

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 706**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2016 PCT/EP2016/055524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16146620**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2016 E 16713751 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3271722**

54 Título: **Métodos para detectar cancerígenos no genotóxicos usando platelmintos**

30 Prioridad:

16.03.2015 EP 15159158

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.12.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (50.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE y
UNIVERSITEIT HASSELT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SMEETS, KAREN;
STEVENS, AN-SOFIE;
PLUSQUIN, MICHELLE;
ARTOIS, TOM;
WILLEMS, MAXIME y
REMON, JEAN PAUL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 734 706 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para detectar cancerígenos no genotóxicos usando platelmintos

5 Campo técnico de invención

La presente invención se refiere a predecir la carcinogenicidad de compuestos. Más particularmente, la presente invención divulga métodos para detectar o predecir si un compuesto es un cancerígeno no genotóxico y métodos para diferenciar entre cancerígenos genotóxicos y no genotóxicos que se basan en patrones *in vivo* de proliferación de células madre en platelmintos.

Técnica anterior

Una evaluación correcta de los riesgos de cáncer que se asocian con exposiciones humanas a químicos resulta de gran importancia tanto desde el punto de vista tanto de la salud pública como de la economía. A este respecto, los ensayos precisos y confiables que estiman la potencia cancerígena de compuestos resultan indispensables. El ensayo biológico de carcinogenicidad de 2 años en roedores constituye el estándar de excelencia para evaluaciones cancerígenas de medicamentos desarrollados recientemente y otros compuestos químicos, pero los altos costes, períodos experimentales prolongados y las políticas europeas (REACH) y de US (Ley de Autorización del ICCVAM) promueven la búsqueda de ensayos alternativos (1-5). De manera adicional, debido al incremento de cuestiones éticas en cuanto al uso de animales en procedimientos científicos, organizaciones como EURL ECVAM (Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para la Validación de Métodos Alternativos) e ICCVAM (Comité de Coordinación Interinstitucional sobre la Validación de Métodos Alternativos) han demostrado validar enfoques alternativos de acuerdo con el Principio de las 3Rs (Reemplazar, Reducir y Refinar) que incluye el uso de organismos con sensibilidad limitada tales como invertebrados.

Un desafío para el desarrollo de métodos de ensayo alternativos se refiere a que, además de una estimación de carcinogenicidad adecuada, los compuestos necesitan clasificarse de acuerdo con su presunto mecanismo de acción predominante en cancerígenos genotóxicos y no genotóxicos, lo que implica diferentes evaluaciones de riesgo de cáncer para la salud humana. Los cancerígenos genotóxicos alteran la integridad genómica de manera directa al interactuar con el ADN y/o el aparato celular, y se supone que tienen una linealidad de dosis baja sin umbrales de dosis en sus efectos cancerígenos. Los cancerígenos no genotóxicos alteran la expresión génica de manera indirecta y promueven el crecimiento tumoral al interferir con una variedad de procesos celulares que se asocian con apoptosis suprimida y proliferación celular aumentada (6-8). Una dificultad importante para distinguir estas clases de cancerígenos consiste en la comparación de condiciones de exposición, debido a que múltiples vías de señalización se desregularizan durante carcinogénesis no genotóxica, según la cual los efectos cancerígenos solo ocurren si se alcanza una cierta dosis umbral (7-10). La comprensión y predicción de cancerígenos no genotóxicos se complica sustancialmente por sus mecanismos de acción de compuesto específico (7, 10).

Los presentes ensayos *in vitro* e *in vivo* a corto plazo alternativos identifican la mayoría de cancerígenos genotóxicos, a pesar de que se necesitan todavía mejoras en la capacidad predictiva para reducir falsos positivos y resultados negativos. Los ensayos *in vitro* estándares para la detección de compuestos genotóxicos producen hasta el 70% y más de resultados positivos irrelevantes, que requieren pruebas de seguimiento *in vitro* e *in-vivo* costosas y prolongadas. Otra desventaja de estos ensayos consiste en la sensibilidad y confiabilidad para detectar cancerígenos no genotóxicos, que representan hasta el 25% de cancerígenos Clase I para la salud humana de acuerdo con el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) (3, 5, 7, 11-13). Se necesita una mejor comprensión de eventos celulares y moleculares que se involucran en carcinogénesis no genotóxica y dada la capacidad de extensión y complejidad de estos procesos, los métodos de detección *in vitro* pueden no resultar suficientemente sofisticados para cubrir la respuesta de carcinogenicidad completa.

Los platelmintos son organismos prometedores para predecir exámenes de carcinogenicidad/genotoxicidad por las siguientes razones: (1) Su notable capacidad de regeneración, reconstituyendo partes faltantes del cuerpo en aproximadamente 1 semana, lo que permite el estudio de respuestas inducidas por cancerígenos durante la regeneración de múltiples tejidos (14, 15). Debido a que la masiva proliferación celular constituye un prerrequisito para tanto la regeneración como la carcinogénesis, la respuesta celular del organismo a exposiciones a cancerígenos se acelera durante el proceso de regeneración (16-18). (2) Sus células madres accesibles experimentalmente permiten estudios *in vivo* de respuestas inducidas por cancerígenos de células madre pluripotentes, adultas en todo el animal. (3) Las características principales de carcinogénesis inducida químicamente, a saber, la etapa de inicio y promoción de formación neoplásica se describen en platelmintos y se han identificado varios genes relacionados con cáncer y vías de señalización subyacentes, por ejemplo, PTEN, FOXO, caspasas, ciclinas, vía (PI3K)-Akt, vía RAS, vía p53, vía MAPK (19-24).

Kokel et al. (Nature Chemical Biology, 2006: 338-345) divulga el uso del nematodo *C.elegans* para examinar los compuestos cancerígenos no genotóxicos.

65

Plusquin et al. (Int. J. Dev. Biol. 2012: 183-191) divulga el uso de planaria *Schmidtea mediterranea* para estudiar el efecto del cadmio metálico cancerígeno. La búsqueda en internet de "URL: <http://www.researchportal.be/en/project/-%28UH-R-2902%29/> (Validation and valorization of the flatworms as model system in primary toxicity screenings) (31 de diciembre de 2014)" divulga el uso de los platelmintos *Schmidtea mediterranea* y *Macrostomum lignano* como organismos modelo para exámenes de toxicidad de "primera línea".

Stalmans et al. (25) divulga además un ensayo biológico *in vivo* de carcinogenicidad en platelmintos, en el que la proliferación de células madre se usa como un punto final para evaluar el potencial cancerígeno de compuestos. Sin embargo, se desconoce por completo si los platelmintos pueden usarse para detectar si un compuesto es un cancerígeno no genotóxico y/o si los platelmintos pueden usarse para distinguir cancerígenos no genotóxicos a partir de cancerígenos genotóxicos.

Breve descripción de figuras

Figura 1. A) Imagen de contraste por interferencia de *Macrostomum lignano* adulto; br: cerebro, ey: ojos, gu: intestino; ov: ovario; te: testículos, tp: cola. B) y C) imagen de contraste por interferencia y proyección confocal correspondiente de *M. lignano* etiquetado con un anticuerpo anti-histona H3 fosforilada. Las células en mitosis (señal blanca) se cuentan (marcadas con X). Las células mitóticas en los ensayos (contorno pseudocoloreado en azul) no son parte del análisis. Anterior se encuentra hacia la parte superior. Barra de escala: 50 μ m

Figura 2. Diagramas de caja que representan la media e IQR del número de células madre mitóticas en controles de agua de mar (SW; n= 12) y disolvente (DMSO; n=6) para todos los experimentos que se usan para determinar el valor límite para el criterio de validación. La línea discontinua representa el valor límite de nuestro ensayo.

Figura 3. Diagramas de caja que representan la media e IQR del número de células madre mitóticas en función de la concentración de D-manitol y Sulfisoxazole (Sox) no cancerígenos; cancerígenos genotóxicos 4-Nitroquinolina 1-óxido y ciclofosfamida monohidrato; cancerígenos no genotóxicos Dietilestilbestrol y Ciclosporina A. Controles de Agua de mar (SW) y DMSO se diagraman también. Todo se ilustra por un experimento. La línea discontinua representa el valor límite de nuestro ensayo.

Figura 4. Perfil de tiempo de respuestas de proliferación de células madre como respuesta a exposiciones a cancerígenos. Divisiones mitóticas por mm^2 después de exposición de 1 día, 3 días, 1 semana y dos semanas a un genotóxico (MMS), no genotóxico (CsA) y no cancerígeno (Dmann). Las divisiones mitóticas después de exposición de 6 semanas a MMS y CsA se representan también. El número de células mitóticas se normalizó con respecto al área corporal total de los gusanos y se expresó con respecto al grupo de control de MMS, CsA y Dmann correspondiente por punto de tiempo, medio de cultivo correspondiente, medio de cultivo con DMSO al 0,05% (control de vehículo) y medio de cultivo. Los valores promedio de proliferación celular en cada punto de tiempo se conectan mediante líneas, mediciones individuales también se representan (≥ 3 por punto de tiempo). Los efectos significativos se indican en la tabla: * $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$. El promedio y se de grupos de control de MMS son: 172,0 \pm 21,9 células/ mm^2 (1 día); 368,6 \pm 37,4 células/ mm^2 (3 días); 347,5 \pm 8,9 células/ mm^2 (1 semana); 83,8 \pm 26,0 células/ mm^2 (2 semanas); 80,3 \pm 9,7 células/ mm^2 (6 semanas). El promedio y se de grupos de control de CsA son: 344,1 \pm 42,5 células/ mm^2 (1 día); 328,3 \pm 46,6 células/ mm^2 (3 días); 288,8 \pm 17,7 células/ mm^2 (1 semana); 180,9 \pm 15,8 células/ mm^2 (2 semanas); 74,9 \pm 11,6 células/ mm^2 (6 semanas). El promedio y se de grupos de control de Dmann son: 352,5 \pm 42,2 células/ mm^2 (1 día); 317,7 \pm 26,9 células/ mm^2 (3 días); 260,6 \pm 44,0 células/ mm^2 (1 semana); 135,9 \pm 15,6 células/ mm^2 (2 semanas). MMS metanosulfonato de metilo, CsA ciclosporina A, Dmann d-manitol.

Figura 5. Comparación de respuestas de proliferación de células madre después de exposición de 1 día y 3 días. Las divisiones mitóticas por mm^2 después de exposición de 1 día y 3 días a cancerígenos genotóxicos (MMS, 4NQO), cancerígenos no genotóxicos (CsA, S-PB) y no cancerígenos (Dmann). El número de células mitóticas se normalizó con respecto al área corporal total de los gusanos y se expresó con respecto al grupo de control de MMS, 4NQO, CsA, S-PB y Dmann correspondiente por punto de tiempo, que constituyó el medio de cultivo para todos los compuestos a excepción de CsA, que se expuso a medio de cultivo con DMSO al 0,05% (control de vehículo). Los valores de proliferación celular promedio de cada concentración se conectan mediante líneas y constituyen el promedio y se de 3 repeticiones biológicas como mínimo. Efectos significativos se indican en la tabla: * $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$. El promedio y se de grupos de control de MMS son: 172,0 \pm 21,9 células/ mm^2 (1 día); 368,6 \pm 37,4 células/ mm^2 (3 días). El promedio y se de grupos de control de 4NQO son: 293,5 \pm 21,6 células/ mm^2 (1 día); 452,7 \pm 30,3 células/ mm^2 (3 días). El promedio y se de grupos de control de CsA son: 344,1 \pm 42,5 células/ mm^2 (1 día); 328,3 \pm 46,6 células/ mm^2 (3 días). El promedio y se de grupos de control de S-PB son: 289,6 \pm 41,1 células/ mm^2 (1 día); 424,5 \pm 10,9 células/ mm^2 (3 días). El promedio y se de grupos de control de Dmann son: 352,5 \pm 42,2 células/ mm^2 (1 día); 317,7 \pm 26,9 células/ mm^2 (3 días). MMS metanosulfonato de metilo, 4NQO 4-nitroquinolina-1-óxido, CsA ciclosporina A, S-PB fenobarbital sódico, Dmann D-manitol.

Figura 6. Respuestas de actividad de células madre en la aparición de efectos fenotípicos. Las respuestas de proliferación de células madre en la aparición de efectos fenotípicos (concentraciones de categoría 2) a continuación de exposiciones a cancerígenos genotóxicos (MMS, 4NQO) y no genotóxicos (S-PB, CPZ, MPH). El número de

células mitóticas se normalizó con respecto al área corporal total de los gusanos y se expresó con respecto al grupo no expuesto correspondiente. Los valores que se indican en los gráficos constituyen el promedio \pm se de 3 repeticiones biológicas como mínimo, a excepción de S-PB y CPZ, debido a lisis severas de los animales. Los efectos significativos según se comparan con el grupo de control correspondiente se indican con las estrellas: ***: $p < 0,01$; **: $p < 0,05$. Los tiempos de exposición fueron 3 días (MMS), 1 semana (4NQO) y dos semanas (S-PB, CPZ, MPH). El promedio y se de grupos que se expusieron a medio de cultivo son: $227,7 \pm 26,7$ células/mm² (3 días); $212,0 \pm 4,7$ células/mm² (1 semana); $130,9 \pm 10,2$ células/mm² (2 semanas). MMS metanosulfonato de metilo, 4NQO 4-nitroquinolina-1-óxido, S-PB fenobarbital sódico, CPZ clorhidrato de clorpromazina, MPH clorhidrato de metapirileno.

Descripción de invención

La presente invención divulga métodos para predecir o detectar si un compuesto es un cancerígeno no genotóxico y métodos para diferenciar entre cancerígenos genotóxicos y no genotóxicos que se basan en patrones *in vivo* de proliferación de células madre en platelmintos. Por lo tanto, resulta claro que los métodos de la presente invención pueden usarse además para predecir o detectar si un compuesto es un cancerígeno genotóxico.

Una primera realización de la invención se refiere a un método *in vivo* para predecir si un compuesto es un cancerígeno no genotóxico que comprende:

- exponer dicho compuesto a platelmintos durante un período de tiempo,
- contar el número de células madre pluripotentes adultas en dicho platelmintos después de exposición a dicho compuesto, y
- comparar el último número con un valor límite de referencia,

en la que dicho compuesto resulta un cancerígeno no genotóxico cuando dicho número de células madre pluripotentes adultas resulta mayor que dicho valor límite.

El término “compuesto” se refiere a cualquier compuesto que podría ser cancerígeno. Ejemplos no limitantes son los cancerígenos genotóxicos metanosulfonato de metilo (MMS; Cas # 66-27-3; pureza del 99%), ciclofosfamida monohidrato (CP, Cas # 6055-19-2) y 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO, Cas # 56-57-5), los cancerígenos no genotóxicos, dietilestilbestrol (DES, Cas # 56-53-1), clorhidrato de metapirileno (MPH; 135-23-9; estándar analítico), ciclosporina A (CsA; Cas # 59865-13-3; pureza \geq al 98.5%), clorpromazina (CPZ; Cas # 69-09-0; pureza \geq al 98%) y fenobarbital sódico (S-PB; Cas # 57-30-7) y los no cancerígenos d-manitol (Dmann, Cas # 69-65-8) y sulfisoxazole (Sox, Cas # 127-69-5). Los “compuestos” pueden seleccionarse sobre la base de datos *in vitro* e *in vivo* disponibles que se informan en el documento OECD DRP31 (26), clasificaciones de IARC y las publicaciones de Kirkland et al. (13, 27) y Robinson and MacDonald (28). Sobre la base de estas publicaciones puede hacerse una distinción entre cancerígenos genotóxicos, cancerígenos no genotóxicos y no cancerígenos. Un “cancerígeno” se define como cualquier químico del cual el potencial cancerígeno se ha demostrado claramente en un ensayo biológico de 2 años en roedores. Un “cancerígeno genotóxico” debe haber demostrado ser positivo en ensayos de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* clásicos. CP y 4NQO son ejemplos no limitantes de cancerígenos no genotóxicos (a saber, requieren metabolización) y genotóxicos, respectivamente. Un “cancerígeno no genotóxico” consiste en cualquier químico del cual un mecanismo no reactivo de ADN resulta la causa principal de los efectos cancerígenos que se observan en mamíferos y humanos. DES y CA constituyen ejemplos no limitantes de cancerígenos no genotóxicos. Un compuesto que resulta negativo en los ensayos de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* estándares y que carece de potencial cancerígeno en los ensayos biológicos de 2 años en ratones y ratas se considera “no cancerígeno” Dmann y Sox son ejemplos no limitantes de no cancerígenos.

Los términos “exponer dichos compuestos a platelmintos” se refieren a cualquier método que se conoce por una persona experta que permite el contacto entre el compuesto para evaluar y los platelmintos. Un ejemplo no limitante de un procedimiento de “exponer dichos compuestos a platelmintos” resulta el siguiente:

una semana antes de iniciar la exposición química, una placa de 6 pozos que se rellena con 4 ml de medio f/2 (Novolab NV) se inocula con diatomeas para alcanzar una fuente de alimentos *ad libitum* durante exposición. La inanición de los gusanos conduce a una reducción de la proliferación de células madre (según se muestra en Nimeth et al (29)) que interferiría con la proliferación de células madre, el punto final del ensayo. Antes de iniciar la exposición quince gusanos adultos por condición se pipetea en cada pozo que luego se vacía mediante pipeteo sin secar los gusanos y se rellena con medio f/2 (control), si se requiere, F2 + DMSO al 0,05% (control de vehículo) y una concentración seleccionada del químico.

La concentración de DMSO en el control de vehículo no debería exceder el 0,05% con el fin de poder observar de manera confiable cualquiera de los efectos de comportamiento o tóxicos de los compuestos en estos animales (30-32).

Para seleccionar la concentración de compuesto apropiada, en primer lugar se puede llevar a cabo un experimento de detección de rango de concentración amplio (factor de separación 10, exposición de 2 semanas). Sobre la base de esta detección de rango piloto se puede elegir una detección de rango afinado (factor de separación ≤ 2 ; para D-manitol, factor 5) para conducir el ensayo. La concentración máxima que se evalúa depende de la solubilidad del compuesto del ensayo y el requisito de una supervivencia de 12/15 gusanos al final de la exposición.

El medio puede renovarse semanalmente.

El término "platelminto" se refiere a invertebrados bilaterales, no segmentados, de cuerpo blando, relativamente simples que corresponden al filo Platyhelminthes. Ejemplos no limitantes son las especies de platelmintos *Macrostomum lignano* y *Schmidtea mediterranea*.

El término "un período de tiempo" con respecto a esta primera realización se refiere a diferentes tiempos de exposición que varía de 1 día a 6 semanas y se refiere específicamente a un período de tiempo de aproximadamente 2 semanas (a saber, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 días).

Por lo tanto, y más específicamente, la presente invención se refiere además a un método *in vivo* según se indica anteriormente en la que dicho período de tiempo es de 2 semanas.

Los términos "células madre pluripotentes adultas (APSC)" se refieren a células no diferenciadas en un organismo adulto que se dividen para dar lugar a otra célula madre y que pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula.

Los términos "un valor límite de referencia" con respecto a esta primera realización se refiere a un valor específico que se usa como un valor de referencia con el fin de decidir de manera concluyente si un compuesto para evaluarse es un cancerígeno no genotóxico o genotóxico o con el fin de decidir de manera concluyente si un compuesto para evaluarse es un no cancerígeno. El valor límite puede determinarse sobre la base de diagramas de densidad (versión R 2.15.3; (33)) del número de células madre mitóticas de todos los experimentos para control (tal como agua de mar & DMSO), no cancerígenos, cancerígenos genotóxicos y cancerígenos no genotóxicos.

Los términos "mayor que dicho valor límite" con respecto a esta primera realización se refieren a que el número de células madre mitóticas excede el valor límite.

Un compuesto puede considerarse positivo si se cumplen los siguientes criterios: 1) un mínimo del 20% de los gusanos por concentración debe tener un número de células madre mitóticas \geq al valor límite de 30. Treinta (30) pueden yacer en la cola de la distribución que corresponde al 97,5 percentil o 2 desviaciones estándar. Las concentraciones que dan como resultado la muerte del 20% de los gusanos (3/15) durante exposición pueden considerarse citotóxicas y no deberían analizarse. Los siguientes criterios pueden configurarse para un ensayo exitoso: 1) 3 experimentos independientes como mínimo, 2) el número de células madre mitóticas de 2 concentraciones químicas subsiguientes debería proporcionarse, 3) el número de células madre mitóticas de 5 gusanos como mínimo por concentración debería cuantificarse y finalmente 4) un máximo de 2 gusanos de control individuales (por ejemplo agua de mar & DMSO) con un número de células madre mitóticas \geq al valor límite de 30.

Por lo tanto, un compuesto puede considerarse positivo si se cumplen los siguientes criterios: 1) un mínimo del 20% de los gusanos por concentración debería tener un número de células madre mitóticas \geq al valor límite de 30 (calificado como "+") y 2) al menos 2/3 de los experimentos deberían haber recibido una calificación "+" para el compuesto para tener una llamada final general "+". En el futuro, 2 experimentos resultarían suficientes para determinar la llamada final, un tercer experimento se requeriría cuando el número de "+" y "-" resultan iguales. Los diagramas pueden generarse usando el paquete R de software según se describe anteriormente.

Por lo tanto, resulta claro que los métodos según se describen en detalle en los Ejemplos, o cualquier otro método para contar el número de células madre o para evaluar los patrones de proliferación de células madre tales como hibridación *in situ* (fluorescente), inmunoetiquetado, tinción con bromodesoxiuridina, líneas transgénicas, ... pueden usarse para predecir o detectar si un compuesto es un cancerígeno genotóxico. Los últimos métodos para contar el número de células madre o para evaluar los patrones de proliferación de células madre se describen, por ejemplo, en: 1) Nimeth K. et al., Regeneration in *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes): cellular dynamics in the neoblast stem cell system. *Cell Tissue Res* (2007) 327:637-646; 2) Pearson B. et al., A Formaldehydebased Whole-Mount *In Situ* Hybridization Method for Planarians. *Dev Dyn.* (2009) 238(2): 443-450; y 3) King R., Newmark P. *In situ* hybridization protocol for enhanced detection of gene expression in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *BMC Developmental Biology* (2013) 13:8.

Una segunda realización de la invención se refiere a un método *in vivo* para detectar si un compuesto es un cancerígeno no genotóxico y/o para distinguir un cancerígeno no genotóxico a partir de un cancerígeno genotóxico que comprende:

– exponer dicho compuesto o dicho cancerígeno no genotóxico y cancerígeno genotóxico durante un período de tiempo a concentraciones que activan efectos fenotípicos a platelmintos de regeneración,

– contar el número de células madre pluripotentes adultas en dichos platelmintos de regeneración después de exposición, y

5 – comparar el último número con el número que se obtiene mediante una exposición similar a un compuesto no cancerígeno, de control,

en la que un compuesto resulta un compuesto cancerígeno no genotóxico cuando el número de células madre adultas al momento de aparición de efectos sistémicos resulta similar al número de células madre adultas cuando se usa dicho compuesto no cancerígeno, de control, y

en la que un compuesto resulta un compuesto cancerígeno no genotóxico cuando el número de células madre adultas al momento de aparición de efectos sistémicos resulta significativamente menor con respecto al número de células madre adultas cuando se usa dicho compuesto no cancerígeno, control.

Los términos “exponer dicho compuesto o dicho cancerígeno no genotóxico y cancerígeno genotóxico durante un período de tiempo a concentraciones que activan efectos fenotípicos a platelmintos de regeneración” se refieren principalmente a que el método que se describe se lleva a cabo con animales de regeneración (cabezas y colas) con el fin de obtener respuestas iniciales aceleradas a compuestos cancerígenos ya que este proceso de proliferación celular masiva, migración y diferenciación se asemeja de la mejor manera al proceso de carcinogénesis (16, 32). Dichos términos indican además que los platelmintos pueden dejar de alimentarse por una semana antes de las mediciones. En cada condición experimental, por ejemplo, 4 animales de regeneración, que se cortan transversalmente de manera inmediata antes de la exposición, pueden colocarse en placas de 6 pozos que contienen por ejemplo 4 ml de una concentración de cancerígeno/compuesto, medio (control) o medio con DMSO al 0,05% (control de vehículo). Para excluir efectos intrínsecos de DMSO en la proliferación celular, la concentración de vehículo DMSO no debería exceder nunca el 0,05% y los efectos de interacción entre el compuesto de ensayo y DMSO pueden investigarse usando un ANOVA de dos vías (32). Después de la comparación de exposiciones continuas versus intermitentes y renovación de medio única versus dos veces por semana, puede encontrarse que una exposición continua con renovación de medio dos veces por semana resulta la más adecuada para obtener respuestas celulares distintivas.

El término “platelminto de regeneración” se refiere a que los platelmintos tienen la capacidad de reemplazar grandes regiones de estructuras faltantes a través de la regeneración. Cuando un animal se corta artificialmente, el proceso de regeneración se inicia (regeneración de partida) y termina (dependiendo del tamaño de la pieza faltante) después de aproximadamente 1 a 2 semanas lo que depende del sitio de amputación (34).

Los términos “una exposición similar a un compuesto no cancerígeno, de control” se refiere a que la configuración experimental de exposición fue la misma con respecto al esquema de tratamiento para el compuesto cancerígeno. Debería estar claro que una alternativa para “en comparación con una exposición similar a un compuesto no cancerígeno, de control” puede ser “en comparación con el número de células madre pluripotentes adultas de un platelminto no expuesto, de control o en comparación con el número de células madre pluripotentes adultas de un platelminto de control que se expone a medio en el que no se agrega un compuesto de control (expuestos de manera simulada)”.

Los efectos fenotípicos que pueden monitorearse diariamente después de la exposición durante un cierto período de tiempo (a saber, después de 3 a aproximadamente 14 días) incluyen regresión de tejido (= áreas del cuerpo de gusanos en las que el tejido desaparece sin la aparición de heridas), lesiones (= áreas del cuerpo de gusanos en las que el tejido desaparece y aparecen heridas), ampollas (= pequeñas bolsas de fluidos en la capa de piel de los gusanos), hinchazón (= inflamación anormal del cuerpo de gusanos), pigmentación (= áreas con un aumento de pigmentación visual), cambios de comportamiento tales como movimientos espasmódicos u enrollamientos alrededor de su superficie ventral, dificultades de regeneración, tamaño corporal anormal, excrecencia de tejido, postura plana y muerte (35).

Por lo tanto, y más en particular, la presente invención se refiere a un método *in vivo* según se describe anteriormente en el que dichos efectos fenotípicos constituyen manchas de pigmentación aberrantes, regresión de tejido, lesiones, ampollas, hinchazón, cambios de comportamiento, dificultades de regeneración, tamaño corporal anormal, excrecencia de tejido y postura plana.

El período de tiempo después del cual dichos efectos fenotípicos se detectan normalmente y que permite distinguir entre compuestos genotóxicos y no genotóxicos resulta variable y puede ser de aproximadamente 3 días (a saber, 2, 3, 4 o 5 días posteriores a la exposición) o puede ser de aproximadamente una semana (a saber, 6, 7, 8 días posteriores a la exposición) o puede ser de aproximadamente 2 semanas (a saber, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 días posteriores a la exposición). Por lo tanto, y más en particular, la presente invención se refiere a un método *in vivo* según se describe anteriormente en la que dicho período de tiempo que activa efectos fenotípicos en platelmintos de regeneración es de entre 3 y 19 días.

Los términos “concentraciones que disparan efectos fenotípicos” se refieren a concentraciones químicas de los compuestos seleccionados según se indican anteriormente con respecto a la primera realización (tal como, por ejemplo, MMS: 500 μ M; 4NQO: 2 μ M, S-PB: 2mM, CPZ: 1 μ M, MPH: 150 μ M) donde podrían observarse efectos fenotípicos (morfológicos, de comportamiento) según se indican anteriormente.

5 Los términos “similar o menor con respecto al número de células madre adultas cuando se usa dicho compuesto no cancerígeno, de control” se refieren a:

10 a) “Similar” se refiere a que el número promedio de células (valor 1) de control/no cancerígeno no difiere con respecto al compuesto no genotóxico específico que se observa (valor 2) ($p > 0,05$); b) “Menor” se refiere a que el número promedio de células después de exposición a un compuesto genotóxico específico resulta significativamente menor ($p < 0,05$) con respecto a, por ejemplo, un valor de control. Los valores P menores que 0,05 se consideran significativos desde el punto de vista estadístico.

15 Una tercera realización de la invención se refiere a un método *in vivo* para predecir si un compuesto es un cancerígeno no genotóxico y/o para distinguir un cancerígeno no genotóxico a partir de un cancerígeno genotóxico que comprende:

- 20 – exponer dicho compuesto o dicho cancerígeno no genotóxico y cancerígeno genotóxico durante al menos 3 días a platelmintos de regeneración,
- contar el número de células madre pluripotentes adultas en dichos platelmintos de regeneración después de exposición, y
- 25 – comparar el último número con el número que se obtiene mediante una exposición similar a un compuesto no cancerígeno, de control,

30 en la que un compuesto resulta un cancerígeno no genotóxico cuando existe aumento que depende de la concentración del número de células madre pluripotentes adultas en el día 3 posterior a la exposición, en la que un compuesto resulta un cancerígeno genotóxico cuando existe reducción que depende de la concentración del número de células madre pluripotentes adultas en el día 3 posterior a la exposición, y, en la que, un compuesto resulta no cancerígeno cuando no existe respuesta que depende de la concentración del número de células madre pluripotentes adultas en el día 3 posterior a la exposición.

35 Una comparación de respuestas proliferativas de células madre de planarias adultas durante las etapas iniciales de regeneración, a saber, después de los días 1 y 3 de exposición, diferencia cancerígenos genotóxicos a partir de no genotóxicos y no cancerígenos. Cancerígenos genotóxicos se caracterizan por cantidad significativamente menor de células mitóticas después de 3 días de exposición en comparación con una configuración de exposición de 1 día, mientras que cancerígenos no genotóxicos se caracterizan por cantidad significativamente mayor de células mitóticas después de 3 días de exposición en comparación con una configuración de exposición de 1 día. El compuesto no cancerígeno no muestra diferencias entre los días 1 y 3 de exposición, diferenciándose claramente a partir de cancerígenos no genotóxicos y genotóxicos.

45 Los términos “un aumento o reducción que depende de la concentración” describe la relación entre la concentración química del compuesto y el número promedio de células madre. Concentraciones mayores dan como resultado un aumento del número de células madre para una clase cancerígena (cancerígenos no genotóxicos) y una reducción en la otra clase (cancerígenos genotóxicos), respectivamente.

50 El término “durante al menos 3 días” con respecto a la tercera realización se refiere a que el tiempo de exposición a los cancerígenos debería durar 3, 4, 5,... días con el fin de poder llevar a cabo un comparación con una configuración de exposición de 1 día según se describe anteriormente.

55 Los términos “una exposición similar a un compuesto no cancerígeno, de control” se refiere a que la configuración experimental de exposición resultó la misma que el esquema de tratamiento para el compuesto cancerígeno.

60 Debería estar claro que una alternativa para “en comparación con una exposición similar a un compuesto no cancerígeno, de control” puede ser “en comparación con el número de células madre pluripotentes adultas de un platelminto no expuesto, de control o en comparación con el número de células madre pluripotentes adultas de un platelminto de control que se expuso a medio en el que no se agrega un compuesto de control (expuestos de manera simulada)”.

Más en particular, la presente invención se refiere a un método *in vivo* según se describe anteriormente con respecto a la totalidad de las 3 realizaciones en las que dicho platelminto es *Macrostomum lignano* o *Schmidtea mediterranea*. La última especie se describe por Ladurner et al. (36, 37) y Benazzi et al (38) respectivamente.

65

Más en particular, la presente invención se refiere a un método *in vivo* según se describe anteriormente en la que dicho número de células madre se cuantifica mediante un inmunoensayo con histona H3 fosforilada. El último ensayo se describe en detalle por Ladurner et al. (36) y Newmark y Alvarado (39).

5 La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplos 1: Métodos *in vivo* para detectar si un compuesto es un cancerígeno no genotóxico

10

Materiales & Métodos

Estrategia de selección de químicos y compuesto

15

Ciclofosfamida monohidrato (CP, Cas # 6055-19-2), Ciclosporina A (CA; Cas # 59865-13-3), Dietilestilbestrol (DES, Cas # 56-53-1), D-manitol (Dmann, Cas # 69-65-8), 4-Nitroquinolina-1-óxido (4NQO, Cas # 56-57-5), y Sulfisoxazole (Sox, Cas # 127-69-5) se adquirieron todos de Sigma Aldrich. Estos químicos se seleccionaron sobre la base de datos *in vitro* e *in vivo* disponibles que se informan en el documento OECD DRP31 (26), clasificaciones de IARC y las publicaciones de Kirkland et al. (13, 27) y Robinson y MacDonald (28). Sobre la base de estas publicaciones se realizó una distinción entre cancerígenos genotóxicos, cancerígenos no genotóxicos y no cancerígenos. Un cancerígeno se define como cualquier químico del cual el potencial cancerígeno se ha demostrado claramente en un ensayo biológico de 2 años en roedores. Un cancerígeno genotóxico debe haber demostrado ser positivo en ensayos de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* clásicos. CP y 4NQO se seleccionaron como cancerígenos no genotóxico (a saber, requieren metabolización) y genotóxico, respectivamente. Un cancerígeno no genotóxico consiste en cualquier químico del cual un mecanismo no reactivo de ADN resulta la causa principal de los efectos cancerígenos que se observan en mamíferos y humanos. DES y CA se seleccionaron como cancerígenos no genotóxicos. Un compuesto que resulta negativo en los ensayos de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* estándares y que carece de potencial cancerígeno en los ensayos biológicos de 2 años en ratones y ratas se considera no cancerígeno. Dmann y Sox se seleccionaron como no cancerígenos.

20

25

30

Cultivo animal

35

Cultivos de *Macrostomum lignano* (37) se desarrollaron en agua de mar artificial (ASW) enriquecida con medio f/2 (40) y se alimentaron *ad libitum* con la diatomea *Nitzschia curvilineata* (colección de cultivo PAE; UGent <http://www.pae.ugent.be/collection.htm>), según se describe en (41-43).

Procedimiento de ensayo

40

Una semana antes de iniciar la exposición química, una placa de 6 pozos que se rellenó con 4 ml de medio f/2 (Novolab NV) se inoculó con diatomeas para alcanzar una fuente de alimentos *ad libitum* durante exposición. La inanición de los gusanos conduce a una reducción de la proliferación de células madre (según se muestra en Nimeth et al (29)) que interferiría con la proliferación de células madre, el punto final del ensayo. Antes de iniciar la exposición quince gusanos adultos por condición se pipetea en cada pozo que se vació luego mediante pipeteo sin secar los gusanos y se rellenó con medio f/2 (control), si se requiere, F2 + DMSO al 0,05% (control de vehículo) y una concentración del químico.

45

50

La concentración de DMSO en el control de vehículo nunca excedió el 0,05%. Esto representó el porcentaje máximo de DMSO en la concentración de ensayo más alta de los químicos. Los datos de bibliografía demostraron que las concentraciones de DMSO > al 0,1% deberían evitarse con el fin de poder observar de manera confiable cualquiera de los efectos de comportamiento o tóxicos de compuestos en estos animales (30-32).

55

Para seleccionar la concentración de compuesto apropiada, en primer lugar se llevó a cabo un experimento de detección de rango de concentración amplio (factor de separación 10, exposición de 2 semanas). Sobre la base de esta detección de rango piloto se eligió una detección de rango afinado (factor de separación ≤ 2 ; para D-manitol, factor 5) para conducir el ensayo. La concentración máxima que se evaluó dependió de la solubilidad del compuesto del ensayo y el requisito de una supervivencia de 12/15 gusanos al final de la exposición.

60

Para todos los químicos que se investigan en esta invención, el medio se renovó semanalmente. Después de un ensayo preliminar (CP como referencia) en tiempos de exposición diferentes que varían de 2 días a 6 semanas, elegimos exponer los gusanos durante un período de 2 semanas después de lo cual se sometieron a inmunotinción con histona H3 fosforilada (PH3) para cuantificar mitosis.

Inmunohistoquímica con PH3 y cuantificación

65

Para cuantificar células mitóticas en especímenes montados enteros se usó el marcador mitótico anti-PH3. La tinción se llevó a cabo relajando a los animales en primer lugar en una mezcla 1:1 de MgCl₂·6H₂O (7,14%) y ASW (5

min), luego en $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (7,14%) (sin diluir, 5 min), continuando con fijación en paraformaldehído (PFA, 4% en PBS, 60 min). Los animales se enjuagaron luego con solución salina regulada con fosfato (PBS, 3 x 5 min) y se bloquearon en albúmina de suero bovino, que contenía Triton (BSA-T, Triton X-100 al 0,1%, 60 min). Posteriormente, los animales se incubaron en conejo anti-fosfo-H3 primario (1:300 en BSA-T, durante la noche, 4 °C, Upstate Biotechnology), se enjuagaron en PBS (3 x 5 min) y se incubaron en cerdo anti-conejo conjugado a TRITC secundario (1:150 en BSA-T, 1 h, DAKO). Finalmente, los animales se lavaron con PBS (3 x 5 min) y los portaobjetos se montaron usando Vectashield (Vector Laboratories). Los portaobjetos se analizaron usando un microscopio Leica 2500P que se equipó con epifluorescencia, un objetivo 40 x y una cámara DFC360FX CCD.

10 Todas las células somáticas positivas para PH3 se contaron manualmente usando el Image J cell counter plugin (44) (Fig. 1). Células + PH3 gonadales no se incluyeron en el análisis debido a que 1) la alta densidad de divisiones en esa región que puede conducir a señal de solapamiento y 2) la línea germinal que representa una población de células por separado, diferencialmente tolerante a exposición que puede dar como resultado variabilidad de cuantificación.

15 Criterios de aceptación y estadísticas

20 El valor límite de nuestro ensayo se determinó sobre la base de diagramas de densidad (versión R 2.15.3; (33) del número de células madre mitóticas de todos los experimentos para controles (agua de mar & DMSO), no cancerígenos, cancerígenos genotóxicos y cancerígenos no genotóxicos. El valor límite de 30 puestas en la cola de la distribución correspondiente al 97,5 percentil o 2 desviaciones estándar.

25 Las concentraciones que dieron como resultado la muerte del 20% de los gusanos (3/15) durante exposición se consideraron citotóxicas y no se analizaron. Se establecieron los siguientes criterios para un ensayo exitoso: 1) 3 experimentos independientes como mínimo, 2) el número de células madre mitóticas de 2 concentraciones químicas subsiguientes debe proporcionarse, 3) el número de células madre mitóticas de 5 gusanos como mínimo por concentración debe cuantificarse y finalmente 4) tener en cuenta la posibilidad de gusanos de control negativo que exhiben números mitóticos que exceden el valor límite, se tolera un máximo de 2 gusanos de control individuales (agua de mar & DMSO) con un número de células madre mitóticas \geq al valor límite de 30.

30 Criterios de evaluación

35 Un compuesto se considera positivo si se cumplen los siguientes criterios: 1) un mínimo del 20% de los gusanos por concentración debe tener un número de células madre mitóticas \geq al valor límite de 30 (calificado como "+") y 2) al menos 2/3 de los experimentos deben haber recibido una calificación "+" para el compuesto para tener una llamada final general "+". En el futuro, 2 experimentos resultarían suficientes para determinar la llamada final, un tercer experimento se requeriría solamente cuando el número de "+" y "-" resultan iguales. Los diagramas pueden generarse usando el paquete R de software.

40 Resultados

45 Durante el proceso de múltiples etapas de carcinogénesis química, alteraciones intracelulares pueden dar como resultado proliferación celular aumentada. El punto final de nuestro ensayo *in vivo* de proliferación de células madre de platelmintos consiste en el número de células madre mitóticas. Esperamos que los cancerígenos originen un aumento de proliferación de células madre (resultado +) y que los no cancerígenos no tengan efecto alguno en la proliferación después de exposición de 2 semanas (resultado -).

50 Una base de datos de control se confeccionó a partir del número de células mitóticas por animal de control negativo. El valor límite del ensayo se determinó mediante el análisis de los diagramas de densidad del número de células madre mitóticas para todos los controles en todos los experimentos (Fig. 2).

55 Todos los controles cumplieron con los criterios de aceptación de < 2 gusanos por experimento que exhiben un número de células madre mitóticas \geq al valor límite. Para controles de agua de mar (media 20,1; $n=232$), el número de células madre mitóticas fue 38 como máximo y el 50% de los recuentos se encontraron entre 17 y 28 células. Para controles de DMSO (media 21,0; $n=89$), el número de células madre mitóticas fue 35 como máximo y el 50% de los recuentos se encontraron entre 18 y 24 células. En todos los controles, el número de células madre mitóticas fue < 30 con unas pocas excepciones (5/232 gusanos para agua de mar y 4/89 en controles de DMSO). Como tal, el valor límite se configuró en 30 células madre mitóticas.

60 No cancerígenos

65 D-manitol se pronosticó como negativo para nuestro ensayo para la totalidad de los tres experimentos con 0% de gusanos que tienen un número de células madre mitóticas que excede el valor límite, incluso hasta 5 mM (910 $\mu g/ml$) (Fig. 3 y tabla 1). Mayores concentraciones de Dmann dieron como resultado insolubilidad del medio. Sulfisoxazole se pronosticó como negativo para la totalidad de los tres experimentos hasta 1 mM. Mayores concentraciones de Sox dieron como resultado $>$ del 20% de letalidad y no se analizaron. En el experimento 2

solamente una concentración de Sox (500 µM) dio como resultado un 11,1% de gusanos que exhiben un número de células madre mitóticas que excede 30 lo cual se encuentra todavía por debajo de nuestros criterios de aceptación del 20% (tabla 1). Como conclusión, ambos químicos se pronosticaron finalmente como negativos (no cancerígenos) en nuestro ensayo (Fig. 3 y tabla 1).

5

Cancerígenos genotóxicos

Ciclofosfamida monohidrato se pronosticó como positivo para todos los experimentos, en cada oportunidad a 100 µM (26 µg/ml). Un experimento con CP se rechazó ya que solo 3 gusanos se cuantificaron a pesar de que el 66,7% (100 µM) de ellos tuvo un número de células madre mitóticas que excedió el valor límite (tabla 1).

10

4-Nitroquinolina 1-óxido dio como resultado una predicción positiva en nuestro ensayo para 2/3 de los experimentos en ya sea 0,25 (0,047 µg/ml) y 0,5 µM (0,095 µg/ml). En las concentraciones que se pronosticaron como positivas, el porcentaje de gusanos que exhibió un número de células madre mitóticas ≥ al valor límite variaba de 33,3 a 77,8 (tabla 1). En el segundo experimento que se pronosticó como negativo, 2 concentraciones subsiguientes dieron como resultado un porcentaje de gusanos que exhibían un número de células madre mitóticas ≥ al valor límite pero este porcentaje fue, sin embargo, no mayor que el 20% (tabla 1). Concentraciones de HP y 4NQO mayores dieron como resultado > del 20% de letalidad de los gusanos y no se analizaron. En general, ambos compuestos se pronosticaron finalmente como positivos para nuestro ensayo (Fig. 3 y tabla 1).

15

20

Cancerígenos no genotóxicos

Dietilestilbestrol se pronosticó como positivo para la totalidad de los 3 experimentos en concentraciones que variaban de 0,3125 (0,04 µg/ml) a 0,625 µM (0,16 µg/ml). En el experimento uno, 0,3125 µM dio como resultado el 100% de gusanos que exhibió un número de células madre mitóticas que excedía el valor límite. En 2/3 de los experimentos, incluso dos concentraciones consecutivas dentro del rango se encontraron positivas (Fig. 3).

25

Para Ciclosporina A, todos los experimentos cumplieron con nuestros criterios de aceptación dando como resultado una predicción positiva en nuestro ensayo. Concentraciones positivas variaron de 0,125 µM (0,14 µg/ml) a 0,5 µM (0,56 µg/ml) con un porcentaje de células mitóticas ≥ al valor límite que variaron de 36,4,5 al 70%. En general, ambos compuestos se pronosticaron como positivos en nuestro ensayo (Fig. 3 y tabla 1).

30

TABLA 1

Modelo de predicción. Tabla que representa el número de gusanos que se analizan por concentración (=N), la proporción de gusanos que tienen 30 o más células madre mitóticas (A), las predicciones que resultan de todos los experimentos para todos los compuestos que se evalúan y la llamada de predicción final. Cuando el 20% del número de células mitóticas en un experimento excede el valor límite de 30, se asigna un "+" para calificar ese experimento. Un "+" por experimento se requirió para predecir el compuesto como positivo (=Pos) y un mínimo de 2/3 de los experimentos con predicciones positivas dieron como resultado una llamada de predicción positiva final para ese compuesto (véanse criterios de evaluación en Materiales y Métodos). Concentraciones que no se analizaron debido a pérdida experimental durante el procedimiento de ensayo o se rechazaron debido a invalidez de ensayo (por ejemplo N<3 para CP) se codificaron como no aplicables (NA). Dmann: D-Manitol; Sox: Sulfisoxazole; Nqo: 4-Nitroquinolina 1-óxido; Cp: ciclofosfamida monohidrato; Des: dietilestilbestrol; CA: ciclosporina A.

Compuesto (µM)	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			Predicción general
	N	% ^A	Pred B	N	% ^A	Pred B	N	% ^A	Pred B	
No cancerígenos										
D-Manitol ^C										
0	6	0	-	10	0	-	8	0	-	
1000		0	-	10	0	-	8	0	-	
5000		0	-	6	0	-	8	0	-	
			Neg			Neg			Neg	Neg
Sulfisoxazole ^C										
0	9	0	-	6	0	-	9	0	-	

ES 2 734 706 T3

(continuación)

Compuesto (μM)	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			Predicción general
	N	% ^A	Pred B	N	% ^A	Pred B	N	% ^A	Pred B	
No cancerígenos										
250	12	0	-	NA	NA	NA	9	0	-	
500	9	0	-	9	11,1	-	8	0	-	
1000		0	-	10	0	-	9	0	-	
			Neg			Neg			Neg	Neg
Cancerígenos genotóxicos										
4-Nitroquinolina- 1-óxido ^C										
0	9	0	-	6	0	-	6	0	-	
0,125	NA	NA	NA	6	16,7	-	NA	NA	NA	
0,25		33,3	+	8	12,5	-	8	37,5	+	
0,5	9	77,8	+	7	0	-	11	36,4	+	
			Pos			Neg			Pos	Pos
Ciclofosfamida monohidrato ^C										
0	8	0	-	9	0	-	11	0	-	
50	6	0	-	8	0	-	12	16,7	-	
100	3 ^D	66,7	NA	10	20	+	6	33,3	+	
			NA			Pos			Pos	Pos
Cancerígenos no genotóxicos										
Dietilestilbestrol ^E										
0	10	0	-	NA	NA	NA	8	0	-	
DMSO	8	0	-	6	0	-	8	0	-	
0,3125	10	100	+	8	12,5	-	12	33,3	+	
0,625	11	27,3	+	10	50	+	9	22,2	+	
			Pos			Pos			Pos	Pos

(continuación)

Compuesto (μM)	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			Predicción general
	N	% ^A	Pred B	N	% ^A	Pred B	N	% ^A	Pred B	
Cancerígenos no genotóxicos										
Ciclosporina A ^E										
0	12	0	-	8	0	-	9	0	-	
DMSO	12	0	-	6	0	-	6	0	-	
0,125	NA	NA	NA	7	0	-	8	37,5	+	
0,25	10	70	+	7	0	-	7	42,9	+	
0,5	10	40	+	11	36,4	+	8	50	+	
			Pos			Pos			Pos	Pos

^A proporción de gusanos que tienen 30 o más células madre mitóticas

^B + en caso del 20% o más de gusanos que tienen 30 o más células madre mitóticas

^C en Agua de Mar (SW)

^D Menos de 5 gusanos se cuantificaron para esta concentración, este experimento se excluyó.

^E DMSO conc. 0,05%

Organismos de ensayo

5 Cepas asexuales de la planaria de agua dulce *Schmidtea mediterranea* (38, 45) se mantuvieron en medio de cultivo, que consistió de agua, que fue en primer lugar desionizada y luego destilada, y a la cual se agregaron los siguientes nutrientes: 1,6 mM de NaCl, 1,0 mM de CaCl₂, 1,0 mM de MgSO₄, 0,1 mM de MgCl₂, 0,1 mM de KCl y 1,2 mM NaHCO₃. Los animales se mantuvieron de manera continua en la oscuridad a una temperatura ambiente de 20 °C y se alimentaron una vez a la semana con hígado de ternera.

10 Diseño experimental

Los experimentos se llevaron a cabo con animales de regeneración (cabezas y colas) para acelerar respuestas iniciales a compuestos cancerígenos ya que este proceso de proliferación celular masiva, migración y diferenciación se asemeja más al proceso de carcinogénesis y, posiblemente de manera diferente, afecta la dinámica de células madre hacia exposiciones a cancerígenos genotóxicos y no genotóxicos (16, 32, 39).

En cada condición experimental, los animales se cortaron transversalmente de manera inmediata antes de la exposición a una concentración de genotóxico, no genotóxico o no cancerígeno, medio (control) o medio con DMSO (control de vehículo). Las exposiciones se llevaron a cabo en placas de 6 pozos (4ml/pozo). Para excluir efectos intrínsecos de DMSO en la proliferación celular, la concentración de vehículo DMSO nunca excedió el 0,05% y los efectos de interacción entre el compuesto de ensayo y DMSO se investigaron usando un ANOVA de dos vías (32). La selección del compuesto se basó en investigaciones bibliográficas (13, 26-28) e incluyó los cancerígenos genotóxicos metanosulfonato de metilo (MMS; Cas # 66-27-3; pureza del 99%) y 4 nitroquinolina-1-óxido (4NQO, Cas # 56-57-5; pureza del 98%); los cancerígenos no genotóxicos, clorhidrato de metapirileno (MPH; 135-23-9; estándar analítico), ciclosporina A (CsA; Cas # 59865-13-3; pureza \geq al 98.5%), clorhidrato de clorpromazina (CPZ; Cas # 69-09-0; pureza \geq al 98%) y fenobarbital sódico (S-PB; Cas # 57-30-7) y el no cancerígeno D-manitol (Dmann, Cas # 69-65-8), todos adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Después de la comparación de exposiciones continuas versus intermitentes (toxicidad de dosis repetida: 2 días de exposición de compuesto, 3 días de recuperación en medio de cultivo) y renovación de medio única versus dos veces por semana, se encontró que una exposición continua con renovación de medio dos veces por semana resulta la más adecuada para obtener respuestas celulares distintivas. Los animales se alimentaron una vez por semana con hígado de ternera y se dejaron de alimentar durante 1 semana antes de las mediciones de proliferación de células madre. La proliferación de células madre se midió después de 1 día de regeneración (el mínimo de regeneración mitótica), después de 3 días (el máximo de regeneración mitótica), después de 1 semana (la etapa final de regeneración), después de 2 y 6

semanas (durante homeostasis), así como también en la aparición de fenotipos orgánicos (15,46,47). Los efectos fenotípicos se monitorearon diariamente con un microscopio estéreo.

Actividad mitótica de células madre

5 Las células madre son las únicas células de proliferación en estos animales (48). Los cambios observados en la proliferación celular pueden relacionarse, de este modo, directamente con respuestas de células madre. La actividad mitótica de las células madre se determinó mediante inmunotinción con anticuerpo anti-p-histona H3 (Millipore), que se llevó a cabo según se describe anteriormente (32, 49). Después de la exposición, los gusanos se trataron durante 10 minutos en hielo con solución Holtfreter cinco-octavos (50) que contiene HCl al 2%(VWR) para remover la capa de mucosa. Las muestras se fijaron en fijador de Carnoy (51) durante 2 horas (en hielo) y se enjuagaron en metanol al 100% (VWR) durante 1 hora y se decoloraron durante la noche a temperatura ambiente en H₂O₂ al 6% (VWR) (en metanol al 100%). Posteriormente, los gusanos se rehidrataron a través de series graduadas de solución salina regulada con fosfato/metanol-triton (PBST) (comprimidos de PBS; VWR) (Triton X-100 pro analyse, VWR), se lavaron (75%, 50%, 25%, 0%) durante 10 minutos cada una, donde después se bloquearon sitios de unión no específicos en albúmina de suero bovino (Sigma Aldrich) (PBST/BSA) (Triton X-100 al 0,1%, y 0.1g/ml de BSA) durante 3 horas. Los animales se incubaron a 4 °C durante 44 horas con un anticuerpo primario (anti-fosfo-histona H3 (Ser 10) conjugado a biotina, Millipore, número de catálogo: 16-189) se diluyeron a 1:600 en PBST/BSA. Los animales se enjuagaron de manera repetida durante 1 hora en PBST y se incubaron en PBST/BSA durante 7 horas. Luego, los animales se incubaron con un anticuerpo secundario (de cabra anti-IgG de conejo conjugado a rodamina, Millipore, número de catálogo: 12-510), se diluyeron a 1:500 en PBST/BSA durante 16 horas. Después, los animales se enjuagaron de manera repetida durante 30 minutos en PBST y se montaron en glicerol. Los animales se examinaron con microscopía de fluorescencia que se realizó con un Nikon Eclipse 80i. El número total de neoblastos mitóticos se normalizó con respecto al tamaño corporal de los animales (cfr. área corporal). Antes de iniciar la coloración, se tomaron 3 fotos de cada animal al momento en el que el cuerpo se encontraba estirado por completo. Para normalización, de estas 3 fotos, el tamaño promedio del cuerpo se calculó usando Image J (1.44p, National Institutes of Health).

Seguimiento fenotípico

30 Un estudio *in vivo* permite la investigación de la respuesta de todo el organismo a compuestos cancerígenos y, como tal, hace posible vincular la proliferación de células madre inducida por cancerígenos con el fenotipo del organismo. Las condiciones se subdividieron de acuerdo con sus efectos fenotípicos en concentraciones que no originaron efectos fenotípicos que pudieran observarse (categoría 1), efectos fenotípicos (categoría 2, que se describen en examen de efecto fenotípico) y concentraciones que indujeron la muerte del organismo (categoría 3). Los parámetros fenotípicos que se monitorearon diariamente fueron regresión de tejido, lesión, ampollas, hinchazón, pigmentación, comportamiento, éxito regenerativo, tamaño corporal, excrecencia de tejido, postura plana y muerte orgánica (35). La proliferación de células madre se cuantificó en la aparición de efectos sistémicos (concentraciones de categoría 2).

Métodos estadísticos

45 Efectos del tiempo y exposiciones a cancerígenos (que incluyen concentraciones bajas y altas de cancerígenos) en el número de células de división se analizaron usando un modelo de ANOVA que incluyó tiempo, exposición y la interacción entre ambas covariables (Fig. 4, Fig. 5). Los efectos de exposiciones a cancerígenos en el número de células de división se analizaron estadísticamente usando un modelo de ANOVA que incluyó exposición (Fig. 6). Los residuos a partir del modelo de ANOVA se inspeccionaron visualmente para asegurar que las suposiciones de constancia de varianza y normalidad de errores se cumplieran. Si las suposiciones de normalidad no se cumplieron, se aplicó una transformación de la configuración de datos (Log, raíz cuadrada, 1/x y ex). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando SAS versión 9.2 (SAS institute, Cary, NC, USA). Un valor P de menos de 0,05 se consideró significativo. Los niveles significativos de nivel de 0,1 se informaron también para fortalecer los patrones que se observaron. Un efecto de exposición general se presenta siempre y cuando una exposición a cancerígenos tenga un efecto significativo diferente en el parámetro medido en comparación con una exposición a medio de cultivo.

Resultados

60 La proliferación de células madre se monitoreó en puntos de tiempo significativos a nivel fisiológico después de exposición a ambas concentraciones bajas y altas de cancerígenos genotóxicos, no genotóxico y no cancerígenos (Fig. 4). En general, las respuestas de proliferación celular a continuación de las exposiciones a MMS y CsA se distinguieron significativamente unas con respecto a las otras ($p < 0.01$). Las diferencias más grandes entre cancerígenos genotóxicos y no genotóxicos se detectaron antes de la plena realización de homeostasis (hasta exposición de 2 semanas), con cambios notables en respuestas proliferativas entre 1 y 3 días, a saber, una reducción significativa para cancerígenos genotóxicos ($P < 0,01$) en comparación con un aumento significativo para cancerígenos no genotóxicos ($p < 0,01$). Una adición del no cancerígeno Dmann en el análisis estadístico reveló diferencias significativas de respuestas de proliferación celular a través del tiempo entre exposiciones a Dmann y

MMS ($p < 0,01$), pero no con exposiciones a CsA. La concentración (alta versus baja) de compuestos cancerígenos afectó la mitosis de manera significativa ($p < 0,01$), mientras que el no cancerígeno Dmann no tuvo efectos significativos en respuestas de proliferación en los tiempos de exposición diferentes y concentraciones que se midieron. Para evaluar si las diferencias que se observaron de la proliferación celular después de 1 y 3 días de exposición son respuestas de compuesto no específico, y como tales pueden generalizarse a cancerígenos genotóxicos y no genotóxicos, expusimos los organismos a otro cancerígeno genotóxico (4NQO) y no genotóxico (S-PB) (Fig. 5). Al hacer foco en 1 y 3 días de exposición, intentamos aumentar la potencia diferencial entre proliferación de células madre inducida por cancerígenos genotóxicos, no genotóxicos y no cancerígenos. La proliferación se diferenció significativamente entre 1 y 3 días de exposición para los cancerígenos genotóxicos MMS ($p < 0,01$) y 4NQO ($p < 0,01$) y para los cancerígenos no genotóxicos CsA ($p < 0,05$) y S-PB ($p < 0,1$). No se observaron diferencias significativas entre exposiciones a Dmann de 1 y 3 días. Un resultado sorprendente en función del ensayo consistió en una inhibición más fuerte de la proliferación celular después de exposición de 3 días a cancerígenos genotóxicos en contraste con una inducción más fuerte de proliferación celular después de exposición de 3 días a cancerígenos no genotóxicos, ambas en comparación con respuestas de proliferación después de exposiciones de 1 día. Otro resultado valioso consistió en la reducción significativa de la proliferación celular para concentraciones en aumento de cancerígenos genotóxicos después de exposición de 3 días ($p < 0,01$) en comparación con aumentos o reducciones no significativos de la proliferación celular para concentraciones en aumento de cancerígenos no genotóxicos.

20 Efectos fenotípicos y respuestas de células madre asociadas.

Para distinguir de manera adicional entre exposiciones a cancerígenos y no cancerígenos y entre cancerígenos genotóxicos y no genotóxicos, estudiamos efectos fenotípicos como un factor de diferenciación. Las concentraciones de exposición se subdividieron en categorías, en las que la categoría 1 consistió de concentraciones que no indujeron efectos fenotípicos, la categoría 2 consistió en concentraciones que indujeron efectos fenotípicos y la categoría 3 fueron concentraciones letales (tabla 2).

Tabla 2: Clasificación de concentraciones de cancerígenos genotóxicos y no genotóxicos de acuerdo con fenotipos que se observan. Concentraciones de cancerígenos genotóxicos (MMS, 4NQO) y no genotóxicos (S-PB, CPZ, MPH) se clasificaron en 3 categorías de acuerdo con los efectos fenotípicos que inducen: Categoría 1: ausencia de efectos en el fenotipo; Categoría 2: efectos fenotípicos; Categoría 3: mortalidad. Para concentraciones de categoría 2 en cursiva, las respuestas de proliferación celular se presentan en el artículo. Los tiempos de exposición fueron de 3 días (MMS), 1 semana (4NQO) y 2 semanas (S-PB, CPZ, MPH). MMS metanosulfonato de metilo, 4NQO 4-nitroquinolina 1-óxido, S-PB fenobarbital sódico, CPZ clorhidrato de clorpromazina, MPH clorhidrato de metapirileno.

Cancerígenos		Toxicidad		
		Cat. 1	Cat. 2	Cat. 3
Genotóxicos	MMS	25-50-100-200 μ M	400-500 μ M	1 mM ¹⁰
	4NQO	0,1-0,5 μ M	2 μ M	5 μ M
No genotóxicos	S-PB	1 mM	2 mM	4 mM
	CPZ	250-500 nM	750-1000 nM	2 μ M
	MPH	10 μ M	150-250 μ M	500 μ M

En contraste con exposiciones a cancerígenos, no se indujeron efectos fenotípicos mediante exposiciones a no cancerígenos (Dmann). Concentraciones de categoría 2 de cancerígenos genotóxicos indujeron efectos fenotípicos tales como manchas de pigmentación aberrante, regresión de tejido severa, fallas de regeneración y comportamiento aberrante (tabla 3).

Tabla 3. Número de animales con efectos fenotípicos específicos después de exposición a concentraciones de categoría 2 de cancerígenos genotóxicos y no genotóxicos (véase Tabla 2).

Fenotipos	GTX		NGTX		
	MMS	4NQO	S-PB	CPZ	MPH
Regresión de tejido	3/14	2/4	/	/	/

(continuación)

Fenotipos	GTX		NGTX		
	MMS	4NQO	S-PB	CPZ	MPH
Pigmentación	1/14	2/4	/	/	/
Comportamiento	14/14	3/4	2/2	4/4	8/8
Éxito regenerativo	14/14	4/4	/	/	/
Tamaño corporal	10/14	/	/	2/2	8/8

Una exposición a concentraciones de categoría 2 de cancerígenos no genotóxicos provocó respuestas fisiológicas que parecían tener inicialmente un impacto menor en la viabilidad del organismo en comparación con fenotipos inducidos por cancerígenos genotóxicos, por ejemplo, cambios de tamaño corporal o longitud o un comportamiento aberrante. De manera interesante, una cuantificación de proliferación celular en la aparición de efectos fenotípicos diferenció además exposiciones a cancerígenos genotóxicos y no genotóxicos: efectos fenotípicos inducidos por cancerígenos genotóxicos (concentraciones de categoría 2) se asociaron con una caída significativa de la proliferación de células madre en comparación con animales no expuestos, mientras que no se observaron cambios de proliferación en la manifestación de fenotipos inducidos por cancerígenos no genotóxicos (Fig. 6).

Referencias

1. EU (2008) 440/2008 of 31 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH). ed (EC) CR (Official Journal of the European Union, L 142/1-L 142/739).
2. Marone PA, Hall WC, & Hayes AW (2014) Reassessing the two-year rodent carcinogenicity bioassay: a review of the applicability to human risk and current perspectives. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* 68(1):108-118.
3. Heinonen T, Louekari K, & Tähti H (2014) Need for Harmonized Strategies and Improved Assessment of Carcinogenic and Genotoxic Potencies of Chemical Substances. *Journal of Translational Toxicology* 1(1):76-87.
4. ICCVAM (2000) ICCVAM Authorization Act of 2000 Public Law 106-545.
5. Doktorova TY, Pauwels M, Vinken M, Vanhaecke T, & Rogiers V (2012) Opportunities for an alternative integrating testing strategy for carcinogen hazard assessment? *Critical Reviews in Toxicology* 42(2):91-106.
6. Ellinger-Ziegelbauer H, Stuart B, Wahle B, Bomann W, & Ahr HJ (2005) Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. *Mutat Res* 575(1-2):61-84.
7. Hernández LG, van Steeg H, Luijten M, & van Benthem J (2009) Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 682(2-3):94-109.
8. Silva Lima B & Van der Laan JW (2000) Mechanisms of Nongenotoxic Carcinogenesis and Assessment of the Human Hazard. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32(2):135-143.
9. Bogdanffy MS & Valentine R (2003) Differentiating between local cytotoxicity, mitogenesis, and genotoxicity in carcinogen risk assessments: the case of vinyl acetate. *Toxicology Letters* 140-141(0):83-98.
10. van Delft JH, et al. (2004) Discrimination of genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling. *Carcinogenesis* 25(7):1265-1276.
11. Adler S, et al. (2011) Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol* 85(5):367-485.
12. Benigni R, Bossa C, & Tcheremenskaia O (2013) In vitro cell transformation assays for an integrated, alternative assessment of carcinogenicity: a data-based analysis. *Mutagenesis* 28(1):107-116.

13. Kirkland D, Aardema M, Henderson L, & Müller L (2005) Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 584(1-2):1-256.
- 5 14. Robb SMC, Ross E, & Alvarado AS (2008) SmedGD: the Schmidtea mediterranea genome database. *Nucleic Acids Research* 36(suppl 1):D599-D606.
15. Dunkel J, Talbot J, & Schotz EM (2011) Memory and obesity affect the population dynamics of asexual freshwater planarians. *Phys Biol* 8(2):026003.
- 10 16. Alexandrov V, Aiello C, & Rossi L (1990) Modifying factors in prenatal carcinogenesis (review). *In Vivo* 4(5):327-335.
- 15 17. Birnbaum LS & Fenton SE (2003) Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environmental health perspectives* 111(4):389-394.
18. Oviedo NJ & Beane WS (2009) Regeneration: The origin of cancer or a possible cure? *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20(5):557-564.
- 20 19. Hanahan D & Weinberg Robert A (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(5):646-674.
20. Best JB & Morita M (1982) Planarians as a model system for in vitro teratogenesis studies. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis* 2(3-4):277-291.
- 25 21. Hall F, Morita M, & Best JB (1986) Neoplastic transformation in the planarian: I. Cocarcinogenesis and histopathology. *The Journal of experimental zoology* 240(2):211-227.
22. Schaeffer DJ (1993) Planarians as a model system for in vivo tumorigenesis studies. *Ecotoxicology and environmental safety* 25(1):1-18.
- 30 23. Hall F, Morita M, & Best JB (1986) Neoplastic transformation in the planarian: II. Ultrastructure of malignant reticuloma. *The Journal of experimental zoology* 240(2):229-244.
- 35 24. Fu Z & Tindall DJ (2008) FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* 27(16):2312-2319.
25. Stalmans S, et al. (2014) Flatworm models in pharmacological research: the importance of compound stability testing. *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP 70(1):149-154.
- 40 26. OECD OfECaD (2007) Detailed review on cell transformation assays for detection of chemical carcinogens. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 31.
27. Kirkland D, Kasper P, Müller L, Corvi R, & Speit G (2008) Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: A follow-up to an ECVAM workshop. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 653(1-2):99-108.
- 45 28. Robinson DE & Macdonald JS (2001) Background and framework for ILSI's collaborative evaluation program on alternative models for carcinogenicity assessment. *Toxicologic pathology* 29(1 suppl):13-19.
- 50 29. Nimeth KT, et al. (2004) Stem cell dynamics during growth, feeding, and starvation in the basal flatworm *Macrostomum* sp.(Platyhelminthes). *Developmental dynamics* 230(1):91-99.
30. Pagan OR, Rowlands AL, & Urban KR (2006) Toxicity and behavioral effects of dimethylsulfoxide in planaria. *Neuroscience letters* 407(3):274-278.
- 55 31. Yuan Z, Zhao B, & Zhang Y (2012) Effects of dimethylsulfoxide on behavior and antioxidant enzymes response of planarian *Dugesia japonica*. *Toxicology and industrial health* 28(5):449-457.
32. Stevens AS, et al. (2014) Toxicity profiles and solvent-toxicant interference in the planarian *Schmidtea mediterranea* after dimethylsulfoxide (DMSO) exposure. *Journal of applied toxicology: JAT*.
- 60 33. Team RDC (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 65 34. Newmark PA, Reddien PW, Cebria F, & Alvarado AS (2003) Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(suppl 1):11861-11865.

- 5 35. Reddien PW, Bermange AL, Murfitt KJ, Jennings JR, & Sanchez Alvarado A (2005) Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Developmental cell* 8(5):635-649.
36. Ladurner P, Rieger R, & Baguna J (2000) Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth *macrostomum* sp.: a bromodeoxyuridine analysis. *Dev Biol* 226(2):231-241.
- 10 37. Ladurner P, Schärer L, Salvenmoser W, & Rieger RM (2005) A new model organism among the lower Bilateria and the use of digital microscopy in taxonomy of meiobenthic Platyhelminthes: *Macrostomum lignano*, n. sp. (Rhabditophora, Macrostomorpha) Ein neuer Modellorganismus für die basalen Bilaterier und die Verwendung von digitaler Mikroskopie für die Taxonomie meiobenthischer Platyhelminthen: *Macrostomum lignano* n. sp. (Rhabditophora, Macrostomorpha). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 43(2):114-126.
- 15 38. Benazzi M, Baguná J, Ballester R, Puccinelli I, & Papa RD (1975) Further Contribution to the Taxonomy of the « *Dugesia Lugubris-Polychroa* Group » with Description of *Dugesia Mediterranea* N.SP. (Tricladida, Paludicola). *Bolletino di zoologia* 42(1):81-89.
- 20 39. Newmark PA & Sanchez Alvarado A (2000) Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol* 220(2):142-153.
40. Guillard RRL & Ryther JH (1962) STUDIES OF MARINE PLANKTONIC DIATOMS: I. *CYCLOTELLA NANA* HUSTEDT, AND *DETONULA CONFERVACEA* (CLEVE) GRAN. *Canadian Journal of Microbiology* 8(2):229-239.
- 25 41. Rieger R, et al. (1988) Laboratory cultures of marine Macrostomida (Turbellaria). *Fortschr Zool* 36:523.
42. Ladurner P, et al. (2008) The stem cell system of the basal flatworm *Macrostomum lignano*. *Stem cells*, (Springer), pp 75-94.
- 30 43. Mouton S, et al. (2009) The free-living flatworm *Macrostomum lignano*: a new model organism for ageing research. *Experimental gerontology* 44(4):243-249.
44. Abràmoff MD, Magalhães PJ, & Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* 11(7):36-43.
- 35 45. Baguña J (1973) Estudios citotaxonómicos, ecológicos e histofisiología de la regulación morfogénica durante el crecimiento y la regeneración en la raza asexuada de la planaria *Dugesia mediterranea* n. sp. (Turbellaria: Tricladida: Paludicola).
- 40 46. Robb SM, Ross E, & Sanchez Alvarado A (2008) SmedGD: the *Schmidtea mediterranea* genome database. *Nucleic acids research* 36(Database issue):D599-606.
47. Salo E & Baguna J (1984) Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *Journal of embryology and experimental morphology* 83:63-80.
- 45 48. Reddien PW & Alvarado AS (2004) Fundamentals of planarian regeneration. *Annual review of cell and developmental biology* 20:725-757.
- 50 49. Plusquin M, et al. (2012) Physiological and molecular characterisation of cadmium stress in *Schmidtea mediterranea*. *The International journal of developmental biology* 56(1-3):183-191.
- 55 50. Armstrong JB, Duhon ST, & Malacinski GM (1989) Raising the axolotl in captivity. *Smith VII*.
51. Yoneyama M, Kitayama T, Taniura H, & Yoneda Y (2003) Immersion fixation with Carnoy solution for conventional immunohistochemical detection of particular N-methyl-D-aspartate receptor subunits in murine hippocampus. *Journal of neuroscience research* 73(3):416-426.
- 60 52. Doktorova TY, et al. (2014) Testing chemical carcinogenicity by using a transcriptomics HepaRG-based model?
53. Hochstenbach K, et al. (2012) Transcriptomic fingerprints in human peripheral blood mononuclear cells indicative of genotoxic and non-genotoxic carcinogenic exposure. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 746(2):124-134.
- 65

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vivo* para predecir si un compuesto es un cancerígeno no genotóxico que comprende:

- 5 – exponer dicho compuesto a platelmintos durante un período de tiempo,
- contar el número de células madre pluripotentes adultas en dichos platelmintos después de exposición a dicho compuesto, y
- 10 – comparar el último número con un valor límite de referencia,
- en el que dicho compuesto resulta un cancerígeno no genotóxico cuando dicho número de células madre pluripotentes adultas resulta mayor que dicho valor límite.

15 2. Un método *in vivo* de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho período de tiempo es de 2 semanas.

3. Un método *in vivo* para predecir si un compuesto es un cancerígeno no genotóxico y/o para distinguir un cancerígeno no genotóxico a partir de un cancerígeno genotóxico que comprende:

- 20 – exponer dicho compuesto o dicho cancerígeno no genotóxico y cancerígeno genotóxico durante un período de tiempo a concentraciones que activan efectos fenotípicos a platelmintos de regeneración,
- contar el número de células madre pluripotentes adultas en dichos platelmintos de regeneración después de exposición, y
- 25 – comparar el último número con el número que se obtiene mediante una exposición similar a un compuesto no cancerígeno, de control,

30 en el que un compuesto resulta un compuesto cancerígeno no genotóxico cuando el número de células madre adultas al momento de aparición de efectos sistémicos resulta similar al número de células madre adultas cuando se usa dicho compuesto no cancerígeno, de control, y

35 en el que un compuesto resulta un compuesto cancerígeno genotóxico cuando el número de células madre adultas al momento de aparición de efectos sistémicos resulta significativamente menor con respecto al número de células madre adultas cuando se usa dicho compuesto no cancerígeno, de control.

4. Un método *in vivo* de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho período de tiempo que activa efectos fenotípicos para platelmintos de regeneración es de entre 3 y 19 días.

40 5. Un método *in vivo* de acuerdo con las reivindicaciones 3-4, en el que dichos efectos fenotípicos son manchas de pigmentación aberrantes, regresión de tejido, lesiones, ampollas, hinchazón, cambios de comportamiento, dificultades de regeneración, tamaño corporal anormal, excrecencia de tejido y postura plana.

45 6. Un método *in vivo* para predecir si un compuesto es un cancerígeno no genotóxico y/o para distinguir un cancerígeno no genotóxico a partir de un cancerígeno genotóxico que comprende:

- exponer dicho compuesto o dicho cancerígeno no genotóxico y cancerígeno genotóxico durante al menos 3 días a platelmintos de regeneración,
- 50 – contar el número de células madre pluripotentes adultas en dichos platelmintos de regeneración después de dicha exposición, y
- comparar el último número con el número que se obtiene mediante una exposición similar a un compuesto no cancerígeno, de control,
- 55

60 en el que un compuesto resulta un compuesto cancerígeno no genotóxico cuando existe aumento que depende de la concentración del número de células madre pluripotentes adultas en el día 3 posterior a la exposición, en el que un compuesto resulta un compuesto cancerígeno genotóxico cuando existe reducción que depende de la concentración del número de células madre pluripotentes adultas en el día 3 posterior a la exposición, y, en el que un compuesto resulta no cancerígeno cuando no existe respuesta que depende de la concentración del número de células madre pluripotentes adultas en el día 3 posterior a la exposición.

65 7. Un método *in vivo* de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, en el que dicho platelminto es *Macrostomum lignano* o *Schmidtea mediterranea*.

8. Un método *in vivo* de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que dicho número de células madre se cuantifica mediante un inmunoensayo con histona H3 fosforilada.

5 9. Un método *in vivo* de acuerdo con las reivindicaciones 3-8, en el que dicha comparación del último número consiste en la comparación con respecto al número que se obtiene a partir de un platelminto de regeneración no expuesto o expuesto de manera simulada.

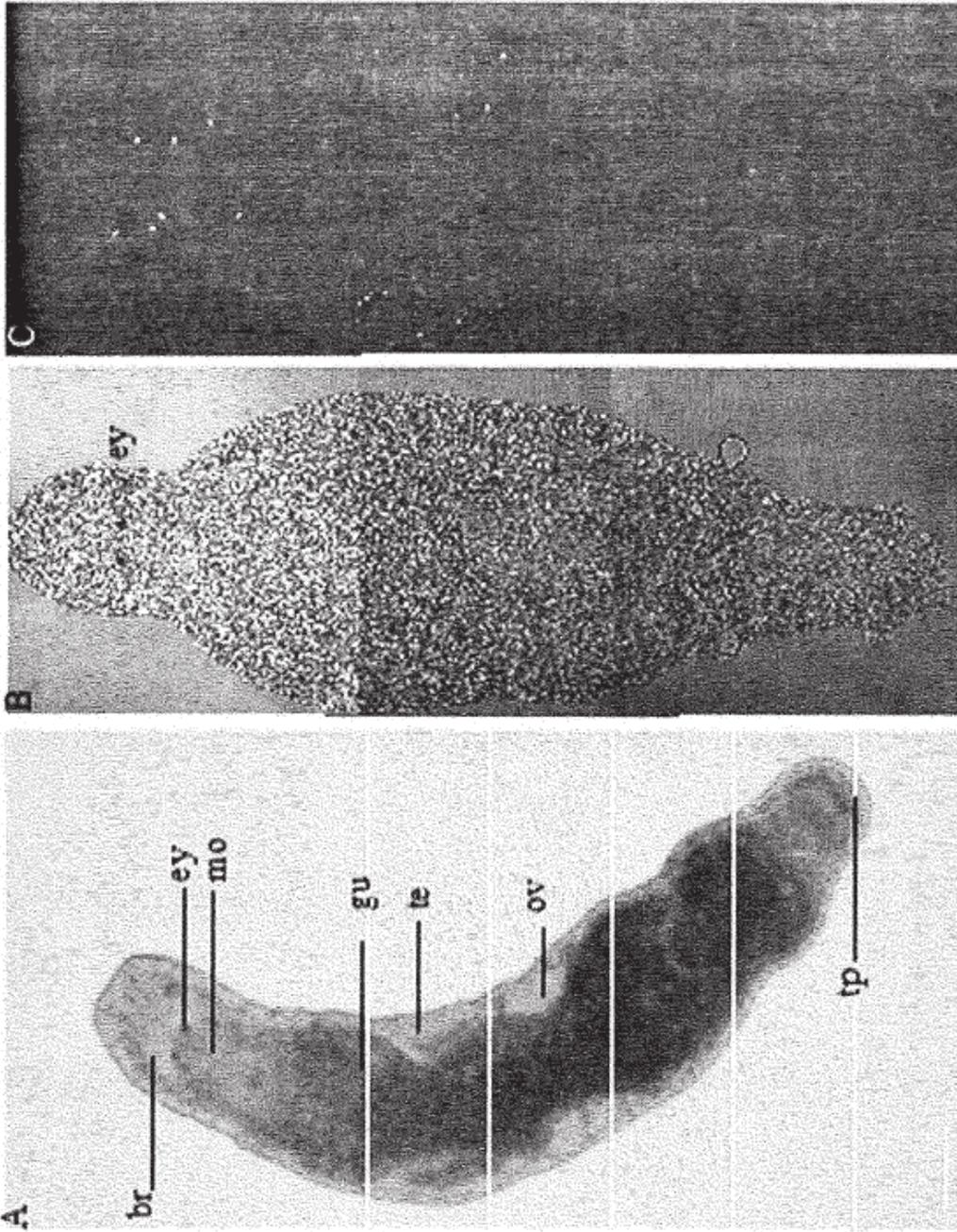


Figura 1

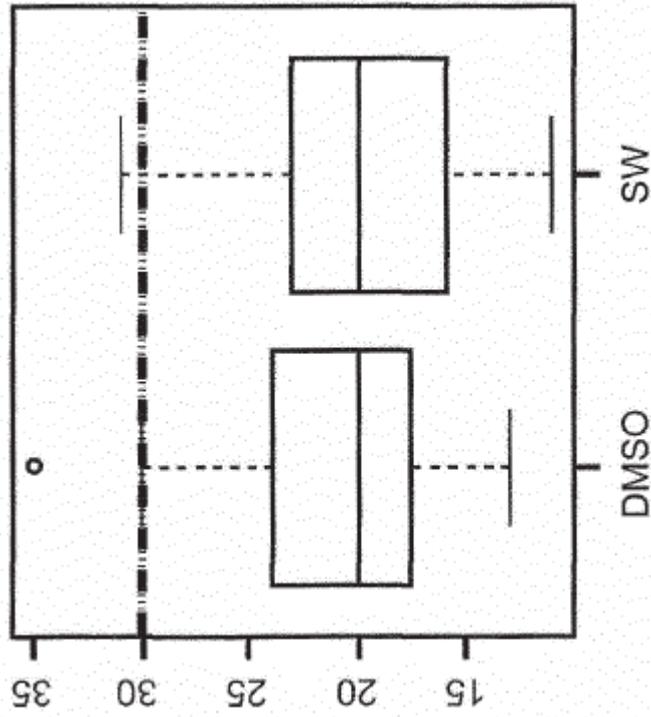
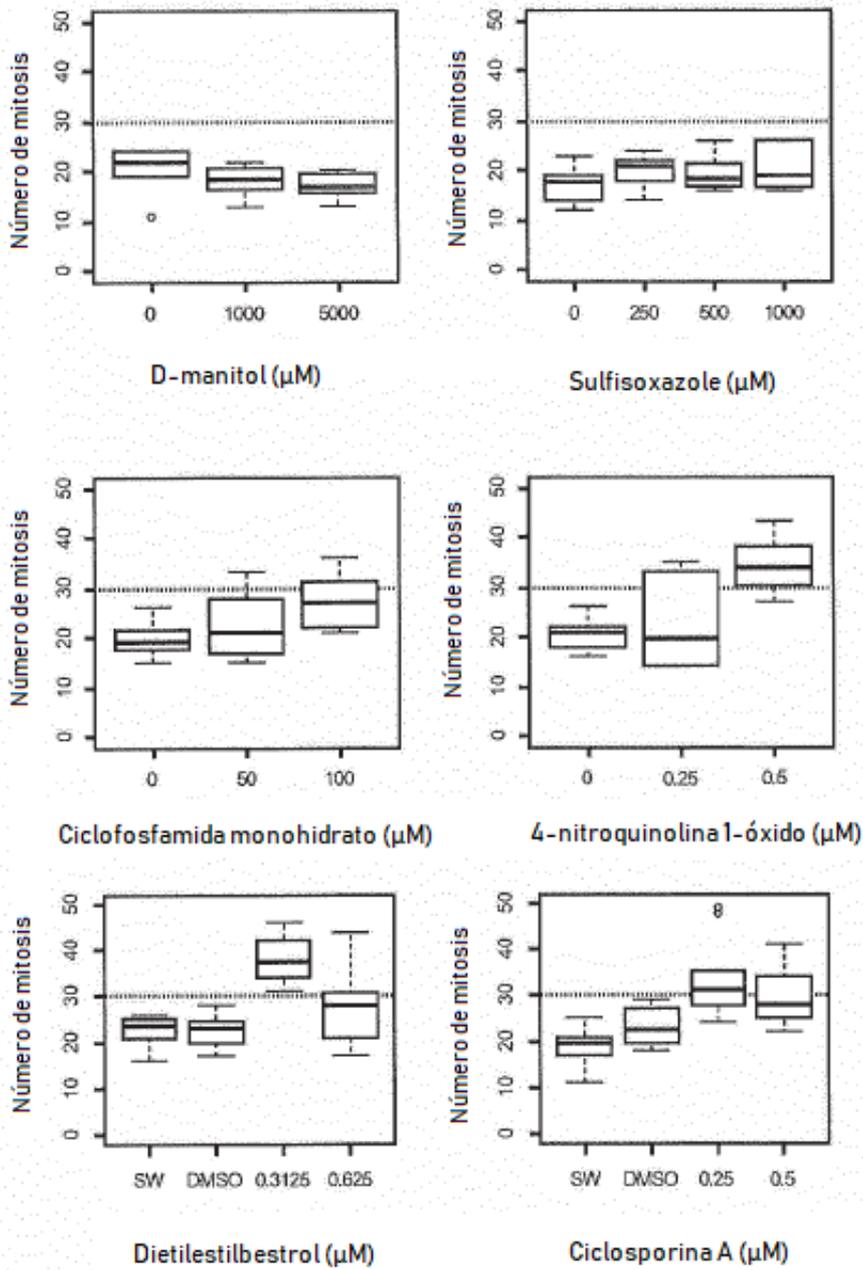
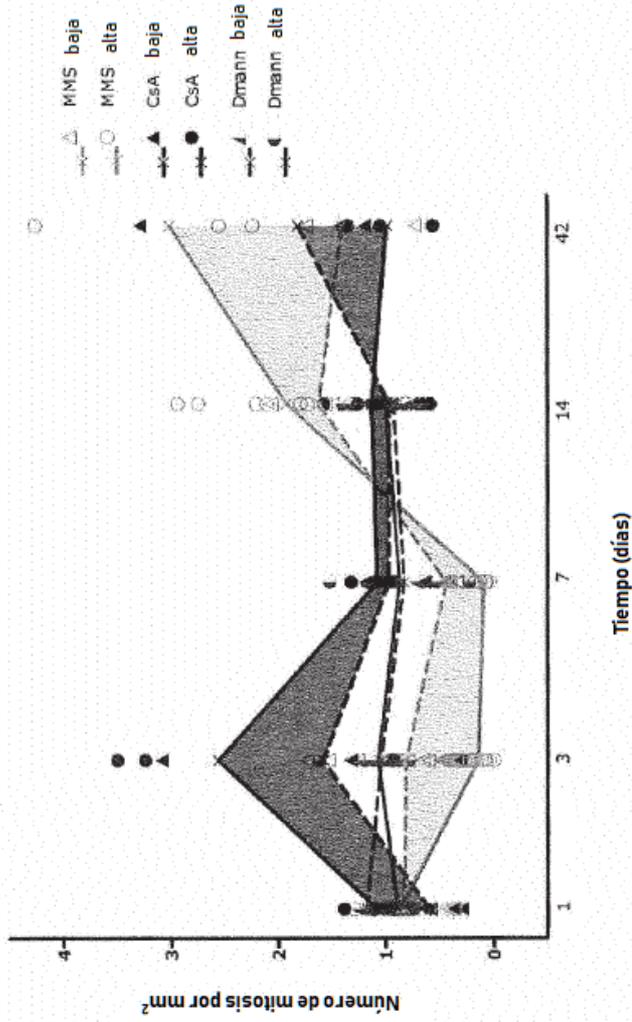


Figura 2

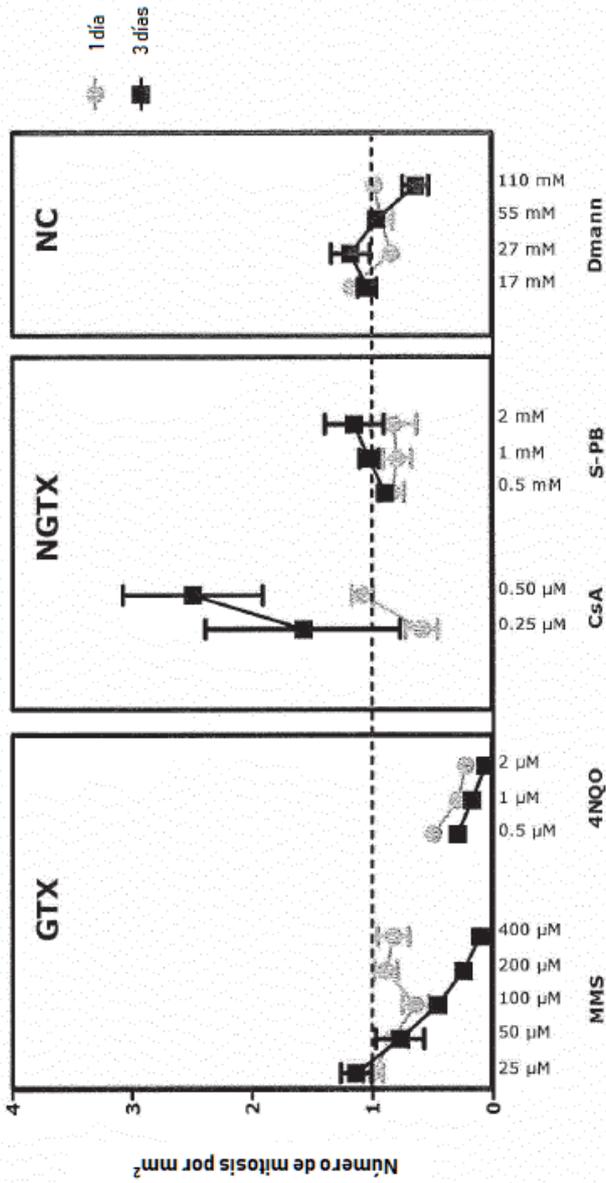
Figura 3





Compuesto (GTX, NGTX, NC)	Concentraciones altas vs. bajas	MMS vs. Csa	MMS vs. Dmann	Csa vs. Dmann
***	MMS: *** Csa: *** Dmann: NS	***	***	NS
1 vs. 3 días	MMS: *** Csa: ***	1 vs. 2 semanas	2 vs. 6 semanas	
MMS: *** Csa: ***	MMS: *** Csa: *	MMS: NS Csa: NS	MMS: NS Csa: NS	

Figura 4



1 día vs. 3 días				Aumento/reducción que depende de la concentración (3 días)			
MMS	4NQO	CsA	Dmann	MMS	4NQO	CsA	Dmann
***	***	**	NS	***	***	NS	NS
					*		NS
							NS

Figura 5

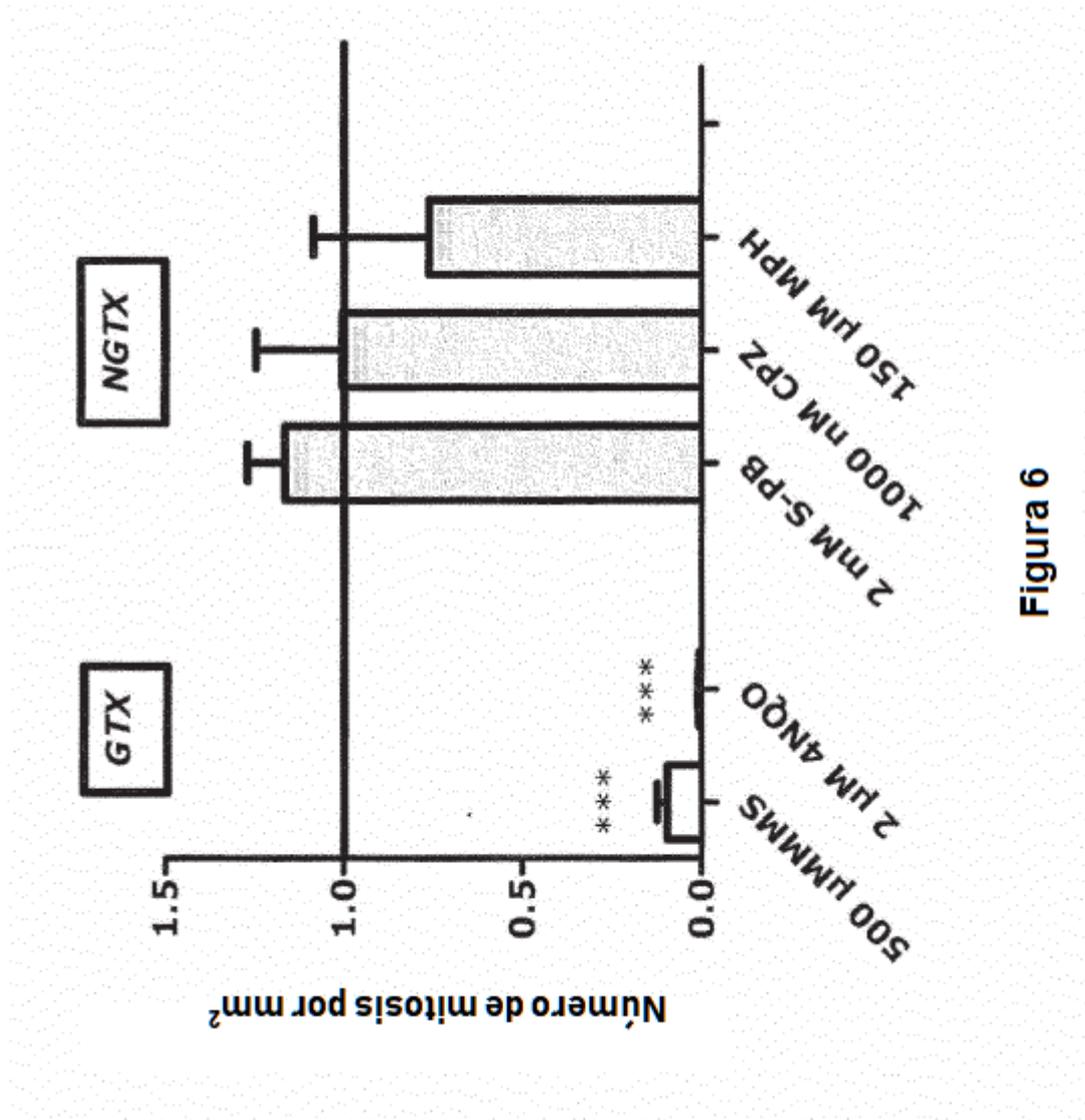


Figura 6