


Figura 18. Análisis de la inducción de frecuencia neta de MN (NIF) calculada por grupo de hembras en los diferentes tiempos evaluados: I) 24, II) 48 y III) 72 horas. Se presenta el % de disminución de frecuencias comparando entre grupo CrO_3 y $\text{MLB13} + \text{CrO}_3$. $p < 0.05$; ^ap: vs Testigo agua; ^bp: vs. Testigo DMSO; ^cp: vs $\text{MLB13} + \text{CrO}_3$.

En la Figura 19 se muestra el análisis del NIF para los grupos de machos. Se observa que la quinazolina MLB13 no tiene un efecto que resulte significativo sobre las frecuencias de MN al comparar con el testigo DMSO en ninguna de las horas de tratamiento. Al administrar el tratamiento combinado no se observan efectos en las frecuencias de MN al comparar con el grupo CrO₃ en las horas 48 y 72, pero menor frecuencia que resultó significativa a la hora 24.

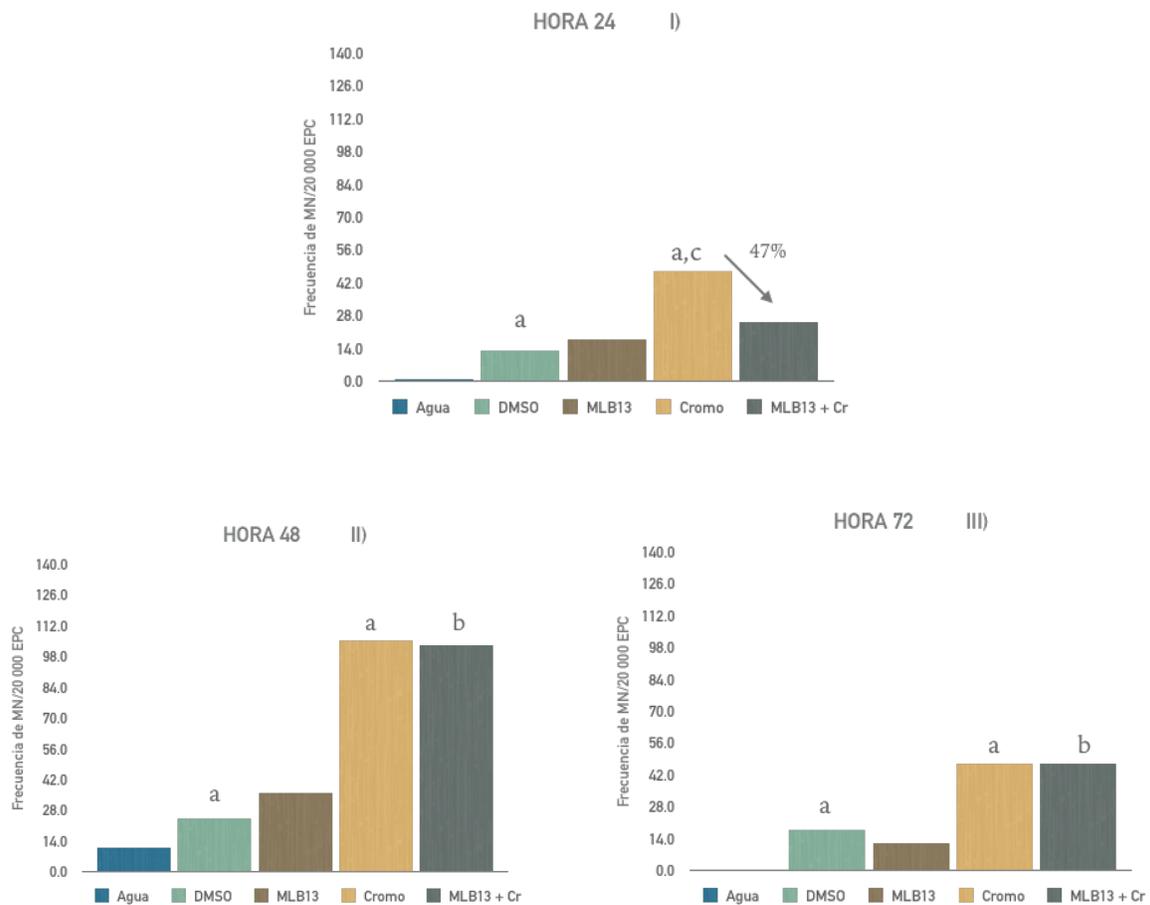


Figura 19. Análisis de la inducción de frecuencia neta de MN (NIF) calculada por grupo de machos en los diferentes tiempos evaluados: I) 24, II) 48 y III) 72 horas. Se presenta el % de disminución de frecuencias comparando entre grupo CrO₃ y MLB13 + CrO₃. p<0.05; ^ap: vs Testigo agua; ^bp: vs. Testigo DMSO; ^cp: vs MLB13 + CrO₃.

En la Figura 20 se muestra el análisis del DIF para los grupos de hembras en los tratamientos de la quinazolina MLB13 y el CrO_3 . La quinazolina MLB13 presenta similitud en las frecuencias de MN para las horas 0, 24 y 48, y para la hora 72 se observó una disminución significativa. El grupo CrO_3 presenta frecuencias de MN que resultaron significativas en todas las horas de tratamiento contra su hora 0. Mientras que, en la combinación de los tratamientos se observó que las frecuencias de MN disminuyeron respecto al grupo tratado con CrO_3 , lo que sugiere que la quinazolina MLB13 desempeñó la mayor modulación del daño, dicha disminución resultó estadísticamente significativa a las horas 24, 48 y 72. En la Figura 21 se muestran los resultados del análisis del DIF en el grupo de machos. La quinazolina MLB13 mantiene similitud de frecuencias en todas sus horas, sin embargo, en la hora 48 aumenta la frecuencia de MN. Mediante este análisis, el grupo CrO_3 presentó menor frecuencia de MN al comparar con el grupo combinado. Para la combinación de los tratamientos, la MLB13 presentó aumento de frecuencias en la hora 48, comparado con el grupo tratado con CrO_3 .

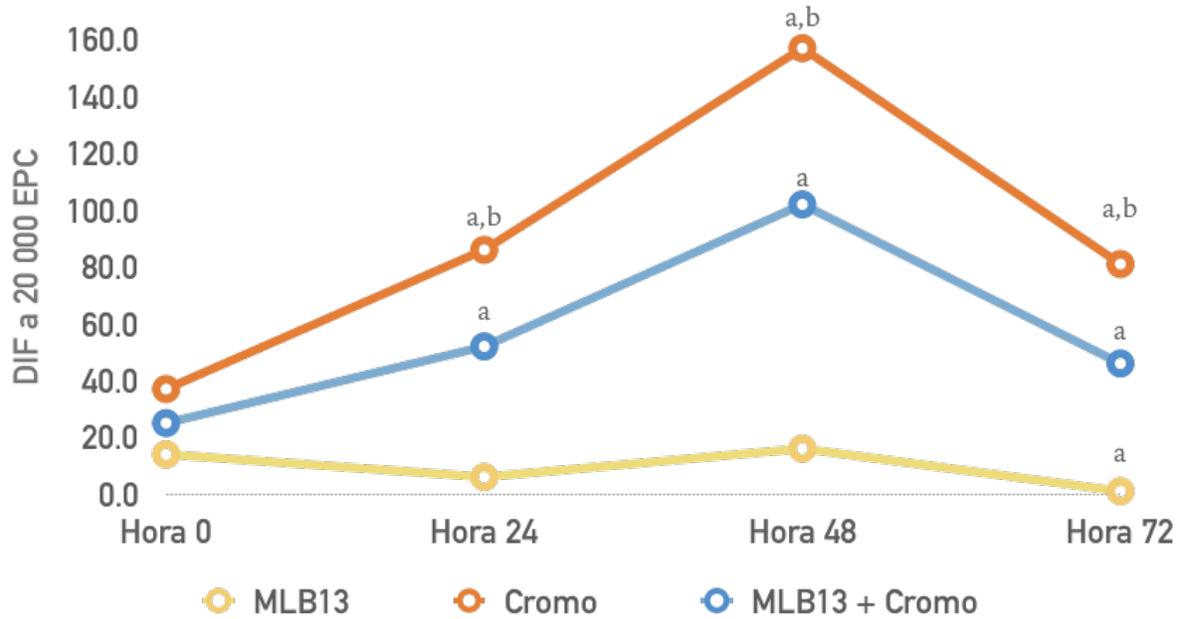


Figura 20. DIF absoluto calculado por tiempo y grupos de hembras para 20 000 EPC en el tratamiento de quinazolina MLB13. $p < 0.05$; ^ap: vs hora 0; ^bp: vs. MLB13 + CrO₃.

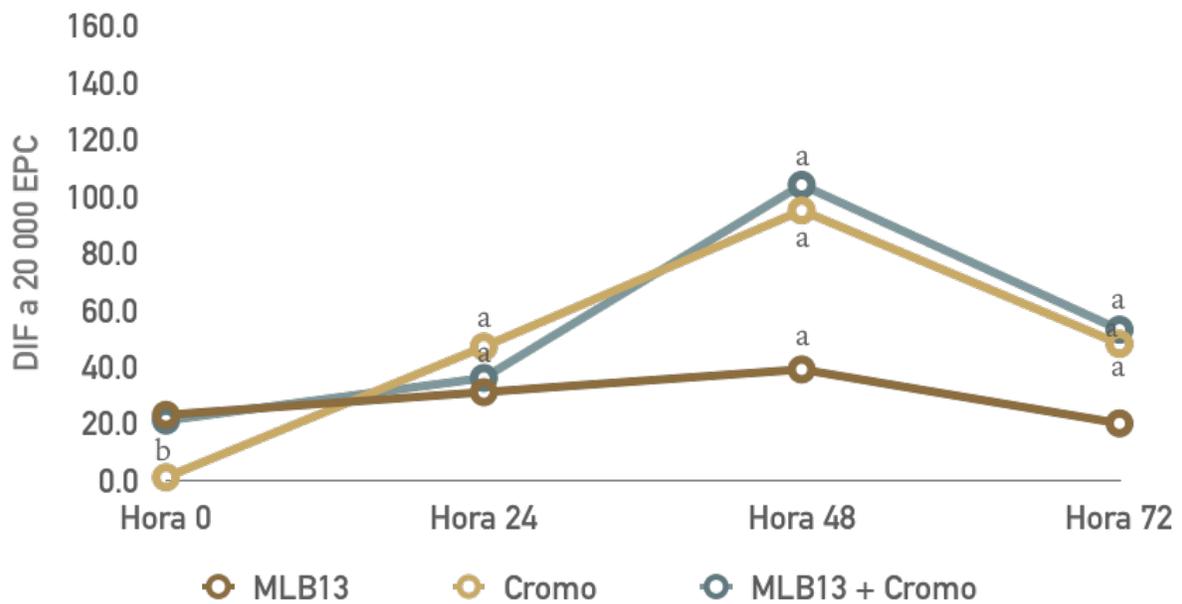


Figura 21. DIF absoluto calculado por tiempo y grupos de machos para 20 000 EPC en el tratamiento de quinazolina MLB13. $p < 0.05$; ^ap: vs hora 0; ^bp: vs. MLB13 + CrO₃.

2. Evaluación de apoptosis y necrosis

2.1. QUINAZOLINA MLB02

En el cuadro 7 se muestran los promedios con su desviación estándar de células sanas, apoptóticas tempranas y tardías, y necróticas en hembras cuando se administraron los tratamientos de la quinazolina MLB02 y el CrO_3 . Se observó que las células apoptóticas tempranas no varían de forma estadísticamente significativa, de igual forma no se observa efecto sobre las células apoptóticas tardías en ninguno de los tratamientos. Mientras que, para la incidencia de células necróticas se observó un aumento en el tratamiento de testigo DMSO comparado contra testigo agua, y también en el grupo CrO_3 contra el testigo agua. En el cuadro 8 se muestran los promedios de apoptosis y necrosis para el grupo de machos. El grupo CrO_3 muestra una disminución significativa en las células sanas contra el grupo combinado, y aumento en las células apoptóticas tempranas comparando contra el testigo agua. Se observa que la quinazolina MLB02 ejerció efecto sobre la inducción de apoptosis ocasionada por el CrO_3 al disminuirla de manera significativa en la combinación de los tratamientos en comparación con el grupo CrO_3 . Se resalta que la administración de la quinazolina sola produce, tanto aumento en la apoptosis tardía, como para las células necróticas, y amplifica la acción del CrO_3 sobre la necrosis.

Cuadro 7. Promedios y desviación estándar de las frecuencias de células normales o sanas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas para el grupo de hembras.

Grupo	Dosis mg/kg	N	SANAS $\bar{x} \pm d. e.$	APOPTÓTICAS TEMPRANAS $\bar{x} \pm d. e.$	APOPTÓTICAS TARDÍAS $\bar{x} \pm d. e.$	NECRÓTICAS $\bar{x} \pm d. e.$
Agua		5	259.8 \pm 5.4	37.0 \pm 5.1	0.2 \pm 0.4	3.0 \pm 1.4
DMSO		5	254.8 \pm 5.0	38.8 \pm 5.4	0.6 \pm 0.5	5.8 \pm 0.8 ^a
MLB02	10	5	247.2 \pm 3.6	43.6 \pm 3.5	0.6 \pm 0.9	8.6 \pm 3.3
CrO₃	20	5	249.0 \pm 6.8	43.2 \pm 4.5	0.0 \pm 0.0	7.8 \pm 3.3 ^a
MLB02 + CrO₃	10-20	5	248.8 \pm 7.6	43.2 \pm 4.5	0.2 \pm 0.4	7.8 \pm 3.9

Significancia estadística $p < 0.05$; ^ap: vs Testigo Agua. Se evaluaron 300 células nucleadas por ratón.

Cuadro 8. Promedios y desviación estándar de las frecuencias de células normales o sanas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas para el grupo de machos.

Grupo	Dosis mg/kg	N	SANAS $\bar{x} \pm d. e.$	APOPTÓTICAS TEMPRANAS $\bar{x} \pm d. e.$	APOPTÓTICAS TARDÍAS $\bar{x} \pm d. e.$	NECRÓTICAS $\bar{x} \pm d. e.$
Agua		5	232.4 \pm 10.8	64.4 \pm 10.7	0.0 \pm 0.0	3.2 \pm 1.8
DMSO		5	257.4 \pm 5.7	39.0 \pm 4.1 ^a	0.2 \pm 0.4	3.4 \pm 2.1
MLB02	10	5	245.2 \pm 4.1	44.8 \pm 4.5	1.4 \pm 1.7 ^b	8.6 \pm 1.5 ^b
CrO₃	20	5	215.8 \pm 15.2 ^c	8.4 \pm 15.3 ^a	0.4 \pm 0.5	5.4 \pm 2.2
MLB02 + CrO₃	10-20	5	244.8 \pm 6.5	47.2 \pm 3.1 ^c	0.4 \pm 0.9	7.6 \pm 3.0 ^b

Significancia estadística $p < 0.05$; ^ap: vs Testigo Agua; ^bp: vs Testigo DMSO; ^cp: vs MLB02 + CrO₃. Se evaluaron 300 células nucleadas por ratón.

2.2. QUINAZOLINA MLB13

En el cuadro 9 se muestran los resultados de células sanas, apoptóticas tempranas y tardías, y necróticas en hembras cuando se administraron los tratamientos de la quinazolina MLB13 y el CrO₃. La frecuencia de células apoptóticas tempranas disminuye ampliamente para el tratamiento de quinazolina sola, e incrementa de forma estadísticamente significativa con la administración del CrO₃, comparado contra sus respectivos testigos. Ninguno de los tratamientos administrados mostró efecto sobre la frecuencia de células apoptóticas tardías. En relación a las células necróticas, la frecuencia no varía de manera significativa en ninguno de los tratamientos. En el cuadro 10 se muestran los resultados de apoptosis y necrosis para los tratamientos de machos. La frecuencia de células apoptóticas tempranas incrementa de forma estadísticamente significativa en el tratamiento de la quinazolina MLB13, comparado contra su testigo DMSO. Al igual que en hembras, los tratamientos administrados no mostraron efecto sobre la frecuencia de células apoptóticas tardías. Para las frecuencias de células necróticas hubo un aumento que resultó significativo en el grupo combinado al comparar con el testigo DMSO.

Cuadro 9. Promedios y desviación estándar de las frecuencias de células normales o sanas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas para el grupo de hembras

Grupo	Dosis mg/kg	N	SANAS $\bar{x} \pm d. e.$	APOPTÓTICAS TEMPRANAS $\bar{x} \pm d. e.$	APOPTÓTICAS TARDÍAS $\bar{x} \pm d. e.$	NECRÓTICAS $\bar{x} \pm d. e.$
Agua		5	260.2 ± 19.3	36.2 ± 17.7	0.0 ± 0.0	3.6 ± 2.9
DMSO		5	260.6 ± 6.4	37.8 ± 7.2	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.9
MLB13	10	5	281.4 ± 4.3	17.0 ± 4.7 ^b	0.0 ± 0.0	1.6 ± 1.5
CrO₃	20	5	249.4 ± 13.9	45.6 ± 15.1 ^a	0.2 ± 0.4	4.8 ± 1.3
MLB13 + CrO₃	10-20	5	249.0 ± 13.2	45.8 ± 13.3	0.4 ± 0.5	4.8 ± 1.5

Significancia estadística $p < 0.05$; ^ap: vs Testigo Agua; ^bp: vs Testigo DMSO. Se evaluaron 300 células nucleadas por ratón.

Cuadro 10. Promedios y desviación estándar de las frecuencias de células normales o sanas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas para el grupo de machos.

Grupo	Dosis mg/kg	N	SANAS $\bar{x} \pm d. e.$	APOPTÓTICAS TEMPRANAS $\bar{x} \pm d. e.$	APOPTÓTICAS TARDÍAS $\bar{x} \pm d. e.$	NECRÓTICAS $\bar{x} \pm d. e.$
Agua		5	257.8 \pm 5.4	39.0 \pm 4.1	0.2 \pm 0.4	3.0 \pm 1.9
DMSO		5	255.2 \pm 6.7	41.2 \pm 6.4	0.2 \pm 0.4	3.4 \pm 0.5
MLB13	10	5	249.6 \pm 6.4	47.8 \pm 6.0 ^b	0.4 \pm 0.5	2.2 \pm 1.3
CrO₃	20	5	253.6 \pm 3.0	40.8 \pm 3.4	0.4 \pm 0.9	5.2 \pm 2.2
MLB13 + CrO₃	10-20	5	254.4 \pm 11.9	39.0 \pm 9.5	0.6 \pm 0.5	6.0 \pm 4.0 ^b

Significancia estadística $p < 0.05$; ^bp: vs Testigo DMSO. Se evaluaron 300 células nucleadas por ratón.

3. Evaluación del daño citotóxico

3.1. RELACIÓN EPC/ENC

3.1.1. QUINAZOLINA MLB02

En el cuadro 11 se presentan los promedios con su desviación estándar de las frecuencias de EPC con respecto a la frecuencia de ENC, evaluados en sangre periférica de las 0 a las 72 horas en los grupos de hembras para el tratamiento de la quinazolina MLB02 y el CrO₃. Únicamente a la hora 48 del grupo tratado con la quinazolina MLB02 se observa un aumento estadísticamente significativo de EPC al comparar contra su propia hora 0. En el cuadro 12 se muestran los promedios de EPC para el grupo de machos. El grupo de DMSO y quinazolina MLB02 únicamente presentan diferencias en la frecuencia de EPC contra su hora 0.

Cuadro 11. Promedios y desviación estándar de las frecuencias de EPC en relación con ENC para el grupo de hembras tratadas con quinazolina MLB02.

Tratamiento	Dosis	N	Hora	EPC/ 4000 células (media \pm d.e.)
Testigo agua	---	5	0	139.8 \pm 22.1
			24	142.3 \pm 8.9
			48	154.4 \pm 6.2
			72	175.4 \pm 18.5
Testigo DMSO (11.5%)	---	5	0	158.6 \pm 29.3
			24	174.4 \pm 17.5
			48	161.0 \pm 18.7
			72	173.0 \pm 4.6
MLB02	10 mg/kg	5	0	161.3 \pm 8.1
			24	171.4 \pm 14.2
			48	195.0 \pm 10.3 ^a
			72	201.4 \pm 14.5
CrO ₃	20 mg/kg	5	0	147.8 \pm 18.1
			24	168.6 \pm 16.8
			48	176.6 \pm 20.4
			72	165.4 \pm 7.8
MLB02-CrO ₃	10-20 mg/kg	5	0	127.8 \pm 12.7
			24	153.8 \pm 24.4
			48	175.4 \pm 35.5
			72	158.0 \pm 20.0

Significancia estadística $p < 0.05$; ^ap: vs Hora 0.

Cuadro 12. Promedios y desviación estándar de las frecuencias de EPC en relación con ENC para el grupo de machos tratados con quinazolina MLB02.

Tratamiento	Dosis	N	Hora	EPC/ 4000 células (media ± d.e.)
Testigo agua	---	5	0	149.8 ± 27.5
			24	153.5 ± 18.2
			48	157.3 ± 11.4
			72	183.0 ± 16.2
Testigo DMSO (11.5%)	---	5	0	98.4 ± 4.8
			24	131.0 ± 14.7
			48	152.4 ± 18.0 ^a
			72	164.8 ± 20.0 ^a
MLB02	10 mg/kg	5	0	129.2 ± 9.6
			24	159.0 ± 12.0
			48	148.8 ± 16.7
			72	176.0 ± 17.0 ^a
CrO ₃	20 mg/kg	5	0	161.4 ± 33.2
			24	155.4 ± 21.6
			48	178.6 ± 16.9
			72	153.6 ± 27.5
MLB02-CrO ₃	10-20 mg/kg	5	0	162.6 ± 21.1
			24	152.2 ± 20.6
			48	153.4 ± 10.9
			72	183.0 ± 17.4

Significancia estadística $p < 0.05$; ^ap: vs Hora 0.

3.1.2. QUINAZOLINA MLB13

En el cuadro 13 se muestran los promedios con su desviación estándar de las frecuencias de EPC/ENC, evaluados de las 0 a las 72 horas en los grupos de hembras tratados con la quinazolina MLB13 y CrO_3 . Sólo se observa aumento significativo en la frecuencia de EPC en la hora 72 del grupo tratado con el testigo DMSO al comparar contra su hora 0. El cuadro 14 muestra los promedios para el grupo de machos. Resultó ser el tratamiento con más variaciones en los grupos de agua y cromo, al existir aumento de EPC en las horas 48 y 72 en ambos tratamientos al comparar contra su hora 0. De igual modo en la hora 48 del grupo de MLB13 se observó incremento de EPC contra su hora 0.

Cuadro 13. Promedios y desviación estándar de las frecuencias de EPC en relación con ENC para el grupo de hembras tratadas con quinazolina MLB13.

Tratamiento	Dosis	N	Hora	EPC/ 4000 células (media ± d.e.)
Testigo agua	---	5	0	171.0 ± 38.7
			24	162.6 ± 24.6
			48	181.8 ± 34.7
			72	208.6 ± 33.1
Testigo DMSO (11.5%)	---	5	0	113.4 ± 13.7
			24	123.6 ± 20.3
			48	147.8 ± 24.4
			72	177.8 ± 17.7 ^a
MLB13	10 mg/kg	5	0	153.4 ± 25.4
			24	115.4 ± 25.4
			48	138.8 ± 23.8
			72	149.6 ± 34.8
CrO ₃	20 mg/kg	5	0	161.2 ± 17.7
			24	176.6 ± 18.7
			48	170.6 ± 13.0
			72	172.6 ± 18.0
MLB13-CrO ₃	10-20 mg/kg	5	0	143.8 ± 22.1
			24	122.4 ± 19.0
			48	141.0 ± 19.5
			72	130.6 ± 16.9

Significancia estadística p<0.05; ^ap: vs Hora 0.

Cuadro 14. Promedios y desviación estándar de las frecuencias de EPC en relación con ENC para el grupo de machos tratados con quinazolina MLB13.

Tratamiento	Dosis	N	Hora	EPC/ 4000 células (media ± d.e.)
AGUA	0.25 ml	5	0	166.4 ± 26.0
			24	164.8 ± 7.6
			48	184.8 ± 8.6 ^a
			72	209.4 ± 13.7 ^a
DMSO	0.25 ml	5	0	98.4 ± 4.8
			24	131.0 ± 14.7
			48	152.4 ± 18.0
			72	164.8 ± 19.9
MLB13	10 mg/kg	5	0	148.6 ± 23.7
			24	163.2 ± 29.0
			48	195.2 ± 23.1 ^a
			72	176.2 ± 12.7
CrO ₃	20 mg/kg	5	0	105.4 ± 9.0
			24	133.4 ± 12.7
			48	182.6 ± 16.0 ^a
			72	170.2 ± 28.5 ^a
MLB13-CrO ₃	10-20 mg/kg	5	0	165.4 ± 37.2
			24	177.0 ± 24.9
			48	177.2 ± 12.0
			72	183.2 ± 16.5

Significancia estadística p<0.05; ^ap: vs Hora 0.

3.2. VIABILIDAD CELULAR

A causa de la alta variabilidad en los resultados obtenidos en la relación de EPC/ENC se realizó otro análisis para obtener datos más confiables respecto a la citotoxicidad. Se utilizó la técnica basada en la tinción diferencial de los fluorocromos Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio (NA/BrEt), en donde el NA únicamente se introduce a las células vivas (viables) y el BrEt se introduce a células muertas (no viables) (McGahon *et al.*, 1995; García-Rodríguez *et al.*, 2013).

3.2.1. QUINAZOLINA MLB02

En la Figura 22 se muestran los resultados para viabilidad celular en los tratamientos de la quinazolina MLB02 y el CrO_3 para los grupo de hembras. La quinazolina MLB02 disminuye las células viables, aunque no de manera significativa al comparar con el testigo DMSO. Mientras que el grupo tratado con CrO_3 presentó disminución en la viabilidad celular al comparar con el testigo agua. Cuando se administró el tratamiento combinado se observó aumento significativo contra el testigo agua y similitud de células no viables con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 , lo cual sugiere que la MLB02 no ejerce acción sobre el efecto del CrO_3 en la viabilidad celular. En la Figura 23 se muestra que la quinazolina MLB02 sola también disminuye la viabilidad celular en los machos, en este caso la disminución en la viabilidad celular si resulta significativa contra el testigo DMSO. Al mismo tiempo que aumenta la citotoxicidad ya ejercida por el CrO_3 al combinar los tratamientos y muestra aumento significativo contra el testigo agua.

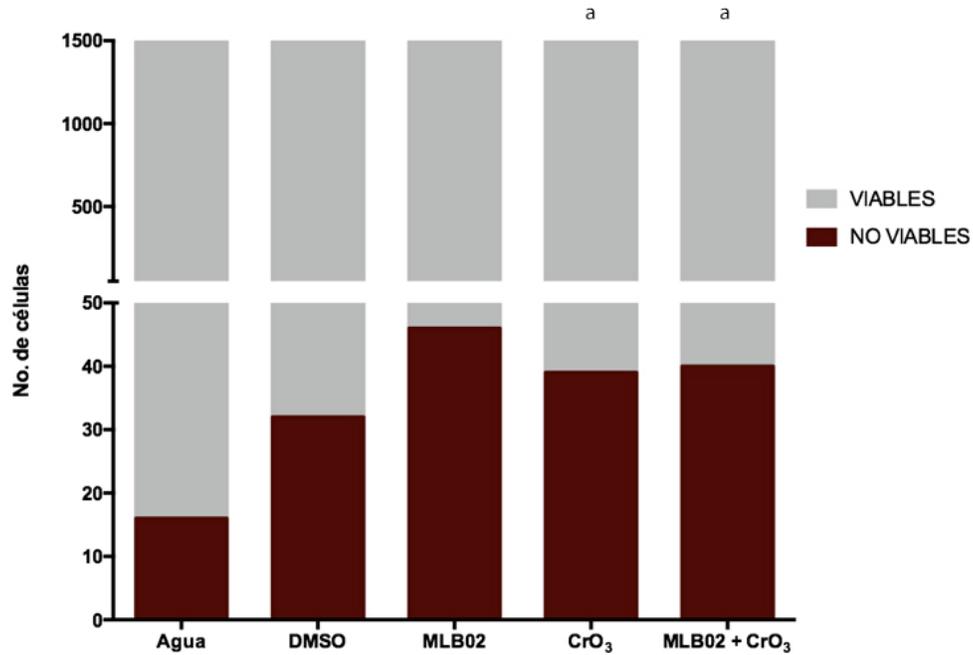


Figura 22. Frecuencia de células viables y no viables en ratones hembra tratados con la quinazolina MLB02. $p < 0.05$; ^ap: vs Testigo agua.

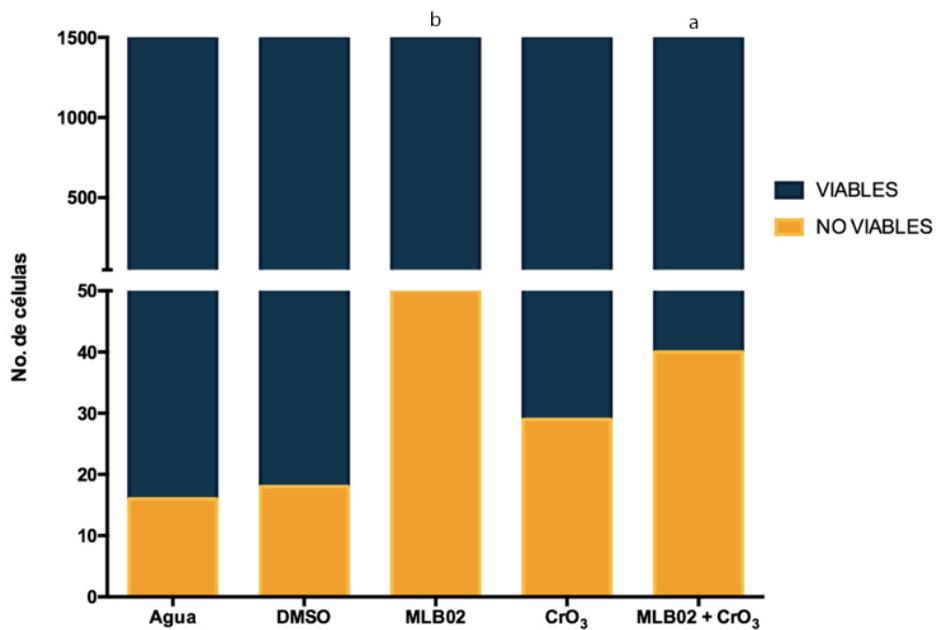


Figura 23. Frecuencia de células viables y no viables en ratones macho tratados con la quinazolina MLB02. $p < 0.05$; ^ap: vs Testigo agua; ^bp: vs Testigo DMSO.

3.2.2. QUINAZOLINA MLB13

En la Figura 24 se muestran las células viables y no viables obtenidas del análisis de viabilidad celular cuando se administraron los tratamientos de la quinazolina MLB13 y el CrO_3 . La quinazolina MLB13 no mostró citotoxicidad aparente. Mientras que en el grupo tratado con CrO_3 se observó disminución de células viables e incremento de células no viables. Cuando se administró el tratamiento combinado se observó similitud en la viabilidad celular con respecto al grupo tratado solo con CrO_3 , lo cual sugiere que la quinazolina MLB13 no tiene efecto sobre la citotoxicidad inducida por el CrO_3 en este grupo. En la Figura 25 se muestran los resultados de viabilidad celular para los grupos de machos. Se observa que la administración sola de la quinazolina MLB13 aumenta las células viables comparando con el testigo DMSO. Por su parte, el grupo tratado con CrO_3 , mostró incremento de células no viables, aunque no produce diferencias significativas. Para cuando se combinaron los tratamientos, la quinazolina MLB13 incrementó la citotoxicidad ejercida por acción del CrO_3 , dando como resultado el aumento de células no viables que resultó significativo al comparar con los testigos agua y DMSO.

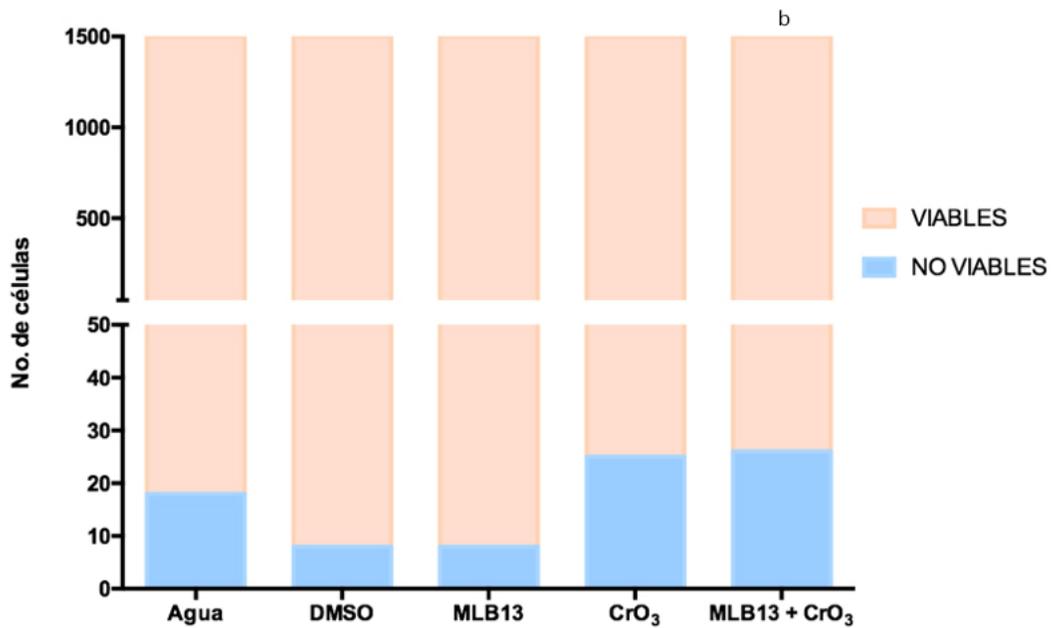


Figura 24. Frecuencia de células viables y no viables en ratones hembra tratados con la quinazolina MLB13. $p < 0.05$; ^ap: vs Testigo agua; ^bp: vs Testigo DMSO

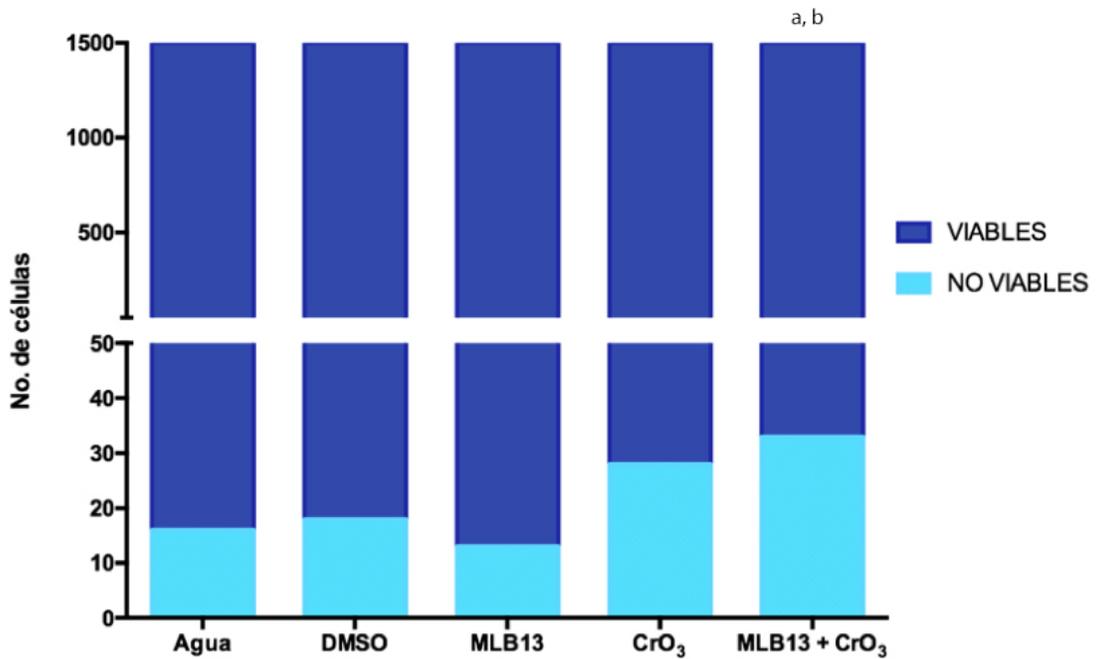


Figura 25. Frecuencia de células viables y no viables en ratones macho tratados con la quinazolina MLB13. $p < 0.05$; ^ap: vs Testigo agua; ^bp: vs Testigo DMSO

VII. DISCUSIÓN

La malaria y la leishmaniasis son causantes de numerosas defunciones tanto en México como a nivel mundial, en algunas zonas han mostrado un incremento en su incidencia y mortandad debido a la resistencia que las cepas de los parásitos protozarios *Plasmodium* y *Leishmania* generan hacia los medicamentos antipalúdicos y a los antimoniales, respectivamente, así como la tolerancia de los mosquitos vectores hacia los insecticidas (WHO, 2010). Se calcula que la malaria afecta mundialmente entre 300 y 500 millones de personas y causa la muerte de más de 1 millón cada año, en su mayoría, niños por debajo de los 5 años. Predomina en el continente africano, sin embargo, México y otros países de Latinoamérica también presentan zonas con alta incidencia. Se calcula que cerca del 40% de la población mundial está en riesgo de padecer la afección en cualquier momento de su vida (Nafo-Traore, 2005; Fuentes *et al.*, 2006). Por su parte, se estima una prevalencia mundial de 20 millones de casos de leishmaniasis, y se calcula que la incidencia anual oscila entre 1.5 y 2 millones de nuevos casos (Pan American Health Organization, 2008). En México se han logrado controlar las transmisiones, aunque en algunos estados aún siguen siendo un problema de salud pública, en el año 2013 se presentaron 495 casos de malaria, y para el año 2014 la incidencia incrementó a 656 en zonas como Chiapas y al sur de Oaxaca, al noroeste del país, y en los estados de Chihuahua, Sinaloa, Sonora y Durango (World Malaria Report, 2015). La leishmaniasis representa una incidencia de 490 casos anuales, afectando a estados del sureste correspondientes a la zona neotropical (Sosa *et al.*, 2014).

Los compuestos más empleados para los tratamientos contra la malaria son los alcaloides extraídos del árbol de la quina, principalmente la quinina por su mayor eficacia (Cuvi, 2009). Mientras que para combatir a ciertas cepas de los parásitos causantes de leishmaniasis han sido utilizados compuestos antimoniales pentavalentes (WHO, 2010). Sin embargo, se ha comprobado que a ciertas dosis estos compuestos resultan tóxicos (Redolar, 2012). Datos clínicos sobre el uso de la quinina revelan que puede ser administrada a modo de medicación contra plasmodios resistentes a la cloroquina (análogo sintético de la quinina), en combinación con otros fármacos como *Tetraciclina*®. La quinina no puede

emplearse conjuntamente con la cloroquina para potenciar los efectos, dado el riesgo de generar convulsiones (WHO, 2001). Algunos tratamientos han conseguido combatir y contener en cierta medida a estas enfermedades, aunque de manera contraproducente, se llegan a generar efectos adversos y no resultan del todo eficientes.

El continente africano es el que muestra más casos de malaria, estudios sobre esta enfermedad señalan que la cepa *Plasmodium falciparum* ha presentado tolerancia a la quinina, los datos de un estudio en Camboya revelaron que al aplicar terapia con quinina sólo un 60% de los pacientes fueron curados (Barat y Bloland, 1997). Otros casos clínicos fundamentan que utilizando como fármaco antimalárico a la Pirimetamina-sulfadoxina (*Fansidar*®), presenta desempeño de acción lenta, razón por la que se optó por combinar al compuesto con quinina para generar una acción más rápida y así suprimir el paludismo producido por *Plasmodium falciparum*. De este modo se logra eliminar a esta cepa, pero el tratamiento no presenta efectividad contra algunas cepas parasitarias; no se logra contrarrestar la infección para la cepa con la mayor incidencia en México, como es la *Plasmodium vivax*. Tampoco demostró ser útil para las epidemias producidas por *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*. Este tipo de tratamientos, además de ser ineficaces, resultan agresivos contra el paciente (Goldsmith, 1998; WHO, 2015).

Para los tratamientos contra leishmaniasis se han utilizado los derivados quinolínicos denominados 2-n-propilquinolona y chimanina D, los cuales produjeron 99% de supresión de leishmaniasis en el bazo de ratones infectados con *Leishmania donovani*. Estos mismos compuestos lograron suprimir el desarrollo de lesiones en ratones infectados con *Leishmania amazonensis* y *Leishmania venezuelensis*, luego de un tratamiento por vía oral, a base de 50 mg/kg/día por 15 días; y se obtuvo mayor efecto al obtenido con el tratamiento convencional a base de antimoniales (Fournet *et al.*, 1996).

El objetivo de la ciencia orgánica en la fabricación de nuevas moléculas es innovar a través de la elaboración de fármacos más potentes y menos agresivos que permitan combatir estas y otras enfermedades (Mouret, 2016). La síntesis de nuevos compuestos a partir de la estructura quinolínica acrecentó el interés debido a las diversas propiedades y expectativas que generaron; partiendo de esto surgen las quinazolininas, como compuestos que han

demostrado una amplia gama de actividades fisiológicas tales como antivirales, antitumorales, antimicrobianos, antimaláricos, anticancerígenos, entre otros (Hassanzadeh *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la presencia del grupo hidroxilo en los compuestos quinolínicos otorga actividad antimalárica contra algunos de los parásitos resistentes, en comparación con sus análogos deshidroxilados (O'Neill *et al.*, 2003). Datos sobre la evaluación de quinazolininas en tratamientos contra leishmaniasis; en particular ocasionada por las cepas *Leishmania donovani* y *Leishmania amazonensis*, han trascendido por compuestos como la 2,4-diaminoquinazolina (Van Horn *et al.*, 2014). El interés de las quinazolininas también abarca sus propiedades como agentes anticancerosos, estos tratamientos han ido en aumento desde el descubrimiento del raltitrexed (Tomudex®) puesto que actúa como fármaco antimetabolito usado en la quimioterapia del cáncer (Khalil *et al.*, 2003). Para el año 2008, el grupo de investigación de Vanelle publicó antecedentes sobre la 4-(4'-fluorofenil)-2-triclorometilquinazolina, ésta exhibía propiedades interesantes como antiplasmodial sobre la cepa de *Plasmodium falciparum* (Verhaeghe, 2008).

Las 2,4,6-triaminoquinazolininas (quinazolininas MLB02 y MLB13) desarrolladas en el departamento de Farmacia de la Facultad de Química han sido puestas a prueba en tratamientos contra malaria y leishmaniasis, demostrando efectos prometedores en pruebas *in vitro* (Mendoza-Martínez *et al.*, 2015; Rojas-Aguirre *et al.*, 2012). En pruebas *in vivo* se determinó que a una dosis de 10 mg/kg las quinazolininas MLB02 y MLB13 no muestran inducción de daño genotóxico mediante la prueba de MN, y con esta misma dosis tampoco se observó daño citotóxico mediante la relación de eritrocitos EPC/ENC, la apoptosis y la viabilidad celular (Hernández-Cruz, 2016). Una vez encontradas las dosis no tóxicas, el siguiente paso fue evaluar el posible efecto antioxidante conferido a las quinazolininas MLB02 y MLB13 mediante la adición de grupos hidroxilo y metoxilo, sobre el daño inducido por compuestos de Cr(VI); se utilizó en particular este compuesto debido a que forma parte de un gran número de agentes a los que estamos expuestos y además tienen una asociación con la inducción de cáncer (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2012). En estudios realizados previamente en nuestro laboratorio se ha demostrado que 20 mg/kg de CrO₃ inducen MN (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

El Cr(VI) es un fuerte agente oxidante, se ha establecido que varios de sus compuestos en forma de óxidos, cromatos y dicromatos, son contaminantes ambientales presentes en agua, suelos y efluentes de industrias, debido a que dicho metal es ampliamente utilizado en distintas actividades manufactureras (Nriagu y Nieoerber, 1988). Se ha propuesto que su toxicidad se debe a que dentro de las células, se reduce a Cr(III) generando intermediarios que, en presencia de H₂O₂ funcionan como catalizadores, generando EROs y RL, con el consecuente estrés oxidativo, produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ácidos nucleicos, entrecruzamientos en las cadenas de ADN, y por lo tanto inducen daño mutagénico y cancerígeno (Liu y Shi, 2001; O'Brien y Patierni, 2003).

Los ratones del presente estudio no mostraron signos de toxicidad aparentes posteriores a la administración de las quinazolinas, tuvieron un comportamiento, apetito, actividad y pelaje normal durante los días de tratamiento. En contraste con los ratones tratados con CrO₃, estos últimos presentaron signos de toxicidad, como disminución de movilidad o pelo erizado, lo cual corrobora el daño genotóxico reportado en estudios para compuestos de Cr(VI) (O'Brien *et al.*, 2003) y en particular para el CrO₃ (García-Rodríguez *et al.*, 2001).

La administración de las quinazolinas únicamente indujo un aumento estadísticamente significativo en las frecuencias de MN en el caso de la MLB02 contra su testigo para el tratamiento de machos a la hora 72 después de realizar el análisis del NIF. El aumento de estas frecuencias, a pesar de resultar significativo mediante el análisis de varianzas, no determina toxicidad; de acuerdo a la FDA, el hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que un resultado es positivo, y además se ha propuesto que un agente genotóxico evidente es aquel que incremente en más de 4 MN por cada 1000 EPC, mientras que el aumento mostrado fue de 5 MN por cada 4000 EPC. Por el contrario, en el caso de la MLB13 para el tratamiento de hembras se disminuyen los promedios de MN a la hora 24 y 72 comparando con su testigo DMSO, el cual generó aumento en las frecuencias contra el testigo agua, y para la MLB02 en el tratamiento de machos hubo disminución a la hora 48 contra su testigo. Estos datos corroboran estudios anteriores en donde se demostró que una dosis de 10 mg/Kg no induce daño genotóxico (FDA, 2000; OECD, 2014; Hernández-Cruz, 2016).

Parte de la inducción de MN mostrada en los tratamientos de quinazolininas pudo deberse a la acción del disolvente; un estudio enfocado a evaluar el efecto del DMSO como vehículo, demostró que los ratones administrados con DMSO, en conjunto con una sustancia tóxica disminuyeron la actividad locomotora, presentaron letargo y disminuyeron la respuesta a estímulos. La sustancia de prueba para este estudio fue la vainillina, que a dosis altas de 1,000 mg/kg y una concentración de 0,5% de DMSO ocasiona la muerte en algunos casos. La alta toxicidad fue atribuida en gran medida a las altas dosis y a la toxicidad inherente de la vainillina, sin embargo, la interacción con un vehículo diferente disminuyó la mortandad en los ratones. Se ha demostrado que los datos de toxicidad de una sustancia de prueba sirven para determinar su valoración de riesgo en la salud humana, pero pueden ser influenciados por los vehículos (Trapero *et al.*, 2012). También se ha comprobado que la toxicidad y la biodisponibilidad de sustancias de prueba pueden ser más altas cuando se administra DMSO respecto a otros vehículos (Prigo *et al.*, 2009). En nuestro estudio a una concentración de 11.5% se observó un incremento en las frecuencias de MN ocasionado por el DMSO en comparación con el testigo agua en la mayoría de los grupos. Para la administración de la quinazolinina MLB13 se observó una disminución de frecuencias contra su grupo testigo para el grupo de hembras, sugiriendo que debido al posible efecto antioxidante que se les ha atribuido a los derivados de quinazolininas, la MLB13 pudo modular la genotoxicidad ocasionada por su vehículo.

Cuando se combinaron los tratamientos de MLB02 y CrO₃, no hubo variabilidad estadísticamente significativa en las frecuencias de MN al comparar con los grupos tratados únicamente con CrO₃, sin embargo, al realizar el análisis del DIF (restando los MN de sus respectivos testigos), las frecuencias del grupo combinado en ambos sexos resultaron moderadamente menores a las del grupo cromo; dichos tratamientos tuvieron un testigo diferente, lo que permite sugerir que el vehículo DMSO tuvo influencia en estos aumentos de MN. De igual forma en el grupo combinado de MLB13, para el caso de hembras ya existía disminución contra el grupo CrO₃, y después del DIF este decremento en las frecuencias resultó aún mayor. No así en la administración en machos, en donde para el análisis del NIF se observó disminución a la hora 24 entre el combinado y el grupo CrO₃, pero no hubo efectos en las demás horas; y después de realizar el DIF, a la hora 48 resulta

mayor la frecuencia de MN en grupo combinado, atribuido posiblemente a que la concentración de la quinazolina disminuye para esa hora después de la administración.

En el presente estudio se observaron efectos que difieren entre hembras y machos, esto se debe a diversos factores, por ejemplo, a que los estrógenos con mayor concentración en hembras pueden actuar como antioxidantes endógenos y proteger contra daño oxidativo mediante la neutralización de RL, y así volver a las hembras menos susceptibles al daño genotóxico. Esta propiedad puede relacionarse con la acción del anillo fenólico en la estructura de los estrógenos que tiene la capacidad de donar hidrógeno y electrones al igual que los radicales hidroxilo (Badeau *et al.*, 2005; Fortoul *et al.*, 2011). En cuanto a la acción de los fármacos, las hembras son más sensibles que los machos, a causa de que las hormonas sexuales masculinas se inducen un efecto estimulante del metabolismo de los mismos. Otro de los motivos por los que los fármacos generan mayor efecto en las hembras es a causa de la intensificación del efecto, debido a que estas poseen mayor proporción de tejido adiposo metabólicamente menos activo (Rang y Dale, 2008).

Las variaciones en las frecuencias de MN que se han distinguido podrían relacionarse con la apoptosis; este mecanismo de muerte celular se ha vinculado con el daño al ADN, mediante la alteración intracelular que puede sensibilizar a la célula a apoptosis. Por otro lado, la apoptosis también es capaz de regular el daño de distintos modos: mediante los factores que aumentan el proceso apoptótico se contribuye a la prevención del surgimiento y desarrollo de tumores y cánceres eliminando células dañadas. En contra parte, la disminución de estos procesos favorece a evitar el origen de enfermedades neurodegenerativas y del sistema inmune (Evan y Vousden, 2001; Lockshin y Sakeri, 2001; García-Rodríguez *et al.*, 2013). Se ha comprobado que el mecanismo inductor de daño del CrO₃ incrementa las células apoptóticas en una dosis de 20 mg/kg (García-Rodríguez *et al.*, 2013). Datos sobre estudios de quinazolinas revelan que pueden inducir apoptosis en células cancerígenas de adenocarcinoma de colon, carcinoma de vejiga y adenocarcinoma de mama (Cubedo, 2006; Shilei *et al.*, 2013). Esta observación permite relacionar los resultados de la MLB13 en machos, donde se aumentó la apoptosis temprana significativamente comparando con su testigo. Por otro lado, el efecto de la MLB13 en

hembras sobre la apoptosis presentó disminución contra su testigo de casi el 50% de células apoptóticas tempranas. Para la quinazolina MLB02 se presentó efecto opuesto, donde una combinación con CrO_3 en los tratamientos de machos generó una disminución significativa de la apoptosis comparando con el grupo CrO_3 , evidenciando su efecto antagónico entre los mecanismos de acción. Estos datos podrían impulsar al estudio de los mecanismos de acción mediante los que las quinazolininas favorecen la eliminación de células dañadas, o por el contrario, a contener los mecanismos de apoptosis como en los tratamientos de afecciones neurodegenerativas.

Al evaluar el efecto citotóxico de los tratamientos mediante las frecuencias de EPC/ENC, se observó alta variabilidad en los datos y las diferencias que resultaron estadísticamente significativas son sólo contra su hora 0. En estudios previos para tratamientos de Cr(VI) no se reportaron efectos sobre las frecuencias de EPC/EPC (García-Rodríguez *et al.*, 2001). La evaluación de este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, se pueden activar los mecanismos de división celular y enmascarar el efecto (Krishna *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 2000). Por lo que decidimos realizar la evaluación de daño citotóxico mediante la técnica descrita por García-Rodríguez *et al.* (2013) para viabilidad celular. Esta técnica se basa en una tinción diferencial con fluorocromos que muestra la absorción diferencial del ADN unido a naranja de acridina o bromuro de etidio emitiendo distintas fluorescencias, permite distinguir las células viables de las no viables basándose en la integridad de la membrana. Los resultados para esta prueba muestran disminución en la viabilidad celular para el CrO_3 que es consistente con el aumento de necrosis que se observó en las evaluaciones. La MLB02 también mostró disminución en la viabilidad celular, relacionado con el aumento de necrosis que generó, si bien podría ser un motivo para considerar a este derivado de quinazolina como citotóxico, también se debe tomar en cuenta que su vehículo DMSO presentó disminución de células viables comparando contra el testigo agua en estos tratamientos. Contrariamente, se observó que la quinazolina MLB13 aumenta la viabilidad celular en hembras y en machos. Para los grupos combinados no se percibieron diferencias evidentes al comparar con el grupo cromo, la única diferencia estadísticamente significativa que se encontró fue al comparar con su testigo DMSO. La disminución en la viabilidad celular en los grupos

combinados se puede atribuir al efecto del DMSO y a la acción del cromo, por lo tanto, se puede sugerir que las quinazolininas no tienen efecto sobre la citotoxicidad.

Las moléculas heterocíclicas, y en particular los compuestos quinolínicos juegan un papel muy importante en el campo de la química médica, estos muestran amplia variedad de actividades con fines terapéuticos. Las nuevas quinazolininas no inducen genotoxicidad, y en particular la MLB13 logró disminuir las frecuencias de MN en los tratamientos de hembras. Sin embargo, la MLB02 si resulta ser citotóxica y aunque no induce genotoxicidad, no logró reducir las frecuencias de MN inducidos por el CrO₃.

Estas nuevas quinazolininas generan grandes expectativas para ser utilizadas en pruebas pre-clínicas, sin embargo, no tienen efecto protector claro como algunos otros antioxidantes probados anteriormente en nuestro laboratorio, como el caso de los polifenoles. Es probable que puedan sustituir en un futuro próximo a los fármacos derivados de la quina que son empleados en diversos tratamientos, pero que al mismo tiempo ocasionan toxicidad, y así poder contrarrestar las infecciones de malaria y leishmaniasis.

VIII. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

- 1.- Las quinazolinas MLB02 y MLB13 no presentan signos clínicos de toxicidad.
- 2.- Los incrementos en las frecuencias de MN observados en los tratamientos de las quinazolinas se encuentran dentro de los rangos aprobados por las agencias reguladoras de sustancias genotóxicas, y fueron muy similares a las observadas en el grupo tratado sólo con el vehículo (DMSO), lo que indica que no son genotóxicas.
- 3.- Se corroboró el daño genotóxico y citotóxico tanto en hembras como en machos tratados con 20 mg/kg de CrO₃, ya que se incrementaron significativamente las frecuencias de MN, células apoptóticas y necróticas.
- 4.- La quinazolina MLB02 no presentó una disminución significativa de la genotoxicidad inducida por acción del CrO₃ en ninguno de los tratamientos. Mientras que, la quinazolina MLB13 si reduce las frecuencias de MN basales y también las inducidas por el CrO₃ en hembras.
- 5.- La quinazolina MLB02 no mostró efecto sobre la apoptosis, pero al combinarla con el tratamiento de CrO₃ se reduce la apoptosis en comparación con el grupo tratado únicamente con el CrO₃ en machos. Sin embargo, la quinazolina MLB13 disminuyó significativamente las células apoptóticas en hembras, y las aumentó en machos.
- 6.- La quinazolina MLB02 mostró efectos citotóxicos, ya que se observó disminución en la viabilidad celular tanto en hembras como en machos. Mientras que la MLB13 no mostró efectos citotóxicos.
- 7.- Se observó un efecto sinérgico en las evaluaciones de viabilidad celular cuando se administraron los tratamientos de la quinazolina MLB02 y CrO₃ en machos.
- 8.- Las quinazolinas MLB02 y MLB13 no mostraron efecto protector claro del daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃ debido a la adición de los grupos antioxidantes a las moléculas. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios en los que se indaguen las posibles vías de protección empleando otros protocolos y otros compuestos

identificados como carcinógenos. Cabe resaltar que al no mostrar genotoxicidad *in vivo*, estos compuestos generan grandes expectativas para ser utilizados en pruebas pre-clínicas como componentes de fármacos contra malaria y leishmaniasis.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abida, Nayar P, Arpanarana, Mohdimran. (2011). An updated review: newer quinazoline derivatives under clinical trial. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2: 1651–1657.
- Adler I, Bootman J, Favor J, Hook G, Schriever G, Welzl G, Whorton E, Yoshimura I, Hayashi M. (1998). Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutation Research*, 417: 19-30.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2008). Toxicological profile for chromium. Public Health Service. Recuperado de <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp7.pdf> _ Revisada el 19 de Diciembre de 2016.
- Alamone M. (1994). Bone Marrow Micronucleus Assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 23: 239-240.
- Ames BN. (1989). What are the major carcinogens in the etiology of human cancer? Environmental pollution, natural carcinogens, and the causes of human cancer: six errors. *Important Advances in Oncology*, 237-247.
- Asif M. (2014). Chemical Characteristics, Synthetic Methods, and Biological Potential of Quinazoline and Quinazolinone Derivatives. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 395637: 1-3.
- Badeau M, Adlercreutz H, Kaihovaara P, Tikkanen MJ. (2005). Estrogen A ring structure and antioxidative effects on lipoproteins. *Journal Steroid Biochemical Molecular Biology*, 96: 271–278.
- Barat LM, Bloland PB. (1997). Drug resistance among malaria and other parasites. *Clinical Infectious Diseases*, 11: 969.
- Baskic D, Popovic S, Ristic P. (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biology International*, 30: 924–932.
- Bridges B, Bowyer E, Hansen A, Wakabayashi K. (1990). The possible involvement of somatic mutations in the development of atherosclerotic plaques. *Mutation Research*, 239: 143-148.
- Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS. (2008). Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infection Diseases*, 46: 165-171.
- Cubedo E, Cordeu L, Bandrés E, Rebollo A, Malumbres R, Sanmartín C, Font M, Palop JA, García-Foncillas J. (2006). New symmetrical quinazoline derivatives selectively induce apoptosis in human cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 5: 850-859.
- Cuví N. (2009). Ciencia e imperialismo en América Latina: la Misión de Cinchona y las estaciones agrícolas cooperativas. Tesis de Doctorado. Universitat Autònoma de Barcelona, pp. 13-35.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. (2007). Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control. *Nature Review Microbiology*, 5: 7–16.
- Cheng B. (2013). Q&A: what is the difference between apoptosis and necrosis. Daily

Q&A. Recuperado de: http://www.symposcium.com/2013/07/qa-what-is-the-difference-between-apoptosis-and-necrosis_ Revisada el 17 de Noviembre de 2016.

- Elis A, Froom P. (2001). Employee exposure to chromium and plasma lipid oxidation. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 7: 206-208.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35: 495-516.
- Environmental Protection Agency (EPA) (1984). Toxicological Review of Hexavalent Chromium. *Environmental Assessment and Criteria Office*. Research Triangle Park, NW.
- Epperson MT, Hadden CE, Waddell TG. (1995). Mechanistic basis for rate enhancements in the methanolysis of aliphatic esters of quinine. *Journal of Organic Chemistry*, 60: 8113-8114.
- Ercal N, Gurer-Ohan H, Aykin-Burns N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I; mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Current Topics in Medical Chemistry*, 1: 529-539.
- Evan G, Littlewood T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281: 1317-1322.
- Evan G, Vousden K. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411: 342-348.
- Finkel T, Holbrook N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408: 239-247.
- Food and Drug Administration (FDA) (2000). Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. *Food and Drug Administration*. USA.
- Fortoul TI, Rodriguez-Lara V, Gonzalez-Villalva A, Rojas-Lemus M, Cano-Gutierrez G, Ustarroz-Cano M, Colin-Barenque L, Montañó LF, García-Pelez I, Bizarro-Nevarés P, Lopez-Valdez N, Jimenez-Martínez RS, Ruiz-Guerrero ML, López-Zepeda LS, Morales-Rivero A, Muñiz-Rivera-Cambas A. (2011). Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *Journal of Biomedical Biotechnology*, 951043.
- Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortiz S, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R. (1996). In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40: 2447-2451.
- Fuentes SM, Ruíz GJ, Sanz J. (2006). Paludismo: un diagnóstico emergente, Estudio descriptivo de 25 casos. *Revista Clínica Española*, 206: 491-494.
- García-Rodríguez MC, Carvente-Juárez M, Altamirano-Lozano M. (2013). Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-Induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. Hindawi Publishing Corporation, 486419.
- García-Rodríguez MC, López-Santiago V, Altamirano-Lozano M. (2001). Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research*, 496: 145-151.
- García-Rodríguez MC, Montañó-Rodríguez A, Altamirano-Lozano M. (2015): Modulation of hexavalent chromium-induced genotoxic damage in peripheral blood of mice by epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its relationship to the

- apoptotic activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*.
- García-Rodríguez MC, Nicolás-Méndez T, Montaña-Rodríguez A, Altamirano-Lozano M. (2014) Antigenotoxic Effects of (–)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), Quercetin, and Rutin on Chromium Trioxide-Induced Micronuclei in the Polychromatic Erythrocytes of Mouse Peripheral Blood, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 77:6, 324-336.
 - García-Rodríguez MC, Vilches-Larrea R, Nicolás-Méndez T, Altamirano-Lozano M. (2012). El té verde en la quimiopreención in vivo del daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (cromo[VI]). *Nutricion Hospitalaria*, 27: 1204-1212.
 - García-Rodríguez MC, y Altamirano-Lozano M. (2001). Sales de sodio y cobre de la clorofila; usos, aplicaciones terapéuticas, actividad antimutágena y anticancerígena. © TIP *Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas*, 4: 77-86.
 - Goldman L, Schafer A. (2013). Cecil y Goldman Tratado de medicina interna. Ed Elsevier, España. pp. 95-98.
 - Goldsmith R. (1998). Antiprotozoarios. *Farmacología Básica y Clínica*. Ed El Manual Moderno. México, pp. 972-973.
 - Gundla, R, Kazemi R, Sanam R, Muttineni R, Sarma J, Dayam R, Neamati N. (2008). Discovery of Novel Small-Molecule Inhibitors of Human Epidermal Growth Factor Receptor-2: Combined Ligand and Target-Based approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51: 3367-3377.
 - Gutteridge J, Halliwell B. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18: 125-126.
 - Harim E. (2013). Síntesis de quinazolininas 2,4-disustituídas a partir de reacciones de cicloadición tipo Diels-Alder. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de México, pp. 2,3.
 - Hassanzadeh F, Jafari, E, Hakimelahi GH, Rahmani Khajouei M, Jalali M, Khodarahmi G. (2012). Antibacterial, antifungal and cytotoxic evaluation of some new quinazolinone derivatives. *Pharmaceutical Research*, 7: 87–94.
 - Hayashi M, McGregor J, Gartehouse D, Adler I, Blaker D, Derting S, Krishna G, Morita T, Ruso A, Suto S. (2000). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol desing including repeated treatment, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 234-252.
 - Hayashi, M, Morita, T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, 245: 245-249.
 - Heddle J, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor J, Newell G, Salamone M. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. *Mutation Research*, 123: 61-118.
 - Hemberg S. (1988). Occupational medicine: principles and practical applications. Ed. Chicago Mosby, New York. pp. 56.
 - Hernández G, Moreno A. (2011). Tratado de Medicina Farmacéutica. Ed Panamericana, España, pp. 155-157, 181.
 - Hernández-Cruz E. (2016). Efecto genotóxico y citotóxico de nuevos compuestos quinolínicos (quinazolininas MLB01, MLB02 y MLB13) en sangre periférica de

- ratones: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 39-46.
- Hodge W. (1947). Wartime cinchona procurement in Latin America. *Economic Botany*, 2: 229-257.
 - Jiménez B. (2005). La contaminación en México: causas, efectos y tecnología apropiada. Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA, Ed. Limusa, p. 47.
 - Jones D. (2006). Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8: 1865-1879.
 - Karlsson KK, Hellgren U, Alvan G, Rombo L. (1990). Audiometry as a possible indicator of quinine plasma concentration during treatment of malaria. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 765-767.
 - Khalil A, Abdel hamide S, Al-Obaid A, El-subbagh H. (2003). Substituted quinazolinones, Part2. Synthesis and in-vitro anticancer evaluation of new 2-substituted mercapto-3H-quinazoline analogs. *Archiv der Pharmazie Medicinal Chemistry*, 2: 95-103.
 - Kouznetsov V, Amado D. (2008). Antimaláricos: construcción de híbridos moleculares de la cloroquina, *Universitas scientarum*, 13: 306-320.
 - Kouznetsov V, Palma AR. (1997). Química básica de los heterociclos y su importancia práctica. Ediciones UIS, Colombia, pp. 196.
 - Kouznetsov V, Vargas Méndez LY, Meléndez Gómez CM, (2005). Recent progress in the synthesis of quinolines. *Current Organic Chemistry*, 9: 141- 161.
 - Krishna G, Hayashi M. (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, 455: 155-166.
 - Krishna G, Nath J, Ong T. (1986) Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in mice by vitamin C. *Cancer Research*, 46: 2670-2674.
 - Kumate J, Muñoz H, Santos J, Solórzano F, Miranda MG. (2001). Paludismo, Leishmaniosis. En: Manual de infectología clínica. Ed. Méndez. México, pp. 651-661, 671-682.
 - Liu KJ, Shi X. (2001). In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222: 41-47.
 - Lockshin R, Zakeri Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2: 545-550.
 - Matheus T, Bolaños A. (2014). Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*, 18: 18-26.
 - McGahon AJ, Martín SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. (1995). The end of the (cell) Line: Methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods in Cell Biology*, 46: 153-185.
 - Meléndez-Gómez C, Kouznetsov VV. (2016). Alcaloides quinolínicos: importancia biológica y esfuerzos sintéticos. *Revista de la Facultad de Ciencias*, Colombia. 10: 5-18.
 - Mendoza-Martinez C, Galindo-Sevilla N, Correa-Basurto J, Ugalde-Saldivar VM, Rodríguez-Delgado RG, Hernández-Pineda J, Padierna-Mota C, Flores-Alamo M, Hernández-Luis F. (2015). Antileishmanial activity of quinazoline derivatives: Synthesis, docking screens, molecular dynamic simulations and electrochemical studies. *European*

- Journal of Medicinal Chemistry*, 92: 314-331.
- Mouret C. (2016). Evaluación de la actividad citotóxica de 5 derivados de quinazolina en diferentes líneas celulares. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Müller L, Kikuchi Y, Probst G, Shechtman L, Shimada H, Sofuni T, Tweats D. (1999). ICH harmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Research*, 436: 195-225.
 - Nafo-Traore F, Gautman K, Veneman AM. (2005). World Malaria Report. WHO – UNICEF 2005. Disponible en: http://www.unicef.org/health/index_26448.html _ Revisada el 25 de Septiembre de 2016.
 - Ngan P, Gomes V, Passos M, Ussami K, Campos D, Rocha A, Pereira B. (2007). Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) *Polar Biology*, 30: 209-217.
 - Nriagu JO, Nieoerber E. (1988). Chromium in the Natural and Human Environments. Ed Wiley Interscience, New York, pp. 215-230.
 - O'Brien CS, Patierni S. (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research*, 533: 3-36.
 - O'Neill P, Mukhtar A, Stocks P, Randle L, Hindley S, Ward S, Storr R, Bickley J, O'neil I, Maggs J, Hughes R, Winstanley P, Bray P, Park B. (2003). Isoquine and related amodiaquine analogues: A new generation of improved 4-aminoquinoline antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(23): 4933-4945.
 - Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2014). Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris Test.
 - Pan American Health Organization. (2008). Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) and Sociedad de Pediatría do Estado de Rio de Janeiro (SOPERJ). Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis Control and Research: PAHO/HDM/CD/512-2008. 111-118.
 - Pas M, Milacic R, Drašlar K, Pollak N, Raspor P. (2004). Uptake of chromium (III) and chromium (VI) compounds in the yeast cell structure. *Bio Metals*, 17: 25-33.
 - Poewe W. (2009). Treatments for Parkinson disease-past achievements and current clinical needs. *Neurology*, 72: 65-73.
 - Prigo M, Schumacher RF, Wayne NC, Zeni G. (2009). Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. *Toxicology Letters*, 189: 135-139.
 - Quintanar M, Calderón J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y Aplicaciones. *Rev Educación Bioq*, 28: 89-101.
 - Rang y Dale. (2008). Farmacología, Ed. Elsevier, España, pp. 110.
 - Redolar D. (2012). Cerebro y adicción: neurobiología del refuerzo, Ed. UOC, España, pp. 480.
 - Repetto M. (2009). Toxicología fundamental, Ed. Diaz de Santos, España, pp. 163-165.
 - Roberts MF, Wink M. (1998). Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications, Ed. Plenum Press, New York, pp. 1-6.
 - Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y

- estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30: 36-44.
- Rojas-Aguirre Y, Hernández-Luis F, Mendoza-Martínez C, Patricio-Sotomayor C, Felipe-Aguilar L, Villena F, Castillo I, Gernández DJ, Suwalsky M. (2012). Effects of an antimalarial quinazoline derivate on human erythrocytes and on cell membrane molecular models. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1818: 738-746.
- Roughley SD, Jordan AM. (2011). The medicinal chemist's toolbox: an analysis of reactions used in the pursuit of drug candidates. *Medicinal Chemistry*, 54: 3451-3479.
- Samiran S, Tuhina M, Khairul A, Rajesh R, Bibhas B, Bibhuti S, Ramapada G, Netai P, Subhashis KG, Sourjya K, Dwijadas B, Nahid A. (2005). Leishmania Promastigote Membrane Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunoblotting for Differential Diagnosis of Indian Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis, *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1269-1277.
- Sedelnikova O, Nakamura A, Kovalchuk O, Koturbash I, Mitchell S, y Marino S. (2007). DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Research*, 67: 4295-4302.
- Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-rizi M. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32: 17-20.
- Shilei L, Xiao W, Yong H, Mingxia Z, Yurong C, Jingli X, Man F, Jin C, Hongyu N, Chuanmin Q. (2013). Design and synthesis of novel quinazoline nitrogen mustard derivatives as potential therapeutic agents for cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 67: 293-301.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 945-948.
- Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JL, Reis S, Borges S. (2006). Antioxidant profile of dihydroxy and trihydroxyphenolics acids. A structure-activity relationship study. *Free Radical Research*, 40: 433-442.
- Şişman T, Türkez H. (2010). Toxicologic evaluation of imazalil with particular reference to genotoxic and teratogenic potentials. *Toxicology and Industrial Health*, 26: 641-648.
- Sosa E, Caro J, Zuñiga IR. (2014). Perfil epidemiológico de la leishmaniasis: una enfermedad olvidada en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 34: 31-36.
- Terradas M, Martín M, Tusell L, Genescà A. (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?, *Mutation Research*, 705: 60-67.
- The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT). (1995). The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan. Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10: 153-159.
- Thornalley P, Vasak M. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 827: 36-44.

- Trapero QY, García PM, Aldana VL, Torres AM. (2012). Influencia del vehículo en la toxicidad aguda oral de la vainillina en ratas Sprague Dawley. *Revista Cubana de Toxicología*, 1 (2).
- U.S. Environmental Protection Agency. (U.S. EPA). IRIS Toxicological Review of Hexavalent Chromium (2010 External Review Draft). Recuperado de: http://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/recordisplay.cfm?deid=221433. Revisado el 20 de Diciembre de 2016.
- Valentao P, Fernández E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. (2002). Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusión against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4989- 4993.
- Valko M, Morris H, Cronin MT. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 1161-1208.
- Van Horn KS, Zhu X, Pandharkar T, Yang S, Vesely B, Vanaerschot M, Dujardin JC, Rijal S, Kyle DE, Wang MZ, Werbovets KA, Manetsch R. (2014). Antileishmanial Activity of a Series of N2,N4-Disubstituted Quinazoline-2,4-diamines, *Journal Medicinal Chemistry*, 57: 5141-5156.
- Vega SG. (1985). Toxicología V: Genotoxicidad y daño al sistema reproductor. Organización Panamericana de la Salud, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, México, pp 1-5.
- Verhaeghe P, Azas N, Gasquet M, Hutter S, Ducros C, Laget M, Rault S, Rathelot P, Vanelle P. (2008). Synthesis and antiplasmodial activity of new 4-aryl-2-trichloromethylquinazolines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18: 396-401.
- Winston GW, Di Giulio RT. (1991). Prooxidant and anti-oxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19: 137-161.
- World Health Organization (WHO) (2001). The use of antimalarial drugs: Report of a WHO Informal Consultation. 13-17.
- World Health Organization (WHO) (2003). Chromium in drinking water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. 24-28.
- World Health Organization (WHO). (2010). Control of the leishmaniasis: report of the meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. 22-26.
- World Health Organization (WHO). (2015). World Malaria Report. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/1444852/2/9789241564830_eng.pdf?ua=1 _ Revisada el 13 de Noviembre de 2016.
- World Health Organization (WHO). (2016). Paludismo. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/> _ Revisada el 17 de diciembre de 2016.
- Yeka A, Achan J, D'Alessandro U, Talisuna AO. (2009). Quinine monotherapy for treating uncomplicated malaria in the era of artemisinin-based combination therapy: an appropriate public health policy. *Lancet Infectious Diseases*, 9: 448-452.
- Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28: 227-236.

X. ANEXOS

Los resultados de este trabajo fueron presentados de forma parcial o total en los siguientes eventos académicos:

- 1.1. Evento:** XVIII Foro de Investigación Escolar de Biología
Título de la ponencia: “Efecto de la quinazolina MLB13 sobre el daño genotóxico y citotóxico en ratones tratados con CrO₃”
Organizador: Carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM
Lugar y fecha: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 12 de agosto del 2016
Tipo de participación: PONENTE
- 1.2. Evento:** XXI Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud.
Título de la ponencia: “Efecto de un nuevo compuesto quinolínico (quinazolina MLB13) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por cromo hexavalente en ratones de la cepa Hsd:ICR”
Organizador: La Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y el Departamento de Ciencias de la Salud
Lugar y fecha: Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana de México Iztapalapa 18 de octubre del 2016
Tipo de participación: PONENTE
- 1.3. Evento:** XVII Reunión Internacional de Ciencias Médicas
Título de la ponencia: “Propiedades antigenotóxicas de nuevos fármacos empleados en el tratamiento de la malaria y leishmania al ser administrados a ratones de la cepa Hsd:ICR tratados con cromo hexavalente”
Organizador: Universidad de Guanajuato (Campus León), División Ciencias de la Salud, Departamento de Ciencias Médicas.
Lugar y fecha: Universidad de Guanajuato (Campus León) en proceso 26-28 abril del 2017
Tipo de participación: PONENTE



XVIII FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

del 10 al 12 de AGOSTO de 2016



Efecto de la quinazolina MLB13 sobre el daño genotóxico y citotóxico en ratones tratados con CrO₃

Julio César Olguin-Galindo, Estefani Yaquelin Hernández-Cruz, Francisco Hernández-Luis, Marcela Alejandra López-Sánchez, María del Carmen García-Rodríguez

Modalidad y Ciclo

Por favor marque con una x

	Oral		Básico
X	Cartel		Intermedio
	Video	X	Terminal

Resumen

En la Facultad de Química (UNAM) se sintetizaron nuevos compuestos derivados de las quinazolinas, con el propósito de potenciar sus efectos terapéuticos en el tratamiento de la malaria y la leishmania, aunado a ello en particular a la quinazolina MLB13 se le adicionaron grupos hidroxilo y metoxi para conferirles propiedades antioxidantes. En contra parte los compuestos de cromo hexavalente como el trióxido de cromo (CrO₃) son capaces de inducir daño oxidativo al ADN durante su reducción intracelular a cromo trivalente. En este estudio se evaluó el efecto de la quinazolina MLB13 sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃. Grupos de cinco ratones de la cepa Hsd:ICR fueron divididos en los siguientes grupos: a) testigo 1, se administró sólo el vehículo agua, b) testigo 2, tratado con dimetilsulfóxido (disolvente de quinazolina) por vía i.p., c) quinazolina MLB13, administrada por vía i.p. (10 mg/kg), d) CrO₃, administrado por vía i.p. (20 mg/kg), y e) grupo tratado con MLB13 y CrO₃. Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. Se observó que la administración de quinazolina no incrementa las frecuencias de MN. La administración del CrO₃ incrementa las frecuencias de MN. Cuando se combinaron los tratamientos de quinazolina-CrO₃, se observó una disminución de alrededor del 24% a la hora 48. En cuanto a la apoptosis, se observó que tanto el grupo tratado con CrO₃ como el combinado (MLB13-CrO₃) incrementaron las células apoptóticas. La administración de CrO₃ y quinazolina-CrO₃ modifican la viabilidad celular. A partir de estos resultados se sugiere que la quinazolina MLB13 puede modular parcialmente el daño genotóxico inducido por metales pesados. *Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216 y por la CB-SEP-CONACyT 220664.*

Palabras clave:

Antioxidante, quinazolina, cromo hexavalente, micronúcleos, apoptosis.



MEMORIAS

XXI

*Simposio del Departamento
de Ciencias de la Salud*



UAM *Iztapalapa*

17 al 21 de Octubre, 2016

Sala Sandoval Vallarta

Evaluación de micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular sobre el efecto de quinazolina MLB13 en daño genotóxico y citotóxico inducido por compuestos metálicos de cromo hexavalente en ratones Hsd:ICR

Olguin-Galindo Julio César¹, Hernández-Cruz Estefani Yaquelin¹, Altamirano-Lozano Mario¹, Hernández-Luis Francisco², López-Sánchez Marcela Alejandra² y García-Rodríguez María del Carmen^{1*}.

¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México, D.F. ²Departamento de Farmacia, Facultad de Química. UNAM, México D.F.

*carmen.garcia@unam.mx

En la Facultad de Química (UNAM) se modificaron nuevos compuestos derivados de las quinazolininas, con el propósito de potenciar sus efectos terapéuticos en el tratamiento de malaria y leishmania, así como conferirles propiedades antioxidantes. Como parte de las evaluaciones de nuevos compuestos para uso clínico en este estudio se evaluó el efecto de la quinazolina MLB13 sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por trióxido de cromo (CrO_3). Grupos de cinco ratones de la cepa Hsd:ICR fueron divididos en los siguientes grupos: a) testigo 1, se administró sólo el vehículo agua, b) testigo 2, tratado con dimetilsulfóxido (disolvente de quinazolina) por vía i.p., c) quinazolina MLB13, administrada por vía i.p. 10 mg/kg, d) CrO_3 , administrado por vía i.p. 20 mg/kg y e) grupo combinando tratado con MLB13 y CrO_3 . Para la evaluación de micronúcleos (MN) se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos [1]. Para la evaluación de apoptosis y viabilidad celular se tomaron muestras únicamente a la hora 48 [2]. Se observó que la administración de quinazolina no incrementa las frecuencias de MN. La administración del CrO_3 incrementa las frecuencias de MN. Cuando se combinaron los tratamientos de quinazolina- CrO_3 , se observó una disminución de alrededor del 24% a la hora 48. En cuanto a la apoptosis, se observó que tanto el grupo tratado con CrO_3 como el combinado (MLB13- CrO_3) incrementaron las células apoptóticas. La administración de CrO_3 y quinazolina- CrO_3 modifican la viabilidad celular. A partir de estos resultados se sugiere que la quinazolina MLB13 pueden modular parcialmente el daño genotóxico inducido por metales pesados.

Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN217712.

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

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



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO



26-28 de abril 2017 - León, Guanajuato

XVII Reunión Internacional de Ciencias Médicas

Fecha Límite de Envío de Trabajos: 28 de febrero

Propiedades antigenotóxicas de nuevos fármacos empleados en el tratamiento de la malaria y leishmania al ser administrados a ratones de la cepa Hsd:ICR tratados con cromo hexavalente

Olguin-Galindo Julio César¹, Hernández-Luis Francisco², López-Sánchez Alejandra² y García-Rodríguez María del Carmen^{1,*}. ¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. CDMX, México. ²Departamento de Farmacia, Facultad de Química. UNAM. CDMX, México. *carmen.garcia@unam.mx

Introducción. Se ha propuesto que metales con potencial cancerígeno como los compuestos del cromo hexavalente [Cr(VI)] inducen daño genotóxico mediante estrés oxidativo. Por ello, en la Facultad de Química de la UNAM se sintetizaron las quinazolininas MLB02 y MLB13, a las que se les adicionaron grupos hidroxilo y metoxilo con la finalidad de conferirles propiedades antioxidantes. Estos nuevos compuestos quinolínicos han sido diseñados para ser empleados en los tratamientos de la malaria y leishmania, por lo que además de disminuir su toxicidad y potenciar sus efectos terapéuticos se espera conferirles propiedades antioxidantes.

Objetivo. Estudiar el efecto de las quinazolininas MLB02 y MLB13, sobre la genotoxicidad y citotoxicidad inducida por compuestos de cromo hexavalente mediante el ensayo de micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular.

Métodos. Grupos de cinco ratones hembra fueron divididos de la siguiente manera: a) Testigo agua; b) Testigo DMSO; c) Quinazolininas MLB02 o MLB13; d) CrO₃ y e) Grupo combinado (quinazolininas-CrO₃). Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas. Para evaluar genotoxicidad y citotoxicidad se utilizó la técnica de micronúcleos (MN), propuesta por Hayashi et al. (1990)[1], mientras que apoptosis y viabilidad celular se realizó de acuerdo a la técnica modificada por García-Rodríguez et al., (2013)[2].

Resultados. La administración de la quinazolinina MLB02 no disminuyó las frecuencias de MN inducidos por el CrO₃, mostró citotoxicidad al disminuir la viabilidad celular a causa de un aumento de células necróticas, aunque no tuvo efectos sobre la apoptosis. La quinazolinina MLB13 disminuyó los MN basales y también los inducidos por el CrO₃, sin embargo, no modificó la viabilidad celular, y tampoco tuvo efectos sobre la apoptosis.

Conclusión. La MLB02 no protege contra daño genotóxico ni citotóxico inducido por CrO₃, mientras que la MLB13 disminuyó el daño genotóxico inducido por CrO₃, aunque no mostró efectos sobre la citotoxicidad.

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

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

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