



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN

CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

“APROXIMACIÓN A LA GENOTOXICODINÁMICA DE ANTIMETABOLITOS
ANTINEOPLÁSICOS ANÁLOGOS DE PURINA USANDO COMO REFERENTE LA
ACCIÓN DE LA RADIACIÓN IONIZANTE (^{60}CO)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

PRESENTA

JESÚS QUEZADA VIDAL

COMITÉ TUTORAL

Dr. Pedro Rosendo Morales Ramírez (Codirector)

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz (Codirectora)

Dra. Elsa Cervantes Ríos (Asesora)

Iztapalapa, Ciudad de México, 28 de agosto de 2020

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Radiobiología Celular, del Departamento de Biología del INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES bajo la dirección del Dr. Pedro Rosendo Morales Ramírez. En el laboratorio de Citometría de Flujo del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA bajo la dirección de la Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo de la Dra. Elsa Cervantes Ríos.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 418251, que comprendió del periodo de 01 septiembre de 2015 al 30 de agosto del 2019. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por la Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

Jesús Quezada Vidal

Fecha de aprobación de la tesis: **28 de agosto de 2020**

JURADO:

Presidente: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Secretario: Dr. Pedro Rosendo Morales Ramírez

Vocal: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Vocal: Dra. María del Carmen García Rodríguez

Vocal: Dra. Elsa Cervantes Ríos

Agradecimientos

Al Dr. Pedro Morales Ramírez, por haberme aceptado y dirigir este proyecto de investigación en el laboratorio de Radiobiología celular, por todas sus enseñanzas y sobre todo por su paciencia.

A la Dra. Rocío Ortiz Muñiz y Dra. Elsa Cervantes Ríos haber aceptado ser codirectora y asesora, respectivamente, por sus valiosas sugerencias otorgadas en la realización de este proyecto.

Al INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES, por permitirme realizar la tesis doctoral en el laboratorio de Radiobiología Celular.

A los miembros revisores: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre, Dra. María del Carmen García-Rodríguez, Dra. Elsa Cervantes Ríos, Dra. Elena Aréchaga Ocampo, Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero porque gracias a sus observaciones y sugerencias este trabajo es mejor. Gracias por el tiempo y disposición para este trabajo.

Al grupo de trabajo del laboratorio de Radiobiología Celular del ININ, por su apoyo, consejos y críticas al presente trabajo.

A los técnicos Miguel Ángel García Torres y Faustino Antonio Anastasio Montes por su excelente asistencia técnica.

Especialmente

A mis padres Jesús y Piedad

A mi hermana Guadalupe

A Rubri

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
Abstract	3
Abreviaturas	5
1. Introducción.....	7
2. Antimetabolitos análogos de desoxiadenosina	11
2.1 Antimetabolitos de primera generación	17
2.1.1 Cladribina.....	17
2.1.1.1 Mecanismo celular de acción.....	18
2.1.1.2 Vía CD99	18
2.1.1.3 Vía inhibición de la ribonucleótido reductasa	19
2.1.1.4 Vía inhibición de la ADN polimerasas	20
2.1.1.5 Vía apoptosis	20
2.1.1.6 Vía desmetilación.....	21
2.1.2 Fludarabina	22
2.1.2.1 Mecanismo celular de acción.....	22
2.1.2.2 Vía inhibición de la ribonucleótido reductasa	23
2.1.2.3 Vía inhibición de las ADN polimerasas	23
2.1.2.4 Vía apoptosis	24
2.1.3 Bromodesoxiadenosina	24
2.1.3.1 Mecanismo celular de acción.....	25
2.2 Antimetabolito de segunda generación	26
2.2.1 Clofarabina	26
2.2.1.1 Mecanismo celular de acción.....	27
2.2.1.2 Vía CD99	27

2.2.1.3	Vía inhibición de la ribonucleótido reductasa.....	28
2.2.1.4	Vía inhibición de la ADN polimerasas.....	28
2.2.1.5	Vía apoptosis.....	28
2.2.1.6	Vía metilación.....	29
3.	Micronúcleos.....	31
3.1	Eritropoyesis.....	31
3.2	Inducción de micronúcleos.....	33
3.2.1	Cinética de inducción de EPC-MN en normoblastos de ratón <i>in vivo</i> ...	34
3.2.2	El análisis de las cinéticas de inducción de micronúcleos como una aproximación al estudio de la acción de análogos de la citidina y otros antineoplásicos.....	36
3.2.3	Detección de RET-MN.....	40
3.2.3.1	AntiCD71-FITC.....	42
3.2.3.2	Yoduro de propidio (IP).....	42
4.	Pregunta de investigación.....	43
5.	Objetivo general.....	43
5.1	Objetivos particulares.....	43
6.	Hipótesis.....	44
7.	Justificación.....	44
8.	Material y métodos.....	45
8.1	Reactivos.....	45
8.2	Animales.....	45
8.3	Tratamientos.....	45
8.4	Fijación, marcaje y adquisición de RET-MN.....	47
8.4.1	Fijación.....	47
8.4.2	Marcaje de muestras.....	47

8.4.3	Adquisición de datos	48
8.5	Genotoxicidad	50
8.6	Citotoxicidad	51
8.7	Ajuste de curvas múltiples.....	51
8.8	Estadística	52
9.	Resultados	54
9.1	Controles.....	54
9.2	Antineoplásicos análogos de desoxiadenosina de primera generación	56
9.2.1	Cladribina	56
9.2.2	Fludarabina.....	62
9.2.3	8-Bromodesoxiadenosina	67
9.3	Antineoplásico análogo de desoxiadenosina de segunda generación	72
9.3.1	Clofarabina (ICR).....	72
9.4	Posible mecanismo de acción de la cladribina y clofarabina <i>in vivo</i>	78
9.4.1	Cladribina	78
9.4.2	Clofarabina	79
9.5	Comparación de respuesta de las actividades cito y genotóxicas contra el tiempo entre las cepas ICR y BALB/c.....	81
10.	Discusión.....	95
10.1	Comparación de la respuesta de los diferentes análogos de la adenina.	95
10.2	Comparación de la respuesta citotóxica y genotóxica entre las cepas ICR y BALB/c	103
11.	Conclusiones.....	107
11.1	Conclusión general	108
12.	Perspectivas.....	108
13.	Literatura citada	109
14.	Anexos	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la desoxiadenosina y de sus derivados.....	10
Figura 2. Esquema que representa la acción reportada <i>in vitro</i> de diversos agentes clastógenos sobre el ADN	14
Figura 3. Acción de los análogos de desoxiadenosina en células hematológicas y su tratamiento.....	16
Figura 4. Estructura química de la cladribina	17
Figura 5. Estructura química de la fludarabina.....	22
Figura 6. Estructura química de la 8-bromodesoxiadenosina.....	25
Figura 7. Estructura química de la clofarabina	26
Figura 8. Esquema que representa el mecanismo celular de acción de la 2-CIdA, 2-FA, 8-BrdA y ClFdA <i>in vitro</i> y su posible vía de inducción de micronúcleos.....	30
Figura 9. Esquema que representa la eritropoyesis.	32
Figura 10. Superposición de las cinéticas de inducción de EPC-MN sobre un estudio de radioprotección.	34
Figura 11. Esquema que representa la cinética, la dinámica y la formación de micronúcleos de un agente aneuploidógeno, clastógeno o radiación ionizante	36
Figura 12. Esquema que representa el modo de acción de la azacitidina <i>in vitro</i> y su posible relación con la inducción de micronúcleos <i>in vivo</i>	38
Figura 13. Genotoxicocinéticas causadas por la azacitidina.	39
Figura 14. Incidencia de un haz de luz sobre la célula	41
Figura 15. Esquema que representa la detección de los marcadores antiCD71-FITC y yoduro de propidio mediante el citómetro de flujo.....	49
Figura 16. Citogramas representativos de citometría de flujo.....	50
Figura 17. Ajuste de curvas múltiples..	53
Figura 18. Cinética de inducción de RET-MN / 2000 RET y de la cinética de reducción de RET / 2000 E de los grupos control.	55
Figura 19. Cinéticas de inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 16 o 45 o 190 μ moles/kg pc de 2-CIdA en ratones ICR.....	57
Figura 20. Respuesta genotóxica individual de la dosis alta de cladribina con ajuste de curvas múltiples en ratones ICR.	58

Figura 21. Cinéticas de reducción de RET / 2000 E (%), después de la administración de 16 o 45 o 190 μ moles/kg pc de 2-CIdA.....	60
Figura 22. Curva dosis - respuesta en términos de ABC genotóxica y ABC citotóxica en 72 h causadas por las diferentes dosis de 2-CIdA.	61
Figura 23. Superposición de la genotoxicocinética y de la citotoxicocinética de la dosis de 190 μ moles/kg pc de 2-CIdA.	61
Figura 24. Proporción de la citotoxicidad / genotoxicidad de la dosis de 190 μ moles/kg de 2-CIdA.....	61
Figura 25. Cinéticas de inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 90 o 135 o 175 μ moles/kg pc de 2-FA.	63
Figura 26. Cinéticas de reducción de RET / 2000 E, después de la administración de 90 o 135 o 175 μ moles/kg pc de 2-FA.....	64
Figura 27. Curva dosis-respuestas en términos de ABC genotóxica y ABC citotóxica en 72 horas después del tratamiento con diferentes dosis de 2-FA.....	66
Figura 28. Superposición de la genotoxicocinética y de la citotoxicocinética causada por la dosis de 175 μ moles/kg de 2-FA.....	66
Figura 29. Proporción de la citotoxicidad / genotoxicidad de la dosis de 190 μ moles/kg de 2-FA.....	66
Figura 30. Cinéticas de inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 50 o 100 o 150 μ moles/kg pc de 8-BrdA.....	68
Figura 31. Cinéticas de reducción de RET / 2000 E (%), después de la administración de 50 o 100 o 150 μ moles/kg pc de 8-BrdA.....	69
Figura 32. Curva dosis - respuesta en términos de ABC genotóxica y ABC citotóxica en 72 h causadas por las diferentes dosis de 8-BrdA.	71
Figura 33. Superposición de la genotoxicocinética y de la citotoxicocinética de 150 μ moles/kg pc de 8-BrdA.....	71
Figura 34. Proporción de la citotoxicidad / genotoxicidad de la dosis de 150 μ moles/kg de 8-BrdA.	71
Figura 35. Cinéticas de inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 25 o 50 o 100 μ moles/kg pc de ClFdA.....	73
Figura 36. Respuesta genotóxica individual de la dosis alta de clofarabina con ajuste de curvas múltiples en ratones ICR.....	74

Figura 37. Cinéticas de reducción de RET / 2000 E (%), después de la administración i.p. de 25 o 50 o 100 μ moles/kg pc de ClFdA	76
Figura 38. Curva dosis - respuesta en términos de ABC Genotóxica y ABC citotóxica en 72 h causada por la ClFdA	77
Figura 39. Superposición de la genotoxicocinética y de la citotoxicocinética de la dosis de 100 μ moles/kg de ClFdA.....	77
Figura 40. Proporción de la citotoxicidad / genotoxicidad de la dosis de 100 μ moles/kg de ClFdA.	77
Figura 41. Posible mecanismo de acción citotóxico y genotóxico de la cladribina (190 μ moles/kg pc) y de la clofarabina (100 μ moles/kg pc) <i>in vivo</i>	80
Figura 42. Comparación de las cinéticas de RET-MN, después de la administración de 16 μ moles/kg pc de 2-ClIdA a ratones ICR y ratones BALB/c.....	81
Figura 43. Respuesta genotóxica individual de la dosis baja de cladribina con ajuste de curvas múltiples en ratones ICR y BALB/c.....	82
Figura 44. Comparación de las cinéticas de RET-MN, después de la administración de 90 μ moles/kg pc de 2-FA a ratones ICR y ratones BALB/c	83
Figura 45. Respuesta genotóxica individual de la dosis baja de fludarabina con ajuste de curvas múltiples en ratones ICR y BALB/c.....	84
Figura 46. Comparación de las cinéticas de RET-MN, después de la administración de 50 μ moles/kg pc de 8-BrdA a ratones ICR y ratones BALB/c.....	85
Figura 47. Respuesta genotóxica individual de la dosis baja de 8-BrdA con ajuste de curvas múltiples en ratones ICR y BALB/c..	86
Figura 48. Comparación de las cinéticas d de RET-MN, después de la administración de 25 μ moles/kg pc de ClFdA en ratones ICR y ratones BALB/c.....	87
Figura 49. Respuesta genotóxica individual de la dosis baja de clofarabina con ajuste de curvas múltiples en ratones ICR y BALB/c.....	88
Figura 50. Comparación de las cinéticas de reducción de RET / 2000 E (%) causadas por 2-ClIdA (16 μ moles/kg), 2-FA (90 μ moles/kg), 8-BrdA (50 μ moles/kg) y ClFdA (25 μ moles/kg) en ratones ICR y BALB/c.....	90
Figura 51. Comparación del área bajo curva genotóxica (A) y citotóxica (B) causada por la dosis de 16 μ moles/kg de 2-ClIdA, 90 μ moles/kg de 2-FA, 50 μ moles/kg de 8-BrdA y 25 μ moles/kg de ClFdA en ratones ICR y BALB/c	92

Figura 52. Comparación de la eficiencia genotóxica (ABC-G / dosis) y de la eficiencia citotóxica (ABC-C / dosis) causada por los análogos de desoxiadenosina.....	93
Figura 53. Comparación de la relación dosis respuesta en términos de ABC genotóxica (A) y del ABC citotóxica (B) causada por las dosis de 50, 100 y 150 μ moles/kg de 8-BrdA en 72 h en ratones ICR y BALB/c	94
Figura 54. Retardo en el tiempo de inducción máxima relativa (TIMR) de micronúcleos inducidos por los análogos de desoxiadenosina y los análogos de desoxicitidina probados.	106

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Mecanismo celular de acción de análogos de desoxiadenina.....	15
Cuadro 2. Dosis administrada a ratones	46

RESUMEN

Objetivos. 1) Aproximarse a los modos de acción *in vivo* de la cladribina, fludarabina, bromodesoxiadenosina y clofarabina en normoblastos de ratones ICR mediante el análisis de las cinéticas de la actividad genotóxica y citotóxica determinadas por la frecuencia de reticulocitos micronucleados (RET-MN) y reticulocitos (RET), respectivamente. 2) Comparar la respuesta de las cepas de ratón ICR y BALB/c a la administración aguda de la misma dosis de análogos de desoxiadenosina mediante el análisis de las cinéticas de inducción de RET-MN y RET.

Metodología. Para el primer objetivo grupos de cinco ratones ICR fueron tratados con tres diferentes dosis de cladribina, fludarabina, bromodesoxiadenosina y clofarabina. Para el segundo objetivo, grupos de cinco animales ICR y BALB/c fueron tratados con una misma dosis de los mismos agentes. Las muestras de sangre fueron obtenidas de las colas antes y cada 8 h después del tratamiento hasta las 72 h. Las frecuencias de RET-MN y RET en porcentaje fueron evaluados citométricamente.

Resultados. Las dosis altas de la cladribina, fludarabina, bromodesoxiadenosina y clofarabina, presentaron un efecto citotóxico temprano que no fue relacionado a efectos genotóxicos de estudios previos. Las dosis altas de cladribina y clofarabina presentaron una actividad genotóxica y citotóxica prolongada con perfiles similares, mientras que la fludarabina y la bromodesoxiadenosina presentaron una respuesta genotóxica baja. La curvatura de la cinética de RET-MN inducidos por la cladribina fue determinada por tres picos, a las 24, 48, 56 h, mientras que la curvatura de la clofarabina presentó dos picos a las 32, 48 y un hombro a las 64 h sugiriendo en ambos casos hasta tres vías de inducción de

rupturas de ADN. Por otra parte, ambas cepas de ratón presentaron variaciones significativas en la forma de las cinéticas de RET-MN y de RET a través del número de picos y su magnitud. El análisis, además mostró que la cepa BALB/c presentó mayor efecto genotóxico a la clofarabina y la bromodesoxiadenosina y mayor efecto citotóxico hacia la cladribina y clofarabina que la cepa ICR.

Conclusión. El análisis de la cinética de inducción de RET-MN y RET en normoblastos de ratón constituye una herramienta útil para la aproximación de las actividades genotóxicas y citotóxicas de antimetabolitos análogos de desoxiadenosina *in vivo*, y para la exploración intraespecífica a la sensibilidad genotóxica y citotóxica administrando la misma dosis de análogos de desoxiadenosina.

Palabras clave: micronúcleos, genotoxicidad, citotoxicidad, citometría, análogos de desoxiadenosina.

Abstract

Objectives: 1) To approach the *in vivo* modes of action of cladribine, fludarabine, bromodesoxyadenosine and clofarabine in ICR mice normoblasts by analyzing the kinetics of genotoxic and cytotoxic activity determined by the frequency of micronucleated reticulocytes (MN-RET) and reticulocytes (RET), respectively. 2) To compare the response of the ICR and BALB/c mouse strains to acute administration of the same dose of deoxyadenosine analogues by analyzing MN-RET and RET induction kinetics.

Methodology. For the first objective, groups of five ICR mice were treated with three different doses of cladribine, fludarabine, bromodesoxyadenosine and clofarabine. For the second objective, groups of five ICR and BALB/c mice were treated with equal doses of the same agents. Blood samples were obtained from the tails before and every 8 hours after treatment until 72 h. The frequencies of MN-RET and RET in percentage were scored cytometrically.

Results. High doses from cladribine, fludarabine, bromodeoxyadenosine and clofarabine showed an early cytotoxic effect that was not related to the previous genotoxic studies. Cladribine and clofarabine presented prolonged genotoxic and cytotoxic activity with similar profiles, while fludarabine and bromodeoxyadenosine had a low genotoxic response. The curvature of the kinetics MN-RET of cladribine was determined by three peaks, at 24, 48, 56 h, while the clofarabine had two peaks at 32, 48 and one in the shape of the shoulder at 64 h suggesting in both cases up to three induction ways of DNA ruptures. On the other hand, both mouse strains exhibited significant variations in the shape of RET-MN and RET kinetics over the number of peaks and their magnitude. The analysis, also observed that the BALB/c

strain had a higher genotoxic effect on clofarabine and bromodeoxyadenosine and a higher cytotoxic effect on cladribine and clofarabine than the ICR strain.

Conclusion. The analysis of the kinetics of MN-RET and RET induction in mouse normoblasts is a useful tool for the approximation of genotoxic and cytotoxic activities of antimetabolites analogs of deoxyadenosine *in vivo*, and for intraspecific examination to genotoxic and cytotoxic sensitivity applying the same dose of deoxyadenosine analogs.

Keywords. Micronuclei, genotoxicity, cytotoxicity, cytometry, deoxyadenosine analogs.

Abreviaturas

A

A Adenina

ABC área bajo la curva

ADA amino desaminasa

ADN ácido desoxirribonucleico

Apaf-1 (del inglés *Apoptosis protease-activating*) Factor activador de la proteasa apoptótica

ARN ácido ribonucleico

araC arabinósido de citosina

ATP adenosina trifosfatada

ATR (del inglés *Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y Rad3

azaC 5-azacitidina

B

8-BrdA 8-bromodesoxiadenosina

BUS Busulfán

BCNU Bis-cloroetilnitrosourea

C

C Citosina

Cdk2 cinasa dependiente de ciclinas-2

CD71 receptor de transferrina

CD99 o MIC2 antígeno CD99 proteína transmembranal codificada por el gen pseudoautosómico MIC2

Cis-Pt cisplatino

CldA 2-CldA o 2-CldAdo o CldAdo cladribina

CldATP o Cl-ara-ATP cladribina trifosfatada

CIFdA clofarabina

⁶⁰Co Cobalto-60

COL colchicina

CP (del inglés *cyclophosphamide*) ciclofosfamida

D

dATP desoxiadenosina trifosfatada

dCK desoxicitidina cinasa

dCTP desoxiadenosina trifosfato

dFdC difluorodesoxicidina

dG desoxiguanosina

dGK desoxiguanosina cinasa

dGMP desoxiguanosina monofosfato

dGDP desoxiguanosina difosfato

dGTP desoxiguanosina trifosfato

DMN dimetilnitrosamina

dNTPs desoxinucleótidos trifosfatados

DSBs (del inglés *double strand breaks*) rupturas de doble cadena

E

EE.UU Estados Unidos

EM esclerosis múltiple

ENC eritrocito normocromático

ENU etilnitrosourea

EPC-MN Eritrocitos policromáticos micronucleados

ERO Especies reactivas de oxígeno

F

2-FA o F-ara-A fludarabina

FDA (del inglés *Food and Drugs Agency*) Administración de Fármacos y Alimentos

FITC (del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*) isotiocianato

de fluoroceína	Waldenstrom	luz lateral
FSC (del inglés <i>Forward Side Scatter</i>) Luz delantera	MMC mitomicina C	SSBs (del inglés <i>single-strand breaks</i>) rupturas de cadena sencilla
FWHM (del inglés <i>Full Width at Half Maximum</i>) anchura a media altura	MNU metilnitrosourea	T
G	N	T timina
G guanina	5-NT 5-nucleotidasa	TIMR tiempo de inducción máxima relativa
Gy greys	NMPK nucleótido	TNC transportador de nucleósidos concentrativo
H	NDPK nucleótido difosfato cinasa	TNC transportador de nucleósidos equilibrativo
hTNE1 transportador de nucleósidos de tipo equilibrativo humano 1	O	U
hTNC1 transportador de nucleósidos de tipo concentrativo humano 1	OCDE Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico	U uracilo
K	P	UFCE Unidad formadora de colonias eritroides
kDa kilodaltons	PARP Poli (ADP-ribosa) polimerasa	V
L	PKA-R1Iα (del inglés <i>protein kinase A regulatory subunit IIα</i>) proteína cinasa A subunidad reguladora II α	VNB vinblastina
LCP Leucemia de células pilosas	pc peso corporal	VNC vincristina
LLA Leucemia linfoblástica aguda	PR-A proteína de replicación A	W
LLC Leucemia linfoblástica crónica	p53 proteína 53	w (del inglés <i>width</i>) amplitud
LMA Leucemia mieloide aguda	R	
LM Leucemia mastocística	RET Reticulocitos	
M	RET-MN Reticulocitos micronucleados	
MG's Macroglobulinemia de	RI radiación ionizante	
	S	
	SSC (del inglés <i>Side Scatter</i>)	

1. Introducción

La comprensión de los mecanismos de acción *in vivo* de los antineoplásicos representa un reto importante para mejorar la eficacia de los protocolos para los pacientes durante la terapia y reducir los efectos colaterales (Hentosh y Peffley, 2010). La mayoría de los mecanismos celulares de acción de los antineoplásicos han sido estudiados en sistemas *in vitro*, esto conlleva a cuestionar, si estos mecanismos de acción son equivalentes en sistemas *in vivo* (*In vivo Pharmacology Training Group*, 2002; Mak *et al.*, 2014).

Los antineoplásicos son administrados por vías enterales y parenterales, determinados en fases preclínicas, aprobados y regulados por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) en los EE.UU y por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en México. Su finalidad es eliminar células cancerígenas y aumentar la tasa de sobrevivencia de los pacientes, ello implica, la interacción del anticancerígeno en al menos tres niveles de organización, el nivel bioquímico o molecular, el nivel celular y el nivel fisiológico.

En los últimos años, se han empleado nuevas estrategias para la creación de agentes más efectivos y menos tóxicos para el tratamiento de los diversos tipos de cáncer, entre ellos, la síntesis de antimetabolitos análogos de bases, que estructuralmente tienen modificaciones en las nucleobases, nucleósidos, nucleótidos, desoxinucleósidos, desoxinucleótidos de pirimidina o de purina (Gandhi y Plunkett, 2006; Jordheim *et al.*, 2013).

Los antimetabolitos, como la 2-cloro-desoxiadenosina o cladribina (2-CIdA), la 2-fluoroadenina o fludarabina (2-FA) y la 2-fluoro-2-cloro-arabinofuranosiladenosina o clofarabina (ClFdA) constituyen la primera línea de tratamiento para diversos tipos de cáncer, principalmente para el tratamiento de diversos desórdenes hematológicos (Bonate *et al.*,

2006; Buie *et al.*, 2007; DeAngelo y Stone, 2008; Galmarini *et al.*, 2002; Robak *et al.*, 2009). Su mecanismo celular de acción ha sido estudiado en diversas líneas celulares leucémicas con concentraciones que no son equivalentes a las empleadas en investigación clínica (Hentosh y Peffley, 2010) y las mediciones son establecidas en tiempos discretos (p.e. 24 o 48 o 72 h) y que a su vez son distintas a los esquemas de quimioterapia de los pacientes (Morales-Ramírez *et al.*, 2017). Incluso, los individuos pueden modular la respuesta y presentar una acción magnificada, disminuya o distinta al mismo tratamiento, debido a diferencias interindividuales de su metabolismo, farmacología y heterogeneidad molecular (*In vivo Pharmacology Training Group*, 2002).

En la literatura, se ha descrito que los mecanismos celulares de acción de los antimetabolitos son la inhibición: i) de la síntesis de los desoxinucleótidos bloqueando la actividad catalítica de la ribonucleótido reductasa y ii) y de la síntesis de la cadena de ADN, formando una horquilla en la estructura de la cadena que bloquea su polimerización y su reparación (Ewald *et al.*, 2008; Robak *et al.*, 2009). No obstante, en los últimos años se han reportado otras acciones, una de ellas más tempranas que dirige a la célula hacia muerte celular vía CD99, con efecto a nivel de membrana plasmática y asociado probablemente a la metuosis (Celik *et al.*, 2018) y efectos que están asociados a la desmetilación de promotores de genes SFRP1, DKK3, y WIF1 y modificaciones post-traduccionales de histonas y que en conjunto resultan en fragilidad cromosómica (Valdez *et al.*, 2015) y la activación de señales de apoptosis por la vía intrínseca (Marzo *et al.*, 2001).

Aún no es claro, cuál o cuáles de estas de acciones se llevan a cabo durante la terapia, ni el tiempo de su actividad, ni de su magnitud. Mediante el modelo de “Cinética de inducción de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) en normoblastos de ratón” desarrollado en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares por Morales-Ramírez *et al.*, (2014) se ha explorado y relacionado la actividad genotóxica de algunos agentes *in vivo* con mecanismos celulares de acción reportados en sistemas *in vitro* a través de un análisis de la inducción de EPC-MN en función del tiempo o cinética. Los micronúcleos están formados por residuos de cromatina, producto de las rupturas dobles de la cadena de ADN o de

cromosomas retenidos, que no fueron incorporadas al núcleo principal de las células hijas (Schmid, 1975).

La cinética está determinada por las frecuencias de EPC-MN monitoreados periódicamente, su curvatura está determinada por picos, que representan la actividad genotóxica, los cuales se podrían asociarse al mismo número de vías de inducción de rupturas del ADN. Por ejemplo, la curvatura de la cinética de EPC-MN causada por la 5-azacitidina (azaC) presentó dos picos a las 32, 48 h y un hombro a las 64 h, sugiriendo la participación de al menos tres vías de inducción de rupturas de ADN *in vivo* (Morales-Ramírez *et al.*, 2008) y en la difluorodesoxicitidina (dFdC) se presentó un pico estrecho hacia las 33 h post-administración, sugiriendo una vía de inducción de rupturas (Morales-Ramírez *et al.*, 2017b).

Ambos agentes son antimetabolitos análogos de la citosina usados para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, compiten con los desoxicitosina y se incorporan en el ADN, pero provocan rupturas por distintas vías. La literatura ha expuesto que en sistemas *in vitro*, la azaC provoca rupturas en el ADN por al menos tres vías: i) durante la reparación del aducto formado entre los residuos de la azaC que se unen covalentemente con la ADN citosina metiltransferasa (Santi *et al.*, 1984), ii) durante la reparación por recombinación o durante la reparación de los errores de apareamiento causado por el apareamiento incorrecto de la azaC (Hedge *et al.*, 1996, Morales-Ramírez *et al.*, 1997) y iii) por fragilidad cromosómica que resulta de la desmetilación de islas CpG (Viegas-Péquignot y Dutrillaux, 1981); estos eventos podrían corresponder a las oleadas de inducción de EPC-MN o picos (en ese orden) observados *in vivo* (Morales-Ramírez *et al.*, 2008).

Por su parte, la dFdC inhibe principalmente las ADN polimerasas, que subsecuentemente conlleva a la formación de sitios terminales en la cadena de ADN (Huang *et al.*, 1991) e inhibe a la ribonucleótido reductasa encargada de sintetizar los desoxinucleótidos (Heinemann *et al.*, 1989); se había propuesto que el abatimiento de la poza de los desoxinucleótidos causaba la activación de nucleasas, que subsecuentemente provocaban las rupturas del ADN (Hirota *et al.*, 1989), pero Osterman *et al.*, (2013) mostró que la

hidroxiurea, un inhibidor irreversible de la ribonucleótido reductasa provoca rupturas en el ADN a una dosis 25 veces mayor que la dosis que causa inhibición de la síntesis de los desoxinucleótidos.

En este trabajo administramos intraperitonealmente tres análogos de desoxiadenosina de primera generación: cladribina, fludarabina y 8-bromodesoxiadenosina y un análogo de segunda generación: clofarabina (Figura 1) a ratones de la cepa ICR, la actividad genotóxica determinada por la cinética de inducción de RET-MN y la actividad citotóxica determinada por la cinética de RET podría ser una herramienta útil para explorar y aproximarse a su(s) posible(s) vía(s) de acción *in vivo*. Además, comparar la respuesta de las cepas de ratón ICR y BALB/c empleando la misma dosis de análogos de desoxiadenosina.

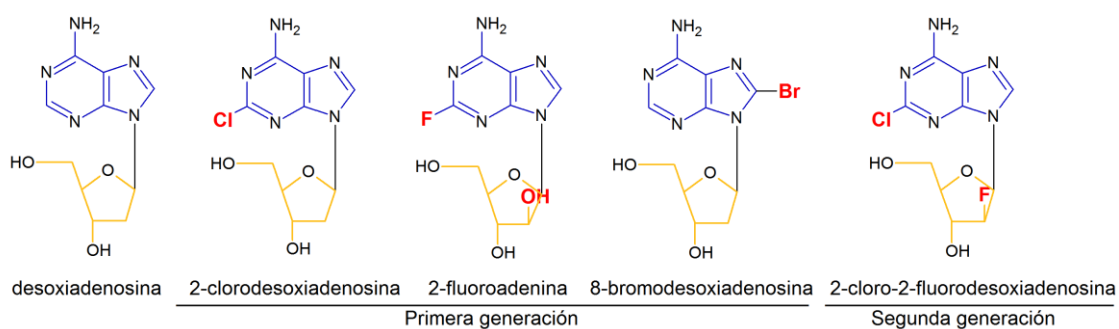


Figura 1. Estructura química de la desoxiadenosina y de sus derivados. JQV

2. Antimetabolitos análogos de desoxiadenosina

Un agente genotóxico se define como aquel agente biológico, físico o químico que altera la integridad del ADN. Los agentes genotóxicos se clasifican en agentes aneuploidógenos y agentes clastógenos por su modo de acción (Bryce *et al.*, 2014). Los antimetabolitos análogos de purinas o pirimidinas, constituyen un grupo de antineoplásicos clastógenos sintéticos que son utilizados para el tratamiento de los desórdenes hematológicos, incluyendo las leucemias, linfomas, neoplasmas, síndrome mielodisplásico o en alteraciones de otras líneas celulares hematopoyéticas (Schulz, 2005).

Los protocolos de quimioterapia combinan diversas clases de anticancerígenos: agentes físicos como la radiación gamma y agentes químicos como alquilantes mono y bifuncionales, aneugénicos, antifolatos, antimetabolitos, derivados de platino, enzimas, hormonas para eliminar el cáncer (Figura 2). No obstante, sus mecanismos celulares de acción han sido estudiados en sistemas controlados y su translación a la práctica clínica parece más compleja, debido a se requieren estrategias y modelos que permitan corroborar que sus acciones *in vitro* sean equivalentes en sistemas *in vivo*.

En los estudios clínicos, la población de pacientes con leucemia es separada en grupos, los cuales presentan distintos protocolos o esquemas de quimioterapia, por ejemplo, un grupo de pacientes tratados con monoterapia de clofarabina (52 mg/m²/día), otro grupo con pacientes tratados con clofarabina (40 mg/m²/día), ciclofosfamida (440 mg/m²/día) y etopósido (100 mg/m²/día) y otro grupo con pacientes tratados con clofarabina (40 mg/m²/día), ciclofosfamida 400 (mg/m²/día) y etopósido (150 mg/m²/día). La eficacia de un protocolo reside en la tasa de remisión completa (RC), que son pacientes sin rastros de células leucémicas en la sangre periférica, blastos menor al 5% en médula ósea y recuperación de plaquetas ($\geq 100 \times 10^9/l$) y granulocitos ($\geq 1.0 \times 10^9/l$) y aquellos pacientes con remisión completa sin recuperación (RPp) de plaquetas (menor a $100 \times 10^9/l$) y en la tasa de sobrevivencia.

También, se pueden presentar otras respuestas como remisión parcial (RP) que son pacientes sin blastos circulantes, pero con blastos entre 5 y 25% en la médula ósea y pacientes sin respuesta con blastos circulantes y blastos con más de 50% en médula ósea y pacientes que fallecen durante la terapia. La tasa en porcentaje de los pacientes que presentan remisión completa empleando al menos un antimetabolito es variada de 20% a 52%, la mediana de supervivencia oscila entre los 3 -10 años en pacientes con leucemia aguda. (Annaloro *et al.*, 2015; Jeha, 2009; Jhaveri *et al.*, 2014; O'connor *et al.*, 2011; Trioche *et al.*, 2012; Sawitsky *et al.*, 1977; Weiss *et al.*, 2005).

En otro protocolo de quimioterapia, usando la clofarabina (20 o 25 mg/m²/día) por cinco días (del 2º al 6º día), combinada con etopósido (100 mg/m²/día) por cinco días (del 1º al 5º día), y mitoxantrona (8 mg/m²/día) por tres días (del día 1º al 3º) a 22 pacientes con leucemia aguda refractaria (cuando hay presencia de blastos después del primer tratamiento) resultó en una tasa de RC de 36%, 5 de 22 pacientes (22%) presentaron una RC y 3 de 22 (14%) pacientes una RCp, estos ocho pacientes presentaron una mediana de supervivencia de 200 días (rango, 47-1327 días); dos pacientes fallecieron por infecciones bacterianas dentro del primer mes (Abbi *et al.*, 2015).

Los efectos adversos de los antimetabolitos están asociados principalmente con inmunosupresión de la médula ósea que conlleva a infecciones sistémicas y que puede resultar fatal debido a infecciones bacterianas o micóticas, también causan hepatotoxicidad y neurotoxicidad irreversible (Abbi *et al.*, 2015; Haider *et al.*, 2015; Ngo *et al.*, 2015).

A pesar de que los primeros análogos de purina comenzaron a ser sintetizados en los años 60's (Robins *et al.*, 1961; Holmes y Robins, 1965), sólo algunos de ellos fueron aprobados para el tratamiento de las leucemias en seres humanos (Carson *et al.*, 1984; Piro *et al.*, 1988). Cohen *et al.*, (1978) mostraron que la deficiencia de la amino desaminasa (ADA), una enzima que participa en la degradación de las purinas hacía inosina vía urea, resultaba en un incremento de la desoxiguanosina mono, di y trifosfatada (dGMP, dGDP y dGTP), el metabolito trifosfatado resultó tóxico para las células.

Estos análogos de purina o pirimidina presentan modificaciones en la nucleobase, en el nucleósido (nucleobase y pentosa) y en el nucleótidos (nucleobase, pentosa y grupo fosfato). En la nucleobase, las modificaciones pueden incluir la sustitución de átomos de hidrógeno por átomos de nitrógeno, (2-azapurina), oxígeno (8-oxoguanina) o por metililos (5-metilcitosina) o por halógenos como flúor (5-fluorouracilo), cloro (6-cloropurina), bromo (2-bromopiridina). En los nucleósidos hay sustituciones de átomos en la nucleobase y la pentosa puede incluir halogenaciones y estar en forma de ribosa (2-fluoroadenosina) o desoxirribosa (2-clorodesoxiadenosina) o arabinosa (2-Desoxi-2-fluoro- β -D-arabinofuranosil-adenina o clofarabina). Los nucleótidos, presentan modificaciones en la nucleobase, pentosa y en el grupo fosfato, el cual puede estar en forma mono, di o trifosfato (2-fluoroadenina-monofosfato) y los enlaces fósforo-oxígeno pueden ser sustituidos por enlaces fósforo-nitrógeno (Jordheim *et al.*, 2013).

Los antimetabolitos análogos de desoxiadenina comparten una estructura química similar, pero presentan una ligera afinidad hacia algún tipo celular, p.e. la cladribina inhibe principalmente la ADN polimerasa α (Hentosch *et al.*, 1990), presenta mejor eficacia en pacientes con leucemias del tipo B (Piro *et al.*, 1988) y esclerosis múltiple (EM) (Lizak *et al.*, 2020); la fludarabina inhibe la ADN polimerasa α , β y ϵ , y es un potente inhibidor de la ribonucleótido reductasa (Huang y Plunkett, 1995; Lukenbill y Kalaycio, 2013), es más eficiente para linfomas de bajo grado de leucemia linfoblástica crónica (McLaughlin *et al.*, 1997); la clofarabina inhibe la ADN polimerasa α e inhibe a la ribonucleótido reductasa (Parker *et al.*, 1991), es más eficiente para células de leucemia mieloide aguda (LMA) (Larson y Venugopal, 2009) y Síndrome mielodisplásico (SMD) (Bryan *et al.*, 2014).

La bromodesoxiadenosina es un agente que no fue aprobado por la FDA debido a su baja acción citotóxica en células linfoblásticas y mieloblásticas, su citotoxicidad fue menor comparado con la 2-CldA (Huang *et al.*, 1986) (Cuadro 1) (Figura 3).

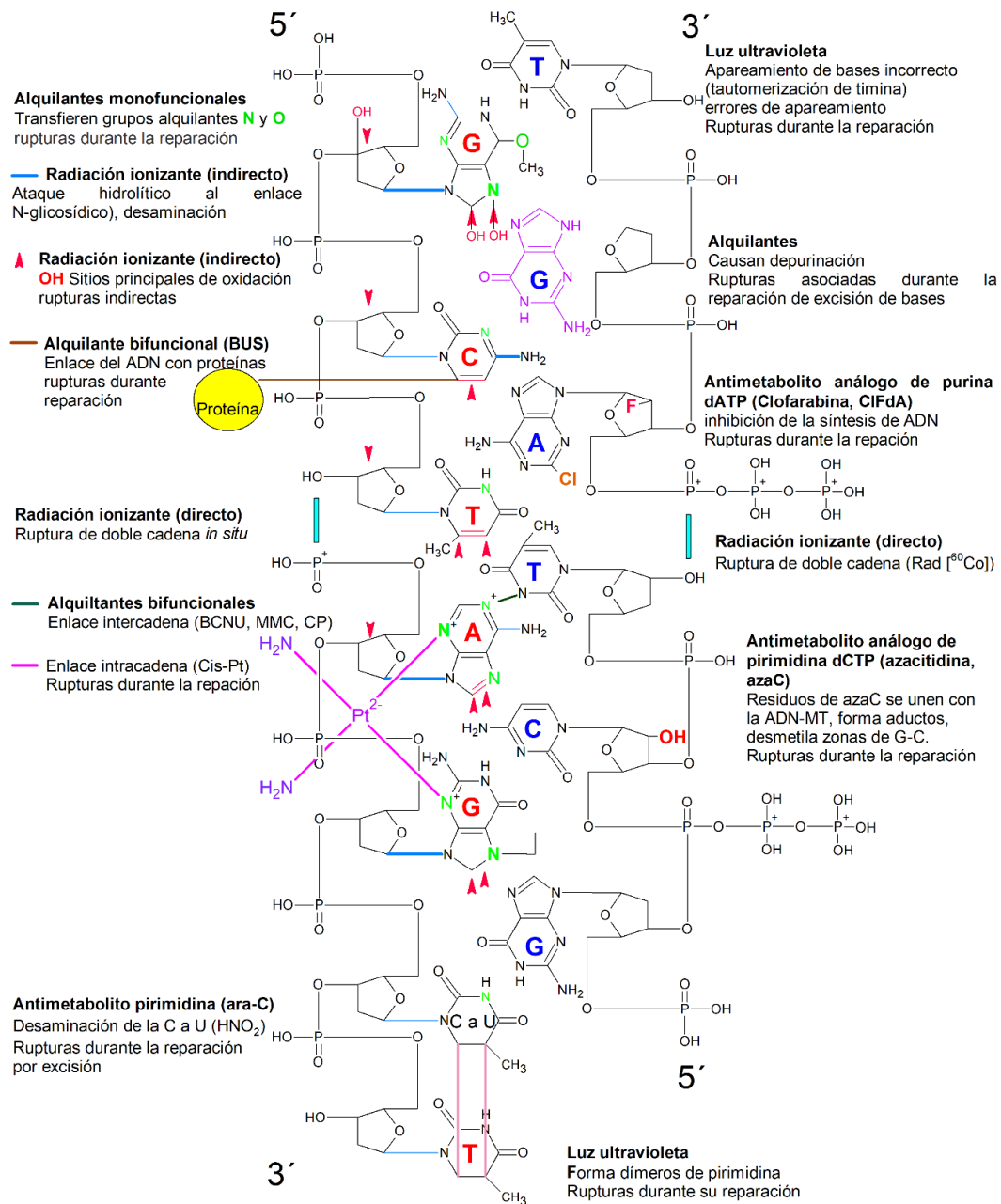


Figura 2. Esquema que representa la acción reportada *in vitro* de diversos agentes clastógenos sobre el ADN. A, C, G y T. Nitrógeno, N; Oxígeno, O; Cloro, Cl; Flúor, F. Alquilantes: MNU, ENU, DMN, BUS, BCNU, MMC, Cis-Pt. Promutágenos: CP. Nitrosoureas: HNO_2 ; Radiación ionizante (Rad): ^{60}Co , luz ultravioleta; dATP, dCTP. Análogos ClFdA, azaC, ara-C, uracilo (U). JQV

Cuadro 1. Mecanismo celular de acción de análogos de desoxiadenina

Antimetabolitos	Agente	Acciones	Mecanismo de inducción de rupturas / micronúcleos
Análogos de Adenina	2-CIdA	1a Inhibición la ribonucleótido reductasa (Hirota <i>et al.</i> , 1989) Inhibición la polimerasa β (Hentosh <i>et al.</i> , 1990) Activación de señales apoptóticas (Genini <i>et al.</i> , 2000; Marzo <i>et al.</i> , 2001)	Incorporación e inhibición de la síntesis de ADN (Huang <i>et al.</i> , 1986) Decremento de desoxinucleótidos (Wataya <i>et al.</i> , 1989).
	2-FA	1a Inhibición de la ribonucleótido reductasa (Tseng <i>et al.</i> , 1982) Inhibición la polimerasa α (White <i>et al.</i> , 1982) Activación de señales apoptóticas (Biswall <i>et al.</i> , 2000)	Incorporación e inhibición de la síntesis de ADN (Huang <i>et al.</i> , 1990; Huang y Plunkett 1995)
	2-BrdA	Inhibición de la síntesis de ADN (Huang <i>et al.</i> , 1986) Inhibición la ribonucleótido reductasa (Backley <i>et al.</i> , 1985)	Inhibición de la síntesis de ADN (Huang <i>et al.</i> , 1986)
	CIFdA	1a Potente Inhibidor de la ribonucleótido reductasa (Parker <i>et al.</i> , 1991; Xie y Plunket, 1995) Inhibición la polimerasa α (Parker <i>et al.</i> , 1991) Activación de señales apoptóticas (Genini <i>et al.</i> , 2000)	Incorporación e inhibición de la síntesis de ADN (Parker <i>et al.</i> , 1999)

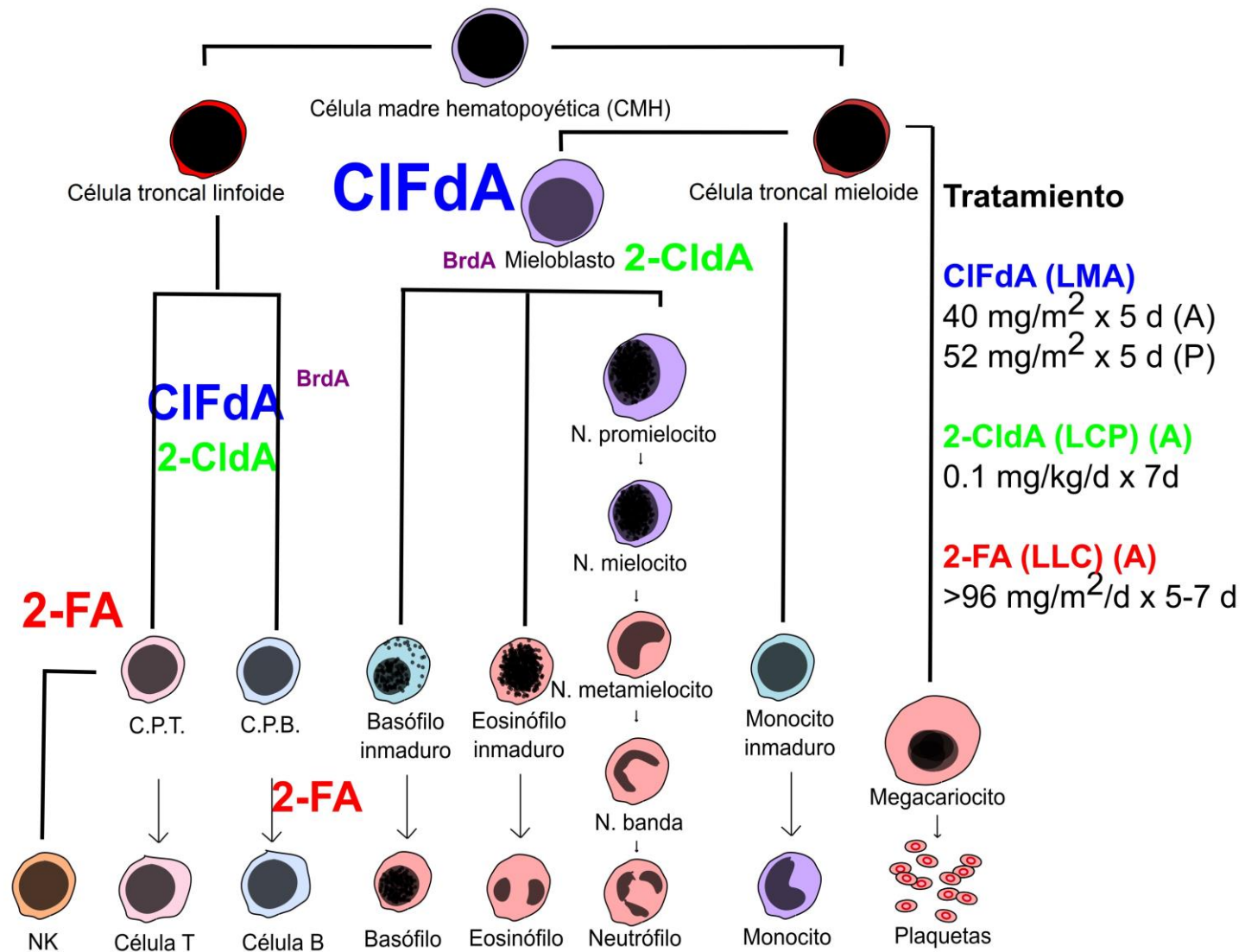


Figura 3. Acción de los análogos de desoxiadenosina en células hematológicas y su tratamiento. Leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica crónica (LLC), Cladribina (2-CldA), clofarabina (CIFdA), fludarabina (2-FA), bromodesoxiadenosina (BrdA), este último no fue aprobado por la FDA; adulto (A), pediatría (P). JQV

2.1 Antimetabolitos de primera generación

2.1.1 Cladribina

Este compuesto también conocido como 2-clorodesoxiadenosina (2-ClIdA o 2-ClIdAdo o ClIdAdo) fue sintetizado por Carson *et al.*, en 1980 (Carson *et al.*, 1980), difiere de la desoxiadenosina por la sustitución del átomo de hidrógeno en la posición 2 del anillo de purina por un átomo de cloro (Figura 4), esta halogenación hace más resistente a la molécula a la desaminación (Beutler, 1992).

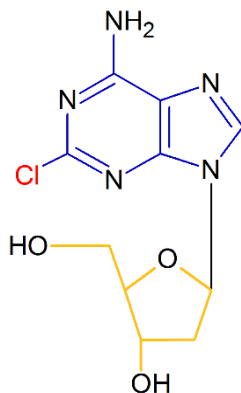


Figura 4. Estructura química de la cladribina

La cladribina ha demostrado ser tóxica para células en división y células quiescentes; en concentraciones nanomolares, bloquea la proliferación en células linfoblastoides (Carson *et al.*, 1983), inhibe el crecimiento de las células linfoblastoide – T, linfoblastoides – B y en células mieloides en cultivo (Huang *et al.*, 1986). Sin embargo, en las líneas celulares hematopoyéticas humanas, la cladribina presentó una variabilidad en la sensibilidad de cien veces comparado con las líneas linfoblástica – T y linfoblástica – B (Avery *et al.*, 1989). Se ha administrado a pacientes con leucemia linfoblástica (Robak *et al.*, 2002) y leucemia mieloblástica aguda (LMA) (Wrzesień-Kuś *et al.*, 2005), Macroglobulinemia de Waldenstrom (MG's) (Guchelaar *et al.*, 1994), Leucemia mastocítica (LM) (Penack *et al.*, 2005). Parece ser más eficaz como tratamiento de la Leucemia de células pilosas (LCP) (Guchelaar *et al.*, 1994, Riechelova *et al.*, 1995) y recientemente, ha tomado mayor relevancia en el tratamiento de esclerosis múltiple (Baker *et al.*, 2019).

2.1.1.1 Mecanismo celular de acción

La cladribina al igual que otros nucleósidos, ingresa a la célula vía transportadores de nucleósidos de tipo equilibrativo (TNE) por difusión facilitada, son independiente de sodio y el flujo es bidireccional y los transportadores de nucleósidos de tipo concentrativo (TNC) que son dependiente de sodio y requieren de adenosina trifosfatada (ATP). La mayoría de las células humanas, incluyendo las células hematopoyéticas presentan tres TNE (hTNE1, hTNE2 y hTNE3) y dos TNC (hTNC1 y hTNC2). Los hTNE1, hTNE2, hTNE3 y hTNC2 transportan nucleósidos de purina, el hTNC1 transporta solamente nucleósidos de pirimidina (Zhenchuk *et al.*, 2009). En el citosol, la cladribina es fosforilada hasta su forma trifosfatada preferentemente por la desoxicitidina cinasa (dCK) de origen citosólico y por la desoxiguanosina cinasa (dGK) de origen mitocondrial.

La cladribina resulta tóxica por cinco vías de acción, i) induce muerte celular vía CD99 (Celik *et al.*, 2018), ii) inhibe la síntesis de desoxinucleótidos (Hirota *et al.*, 1989) y iii) la síntesis de ADN (Huang *et al.*, 1986), iv) provoca un efecto apoptótico vía intrínseca (Genini *et al.*, 2002) y v) a través de un efecto desmetilante (Valdez *et al.*, 2015) (Figura 8).

2.1.1.2 Vía CD99

La CD99 es una glicoproteína transmembranal de 32 kDa, codificada por el gen MIC2, ubicada en la región pseudoautosómica de los cromosomas humanos X y Y (Fouchet *et al.*, 2002). Aunque no se conoce por completo su función, esta proteína participa en varios procesos celulares como la adjunción de linfocitos T, el aumento del receptor de linfocito T y la migración celular y la muerte celular no dependiente de rupturas de ADN (Pasello *et al.*, 2018), se encuentra ampliamente expresada en células del Sarcoma de Ewing (Çelik *et al.*, 2018) y en leucocitos (Li *et al.*, 2018).

La cladribina y la clofarabina interactúan con la proteína CD99, su unión resulta en el bloqueo de su dimerización y subsecuentemente inhibe señalizaciones corriente abajo de la ciclofilina A y de la proteína cinasa A subunidad reguladora II α (PKA-RII α) que participan en migración de las células (Çelik *et al.*, 2018). La metuosis es un tipo de muerte celular temprano con efecto a nivel de membrana, es caracterizada por una acumulación masiva de vacuolas citoplasmáticas, ruptura de la membrana, no presenta activación de caspasas ejecutoras, ni induce fragmentación de ADN y separación de las células (Pasello *et al.*, 2018).

Çelik *et al.*, (2018) demostraron que la cladribina y clofarabina y las moléculas de cladribina y clofarabina fosforiladas interactúan con la proteína CD99, la adición de grupos fosfatos hace más polar a la molécula impidiendo el paso de estos a través de la membrana celular, los resultados mostraron que las moléculas fosforiladas y no fosforiladas presentaron un decremento similar en la expresión de la PKA y ciclofilina y citotoxicidad similar, lo que les permitió concluir que el efecto citotóxico no requiere del ingreso de los agentes a la célula, además. Estos mismos autores mostraron que la cladribina resultó menos citotóxica que la clofarabina.

2.1.1.3 Vía inhibición de la ribonucleótido reductasa

La evidencia ha mostrado que la cladribina requiere de la fosforilación pero no de la incorporación al ADN para causar citotoxicidad. La concentración de cladribina trifosfatada (CldATP) envía una señal de bloqueo hacia la ribonucleótido reductasa, dejando de sintetizar más desoxinucleótidos y causando desbalance en la poza de nucleótidos, necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos, reduciendo principalmente, la síntesis de dATP y dGTP (Hirota *et al.*, 1989), este desbalance se observó después de 3 horas post incubación y los fragmentos de ADN fueron detectados 12 h después en células FM3A (Hirota *et al.*, 1989) que puede ser revertido por la adición de desoxicitidina (Griffing *et al.*, 1989). En los primeros estudios, se había propuesto que el desbalance de los dNTPs causaba rupturas de doble cadena de ADN y

muerte celular a través de la activación de nucleasas (Hirota *et al.*, 1989; Wataya *et al.*, 1989), pero la activación de nucleasas no fue determinada en estudios posteriores, e incluso se reportó que la dosis que causó desbalance de los dNTPs, no fue suficiente para inducir micronúcleos (Osterman *et al.*, 2013).

2.1.1.4 Vía inhibición de la ADN polimerasas

En la literatura, se ha descrito que la acción principal de la cladribina es la inhibición de la síntesis de ADN, bloqueando la actividad de las ADN polimerasas (alfa, beta y épsilon) y provocando rupturas de cadena sencilla y rupturas de doble cadena (Hentosh *et al.*, 1990). Estas rupturas fueron detectadas tempranamente (4 h) post-incubación en los linfocitos (Seto *et al.*, 1985) y similarmente en células V79 de hámster (Tanabe *et al.*, 1989). La evidencia ha mostrado que los fragmentos de ADN son acumulados dentro de la célula, los cuales parecen estar asociados con el bloqueo temprano de la síntesis de ADN provocando pérdida de viabilidad (Huang *et al.*, 1986).

La incorporación de la cladribina y otros análogos trifosfatados forman una horquilla en el ADN bloqueando su síntesis y reparación. Esta señal es detectada por la proteína sensora relacionada con ataxia-telangiectasia y Rad3 (ATR) (del inglés *Ataxia telangiectasia and Rad3 related*), encargada de activar los puntos de control de daño en el ADN. Después, la ATR se activa cuando se forma un complejo entre la acumulación de rupturas de cadena sencilla y su unión a la proteína de replicación A (PR-A) y a la claspina que actúa como proteína mediadora; subsecuentemente, se fosforila la cinasa dependiente de ciclinas-2 (Cdk2) ejerciendo como proteína transdutora, después se detiene el ciclo celular y se activan proteínas efectoras, como p53 y la célula se dirige a apoptosis, evitando que el ADN con daño sea replicado y heredado a células hijas (Ewald *et al.*, 2008).

2.1.1.5 Vía apoptosis

Se ha evidenciado que la cladribina induce apoptosis en líneas celulares promielocíticas humanas estimuladas con fitohematoglutina (PHA), mientras que en los linfocitos humanos estimulados con PHA no se observó apoptosis (Seto *et al.*, 1986). El tratamiento prolongado de 2-CldA en gliomas malignos humanos, induce cambios morfológicos en la mitocondria, explorado con microscopía electrónica (Matyja *et al.*, 1996). La evidencia ha mostrado que la 2-CldA en células de leucemia humana presentó un daño directo sobre la mitocondria, causando cambio en el potencial y permeabilidad de la membrana mitocondrial, que facilita la liberación del citocromo c y la activación del factor inductor de apoptosis, la activación de caspasas, la fragmentación de ADN y la formación de cuerpos apoptóticos (Genini *et al.*, 2000; Marzo *et al.*, 2001). Además, se ha reportado que activa la proteína p53 como respuesta al daño de ADN, amplificando la señalización de muerte celular (Borner *et al.*, 1997).

La incubación de cladribina a células de leucemia linfocítica, induce la formación de micronúcleos detectados por microscopía de campo claro (Robertson *et al.*, 1993). Estudios *in vivo*, mostraron que las dosis de 0.25, 0.35, y 0.5 mg/kg de peso corporal de cladribina en ratones BALB/c no presentaron efecto clastogénico ni aberraciones cromosómicas (Antonucci y Takahashi *et al.*, 2005).

2.1.1.6 Vía desmetilación

En la literatura se ha documentado que la cladribina y la clofarabina presentan un efecto desmetilante asociado a modificaciones en la histona 3 y la hipometilación de los promotores de genes SFRP1, DKK3, y WIF1, que en conjunto se asocian a un arreglo estructural de la cromatina y subsecuentemente hacia fragilidad cromosómica en células de la línea OCI-AML3, este mecanismo de la acción no ha sido bien establecido (Valdez *et al.*, 2015). Estos mismos autores observaron que la cladribina presentó un efecto citotóxico menor que la clofarabina en líneas celulares KBM3/Bu2506 y HL60.

2.1.2 Fludarabina

La fludarabina (2-fluoroadenina o 2-FA o F-ara-A) es un ribonucleósido análogo a la adenina, fue sintetizado por Montgomery y Hewson, en 1969. Difiere de la adenina por la sustitución del átomo de hidrógeno de la posición 2 del anillo de purina por un átomo de flúor, haciendo más resistente a la molécula a desaminación y la sustitución del átomo de hidrógeno en la posición 2' de la desoxirribosa por un grupo hidroxilo (OH⁻) en posición 2-β, este anómero hace a la molécula más resistente al enlace N-glucosídico a condiciones ácidas (Huang y Plunkett, 1995) (Figura 5). La fludarabina ha sido utilizada en pacientes con LLA y Leucemia linfoblástica crónica (LLC) (Huguley, 1977; Sawitsky *et al.*, 1977; Rai *et al.*, 2000).

La 2-FA es el único agente que *per se* ha mostrado ser eficaz para el tratamiento de la LLC (Elter *et al.*, 2011). La evidencia ha mostrado que la 2-FA tiene un efecto citotóxico menor que la 2-CIdA en células cultivadas de leucemia linfoblástica crónica (Begleiter *et al.*, 1995). Sin embargo, su actividad es mayor en células T que en células B (Boldt *et al.*, 1984).

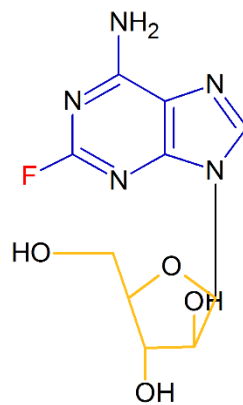


Figura 5. Estructura química de la fludarabina

2.1.2.1 Mecanismo celular de acción

Comercialmente, la fludarabina es producida como fludarabina monofosfato (2-FAMP) debido a su baja solubilidad; en el plasma es desfosforilada rápidamente por la 5-nucleotidasa (5-NT) y después transportada intracelularmente por transportadores de nucleósidos hENT1, hENT2, hCNT2 y hCNT3. En el citosol es re-fosforilada preferentemente por la dCK hasta su forma trifosfatada (2-FA-TP) (Gandi y Plunkett, 2002). En la literatura se han descrito al menos tres modos de acción: i) inhibe la ribonucleótido reductasa, ii) inhibe la síntesis de ADN e iii) induce la activación de señalizaciones relacionadas con la apoptosis (Figura 8).

2.1.2.2 Vía inhibición de la ribonucleótido reductasa

En células HeLa, la fludarabina se ha asociado con una fuerte inhibición intracelular de la ribonucleótido reductasa (Tseng *et al.*, 1982), disminuyendo la síntesis de los desoxinucleótidos, principalmente de dATP (Sato *et al.*, 1984; Gandhi *et al.*, 1994). La inhibición de la síntesis de dNTPs puede ser restaurada por la adición de desoxicitidina (Brockman *et al.*, 1990). Aún es un agente viable para el tratamiento del cáncer considerando su actividad sobre la inhibición de la ribonucleótido reductasa (Mannargurdi y Deb, 2017).

2.1.2.3 Vía inhibición de las ADN polimerasas

En sistemas *in vitro*, se ha demostrado que la acción citotóxica primaria de la fludarabina es la inhibición de la síntesis de ADN, bloqueando la actividad de las ADN polimerasa alfa, delta y epsilon (Gandhi *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1990; Moufarij *et al.*, 2006; White *et al.*, 1982). También inhibe la ADN primasa, ADN ligasa I en células HeLA (Gandhi y Plunkett, 2002; Yang *et al.*, 1992). En células linfoblastoides T de humanos la incorporación de fludarabina monofosfato (F-ara-MP) termina con la elongación de la cadena de ADN, mientras que, fludarabina trifosfatada (F-ara-TP) es altamente incorporada en el ADN provocando la

terminación de la cadena preferentemente en sentido 3' (Huang *et al.*, 1990), provocando fragmentos de ADN internucleosomales (Huang y Plunkett, 1995). Las rupturas de ADN han sido detectadas y cuantificadas por electroforesis unicelular (Poli *et al.*, 1999). Diversos estudios han mostrado que la incorporación de fludarabina en la fase de síntesis es crítica para generar citotoxicidad en células linfoblastoides T (Huang *et al.*, 1990; Gandhi *et al.*, 1994; Huang y Plunkett, 1995).

2.1.2.4 Vía apoptosis

Se ha reportado que la fludarabina *in vitro*, es más tóxica en células linfoblásticas (Plunkett *et al.*, 1980) particularmente hacía la línea celular de linfocitos de T (Rodríguez, 1994) y es un potente inhibidor del crecimiento en células L1210 en cultivo (Sato *et al.*, 1984), provoca la externalización de la fosfatidilserina, la activación de caspasas y la fragmentación de ADN en células WSU y en células JVM-2 (Biswall *et al.*, 2000) y en células aisladas de leucemia linfocítica crónica-B (Zinzani *et al.*, 1994) y formación de cuerpos apoptóticos en linfocitos humanos (González-Cid, 2002). La 2-FA no provoca daño directo en la mitocondria como sucede con la 2-CIdA y ClFdA (Genini *et al.*, 2001). Las concentraciones empleadas con la fludarabina son variables, se ha reportado que 1 μM de fludarabina produce un 20% de toxicidad en células de LLC-B después de 24 horas de incubación (Pedersen *et al.*, 2002) y 1 μg de fludarabina causó una citotoxicidad de 20% en células LLC-B después de 48 h (Trachootham *et al.*, 2008).

2.1.3 Bromodesoxiadenosina

La bromodesoxiadenosina es un análogo que difiere de la desoxiadenosina por la sustitución del átomo de hidrógeno de la posición 8 del anillo de purina por un átomo de bromo, favoreciendo la formación de aductos bromados con otras moléculas (Figura 6). La evidencia ha

mostrado que la 2-bromodesoxiadenosina (2-BrdAdo o 2-BrdA o BrdAdo) inhibe el crecimiento de cultivos de células mieloides y células linfoblastoides T o B (Huang *et al.*, 1985). Esta molécula es menos tóxica que la 2-clorodesoxiadenosina en células de melanoma (Parsons *et al.*, 1986), similarmente observado en células humanas linfoblastoides-T CCRF-CEM (Huang *et al.*, 1985).

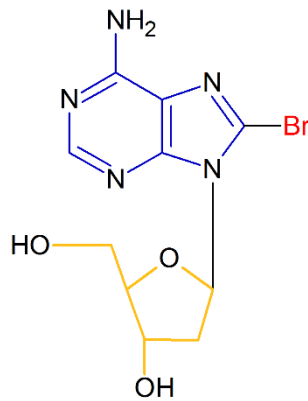


Figura 6. Estructura química de la 8-bromodesoxiadenosina

2.1.3.1 Mecanismo celular de acción

Debido a su baja citotoxicidad, esta molécula no fue aprobada por la FDA. La evidencia ha mostrado que la BrdAdo inhibe principalmente la síntesis de ADN (Huang *et al.*, 1985) (Figura 8). No es claro el tipo de ADN polimerasa bloqueada, pero su inhibición del ADN es prolongada (Parsons *et al.*, 1986). Las rupturas del ADN han sido detectadas 48 h post incubación en células derivadas de melanoma (Parsons *et al.*, 1986). La citotoxicidad puede ser prevenida por la adición de desoxicitidina o citidina (Pearsons *et al.*, 1986). Además, se ha documentado que provoca hinchazón y desaparición de las crestas mitocondriales observado por microscopía electrónica (Matyja *et al.*, 1996).

2.2 Antimetabolito de segunda generación

2.2.1 Clofarabina

La clofarabina (2-cloro-2-fluoro-desoxiarabinofuranosil-denosina o ClFdA) fue sintetizada a principios de los 90's por el grupo de investigación del *Southern Research Institute* (EE.UU). Difiere de la desoxiadenosina por la sustitución del átomo de hidrogeno en la posición 2 del anillo de purina por un átomo de cloro, haciendo más resistente a la molécula a la desaminación y la sustitución del átomo de hidrógeno en la posición 2' de la arabinosa por un átomo de flúor (Figura 7), esta halogenación incrementa la resistencia a condiciones ácidas de pH 1 y a la fosforólisis (Carson *et al.*, 1992; Bonate *et al.*, 2006).

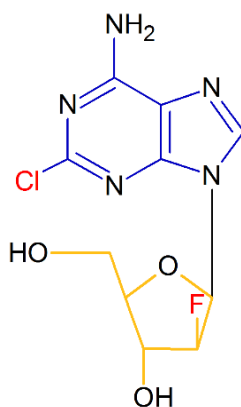


Figura 7. Estructura química de la clofarabina

La clofarabina es un análogo de segunda generación que combina características de la cladribina y de la fludarabina. A diferencia de sus predecesores (cladribina y fludarabina) presentó mejor estabilidad y solubilidad, es más resistente a la desaminación y a la fosforólisis (Carson *et al.*, 1992), presentó mayor afinidad hacia la dCK (Lindemalm *et al.*, 2003) y una acción más directa sobre el ADN (Xie y Plunkett, 1996). En modelos *in vitro*, la clofarabina es un potente inhibidor del crecimiento de células no proliferantes y proliferantes derivadas de linfocitos humanos (Zhenchuck *et al.*, 2009), de células derivadas de leucemia mielógena crónica K562 (Parker *et al.*, 1991), de células linfoblásticas humanas CEM (Parker *et al.*, 1999), de células de la línea HEP2 (derivadas de melanoma) y de células derivadas de leucemia

linfoblástica de murinos L1210 (Faderl *et al.*, 2005a), presentó mayor afinidad hacia células linfoblásticas-B que para células linfoblásticas-T (Beesley *et al.*, 2007). Las pruebas clínicas fueron establecidas en 1998 por el *M.D. Anderson Cancer Center*, de la Universidad de Texas (EE.UU). En el año de 2004, fue aprobada por la FDA para el tratamiento de la LLA refractaria (Gandhi y Plunkett, 2006).

2.2.1.1 Mecanismo celular de acción

La clofarabina ingresa a la célula por los transportadores de nucleósidos hENT1, hENT2 y hCNT3 (Shigemi *et al.*, 2013) e ingresa por difusión debido su mayor lipofilicidad comparado con la 2-CldA (King *et al.*, 2005). Esta molécula ha mostrado ser más tóxica en células que expresan mayormente el hTNE1 comparado con la 2-CdA y 2-FA (Zhenchuck *et al.*, 2009).

En el citosol, es fosforilada inicialmente por la dCK y en menor proporción por al dGK a ClFdAMP después es fosforilado por la nucleótido monofosfato cinasa (NMPK) a ClFd-ADP y por la nucleótido difosfato cinasa (NDPK) a su forma trifosfatada ClFd-ATP (Shigemi *et al.*, 2013). En la literatura, se ha documentado al menos cinco vías que soportan su toxicidad: i) muerte celular vía CD99, ii) vía inhibición de la ribonucleótido reductasa, iii) vía inhibición de las polimerasas y iv) vía activación de señalizaciones apoptóticas, v) vía metilación similar a la cladribina (Figura 8).

2.2.1.2 Vía CD99

Similar al efecto mostrado por la cladribina, la clofarabina se une con la proteína CD99 inhibiendo su dimerización, su inhibición conllevaba con el bloqueo de componentes subsecuentes, desencadenando la expresión de algunos eventos de muerte celular, como la vacuolización y ruptura de la membrana; características de la metuosis (Çelik *et al.*, 2018; Pasello *et al.*, 2018). Çelik *et al.*, (2018) además utilizaron moléculas fosforiladas de clofarabina y de cladribina impidiendo su ingreso al interior de la célula, estos agentes presentaron una

citotoxicidad similar a las moléculas no fosforiladas; la clofarabina resultó más citotóxica que la cladribina.

2.2.1.3 Vía inhibición de la ribonucleótido reductasa

La clofarabina trifosfatada (CI-F-ara-ATP) inhibe fuertemente a la ribonucleótido reductasa, al menos 10 veces más que la 2-FA provocando un desbalance en la síntesis de dNTPs (Gandhi y Plunkett, 2007). Incubaciones en presencia de 0.1, 1 o 10 nM de ClFdA en células K562, provocan reducción de dATP, dCTP y dGTP después de 4 horas (Parker *et al.*, 1991), mientras que, en las células linfoblastoides humanas (CEM), la reducción principal ocurre en la reserva de dCTP, seguida de las reservas de dATP, dGTP y dTTP después de 3 horas de incubación (Xie y Plunket, 1996).

2.2.1.4 Vía inhibición de la ADN polimerasas

La evidencia ha mostrado que la clofarabina resultó un potente inhibidor de la ADN polimerasa alfa y no tan potente de las ADN polimerasas beta, gamma, y ADN primasa (Parker *et al.*, 1991). La CI-F-ara-ATP fue detectada en uniones fosfodiéster, mientras que, la CI-F-ara-AMP fue detectada sitios de terminación de las rupturas del ADN (Xie y Plunkett, 1995). En células K562 (Parker *et al.*, 1991) y en células linfoblásticas humanas (CEM) (Xie y Plunkett, 1996), la incorporación de CI-F-ara-AMP en el ADN resultó en la terminación de la elongación de la cadena de ADN.

2.2.1.5 Vía apoptosis

La evidencia ha mostrado que la CIFdATP provoca daño directo sobre la mitocondria, lo que facilita la liberación del citocromo c y la activación de la vía intrínseca (Genini *et al.*, 2002), activa caspasas ejecutoras (Kaufman-Szymczyk *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2015), activa al factor inducible de apoptosis (FIA) y a la nucleasa Poli-ADP-ribosa (PARP) en células primarias de leucemia linfocítica crónica-B (Genini *et al.*, 2000; Curran y Perry, 2005) y formando cuerpos apoptóticos (Marzo *et al.*, 2001).

2.2.1.6 Vía metilación

La evidencia ha mostrado que la clofarabina presenta un efecto desmetilante en los promotores de genes SFRP1, DKK3, y WIF1, y modificaciones en la histona 3, que resulta en fragilidad cromosómica en células de la línea OCI-AML3 (Valdez *et al.*, 2015). También, causa desmetilación del gen supresor de tumor FHIT (del inglés *fragile histidine triad protein*), el cual se encuentra hipermetilado en la leucemia linfoblástica aguda (Stumpel *et al.*, 2015) y genes que codifican proteínas asociadas con la metilación del ADN (Majda *et al.*, 2010), como son Sp17 y SPAN-Xb lo que resultó en un decremento de dinucleótidos pareados citosina-guanina y subsecuentemente un decremento en la metilación del ADN (Zhang *et al.*, 2009). Esta actividad se ha asociado con la apoptosis (Fabianowska-Majewska *et al.*, 1995).

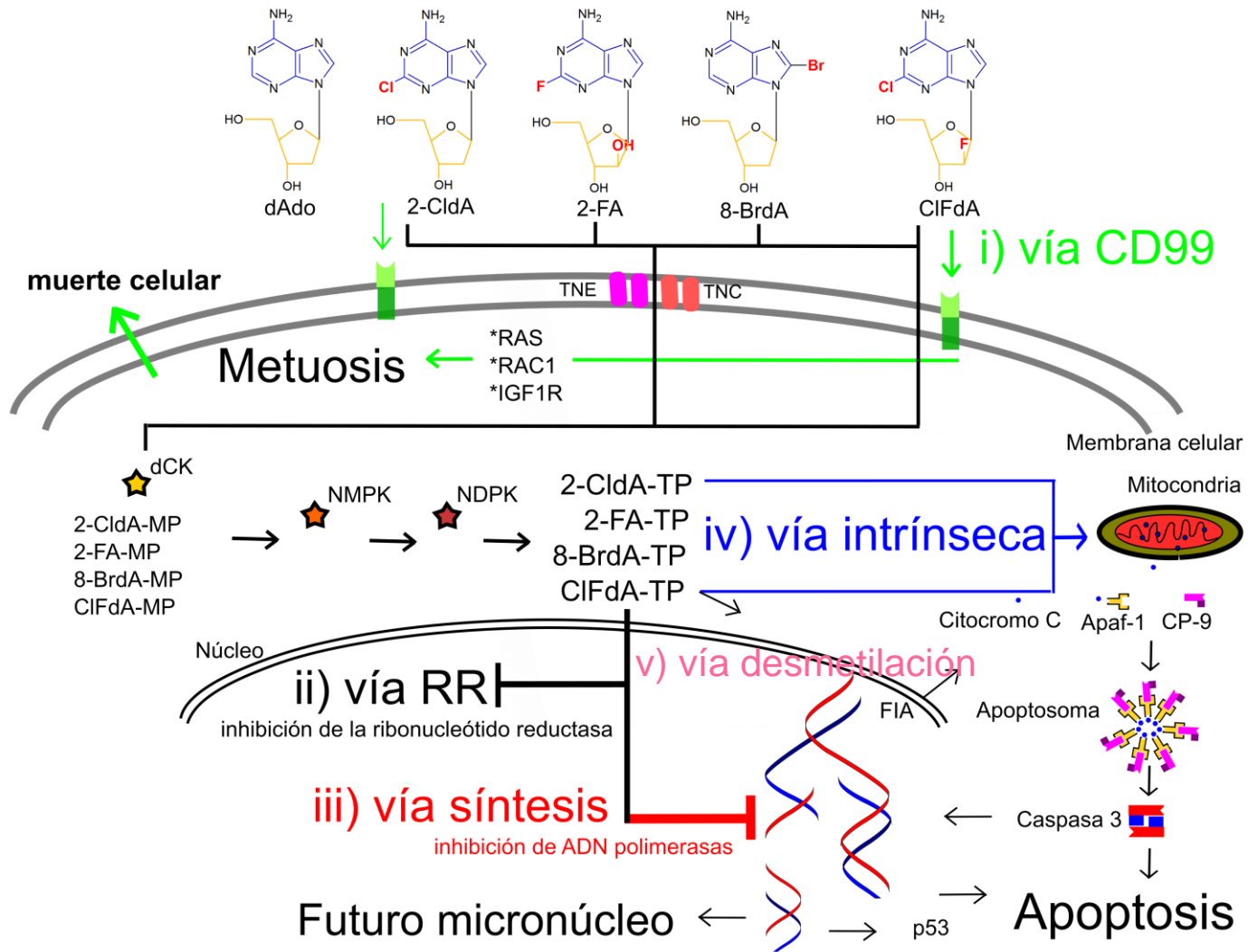


Figura 8. Esquema que representa el mecanismo celular de acción de la 2-CldA, 2-FA, 8-BrdA y CIFdA *in vitro* y su posible vía de inducción de micronúcleos.

3. Micronúcleos

3.1 Eritropoyesis

La eritropoyesis comprende los procesos biológicos de diferenciación, proliferación, actividades de síntesis y maduración de eritrocitos en cantidades apropiadas para el transporte de oxígeno requeridos por el organismo (Rifkind *et al.*, 1974). La Unidad formadoras de colonias eritroides (UFCe) son células troncales que se han podido cultivar (Bull, 2000).

El proeritoblasto es una célula grande de 20-25 μm de diámetro redonda a ovalada de forma irregular. Su núcleo ocupa cerca del 80% del volumen total, contiene cromatina fina distribuida en pequeños grupos, presenta uno o dos nucléolos bien definidos. Se diferencia hacia eritroblasto basofílico, debido a que presentan grupos de 2 a 6 polirribosomas (Bull, 2000).

El eritroblasto es una célula de menor tamaño que el proeritroblasto (16-18 μm). Su núcleo ocupa el 75% del volumen total, se ha observado eucromatina y heterocromatina, previo a la última división mitótica; algunos autores dividen al eritroblasto en eritroblasto basofílico, eritroblasto policromatófilo y eritroblasto ortocromático; durante estos estadios su núcleo se reduce a un 25% del volumen total y es excéntrico (Bull, 2000). En el eritroblasto ortocromático o normoblasto ocurre la segunda división mitótica, en su maduración hacia EPC o RET pierde el núcleo principal y su salida hacia la sangre periférica es por los poros de las células endoteliales. El núcleo se mantiene en la médula ósea y es fagocitado por los macrófagos (Bull, 2000).

El RET es una célula más pequeña de forma redonda a irregular que carece de núcleo, representa del 1 a 3% del total de la sangre, retiene las mitocondrias, algunos ribosomas, el centriolo, y restos del cuerpo de Golgi, no contiene retículo endoplasmático. La maduración del RET requiere de 24-48 horas, durante este tiempo, hay pérdida de los receptores de transferrina (Bull, 2000). El eritrocito es la forma final de la serie eritroide, es

un disco bicóncavo, mide de 7.5 a 8.7 μm de diámetro, su función es trasportar el oxígeno, en los seres humanos tiene una vida de 120 ± 20 días y en ratones de 25 días (Bull, 2000; Rifkind *et al.*, 1974) (Figura 9).

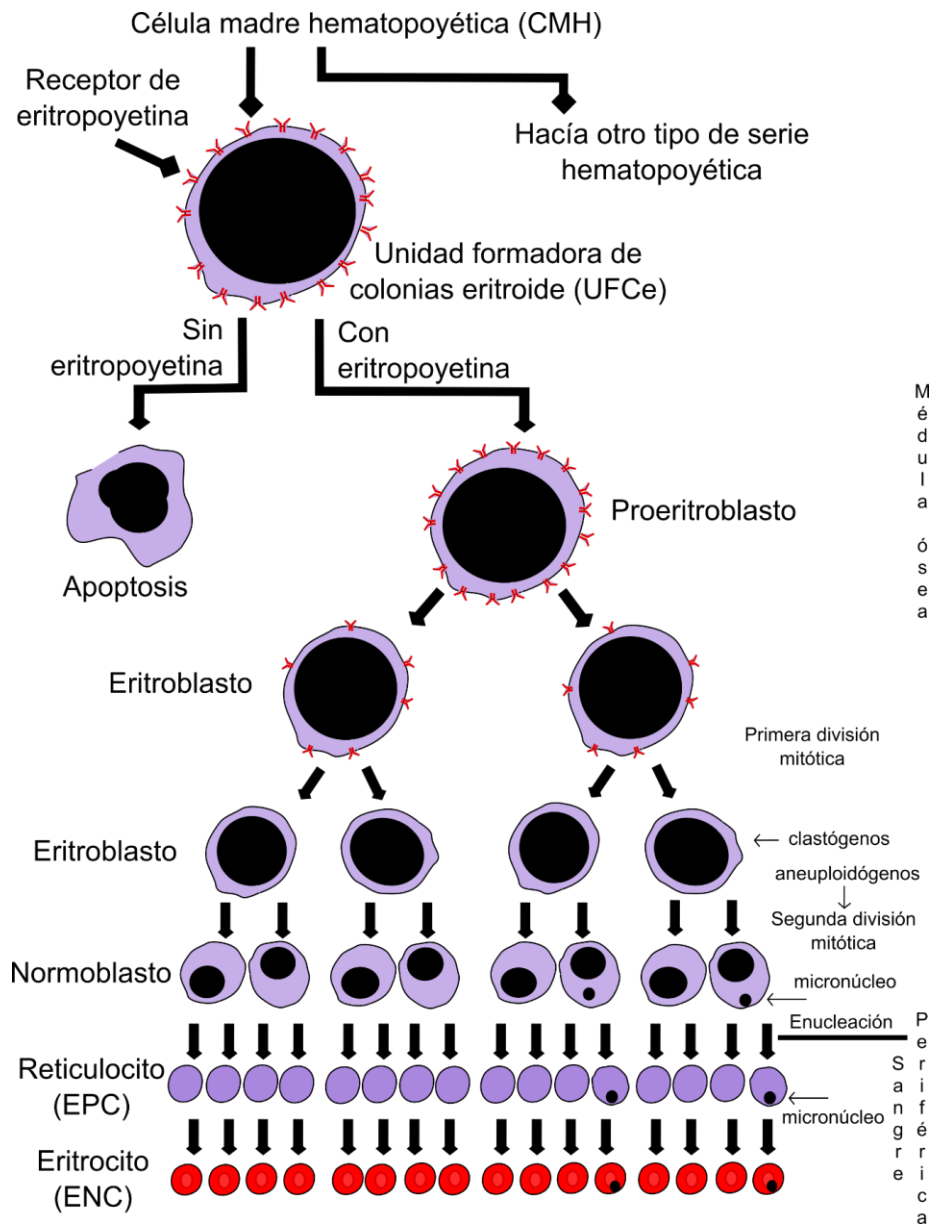


Figura 9. Esquema que representa la eritropoyesis y las células donde se visualizan micronúcleos inducidos por agentes aneuploidógenos o clastógenos. El micronúcleo no es enucleado como sucede con el núcleo principal. JQV

3.2 Inducción de micronúcleos

El micronúcleo está constituido por un pequeño residuo de cromatina aislada que no se incorporó al núcleo principal de las células hijas durante la anafase/telofase en la mitosis, se rodea de la membrana nuclear, pero mide de 1/20 a 1/5 parte del núcleo (Schmid, 1975). Estos han sido detectados y evaluados en células de la médula ósea y en sangre periférica, de distintos modelos biológicos como el hámster (Schmid 1973; 1975), ratón (Morales-Ramírez *et al.*, 1994), en la rata (Torous *et al.*, 2000), borrego, caballo, cerdo y toro (Cristaldi *et al.*, 2004) y en los seres humanos (Cervantes-Ríos *et al.*, 2012; 2018).

La inducción de EPC-MN se ha empleado como un ensayo en la detección de genotoxinas (Mavournin *et al.*, 1990), usando tanto la médula ósea (Weber *et al.*, 1975) como la sangre periférica de ratones (Tice *et al.*, 1990). Se ha demostrado que ambos ensayos son equivalentes (MacGregor *et al.*, 1980). Sin embargo, la prueba de micronúcleos *per se* no ofrece información sobre la dinámica o el modo o modos de acción de los agentes sobre el ADN o “*Genotoxicodinámica*” (Balmus *et al.*, 2015; Hayashi *et al.*, 2016). Para 1984, se integró el Grupo Colaborativo de Estudio de Micronúcleos cuyo propósito era lograr la estandarización de un protocolo como guía para el ensayo genotóxico. En 1997, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) elaboró una guía para realizar la prueba de EPC-MN en mamíferos en vivo y actualizada en 2016, bajo el título de *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test* (viable en <https://dx.doi.org/10.1787/9789264264762-en>) (OCDE, 2016); en los lineamientos, se sugiere realizar las mediciones en tiempos discretos (24 h, 48 h ó 72 h) lo que podría limitar la información genotóxica y resultar en conclusiones contradictorias. Es por ello que en 2017, Morales-Ramírez y colaboradores hacen una recomendación a la OCDE de ampliar el tiempo de análisis de los EPC-MN, para evitar el riesgo de discriminar la acción de las genotoxinas (Morales-Ramírez *et al.*, 2017a)

En un estudio realizado por Morales-Ramírez *et al.*, (1996), sobre radioprotección con clorofilina, se reportó que si se comparaban los EPC-MN inducidos en tiempos discretos (a las 20 h, 30 h y 40 h) de tres grupos de ratones, grupo 1 ratones tratados con

clorofilina, grupo 2 ratones expuestos a radiación y el grupo 3 ratones tratados con clorofilina más radiación, se podrían generar distintas conclusiones; a las 20 horas se podría haber concluido que la clorofilina tenía un efecto de protección total; a las 30 horas se podría concluir que la clorofilina presentaba una radioprotección de 50%; a las 40 horas, la clorofilina no presentaba protección y a las 50 horas, la clorofilina tenía un efecto radiosensibilizador; cuando determinó el área bajo la curva (ABC) de la frecuencia de EPC-MN en función del tiempo se concluyó que no había radioprotección (Figura 10).

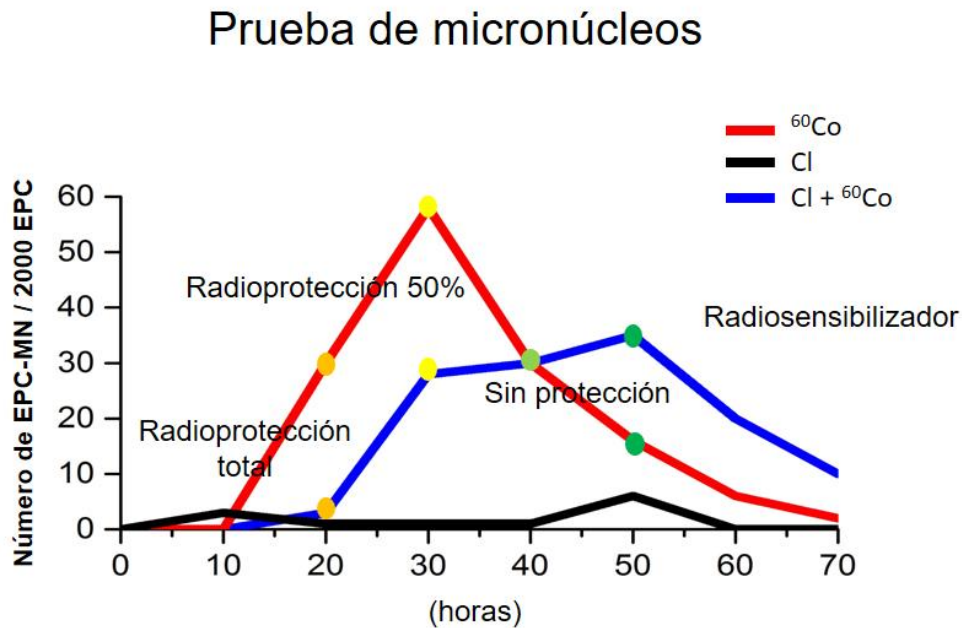


Figura 10. Superposición de las cinéticas de inducción de EPC-MN determinada por la acción de la radiación ionizante ^{60}Co (rojo); la clorofilina, Cl (negro) o Cl + ^{60}Co (azul). Tomado de Morales-Ramírez *et al.*, (1996).

3.2.1 Cinética de inducción de EPC-MN en normoblastos de ratón *in vivo*

A partir de esas observaciones, Morales-Ramírez *et al.*, (2014), propusieron emplear diversos agentes anticancerígenos y cuantificar periódicamente las frecuencias de EPC-MN. El modelo de cinética de inducción de EPC-MN en normoblastos de ratón *in vivo* presenta varias ventajas con respecto la evaluación en tiempos discretos 24, 48 o 72 h.

- a) Es *in vivo* y cada organismo es su propio control

- b) No se necesita sacrificar al animal
- c) Requiere de muestras pequeñas (~30 μ L) de sangre periférica
- d) El daño inducido por los agentes se lleva a cabo en el normoblasto, los micronúcleos son cuantificados en los reticulocitos de la sangre periférica
- e) Toma como índice el ABC que contempla el total de micronúcleos inducidos en 72 horas.
- f) Es un modelo válido para la determinación de la acción genotóxica del agente, se puede establecer:
 - i. El número de picos podría corresponder al número de vía(s) de rupturas de ADN.
 - ii. Se determina la frecuencia máxima (F_{máx}).
 - iii. El tiempo cuando de la F_{máx}, que se puede asociar con la naturaleza del agente
 - iv. Se determina la eficiencia genotóxica de acuerdo a la dosis administrada (Figura 11).

En cuanto a las principales desventajas se incluyen:

- a) La especificidad – afinidad de agentes sobre otras líneas celulares (p.e. linfocitos) podría ser limitada en los RET (línea eritroide).
- b) Utiliza microscopía de campo claro: resulta ser laborioso, los micronúcleos se analizan en 2000 EPC. La sensibilidad puede ser limitada.
- c) En el ratón, las dosis altas podrían causar elevada citotoxicidad y dificultar la cuantificación de los reticulocitos (OCDE, 2016).
- d) Oleadas de inducción de EPC-MN amplias, sugieren la acción de dos o más vías de acción.

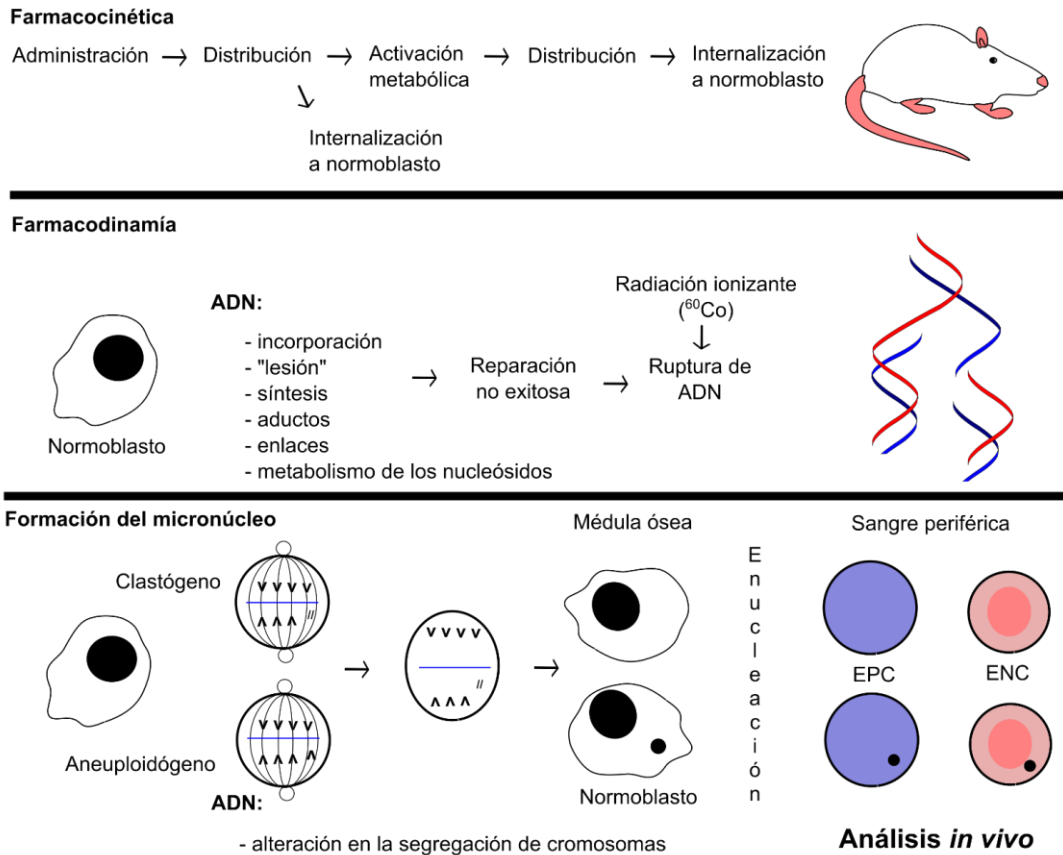


Figura 11. Esquema que representa la cinética, la dinámica y la formación de micronúcleos de un agente aneuploidógeno, clastógeno o radiación ionizante. Modificado de Morales-Ramírez *et al.*, (2006).

3.2.2 El análisis de las cinéticas de inducción de micronúcleos como una aproximación al estudio de la acción de análogos de la citidina y otros antineoplásicos

En la literatura, se ha mostrado que la azaC y la dFdC, antimetabolitos análogos de citidina, presentan diferencias en el modo de inducción de rupturas del ADN en sistemas *in vitro*; aunque ambos se incorporan al ADN en lugar de citosina (Jones y Taylor, 1980; Huang *et al.*, 1991). La azaC presenta al menos tres vías de inducción de rupturas del ADN, i) Los residuos de la azaC se unen covalentemente con la ADN - citosina metil transferasa formando un aducto, las rupturas son generadas durante su reparación (Santi

et al., 1984), ii) la incorporación de la azaC en la cadena del ADN puede generar errores de apareamiento, las rupturas podrían estar asociadas durante la reparación de errores de apareamiento o durante la reparación por recombinación (Hedge *et al.*, 1996; Morales-Ramírez *et al.*, 1997), iii) la azaC incorporada en la cadena de ADN impide que la citosina sea metilada, debido a las modificaciones en su estructura química, que subsecuentemente resulta en desmetilación y que a su vez resulta en fragilidad cromosómica y provoca rupturas (Viegas-Pequignot y Dutrillaux, 1981), estas acciones podrían ser equivalentes a los picos observados en la cinética de EPC-MN causados por la azaC.

La estrategia es asociar el tiempo que tarda una acción en inducir rupturas en el ADN y el tiempo de inducción de micronúcleos, p.e. las rupturas tempranas sobre el ADN durante la reparación del aducto en los normoblastos maduran a EPC con micronúcleos tempranos; las lesiones que causa la azaC como errores de apareamiento involucra la activación de mecanismos de reparación subsecuentes y podría implicar un ciclo de división adicional, esta acción se puede asociar a los EPC-MN desplazados un ciclo de división adicional. Finalmente, la persistencia de la azaC a la degradación y efectos desmetilantes podrían asociarse a rupturas de ADN tardía en los normoblastos y en consecuencia estos madurarían a EPC con micronúcleos tardíos (Morales-Ramírez *et al.*, 2008). (Figura 12 y 13A)

En el caso de la dFdC, la evidencia ha mostrado que inhibe a la polimerasa α , ϵ (Huang *et al.*, 1991), la topoisomerasa 1 (Pourquier *et al.*, 2002), la ribonucleótido reductasa (Heinemann *et al.*, 1989) y provoca rupturas en el ADN por la incorporación e inhibición de la síntesis de ADN (Huang *et al.*, 1986); *in vivo* la dFdC mostró un solo una sola oleada de inducción de EPC-MN a las 33 h y podría corresponder a un mecanismo celular de acción dominante. La asociación de la acción *in vitro* – *in vivo* consideró un desplazamiento en el tiempo de inducción de rupturas de ADN debido al tiempo de la incorporación y de la inhibición de la síntesis de ADN (Figura 13-B) (Morales-Ramírez *et al.*, 2017b).

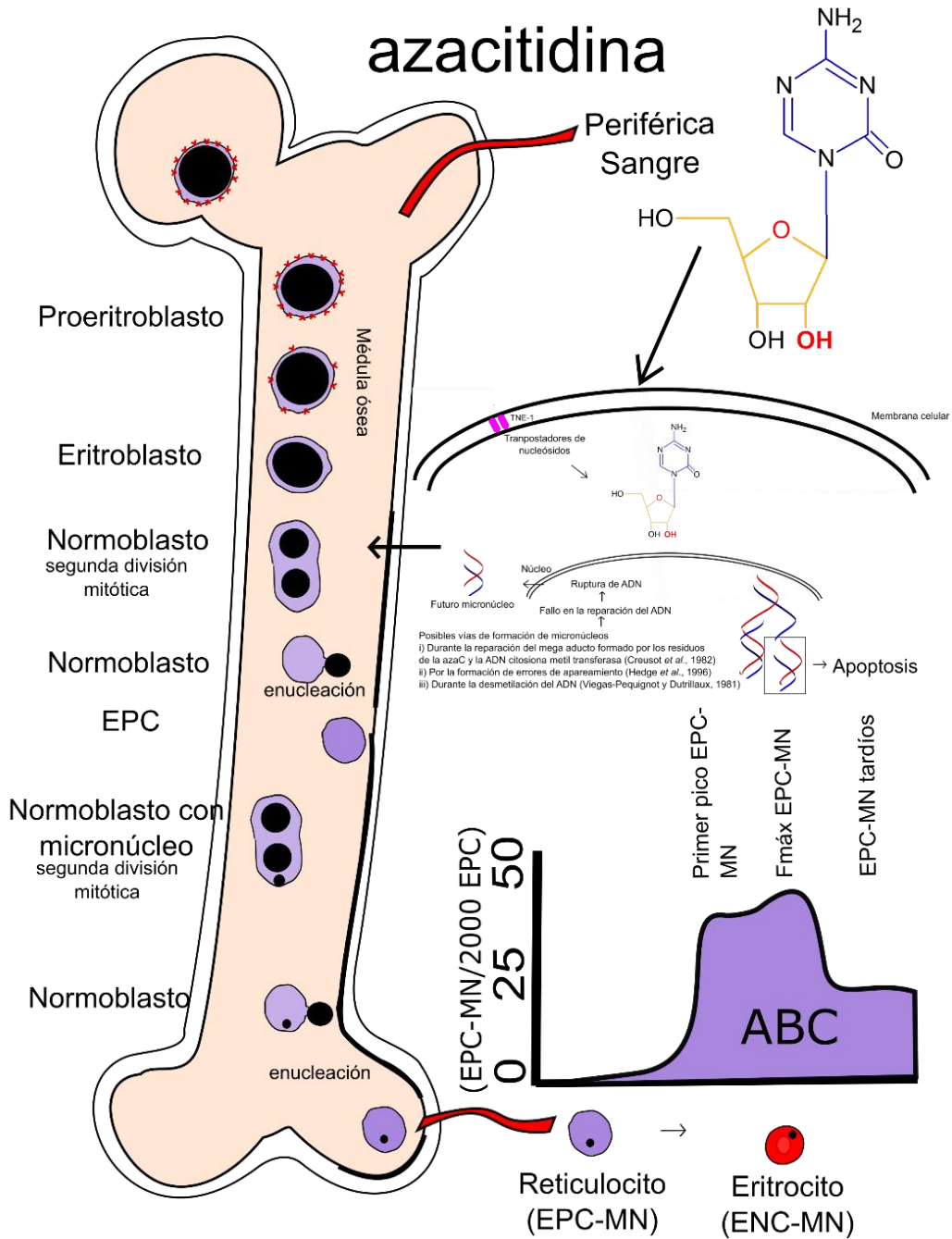


Figura 12. Esquema que representa el modo de acción de la azacitidina (azaC) *in vitro* y su posible relación con la inducción de micronúcleos *in vivo* (Morales-Ramírez *et al.*, 2008). Área bajo la curva (ABC). JQV

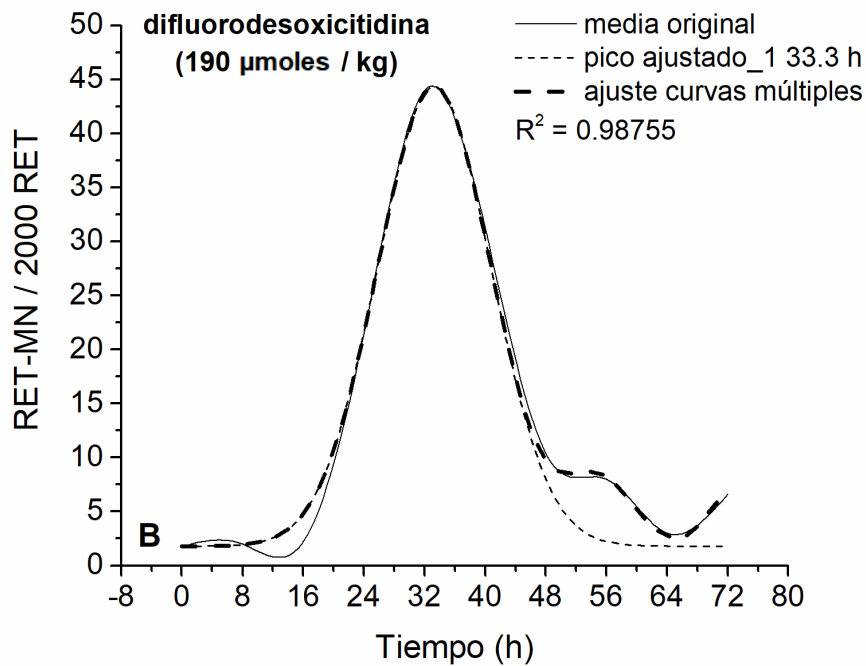
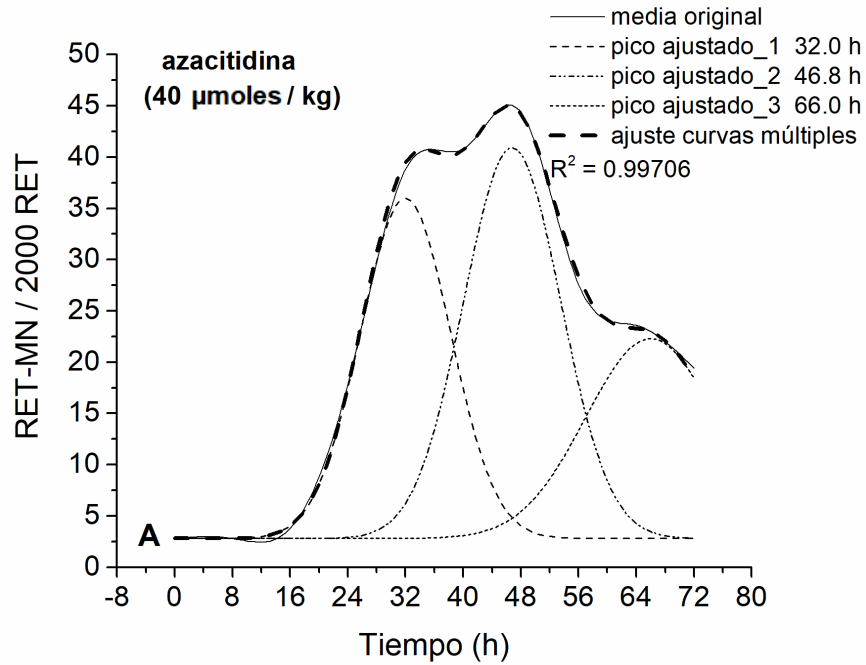


Figura 13. Genotoxicocinéticas causadas por la azacitidina (Morales *et al.*, 2008) (A) y por la difluorodesoxicitidina (Morales *et al.*, 2017) (B). En las gráficas se muestra el ajuste de curvas múltiples; que corrobora que el número de picos sugiere corresponder al número de vías de acción; R^2 - ajustada cercana a 1.

La actividad genotóxica de diversos agentes, puede ser agrupada con base en el tiempo de inducción relativa (Tir), asumiendo que la radiación ionizante (RI) provoca rupturas del ADN *in situ* en los normoblastos, estos maduran a EPC-MN tempranos observados a las 25.6 h. En cambio los agentes químicos requieren más tiempo debido a la farmacocinética y a su acción, los aneuploidógenos (COL, VNB, VNC) indujeron EPC-MN 3.5 h después de Tir, los alquilantes (BUS, BCNU, MMC) y Cist-pt 6 h después, los análogos de citidina (azaC y dFdC) 9 h después, la DMN indujo EPC-MN 11.5 h con respecto al Tir y los agentes que requieren activación metabólica como la CP y DNU indujeron tardíos (14.3 h) debido a su farmacocinética, metabolismo y su acción (Morales-Ramírez *et al.*, 2014).

3.2.3 Detección de RET-MN

Los EPC-MN son detectados en microscopía de campo claro por tinciones de May-Gruenwald-Giemsa, los EPC se tiñen de color azulado y los eritrocitos se tiñen de rojo y debe presentar un micronúcleo bien definido de 1/20 a 1/5 del núcleo principal (Schmid, 1975), o con un filtro de longitud de onda de color azul que mostraba los EPC de color morado intenso (Morales-Ramírez *et al.*, 1994) o detectados en microscopía de fluorescencia y citometría con naranja de tiazol o naranja de acridina para tinción del ARN reticulocitario, en este estudio la identificación de la población se realizó con base en la cantidad de ARN, los EPC presentaron mayor cantidad de ARN, los ENC carecieron de ARN y los micronúcleos fueron marcados con Hoechst (HO342) un marcador derivado de benzimidazol que tiene una alta especificidad por la cadena de ADN uniéndose preferentemente a regiones de A-T (Criswell *et al.*, 1998; Grawé *et al.*, 1992).

En 1996, Dertinger *et al.*, reconocieron por primera vez los RET-MN mediante los marcadores específicos, antiCD71-FITC que detecta al receptor de transferrina y yoduro de propidio como un agente intercalante para ácidos nucleicos (Dertinger *et al.*, 1996) y comercialmente distribuido en el Kit MicroFlow PLUS™ Laboratorios Litron (Torus *et al.*, 2000; Dertinger *et al.*, 2003). La detección de los RET-MN mediante marcadores específicos y analizados con el citómetro de flujo, amplificó el número de eventos evaluados e incrementó la sensibilidad del análisis con respecto a la microscopía de

campo claro (Abramsson-Zetterberg *et al.*, 1996; Dertinger *et al.*, 1996, 2003; Torous *et al.*, 2000; Kasamoto *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013; Balmus *et al.*, 2015). La cuantificación entre dos laboratorios independientes usando los marcadores del kit MicroFlow Plus™ (antiCD71-FITC y yoduro de propidio) presentó una correlación similar y cercana a 1 ($R^2 = 0.97$) y entre citometría y microscopía de fluorescencia la relación también fue cercana a 1 ($R = 0.92$) (Torous *et al.*, 2000; Dertinger *et al.*, 2003).

El citómetro de flujo consta de tres sistemas. i) un sistema de fluidos que aspira las células en suspensión que puede ser agua o una solución amortiguadora de fosfatos pasándolas por una red de tubo que termina por alinear cada célula, ii) un sistema óptico que cuenta con una fuente de luz (lámparas, láser) que impacta a cada célula y la fluorescencia es reflejada por espejos reflectores o dicroicos con determinada longitud de onda hacia fotodetectores y iii) un sistema electrónico que recibe la señal eléctrica en sensores luminosos o fotodiodos, para determinar el tamaño celular mediante la luz delantera o FSC (del inglés *Forward Scatter*) y luz lateral, para determinar la complejidad celular o SSC (del inglés *Side Scatter*) los cuales amplifican la señal y transforman los pulsos eléctricos y en señales digitales (Hoffman, 2008; Macey, 2010; Shapiro, 2003) Figura 14.

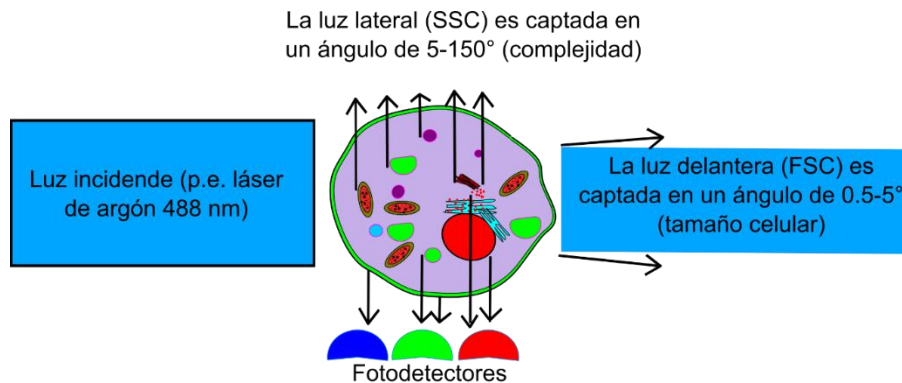


Figura 14. Incidencia de un haz de luz sobre substratos fluorescentes. Las células son alineadas por sistema de flujo, cada célula es impactada lateral o luz larga y captada por fotodetectores con determinada longitud de onda. Modificado de Shapiro (2003).

3.2.3.1 AntiCD71-FITC

El receptor de transferrina o CD71 es una proteína integral de membrana que regula el complejo transferrina-hierro, es una glicoproteína homodimérica de 760 aminoácidos que se expresa en los sincitiotriblastos de la placenta, miocitos, queratinocitos basales, hepatocitos, páncreas endocrino, espermatozoides y precursores eritroides. La proteína CD71 se expresa en los RET, cuando estos maduran a eritrocitos hay pérdida de los receptores de transferrina (Marsee *et al.*, 2010). El antiCD71 es la molécula que reconoce al receptor de transferrina (CD71) unido covalentemente al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína o FITC (del inglés Fluorescein Isothiocyanate), esta molécula absorbe la fluorescencia a 500 nm y la emite a 512-520 nm (Dertinger *et al.*, 1996; 2003).

3.2.3.2 Yoduro de propidio (IP)

Es una molécula que intercala entre los pares de bases de ADN y también en ARN, no tiene alguna preferencia por las bases; como el IP se intercala en ambos ácidos nucleicos se recomienda incubar las muestras con ARNs, para lisar los residuos de ARN presentes en los RET. Su absorción máxima es de 535 nm y su emisión es de 617 nm (Dertinger *et al.*, 1996).

4. Pregunta de investigación

¿Permitirá el análisis de la cinética RET-MN (acción genotóxica) y de cinética de RET (acción citotóxica) de los antineoplásicos análogos de desoxiadenosina ser una herramienta útil para explorar y aproximarse a su posible vías de acción *in vivo*?

5. Objetivo general

Aproximarse al mecanismo de acción genotóxico y citotóxico de antineoplásicos antimetabolitos análogos de desoxiadenosina.

5.1 Objetivos particulares

Determinar las cinéticas de RET-MN y RET *in vivo* causadas por la 2-CIdA, 2-FA, 8-BrdA y ClFdA en los normoblastos de ratón de la cepa ICR y correlacionarlas con los mecanismos de acción (*in vitro*) reportados previamente.

Comparar la respuesta de las cepas de ratón ICR y BALB/c a la administración aguda de la misma dosis de análogos de desoxiadenosina mediante el análisis de las cinéticas de inducción de RET-MN y RET.

6. Hipótesis

El análisis de las cinéticas de inducción de RET-MN (genotoxicidad) y de reducción de RET (citotoxicidad) causadas por la administración de antineoplásicos análogos de desoxiadenosina podría ser una herramienta útil para explorar y aproximarse a su(s) posible(s) vía(s) de acción *in vivo*.

7. Justificación

La comprensión de los mecanismos de acción de los antineoplásicos *in vivo* representa un reto importante para mejorar protocolos de quimioterapia aplicados a pacientes y reducir los efectos colaterales. La mayoría de las descripciones de los mecanismos de acción han sido estudiadas en sistemas *in vitro* empleando concentraciones y tiempos de exposición que no son equivalentes a las utilizadas durante la terapia. El paciente *per se* puede modular la respuesta hacia una acción magnificada, disminuida o distinta al mismo tratamiento, debido a la heterogeneidad molecular y diferencias en el metabolismo y farmacología.

Nosotros proponemos evaluar el daño citotóxico y genotóxico de antimetabolitos análogos de la adenina en normoblastos de ratón *in vivo*; la comprensión del mecanismo(s) de acción *in vivo* de estos antineoplásicos empleados en el tratamiento de leucemias, podría ser una herramienta útil para explorar el mecanismo de acción, mejorar los esquemas de quimioterapia o bien para regular su administración.

8. Material y métodos

8.1 Reactivos

La 2-clorodesoxiadenosina (cladribina o 2-ClIdA), la 2-Fluoroadenina (Fludarabina o 2-FA, la 2-cloro-2-fluoro-desoxiarabinofuranosil-adenosina (clofarabina o ClFdA) fueron adquiridas en ABCam Chemicals (Cambridge MA, EE.UU) y la 8-Bromodesoxiadenosina fue adquirida en Alfa Aesar (Tewksbury MA, EE.UU), la heparina sódica 1000 U/mL (INHEPAR, Laboratorios Pisa, México), el antiCD71-FITC (#Cat 334104, Biolegend, San Diego, CA, EE.UU), el yoduro de propidio (#Cat 02195458, MP Biomedicals Inc., Francia), la ribonucleasa A 1mg/mL (#Cat 02101076, MP Biomedicals Inc., Francia), el amortiguador de bicarbonato de sodio (BBS) (#Cat S6297, #Cat S3014 Sigma, St. Louis, MO, USA).

8.2 Animales

70 ratones machos ICR de 30 g y 4 semanas de edad fueron adquiridos de ENVIGO (Harlan México) y 45 ratones machos BALB/c de 30 g de edad y 4 semanas de edad fueron producidos en el bioterio del ININ. Los ratones fueron separados aleatoriamente y colocados en cajas de acrílico en grupos de 5, mantenidos a 22-24°C con periodos de luz de 7 am a 7 pm, alimentados con Purina para roedores pequeños y agua *ad libitum*.

8.3 Tratamientos

En el cuadro 2 se muestran las distintas dosis empleadas que fueron mezcladas en solución acuosa (0.2 – 0.6 mL) dependiendo de la concentración y administradas vía

intraperitoneal, cada tratamiento fue realizado independientemente. Las dosis empleadas fueron seleccionadas de acuerdo a la dosis probada de azaC (40 μ moles/kg), que indujo EPC-MN (Morales-Ramírez *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Dosis administrada a ratones				
	Agente	Cepa de ratón n=5	Dosis	
			μ moles/kg pc	mg/kg pc
1	Control	ICR		
2	RI	ICR	*0.25 Gy	
3	2-CldA	ICR	**16	4.5
4	2-CldA	ICR	47	13.4
5	2-CldA	ICR	190	54.2
6	CIFdA	ICR	25	7.5
7	CIFdA	ICR	50	15.1
8	CIFdA	ICR	100	30.3
9	2-FA	ICR	90	25.6
10	2-FA	ICR	135	38.5
11	2-FA	ICR	175	49.9
12	8-BrdA	ICR	50	14.2
13	8-BrdA	ICR	100	28.4
14	8-BrdA	ICR	150	42.6
15	2-CldA	BALB/c	16	4.5
16	2-FA	BALB/c	90	25.6
17	CIFdA	BALB/c	25	7.5
18	8-BrdA	BALB/c	50	14.2
19	8-BrdA	BALB/c	100	28.4
20	8-BrdA	BALB/c	150	42.6
21	Control	BALB/c	-	-

Radiación ionizante (RI), cladribina (2-CldA), clofarabina (CIFdA), fludarabina (2-FA) y 8-Bromodesoxiadenosina (8-BrdA). *Greys (Gy) razón de dosis 0.1 Gy/s. **La dosis de 16 μ moles/kg de 2-CldA corresponde a 1/20 parte de la dosis lethal 10 (DL10) en ratones (Reichelová *et al.*, 1995) y nueve veces más que la dosis de 0.5 mg/kg, la cual no indujo daño en el ADN *in vivo* (Antonucci y Takahashi, 2005).

Previo a la administración, se obtuvo una muestra de sangre periférica de cada ratón y fue usada como su propio control, subsecuentemente, las muestras de sangre fueron obtenidas cada 8 h hasta las 72 h. En el grupo control o sin tratamiento, solo se tomaron las muestras cada 8 h hasta las 72 h. Un grupo de cinco ratones fue irradiado con una dosis de 0.25 Gy de radiación gama de una fuente de Cobalto-60 (Gammacel), con una razón de dosis de 0.038 Gy/min. Las dosis fueron corroboradas con dosímetros termoluminiscentes.

8.4 Fijación, marcaje y adquisición de RET-MN

8.4.1 Fijación

Las muestras fueron fijadas y analizadas de acuerdo a métodos reportados previamente (Cervantes-Ríos *et al.*, 2012). Una gota de sangre periférica (~30 μ l) fue obtenida de la cola de cada animal y homogenizada con 30 μ l de heparina sódica (1:1). Las muestras fueron diluidas 1:2 en BBS a pH 7.5 (en 100 mL de agua destilada se mezcló 0.9 g de NaCl y 0.0444 g de NaHCO₃) se fijó una alícuota de 100 μ l en 2 ml de metanol a -75°C mediante una deposición rápida usando un vórtex e inmediatamente, las muestras fueron almacenadas a -75°C hasta su análisis.

Para mejorar la eficiencia y reproducibilidad de la fijación, un tubo Eppendorf fue cortado en el extremo inferior y fue usado para guiar la punta de la micropipeta con la muestra dentro de un criotubo de 4.5 mL, esto permitió depositar la muestra en el centro del vórtice dentro una distancia corta con metanol a -75 °C mediante un mezclador electrónico. El uso de este dispositivo permitió la fijación correcta del 100 % de las muestras, las cuales presentaron un análisis de 90% de células, con presencia mínima de agregados (Cruz-Vallejo *et al.*, 2019).

8.4.2 Marcaje de muestras

La evaluación de RET-MN en sangre periférica se hizo usando un método con citómetro de flujo establecido por Dertinger *et al.*, (1996) y las recomendaciones del kit MicroFlowPLUS (para sangre periférica de ratón) Laboratorios Litron, Rochester NY, EE.UU (viable en <https://litronlabs.com/getattachment/8023ae66-688f-4c3b-bec2-c73f424c7e21/Instruction-Manual-MicroFlow-PLUS-Mouse-Blood.aspx>).

8.4.3 Adquisición de datos

Un día antes de la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo, se procedió a procesarlas: a 7 ml de BBS frío se les adicionó 1.0 ml de la muestra mantenida a -75°C , los tubos fueron centrifugados a 4°C por 5 min. El botón fue recuperado en 25 μl de BBS frío y mezclado en un tubo de poliestireno con 80 μl de ribonucleasa A. Se prepararon tres tipos de tubos: i) un tubo de autofluorescencia que contenía 25 μl de la muestra, ii) un tubo como control de CD71 que contenía 25 μl de la muestra + 5 μl de antiCD71-FITC, iii) el resto de los tubos contenían 25 μl de la muestra + 5 μl de antiCD71-FITC + 2 μl de yoduro de propidio (820 $\mu\text{g}/\text{ml}$) agregado e incubado por 15 minutos previo a la adquisición. Todos los tubos fueron incubados a 4°C por 40 minutos, después a 22°C por 90 minutos y se adicionó 0.5 ml de BBS frío.

Se adquirió un millón de eventos a baja velocidad con el programa Cell Quest (Becton Dickinson version 3.0.1) en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson), que tiene un láser de argón de 488 nm. Los datos fueron ajustados a 2000 reticulocitos (RET) o 2000 eritrocitos (E). La emisión de antiCD71-FITC y yoduro de propidio se detectó en los canales de FL1 y FL2, respectivamente Figura 15. La regionalización de los RET y E con o sin micronúcleo fue realizada de acuerdo a Cervantes-Ríos *et al.*, (2012) Figura 16. Los datos fueron analizados con el programa WinMDI versión 2.9 (Joseph Trotter, trotter@scripps.edu) en un sistema Windows 10.

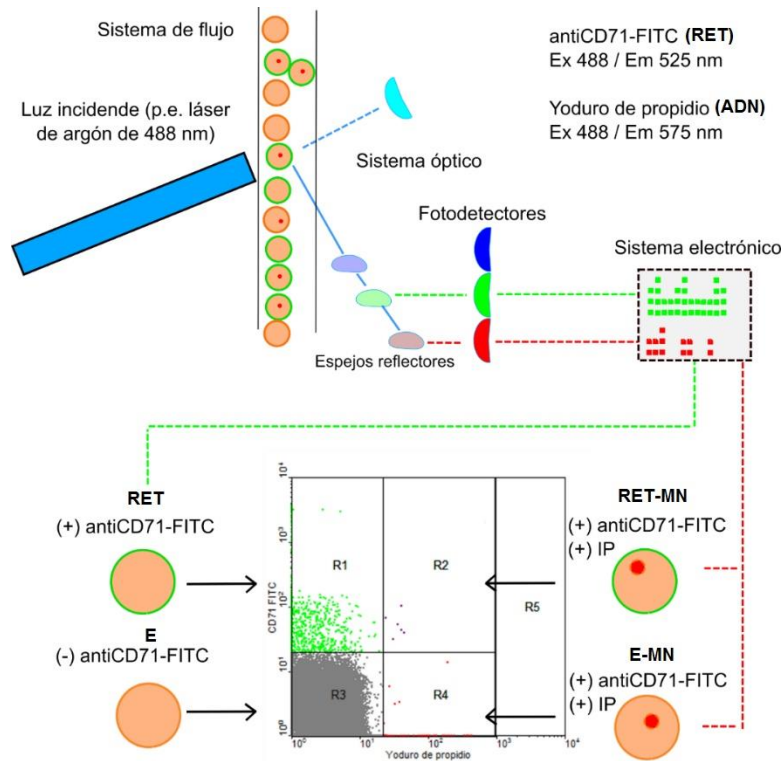


Figura 15. Esquema que representa la detección de los marcadores antiCD71-FITC y yoduro de propidio mediante el citómetro de flujo. Las células son alineadas por sistema de corriente, cada célula es impactada por un láser de argón, la emisión de fluorescencia es reflejada en un ángulo de 90° hacia espejos con filtros y captada por fotodetectores con determinada longitud de onda, la señal análoga es transformada en señal eléctrica y montada en una plantilla o citograma donde se identifican 5 regiones: RET o R1 = antiCD71-FITC(+) y IP(-); RET-MN o R2 = antiCD71-FITC(+) y IP(+); eritrocitos (E) o R3 = antiCD71-FITC(-) y IP(-); eritrocitos micronucleados (E-MN) o R4 = antiCD71-FITC(-) y IP(+); células nucleadas o R5 que fueron excluidas del análisis. Cada punto representa un evento evaluado. JQV

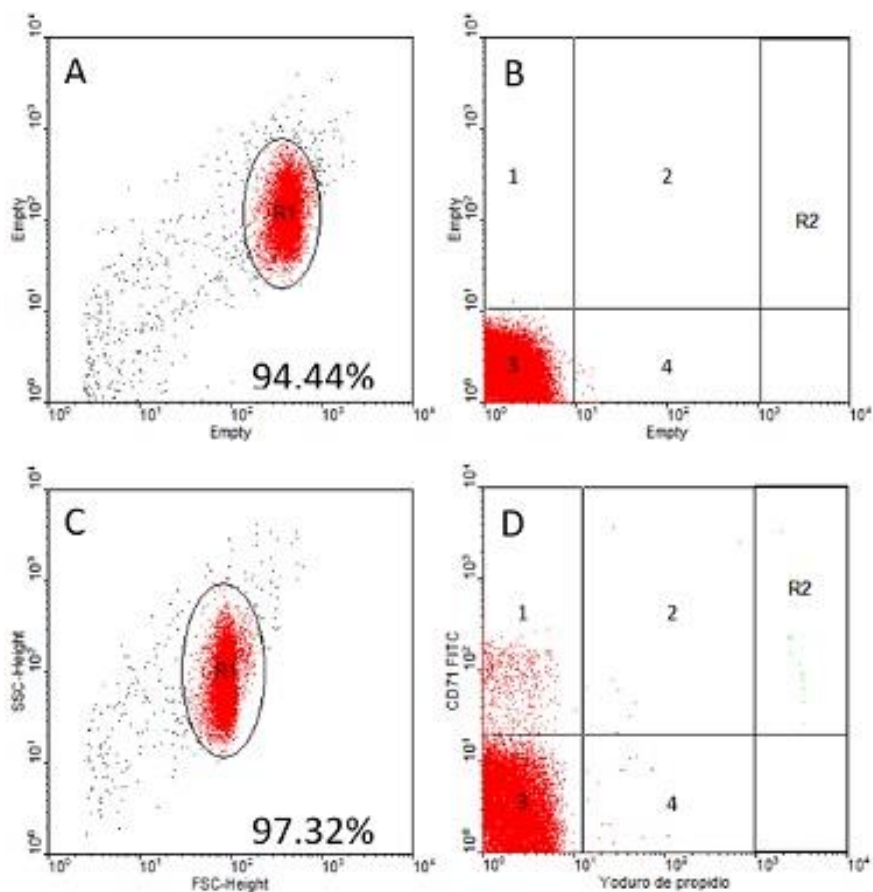


Figura 16. Estrategia de regionalización. Citogramas representativos de citometría de flujo de una muestra control (A y B) y de muestra provenientes de un ratón irradiado con 0.25 Gy de ^{60}Co a las 24 h (C y D). La región 1 (R1) corresponde a la población delimitada por su tamaño y complejidad y la región 2 (R2) corresponde a células nucleadas excluidas del análisis. 1. RET; 2. RET-MN, 3. eritrocitos 4. eritrocitos micronucleados. Cada punto representa un evento evaluado.

8.5 Genotoxicidad

La genotoxicidad fue definida por el ABC de RET-MN inducidos en 72 h en cada individuo, esto constituye un índice de la inducción total de RET-MN, la eficiencia genotóxica se determinó dividiendo el ABC entre la dosis.

8.6 Citotoxicidad

La citotoxicidad fue definida por el ABC de la reducción de RET en 72 h en cada individuo, la eficiencia citotóxica se determinó dividiendo el ABC entre la dosis. En ambos casos, la muestra basal se consideró como el tiempo cero o toxicidad nula.

8.7 Ajuste de curvas múltiples

A pesar de establecer una metodología reproducible para muestras pequeñas, algunos individuos presentaron cinéticas con curvaturas variables que sugerían la sobreposición de dos oleadas de inducción de micronúcleos, resultando en mayor variabilidad del tiempo de la respuesta. Para resolver el problema, las curvaturas de las cinéticas fueron analizadas mediante el análisis de curvas múltiples, el cual separa aquellas curvas con mayor amplitud o deconvolución, en curvas de tipo gaussiano Figura 17A y 17B.

Este análisis permitió identificar los tiempos teóricos de las inducciones de oleadas de micronúcleos o picos, el ABC de cada pico y el total, la frecuencia máxima con un ajuste cercano a 1 tomando como referente la cinética original. Por ejemplo, el individuo #4 del tratamiento de clofarabina presentó dos oleadas de inducción de micronúcleos a las 37.8 h y 54.9 h, pero la primera oleada visualmente presentó mayor amplitud (Figura 17C), después de la deconvolución resultó en tres picos teóricos con oleadas de inducción de micronúcleos a las 26.4 h, 40.1 h y 55.1 h con una R-cuadrada cercana a 1 Figura 17D.

8.8 Estadística

La normalidad de los datos fue determinada con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Mediante una prueba de t-pareada se establecieron las diferencias significativas entre la frecuencia de inducción de RET-MN / 2000 RET o de la frecuencia de reducción de RET / 2000 E (%) del tiempo cero y de las frecuencias de subsecuentes hasta las 72 h, $p < 0.05$ se consideró significativo. Las curvas fueron analizadas mediante el programa OriginPro 9.1 (Origin Lab Corporation, MA, EE.UU). La comparación entre las frecuencias de inducción de RET-MN / 2000 RET o las frecuencias de reducción de RET / 2000 E desde el tiempo cero y de las muestras subsecuentes hasta las 72 h de la cepa de ratón BALB/c contra la cepa de ratón ICR, fue establecida con una prueba de t-student, donde $p < 0.05$ se consideró significativo.

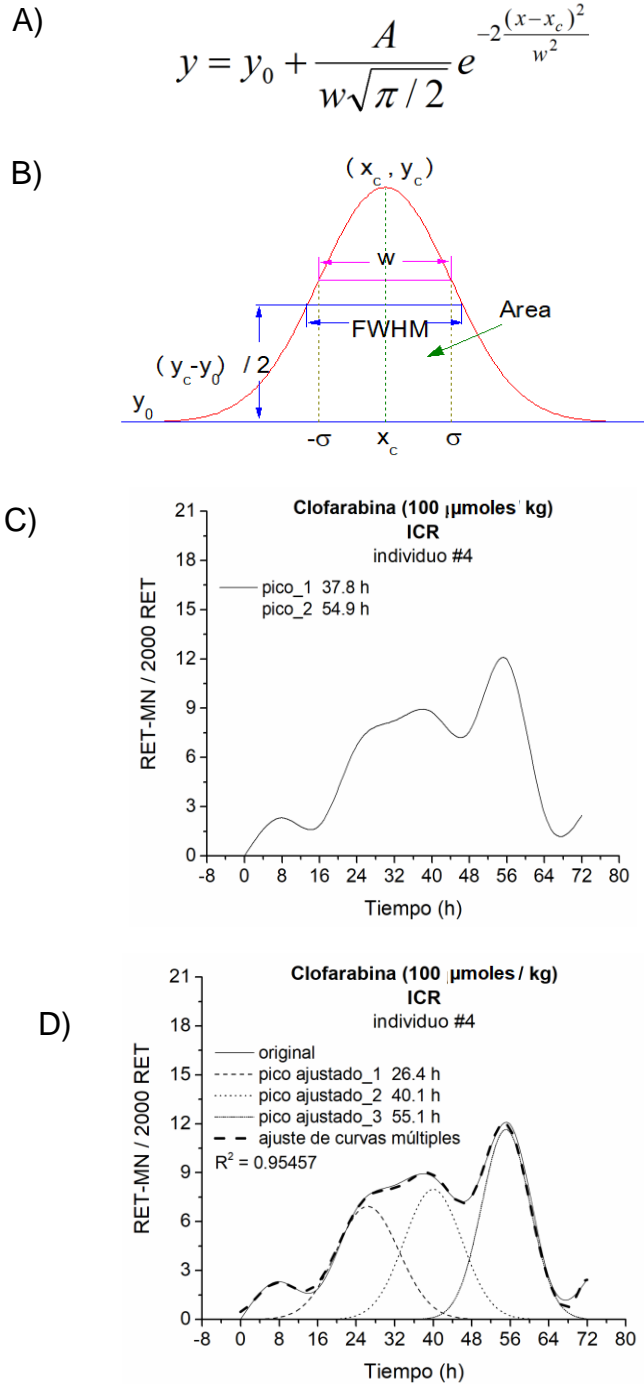


Figura 17. Ajuste de curvas múltiples. A) Corresponde a la fórmula matemática; B) Muestra las variables del ajuste, C) genotoxicocinética sin ajuste y D) genotoxicocinética con ajuste de curvas múltiples, con una R^2 -ajustada cercana a 1 del mismo individuo. Donde y_0 es el desplazamiento de la línea de base, X_c es el centro del pico, w (amplitud) es igual a 2 veces la desviación estándar de la distribución gaussiana ($2 * \sigma$) o aproximadamente 0.849 el ancho del pico a media altura. A (área) es el área bajo la curva. Sigma (σ) es $w/2$, el ancho a media altura (FWHM) es igual a $w * (2 * \ln 2)^{1/2}$. De los parámetros obtenidos, se analizó “xc” que corresponde al tiempo del centro del pico, la amplitud de los picos estrechos fue entre 8 y 16 unidades; unidades superiores a 16 corresponde a dos o más picos.

9. Resultados

9.1 Controles

La Figura 18 muestra las cinéticas de la actividad genotóxica y de la actividad citotóxica determinadas a través de la cuantificación periódica de las frecuencias de RET-MN en 2000 RET y a través de la reducción de RET en porcentaje de ratones ICR, BALB/c no tratados y ratones ICR irradiados con una dosis de 0.25 Gy de ^{60}Co .

Los resultados mostraron que el grupo de ratones no tratados de las cepas ICR (Figura 18A y 18B) y BALB/c (Figura 18C y 18D), no presentaron actividad genotóxica ni actividad citotóxica, lo que indica que la toma de muestra en función del tiempo no induce RET-MN, ni disminuye la población de RET en ambas cepas.

Con respecto al grupo de ratones irradiados con Cobalto-60, los resultados mostraron que la dosis de 0.25 Gy de ^{60}Co indujo un pico de RET-MN a las 24.5 h (Figura 18E). Citotóxicamente, se observó disminución de la población de RET a las 8 y 16 h y de las 24 h a las 54 h. La citotoxicidad total determinada por el ABC fue de 20% en función del tiempo (Figura 18F).

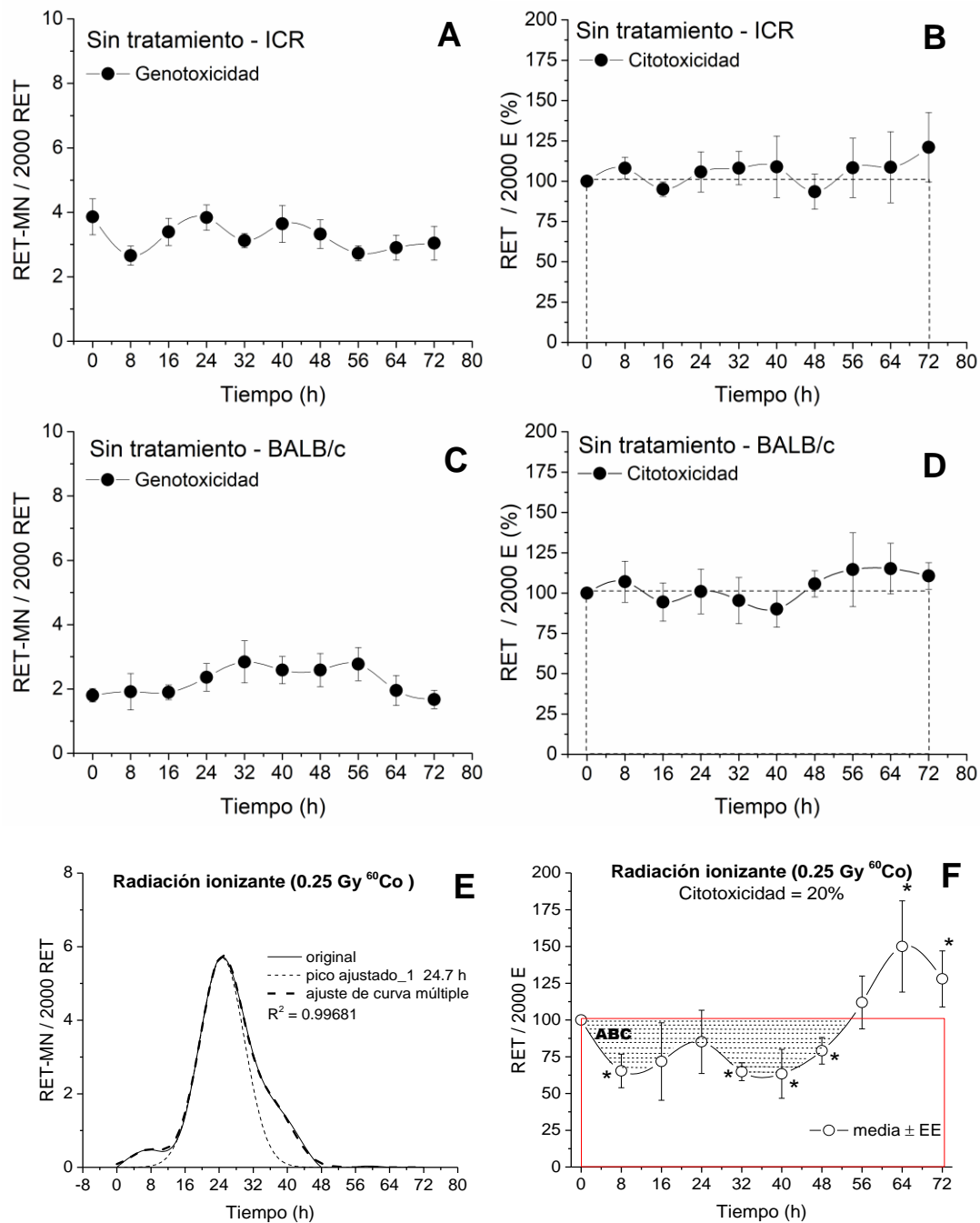


Figura 18. Cinética de inducción de RET-MN / 2000 RET y de la cinética de reducción de RET / 2000 E, desde la toma de muestra del tiempo 0 y de las muestras subsecuentes hasta las 72 h de ratones ICR no tratados (A y B), de ratones BALB/c (C y D) y de ratones expuestos a radiación ionizante con a una dosis de 0.25 Gy ⁶⁰Co, verificada con dosímetros termoluminiscentes (E y F). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al basal (t-pareada, p<0.05). El área sombreada corresponde al área bajo la curva (ABC) en 72 h.

9.2 Antineoplásicos análogos de desoxiadenosina de primera generación

9.2.1 Cladribina

La curvatura de la cinética de la dosis de 16 $\mu\text{moles/kg}$ presentó dos picos de RET-MN significativos, a las 24.3 ± 0.9 h y otro a las 48 ± 0.3 h. La curvatura de la cinética de la dosis de 45 $\mu\text{moles/kg}$ mostró dos picos RET-MN significativos, uno a las 22.9 ± 0.41 h y otro a las 42.03 ± 3.61 h; el segundo pico fue ligeramente mayor que el primer pico. La curvatura de la cinética de la dosis de 190 $\mu\text{moles/kg}$ formó tres picos significativos uno a las 24.0 ± 3.0 h, otro a las 42.1 ± 3.7 y el último a las 56.0 ± 1.3 h (Figura 19).

Los resultados sugieren que la cladribina podría presentar dos vías de inducción de rupturas con las dosis baja e intermedia y tres vías de inducción de rupturas en el ADN con la dosis alta. Todas dosis probadas inducen una oleada de inducción de RET-MN tempranas hacia las 24 h a lo obtenido por RI.

La reproducibilidad de los picos individuales fue corroborada mediante del análisis de ajuste curvas múltiples. El análisis individual mostró que la cladribina (190 $\mu\text{moles/kg}$), indujo tres picos que representan la actividad genotóxica a las 23.6 ± 2.7 h, 37.8 ± 4.5 h y a las 55.1 ± 3.9 h, con una R-cuadrada ajustada cercana a 1 (Figura 20).

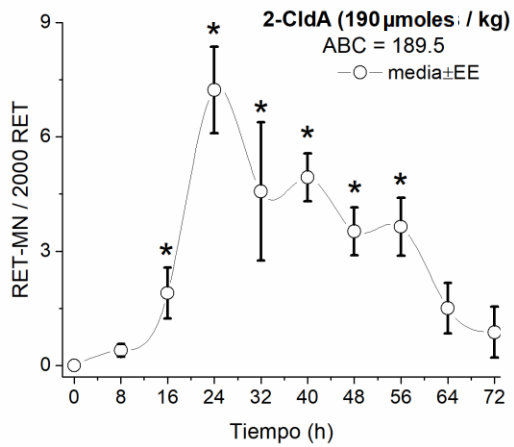
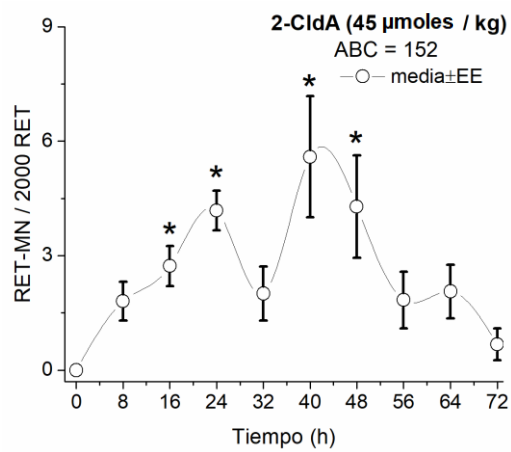
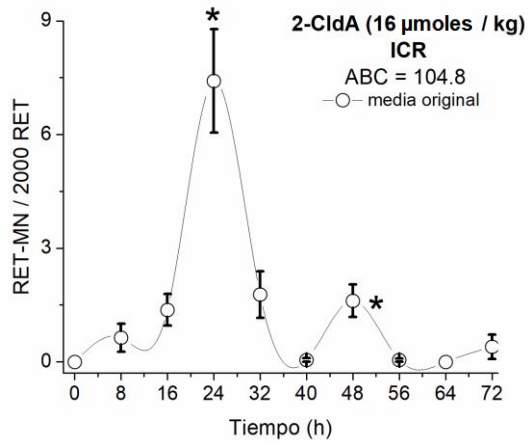


Figura 19. Cinéticas de inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 16 o 45 o 190 μ moles/kg pc de 2-CIdA entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsiguientes hasta las 72 h. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al basal (t-pareada, $p < 0.05$).

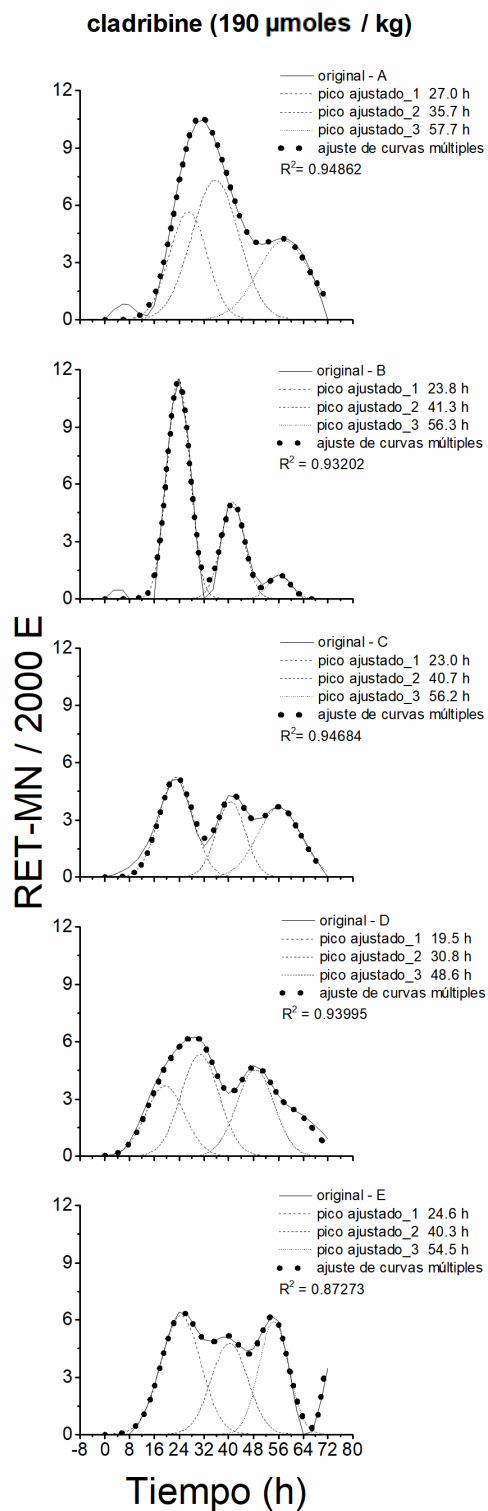


Figura 20. Respuesta genotóxica individual causada por la administración i.p. de 190 μ moles/kg de 2-ClIdA y analizadas con el modelo de ajuste de curvas múltiples en ratones ICR.

La dosis baja (16 μ moles/kg) indujo reducción de RET a las 8.0 h, a las 22.6 h y a las 53.1 h; la reducción máxima fue 30.7 % a las 22.6 h. La dosis intermedia (45 μ moles/kg) indujo reducción de RET significativa, a las 11.6 h y a las 47.2 h, en ambos puntos se presentó una reducción de RET similar de 40%. La curvatura de la dosis alta (190 μ moles/kg) presentó una reducción de RET prolongada, a las 8 h a las 39.8 h; la citotoxicidad máxima fue de 65.3 % a las 23.8 h (Figura 21).

El ABC genotóxica causado por las dosis de 16, 45 y 190 μ moles/kg de cladribina fue 104.8, 152 y 189.9 respectivamente, mientras que el ABC citotóxica fue 5.7%, 12.3% y 38.3%. Los resultados mostraron que la cladribina tiene una correlación positiva dosis – ABC genotóxica ($R^2 = 0.61$) y una correlación casi lineal de la dosis - ABC citotóxica ($R^2= 0.96$). Las eficiencias genotóxicas (ABC genotóxica / dosis en μ moles/kg) fueron 6.5, 4.2 y 1.1, mientras que las eficiencias citotóxicas (ABC citotóxica / dosis en μ moles/kg) fueron 0.3, 1.0 y 0.7 respectivamente (Figura 22).

La Figura 23 muestra la superposición de las cinéticas de RET-MN y del incremento de la reducción de RET causadas por la dosis alta (190 μ moles/kg) de cladribina. Los resultados mostraron que a partir de las 8 y 16 h se muestra un incremento de la reducción de RET y ausencia significativa de RET-MN, a partir de las 24 se observa una relación estrecha entre la citotoxicidad y la genotoxicidad.

La Figura 24 muestra el índice obtenido de la proporción de la citotoxicidad y genotoxicidad (C / G) de la dosis alta (190 μ moles/kg). Los resultados mostraron un etapa citotóxica temprana de la 8 -16 h que no depende del daño en el ADN y una etapa tardía de las 24 – 64 h que es dependiente de las rupturas del ADN.

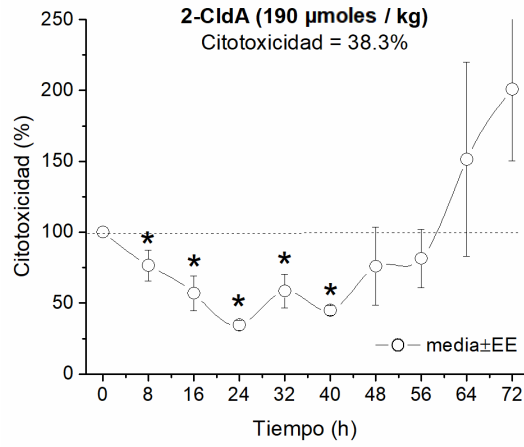
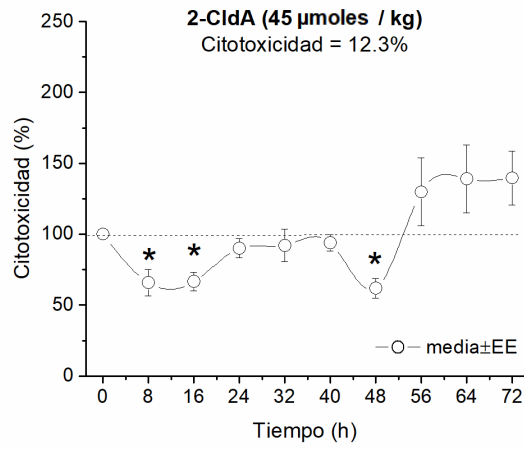
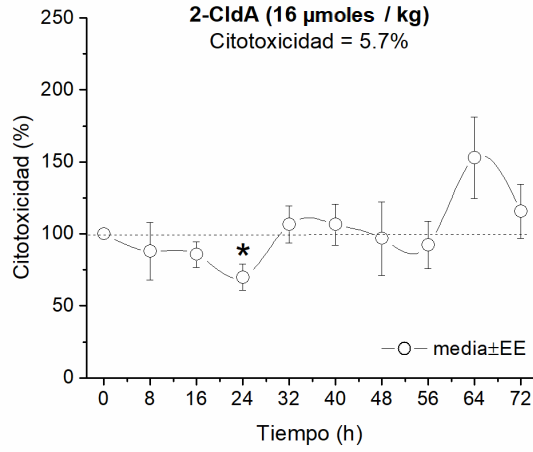


Figura 21. Cinéticas de reducción de RET / 2000 E (%), después de la administración de 16 o 45 o 190 μ moles/kg pc de 2-CldA entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsiguientes hasta las 72 h. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al basal (t-pareada, $p < 0.05$).

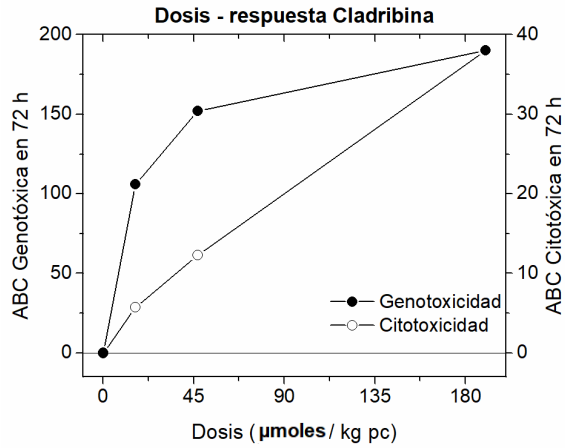


Figura 22. Curva dosis - respuesta en términos de ABC genotóxica y ABC citotóxica en 72 h causadas por las diferentes dosis de 2-ClidA.

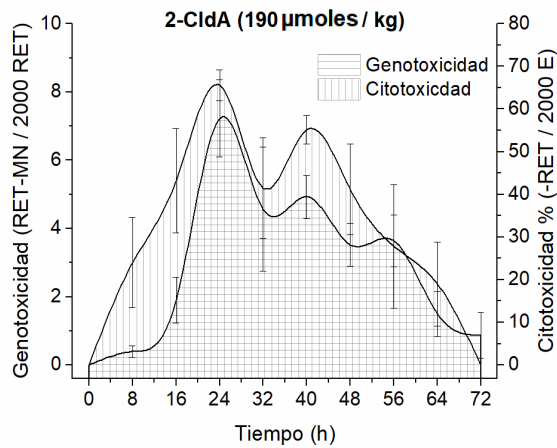


Figura 23. Superposición de la genotoxicocinética y de la citotoxicocinética originada por la administración i.p. de la dosis de 190 $\mu\text{moles / kg pc}$ de 2-ClidA.

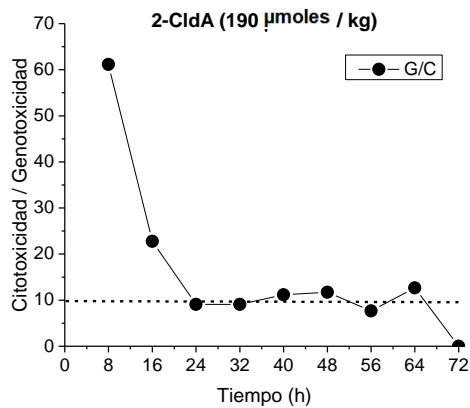


Figura 24. Proporción de la citotoxicidad / genotoxicidad de la dosis de 190 $\mu\text{moles / kg}$ de 2-ClidA.

9.2.2 Fludarabina

La curvatura de la cinética de RET-MN de la dosis baja (90 μ moles/kg) de fludarabina provocó dos picos de micronúcleos similares, el primer pico apareció a las 19.7 ± 3.4 h, el segundo pico apareció a las 43.6 ± 3.8 h. Con la dosis intermedia (135 μ moles/kg) provocó dos picos similares, a las 21.6 ± 3.8 h y a las 44.1 ± 3.2 h. Finalmente, la curvatura de la dosis alta (175 μ moles/kg) provocó un solo pico significativo a las 25.5 ± 4.1 h. Las frecuencias de RET-MN causadas con la dosis de fludarabina fueron bajas. Debido a que los RET-MN inducidos fueron ligeramente mayor al basal, no fue posible determinar su reproducibilidad individual con la dosis alta (Figura 25).

La dosis baja (90 μ moles/kg) presentó una reducción significativa de RET desde las 8 h a las 32 h, la reducción máxima fue de 23.8 % a las 22.4 h. La dosis intermedia (135 μ moles/kg), provocó reducción de RET a las 22.9 h y a las 40 – 48 h, en ambos puntos se presentó una citotoxicidad fue similar de 38%. La dosis alta (190 μ moles/kg) resultó en reducción de RET desde las 16 h hasta las 48 h; a las 24.2 h y a las 40.4 h, se presentó una citotoxicidad similar de 43% (Figura 26).

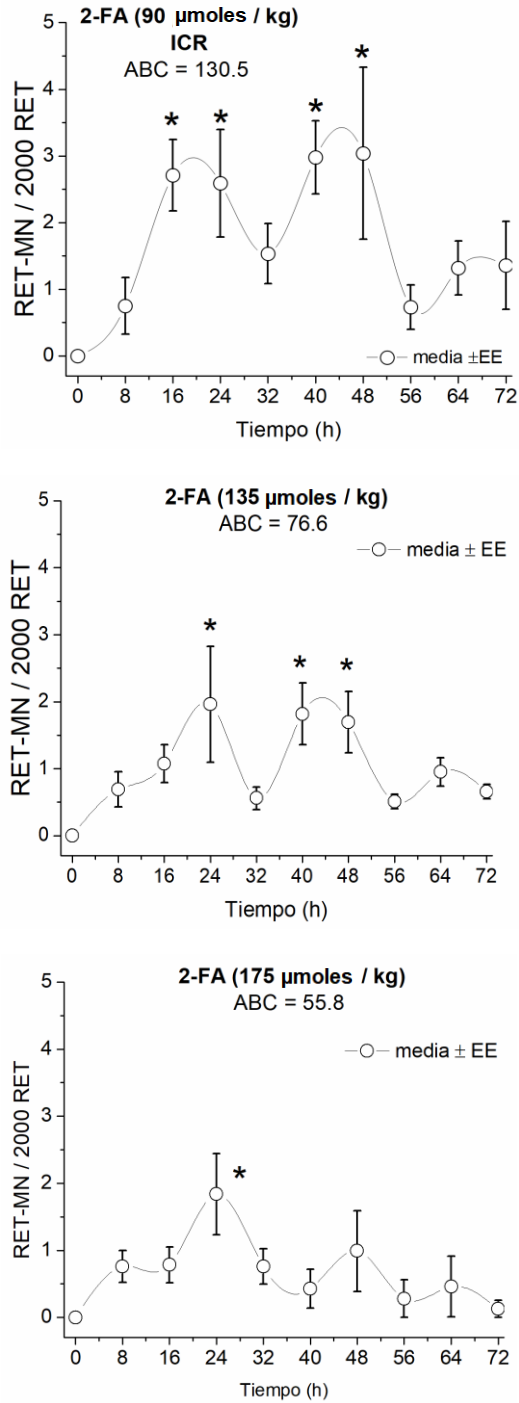


Figura 25. Cinéticas de inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 90 o 135 o 175 µmoles/kg pc de 2-FA entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsiguientes hasta las 72 h. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al basal (t-pareada, $p < 0.05$).

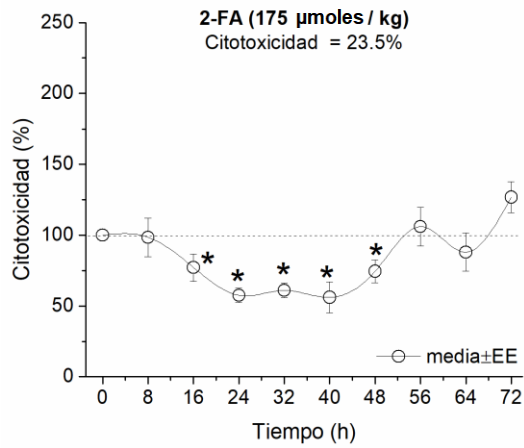
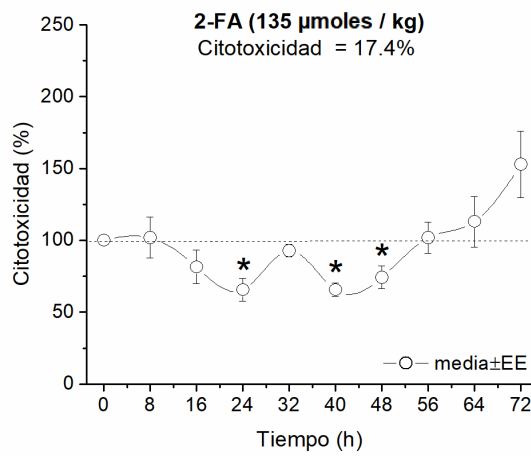
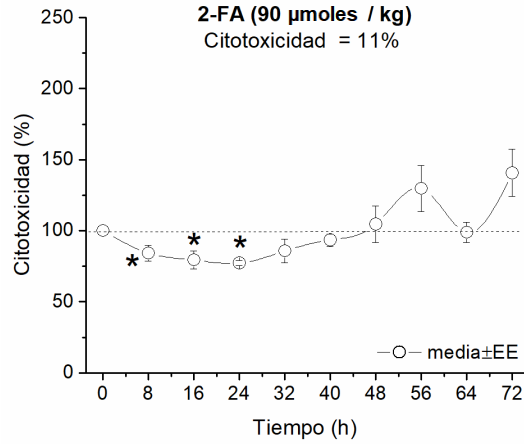


Figura 26. Cinéticas de reducción de RET / 2000 E, después de la administración de 90 o 135 o 175 μ moles/kg pc de 2-FA entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsecuentes hasta las 72 h. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al basal (t-pareada, $p < 0.05$).

La Figura 27 muestra la relación de la dosis respuesta genotóxica y citotóxica de las diferentes dosis de fludarabina. El ABC genotóxica causada por las dosis de 90, 135 y 175 $\mu\text{moles/kg}$ de fludarabina fue 130.5, 76.6 y 55.8 respectivamente, mientras que el ABC citotóxica fue 11.0 %, 17.4 % y 23.5 %. Los resultados mostraron que la fludarabina tiene una correlación negativa dosis – ABC genotóxica ($R^2 = -0.97$) y una correlación lineal de la dosis - ABC citotóxica ($R^2 = 0.99$). Las eficiencias genotóxicas (ABC genotóxica / dosis en $\mu\text{moles/kg}$) fueron 1.4, 0.5 y 0.2, mientras que las eficiencias citotóxicas (ABC citotóxica / dosis en $\mu\text{moles/kg}$) fueron 0.1, 0.1 y 0.1 respectivamente. Los resultados sugieren que la fludarabina es poco eficiente en la inducción de rupturas en el ADN y subsecuentemente en la inducción de RET-MN.

La Figura 28 muestra la superposición de las curvas de inducción de RET-MN y de reducción de RET causadas por la dosis alta (175 $\mu\text{moles/kg}$). Los resultados mostraron una relación estrecha entre la inducción de micronúcleos y la citotoxicidad, con excepción de las 24 y 32 h.

La Figura 29 muestra el índice obtenido de la proporción de la citotoxicidad y genotoxicidad (C / G) de la dosis alta (175 $\mu\text{moles/kg}$). Los resultados mostraron un efecto citotóxico intermedio entre las 24 - 32 h que no fue dependiente del daño en el ADN.

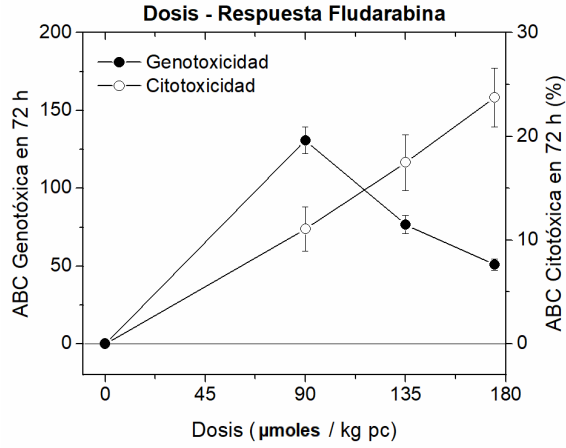


Figura 27. Curva dosis-respuestas en términos de ABC genotóxica y ABC citotóxica en 72 horas después del tratamiento con diferentes dosis de 2-FA.

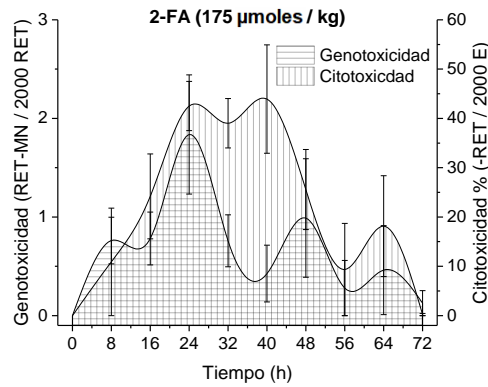


Figura 28. Superposición de la genotoxicocinética y de la citotoxicocinética causada por la dosis de 175 µmoles/kg de 2-FA.

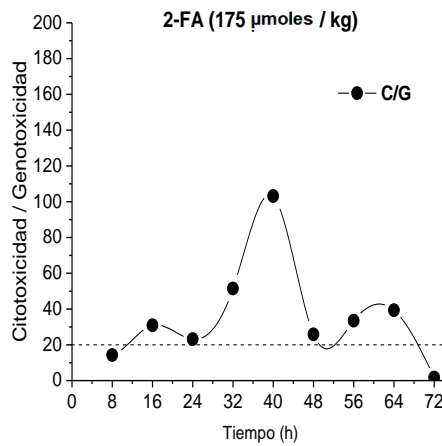


Figura 29. Proporción de la citotoxicidad / genotoxicidad de la dosis de 190 µmoles/kg de 2-FA.

9.2.3 8-Bromodesoxiadenosina

Genotóxicamente, la curvatura de la cinética de RET-MN de la dosis de 50 μ moles/kg indujo micronúcleos hasta las 62.7 ± 2.4 h. La curvatura de la cinética de la dosis de 100 μ moles/kg indujo dos picos significativos a las 23.9 ± 0.3 h y a las 65.3 ± 1.9 h. La dosis de 150 μ moles/kg presentó dos picos de RET-MN significativos una a las 23.9 ± 0.3 h y otra a las 42.1 ± 3.7 , el segundo pico resultó ligeramente mayor (Figura 30). La inducción de RET-MN fue baja y no fue posible determinar su reproducibilidad individual con la dosis alta.

Citotóxicamente, la dosis baja (50 μ moles/kg) presentó una reducción de RET significativa a las 40 h, la reducción máxima fue de 39%. La dosis intermedia (100 μ moles/kg) mostró una reducción de RET significativa a las 23.7 h con una la reducción máxima fue 32.8%. La dosis alta (150 μ moles/kg) presentó una reducción de RET prolongada de las 8 h hasta las 48 h, la reducción máxima de RET ocurrió a las 43.8 y fue de 39.1% (Figura 31).

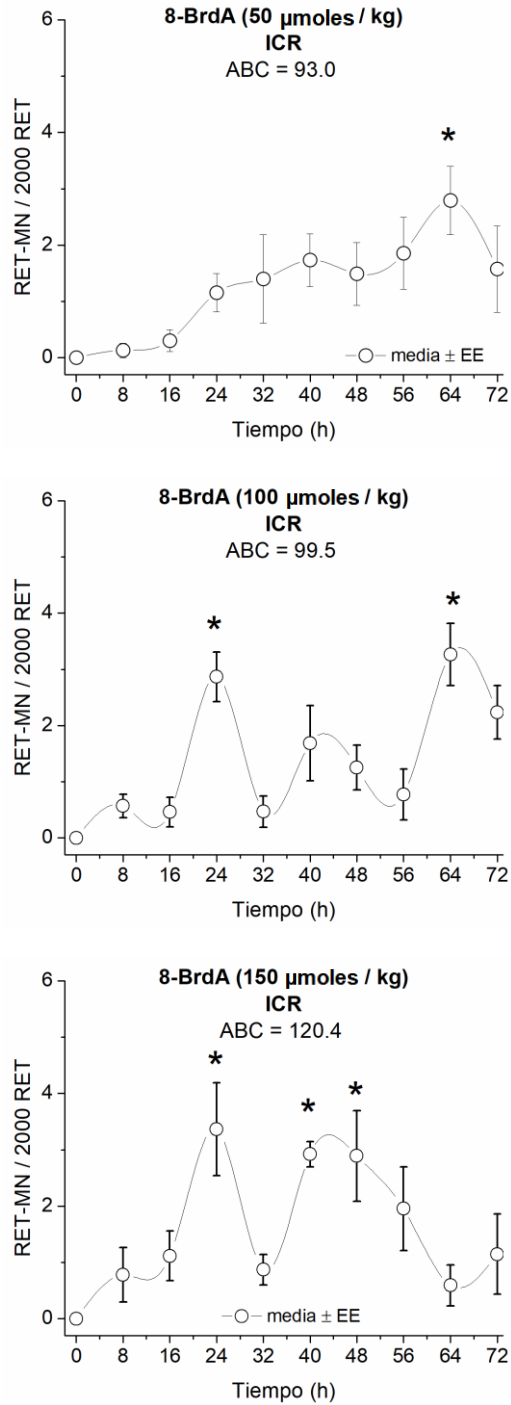


Figura 30. Cinéticas de inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 50 o 100 o 150 µmoles/kg pc de 8-BrdA entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsiguientes hasta las 72 h. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al basal (t-pareada, p<0.05).

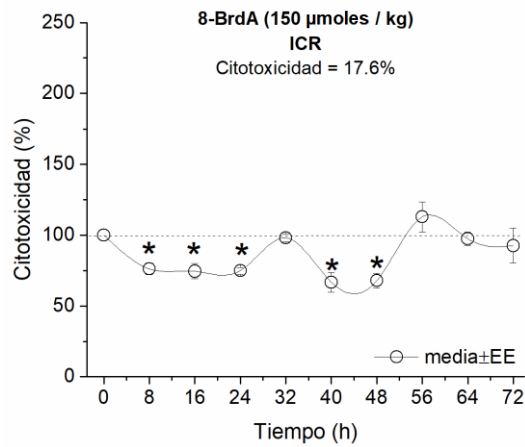
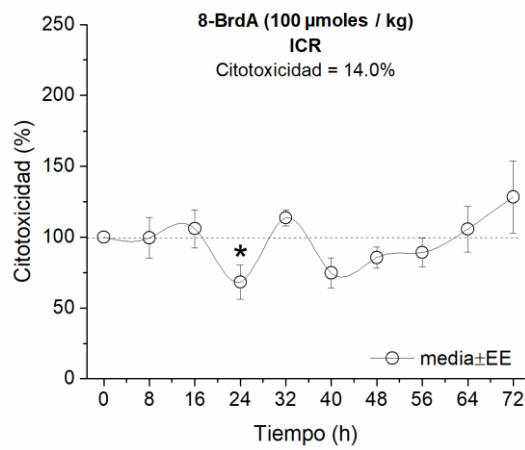
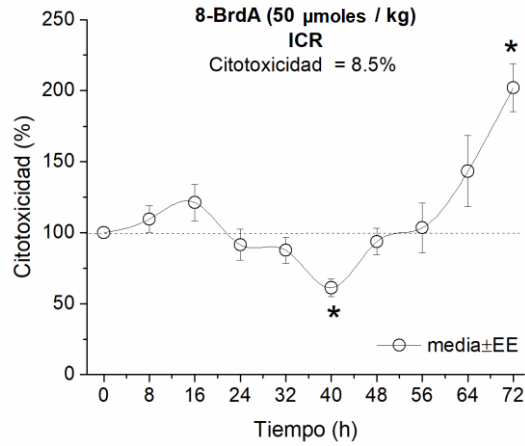


Figura 31. Cinéticas de reducción de RET / 2000 E (%), después de la administración de 50 o 100 o 150 μ moles/kg pc de 8-BrdA entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsiguientes hasta las 72 h. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al basal (t-pareada, $p < 0.05$).

El ABC genotóxica causado por las dosis de 50, 100 y 150 μ moles/kg de la 8-BrdA fue 93, 99 y 120, mientras que el ABC citotóxica fue 8.5%, 14.0% y 17.6%. Los resultados mostraron que la 8-BrdA tiene una correlación positiva dosis – ABC genotóxica ($R^2 = 0.90$) y una correlación lineal de la dosis - ABC citotóxica ($R^2 = 0.98$). Las eficiencias genotóxicas (ABC genotóxica / dosis en μ moles/kg) fueron 1.8, 0.9 y 0.8, mientras que las eficiencias citotóxicas (ABC citotóxica / dosis en μ moles/kg) fueron 0.1, 0.1 y 0.1. Los resultados sugieren que la 8-BrdA es poco eficiente en la inducción de rupturas en el ADN y subsecuentemente en la inducción de RET-MN (Figura 32).

La Figura 33 muestra la superposición de las curvas de inducción de RET-MN y de reducción de RET causadas por la dosis alta (190 μ moles/kg). Entre las 8 – 16 h se muestra citotoxicidad y ausencia de genotoxicidad y a partir de las 24 se observa una relación estrecha entre la citotoxicidad y la genotoxicidad.

La Figura 34 muestra el índice obtenido de la proporción de la citotoxicidad y genotoxicidad (C / G) de la dosis alta (150 μ moles/kg). Los resultados mostraron una etapa citotóxica temprana de la 8 - 16 h que no depende del daño en el ADN (similar a la cladribina, fludarabina) y una etapa tardía de las 24 – 64 h que es dependiente de las rupturas del ADN.

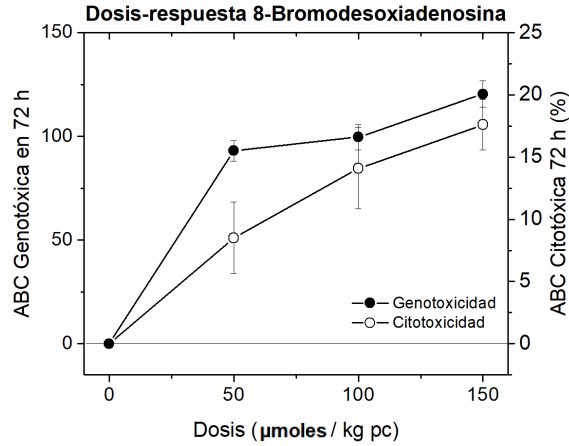


Figura 32. Curva dosis - respuesta en términos de ABC genotóxica y ABC citotóxica en 72 h causadas por las diferentes dosis de 8-BrdA.

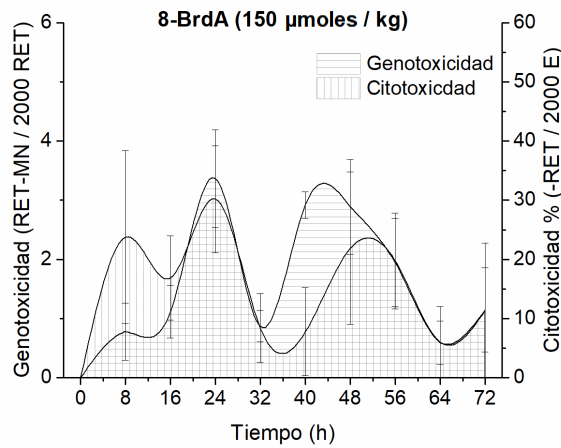


Figura 33. Superposición de la genotoxicocinética y de la citotoxicocinética originada por la administración i.p. de la dosis de 150 µmoles/kg pc de 8-BrdA.

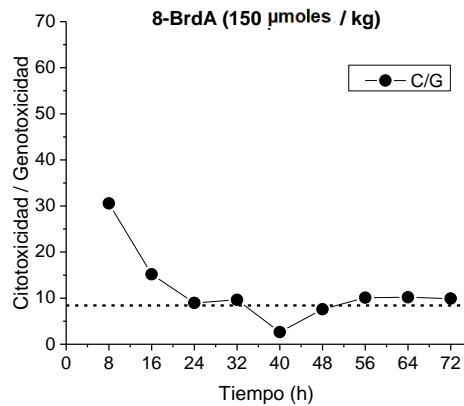


Figura 34. Proporción de la citotoxicidad / genotoxicidad de la dosis de 150 µmoles/kg de 8-BrdA.

9.3 Antineoplásico análogo de desoxiadenosina de segunda generación

9.3.1 Clofarabina (ICR)

Genotóxicamente, la curvatura de la cinética de la dosis baja (25 μ moles/kg) e intermedia (50 μ moles/kg) presentaron un pico de RET-MN a las 27.8 ± 1.8 h y 28.3 ± 3.5 h, respectivamente. La dosis alta (100 μ moles/kg) mostró picos de RET-MN a las 32.9 ± 3.8 h y a las 46.5 ± 3.8 h; el segundo pico resultó mayor que el primero y una inducción prolongada de RET-MM hacía las 56 h – 64 h. Estos resultados sugieren que la clofarabina presenta una vía de inducción de rupturas con las dosis baja e intermedia y tres vías de inducción de rupturas en el ADN con la dosis alta.

La reproducibilidad de los picos individuales fue corroborada mediante del análisis de curvas múltiples. El análisis individual mostró que la clofarabina indujo dos oleadas de inducción de RET-MN, a las 27.3 ± 2.9 h y a las 45.2 ± 4.1 h, con una R-cuadrada ajustada, cercana a 1. El individuo #4 presentó tres picos genotóxicos (Figura 36).

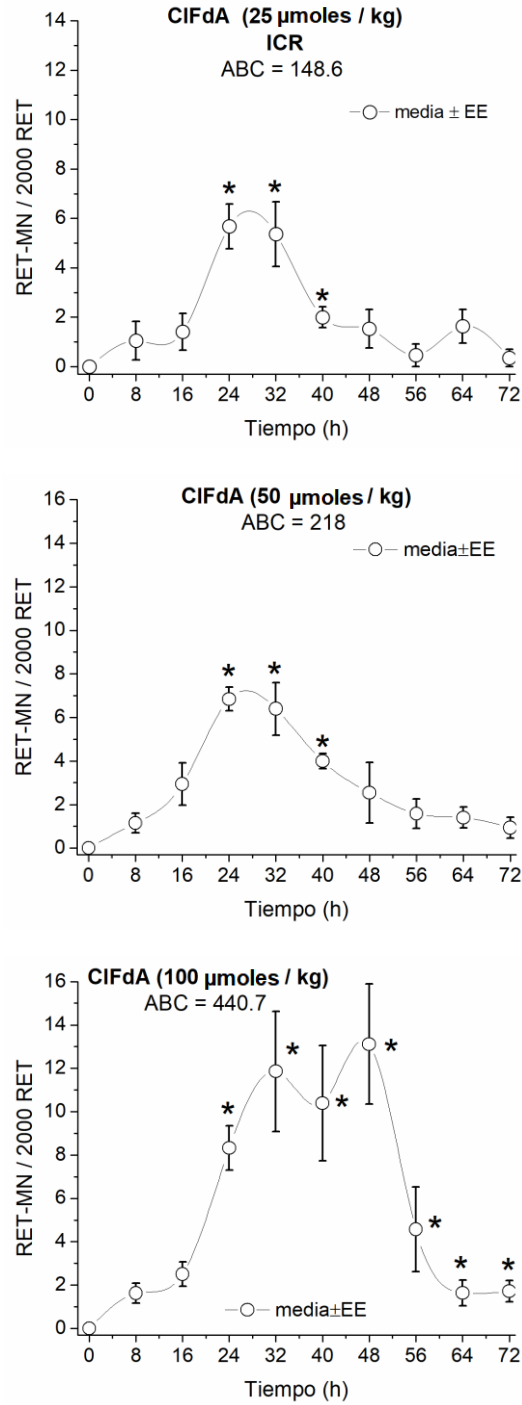


Figura 35. Cinéticas de inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 25 o 50 o 100 µmoles/kg pc de CIFdA entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsiguientes hasta las 72 h. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al basal (t-pareada, $p < 0.05$).

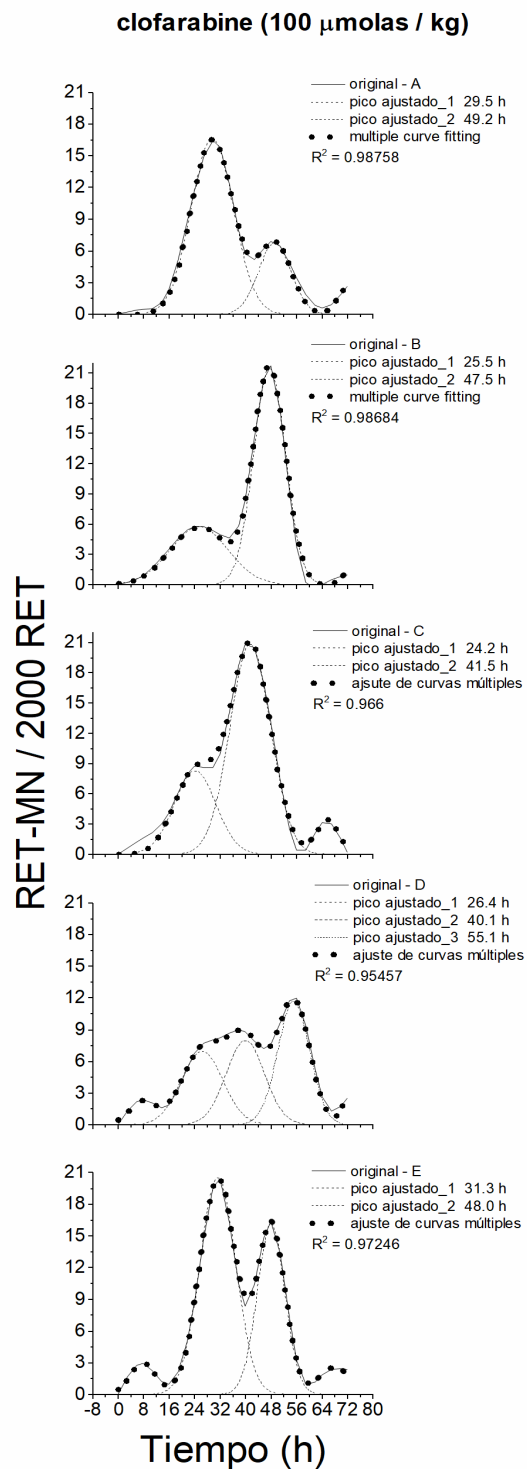


Figura 36. Respuesta genotóxica individual causado por la administración i.p. de 100 μ mol/kg de clofarabina y analizadas con el modelo de ajuste de curvas múltiples.

Citotóxicamente, la dosis baja (25 μ moles/kg) mostró reducción de RET significativa de las 24 h a las 40 h, la citotoxicidad máxima fue de 45.9% a las 23.9 h. La dosis de 50 μ moles/kg mostró una citotoxicidad prolongada desde las 8 h hasta 56 h, la citotoxicidad máxima fue de 57.6% y ocurrió a las 27.9 h. Finalmente, con la dosis alta (100 μ moles/kg) se observó una reducción amplia desde las 8 – 56 h; entre las 24 y 48 h, la citotoxicidad se mantuvo entre 71.3 % y 76%.

El ABC genotóxica causada por la dosis de 25, 50 y 100 μ moles/kg de clofarabina fue 148.6, 218 y 440.7, mientras que el ABC citotóxica fue 16.8%, 30.6% y 48.5%. Los resultados mostraron que la clofarabina tiene una correlación positiva lineal de la dosis – ABC genotóxica ($R^2 = 0.98$) y de la dosis - ABC citotóxica ($R^2= 0.98$). Las eficiencias genotóxicas (ABC genotóxica / dosis μ moles/kg) fueron 6.0, 4.3 y 4.4, mientras que las eficiencias citotóxicas (ABC citotóxica / dosis μ moles/kg) fueron 0.6, 0.6 y 0.4, respectivamente (Figura 38).

La Figura 39 muestra la superposición de las cinéticas de RET-MN y de la reducción de RET causadas por la dosis alta (100 μ moles/kg) de clofarabina. Los resultados mostraron que entre las 8 – 16 h hay citotoxicidad y ausencia de genotoxicidad y a partir de las 24 se observó una convergencia entre la genotoxicidad y citotoxicidad hasta las 64 h.

La Figura 40 muestra el índice obtenido para la proporción de la citotoxicidad y de la genotoxicidad (C / G) de la dosis alta (100 μ moles/kg). Los resultados confirman un efecto citotóxico temprano de la 8 -16 h que no depende del daño en el ADN y un efecto estrecho entre la citotoxicidad y la genotoxicidad a partir de las 24 h hasta las 64 h. Similar al observado en las dosis altas de cladribina, fludarabina y BrdA.

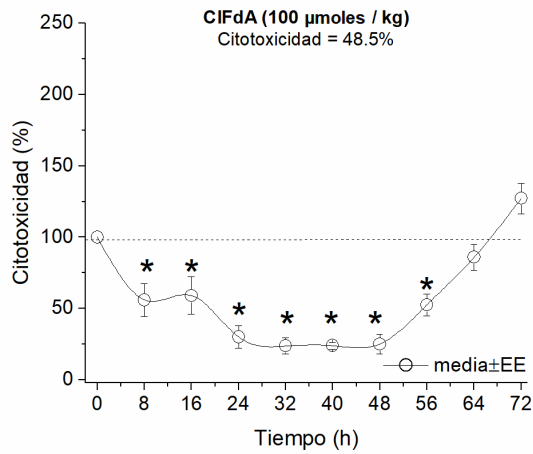
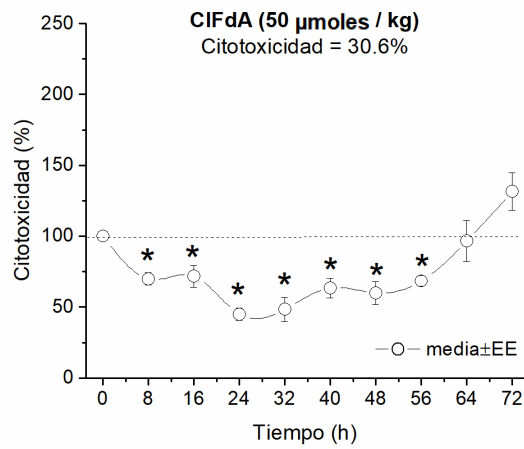
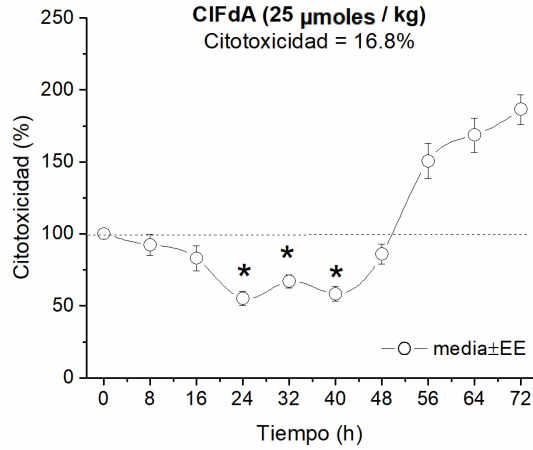


Figura 37. Cinéticas de reducción de RET / 2000 E (%), después de la administración i.p. de 25 o 50 o 100 μ moles/kg pc de CIFdA, entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsiguientes hasta las 72 h. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al basal (t-pareada, $p < 0.05$).

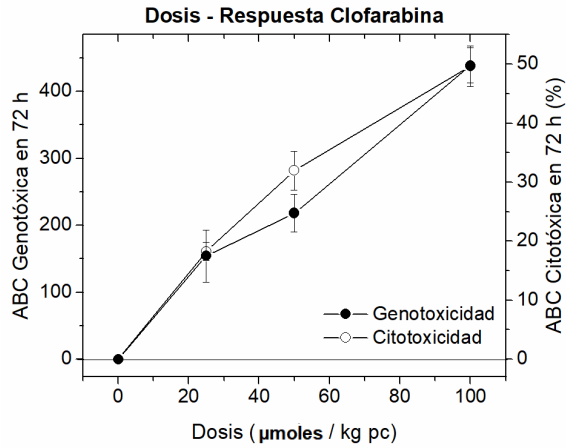


Figura 38. Curva dosis - respuesta en términos de ABC Genotóxica y ABC citotóxica en 72 h causada por la ClFdA

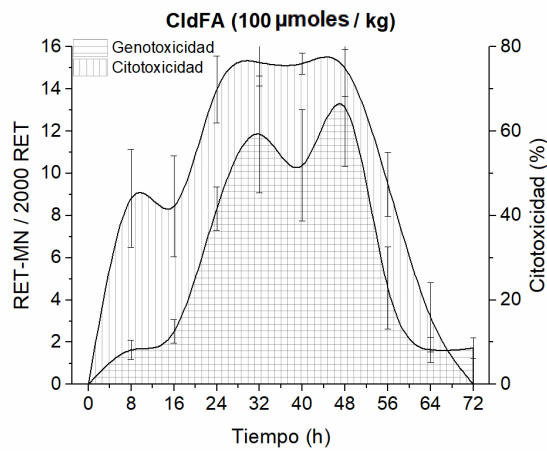


Figura 39. Superposición de la genotoxicocinética y de la citotoxicocinética causada por la administración i.p. de la dosis de 100 µmoles/kg de ClFdA.

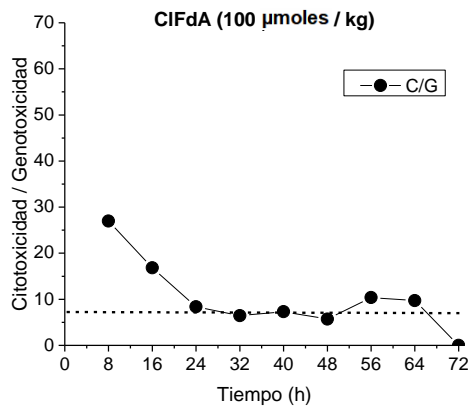


Figura 40. Proporción de la citotoxicidad / genotoxicidad de la dosis de 100 µmoles/kg de ClFdA.

9.4 Posible mecanismo de acción de la cladribina y clofarabina *in vivo*

9.4.1 Cladribina

La Figura 41 muestra las posibles vías de acción *in vivo* después de la administración i.p. de la dosis alta (190 μ moles/kg pc) de cladribina y clofarabina (100 μ moles/kg pc), ya que fueron las dosis que presentaron mejor respuesta.

La cladribina presentó dos etapas citotóxicas: una etapa temprana de las 8 a 16 h que no es dependiente de RET-MN y otra que es ésta estrechamente relacionada con la inducción de RET-MN de las 24 a 64 h. La primera etapa se podría asociar a la muerte celular vía CD99, es un tipo de muerte celular metuósico que no requiere ingresar al interior de la célula, es temprano y no tiene efecto sobre el ADN. La segunda etapa citotóxica puede ser consecuencia de las posibles acciones sobre el ADN.

La cladribina presentó tres picos que representan la actividad genotóxica, a las 24 h, a las 40 h y a las 56 h, sugiere tres vías de inducción de rupturas del ADN. El primer pico coincide con el observado en RI (Figura 17E), ello implica que la cladribina presenta una acción temprana sobre el ADN, posiblemente clastogénica, aunque por el tiempo de inducción de los RET-MN también coincide con el pico observado en VNB, VNC y COL. El segundo pico no coincide con algún agente reportado, ocurre 16 h después e implica un ciclo de división adicional, esta acción se podría asociar con la formación de rupturas de ADN causadas durante la inhibición de la síntesis de ADN o lesiones subsecuentes. El tercer pico fue tardío, sugiere persistencia o a una acción secundaria asociada a la metilación debido a que implica un segundo ciclo de división.

9.4.2 Clofarabina

Similar a la cladribina, la clofarabina presentó dos etapas citotóxicas: una etapa temprana de las 8 a 16 h que no es dependiente RET-MN y que podría asociar a la muerte celular vía CD99, no requiere ingresar al interior de la célula, es temprano y no tiene efecto sobre el ADN y otra etapa que es ésta estrechamente relacionada con la inducción RET-MN de las 24 a 64 h que puede ser consecuencia de las posibles acciones sobre el ADN

La clofarabina presentó dos picos a las 32 h y 48 h y un hombro hacia las 64 h que se mantiene a las 72 h que sugieren tres vías de inducción de rupturas de ADN. El primer pico a las 32 h coincide con el observado con en azaC y dFdC, en la azaC fue asociado a rupturas durante la reparación del aducto y en la dFdC fue asociado a la inhibición de las ADN polimerasas o a un arresto de la síntesis de ADN. El segundo pico ocurrió hacia las 48 h coincide con el observado en la azaC, que fue asociado a rupturas causadas durante la reparación de errores de apareamiento, no hay evidencia que la clofarabina provoque errores de apareamiento, es posible que las acciones se deban a acciones secundarias como lesiones subsecuentes o interacciones ADN-ADN o ADN-proteína como sucede con la azaC, e implica un ciclo de división adicional. También, se observó una ligera inducción de RET-MN hacia las 64 h y 74 h que coincide con la observada en la azaC asociada a efecto desmetilante, esta acción requiere dos ciclos de división celular, se mostró una regularidad de 16 h entre los picos.

Posibles acciones de la cladribina y clofarabina en función del tiempo

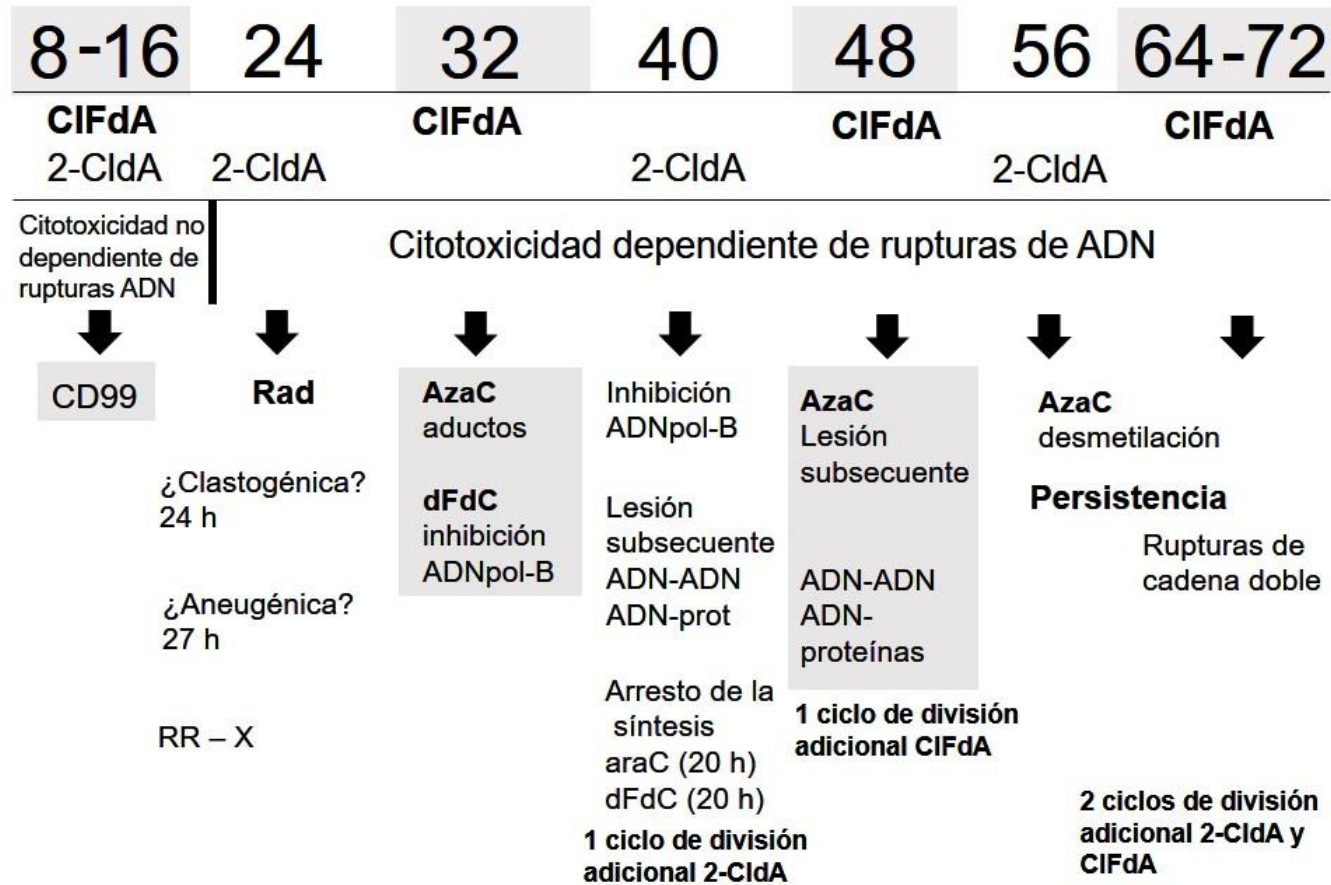


Figura 41. Posibles actividades citotóxicas y genotóxicas de la cladribina (190 μmoles/kg pc) y de la clofarabina (100 μmoles/kg pc) *in vivo*

9.5 Comparación de respuesta de las actividades cito y genotóxicas contra el tiempo entre las cepas ICR y BALB/c

En la cepa ICR, se presentó una cinética con una curvatura caracterizada por dos picos uno a las 24.3 h y otro pequeño a las 48.0 h. La cepa BALB/c presentó también dos picos, uno a las 23.3 h y otro mayor a las 40.6 h, en ambas cepas se presentó una respuesta similar en tiempo y distinta en términos de magnitud. Los resultados sugieren que la cepa ICR tiene una inducción principal de RET-MN temprana hacia las 24 h, mientras la cepa BALB/c presentó una mayor inducción de RET-MN hacia las 40 h (Figura 42). En las cinéticas individuales el individuo #3 de la cepa BALB/c presentó una curvatura caracterizada por tres picos y el individuo #4 de la cepa BALB/c presentó una curva con un solo pico Figura 43. El ajuste de curvas múltiples en cada cinética presentó con una R cuadrada cercana a 1.

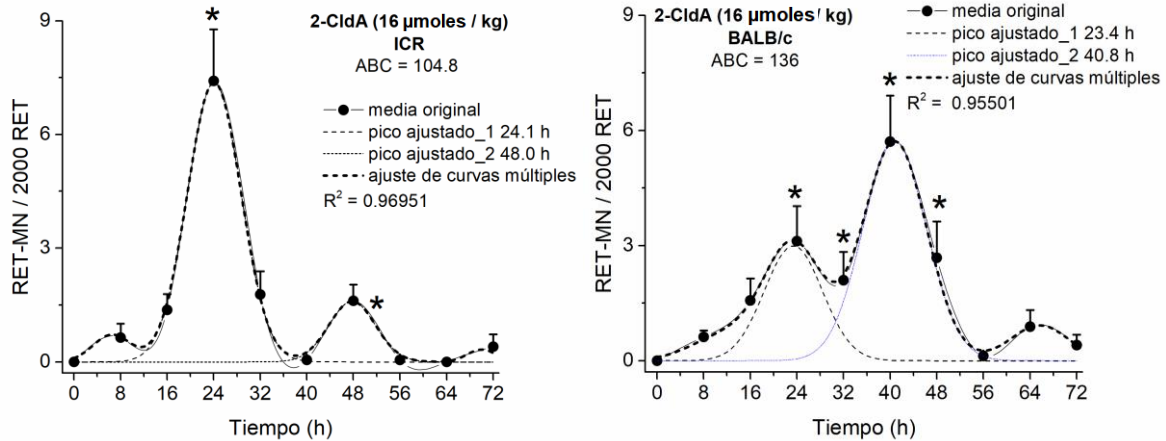


Figura 42. Comparación de las cinéticas determinadas por la inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 16 μ moles/kg pc de 2-CldA entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsecuentes hasta las 72 h en ratones ICR y ratones BALB/c.

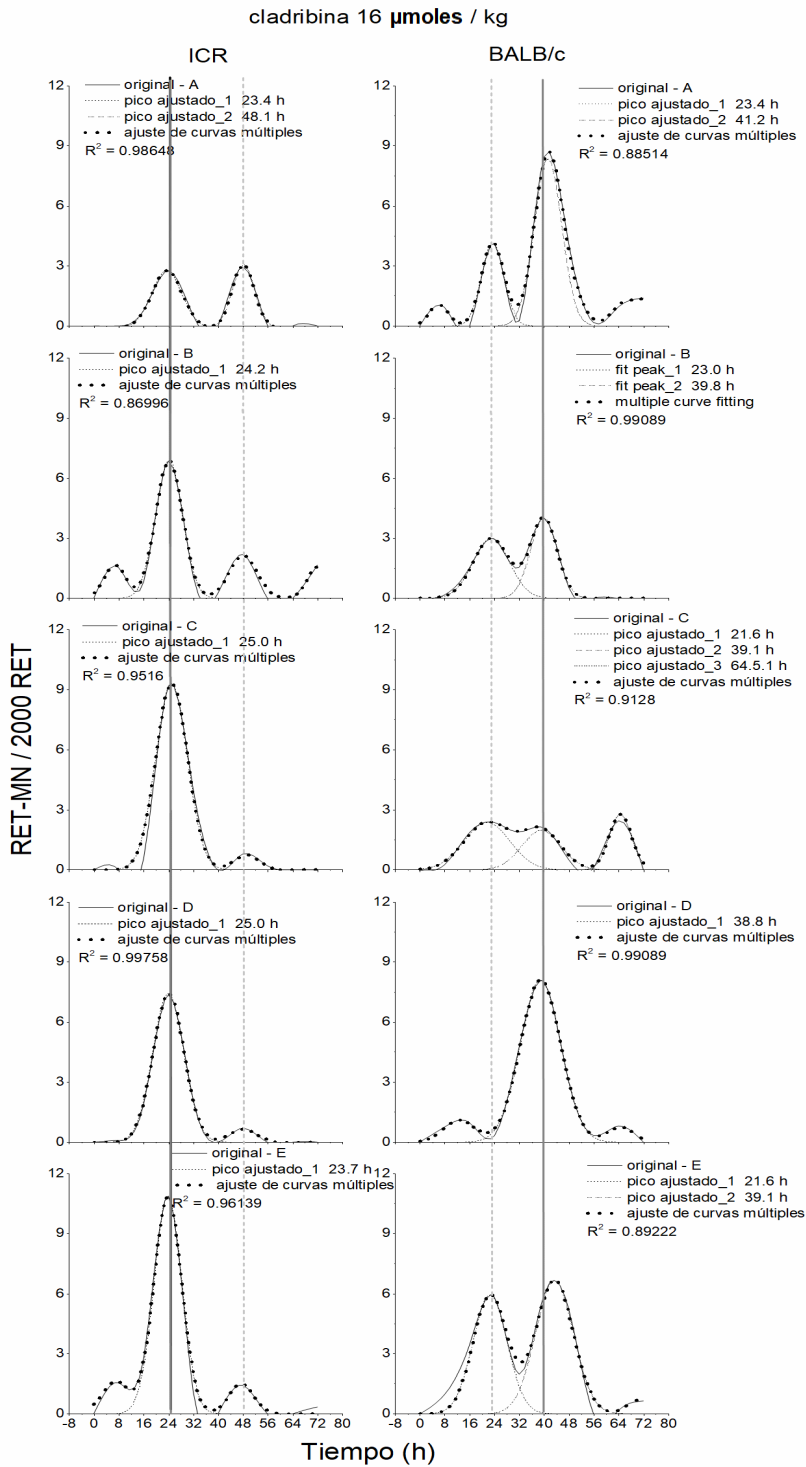


Figura 43. Respuesta genotóxica individual causado por la administración i.p. de 16 μ moles/kg de 2-Cl₄A y analizadas con el modelo de ajuste de curvas múltiples en ratones ICR y BALB/c. La línea sobre los picos indica el promedio principal (continua) y secundaria (punteada).

La dosis de 90 $\mu\text{moles/kg}$ pc de fludarabina en ambas cepas presentó una respuesta similar en tiempo hacia las 24 h y 44 h y similar en términos de magnitud (Figura 44). En las cinéticas individuales y analizadas con el modelo de ajuste de curvas múltiples se mostró que los individuos #4 y #5 de la cepa ICR presentaron tres picos, similarmente al individuo #3 de la cepa BALB/c (Figura 45).

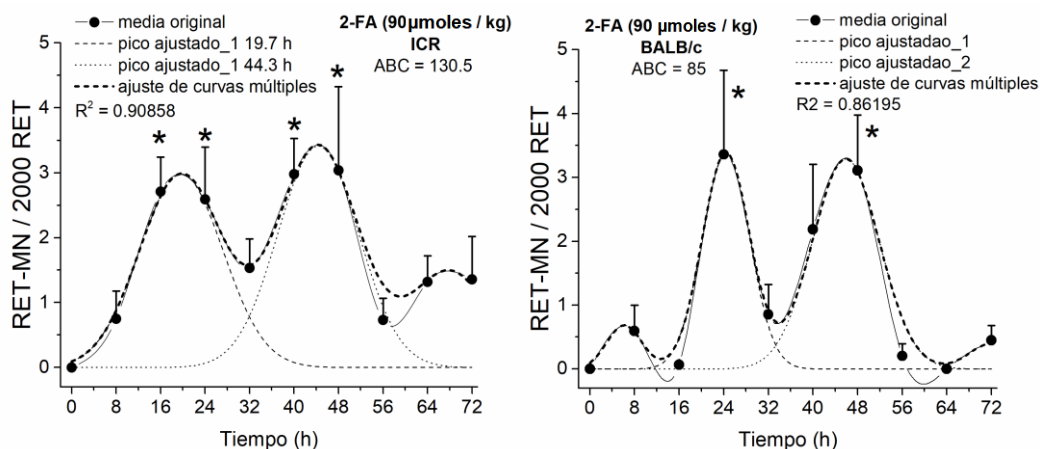


Figura 44. Comparación de las cinéticas determinadas por la inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 90 $\mu\text{moles/kg}$ pc de 2-FA entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsecuentes hasta las 72 h en ratones ICR y BALB/c.

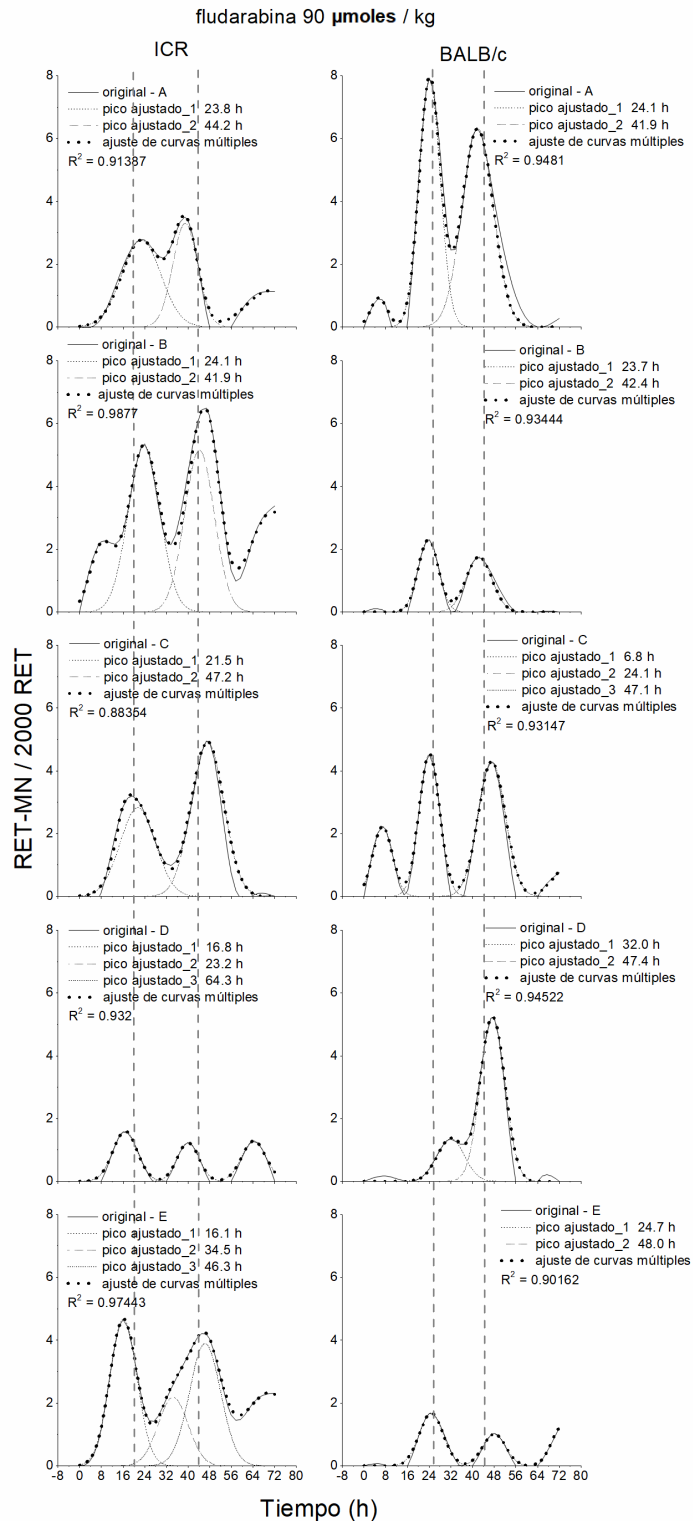


Figura 45. Respuesta genotóxica individual causado por la administración i.p. de 90 μ moles/kg de 2-FA y analizadas con el modelo de ajuste de curvas múltiples. La línea sobre los picos indica el promedio del tiempo de aparición de los picos.

La dosis de 50 μ moles/kg pc de 8-bromodesoxiadenosina en la cepa ICR, presentó una frecuencia máxima de RET-MN hasta las 62 h, en la cepa BALB/c indujo dos picos, uno a las 23.4 h y a las 42.6 h. Estos resultados sugieren diferencias en tiempo y magnitud entre ambas cepas (Figura 46). La reproducibilidad de los picos de cada genotoxicocinética de cada organismo fue analizada mediante el análisis de ajuste de curvas múltiples en cada cinética presentó una R-cuadrada ajustada, cercana a 1, los individuos #2, #4 y #5 de la cepa ICR mostraron tres picos, el individuo #3 indujo un pico mientras que los individuos #1, #2, #4 y #5 de la cepa BALB/c también presentaron tres picos. (Figura 47).

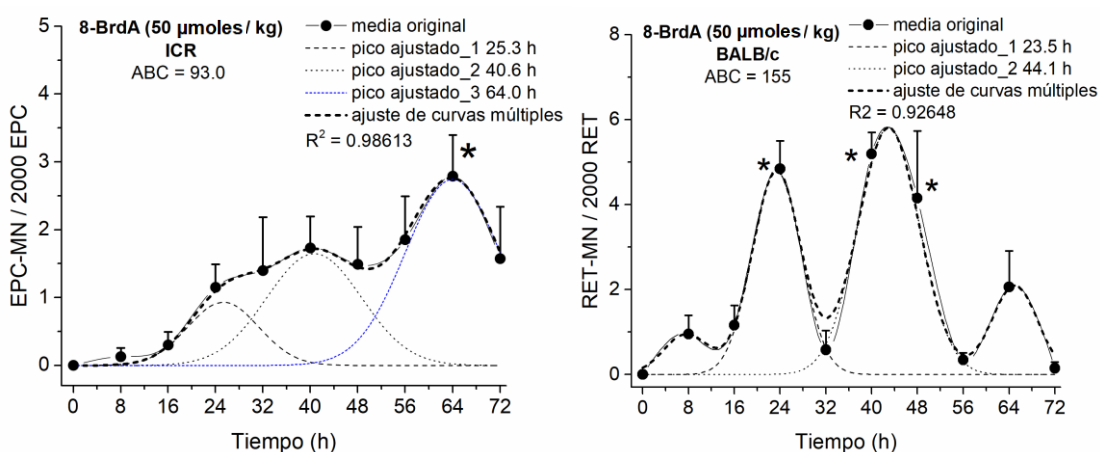


Figura 46. Comparación de las cinéticas determinadas por la inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 50 μ moles/kg pc de 8-BrdA entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsecuentes hasta las 72 h en ratones ICR y ratones BALB/c.

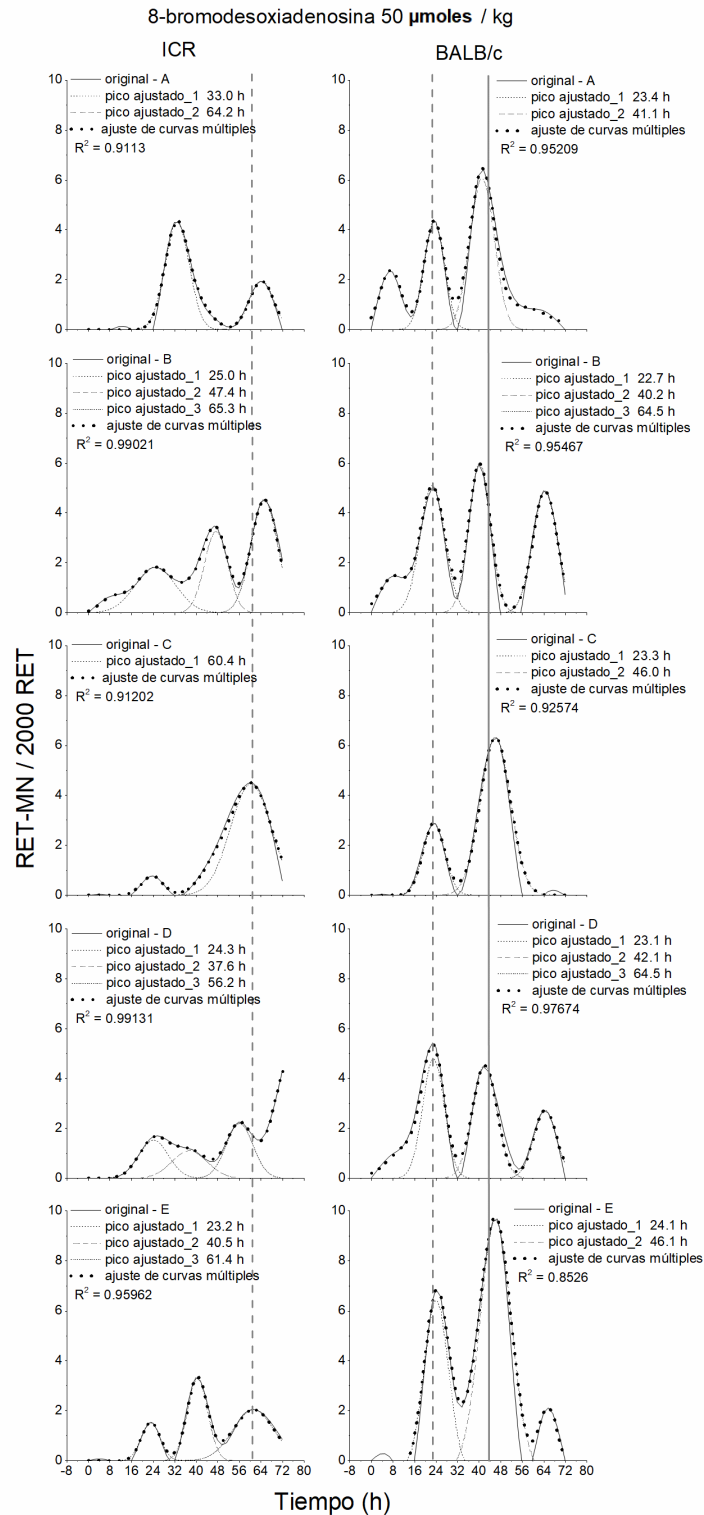


Figura 47. Respuesta genotóxica individual causado por la administración i.p. de 50 μ moles/kg de 8-BrdA y analizadas con el modelo de ajuste de curvas múltiples en ratones ICR y BALB/c. La línea punteada o continua sobre los picos indica el promedio.

La dosis de 25 μ moles/kg pc de clofarabina, en la cepa ICR mostró una cinética con una curvatura de un pico a las 27.8 h, mientras que en la cepa BALB/c se presentaron dos picos, uno a las 40.6 h y 56 h y un hombro que se mantuvo hasta las 72 h. Los resultados muestran diferencias en el tiempo y en la magnitud de la inducción de RET-MN entre ambas cepas (Figura 48). En la cinética individual con ajuste de curvas múltiples presentó una R-cuadrada cercana a 1, los individuos #3, #4, #5 de la cepa ICR presentaron un pico mayor, acompañado de dos picos pequeños, ligeramente mayores que el basal. Los individuos #1 y #5 en BALB/c presentaron tres picos, el primero fue temprano (Figura 49).

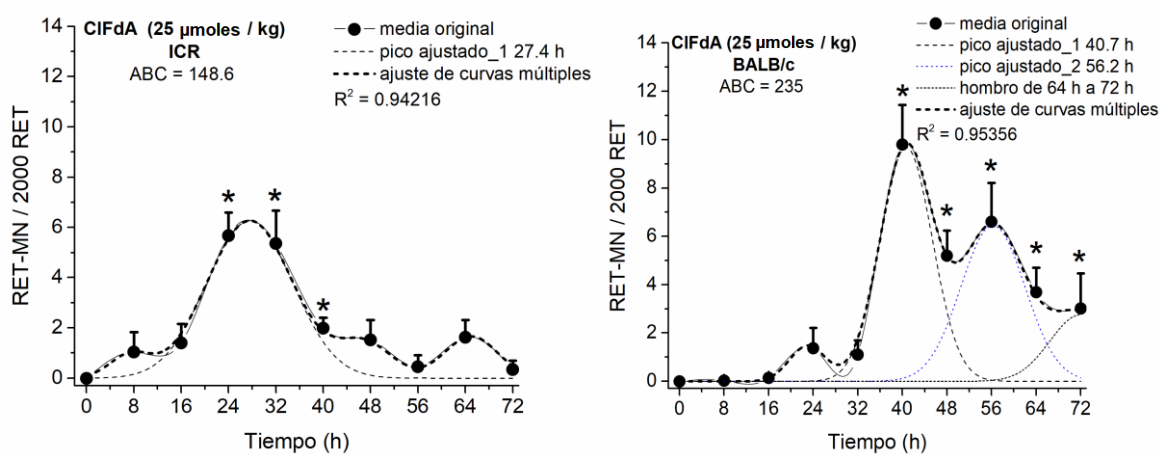


Figura 48. Comparación de las cinéticas determinadas por la inducción de RET-MN / 2000 RET, después de la administración de 25 μ moles/kg pc de CIFdA entre la muestra basal (tiempo cero) y de las muestras subsecuentes hasta las 72 h en ratones ICR y ratones BALB/c.

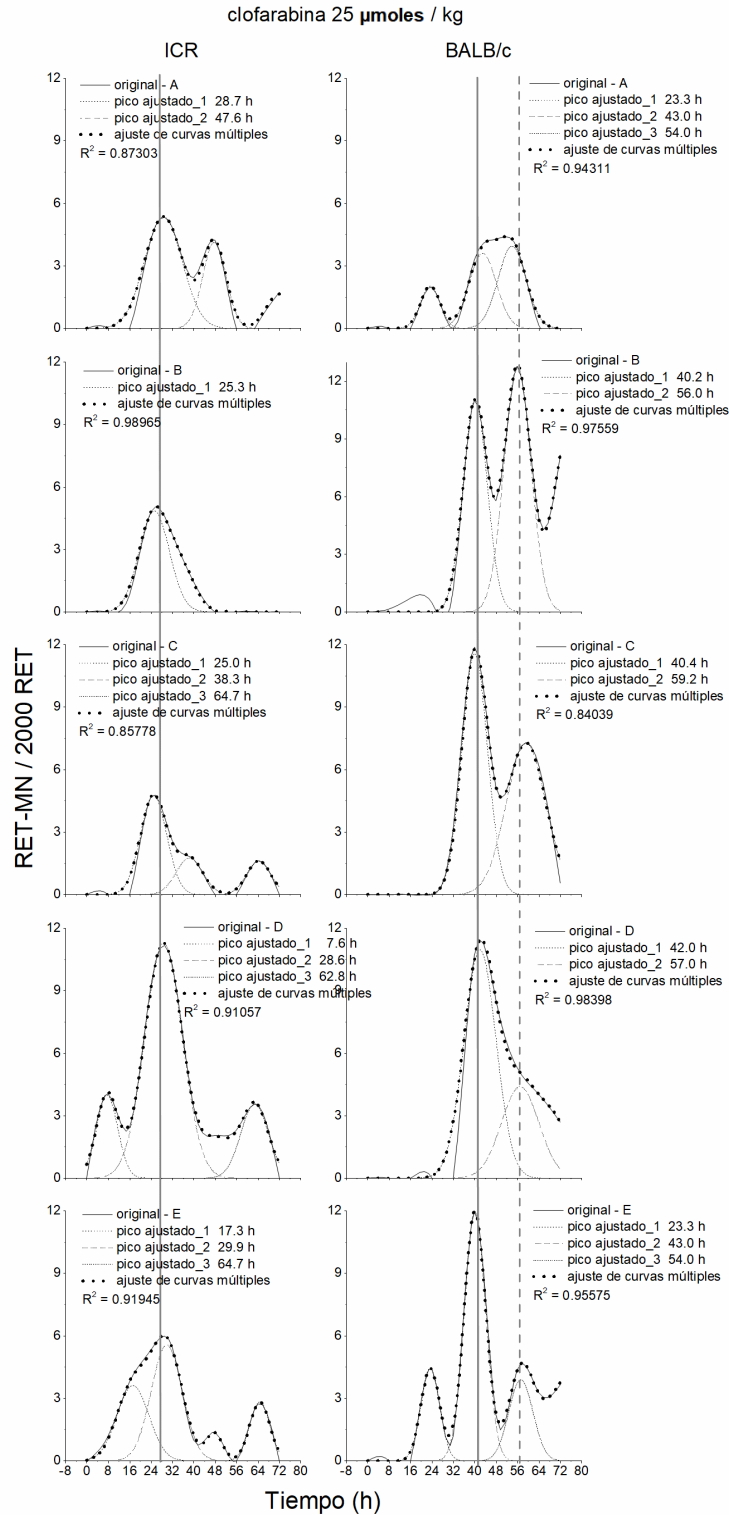


Figura 49. Respuesta genotóxica individual causado por la administración i.p. de 25 μ moles/kg de clofarabina y analizadas con el modelo de ajuste de curvas múltiples en ratones ICR y BALB/c. La línea punteada o continua sobre los picos indica el promedio.

La Figura 50 se muestran las cinéticas de la actividad citotóxicas determinadas a partir de las frecuencias de los RET en 2000 E en porcentaje en función del tiempo con las dosis de 16 μ moles/kg de 2-CIdA, 90 μ moles/kg de 2-FA, 50 μ moles/kg de 8-BrdA y 25 μ moles/kg de ClFdA en la cepa de ratón ICR y BALB/c.

Citotóxicamente, la dosis de cladribina (de 16 μ moles/kg de 2-CIdA) mostró una reducción significativa a las 22.6 h de 38% en la cepa ICR, mientras que en la cepa BALB/c se presentó una reducción a las 16 h, 24.1 h y 39.6 h. a las 24 h la reducción fue 30%. La fludarabina indujo reducción de RET desde las 8 a 24 horas en la cepa ICR, mientras que en la cepa BALB/c la reducción ocurrió a las, a las 7.5 h, a las 24.3 h y a las 43.7 h. Ambas cepas presentaron una citotoxicidad similar que converge a las 8 h y 24 h. La dosis de 8-BrdA indujo una reducción significativa a las 40 h y en la cepa BALB/c se presentó de las 16 a 24 h y a las 40 h, en ambas cepas convergen en citotoxicidad a las 40 h de 30%. La dosis de clofarabina indujo reducción de RET de las 24.6 h a las 40 h, en este tiempo se presentó una reducción de 45.7 % en la cepa ICR, mientras que en la cepa en la cepa BALB/c la reducción ocurrió de las 24 h hasta las 56 h, la reducción máxima ocurrió a las 38.6 h y fue de 63.7 %. Los resultados muestran mayor sensibilidad de la cepa BALB/c a la cladribina y clofarabina.

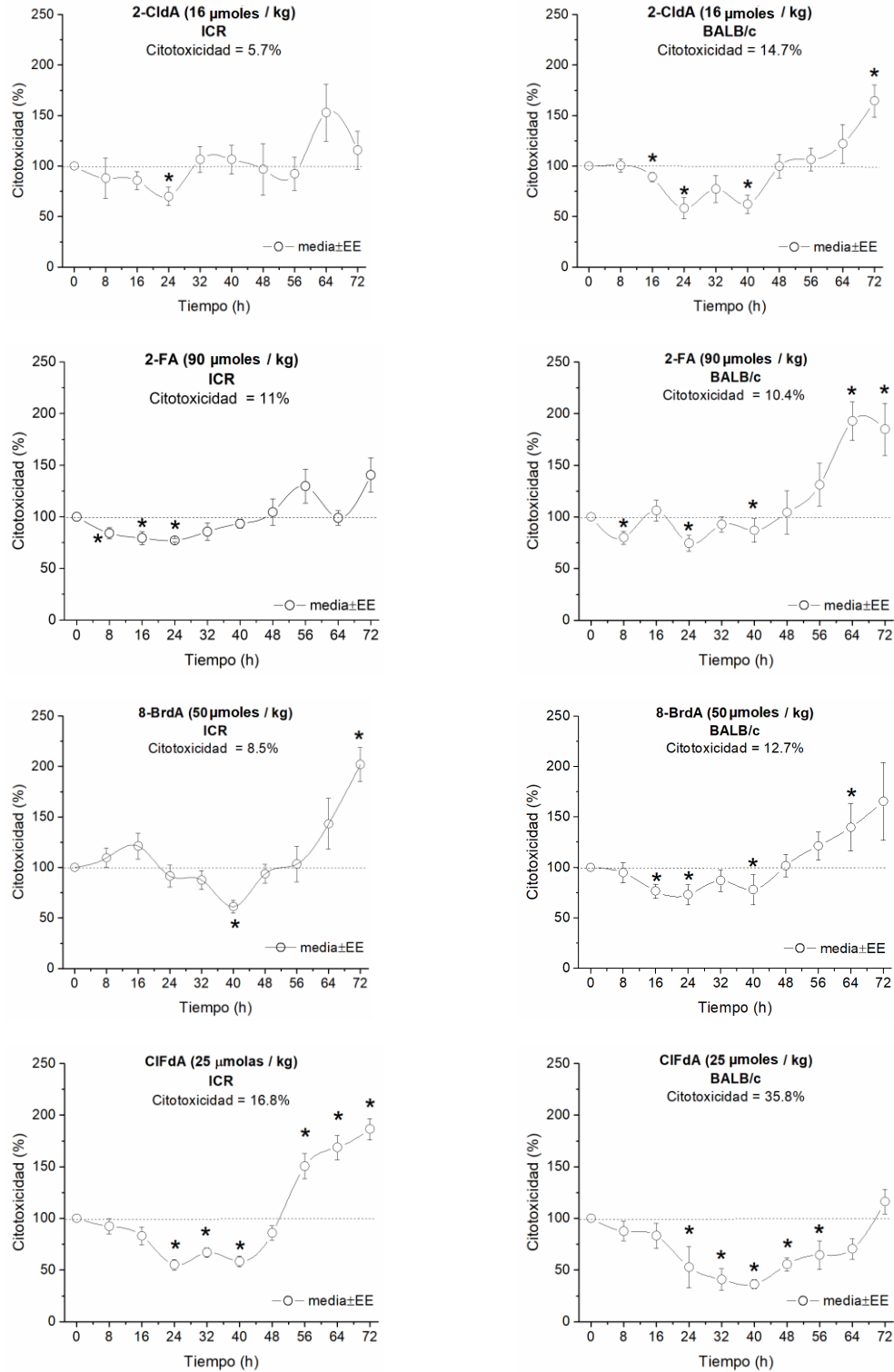


Figura 50. Comparación de las cinéticas de reducción de RET / 2000 E (%) causadas por 2-CldA (16 μmoles/kg), 2-FA (90 μmoles/kg), 8-BrdA (50 μmoles/kg) y CIFdA (25 μmoles/kg) en función del tiempo en ratones ICR y BALB/c. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al basal (t-pareada, p<0.05).

En términos del área bajo la curva genotóxica (ABC-G), la dosis de cladribina no presentó diferencias significativas entre ambas cepas (104.8 ± 31.9 vs 136 ± 45.1 , $p = 0.244$). La dosis de la fludarabina presentó efectos genotóxicos similares (130.7 ± 73.3 vs 84.7 ± 60.2 , $p = 0.311$). La dosis de 8-BrdA mostró diferencias significativas en la cepa ICR fue 93.0 ± 24.0 y en la cepa BALB/c fue 154.8 ± 37.2 ($p < .01$). La dosis de la clofarabina presentó diferencias significativas en el ABC genotóxica entre ambas cepas (148.6 ± 57.1 vs 235.4 ± 80.1 , $p < 0.05$). Los resultados sugieren que la cepa BALB tiende a ser más sensible al daño total causado por la clofarabina y bromodesoxiadenosina comparado con la cepa ICR.

En términos del área bajo la curva citotóxica (ABC-C), La dosis de cladribina mostró diferencias significativas en el ABC citotóxica entre ambas cepas (5.7 ± 5.7 % vs 16.2 ± 8.0 %, $p < 0.05$). La dosis de la fludarabina presentó efectos citotóxicos similares en ambas cepas, no se observaron diferencias significativas en el ABC citotóxicas entre ambas cepas (11.0 ± 4.4 % vs 10.4 ± 4.0 %, $p = 0.81$). La dosis de 8-BrdA presentó efectos citotóxicos similares en ambas cepas, no se observaron diferencias significativas en el ABC citotóxica entre ambas cepas (8.5 ± 8.2 % vs 13.7 ± 6.4 %, $p = 0.29$). Finalmente, la dosis de clofarabina presentó diferencias significativas en el ABC genotóxica entre ambas cepas (18.2 ± 2.3 % vs 35.8 ± 10.3 %, $p < .01$), los resultados sugieren que la cepa BALB tiende a ser más sensible al efecto citotóxico que la cepa ICR.

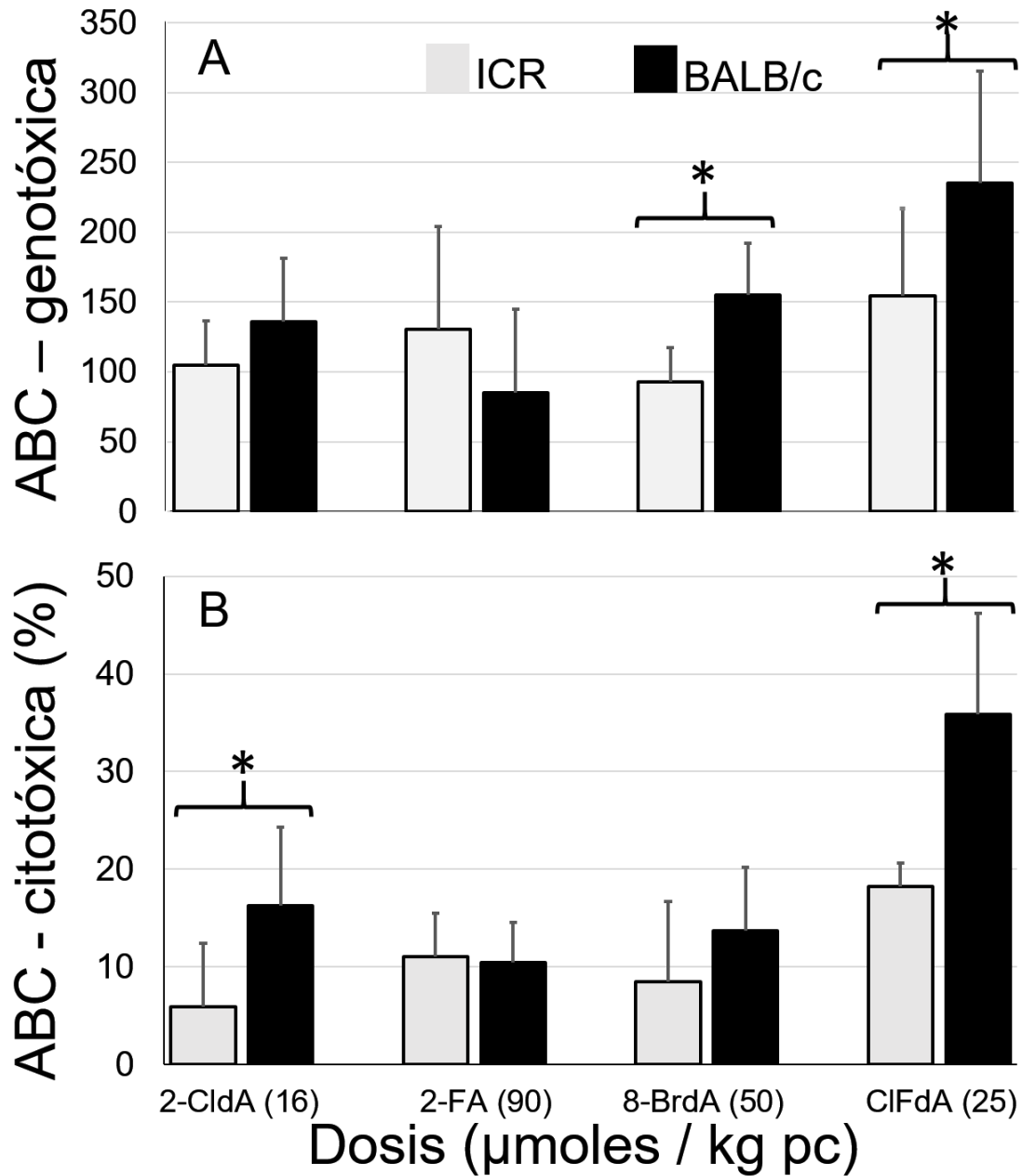


Figura 51. Comparación del área bajo curva genotóxica (A) y citotóxica (B) causada por la dosis de 16 μ moles/kg de 2-CIdA, 90 μ moles/kg de 2-FA, 50 μ moles/kg de 8-BrdA y 25 μ moles/kg de ClFdA en ratones ICR y BALB/c. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre las cepas (T-Student, $p < 0.05$).

De acuerdo a su eficiencia genotóxica definida como el área bajo la curva genotóxica entre la dosis administrada (ABC-G / dosis en micromoles) mostraron que la ClFdA (25

µmoles/kg) y la 2-CIdA (16 µmoles/kg) resultaron ser los agentes más eficientes para provocar daño genotóxico en ambas cepas. Por su eficiencia genotóxica en la cepa ICR la CIFdA > 2-CIdA > 8-BrdA > 2-FA y en la cepa BALB/c la 2-CIdA > CIFdA > 8-BrdA > 2-FA. Por su eficiencia citotóxica definida como el área bajo la curva citotóxica con relación a la dosis administrada (ABC-C / dosis en micromoles) mostraron que la CIFdA (25 µmoles/kg) y la 2-CIdA (16 µmoles/kg) resultaron ser los agentes más eficientes para provocar daño citotóxico. En la cepa ICR la CIFdA > 2-CIdA > 2-FA > 8-BrdA en términos de la dosis administrada en µmoles/kg pc (Figura 52).

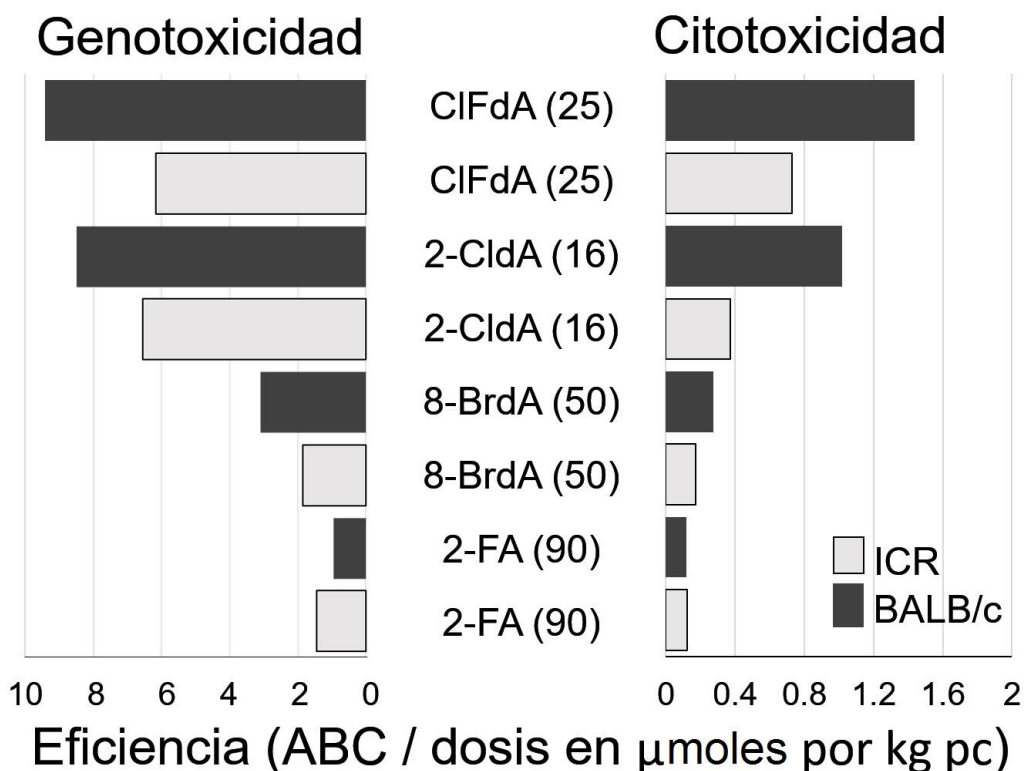


Figura 52. Comparación de la eficiencia genotóxica (ABC-G / dosis) y de la eficiencia citotóxica (ABC-C / dosis) causada por las dosis (µmoles/kg) de peso corporal, causadas por los análogos de desoxiadenosina.

La Figura 53 muestra la relación de la dosis respuesta en términos del ABC genotóxica (A) y citotóxica (B) total en 72 h, causada por las dosis de 50, 100 y 150 µmoles/kg de 8-

BrdA en la cepa ICR y BALB/c. El ABC genotóxica en la cepa ICR fue 93.0 ± 24.0 , 99.5 ± 38.0 y 120.3 ± 40.8 , mientras que la cepa BALB/c fue 154.8 ± 37.2 , 174.1 ± 71.2 y 196.2 ± 121.0 . El ABC citotóxica en porcentaje para la cepa ICR fue 8.5 ± 8.2 %, 14.0 ± 10.6 % y 17.6 ± 4.0 % y en la cepa BALB/c fue 13.7 ± 6.4 %, 17.4 ± 9.8 % y 25.6 ± 4.4 %. Las eficiencias genotóxicas fueron 1.8, 0.9 y 0.8 para la cepa ICR y para la cepa BALB/c fueron 3.0, 1.7 y 1.3 respectivamente.

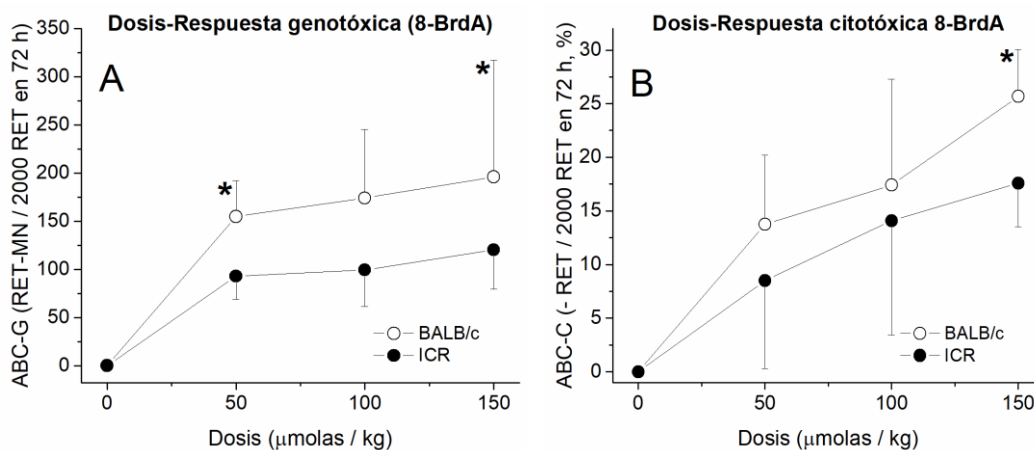


Figura 53. Comparación de la relación dosis respuesta en términos de ABC genotóxica (A) y del ABC citotóxica (B) causada por las dosis de 50, 100 y 150 µmoles/kg de 8-BrdA en 72 h en ratones ICR y BALB/c. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las cepas (T-Student $p < 0.05$).

10. Discusión

10.1 Comparación de la respuesta de los diferentes análogos de la adenina.

El objetivo de este trabajo fue explorar y aproximarse a las posibles vías de acción *in vivo* de análogos de desoxiadenosina a través de su actividad genotóxica determinada por la cinética de inducción de RET-MN y de su actividad citotóxica determinada por la cinética de RET en normoblastos de ratón evaluados citométricamente.

Asumiendo que la administración vía intraperitoneal es adecuada, el tiempo de la farmacocinética (absorción, distribución, médula ósea, internalización en normoblasto) y procesos celulares como la enucleación y la salida de EPC-MN de la médula ósea a la sangre periférica parecen ser constantes (Morales-Ramírez *et al.*, 2017b). Con base en los resultados, los antimetabolitos análogos de desoxiadenosina presentan acciones genotóxicas y citotóxicas prolongadas, que a su vez sugieren presentar múltiples acciones que conllevan a la inducción de RET-MN y a la reducción de RET y a su vez parecen estar reguladas en función del tiempo. En sistemas *in vitro*, es ampliamente aceptado que los análogos de desoxiadenosina presentan múltiples acciones que culminan con la muerte celular de células quiescentes y de células en división de células linfoides y de células mieloides (Huang y Plunkett, 1995; Parker *et al.*, 1991).

En términos de tiempo, en las dosis altas de cladribina y clofarabina, se presentó una citotoxicidad temprana no dependiente de micronúcleos entre las 8 y 16 h y una citotoxicidad tardía que está relacionada con micronúcleos a partir de las 24 h a las 72 h. En el caso de la cladribina parece inducir tres picos de RET-MN a las 24 h, 48 h y 56 h con regularidad de 16 h y en el caso de la clofarabina dos picos de RET-MN a las 32 h y 48 h con una ligera persistencia de RET-MN de las 64 h hasta las 72 h regulada cada 17 h, sugiriendo en ambos casos tres vías de inducción de rupturas ADN, que pueden ser clasificadas en tempranas, intermedias y tardías.

i) Citotoxicidad temprana - vía CD99

La citotoxicidad temprana (8 – 16 h) se observó principalmente en las dosis altas de cladribina, clofarabina, fludarabina y 8-BrdA, en estos tiempos no hay inducción significativa de RET-MN, sugiriendo un efecto no dependiente de rupturas de ADN, el cual podría corresponder a la metuosis. La metuosis es caracterizada por la interacción de CD99 y el bloqueo de señales corriente abajo que culmina con la formación de vacuolas y ruptura de la membrana sin presentar daño sobre el ADN (Pasello *et al.*, 2016). Çelik *et al.*, (2018) en su estudio mostraron que la cladribina y clofarabina fosforilada y no fosforilada interacciona con la proteína CD99 y subsecuentemente, causa decremento de la expresión de fosfocinasa A y de ciclofilina que resultaba en citotoxicidad de células del sarcoma de Erwing, lo que permitió concluir que ambos agentes causan muerte celular sin requerir entrar al interior de la célula, además mostraron que la clofarabina resultó más citotóxica que la cladribina.

La proteína CD99 es una glicoproteína transmembranal de 32 kDa que está asociada con múltiples acciones que incluye, la muerte celular de células T independiente de caspasas (Pettersen *et al.*, 2001), participa en la adhesión de células T, en el transporte transmembranal de proteínas y está ampliamente expresada en el diagnóstico de sarcoma de Erwing (Celik *et al.*, 2018; Cerisano *et al.*, 2004; Llombart-Bosch y Navarro, 2001), se expresa en mayoría de las células incluyendo los leucocitos (Pasello *et al.*, 2018) y en eritrocitos de los seres humanos (Fouchet *et al.*, 2000; Petty y Tippett, 1995; Schenkel *et al.*, 2007).

En ratones, la proteína es llamada 12E7 y se ha descrito que presenta acciones similares a la proteína CD99. No se ha reportado que la proteína CD99 se exprese en los normoblastos, aunque su presencia en los eritrocitos sugiere que esta proteína puede estar presente en células precursoras al eritrocito.

ii) Genotoxicidad temprana – no conocida

La mayoría de las dosis probadas presentaron un pico de RET-MN hacia las 24 h, el cual coincide con el causado por RI (0.25 Gy Co-60) Figura 18-C; teóricamente, la radiación ionizante causa rupturas en el ADN por dos vías rápidas: directa a través de la interacción de los fotones con el ADN e indirecta a través de la ionización de la molécula de agua formando: hidroxilos (HO^\cdot), superóxido (HO_2^\cdot), hidronio (H^+) y por reacciones subsecuentes como el peróxido de oxígeno (H_2O_2), los cuales reaccionan rápidamente con sitios lábiles de la cadena del ADN.

La inducción de RET-MN temprana sugiere que los análogos de desoxiadenina presentan una acción temprana sobre el ADN. Su acción temprana, podría corresponder a un efecto clastogénico temprano o a un efecto aneugénico debido a que coincide con la inducción de EPC-MN causado por VNB, VNC y COL. No se ha documentado que los análogos de desoxiadenosina presenten una acción clastogénica temprana ni efecto aneugénico.

Los primeros estudios sugerían que las rupturas del ADN podrían ser originadas por la acción de nucleasas, activadas por la señalización de la reducción de los desoxinucleótidos a través de la inhibición de la ribonucleótido reductasa (Hirota *et al.*, 1989), pero solo un par de trabajos mostraron la activación de nucleasas como señalización del desbalance de la poza de nucleótidos, después de la incubación de 5-FdUrd en el ADN de células FM3A (Otani *et al.*, 1992; Yoshioka *et al.*, 1987). Sin embargo, esta acción parece estar relacionada a un proceso de reparación, ya que no se documentó más información en años subsecuentes hasta la actualidad e inclusive, la evidencia ha mostrado que la hidroxurea, un inhibidor específico de la ribonucleótido reductasa indujo micronúcleos a una dosis de 25 veces más alta que la dosis que causa desbalance de desoxinucleótidos en células de linfoma de ratón L5178Y, ello implica que

la inhibición de la síntesis de los dNTPs vía inhibición de la ribinucleótido reductasa no induce rupturas en el ADN (Osterman *et al.*, 2013).

Posiblemente, las rupturas de ADN tempranas fueron originadas de rupturas de cadena sencilla SSBs (del inglés *single-strand breaks*) que se subsecuentemente se convertían en rupturas de doble cadena (del inglés *double strand breaks*) y las rupturas de doble cadena conllevaban a la muerte celular (Hirota *et al.*, 1989; Wataya *et al.*, 1989). En un modelo *in vitro* para analizar mecanismos que favorecen la formación de micronúcleos en linfocitos, se mostró que las acciones de la citarabina la formación de aductos e inhibición de la síntesis de ADN, provocan rupturas de cadena sencilla que posteriormente se convierten en rupturas de doble cadena y subsecuentemente los fragmentos son expresados como micronúcleos dentro de un ciclo de división celular (Fenech, 2007). En los análogos de desoxiadenosina aún no es clara la vía que se encarga de provocar las rupturas de cadena sencilla tempranas.

La evidencia ha mostrado que las especies reactivas de oxígeno (ERO) causan rupturas de cadena sencilla, las cuales se introducen en la base del ADN o en el azúcar y provocan rupturas de doble cadena (Pascucci *et al.*, 2005). En sistemas *in vitro*, se mostró que la formación de micronúcleos puede ser consecuencia de un estrés oxidante causado por la fosfamidón y la dieldrina (Cicchetti y Argentin 2003). Sin embargo, solo se ha demostrado que la dFdC induce la formación de ERO por algún mecanismo no conocido (Arora *et al.*, 2013; Donadelli *et al.*, 2011). Es ampliamente aceptado, que el daño de la membrana mitocondrial genera ERO vía disrupción de la cadena respiratoria (Murphy, 2009) y la cladribina y clofarabina causan daño directo sobre la membrana mitocondrial, pero este daño parece estar más relacionado a un efecto apoptótico (Genini *et al.*, 2000) e incluso la 6-mercaptopurina, un derivado de purina, genera ERO vía óxido-reducción del cobre, que subsecuentemente conllevan a la inducción de rupturas dobles del ADN (Rehman *et al.*, 2015), pero las ERO causadas por las vía oxidación – reducción reversible de la clofarabina, no son suficientes para alterar la integridad del ADN (Satana *et al.*, 2013).

Por otro lado, el primer pico también coincidió con el observado en agentes aneugénicos COL, VBN, VNC a las 27 h (Morales-Ramírez *et al.*, 1997), estos agentes inducen aneuploidía, una alteración en el número de cromosomas. Actúan principalmente durante la mitosis, reaccionan con la β -tubulina uniéndose para formar el protofilamento que constituye el microtúbulo que forma parte del huso mitótico, interfiriendo con la dinámica de los cromosomas durante su redistribución y su segregación para constituir el núcleo principal (Downing, 2000; Eastmond y Tucker, 1989).

La evidencia ha mostrado que algunos análogos de nucleobases pueden eliminar a las células por mecanismos de acción no apoptóticos como la metuosis y otros pueden redirigir la actividad de metuosis a una acción aneugénica, por ejemplo, la nucleobase 3-(5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il)-1-(4piridinil)-2-propeno-1-ona (MOMIPP), la sustitución en la posición 2 de anillo indol por un metilo, causa burbujas en la membrana, redondeo de las células y pérdida de adherencia con células adyacentes y una acumulación de vacuolas macropinocíticas, señales de metuosis, pero el reemplazo por un propilo dirige a la célula a efectos observados por la VNB y VNC provocando un arresto mitótico y muerte celular por interacción con los microtúbulos (Trabbic *et al.*, 2015). La citotoxicidad observada podría estar asociada a las acciones descritas previamente.

iii) Vía inhibición del metabolismo de los desoxinucleósidos

En este estudio no podemos conocer la magnitud, ni el tiempo en que ocurre esta vía, debido a que no tenemos indicios de la acción sobre el ADN y citotoxicidad, dado que la dosis que causa desbalance de la reserva de los dNTPs no resulta en formación de rupturas de la cadena de ADN. En la literatura se ha mostrado que el abatimiento de los reservas de los desoxinucleótidos, es una de las principales acciones causada por los análogos de desoxiadenosina (Ewald, 2008; Gandhi, 2006, Robak *et al.*, 2009). El decremento de la síntesis de los desoxinucleótidos resulta en citotoxicidad (Seto *et al.*,

1986; Tseng *et al.*, 1982; Gandhi y Plunkett, 2007). Para ello, los nucleósidos requieren ingresar al interior de la célula y requieren de la fosforilación y su conversión a metabolitos trifosfatados, no es dependiente de la activación de caspasas (Pettitt y Cawley, 2000) ni de la incorporación al ADN (Poli *et al.*, 1999).

En células linfoblastoides humanas se ha observado una fuerte reducción en las reservas de dCTP, dATP, dGTP y dTTP después de la incubación con cladribina y clofarabina (Hirota *et al.*, 1989; Xie y Plunkett, 1991), en células K562 derivadas de mieloma después de la incubación con clofarabina (Parker *et al.*, 1991) y en células HeLa después de la incubación con fludarabina (Tseng *et al.*, 1982), el cual puede ser restaurado por la adición de desoxicititina (Brockman *et al.*, 1990; Griffing *et al.*, 1989). Se ha reportado que el reducción de la síntesis de los dNTP ocurrió 3 h post-incubación con cladribina en células FM3A de ratón (Hirota *et al.*, 1989) con clofarabina en células linfoblastoides (Xie y Plunkett, 1996).

iv) Genotoxicidad intermedia - Inhibición de las ADN polimerasas o lesiones en el ADN

El pico de 32 h en la clofarabina y de las 40 h con la dosis alta de cladribina, las rupturas del ADN podrían estar asociadas al bloqueo de la síntesis de las ADN polimerasas, coincide con el observado en la dFdC (Morales-Ramírez *et al.*, 2017b). En el caso de la cladribina, esta acción requiere un ciclo de división adicional, que está condicionado por la acción genotóxica previa. También, coincide con el observado en la azaC asociado a rupturas del ADN durante la reparación del aducto formado entre la azaC y la ADN citosina metil-transferasa (Morales-Ramírez *et al.*, 2008), no se ha reportado que los análogos de desoxiadenosina se unan con la ADN citosina metiltransferasa y formen un aducto.

La evidencia ha mostrado que las rupturas dobles del ADN se observan después de 12 – 14 h de incubación con cladribina (Yamato *et al.*, 1992), que a su vez podría asociarse con la incorporación, inhibición de la síntesis de la cadena de ADN y la formación de rupturas. La incorporación de los análogos de desoxiadenosina dentro de la cadena de ADN impide la elongación de la cadena y subsecuentemente impide la polimerización y/o la reparación del ADN en células linfoides (Huang *et al.*, 1986; Xie y Plunkett 1996) y en células mieloides (Parker *et al.*, 1991).

Se ha reportado que en células troncales de murinos la incorporación de la citarabina (araC) en la cadena de ADN conlleva un arresto celular durante la fase de síntesis y tarda hasta 20 h en reactivarse (Van Pelt *et al.*, 2005). La cladribina y fludarabina inhiben principalmente la ADN polimerasa α (Parker *et al.*, 1991; White *et al.*, 1990), la clofarabina inhibe principalmente la ADN polimerasa β y en menor medida a la polimerasa α (Hentosh *et al.*, 1990) y la BrdA bloquea la fase de síntesis (Parsons *et al.*, 1986). La inhibición de la síntesis del ADN resulta en la formación de sitios terminales de la cadena que conllevan a la inducción de rupturas dobles de la cadena de ADN (Huang *et al.*, 1995; Xie y Plunkett, 1995).

Las rupturas de ADN ha sido detectada con marcadores moleculares (γ -HX2A) incubando clofarabina en células derivadas de tumores (Cariveau *et al.*, 2000), también han sido detectadas por electroforesis unicelular en linfocitos incubación con cladribina (Hirota *et al.*, 1989) y con la incubación de 2-FA en leucocitos (Poli *et al.* 1999). La fragmentación del ADN se ha asociado con la apoptosis (Genini *et al.*, 2000).

vi) Genototoxicidad tardía - vía desmetilación o lesiones tardías

La inducción de RET-MN tardíos puede ser equivalente por analogía al tercer pico que corresponde al hombro en la azaC, que fue asociada a la fragilidad cromosómica vía desmetilación (Morales-Ramírez *et al.*, 2008). Se ha reportado que tanto la clofarabina

como la cladribina producen desmetilación por un mecanismo aún no dilucidado, provocando decremento en la expresión de los promotores de genes y causando modificaciones post-traduccionales de histonas que en conjunto están asociadas a un arreglo estructural de la cromatina y fragilidad cromosómica (Valdez *et al.*, 2015).

La desmetilación es un evento tardío que conlleva a la fragilidad cromosómica, la sustitución del carbono 5' por un átomo nitrógeno en la azaC impide que este sea metilado, y favorece la formación del enlace covalente entre el carbono 6 y la metiltransferasa (Gabbara y Bhagwat, 1995), el reemplazo de citosina por azaC en islas GpC resulta en fragilidad cromosómica y la fragilidad cromosómica provoca fragmentación de la cromatina (Viegas-Pequignot y Dutrillaux, 1981) que conllevaría a la formación de micronúcleos tardíos.

En la literatura se ha reportado, que la fludarabina y la cladribina causan desmetilación alterando el ciclo de metilación de la S-adenosilmetionina (SAM), inactivando la S-adenosil homocisteína (SAH) hidrolasa en células de la línea K562 (derivadas de LMC) (Wyczechowska y Fabianowska-Majewska, 2003). No se ha reportado, que la desmetilación vía alteración del ciclo activo de la metilación causada por estos agentes se dirija a fragilidad cromosómica.

Otra posible explicación es que las rupturas de ADN tardías, puedan ser producto de la persistencia de lesiones. Recientemente, se documentó que la azaC y la RI puede formar enlaces cruzados intracadena ADN-ADN y cruzados intercadena y cruzados ADN-proteínas. Las rupturas de enlaces cruzados ADN-proteínas preceden de una lesión específica del ADN unida covalentemente a proteínas, la acumulación de rupturas de enlaces cruzados ADN-proteína conlleva a un estrés en la replicación del ADN y a inestabilidad genómica y a muerte celular por proteólisis (Fielden *et al.*, 2018). En la literatura se han detectado rupturas de doble cadena del ADN después de la incubación de clofarabina después de 72 h de incubación (Cariveau *et al.*, 2008)

v) Vía apoptosis

La pérdida de la viabilidad de los normoblastos se podría asociar a las acciones previamente descritas. La inducción de rupturas en el ADN está asociada a la apoptosis (Barbieri *et al.*, 1998; Carson *et al.*, 1983; Parsons *et al.*, 1986; Zinzani *et al.*, 1994; Genini *et al.*, 2000). Van Pelt *et al.*, (2005) mostraron que la araC tiene un efecto citotóxico prolongado de células troncales hematopoyéticas, similarmente como ocurre con la población de los RET, entre las 8 y 56 h.

Comparando el daño genotóxico y citotóxico causado por los análogos de desoxiadenosina. La clofarabina es el agente que induce mayor daño, hasta cuatro veces mayor que la cladribina y 20 veces más que la fludarabina. La bromodesoxiadenosina y la fludarabina son agente poco eficientes en la inducción de rupturas de ADN. La doble halogenación de la clofarabina le confiere mejor estabilidad, mayor solubilidad (Carson *et al.*, 1992), lo que facilita su entrada hacia el citosol por difusión (King *et al.*, 2006), tiene mayor afinidad hacia la fosforilación por la desoxiciditina cinasa (Lindemalm *et al.*, 2003) y una acción más directa sobre el ADN (Xie y Plunkett, 1995) que sus predecesores cladribina y fludarabina (Bonate *et al.*, 2006), la evidencia terapéutica ha mostrado que el efecto citotóxico es al menos 10 mayor que el causado por la 2-FA (Gandhi y Plunkett, 2007) consistente con este estudio.

10.2 Comparación de la respuesta citotóxica y genotóxica entre las cepas ICR y BALB/c

Esta parte del estudio fue debido a que la cepa de ratón ICR presentó una baja inducción de RET-MN, incluso aplicando dosis altas y es distinta al modelo biológico usado por Morales-Ramírez desde sus inicios en 1996 (Morales-Ramírez *et al.*, 1996; 2008; 2014;

2017). Esto nos llevó a suponer diferencias en la sensibilidad de las cepas después de la administración de antimetabolitos de la desoxiadenosina.

Los resultados mostraron que la cepa de ratón BALB/c tiende a ser más sensible genotóxicamente a la 8-BrdA y clofarabina y citotóxicamente hacia la cladribina y clofarabina que la cepa ICR. En un estudio previo, empleando diferentes cepas de ratón se probó la sensibilidad o resistencia hacia nucleobases y nucleósidos, la cepa BALB/c resultó más sensible que otras cepas de ratón a la inducción de micronúcleos causado por los nucleósidos de base (Sato *et al.*, 1993). Sin embargo, este estudio solo consideró la evaluación de los micronúcleos en un solo tiempo a las 30 h y el daño total no fue considerado.

La evidencia ha mostrado diferencias en la sensibilidad de algunas cepas a agentes químicos, que podría relacionarse al metabolismo y constitución genética propia de cada cepa. En un estudio previo, sobre sensibilidad de la población de linfocitos en dos cepas de ratón (C57BL/6 y CBA/Ca) después de ser irradiadas con la misma dosis, los autores concluyeron que la cepa de ratón C57BL/6 fue más susceptible a la inducción de apoptosis por radiación (Gridley *et al.*, 2011), en otro estudio sobre hepatocitos aislados y cultivados de distintas cepas de ratón (FVB/N, C57BL/6 y C3H/He) y tratados con ligando Fas que se une al receptor Fas, un iniciador de la apoptosis vía extrínseca, mostraron que los hepatocitos de la cepa C3H/He fueron más susceptible al daño mediado vía Fas que las cepas de ratón C57BL/6 y FVB/N (Weerasinghe *et al.*, 2016).

Con respecto a la eficiencia en términos del daño y dosis administrada entre ambas cepas se mostró que la clofarabina y cladribina son agentes que presentan mejor eficiencia, en la cepa ICR la 2-CldA=CIFdA>8-BrdA>2-FA y en la cepa BALB/c la CIFdA>2-CldA>8-BrdA>2-FA y por su eficiencia citotóxica para ambas cepas fue en orden descendente CIFdA>2-CldA>8-BrdA>2-FA, esta evidencia concuerda con las observaciones reportadas previamente y en sistemas *in vitro* (Celik *et al.*, 2018) y en investigación clínica (Faderl *et*

al., 2005; 2005b). La clofarabina es un agente que genera mayor daño genotóxico y citototóxico que sus predecesores cladribina y fludarabina en ambas cepas.

Con respecto a la eficacia de otros a antimetabolitos (azaC y dFdC), la cladribina y la clofarabina, presentaron un eficiencia genotóxica similar que la dFdC (Morales-Ramírez *et al.*, 2017b), pero fueron 3 y 4 veces menos eficientes que la azaC (Morales-Ramírez *et al.*, 2008). Citotóxicamente, la azaC fue 6.2 veces mayor que la clofarabina y 7.1 veces mayor que la cladribina (Morales-Ramírez *et al.*, 2014).

En una revisión previa, Morales-Ramírez *et al.*, (2014), compararon el Tir determinada por el tiempo de la frecuencia máxima de EPC-MN causado por distintas clases de agentes, incluyendo antimetabolitos, alquilantes mono y bifuncionales, derivados de *Vinca spp.* y promutágenos en ratones BALB/c y radiación. La cepa BALB/c presentó un pico constante entre las 40 y 44 h. que equivale a 16 h para cladribina, de 17 h para clofarabina, de 18 h para la bromodesoxiadenosina y 20 h para fludarabina después del Tir, lo cual sugiere una regularidad en los tiempos de inducción del daño del ADN. La cepa ICR, se presentó mayor variabilidad en los tiempos de inducción de RET-MN, esto nos permite sugerir que la cepa BALB/c es más estable para realizar ensayos genotoxicológicos *in vivo* (Figura 54).

El análisis cinético de la inducción de los RET-MN es una herramienta útil para la exploración de las acciones genotóxicas de los antineoplásicos *in vivo*. Las diferencias en las respuestas genotóxicas y citotóxicas entre las cepas de ratón podrían implicar un reto adicional en la extrapolación de los mecanismos de acción *in vivo*.

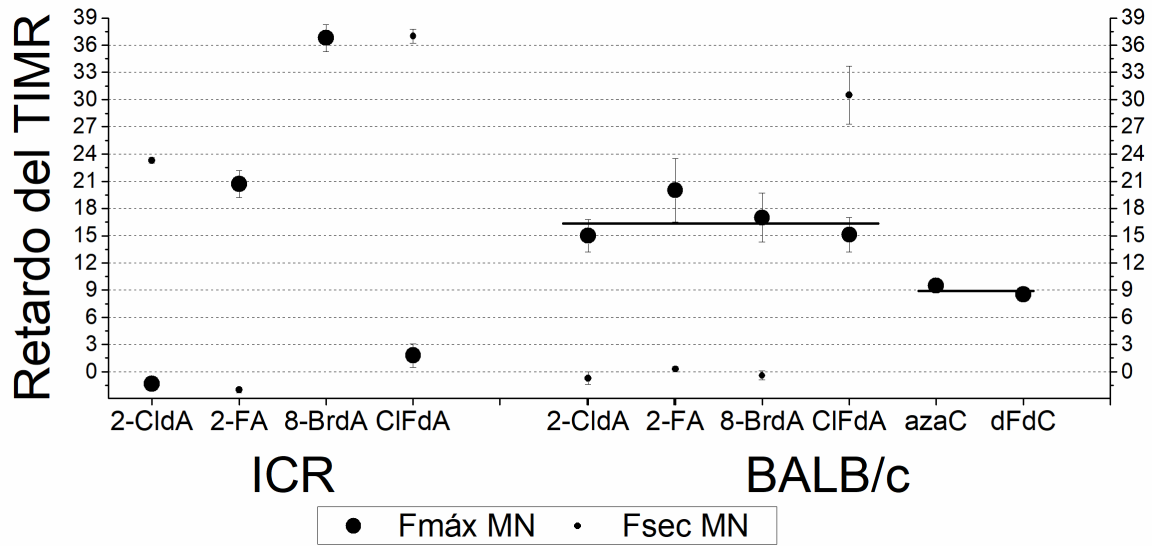


Figura 54. Retardo en el tiempo de inducción máxima relativa (TIMR) de micronúcleos inducidos por los análogos de desoxiadenosina y los análogos de desoxicitidina probados, tomando como referente el tiempo de la inducción máxima de la inducción de RET-MN de la radiación ionizante (Rad) (Morales-Ramírez *et al.*, 2014). La barra de color negro indica la media.

11. Conclusiones

- i) Las dosis altas de clofarabina, la cladribina, fludarabina y de la 8-bromodesoxiadenosina presentan un efecto citotóxico temprano que es independiente del efecto genotóxico.
- ii) La cladribina y clofarabina presentaron una acción citotóxica compleja con persistencia hasta las 64 h.
- iii) La cladribina y clofarabina presentan perfiles genotóxicos similares, que parecen estar regulados en tres vías: a) una acción temprana aún no conocida que podría estar asociada a efectos de rupturas tempranas o a efectos aneugénicos; b) por la inhibición de las ADN polimerasas y c) a un efecto desmetilante como sucede con la azaC.
- iv) La clofarabina resultó más genotóxica y citotóxica y que sus predecesores cladribina y fludarabina
- v) Diferencias en la expresión temporal de micronúcleos depende de los procesos involucrados durante la formación de rupturas de ADN o un efecto aneugénico.
- vi) La fludarabina y la bromodesoxiadenosina fueron los agentes menos eficientes en la inducción de rupturas del ADN comparado con la cladribina y clofarabina.
- vii) La clofarabina es el agente más genotóxico y citotóxico que la cladribina y que la fludarabina y que la 8-BrdA, consistente con lo reportado en estudios clínicos.
- viii) La cepa BALB/c tiende a ser más sensible genotóxicamente a la clofarabina y 8-BrdA y citotóxicamente a la clofarabina y cladribina

11. 1 Conclusión general

El análisis de la cinéticas de inducción de RET-MN y RET *in vivo* es una herramienta útil para explorar la acción de agentes antineoplásicos *in vivo*.

12. Perspectivas

Comprobar si los picos de inducción de RET-MN corresponden a los mecanismos propuestos, para ello se requiere implementar estrategias que permitan conocer y relacionar los mecanismos de acción descritos *in vitro* con las observaciones de los análisis cinéticos *in vivo*.

Las diferencia genotóxicas y citotóxicas entre distintas cepas de ratón representa un reto adicional en la extrapolación de los posibles mecanismos de acción.

Se podría explorar la viabilidad de monitorear la cinética de la actividad genotóxica y citotóxica de los antineoplásicos durante el tratamiento de los desórdenes linfoproliferativos en seres humanos.

13. Literatura citada

- Abbi, K.S., W. Rybka, W.C. Ehmann, D.F. Claxton. 2015. Phase I/II study of clofarabine, etoposide, and mitoxantrone in patients with refractory or relapsed. Acute Leukemia Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia. 15(1):41-46
- Abramsson-Zetterberg, L., G. Zetterberg y J. Grawe. 1996. The time-course of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. Mutation Research. 350(2):349-358.
- Annaloro, C., A. Costa, N.S. Fracchiolla, G. Mometto, S. Artuso, G. Saporiti, E. Tagliaferri, F. Grifoni, F. Onida y A. Cortelezzi. 2015. Severe fludarabine neurotoxicity after reduced intensity conditioning regimen to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a case report. Clin Case Rep. 3(7):650-655.
- Antonucci, G.A. y C.S. Takahashi. 2005. Clastogenic activity of 2-chlorodeoxyadenosine in mammalian somatic cells. Genetics and Molecular Biology. 28(2):339-344.
- Arora, S., A. Bhardwaj, S. Singh, S.K. Srivastava, S. McClellan, C.S. Nirodi, G.A. Piazza, W.E. Grizzle, L.B. Owen, y A.P. Singh. 2013. An undesired effect of chemotherapy: gemcitabine promotes pancreatic cancer cell invasiveness through reactive oxygen species-dependent, nuclear factor kappaB- and hypoxia-inducible factor 1alpha-mediated up-regulation of CXCR4. The Journal of Biological Chemistry. 288(29):21197-21207.
- Avery, T.L., J.E. Rehg, W.C. Lumm, F.C. Harwood, V.M. Santana, Blakley RL. 1989. Biochemical pharmacology of 2-chlorodeoxyadenosine in malignant human hematopoietic cell lines and therapeutic effects of 2-bromodeoxyadenosine in drug combinations in mice. Cancer Res. 49(18):4972-8.
- Baker, D., G. Pryce, S.S. Herrod, K. Schmierer. 2019. Potential mechanisms of action related to the efficacy and safety of cladribine. Multiple Sclerosis and Related Disorder. 30: 176-186
- Barbieri, D., M.P. Abbracchio, S. Salvioli, D. Monti, A. Cossarizza, S. Ceruti, R. Brambilla, F. Cattabeni, K.A. Jacobson, y C. Franceschi. 1998. Apoptosis by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 2-chloro-adenosine in human peripheral blood mononuclear cells. Neurochemistry international. 32(5-6):493-504.
- Beesley, A.H., M.L. Palmer, J. Ford, R.E. Weller, A.J. Cummings, J.R. Freitas, M.J. Firth, K.U. Perera, N.H. de Klerk y U.R. Kees. 2007. *In vitro* cytotoxicity of nelarabine, clofarabine and flavopiridol in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 137(2):109-16.

- Begleiter, A., L. Verburg, A. Ashique, K. Lee, L.G. Israels, M.R. Mowat y J.B Johnston.1995. Comparison of antitumor activities of 2-chlorodeoxyadenosine and 9-beta-arabinosyl-2-fluoroadenine in chronic lymphocytic leukemia and marrow cells *in vitro*. *Leukemia*. 9(11):1875–1881.
- Beutler, E. 1992. Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine). *Lancet*. 340(8825):952-956.
- Biswal, S.S., K. Datta, G.K. Acquaah-Mensah, J.P. Kehrer. 2000. Changes in ceramide and sphingomyelin following fludarabine treatment of human chronic B-cell leukemia cells. *Toxicology*. 154(1-3):45-53.
- Blakley, R.L., M.C. Huang, K. Rainer. 1985. Mechanism of cytotoxicity of 2-chloro and 2-bromo deoxyadenosine for a human lymphoblastic cell line, CCRF-CEM. In: Nyhan W.L., Thompson L.F., Watts R.W.E. (eds) *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man V. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 195B. Springer, New York, NY
- Boldt, D.H., D.D. Von Hoff, J.G. Kuhn y M. Hersh. 1984. Effects on human peripheral lymphocytes of *in vivo* administration of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine-5'-monophosphate (NSC 312887), a new purine antimetabolite. *Cancer Res*. 44(10):4661-6.
- Bonate, P.L., L. Arthaud, W.R. Cantrell, Jr., K. Stephenson, J.A. Secrist, 3rd y S. Weitman. 2006. Discovery and development of clofarabine: a nucleoside analogue for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 5(10):855-863.
- Borner, M.M., F. Joncourt y M.A. Hotz. 1997. Similarity of apoptosis induction by 2-chlorodeoxyadenosine and cisplatin in human mononuclear blood cells. *Br J Cancer*. 76(11):1448-54.
- Brockman, R.W., Y.C. Cheng, F.M. Schabel Jr y J.A. Montgomery. 1980. Metabolism and chemotherapeutic activity of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine against murine leukemia L1210 and evidence for its phosphorylation by deoxycytidine kinase. *Cancer Res*. 40(10):3610-5.
- Bryan, J., H. Kantarjian, H. Prescott y E. Jabbour. 2014. Clofarabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Opin Investig Drugs*. 23(2):255-263.
- Bryce, S.M., J.C. Bemis, J.A. Mereness, R.A. Spellman, J. Moss, D. Dickinson, M.J. Schuler y S.D. Dertinger. 2014. Interpreting *in vitro* micronucleus positive results: simple biomarker matrix discriminates clastogens, aneugens, and misleading positive agents. *Environ Mol Mutagen*. 55(7):542–555.
- Buie, L.W., S.S. Epstein y C.M. Lindley. 2007. Nelarabine: a novel purine antimetabolite antineoplastic agent. *Clin Ther*. 29(9):1887-1899.

- Bull, B. 2000. The erythrocyte. In: Williams Hematology. M. Lichtman, K. Kaushansky, E. Beutler, U. Seligsohn, T. Kipps y Josef Prchal. 6th edition. Mc Graw-Hill. USA. pp 271-278.
- Cariveau, M.J., M. Stackhouse, X.L. Cui, K. Tiwari, W. Waud, J.A. Secrist 3rd y B. Xu. 2008. Clofarabine acts as radiosensitizer *in vitro* and *in vivo* by interfering with DNA damage response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 70(1):213-20.
- Carson, D.A., D.B. Wasson, L.M. Esparza, C.J. Carrera, T.J. Kipps y H.B. Cottam. 1992. Oral antilymphocyte activity and induction of apoptosis by 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Proc Natl Acad Sci.* 89(7):2970-4.
- Carson, D.A., D.B. Wasson y E. Beutler. 1984. Antileukemic y immunosuppressive activity of 2-chloro-2'-deoxyadenosine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81(7):2232-2236.
- Carson, D.A., D.B. Wasson, R. Taetle y A. Yu. 1983. Specific toxicity of 2-chlorodeoxyadenosine toward resting and proliferating human lymphocytes. *Blood.* 62(4):737-43.
- Carson, D.A., J. Kaye y D.B. Wasson. 1980. Differences in deoxyadenosine metabolism in human y mouse lymphocytes. *J Immunol.* 124(1):8-12.
- Çelik, H., M. Sciandra, B. Flashner, E. Gelmez, N. Kayraklıoğlu, D.V. Allegakoen, J.R. Petro, E.J. Conn, S. Hour, J. Han, L. Oktay, P.B. Tiwari, M. Hayran, B.T. Harris, M.C. Manara, J.A. Toretsky, K. Scotlandi, A. Üren. 2018. Clofarabine inhibits Ewing sarcoma growth through a novel molecular mechanism involving direct binding to CD99. *Oncogene.* 37(16):2181-2196.
- Cerisano, V., Y. Aalto, S. Perdichizzi, G. Bernard, M.C. Manara, S. Benini S, G. Cenacchi, P. Preda, G. Lattanzi, B. Nagy, S. Knuutila, M.P. Colombo, A. Bernard, P. Picci, K. Scotlandi. 2004. Molecular mechanisms of CD99-induced caspase-independent cell death and cell-cell adhesion in Ewing's sarcoma cells: actin and zyxin as key intracellular mediators. *Oncogene.* 23(33):5664-74.
- Cervantes-Rios, E., R. Ortiz-Muniz, A. L. Martinez-Hernandez, L. Cabrera-Rojo, J. Graniel-Guerrero y L. Rodriguez-Cruz. 2012. Malnutrition and infection influence the peripheral blood reticulocyte micronuclei frequency in children. *Mutation research.* 731 (1-2):68-74.
- Cicchetti, R y G. Argentin. 2003. The role of oxidative stress in the *in vitro* induction of micronuclei by pesticides in mouse lung fibroblasts, *Mutagenesis,* 18(2): 127–132.
- Cohen, A., R. Hirschhorn, S.D. Horowitz, A. Rubinstein, S.H. Polmar, R. Hong y D.W. Martin Jr. 1978. Deoxyadenosine triphosphate as a potentially toxic metabolite in adenosine deaminase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(1):472-476.

- Criswell, K.A., G. Krishna, D. Zielinski, G.A. Urda, J.C. Theiss, P. Juneau y M.R. Bleavins. 1998. Use of acridine orange in: flow cytometric assessment of micronuclei induction. *Mutation Research*. 414(1-3):63-75.
- Cruz-Vallejo V, Ortíz-Muñiz R, Vallarino-Kelly T, Cervantes-Ríos E, Morales-Ramírez P. 2019. In vivo Characterization of the Radiosensitizing Effect of a Very Low Dose of BrdU in Murine Cells Exposed to Low-Dose Radiation. *Environ Mol*. 60(6):534-545.
- Curran, M.P. y C. M. Perry. 2005. Clofarabine: in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Paediatr Drugs*. 7(4):259-64.
- DeAngelo, D.J. y R.M. Stone. 2008. New agents for the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 3(3):135-143.
- Dertinger, S.D., Torous, D.K. y Tometsko, K.R. 1996. Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutation Research*. 371(3-4):283-292.
- Dertinger, S.D., Y. Chen, R.K. Miller, K.J. Brewer, T. Smudzin, D.K. Torous, N.E. Hall, K.A. Olvany, F.G. Murante y C.R. Tometsko. 2003. Micronucleated CD71-positive reticulocytes: a blood-based endpoint of cytogenetic damage in humans. *Mutation Research*. 542(1-2):77-87.
- Donadelli, M., I. Dando, T. Zaniboni, C. Costanzo, E. Dalla Pozza, M.T. Scupoli, A. Scarpa, S. Zappavigna, M. Marra, A. Abbruzzese, M. Bifulco, M. Caraglia, M. Palmieri. 2011. Gemcitabine/cannabinoid combination triggers autophagy in pancreatic cancer cells through a ROS-mediated mechanism. *Cell Death and Dis*. 2:e152.
- Elter, T., L. Gercheva-Kyuchukova, H. Pylypenko, T. Robak T, B. Jaksic, G. Rekhtman, S. Kyrz-Krzemień, M. Vatutin, J. Wu, C. Sirard, M. Hallek y A. Engert A. 2011. Fludarabine plus alemtuzumab versus fludarabine alone in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia: a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 12(13):1204-13.
- Ewald, B., D. Sampath y W. Plunkett. 2008. Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene*. 27(50):6522-6537.
- Faderl, S. V. Gandhi, S. O'Brien, P. Bonate, J. Cortes, E. Estey, M. Beran, W. Wierda, G. Garcia-Manero, A. Ferrajoli, Z. Estrov, F.J. Giles, M. Du, M. Kwari, M. Keating, W. Plunkett y H. Kantarjian. 2005b. Results of a phase 1-2 study of clofarabine in combination with cytarabine (ara-C) in relapsed and refractory acute leukemias. *Blood*. 105(3):940-7.
- Faderl, S., V. Gandhi, M.J. Keating, S. Jeha, W. Plunkett, and H.M. Kantarjian. 2005a. The role of clofarabine in hematologic and solid malignancies development of a next-generation nucleoside analog. *Cancer*. 103(10):1985-1995.

- Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2(5): 1084-1104.
- Fielden, J. A. Ruggiano, M. Popović, K. Ramadan. 2018. DNA protein crosslink proteolysis repair: From yeast to premature ageing and cancer in humans. *DNA Repair*. 71:198–204
- Fouchet, C., P. Gane, J.P. Cartron, C. Lopez C. 2000. Quantitative analysis of XG blood group and CD99 antigens on human red cells. *Immunogenet* 51(8-9):688-694.
- Gabbara S, Bhagwat A. 1995. The mechanism of inhibition of DNA (cytosine-5-) methyltransferase by 5-azacytosine is likely to involve methyl to the inhibitor. *Biochem*. 307(Pt 1):87-92.
- Galmarini, C.M., J.R. Mackey y C. Dumontet. 2002. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol*. 3(7):415-424.
- Gandhi, V. y W. Plunkett. 2002. Cellular and Clinical Pharmacology of Fludarabine. *Clin Pharmacokinet*. 41(2):93-103.
- Gandhi, V. y W. Plunkett. 2006. Clofarabine and nelarabine: two new purine nucleoside analogs. *Current opinion in oncology*. 18(6):584-590.
- Gandhi, V. y W. Plunkett. 2007. Clofarabine: Mechanism of Action, Pharmacology and Clinical Investigations. In: *Cancer Drug and Development: Deoxynucleoside Analogs in Cancer Therapy*. Edited by G.J. Peters. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA. pp. 153-167.
- Gandhi, V., P. Huang y W. Plunkett. 1994. Fludarabine inhibits DNA replication: a rationale for its use in the treatment of acute leukemias. *Leuk Lymphoma*. 14 Suppl 2:3-9.
- Genini, D., S. Adachi, Q. Chao, D.W. Rose, C.J. Carrera, H.B. Cottam, D.A. Carson y L.M. Leoni. 2000. Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. *Blood*. 96(10):3537-43.
- González-Cid, M., A.F. Fundia, M.I. Cuello e I. Larripa. 2002. Correlation between chromosome damage and apoptosis induced by fludarabine and idarubicin in normal human lymphocytes. *Toxicology*. 171(2-3):215-22.
- Grawe, J., G. Zetterberg y H. Amneus. 1992. Flow-cytometric enumeration of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Cytometry*. 13:750-758.
- Grawe, J., L. Abramsson-Zetterberg y G. Zetterberg. 1998. Low dose effects of chemicals as assessed by the flow cytometric *in vivo* micronucleus assay. *Mutation Research*. 405(2):199-208.

- Gridley, D.S., M.J. Pecaut, L.M. Green, M.C. Sanchez, A.M. Kadhim. 2011. Strain-related Differences and Radiation Quality Effects on Mouse Leukocytes: Gamma-Rays and Protons (With and Without Aluminum Shielding). *In Vivo*. 25(6):871-80.
- Griffig, J., R. Koob, y R.L Blakley. 1989. Mechanisms of inhibition of DNA synthesis by 2-chlorodeoxyadenosine in human lymphoblastic cells. *Cancer Res*. 49(24 Pt 1):6923-8.
- Guchelaar, H.J., D.J. Richel y M.R. Schaafsma. 1994. Clinical and toxicological aspects of the antineoplastic drug cladribine: a review. *Annals of hematology* (69): 223-230.
- Haider, M., S.A. Rizvi y P.M. Kasi. 2015. Nelarabine associated myotoxicity and rhabdomyolysis. *Case Rep Hematol*. 2015:825670.
- Hayashi, M. 2016. The micronucleus test-most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes Environ*. 38:18.
- Hegde, V., R.J. McFarlane, E.M. Taylor, Price C. 1996. The genetics of the repair of 5-azacytidine-mediated DNA damage in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*. 251(4):483-92.
- Heinemann, V., Y.Z. Xu, S. Chubb, A. Sen, L.W. Hertel, G.B. Grindey y W. Plunkett. 1990. Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Mol Pharmacol*. 38(4):567-72.
- Hentosh, P. y D.M. Peffley. 2010. The cladribine conundrum: deciphering the drug's mechanism of action. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 6(1):75-81.
- Hentosh, P., R. Koob y R.L. Blakley. 1990. Incorporation of 2-halogeno-2'-deoxyadenosine 5-triphosphates into DNA during replication by human polymerases alpha and beta. *J Biol Chem*. 265(7):4033-4040.
- Hirota, Y., A. Yoshioka, S. Tanaka, K. Watanabe, T. Otani, J. Minowada, A. Matsuda, T. Ueda y Y. Wataya. Imbalance of deoxyribonucleoside triphosphate. 1989. DNA double-strand breaks, and cell death caused by 2-chlorodeoxyadenosine in mouse FM3A cells. *Cancer Res*. 49(4):915-9.
- Hoffman R.A. 2008. Flow cytometry: instrumentation, applications, future trends and limitations. In: Resch-Genger U. (eds) *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II*. Springer Ser Fluoresc. Springer, Berlin, Germany. 6:307-342
- Holmes R.E. y R.K. Robins. 1965. Purine Nucleosides. IX. The Synthesis of 9- β -D-Ribofuranosyl Uric Acid and Other Related 8-Substituted Purine ribonucleosides. *J. Am. Chem. Soc*. 87(8):1772-1776.
- Huang, M.C., R.A. Ashmun, T.L. Avery TL, M. Kuehl, R.L Blakley. 1986. Effects of cytotoxicity of 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 2-bromo-2'-deoxyadenosine on cell

- growth, clonogenicity, DNA synthesis, and cell cycle kinetics. *Cancer Res.* 46(5):2362-8.
- Huang, P. y W. Plunkett. 1995. Fludarabine- and gemcitabine-induced apoptosis: incorporation of analogs into DNA is a critical event. *Cancer Chemother Pharmacol.* 36(3):181-188.
- Huang, P., L.E Robertson, S. Wright, W. Plunkett. 1995. High molecular weight DNA fragmentation: a critical event in nucleoside analogue-induced apoptosis in leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 1(9):1005-13.
- Huang, P., S. Chubb y W. Plunkett. 1990. Termination of DNA synthesis by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. A mechanism for cytotoxicity. *J Biol Chem.* 265(27):16617-25.
- Huang, P., S. Chubb, L.W. Hertel, G.B. Grindey y W. Plunkett. 1991. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* 51(22):6110-7
- Huguley, C.M. Jr. 1977. Treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Treat Rev.* 4(4):261-73.
- In vivo* Pharmacology Training Group. 2002. The fall and rise of *in vivo* pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 23(1):13-18.
- Jeha, S. 2009. Recent progress in the treatment of acute lymphoblastic leukemia: Clofarabine. *Hematology/oncology clinics of North America* (23): 1137-1144.
- Jhaveri, K.D., S. Chidella, S.L. Allen y S. Fishbane. 2014. Clofarabine-induced kidney toxicity. *J Oncol Pharm Pract.* 20(4):305-308.
- Jones, P.A. y Taylor, S.M. 1980. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* 20(1):85-93.
- Jordheim, L., D. Durantel, F. Zoulim, y C. Dumontet. 2013. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov* 12(6):447-464.
- Kasamoto, S., S. Masumori y M. Hayashi. 2013. *In vivo* micronucleus assay in mouse bone marrow and peripheral blood. *Methods in Molecular Biology.* Clifton, N.J. 1044:179-189.
- King, K.M., V.L. Damaraju, M.F. Vickers, S.Y. Yao, T. Lang, T.E. Tackaberry, D.A. Mowles, A.M. Ng, J.D. Young y C.E. Cass. 2005. A comparison of the transportability, and its role in cytotoxicity, of clofarabine, cladribine, and fludarabine by recombinant human nucleoside transporters produced in three model expression systems. *Mol Pharmacol.* 69(1):346-53.

- Kaufman-Szymczyk, A., K. Majda, A. Szulawska-Mroczyk y Fabianowska-Majewska y K. Lubecka. 2019. Clofarabine-phytochemical combination exposures in CML cells inhibit DNA methylation machinery, upregulate tumor suppressor genes and promote caspase-dependent apoptosis. *Molecular Medicine Reports*. 20(4):3597–3608.
- Krawczyk B, K. Fabianowska-Majewska. 2006. Alteration of DNA methylation status in K562 and MCF-7 cancer cell lines by nucleoside analogues. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 25(9-11):1029-32.
- Larson, M.L. y P. Venugopal. 2009. Clofarabine: a new treatment option for patients with acute myeloid leukemia. *Expert Opin Pharmacother*. 10(8):1353-1357.
- Lee, Y.J., Y.L. Lee, y S.H. Lee. 2015. Resveratrol and clofarabine induces a preferential apoptosis-activating effect on malignant mesothelioma cells by Mcl-1 down-regulation and caspase-3 activation. *BMB Reports*, 48(3), 166–171.
- Li, J., W. Zhang, W. Wang, Y. Jiang, S. Zhao, W. Liu, G. Li, N. Liu, Q. Li, X. Su. 2018. Forty-nine cases of acute lymphoblastic leukaemia/lymphoma in pleural and pericardial effusions: A cytological-histological correlation. *Cytopathol*. 29(2):172-178.
- Lizak, N., S. Hodgkinson, E. Butler, J. Lechner-Scott, M. Slee, P.A. McCombe, C. Shaw, O. Skibina, S. Vucic, N. Shuey, M.H. Barnett, J. Parratt, H. Butzkueven, D. Jack, J. Fabris, T. Kalincik. 2020. Real-world effectiveness of cladribine for Australian patients with multiple sclerosis: An MSBase registry substudy. *Mult Scler*. 1–10.
- Llombart-Bosch, A., S. Navarro. 2001. Immunohistochemical detection of EWS and FLI-1 proteinss in Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumors: comparative analysis with CD99 (MIC-2) expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 9(3):255-60
- Lukenbill, J. y M. Kalaycio. 2013. Fludarabine: a review of the clear benefits and potential harms. *Leuk Res*. 37(9):986-994.
- Macey, M. 2010. Principles of flow cytometry. En *Flow cytometry: principles and applications*. M.G. Macey (ed). 3ª ed. Human Press. New Jersey, USA. 1-15 pp.
- MacGregor, J.T., C.M. Wehr y D.H. Gould. 1980. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis*. 2(4):509-514.
- Mannargudi, M.B., y S. Deb. (2017). Clinical pharmacology and clinical trials of ribonucleotide reductase inhibitors: is it a viable cancer therapy?. *Journal of Cancer research and Clinical oncology*. 143(8):1499–1529.

- Marsee, D.K., G.S. Pinkus, y H. Yu. 2010. CD71 (transferrin receptor): An Effective Marker for Erythroid Precursors in Bone Marrow Biopsy Specimens. *Hematopatology*. 134(3):429-435.
- Marzo, I., P. Pérez-Galán, D. Giraldo, D. Rubio-Félix, A. Anel, J. Naval. 2001. Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Biochem J*. 359(Pt 3):537-46.
- Matyja, E., P. Grieb, M. Ryba, J. Jagielski, M.J. Mossakowski MJ. 1996. Mitochondrial damage following exposure of organotypic cultures of human malignant gliomas to 2-chloro- and 2-bromo-2'-deoxyadenosine. *Folia Neuropathol*. 34(1):31-39.
- Mavournin, K.H., D.H. Blakey, M.C. Cimino, M.F. Salamone y J.A. Heddle. 1990. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 239(1):29-80.
- McLaughlin P., L.E. Robertson y M.J. Keating. 1997. Fludarabine phosphate in lymphoma: an important new therapeutic agent. In: Cabanillas F., Rodriguez M.A. (eds) *Advances in Lymphoma Research. Cancer Treatment and Research*, vol 85. Springer, Boston, MA. USA.
- Morales-Ramírez P, T. Vallarino-Kelly, V.L. Cruz-Vallejo. 2017a. The OECD's micronucleus test guideline for single exposure to an agent and the genotoxic-kinetic alternative. *Mutagenesis*. 32(4):411–415.
- Morales-Ramírez R. 2006. Micronúcleos. Pimentel-Peñaloza Emilio A., Ortiz-Muñiz Alda Rocío y Breña-Valle Matilde. (Coordinadores). *Tópicos de Genética*. Editorial de México (CEDIMSA), México, 2006.
- Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly y R. Rodriguez-Reyes. 1996. Effect of chlorophyllin on gamma ray induced micronuclei in polychromatic erythrocytes of murine peripheral blood determined by the ABC strategy. *Mutation Research* 367(2):51-56.
- Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly y V. Cruz-Vallejo. 2014. Kinetics of micronucleus induction and cytotoxicity caused by distinct antineoplastics and alkylating agents *in vivo*. *Toxicol Lett*. 224(3):319-325.
- Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly y V. Cruz-Vallejo. 2017b. Genotoxicity kinetics in murine normoblasts as an approach for the *in vivo* action of difluorodeoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 79(5):843-853.
- Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly y V.L. Cruz-Vallejo. 2008. Mechanisms of DNA breaks induction *in vivo* by 5-azacytidine: paths of micronucleus induction by azaC. *Journal of Applied Toxicology*. 28(3):254-259.

- Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly, G. Anguiano-Orozco, y R. Rodríguez-Reyes, R. 1997. Pharmacokinetic parameters of genotoxic activity inferred from the comparison of the kinetics of MN-PCE induced by chemical agents and ionizing radiation. *Mutation Research* 391(3):127-134.
- Moufarij, M.A., D. Sampath, M.J. Keating y W. Plunkett. 2006. Fludarabine increases oxaliplatin cytotoxicity in normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by suppressing interstrand DNA crosslink removal. *Blood*. 108(13):4187-93.
- Murphy, M.P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 417(Pt 1):1-13.
- Kamal K.S. Abbi,¹ Witold Rybka,² W. Christopher Ehmann,² David F. Claxton² Ngo, D., S. Patel, E.J. Kim, R. Brar y M.Z. Koontz. 2015. Nelarabine neurotoxicity with concurrent intrathecal chemotherapy: Case report and review of literature. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 21(4):296-300.
- O'Connor, D., K. Sibson, M. Caswell, P. Connor, M. Cummins, C. Mitchell, J. Motwani, M. Taj, A. Vora, R. Wynn y P. R. Kearns. 2011. Early UK experience in the use of clofarabine in the treatment of relapsed and refractory paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 154(4):482-485.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2016. Guideline for the testing of chemicals. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. En línea: <https://dx.doi.org/10.1787/9789264264762-en>
- Osterman, G.S., S Czene, A. Gokarakonda, S. Haghdoost. 2013. Intracellular deoxyribonucleotide pool imbalance and DNA damage in cells treated with hydroxyurea, an inhibitor of ribonucleotide reductase. *Mutagenesis*. 28(6):653-660.
- Otani, M., H.S. Hwang, T. Nakazawa, Y. Wataya. 1992. dNTP pool imbalance induced endonuclease: 5-fluorodeoxyuridine induced dna double strand break in mouse fm3a cells and the mechanism of cell death. *Nucleic Acids Symp Ser*.27:193-4.
- Parker, W.B., S.C. Shaddix, C.H. Chang, E.L. White, L.M. Rose, R.W. Brockman, A.T. Shortnacy, J.A. Montgomery, J.A. Secrist 3rd y L.L. Bennett Jr. 1991. Effects of 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)adenine on K562 cellular metabolism and the inhibition of human ribonucleotide reductase and DNA polymerases by its 5'-triphosphate. *Cancer Res*. 51(9):2386-94.
- Parker, W.B., S.C. Shaddix, L.M. Rose, D.S. Shewach, L.W. Hertel, J.A. Secrist 3rd, J.A. Montgomery y L.L. Bennett Jr. 1999. Comparison of the mechanism of cytotoxicity of 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)adenine, 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-ribofuranosyl)adenine, and 2-chloro-9-(2-deoxy-2,2-difluoro-beta-D-ribofuranosyl)adenine in CEM cells. *Mol Pharmacol*. 55(3):515-20.

- Parsons, P.G., E.P. Bowman, and R.L. Blakley. 1986. Selective toxicity of deoxyadenosine analogues in human melanoma cell lines. *Biochemical pharmacology*. 35(22):25-4029.
- Pascucci, B., M.T. Russo, M. Crescenzi, M. Bignami, E. Dogliotti, E. 2005. The accumulation of mms-induced single strand breaks in g 1 phase is recombinogenic in DNA polymerase β defective mammalian cells. *Nucleic Acids Research*. 33(1):280-288.
- Pasello, M., M.C. Manara, K. Scotlandi. 2018. CD99 at the crossroads of physiology and pathology. *J Cell Comm Sign*. 12(1):55-68.
- Pedersen, I.M., S. Kitada, A. Schimmer, Y. Kim, J.M. Zapata, L. Charboneau, L. Rassenti, M. Andreeff, F. Bennett, M.B. Sporn, L.D. Liotta, T.J. Kipps y J.C. Reed. 2002. The triterpenoid CDDO induces apoptosis in refractory CLL B cells. *Blood*. 100(8):2965-72.
- Penack, O., K. Sotlar, F. Noack, H. P. Horny, E. Thiel y M. Notter. 2005. Cladribine therapy in a patient with an aleukemic subvariant of mast cell leukemia. *Annals of hematology*. 84(10):692-693.
- Pettersen, R.D., G. Bernard, K.K. Olafsen, M. Pourtein y S.O. Lie. 2001. CD99 signals caspase-independent T cell death. *J Immunol*. 166(8):4931-42.
- Pettitt, A.R., y J.C. Cawley. 2000. Caspases influence the mode but not the extent of cell death induced by purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 109(4):800-804
- Petty, A.C., P. Tippett. 1995. Investigation of the biochemical relationship between the blood group antigens Xga and CD99 (12E7 antigen) on red cells. *Vox Sang*. 69(3):231-235
- Piro, L.D., C.J. Carrera, E. Beutler y D.A. Carson. 1988. 2-Chlorodeoxyadenosine: an effective new agent for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 72(3):1069-1073.
- Plunkett, W., S. Chubb, L. Alexander, J. Montgomery. 1980. Comparison of the toxicity and metabolism of 9- β -d-arab-inofuranosyl-2-Fluoroadenine and 9- β -d-arabinofuransyladenine in human lymphoblastoid cells. *Cancer Res*. 40(7):2349-2355.
- Poli, P., A. Buschini, A. Spaggiari, V. Rizzoli, C. Carlo-Stella y C. Rossi. 1999. DNA damage by tobacco smoke and some antiproliferative drugs evaluated using the Comet assay. *Toxicol Lett*. 108(2-3):267-76.
- Pourquier P., C. Gioffre, G. Kohlhagen, Y. Urasaki, F. Goldwasser, L.W. Hertel, R.T. Yu S, Pon, W.H. Gmeiner, Y. Pommier. 2002. Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clin Cancer Res*. 8(8):2499-504.

- Rehman, S.U., H. Zubair, T. Sarwar, M.A. Husain, H.M. Ishqi, S. Nehar, M. Tabish. 2015. Redox cycling of Cu(II) by 6-mercaptopurine leads to ROS generation and DNA breakage: possible mechanism of anticancer activity. *Tumour Biol.* 36(2):1237-1244.
- Reichelová V., G. Juliusson, T. Spasokoukotskaja, S. Eriksson y J. Liliemark. 1995. Interspecies differences in the kinetic properties of deoxycytidine kinase elucidate the poor utility of a phase I pharmacologically directed dose-escalation concept for 2-chloro-2'-deoxyadenosine. *Cancer Chemother Pharmacol.* 36(6):524-9.
- Rifkind, R.A., Bank, A. y Marks, P.A. 1974. Chapter 2 - Erythropoiesis A2 - Surgenor, in *The Red Blood Cell*. Ed. by Douglas MacN. Academic Press. 2nd Edition. 51-89.
- Robak, P. y T. Robak. 2013. Older and new purine nucleoside analogs for patients with acute leukemias. *Cancer Treat Rev.* 39(8):851-61.
- Robak, T., A. Korycka, E. Lech-Maranda y P. Robak. 2009. Current status of older and new purine nucleoside analogues in the treatment of lymphoproliferative diseases. *Molecules.*14(3):1183-1226.
- Robak, T., J. Z. Blonski, M. Kasznicki, J. Gora-Tybor, J. Dwilewicz-Trojaczek, B. Stella-Holowiecka y D. Wolowiec. 2002. Cladribine combined with cyclophosphamide is highly effective in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *The hematology journal: the official journal of the European Haematology Association / EHA.* 3(5):244-250.
- Robertson, L.E., S. Chubb, R.E. Meyn, M. Story, R. Ford, W.N. Hittelman, y W. Plunkett. 1993. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9-beta-D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood.* 81(1):143-150.
- Robins, R.K., E.F. Godefroi, C.E. Taylor, R.L. Lewis y A. Jackson. 1961. Purine Nucleosides. I. The Synthesis of Certain 6-Substituted-9-(tetrahydro-2-pyranil)-purines as Models of Purine Deoxynucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* 83(11):2574-2579.
- Rodriguez G. 1994. Fludarabine phosphate. A new anticancer drug with significant activity in patients with chronic lymphocytic leukemia and in patients with lymphoma *Invest New Drugs.* 12(2):75-92.
- Santi, D.V., A. Norment y C.E. Garrett. 1984. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 81(22): 6993-6997.
- Satana, H.E., A.D. Pontinha, V.C. Diculescu y A.M, Oliveira-Brett. 2011. Nucleoside analogue electrochemical behaviour and *in situ* evaluation of DNA-clofarabine interaction. *Bioelectrochemistry.* 87:3-8.

- Sato, A., J.A. Montgomery y J.G. Cory. 1984. Synergistic inhibition of leukemia L1210 cell growth *in vitro* by combinations of 2-fluoroadenine nucleosides and hydroxyurea or 2,3-dihydro-1H-pyrazole[2,3-a]imidazole. *Cancer Res.* 44(8):3286-90.
- Sato, S., H. Takizawa y N. Inui. 1993. Mouse strain differences in induction of micronuclei by base analogues and nucleosides. *Mutat Res.* 301(1):45-9.
- Sawitsky, A., K.R. Rai, O. Glidewell, R.T. Silver. 1977. Comparison of daily versus intermittent chlorambucil and prednisone therapy in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 50(6):1049-59.
- Schenkel AR, Dufour EM, Chew TW, Sorg E, Muller WA. 2007. The murine CD99-related molecule CD99-like 2 (CD99L2) is an adhesion molecule involved in the inflammatory response. *Cell Commun Adhes.* 14(5):227-37.
- Schmid, W. 1973. Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells. *Agents and Actions.* 3(2):77-85.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat Res.* 31(1):9-15
- Schulz, W.A. 2005. Leukemias and Limphomas in *Molecular Biology of Human Cancers. An Advanced student's Textbook.* Springer. USA. pp.219-242.
- Seto, S., C.J. Carrera, D.B. Wasson, D.A. Carson. 1986. Inhibition of DNA repair by deoxyadenosine in resting human lymphocytes. *Journal of immunology.* 136(8):2839-2843.
- Seto, S., C.J. Carrera, M. Kubota, D.B. Wasson, D.A. Carson. 1985. Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *J Clin Invest.* 75(2):377-83.
- Shapiro H.M. 2003. *Practical Flow Cytometry.* 4 ed. Editorial Wiley-Liss. EUA. 1-60 pp.
- Shigemi, H., T. Yamauchi, Y. Tanaka, T. Ueda. 2013. Novel leukemic cell lines resistant to clofarabine by mechanisms of decreased active metabolite and increased antiapoptosis. *Cancer Sci.* 104(6):732-9.
- Tanabe, K., W. Hiraoka, M. Kuwabara, F. Sato, A. Matsuda, T. Ueda. 1989. Induction of DNA double-strand breaks in Chinese hamster V79 cells by 2-chlorodeoxyadenosine. *Chem Biol Interact.* 71(2-3):167-75.
- Tice, R.R., G.L. Erexson, C.J. Hilliard, J.L. Huston, R.M. Boehm, D. Gulati y M.D. Shelby. 1990. Effect of treatment protocol and sample time on the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutagenesis.* 5(4):313-321.

- Torous, D.K., S.D. Dertinger, N.E. Hall y C.R. Tometsko. 2000. Enumeration of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood: a flow cytometric study. *Mutation Research*. 465(1-2):91-99.
- Trabbic, C.J., F. Zhang, T.F. Walseth y J.T. Slama. 2015. Synthesis and Biological Evaluation of Indolyl-Pyridinyl-Propenones Having Either Methuosis or Microtubule Disruption Activity 58(8):3593-361.
- Trachootham, D., H. Zhang, W. Zhang, L. Feng, M. Du, Y. Zhou, Z. Chen, H. Pelicano, W. Plunkett, W.G. Wierda, M.J. Keating y P. Huang. 2008. Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through a redox-mediated mechanism. *Blood*. 112(5):1912-22.
- Trioche, P., B. Nelken, G. Michel, I. Pellier, A. Petit, Y. Bertrand, P. Rohrlich, C. Schmitt, N. Sirvent, P. Boutard, G. Margueritte, B. Pautard, S. Ducassou, D. Plantaz, A. Robert, C. Thomas, K. Desseaux, S. Chevret, y A. Baruchel. 2012. French "real life" experience of clofarabine in children with refractory or relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Experimental Hematology & Oncology*.1(1):39.
- Tseng, W.C., D. Derse, Y.C. Cheng, R.W. Brockman y L.L Bennett Jr. 1982. *In vitro* biological activity of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and the biochemical actions of its triphosphate on DNA polymerases and ribonucleotide reductase from HeLa cells. *Mol Pharmacol*. 21(2):474-7.
- Valdez, B.C., Y. Li, D. Murray, J. Ji, Y. Liu, U. Popat, R.E. Champlin, B.S. Andersson. 2015. Comparison of the cytotoxicity of cladribine and clofarabine when combined with fludarabine and busulfan in AML cells: Enhancement of cytotoxicity with epigenetic modulators. *Exp Hematol*. 43(6):448-61.e2.
- van Pelt, K., G. de Haan, E. Vellenga, S.M. Daenen. 2005. Administration of low-dose cytarabine results in immediate S-phase arrest and subsequent activation of cell cycling in murine stem cells. *Exp Hematol*. 33(2):226-31.
- Viegas-Péquignot E. y B. Dutrillaux. 1981. Detection of G-C rich heterochromatin by 5-azacytidine in mammals. *Hum Genet*. 57(2):134-7.
- Wataya, Y., K. Watanabe, S. Yoshida, y A. Hiramoto-Yoshioka A. 1989. dNTPs imbalance and DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *Nucleic Acids Symp Ser*. 21:11-12.
- Weber, E., K. Bidwell y M.S. Legator. 1975. An evaluation of the micronuclei test using triethylenemelamine, trimethylphosphate, hycanthone and niridazole. *Mutation Research*. 28(1):101-106.

- Weerasinghe, S.V., M. J. Park, D.A. Portney, M.B. Omary. 2016. Mouse genetic background contributes to hepatocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *Molecular biology of the cell*. 27(20):3005–3012.
- Weiss M.A., L. Heffner, N. Lamanna, M. Kataycio, G. Schiller, S. Coutre y P. Maslak. 2005. A randomized trial of cytarabine compared to standard vincristine/prednisone-based regimen as induction therapy. *J. Clin. Oncol.* 23(16):6516.
- White, E.L., S.C. Shaddix, R.W. Brockman y L.L. Bennett Jr. Comparison of the actions of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and 9-beta-D- arabinofuranosyladenine on target enzymes from mouse tumor cells. *Cancer Res.* 42(6):2260-4.
- Wrzesien-Kus, A., T. Robak, A. Wierzbowska, E. Lech-Maranda, A. Pluta, E. Wawrzyniak, A. Krawczynska, K. Kuliczkowski, G. Mazur, M. Kiebinski, A. Dmoszynska, M. Wach, A. Hellmann, W. Baran, J. Holowiecki, S. Kyrzcz-Krzemien y S. Grosicki. 2005. A multicenter, open, noncomparative, phase II study of the combination of cladribine (2-chlorodeoxyadenosine), cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor and mitoxantrone as induction therapy in refractory acute myeloid leukemia: a report of the Polish Adult Leukemia Group. *Annals of Hematology*. 84(9):557-564.
- Wyczechowska D, K. Fabianowska-Majewska. 2003. The effects of cladribine and fludarabine on DNA methylation in K562 cells. *Biochem Pharmacol.* 65(2):219-25.
- Xie, C. y W. Plunkett. 1995. Metabolism and actions of 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D- arabinofuranosyl)-adenine in human lymphoblastoid cells. *Cancer Res.* 55(13):2847-52.
- Xie, K.C. y W. Plunkett W. 1996. Deoxynucleotide pool depletion and sustained inhibition of ribonucleotide reductase and DNA synthesis after treatment of human lymphoblastoid cells with 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl) adenine. *Cancer Res.* 56(13):3030-7.
- Yamato M, Y. Hirota, S. Yoshida, S. Tanaka, T. Morita, J. Y. Wataya, Y. 1992. Imbalance of deoxyribonucleoside triphosphates and DNA double-strand breaks in mouse mammary tumor FM3A cells treated in vitro with an antineoplastic tropolone derivative. *Jpn J Cancer Res.* 83(6):661–668.
- Yang, S.W., P. Huang, W. Plunkett, F.F. Becker y J.C. Chan. 1992. Dual mode of inhibition of purified DNA ligase I from human cells by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine triphosphate. *J Biol Chem.* 267(4):2345-9.
- Yoshioka, A. S. Tanaka, O. Hiraoka, Y. Koyama, Y. Hirota, D. Ayusawa, T. Seno, C. Garrett, Y. Wataya Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *Journal of Biological Chemistry.* 262(17):8235-41

- Zhenchuk, A., K. Lotfi, G. Juliusson y F. Albertioni. 2009. Mechanisms of anti-cancer action and pharmacology of clofarabine. *Biochemical pharmacology*. 78:1351-1359.
- Zhou, C., Q. Wang, Z. Wang y Y. Chang. 2013. Comparison of three-colour flow cytometry and slide-based microscopy for the scoring of micronucleated reticulocytes in rat bone-marrow and peripheral blood. *Mutation Research*. 758(1-2):12-17.
- Zinzani, P.L., M. Buzzi, P. Farabegoli, P. Tosi, A. Fortuna, G. Visani, G. Martinelli, A. Zaccaria y S. Tura. 1994. Induction of "*in vitro*" apoptosis by fludarabine in freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 13(1-2):95-7.

14. Anexos

Received: 23 March 2020 | Revised: 1 May 2020 | Accepted: 10 May 2020
DOI: 10.1002/em.22394

BRIEF COMMUNICATION

Environmental and
Molecular Mutagenesis



WILEY

In vivo kinetics of the genotoxic and cytotoxic activities of cladribine and clofarabine

Jesús Quezada-Vidal^{1,2} | Rocío Ortiz-Muñiz² | Elsa Cervantes-Ríos² |
Virginia Cruz-Vallejo¹ | Pedro Morales-Ramírez¹

¹Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Centro Nuclear, Carretera México-Toluca s/n, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, México

²Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco 186, Ciudad de México, México

Correspondence

Pedro Morales-Ramírez, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Km 36.5 Carretera México Toluca-La Marquesa s/n, Ocoyoacac, Estado de México, C.P. 52750, Mexico.
Email: mordep1@yahoo.com.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: CB-240116-2014

Accepted by: B. Gollapudi

Abstract

The aim of the present in vivo study was to determine the kinetics of the genotoxic and cytotoxic activities of cladribine and clofarabine in mouse normoblasts using flow cytometry. Mice in groups of five were treated with cladribine or clofarabine. Blood samples were obtained from the mouse tails before treatment and every 8 hr post-treatment for 72 hr. These samples were cytometrically scored for micronucleated reticulocytes (RETs), and the percentage of RETs was determined. The results showed that clofarabine and cladribine have early cytotoxic effects that are related to the genotoxic effects reported in previous studies; the drugs have both complex long-lasting genotoxic and cytotoxic kinetic activity, with similar profiles that suggest a relationship between the genotoxic and cytotoxic parameters. The initial genotoxokinetics timing of clofarabine is equivalent to those of difluorodeoxycytidine, likely because both agents inhibit DNA polymerase. Clofarabine shows a higher genotoxic and cytotoxic efficiency than cladribine, in agreement with previous results.

KEYWORDS

cytometry, cytotoxicokinetics, genotoxicokinetics, micronucleus assay, normoblasts

1 | INTRODUCTION

Not much information regarding the long-term genotoxic and cytotoxic actions in mammals after in vivo exposure to mutagens, specifically antineoplastic agents, is available. However, the time and duration of these genotoxic and cytotoxic effects, as well as their consequences on normal cells, is of interest for various conditions in which the entire organism is exposed (Hentosh and Peffley, 2010).

Using microscopy, we have systematically studied the genotoxic and cytotoxic action of different types of agents in mouse normoblasts in vivo, monitoring the induction of micronuclei in young erythrocytes and the reduction in the frequency of these kinds of erythrocytes (Morales-Ramírez *et al.*, 2014). We observed that aneugens cause earlier induction than do mono and bifunctional alkylating agents, particularly those that require metabolic activation. Alkylating agents usually have single peak curves, with few

exceptions, such as busulfan (Morales-Ramírez *et al.*, 2004a). We also studied two antimetabolites derived from cytidine, difluorodeoxycytidine, which has regular bell-shaped kinetics (Morales-Ramírez *et al.*, 2017), and azacytidine, which has irregularly shaped kinetics and produces micronuclei for a very long time (Morales-Ramírez *et al.*, 2008). This is most likely correlated with the complex action of this agent leading to the formation of a mega-adduct complex by the covalent bonds between DNA containing azacytidine and DNA methyltransferase (Santi *et al.*, 1984), which can subsequently cause breaks during repair (Hegde *et al.*, 1996), the induction of demethylation (Jones and Taylor, 1980) and chromosomal fragility at GC-rich clusters (Satoh *et al.*, 2004).

Cladribine and clofarabine are halogenated derivatives of adenine nucleotides used in the treatment of hematological malignancies. Clofarabine is a second-generation antineoplastic that has greater chemical and metabolic stability than exhibited by cladribine (Lotfi *et*

et al., 1999). In models *in vitro*, both agents have shown a variety of effects, such as early cytotoxicity (Çelik *et al.*, 2018), nucleotide reductase inhibition (Parker *et al.*, 1991), DNA polymerase inhibition (Parker *et al.*, 1991), hypomethylation (Zhang *et al.*, 2009), and apoptosis induction (Genini *et al.*, 2000).

In the present study, the complexity and duration of the kinetics of genotoxic and cytotoxic activity of cladribine and clofarabine were determined in mouse normoblasts *in vivo* as measured by flow cytometry.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Chemicals

Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine, cat. Ab142414, purity >98%) and clofarabine (2-chloro-2'-arabino fluoro-2'-deoxyadenosine, cat. Ab142732, purity >98%) were purchased from Abcam Chemicals (Cambridge, MA), and 1,000 U/ml sodium heparin was obtained from Inhepar Laboratorios (Pisa, México). The anti-CD71-FITC antibody was obtained from BioLegend (cat. 334104, San Diego, CA). Propidium iodide (cat. 02195458) and 1 mg/ml ribonuclease A (cat. 02101076) were obtained from MP Biomedicals, Inc. (Illkirch-Graffenstaden, France). Bicarbonate-buffered solution (BBS) was obtained from Sigma (cat. S6297 and cat. S3014, respectively, St. Louis, MO).

2.2 | Animals

Male ICR mice weighing 30 g each were purchased from Envigo (Haran, México), maintained at 22–24°C with 12 hr dark–light periods; fed Purina Small Rodent Chow; and provided water *ad libitum*. The animals used in this study were treated and housed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the Commission on Life Sciences, Institute of Laboratory Animal Research, National Research Council (1996). The protocol was reviewed and approved by the Internal Committee of Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL), which oversees the ethics of research involving the use and welfare of animals.

2.3 | Treatments

The mice in groups with five animals in each were intraperitoneally injected with 190 µmol/kg cladribine or 100 µmol/kg clofarabine diluted in 0.2 ml of water.

2.4 | Samples

Blood samples were obtained from the tail of each mouse before (control) and every 8 hr after treatment with cladribine or clofarabine for 72 hr. The sampling times were established according to our previous studies (Morales-Ramirez *et al.*, 2017).

2.5 | Sample fixing, labeling, and analysis

The reticulocyte (RET) and micronucleated (MN)-RET scoring of the blood samples was conducted using a cytometry method (Dertinger *et al.*, 1996) according to the instruction for the MicroFlowPLUS kit (mouse peripheral blood from Litron Laboratories [Rochester, NY] available at https://litronlabs.com/getattachment/8023ae66-688f-4c3b-bec2-c73f424c7e21/Instruction-Manual_MicroFlow-PLUS-Mouse-Blood.aspx). The blood samples were fixed, labeled and analyzed according to previously reported methods (Cervantes-Rios *et al.*, 2012) and modified for the low volume blood samples obtained from the mice. Samples of 30 µl of blood were obtained from the tail of each animal and mixed with 30 µl of sodium heparin. These samples were then diluted 1:2 with sodium BBS at pH 7.5 (0.9 g of NaCl and 0.0444 g of NaHCO₃ diluted in 100 ml of distilled water), of which a 100 µl sample was fixed in a cryotube with 2 ml of methanol at –75°C by rapid vortex mixing. To improve the efficiency and reproducibility of the fixation procedure, a 1.5 ml Eppendorf tube was cut at the extreme end and used as a guide for the micropipette tip used for transferring the sample into the 4.5 ml fixation tube. This precision allowed the sample to be deposited in the center of the fixation tube within a short distance of the vortex produced by an electric mixer in –75°C methanol. The use of this dispositive method enabled the correct fixation of 100% of the samples and an analysis of 90% of the cells with minimal number of cell aggregates (Cruz-Vallejo *et al.*, 2019). The fixed samples were immediately stored at –75°C until labeling and staining for analysis.

One milliliter of the fixed sample was mixed with 7 ml of cold BBS and centrifuged at 600g at 4°C for 5 min. The pellet was resuspended in 25 µl of BBS and mixed with 80 µl of ribonuclease A in a polystyrene tube. Three types of tubes were prepared: (a) autofluorescence reagent containing 25 µl of the sample; (b) control CD71-sample fluorescence reagent containing 25 µl of the sample and 5 µl of anti-CD71-FITC, which allowed us to distinguish the RETs; and (c) samples containing 25 µl of sample with 5 µl of anti-CD71-FITC. The tubes were incubated at 4°C for 40 min and then at 22°C for 90 min. Finally, 500 µl of cold BBS was added to each tube, and the tubes were maintained in the dark at 4°C until analysis.

Two microliters of propidium iodide (820 µg/ml in cold BBS) was added to the (c) sample tubes 15 min before the cells were scored with a cytometer. In a FACSCalibur instrument (Becton Dickinson) with Cell Quest software (Becton Dickinson, version 3.0.1), one million events were scored using an argon laser set at a 488 nm excitation wavelength at low speed. For all animals, at least 4,000 RETs were scored according to the Guidelines from the OCDE (OECD/OCDE (2016), OECD Guideline for the testing of chemicals. Mammalian erythrocyte micronucleus test. TG 474). The emissions from the anti-CD71-FITC and propidium iodide stains were detected in Channels FL1 and FL2, respectively. The regions with RET and erythrocytes with and without treatment were discerned according to Cervantes-Rios *et al.* (2012). The data were analyzed with WinMDI software version 2.9 (Joseph Trotter, trotter@scripps.edu).

2.6 | Genotoxicity

The genotoxicity caused by each treatment was established by the area beneath the curve (ABC) of the MN-RET frequency versus time, and the genotoxic efficiency was the ABC value per dose in units of $\mu\text{mol}/\text{kg}$ of bd wt.

2.7 | Cytotoxicity

Cytotoxicity was determined as the reduction in the frequency of RETs versus time by calculating the reduction in the ABC of the RET number versus time. The total ABC was estimated assuming that the basal RET frequency was near constant over time.

2.8 | Statistics

Samples obtained prior to treatment were used as the basal frequency for each animal and used in statistical comparisons with values for each posttreatment time. We determined the data as parametric using the Shapiro-Wilk test. The differences at the posttreatment times were established by comparing the obtained value with the baseline value of the corresponding individual, and the significance was determined with a paired *t* test, and $p < .05$ indicated statistical significance.

3 | RESULTS

Figure 1 shows the MN-RET induction and cytotoxicity increase curves in terms of the reduction in the percentage of RETs as a function of time after mice were treated with 100 μmol of clofarabine or 190 μmol of clofarabine per kilogram of weight. Cladribine and clofarabine induced an increase in the MN-RETs from 16 to 64 hr; although the increases were significant only for between 24 and 56 hr. The ABC values for clofarabine indicated an almost twofold enhanced induction with approximately one-half the dose of cladribine; that is, clofarabine was fourfold more genotoxic than cladribine. Regarding cytotoxicity, cladribine showed increased cytotoxicity from 8 to 64 h, and the increase from 8 to 48 hr was significant. In the case of clofarabine, an increase was observed from 8 to 64 hr but was significant only between 8 and 56 hr. In this case, the cytotoxicity of clofarabine was approximately 40% higher than that of cladribine. The profiles of the genotoxicity and cytotoxicity curves were similar, with the exception of the 8 and 16 hr time points, which showed significantly greater cytotoxicity, while the genotoxicity is minimal.

Figure 2 shows comparisons of the profiles of the induction curves with cladribine and clofarabine with those obtained previously after exposure to azacytidine and difluorodeoxycytidine (Morales-Ramírez et al., 2008; 2017). The profile of difluorodeoxycytidine has a simple, bell shape showing the MN-RET induction from 24 to 48, that

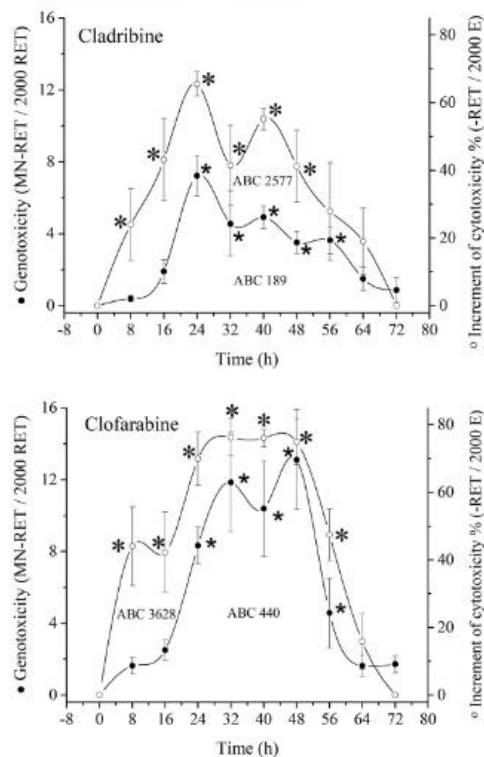


FIGURE 1 Overlapping curves of genotoxicity and cytotoxicity show the correlation of these parameters over time. The points represent the average response, and the bars represent the standard error of the responses of the animals treated with cladribine 190 or clofarabine at 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$. The cytotoxicity is plotted as an increase in cytotoxicity and reduction in reticulocyte (RET) per 2,000 E (%). The area beneath the curve (ABC) values are also displayed for both parameters. The asterisks indicate points that were statistically significant with respect to the frequency before treatment (paired *t* test, $p < .05$)

is, for only approximately 24 hr. Azacytidine has a complex profile, with induction shown beginning at 24 hr and continuing through 72 hr, that is, for more than 48 hr. The profiles of cladribine and clofarabine are also complex and, as described, show MN-RET induction lasting 48 hr.

4 | DISCUSSION

The induction of MN-RET in mouse normoblasts by chemical agents *in vivo* is a complex biological process that can be divided into at least three stages: (a) pharmacokinetics, from the time of administration to when it reaches the target organ; (b) cellular processes, comprising

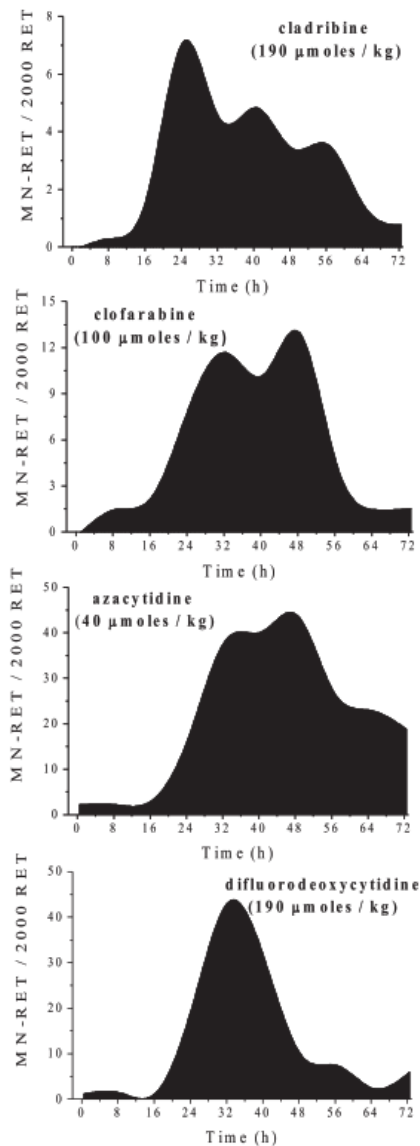


FIGURE 2 Comparison of the profiles of the micronucleated reticulocytes (MN-RETs) induction curves with respect to time for cladribine and clofarabine with those of the curves obtained by exposure to azacytidine (Morales-Ramirez *et al.*, 2008) and difluorodeoxycytidine (Morales-Ramirez *et al.*, 2017)

the interaction of the agent with the cell, the production of breaks in the DNA and the formation of MN normoblasts; and (c) the expression stage, in which the DNA ruptures produces micronuclei in RETs and includes the cell differentiation of the normoblasts into erythrocytes after enucleation and the appearance of RETs in peripheral blood.

The pharmacokinetic stage in the case of nucleotide derivatives and other agents does not appear to have a significant effect on the time of MN-RET induction, with the exception of agents that require metabolic activation in the liver (Morales-Ramirez *et al.*, 2014). Similarly, the duration of the expression stage may be variable, but there is no evidence that it depends on the effect of the mutagens. Therefore, the differences in the temporal expression of micronuclei depend on the processes involved in the production of aneuploidy or breaks in the DNA. This timing can be explained in terms of the stage of the cell cycle at which the agent can act to cause DNA rupture or aneuploidy. The marrow continuously produces erythrocytes; therefore, there are normoblasts at different stages of the cell cycle. That is, the normoblasts that are currently undergoing mitosis are sensitive to aneugens and will produce isolated chromosomes and, subsequently, micronuclei in this mitosis (Morales-Ramirez *et al.*, 2004b). For example, if an agent must be incorporated into DNA to inhibit a polymerase (Morales-Ramirez *et al.*, 2017), its effect will occur in the synthesis stage; however, the cell must resume and complete synthesis, enter into the G2 stage and undergo mitosis for MN-RET to be observed.

Regarding the duration and shape of the kinetic curves, we have observed very simple bell-shaped kinetics with a duration of approximately 24 hr (Morales-Ramirez *et al.*, 2017) or complex irregularly shaped kinetic curves, such as that of azacytidine, with a long-term effect, more than 48 hr (Morales-Ramirez *et al.*, 2008). The azacytidine profile is attributed to its complex action that subsequently generates a mega adduct complexes (Santi *et al.*, 1984), and induces breaks during DNA repair (Hegde *et al.*, 1996), demethylation (Jones and Taylor, 1980), and chromosomal fragility (Sato *et al.*, 2004).

The complex and prolonged kinetic responses obtained with cladribine and clofarabine can be attributed to the variety of actions that have been reported for these agents, and although the sequence of their actions can be inferred, the kinetics do not allow unequivocal certainty regarding the response and the mechanisms involved, that is, the initial genotoxkinetics timing of clofarabine seem equivalent to those of dFdC, likely because both agents inhibit DNA polymerase (Huang *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 1991). Furthermore, some mechanisms may not have yet been reported, such as those associated with the early cytotoxicity caused by cladribine or clofarabine (Çelik *et al.*, 2018), which has recently been reported, despite studies on these agents dating back three or four decades. The early cytotoxicity caused by these agents does not require the introduction of the agent into the cell, only their interaction with the CD99 membrane protein, which triggers cell death. Coincidentally, in the present study, early cytotoxicity was observed, almost 16 hr before the genotoxic effect was manifested. Although

there are no reports of the presence of CD99 in normoblasts, it has been found on erythrocytes (Latron et al., 1987).

The complex kinetics caused by azacytidine, cladribine, and clofarabine show the need to deepen the knowledge of the phenomena triggered by these treatments in vivo through strategies that include molecular methods. The knowledge thereby generated can improve therapeutic protocols and be used to explain or predict the side effects of antineoplastic agents on healthy cells.

5 | CONCLUSIONS

1. Clofarabine and cladribine have an early cytotoxic effect, not related to their genotoxic effect.
2. The kinetics of genotoxic action caused by cladribine and clofarabine are complex and indicate a prolonged genotoxic effect for a period of 48 hr.
3. The kinetics of the cytotoxic action by cladribine and clofarabine are also complex and indicate cytotoxicity that lasts for 64 hr.
4. The profiles of the genotoxicity and cytotoxicity curves are similar, with the exception of an early and significant increase in cytotoxicity while genotoxicity remains minimal.
5. Clofarabine has more genotoxic and cytotoxic effect than cladribine.
6. The differences in the temporal expression of micronuclei depend on the processes involved during the induction of aneuploidy or DNA breaks.
7. Concomitant genotoxicokinetics and cytotoxicokinetics analyses may be useful as preclinical assays to establish the duration and complexity of the antineoplastic agent response in vivo.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Miguel Angel Garcia Torres and Faustino Antonio Anastacio Montes for their excellent technical assistance. This work was supported by project CB-240116-2014 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT, México) to Dr P. M.-R. and scholarship 302735 for postgraduate studies to J. Q.-V.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All of the authors contributed to the conception and design of the study, the acquisition of data, the analysis and interpretation of data, the drafting of the article, the critical revisions of the article for important intellectual content, and the approval of the version to be published.

ORCID

Rocio Ortiz-Muñiz  <https://orcid.org/0000-0003-2501-2916>

REFERENCES

- Çelik, H., Sciandra, M., Flashner, B., Gelmez, E., Kayraklıoğlu, N., Allegakoen, D.V., Petro, J.R., Conn, E.J., Hour, S., Han, J., Oktay, L., Tiwari, P.B., Hayran, M., Harris, B.T., Manara, M.C., Toretzky, J.A.,

- Scotlandi, K. and Üren, A. (2018) Clofarabine inhibits Ewing sarcoma growth through a novel molecular mechanism involving direct binding to CD99. *Oncogene*, 37, 2181–2196.
- Cervantes-Rios, E., Ortiz-Muniz, R., Martínez-Hernández, A.L., Cabrera-Rojo, L., Graniel-Guerrero, J. and Rodríguez-Cruz, L. (2012) Malnutrition and infection influence the peripheral blood reticulocyte micronuclei frequency in children. *Mutat Res*, 731, 68–74.
- Commission on Life Sciences, Institute of Laboratory Animal Research, National Research Council. (1996). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.
- Cruz-Vallejo, V., Ortiz-Muñiz, R., Vallarino-Kelly, T., Cervantes-Rios, E. and Morales-Ramirez, P. (2019) In vivo characterization of the radiosensitizing effect of a very low dose of BrdU in murine cells exposed to low-dose radiation. *Environ Mol Mutagen*, 60(534), 545.
- Dertinger, S.D., Torous, D.K. and Tometsko, K.R. (1996) Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutat Res*, 371, 283–292.
- Genini, D., Adachi, S., Chao, Q., Rose, D.W., Carrera, C.J., Cottam, H.B., Carson, D.A. and Leoni, L.M. (2000) Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. *Blood*, 96, 3537–3543.
- Hegde, V., McFarlane, R.J., Taylor, E.M. and Price, C. (1996) The genetics of the repair of 5-azacytidine-mediated DNA damage in the fission yeast. *Mol Gen Genet*, 251, 483–492.
- Hentosh, P. and Peffley, D.M. (2010) The cladribine conundrum: deciphering the drug's mechanism of action. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6, 75–81.
- Huang, P., Chubb, S., Hertel, L.W., Grindey, G.B. and Plunkett, W. (1991) Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res*, 51, 6110–6117.
- Jones, P.A. and Taylor, S.M. (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, 20, 85–93.
- Latron, F., Blanchard, D. and Cartron, J.P. (1987) Immunochemical characterization of the human blood cell membrane glycoprotein recognized by the monoclonal antibody 12E7. *Biochem*, 247, 757–764. <https://doi.org/10.1042/bj2470757>.
- Lotfi, K., Mansson, E., Spasokoukotskaja, T., Pettersson, B., Lillemark, J., Peterson, C., Eriksson, S. and Albertoni, F. (1999) Biochemical pharmacology and resistance to 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine, a novel analogue of cladribine in human leukemic cells. *Clin Cancer Res*, 5, 2438–2444.
- Morales-Ramirez, P., Vallarino-Kelly, T., Cruz-Vallejo, V.L., López-Iturbe, R. and Alvaro-Delgado, H. (2004a) In vivo kinetics of micronuclei induction by bifunctional alkylating antineoplastics. *Mutagenesis*, 19, 207–213.
- Morales-Ramirez, P., Vallarino-Kelly, T. and Cruz-Vallejo, V.L. (2004b) Kinetics of micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCE) induction in vivo by aneuploidogens. *Mutat Res*, 565, 79–87.
- Morales-Ramirez, P., Vallarino-Kelly, T. and Cruz-Vallejo, V.L. (2008) Mechanisms of DNA breaks induction in vivo by 5-azacytidine: paths of micronucleus induction by azaC. *J Appl Toxicol*, 28, 254–259.
- Morales-Ramirez, P., Vallarino-Kelly, T. and Cruz-Vallejo, V.L. (2014) Kinetics of micronucleus induction and cytotoxicity caused by distinct antineoplastics and alkylating agents in vivo. *Toxicol Lett*, 224, 319–325.
- Morales-Ramirez, P., Vallarino-Kelly, T. and Cruz-Vallejo, V.L. (2017) Genotoxicity kinetics in murine normoblasts as an approach for the in vivo action of difluorodeoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol*, 79, 843–853.
- OECD/OCDE. (2016). OECD Guideline for the testing of chemicals. Mammalian erythrocyte micronucleus test. TG 474.
- Parker, W.B., Shaddix, S.C., Chang, C.H., White, E.L., Rose, L.M., Brockman, R.W., Shortnacy, A.T., Montgomery, J.A., Secrist, J.A., 3rd and Bennett, L.L., Jr. (1991) Effects of 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl) adenine on K562 cellular metabolism and the inhibition of human ribonucleotide reductase and DNA polymerases by its 5'-triphosphate. *Cancer Res*, 51, 2386–2394.

- Santi, D.V., Norment, A. and Garrett, C.E. (1984) Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 6993–6997.
- Sato, T., Yamamoto, K., Miura, K.F. and Sofuni, T. (2004) Region-specific chromatin decondensation and micronucleus formation induced by 5-azacytidine in human TIG-7 cells. *Cytogenet Genome Res*, 104, 289–294.
- Zhang, Y., Shahriar, M., Zhang, J., Ahmed, S.U. and Lim, S.H. (2009) Clofarabine induces hypomethylation of DNA and expression of cancer-testis antigens. *Leukemia Res*, 33, 1678–1683.

How to cite this article: Quezada-Vidal J, Ortiz-Muñiz R, Cervantes-Ríos E, Cruz-Vallejo V, Morales-Ramírez P. In vivo kinetics of the genotoxic and cytotoxic activities of cladribine and clofarabine. *Environ Mol Mutagen*. 2020;1–6. <https://doi.org/10.1002/em.22394>



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 0071
Matrícula: 215380401

Aproximación a la genotomicodinámica de antimetabólitos antineoplásicos análogos de purina usando como referente la acción de la radiación ionizante ¹³⁷Cs.



JESUS QUEZADA VIDAL
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DR. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DR. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑOZ

VOCAL

DR. ELSA CERVANTES RIOS

VOCAL

DR. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

VOCAL

DR. MARIA DEL CARMEN GARCIA RODRIGUEZ

SECRETARIO

DR. PEDRO ROSENDO MORALES RAMIREZ

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 11:00 horas del día 28 del mes de agosto del año 2020 POR VÍA BENEFICIA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del Jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- MTRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑOZ
- MTRA. ELSA CERVANTES RIOS
- DR. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
- MTRA. MARIA DEL CARMEN GARCIA RODRIGUEZ
- DR. PEDRO ROSENDO MORALES RAMIREZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: JESUS QUEZADA VIDAL

y de acuerdo con el artículo 7º fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue firmada la protesta.

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella