



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”

“ESTIMACIÓN DE LOS ROMPIMIENTOS DE CADENA
SENCILLA INDUCIDOS EN EL DNA DE LEUCOCITOS
HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA EXPUESTOS A
CASIOPEÍNA II-gly”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
DIANA FLORÍN RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE DE 2005





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó bajo la dirección del M. en C. Juan José Rodríguez Mercado, en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis dentro de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), que se encuentra a cargo del Dr. Mario A. Altamirano Lozano. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Se contó con el apoyo de CONACYT, proyecto SALUD C01-7677 y de la DGAPA, proyecto IN-212701.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de una manera muy especial a los miembros del jurado, quienes con sus observaciones y consejos ayudaron a enriquecer este trabajo:

M. en C. Rosalva Rangel Corona

Dr. Mario A. Altamirano Lozano

Dra. Elia Roldán Reyes

Biól. María Cristina Alvarado Domínguez

A la **Dra. Lena Ruiz**, por sus comentarios respecto al presente trabajo, por impulsar a los jóvenes estudiantes en la investigación y por el apoyo que siempre nos ha brindado.

AGRADECIMIENTOS

Me ha sido muy difícil expresar lo agradecida que estoy con las personas que siempre me han apoyado, y este es el momento ideal, para hacer saber que no tengo manera alguna de pagar...

...a mis padres, Eva y Carlos, por su tolerancia, comprensión, consejos, por enseñarme a luchar y a ser firme, por su apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado, les debo todo...

...a mis hermanos, Karla y Uriel, por su compañía y por ser mi fuente de inspiración...

...a mi abuelita Mamue, por ser como mi segunda madre...

...a mis tías Rosalva y Pilar, por sus consejos y apoyo incondicional...

...a mis Tíos Bartolomé, José y Héctor, por su apoyo, sus consejos, por su tiempo y por ser los mejores ejemplos de constancia a seguir...

...a mis tías Esther e Isabel, por todo su apoyo...

...a la E. Citlalli, por enseñarme a encontrar el lado divertido de los momentos difíciles...

...a Ariadna, Elena, Yeni, Alma y Diana, por permitirme recorrer junto con ustedes este largo y hermosísimo camino lleno de emociones llamado Biología...

...a Edgar, Arturo y Gerardo, por ser siempre la mejor compañía...

...a Betty, por toda tu ayuda...

...a todos y cada uno de mis maestros...

...al Doc Mario, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por el apoyo y consejos recibidos...

...a los miembros de la UNIGEN, por hacer propicio un ambiente cordial de trabajo y por la ayuda que siempre me brindaron...

... a mi maestro Juan José, por su asesoría incondicional, paciencia, apoyo, consejos, por su comprensión, en fin, por su valioso tiempo...

...infinitamente GRACIAS!!!

DEDICATORIA

A Karla, Uriel, a mi Mamá y a mi Papá...

...con todo mi amor.

A mis primos y sobrinos...

...esperando tener muchos momentos como este.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Cáncer	3
2.2. Quimioterapia y agentes antineoplásicos	4
2.3. Cobre	9
2.4. Casiopeínas	10
2.5. Casiopeína II-gly	12
2.6. Ensayo cometa	15
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19
4.1. General	19
4.2. Particulares	19
5. HIPÓTESIS	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1. Reactivos	21
6.2. Tratamiento de leucocitos	21
6.3. Viabilidad celular	22
6.4. Velocidad de efecto	23
6.5. Ensayo cometa	23
6.6. Análisis estadístico	24
6.7. Protocolo general	25
7. RESULTADOS	26
7.1. Viabilidad celular	26
7.2. Estimación de los rompimientos de cadena sencilla	27
7.3. Velocidad de efecto	32
8. DISCUSIÓN	35
8.1. Viabilidad celular	36
8.2. Estimación de los rompimientos de cadena sencilla	37
8.3. Velocidad de efecto	42
9. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS	46
10. REFERENCIAS	47

1. RESUMEN

En la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer, una nueva familia de compuestos con cobre denominados Casiopeínas[®] han sido sintetizados en la UNAM y actualmente tres de éstas (Cas I, II y III) han demostrado actividad anticancerígena *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, se tienen pocos datos acerca de los mecanismos involucrados en la respuesta biológica. Con el fin de conocer si la Casiopeína II-gly es capaz de interactuar con el DNA, en este estudio se trataron leucocitos humanos con diferentes concentraciones.

Se tomaron muestras de sangre periférica de cuatro donadores clínicamente sanos no fumadores (de 23 a 58 años de edad), se hicieron cultivos en tubos eppendorf con 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 y las diferentes concentraciones de Casiopeína II-gly (16.0, 8.35, 4.17, 2.75 y 1.43 µg/ml). Después de 3 horas de exposición, se evaluó la viabilidad celular y se determinó el daño al DNA con la técnica de electroforesis unicelular en gel a pH>13. También, se hicieron tratamientos de 10, 20, 30 y 60 minutos con 8.35 µg/ml de Casiopeína.

Los resultados en los cuatro donadores mostraron un comportamiento similar. La viabilidad celular disminuyó significativamente en los tratamientos de 3 horas con 8.35 y 16.00 µg/ml de Casiopeína II-gly, mientras que en los tratamientos de una hora con 8.35 µg/ml, este parámetro no se vio afectado.

El ensayo cometa mostró que la exposición durante 3 horas a la Casiopeína II-gly induce daño al DNA, a partir de la concentración de 2.08 µg/ml ($P<0.01$). Este daño se refleja en el incremento de la longitud de los cometas y en el aumento del número de células en las cuales el DNA migro completamente

fuera del núcleo, efecto que tiene un comportamiento dependiente de la concentración. Las diferencias estadísticas revelan que el fármaco ejerce daño sobre el DNA en concentraciones en las que no induce muerte celular, por lo que, el efecto observado se debe a la inducción de rompimientos de cadena y no a una consecuencia secundaria derivada de la toxicidad celular. En los tratamientos de 10, 20, 30 y 60 minutos con 8.35 µg/ml, las diferencias estadísticas aparecen a partir de 20 minutos de exposición ($P < 0.005$), efecto que sigue un comportamiento dependiente del tiempo.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la Casiopeína II-gly ejerce un efecto sobre la viabilidad celular en altas concentraciones sobre los leucocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro*. Este compuesto es capaz de inducir rompimientos de cadena sencilla, con un comportamiento dependiente del tiempo y de la concentración; a demás, la detección del daño en 20 minutos, indica que la Casiopeína II-gly es muy permeable a las membranas biológicas, por lo que sus efectos antiproliferativos pueden estar relacionados con el daño al material genético.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Cáncer

Hasta hace unas cuantas décadas, los casos de incidencia por enfermedades infecciosas ocupaban los primeros lugares en los programas de salud. Aunque en cierta medida se les ha controlado, este problema no ha desaparecido, pero si ha disminuido en forma considerable. Mientras, otros padecimientos como el cáncer han aumentado de manera importante (Ruiz *et al.*, 1994).

El cáncer, es la consecuencia de cambios en la conducta de las células provocados por modificaciones en la información genética, debido a estas alteraciones, las células cancerosas proliferan sin control y una de sus características es que tienen la capacidad de establecer tumores secundarios, lo que se conoce como metástasis. Es precisamente esta característica la que ha llamado la atención de los investigadores para buscar nuevas alternativas, que tienen como fin combatir la enfermedad (Chabner, 1990; Hellman y Vokes, 1996).

Muchos estudios sobre la incidencia del cáncer han señalado el papel del medio ambiente y los hábitos personales (la dieta y el abuso del tabaco) entre otros, como factores que incrementan el riesgo para desarrollar esta enfermedad. Algunos agentes físicos, químicos y biológicos como la radiación, los pesticidas y las micotoxinas, respectivamente, están involucrados en el proceso de la transformación celular y en la alteración del material genético (Klug y Cummings, 1999; Clayson, 2001).

La terapia establecida para el tratamiento del cáncer y la más utilizada es la cirugía. La eliminación quirúrgica de un tumor es rápida y efectiva, y es

considerada para un gran número de curas. Desafortunadamente, esta forma de tratamiento presenta varias desventajas, ya que, el remover la masa tumoral no garantiza la eliminación de células malignas, y si el tumor se encuentra adyacente a órganos vitales no puede ser extirpado, además de que no se puede utilizar en casos de metástasis (Alberts *et al.*, 2002; Hellman y Vokes, 1996).

La terapia con radiación es preferible y se propone para la mayoría de los casos. Con este método, el tumor es irradiado con rayos X o gamma, que causan suficiente daño al DNA para eliminar directamente las células, o bien, para inducir muerte celular como la apoptosis. Además de la conservación de tejidos normales, una ventaja que presenta sobre la cirugía es que se pueden eliminar extensiones microscópicas del tejido tumoral que con la cirugía no se pueden extraer, pero al igual que la cirugía, la radioterapia no puede ser utilizada en el tratamiento de metástasis, ya que se pueden dañar órganos sanos, en tales casos, los pacientes recurren a la quimioterapia, que es la administración de drogas con actividad anticancerígena (Lavelly y Poen, 1995; Alberts *et al.*, 2002; Hellman y Vokes, 1996).

1.2. Quimioterapia y agentes antineoplásicos

En un paciente para eliminar a la mayoría de las células neoplásicas, es posible la utilización en tratamientos repetidos, drogas que son tóxicas selectivamente para las células en división; generalmente una pequeña proporción de ellas es resistente a la droga y el efecto que ha tenido el tratamiento ha resultado ser el de favorecer la expansión y evolución de las células con esta característica (Alberts *et al.*, 2002; Blagosklonny, 2003).

Una gran parte de la investigación clínica se centra en el problema de cómo matar selectivamente las células cancerosas. Solo existen algunas pequeñas diferencias bioquímicas entre las células tumorales y las normales de proliferación rápida, como las del epitelio gastrointestinal, de médula ósea o la piel. Los niveles de enzimas y las velocidades de reacción difieren ligeramente entre las células malignas y las normales, son estas pequeñas diferencias cuantitativas las que se aprovechan por los métodos de tratamiento actuales (McLaughlin, 1995).

En relativamente pocos años, los fármacos utilizados en la quimioterapia se han clasificado en diferentes familias según su actividad bioquímica y origen (Muntoni, 1971; Tish *et al.*, 1984; Bergoglio, 1993; McLaughlin, 1995; Hellman y Vokes, 1996), formando dos grupos principales:

I. Especificidad del ciclo celular. Los agentes químicos suelen actuar durante una fase específica del ciclo celular, y en consecuencia, son agrupados en las siguientes categorías:

- a) Agentes de ciclo celular inespecíficos. Estos agentes son efectivos contra las células en cualquier fase ya sea pre-replicativa (fase G_1), pos-replicativa (fase G_2/M) o replicativa (fase S), y son útiles contra tumores que tienen baja actividad antiproliferativa.
- b) Agentes de ciclo celular específicos. Compuestos que inhiben o bloquean la división celular en alguna fase específica, ya sea G_1 , S o G_2/M , afectando diferentes funciones.

II. Mecanismo de acción. Esta clasificación implica el mecanismo por el cual se inhibe la proliferación celular y es importante debido a que es posible

combinar estos compuestos con diferentes modos de acción para aumentar los efectos antitumorales.

- a) Agentes alquilantes. Estos compuestos sustituyen átomos de hidrógeno por grupos alquilo, producen modificaciones tanto estructurales como funcionales; por ejemplo, la formación de entrecruzamientos en la cadena de DNA, lo cual, puede interferir con la replicación del DNA, la transcripción a RNA y por lo tanto la traducción a proteínas.
- b) Antimetabolitos. Son compuestos que interfieren en la función del metabolismo celular.
- c) Inhibidores mitóticos. Estos son alcaloides que inhiben la división celular, su efecto se debe a una alteración estructural y funcional del aparato mitótico.
- d) Antibióticos. Son un grupo de compuestos heterogéneos en cuanto a su estructura y mecanismo de acción, generalmente interfieren en la función o en la síntesis del DNA y en la transcripción a RNA.
- e) Hormonas. Las hormonas, y en particular las esteroides (que prácticamente constituyen la totalidad de las que tienen actividad antitumoral), no actúan indiscriminadamente sobre las células cancerosas, sino sobre determinados tipos de células, a las que estimulan o inhiben específicamente en su crecimiento. Por lo tanto, sólo los tumores que, derivados de estos tipos celulares conservan la sensibilidad originaria a las hormonas, pueden ser inhibidos de modo específico.

- f) Compuestos misceláneos. Este grupo de drogas actúan con una gran variedad de mecanismos de acción.

En la actualidad, nuevos medicamentos continúan apareciendo, y la mayoría de ellos son sintetizados a partir de las ideas con que se han desarrollado compuestos con actividad antineoplásica (Ruiz *et al.*, 1994), sin embargo, son muy pocos los que tienen probabilidad para ser utilizados en el tratamiento del cáncer.

La mayoría de los cánceres (de mama, pulmón, colorectal y de próstata), aún no son curables sólo con quimioterapia, en estos casos, la terapia con drogas puede ser una parte del tratamiento que incluye la cirugía y la radioterapia; además de que la mayoría de estos compuestos tienen efectos tóxicos secundarios como son anemia, diarrea, náuseas, vómito, caída de cabello y en un menor número de casos, daño en el sistema nervioso, así como problemas cardiovasculares (Hellman y Vokes, 1996). Este hecho ha estimulado el diseño, la síntesis y la evaluación de nuevos agentes con mayor actividad anticancerígena y una toxicidad reducida (Ruiz *et al.*, 1996).

El sueño de combatir una enfermedad es casi siempre alentada por el descubrimiento y uso apropiado de un fármaco. Este interés, hace posible que la investigación en quimioterapia siga progresando. En la producción de medicamentos, especialmente en los antineoplásicos, según Blagosklonny (2003), entre los años 1996 y 2001 el desarrollo y la investigación farmacéutica, han incrementado sus gastos en un 40% y la aprobación de nuevas drogas disminuyó casi el 50%. Los gastos llegan a ser hasta de 500 millones de dólares y requieren cerca de 10 años para colocar un nuevo componente en el mercado.

En este sentido, el desarrollo de un tratamiento se convierte en un proceso cada vez más complejo y tiene que estar basado en una detallada comprensión de su potencial para obtener una respuesta benéfica, además de su toxicidad aguda y tardía, ya que el uso apropiado de un agente en quimioterapia, depende principalmente del entendimiento de su mecanismo de acción (Chi-Jen, 1993). El diseño para el tratamiento del cáncer con drogas está planeado bajo un cierto número de consideraciones, entre los que se incluyen estudios de cinética celular, de farmacocinética, consideraciones farmacológicas y bioquímicas, pruebas de predicción *in vitro* e *in vivo* y lo más importante, conocer la sensibilidad patológica del tumor a fármacos específicos (Chabner, 1990).

Un gran número de pruebas se incluyen en la batería de estudios toxicológicos dentro del protocolo de fabricación de un nuevo fármaco y hay cinco principales áreas de investigación para realizar estudios de genotoxicidad: 1) estudios de toxicidad, con administración aguda o repetida periódicamente; 2) estudios de toxicología reproductiva, con pruebas más específicas de un posible impacto sobre la fertilidad o desarrollo embrionario; 3) pruebas de mutagenicidad, las que se realizan principalmente *in vitro* y que buscan frecuentemente efecto sobre tres puntos principales (mutaciones génicas, daño cromosómico y daño primario sobre el DNA); 4) estudios de carcinogenicidad, realizadas principalmente sobre roedores y 5) otras pruebas especiales, por ejemplo, reacciones alérgicas sobre la piel (Cordier, 1992).

En México, existe una creciente demanda por dar servicio a los enfermos con problemas de cáncer. El costo de la quimioterapia es, en ocasiones, una opción inaccesible para un gran número de pacientes (Ruiz *et al.*, 1994), la necesidad de

importación de estos productos y su costo muy elevado, hace que el desarrollo de agentes antineoplásicos adquiera prioridad. Precisamente los compuestos que han llamado la atención son aquellos que presentan una base de metal, los cuales incluyen mercurio (Hg), arsénico (As), oro (Au), plata (Ag), rutenio (Ru), vanadio (V) y **cobre** (Cu) (Sakurai *et al.*, 1995; Zhang y Lippard, 2003).

1.3. Cobre

El cobre es esencial para la sobre vivencia de plantas y animales, algunos estudios han mostrado que está involucrado en la función de varias enzimas entre las que se incluyen la tirosinasa (involucrada en la formación de melanina) y varias oxidases como citocromo oxidasa, superoxido dismutasa y amino oxidasa (Carson *et al.*, 1987; Olivares y Uauy 1996).

Algunos estudios confirman que este metal se requiere en cantidades apropiadas durante el crecimiento en humanos, en los niños para la maduración de las células blancas y rojas, para la resistencia de los huesos, metabolismo del colesterol y glucosa, desarrollo del cerebro, entre otros. Las condiciones ácidas del estomago facilitan la solubilidad del cobre permitiendo su paso a la sangre, en donde juega un papel importante en la incorporación de hierro en la hemoglobina. (Stokinger, 1981; Rojas, 1992; Furst *et al.*, 1998).

El contenido normal de este metal en la sangre es de 93 a 108 $\mu\text{g}/100\text{ml}$. Los casos de toxicidad por cobre en humano son raros, se producen con la ingesta de dosis superiores a 10 mg/día, causando náuseas, vómito y diarrea. Los efectos secundarios son daño en el tracto gastrointestinal, en casos extremos hay

hipertensión, pérdida del conocimiento, desmayos y coma (Stokinger, 1981; Carson *et al.*, 1987).

La deficiencia de cobre produce la enfermedad Menkes, en donde se ha observado que ocasiona alteraciones en el desarrollo mental, este padecimiento se debe a que la absorción o el transporte del metal son deficientes, lo que causa su distribución anormal en el organismo (Carson *et al.*, 1987; Rojas, 1992; Olivares y Uauy, 1996). Por otro lado, la acumulación excesiva de cobre trae como consecuencia la enfermedad de Wilson, que generalmente es acompañada de cirrosis hepática, daño en los riñones y acumulación del metal en la córnea (Carson *et al.*, 1987; Rojas, 1992), estas enfermedades son poco comunes.

No existe evidencia de que el cobre sea teratogénico o carcinogénico (Carson *et al.*, 1987). El cobre inorgánico (CuSO_4) se considera un mutágeno de acción débil capaz de inducir rompimientos en el DNA mediados posiblemente por estrés oxidante (Guecheva *et al.*, 2001). Algunos estudios reportan que este elemento tiene efectos anticancerígenos, reducen el crecimiento y el tamaño de tumores malignos (Aaseth y Norseth, 1986), característica que lo llevó a su selección como centro metálico para el diseño de los nuevos compuestos antineoplásicos y al ser un metal esencial, se espera que su toxicidad sea menor a la de los complejos de Pt (platino), como el cis-Pt o el carbo-Pt (Pratt y Ruddon, 1979; Bravo *et al.*, 2002).

1.4. Casiopeínas

En la década de los setenta, en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se diseñaron una serie de compuestos con la idea de que los metales junto con moléculas orgánicas (tomando como modelo la

molécula de cis-Pt) pudieran llegar a interactuar con el DNA de las células cancerosas, interrumpiendo así su proliferación incontrolada (Ruiz *et al.*, 1994, Ruiz *et al.*, 1996; González, 2004). La actividad antitumoral de algunos de estos compuestos fue comprobada durante la década de los ochenta, en ensayos *in vivo*, basados en protocolos internacionales y posteriormente fueron patentados y registrados a nombre de la UNAM en el año de 1992 con el nombre de **CASIOPEÍNAS[®]**. De los más de cien compuestos patentados, las Casiopeínas I, II y III son las más prometedoras, ya que han demostrado una aceptable actividad antineoplásica en diferentes sistemas tanto *in vitro* como *in vivo* (Bravo *et al.*, 2002; Fuentes *et al.*, 2003; Tovar *et al.*, 2004).

Los avances más recientes sobre la actividad cancerígena de las casiopeínas, se dieron a conocer recientemente en el 1er Congreso Nacional de Química Médica, dedicado a la investigación en cáncer. Algunos de los resultados presentados han sido satisfactorios, pues se ha reportado en una evaluación por medio de citometría de flujo, que las casiopeínas II-gly, III-Ha, III-ia y 5-6-dimetilfenantrolina inducen apoptosis y necrosis en células Hela. También se comprobó que hay muerte por apoptosis en las células neoplásicas de la enfermedad de Marek en gallinas tratadas con la Casiopeína III-ia (Calderón *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004).

Sobre las aportaciones de la toxicidad producida por la Casiopeína III-ia, se tiene que, corazones aislados de ratas disminuye la actividad contráctil del corazón, en perros producen crisis respiratoria así como problemas cardiovasculares y edema pulmonar. En cuanto a efectos sobre el desarrollo, se sabe que induce

toxicidad materna, también alteraciones en el desarrollo esquelético normal, así como toxicidad en embriones y fetos, de hembras preñadas de la cepa CD-1 con una relación dosis-dependiente (García *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2004; Bocanegra y Altamirano, 2004).

Un aspecto importante de resaltar, son los efectos genotóxicos y mutagénicos. Estudios realizados *in vivo* en ratón, revelaron que Casiopeína III-ia induce un incremento en la frecuencia de intercambios de cromátidas, mientras que, pruebas de mutagenicidad en el modelo de *Drosophila*, muestran que compuestos de la familia II producen alteraciones en ojos y alas (Ruiz *et al.*, 1993, 1995; Tovar *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 2004).

Como agentes antineoplásicos, han presentado actividad antitumoral *in vivo* las casiopeínas I y III en las líneas L1210, S180, B16 y LW1 de murino, además de inhibir el crecimiento de las líneas tumorales humanas Hela y Calo, también se ha determinado que el compuesto III-ia tiene gran efectividad frente a tumores mamarios espontáneos y en meduloblastoma (Ruiz *et al.*, 1993; 1995).

Después de efectuar estudios sobre la actividad antineoplásica de las casiopeínas, por su selectividad ante leucemias y células de carcinomas, se eligieron los compuestos más prometedores, estos últimos se encuentran entre las familias II y III (González, 2004).

1.5. Casiopeína II-gly

Dentro de la familia II, se encuentra la Casiopeína II-gly (Figura I); que es un polvo fino color azul intenso, con una densidad aparente de 0.425 g/ml, un tamaño de partícula > 40 y < 50 micras (Fuentes *et al.*, 2004). Tiene un peso

molecular de 425.891 g/mol, muestra estabilidad en agua y en estado sólido, también en condiciones de refrigeración por lo menos durante 21 días, se degrada fácilmente cuando se expone a la luz, es inestable a pH alto y pH bajo, debido a que el estómago tiene un pH aproximadamente de 1, esta casiopeína no puede ser administrada por vía oral (Ferrer *et al.*, 1994). Se sabe que la dosis letal media (DL₅₀) es de 16.7 mg/Kg por vía intravenosa en ratones de la cepa NIH (Gracia *et al.*, 1994).

En el 1^{er} Congreso Nacional de Química Médica (2004), se dio a conocer que la Casiopeína II-gly tiene la capacidad de disminuir el índice de proliferación e inducir un ligero incremento en la frecuencia de micronúcleos en el sistema de linfocitos humanos, a demás de presentar un potencial citostático ligeramente mayor al del cis-Pt. Otros estudios, reportaron que este compuesto inhibe significativamente la proliferación celular e induce muerte celular por apoptosis y necrosis de manera dosis-dependiente con actividad de caspasas, en células de glioma C6 de rata y células Hela, e *in vivo*, en ratones *nu/nu* con tumores genotransplantados el volumen tumoral disminuye después de la administración de la casiopeína (Atilano y Roldán, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004; Carvallo *et al.*, 2004; Trejo *et al.*, 2005).

Sobre la toxicidad del químico en órganos, en un estudio utilizaron como modelo corazones aislados de rata Wistar, en donde se observó que este compuesto afectó la función mecánica del órgano disminuyendo su actividad contráctil con un comportamiento dependiente de la dosis y del tiempo (Hernández 2004).

Marín y colaboradores (2003) demostraron que esta casiopeína interactúa directamente con las mitocondrias aisladas de riñón, hígado y corazón de ratas

Wistar, produciendo una disminución en la respiración y en el contenido de ATP, hasta en un 50% con una concentración de 10 μM .

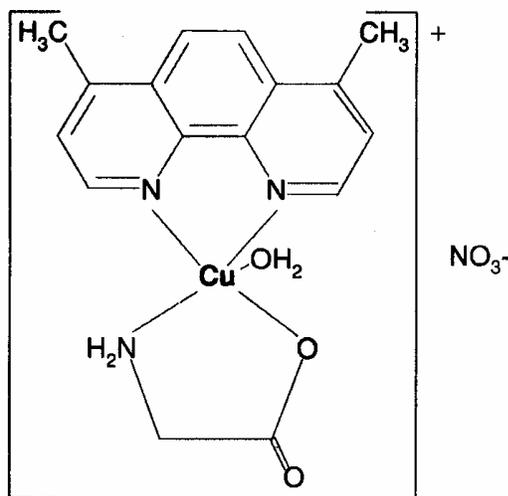


Figura I. Estructura química de la Casiopeína II-gly Acua [(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, glicina cobre II) nitrato] (Tomado de Reyes *et al.*, 2003).

Reportes previos en el laboratorio sobre la toxicidad a nivel reproductivo, mostraron que la administración de 4.4 mg/Kg Casiopeína II-gly induce micronúcleos en hembras preñadas (Santiago, 2004) y toxicidad en los fetos de la cepa de ratones CD-1, cuando el tratamiento se da del día 6 al 15 de gestación, reflejados como malformaciones esqueléticas (González, 2004).

El efecto tóxico reproductivo en machos, también estudiado en ratones de la cepa CD-1 con administración intraperitoneal de 2.2 mg/Kg, no afectó la producción de espermatozoides, pero sí la viabilidad y la movilidad, además de que se encontraron variaciones hormonales (progesterona y testosterona), lo que se atribuye a una disrupción endocrina (Castañeda *et al.*, 2004).

Como agente antineoplásico se ha probado en las líneas celulares: L1210 de leucemia murina, CH1 de carcinoma ovárico humano y de cérvix, células HeLa, células CaLo, y otras, en donde, también produce apoptosis y necrosis (Ruiz *et al.*, 1995; De Vizcaya *et al.*, 2000; Fuentes *et al.*, 2004). Siendo la Casiopeína II-gly una de las que presentan mayor efectividad anticancerígena. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios con los que sea posible detectar daño en el material genético, para conocer si la actividad sobre el DNA es la causa de sus efectos.

1.6. Ensayo cometa

Con la metodología del ensayo cometa o electroforesis unicelular en gel en condiciones alcalinas, el daño al DNA puede ser estudiado tanto *in vivo* como *in vitro* en una gran variedad de células que se encuentren quiescentes (fase G₀) o en proliferación. Esta técnica es relativamente rápida, simple y altamente sensible. El principio básico es que cuando el DNA se encuentra dañado y es desnaturalizado en un medio alcalino, los fragmentos se desplazan desde el núcleo hacia el ánodo bajo la corriente de un campo eléctrico, adoptando la apariencia de un cometa, con su corazón y su estela (Figura II). El cometa puede visualizarse con colorantes fluorocromados y su longitud puede medirse con una escala ocular adaptada a un microscopio de fluorescencia (Singh *et al.*, 1988; McGregor *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 1999; Singh, 2000; Tice *et al.*, 2000).

El método original desarrollado por Singh y colaboradores (1988), se ha modificado en varias ocasiones para mejorar la reproducibilidad y sensibilidad, y así, mejorar también los objetivos en estudio de daño al DNA. También se han desarrollado diferentes propuestas para ampliar el rango de los tipos de daño en el material genético (Fairbairn *et al.*, 1995).

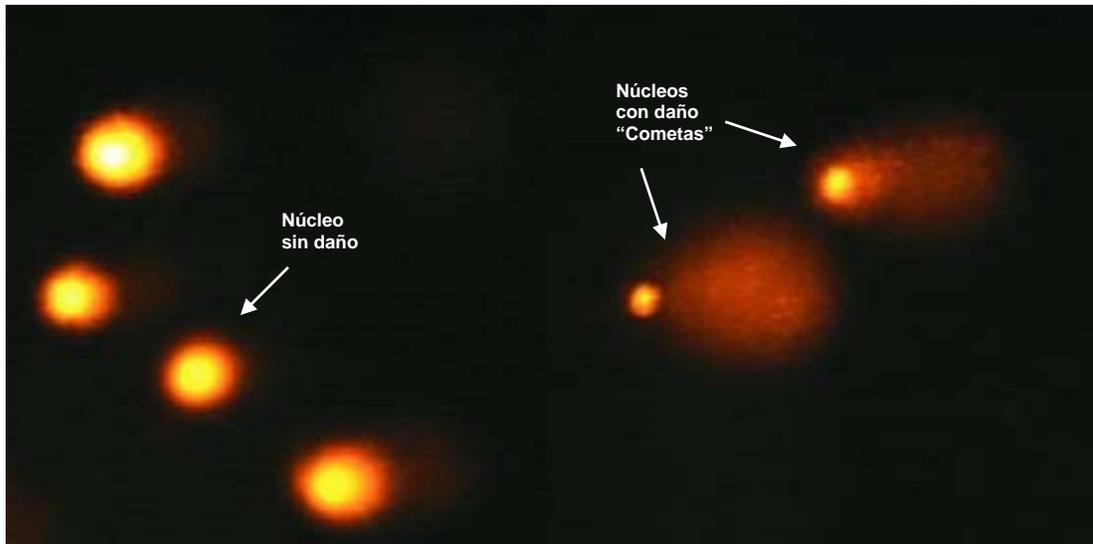


Figura II. Fotomicrografía de núcleos de linfocitos humanos por el ensayo cometa (Tomado de: www.egms.de/egms/servlet/ Figure?id=cto, 2005).

Además de evaluar rompimientos de cadena sencilla, esta metodología presenta ciertas ventajas: i) Es posible investigar la extensión del DNA roto en virtud del tejido animal experimental o de los especímenes de biopsias en humanos, puesto que se requiere una pequeña cantidad de células (de 1 a 10 000), ii) El procedimiento puede llevarse a cabo en unas cuantas horas y si se cuenta con un analizador de imagen, los resultados se pueden evaluar inmediatamente (McKelvey *et al.*, 1993); iii) puede ser usado para observar rompimientos de cadena sencilla o doble, daño en las bases, entrecruzamientos intercadena y fragmentos apoptóticos; iv) se pueden utilizar anticuerpos para detectar aductos o hibridación con fluorescencia *in situ* o para marcar secuencias específicas ampliando su aplicación a otros niveles (Olive, 2000). Una de las ventajas más importantes es que posee la capacidad para detectar daño en cada célula, haciendo posible identificar subpoblaciones resistentes o sensibles a agentes dañinos para el DNA y también

tiene la facilidad de aplicarse en combinación con otras técnicas, para así obtener mayor información (Olive *et al.*, 1992; Tice, 1995).

Algunos investigadores han encontrado utilidad en el ensayo cometa para realizar estudios, ya que no solo se limita a células de mamíferos, sino también en peces y gusanos de tierra expuestos a la contaminación ambiental (McKelvey *et al.*, 1993) y además en células vegetales como de raíz de *Vicia faba*, *Alium sp* entre otros (Rojas *et al.*, 1999).

1. JUSTIFICACIÓN

El cáncer se ha convertido en un problema sanitario de primer orden y con el agravante de que tanto su incidencia como su mortalidad aumentan, mientras se buscan nuevas alternativas y se diseñan nuevos fármacos para combatir esta enfermedad. En México existe una creciente demanda por dar servicio a los pacientes con cáncer, sin embargo, el costo de la quimioterapia hace inaccesible esta opción a un gran número de pacientes. El desarrollo de las casiopeínas, que son compuestos con cierta actividad antiproliferativa, han mostrado ser menos tóxicos y de menor costo en comparación con los agentes utilizados convencionalmente en la quimioterapia. Entre estos compuestos se encuentra la Casiopeína II-gly, que es uno de los que ha mostrado mayor actividad antineoplásica, sin embargo, es necesario realizar estudios que ayuden a comprender el mecanismo por el cual estos compuestos impiden la proliferación celular.

Se han descrito diversas metodologías que permiten cuantificar el daño al DNA, una de las más usadas es ensayo cometa. Esta prueba es sensible, rápida y requiere un pequeño número de células, es considerada un buen indicador de daño biológico, a demás, se incluye como una prueba que permite comprender en el mecanismo de acción de nuevas drogas, como lo es la interacción entre los agentes antineoplásicos y el DNA (Rojas *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000).

Por lo arriba citado, en el presente trabajo se propuso estudiar el daño al DNA que sea capaz de inducir la Casiopeína II-gly en un modelo *in vitro*.

1. OBJETIVOS

1.1. General

Estudiar el efecto de la Casiopeína II-gly sobre la viabilidad celular y sobre el DNA de leucocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro*.

1.2. Particulares

- I. Determinar el efecto sobre la viabilidad en los leucocitos tratados con diferentes concentraciones de Casiopeína II-gly utilizando dos colorantes fluorocromados.
- II. Estimar los rompimientos de cadena sencilla en los leucocitos tratados con diferentes concentraciones de Casiopeína II-gly, mediante electroforesis unicelular en gel en condiciones alcalinas.
- III. Determinar el tiempo mínimo (velocidad de efecto) que requiere la Casiopeína II-gly para inducir rompimientos de cadena sencilla por medio del Ensayo Cometa.

1. HIPÓTESIS

Las casiopeínas han mostrado actividad antineoplásica en células normales y transformadas en sistemas de prueba *in vivo* e *in vitro*. Los estudios de genotoxicidad de estos compuestos son fundamentales, sin embargo, los datos relacionados con el daño genético y celular son limitados. Por lo que, si tratamos células normales *in vitro* con Casiopeína II-gly, entonces, podemos esperar que este compuesto sea capaz de producir toxicidad celular, así como daño al DNA en forma de rompimientos de cadena sencilla.

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1. Reactivos

La Casiopeína II-gly “Acua [(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, glicina cobre II) Nitrato]” utilizada para este estudio, fue proporcionada por el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química, UNAM, encabezado por la Doctora Lena Ruiz (lena@servidor.unam.mx).

El medio de cultivo RPMI-1640, los geles de agarosa, la solución amortiguadora de fosfatos (PBS libre de calcio y magnesio), los reactivos cloruro de sodio (NaCl), etilendiamintetracetato di sódico (EDTA-Na₂), base trizma (Tris), tritón X-100, dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxido de sodio (NaOH), bromuro de etidio y diacetato de 5-6 carboxifluoresceína, utilizados en este estudio fueron obtenidos de la compañía de químicos Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA. El etanol absoluto por J. T. Baker, México y la Heparina por Industria Farmacéutica PISA, México.

1.2. Tratamiento de leucocitos

Por venopunción, con una jeringa heparinizada, se extrajo sangre periférica de cuatro donadores clínicamente sanos, de diferentes edades. En tubos eppendorf se colocaron 20 µl de sangre con 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 cada uno, y las diferentes concentraciones de Casiopeína II-gly, las cuales, fueron establecidas tomando como referencia la dosis letal media (DL₅₀) en ratón de la cepa NIH administrada de manera intravenosa, y que es de 16.7 mg/kg de peso (Gracia *et al.*, 1994). Las concentraciones empleadas fueron: 1.04, 2.08, 4.17, 8.35 y 16.0 µg/ml.

Los microcultivos se incubaron a 37°C durante 3 horas. Se contó con un Testigo (al que no se administro casiopeína). Concluido el tiempo de incubación, las células se recuperaron por centrifugación (4 minutos a 3000 rpm). El botón celular se resuspendió y se dividió en dos partes; una se utilizó para analizar la viabilidad celular y la otra para hacer las láminas que fueron procesadas de acuerdo con el ensayo cometa. En todos los casos, por cada concentración evaluada se sembró un cultivo y su duplicado.

1.3. Viabilidad celular

En cada cultivo se evaluó la viabilidad, utilizando la técnica con colorantes fluorocromados descrita por Tice y colaboradores (1996). Al final del tiempo de tratamiento, se resuspendieron 10 µl de la suspensión celular en 10 µl de la solución de dos fluorocromos. Esta última, fue preparada con bromuro de etidio (0.025 µg/ml) y di acetato de 5-6 carboxifluoresceína (0.125 µg/ml) en una proporción 1:1. Después de 5 minutos de incubación, se realizaron tres lavados con 1 ml de medio de cultivo. Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2, utilizando un filtro de excitación de luz de 450-490 nm. Se evaluaron 200 células por tratamiento, distinguiendo las vivas, las cuales metabolizan el 5-6-di acetato de carboxifluoresceína a un componente fluorescente que tiñe el citoplasma de verde, de las no viables, en las que el bromuro de etidio tiñe el núcleo de color rojo cuando la membrana celular se encuentra dañada.

1.4. Velocidad de efecto

Para determinar el tiempo mínimo que requiere la casiopeína para inducir rompimientos de cadena sencilla, se eligió una concentración a la que se obtuvo un efecto positivo en los experimentos anteriores, la cual fue de 8.35 µg/ml.

Después de extraer sangre de dos donadores y aplicar 8.35 µg/ml de casiopeína, los cultivos se incubaron durante 10, 20, 30 y 60 minutos. Al terminar cada tratamiento, las células se colectaron por centrifugación e inmediatamente después se prepararon los microgeles para la electroforesis. Al igual que en caso anterior, los cultivos se realizaron por duplicado.

1.5. Ensayo cometa

Las células tratadas fueron embebidas en 75 µl de gel de bajo punto de fusión (0.5%), el cual, fue colocado sobre un portaobjetos esmerilado y que previamente se preparó con una capa de 110 µl de gel de punto de fusión normal (1%). Se agregó una tercera capa de 75 µl gel de bajo punto de fusión. Entre cada capa de gel se colocó un cubreobjetos para homogeneizar la misma, y una vez que solidificó fue retirado.

Las preparaciones fueron sumergidas por no más de 24 horas en una solución de lisis fresca y fría (NaCl 2.5 M, EDTA-Na₂ 100 mM, Tris 10 mM, tritón X-100 al 1% y DMSO al 10%, a pH 10 y a 4°C). Después, se colocaron durante 20 minutos en una cámara de electroforesis horizontal (20-25 Gibco BRL Life Technologies Inc.), la cual fue llenada hasta que las laminillas quedaran cubiertas con una solución amortiguadora (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM) a pH>13, y al terminar este tiempo se conectó la corriente eléctrica 20 minutos a 25 Volts

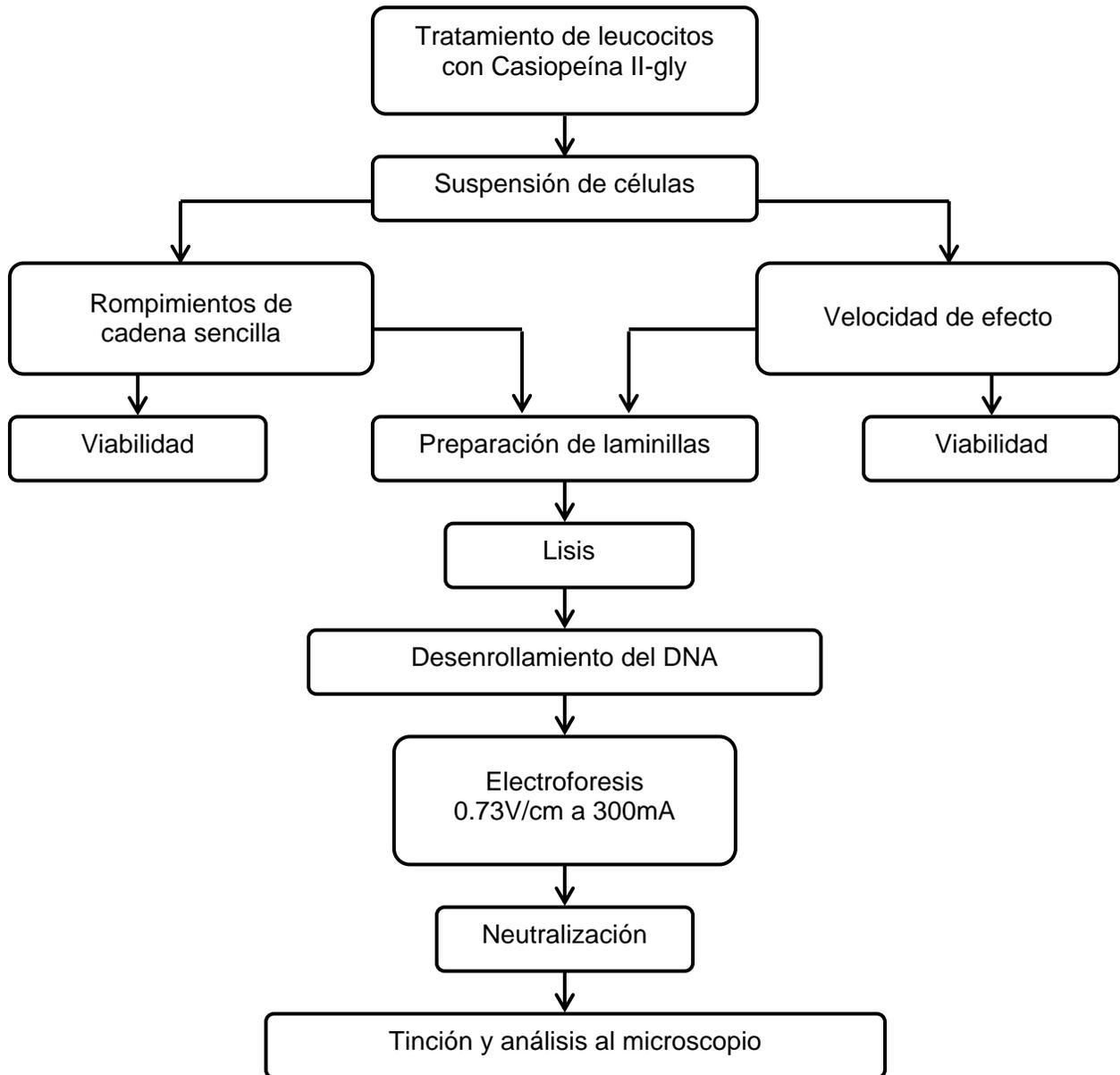
(0.73V/cm) y 300 mA. Para neutralizar las condiciones alcalinas, al concluir la electroforesis las laminillas se transfirieron a una solución de tris (0.4 M a pH 7.5) y se realizaron tres lavados de 5 minutos con esta solución. Finalmente las preparaciones se deshidrataron 5 minutos en etanol absoluto frío y se dejaron secar al aire.

Para estimar los rompimientos de cadena sencilla, se realizó la tinción de los núcleos con 75 μ l de bromuro de etidio (de una solución de 20 μ g/ml). Los cometas se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2 equipado con un filtro G-2A y una escala ocular, con la cual, se midió la longitud total de los cometas a 400 aumentos. Se evaluaron los núcleos con estela, los núcleos sin estela y el DNA que se desplazó completamente de la región del núcleo, este último considerado como daño severo o nubes. Se analizaron 100 núcleos por concentración, un total de 200 núcleos por tratamiento.

1.6. Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo Testigo se determinaron con estadística no paramétrica. Para la media de la longitud total de los cometas se utilizó *U* de *Mann-Whitney*, mientras que para la viabilidad celular y los núcleos con daño severo se utilizó la prueba de *ji cuadrada*. (Marques, 1991; Infante y Zárate, 1997; Devore, 2001).

1.7. Protocolo general



1. RESULTADOS

Las muestras de sangre periférica se tomaron de cuatro donadores clínicamente sanos, no fumadores. Los resultados se presentan de acuerdo al orden en que se tomaron las muestras: Donador 1 (mujer de 23 años), Donador 2 (hombre de 24 años), Donador 3 (hombre de 58 años) y Donador 4 (mujer de 50 años).

1.1. Viabilidad celular

En la tabla I se muestran los resultados de la viabilidad de los leucocitos expuestos durante 3 horas a la Casiopeína II-gly. La comparación entre el grupo Testigo y los grupos tratados de los cuatro donadores, no muestra diferencias estadísticas utilizando la prueba *ji cuadrada* con la fórmula corregida de Yates, sin embargo, se puede observar una tendencia a disminuir la proporción de células viables conforme aumenta la concentración, con diferencias estadísticas en los tratamientos de 8.35 y/o 16.00 µg/ml.

Tabla I. Viabilidad* de leucocitos tratados con diferentes concentraciones de Casiopeína II-gly

Tratamiento con Casiopeína II-gly	Donador 1	Donador 2	Donador 3	Donador 4
Testigo	188 (100)	200 (100)	194 (100)	190 (100)
1.04 µg/ml	178 (94.68)	196 (98.00)	192 (98.96)	186 (97.89)
2.08 µg/ml	166 (88.29)	186 (93.00)	190 (97.93)	186 (97.89)
4.17 µg/ml	162 (86.17)	186 (93.00)	180 (92.78)	182 (95.78)
8.35 µg/ml	124 (65.95) ^a	170 (85.00) ^a	176 (90.72)	170 (89.47)
16.00 µg/ml	102 (54.25) ^a	150 (75.00) ^a	164 (84.53) ^a	160 (84.21) ^a

* 200 células analizadas por tratamiento de cada donador (porcentaje de células vivas)

^a $P < 0.005$ comparado con su Testigo

En cuanto a la velocidad de efecto, la viabilidad celular se evaluó solo a los 60 minutos de tratamiento, y los resultados revelaron que para el donador 3 sobrevivieron 188 (94%) células contra 200 de su Testigo, mientras que para el donador 4 también se encontraron 200 células del Testigo y 194 (97%) expuestas a la casiopeína, por lo que la viabilidad no se vio afectada estadísticamente con 8.35 µg/ml del compuesto y 1 hora de tratamiento.

1.2. Estimación de los rompimientos de cadena sencilla

El número de cometas y de núcleos con daño severo (nubes) encontrados en 200 núcleos analizados por concentración de casiopeína (y por cada donador), después de 3 horas de incubación, se muestran en la tabla II. En todos los casos, se puede apreciar que el número de cometas disminuye conforme se incrementa la concentración, de la misma manera el número de nubes aumenta de manera dependiente de la concentración. Este comportamiento es similar en los cuatro donadores.

Las diferencias estadísticas calculadas para el número de nubes por medio de la prueba *ji cuadrada* con la fórmula corregida de *Yates*, muestran diferencia a partir de la concentración de 2.08 µg/ml en el donador 1, 3 y 4 y a partir de la concentración de 4.17 µg/ml con el donador 2. Estos datos siguen un comportamiento dependiente de la concentración.

La evaluación de los rompimientos de cadena sencilla interpretada en la longitud de la media de los cometas se presenta en la tabla II. Las diferencias estadísticas entre los grupos Testigo y los tratados con Casiopeína II-gly se analizaron con la prueba *U* de *Mann-Whitney*. Las diferencias calculadas para la longitud de los cometas en comparación con la frecuencia de nubes, se dan en las

Tabla II. Proporción de cometas y nubes inducidos en leucocitos humanos por la Casiopeína II-gly, después de 3 horas de tratamiento y evaluación de la longitud de los cometas.

Tratamiento con Casiopeína II-gly	200 núcleos analizados		Longitud de cometas en μm (Media \pm EE)
	Cometas	Nubes	
<i>Donador 1</i>			
Testigo	199	1	24.27 \pm 1.74
1.04 $\mu\text{g/ml}$	192	8	27.40 \pm 1.98
2.08 $\mu\text{g/ml}$	189	11 ^b	35.20 \pm 2.56 ^b
4.17 $\mu\text{g/ml}$	179	21 ^c	56.80 \pm 4.25 ^d
8.35 $\mu\text{g/ml}$	130	70 ^c	69.00 \pm 5.05 ^d
16.00 $\mu\text{g/ml}$	73	127 ^c	80.10 \pm 6.37 ^d
<i>Donador 2</i>			
Testigo	199	1	22.40 \pm 1.59
1.04 $\mu\text{g/ml}$	197	3	26.78 \pm 1.91
2.08 $\mu\text{g/ml}$	199	1	27.82 \pm 1.97
4.17 $\mu\text{g/ml}$	181	19 ^c	36.02 \pm 2.68 ^d
8.35 $\mu\text{g/ml}$	167	33 ^c	51.60 \pm 3.88 ^d
16.00 $\mu\text{g/ml}$	114	86 ^c	71.89 \pm 6.73 ^d
<i>Donador 3</i>			
Testigo	199	1	27.54 \pm 1.95
1.04 $\mu\text{g/ml}$	195	5	30.93 \pm 2.21
2.08 $\mu\text{g/ml}$	191	9 ^b	35.23 \pm 2.54 ^a
4.17 $\mu\text{g/ml}$	186	14 ^c	45.69 \pm 3.35 ^d
8.35 $\mu\text{g/ml}$	136	64 ^c	49.25 \pm 4.22 ^d
16.00 $\mu\text{g/ml}$	76	124 ^c	73.73 \pm 6.45 ^d
<i>Donador 4</i>			
Testigo	200	0	22.14 \pm 1.56
1.04 $\mu\text{g/ml}$	195	5	26.00 \pm 1.86
2.08 $\mu\text{g/ml}$	191	9 ^b	31.78 \pm 2.29 ^a
4.17 $\mu\text{g/ml}$	190	10 ^c	49.00 \pm 3.55 ^d
8.35 $\mu\text{g/ml}$	135	65 ^c	79.09 \pm 4.80 ^d
16.00 $\mu\text{g/ml}$	69	131 ^c	77.53 \pm 6.33 ^d

EE, error estándar

^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$; ^c $P < 0.005$; ^d $P < 0.001$, comparado con su Testigo

mismas concentraciones. En el donador 1, 3 y 4 se encontró diferencia estadística a partir de la concentración de 2.08 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para el donador 2 las diferencias aparecen a partir de la concentración de 4.17 $\mu\text{g/ml}$ de casiopeína. En general, se observa que la media de la longitud de los cometas incrementa al aumentar la concentración, de dos punto siete hasta tres punto cinco veces más aproximadamente, con respecto a su Testigo, en los tratamientos con 16.0 $\mu\text{g/ml}$ de casiopeína, en los cuatro donadores.

La distribución del daño causado sobre el DNA de los leucocitos humanos de sangre periférica expuestos a diferentes concentraciones de Casiopeína II-gly se muestran en las Figuras III y IV. En estas se puede notar una tendencia a incrementar la longitud de los cometas con respecto a la dosis (comportamiento que también se aprecia en la tabla II), también se observa que el número de los mismos disminuye conforme aumenta la concentración del compuesto, debido a que en las dosis más altas, los cometas pasan a la categoría de nubes (los cuales no se incluyen en las figuras).

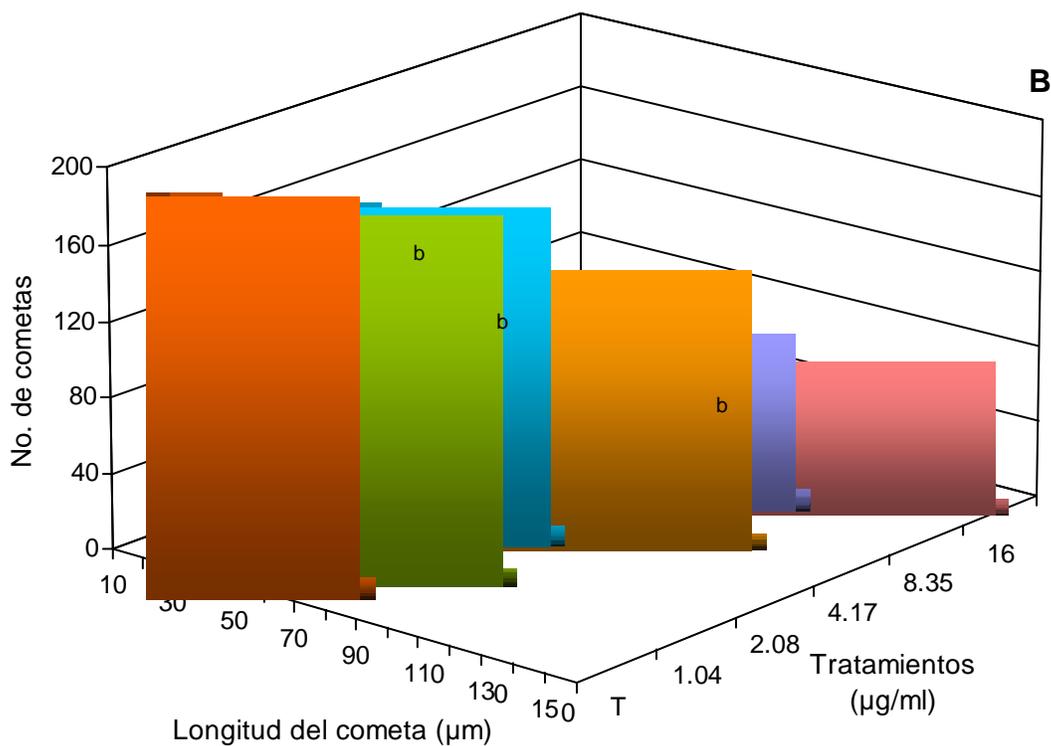
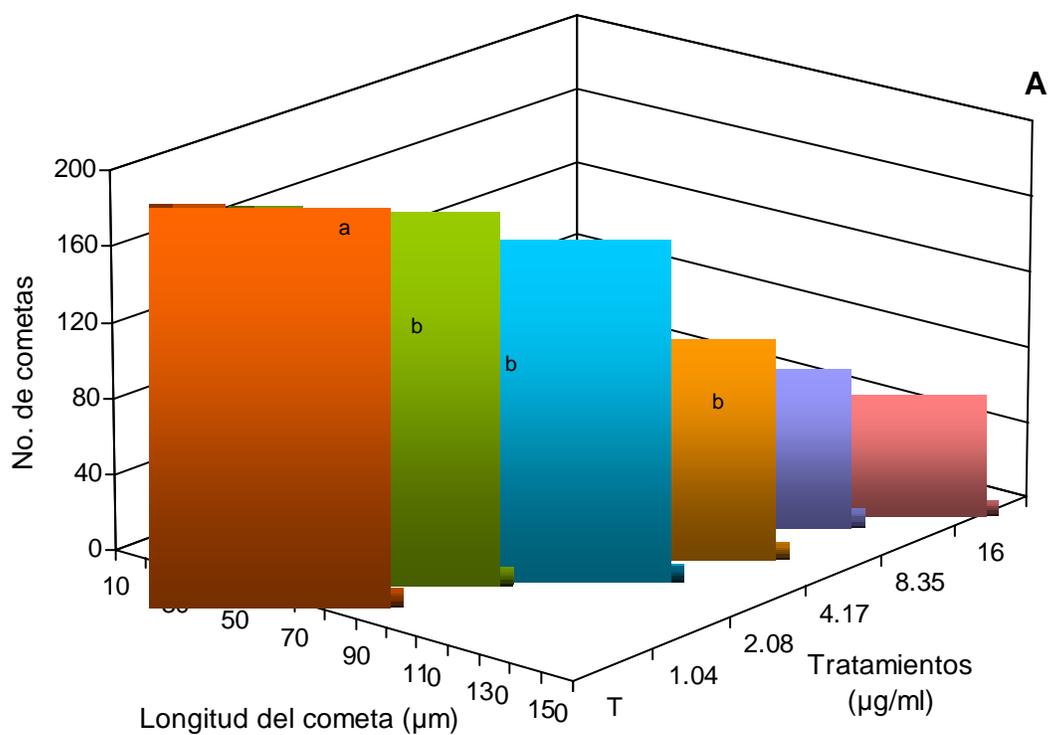


Figura III. Distribución de la longitud de los cometas en leucocitos humanos tratados con Casiopeína II-gly durante 3 horas, en el Donador 1 (A) y el Donador 2 (B) (^a $P < 0.01$; ^b $P < 0.001$ con respecto a su Testigo, T)

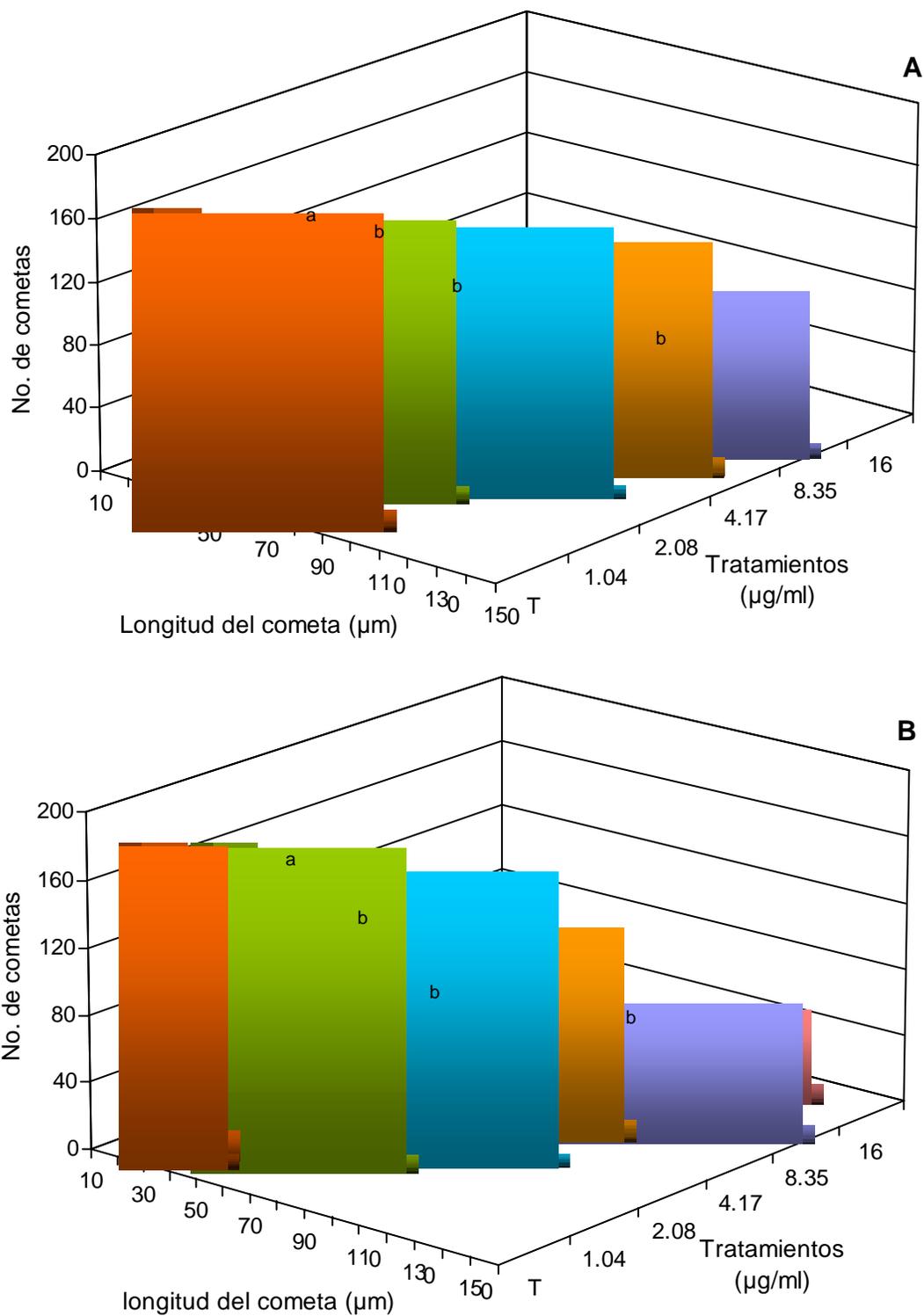


Figura IV. Distribución de la longitud de los cometas en leucocitos humanos tratados con Casiopeína II-gly durante 3 horas, en el Donador 3 (A) y el Donador 4 (B) (^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.001$ con respecto a su Testigo, T)

1.3. Velocidad de efecto

Después de evaluar el daño al DNA en forma de rompimientos de cadena sencilla, se determinó el tiempo mínimo que requiere la casiopeína para llevar a cabo este efecto, por lo que se dieron diferentes tiempos de tratamiento, los cuales fueron de 10, 20, 30 y 60 minutos con una sola concentración (8.35 $\mu\text{g/ml}$).

Los diferentes tiempos de exposición con el agente químico, así como el número de cometas y de nubes encontrados en los 200 núcleos evaluados en dos donadores se muestran en la tabla III. El número de cometas encontrado prácticamente no varía en el primer caso al aumentar el tiempo de exposición al compuesto, en cuanto al segundo, se puede observar que aparece un número significativo de nubes solo en los tratamientos de 30 y 60 minutos.

Al comparar la longitud de los cometas, se encontró que hay una diferencia estadística de este parámetro a partir de 20 minutos; sin embargo, hay un efecto desde los 10 minutos de tratamiento (Tabla III), efecto que se incrementa al extender el tiempo de exposición a la casiopeína y con 60 minutos se ve aumentado 1.8 y 2.4 veces aproximadamente con respecto a su Testigo. El incremento en la longitud de la migración del DNA de los leucocitos tratados, sigue un comportamiento dependiente del tiempo.

La distribución del daño causado sobre el DNA de los leucocitos humanos de sangre periférica expuestos durante diferentes periodos de tiempo a 8.35 $\mu\text{g/ml}$ de Casiopeína II-gly, se muestra en la Figura V, en donde también se puede apreciar una tendencia a incrementar la longitud de los cometas con respecto al tiempo; es decir, que hay un efecto a partir de 20 minutos de exposición y que este daño incrementa al aumentar el tiempo de tratamiento.

Tabla III. Proporción de cometas y nubes inducidos en leucocitos humanos expuestos a 8.35 µg/ml de Casiopeína II-gly durante 10, 20, 30 y 60 minutos.

Tratamiento con Casiopeína II-gly	200 núcleos analizados		Longitud de cometas en µm (Media ± EE)
	Cometas	Nubes	
<i>Donador 3</i>			
Testigo	197	3	24.46 ± 1.74
Tiempo			
10 min	198	2	30.32 ± 2.15
20 min	198	2	33.29 ± 2.36 ^a
30 min	198	2	36.20 ± 2.57 ^a
60 min	197	3	45.80 ± 2.56 ^a
<i>Donador 4</i>			
Testigo	200	0	25.53 ± 1.80
Tiempo			
10 min	198	2	33.71 ± 2.39
20 min	196	4	41.03 ± 3.00 ^a
30 min	190	10 ^b	47.18 ± 3.49 ^a
60 min	189	11 ^b	62.59 ± 3.67 ^a

EE, error estándar

^a $P < 0.005$; ^b $P < 0.001$, comparado con su Testigo

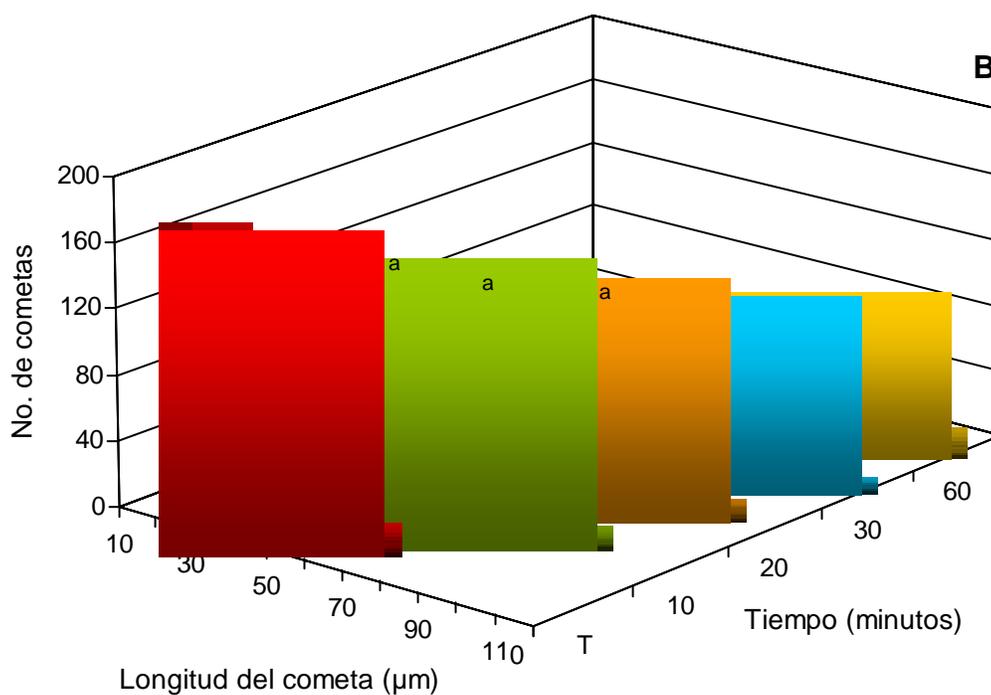
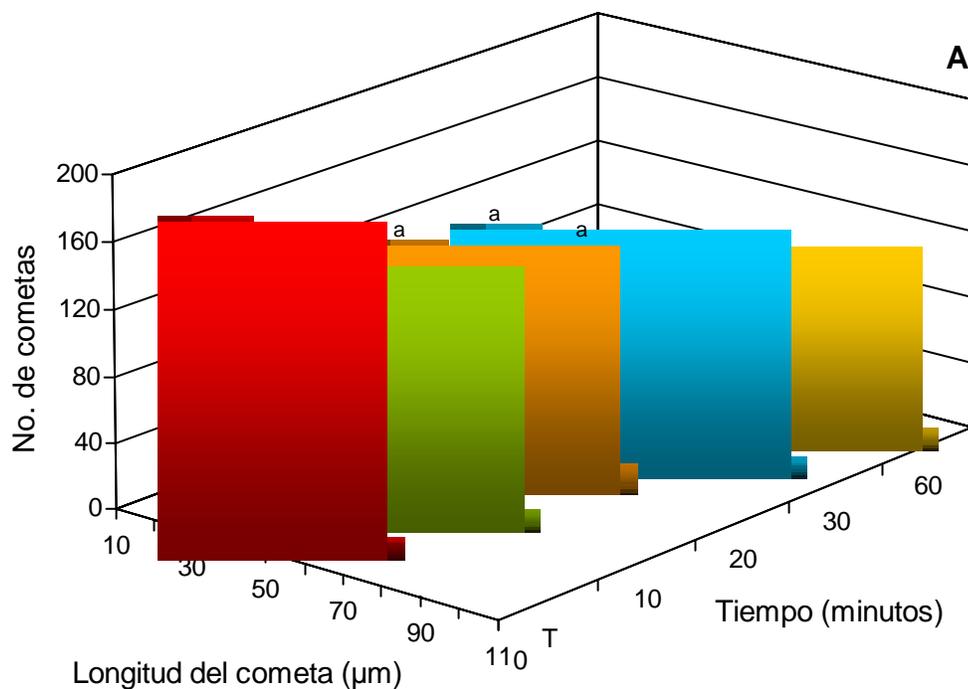


Figura V. Distribución de la longitud de los cometas en leucocitos humanos tratados con 8.35 µg/ml de Casiopeína II-gly durante diferentes tiempos, en el Donador 3 (A) y el Donador 4 (B) (^a $P < 0.005$ con respecto a su Testigo, T)

1. DISCUSIÓN

La aplicación de los metales en la medicina ha adquirido una importancia notable en las tres últimas décadas. Varios metales como el Pt, Ag, Pd, V y Cu, producen efectos tóxicos que se caracterizan por daño al DNA, bloqueo en la proliferación celular y en muchos casos hasta la muerte de las células (Nebojsa *et al.*, 2001; Zhang y Lippard, 2000). Estos eventos son importantes, porque, conociendo el mecanismo por los cuales se originan, se pueden utilizar en el manejo y control de ciertas enfermedades como el cáncer. El Cu, puede combinarse con diversas moléculas orgánicas y formar complejos con menor toxicidad comparada con el platino.

Debido a que el Cu es un metal esencial, la toxicidad de sus compuestos disminuye de manera importante, además, en los organismos existen procesos que permiten eliminar altas concentraciones de este elemento (Bravo *et al.*, 2002).

En la investigación para combatir enfermedades como el cáncer, se ha buscado el diseño de alternativas novedosas, donde sea posible eliminar las células cancerosas sin dañar las células normales. Uno de los mecanismos, por los cuales los agentes antineoplásicos actúan, es induciendo daño al material hereditario, efecto que se estudia en pruebas bioquímicas, en modelos de cultivos celulares y en modelos *in vivo*.

Los modelos donde se emplean células en cultivo, se utilizan principalmente para la evaluación de moléculas con actividad tóxica, dentro de la selección de ciertos compuestos con alguna actividad química. Estos modelos *in vitro*, son muy prometedores para detectar los posibles efectos indeseables de los

compuestos antes de ser empleados como medicamentos, y sobre todo para la elucidación de los mecanismos de acción (Zbinden, 1992).

El presente trabajo, se realizó con la finalidad de conocer si la Casiopeína II-gly es capaz de producir cambios en la viabilidad celular y de inducir daño sobre el DNA, utilizando como modelo leucocitos humanos de sangre periférica.

1.1. Viabilidad celular

En la prueba realizada para evaluar la viabilidad celular, de todas las concentraciones empleadas (1.04, 2.08, 4.17, 8.35 y 16.00 µg/ml), los resultados mostraron que 3 horas de exposición a la Casiopeína II-gly, disminuyen la proporción de células vivas en concentraciones de 8.35 y 16.0 µg/ml. En tanto que en el tratamiento de 1 hora con 8.35 µg/ml, se encontró más del 94% de células viables, por lo que éste parámetro no fue afectado.

En reportes previos, donde se utilizaron células murinas (de leucemia L1210 y C33-A), y humanas transformadas (de carcinoma ovárico CH1 y de cervix SiHa, CaSKi y CaLo) se encontró que la Casiopeína II-gly produce muerte celular en concentraciones de 0.1 a 100 µg/ml, donde la disminución en concentraciones altas alcanza hasta un 80%, con respecto a los controles (De Vizcaya, *et al.*, 2000; Gracia *et al.*, 2001). A pesar de que en los leucocitos de este estudio y en las células utilizadas en los reportes arriba citados se produce muerte celular por la Casiopeína II-gly, la concentración requerida para producir el mismo efecto es menor en células transformadas que en los leucocitos humanos, lo que indica que en los modelos de cáncer son más sensibles al efecto citotóxico del compuesto.

En la investigación sobre la exposición de células a otros agentes químicos, también hay concordancia con los resultados aquí presentados, por

ejemplo, Vock y colaboradores (1998) encontraron que la sobrevivencia de células epiteliales A549 tratadas con diferentes químicos, entre los que se encuentran el cisplatino y melfalan (compuestos utilizados en la quimioterapia) disminuye al incrementar la concentración, específicamente a 10 y 100 μM , con tratamientos de 8, 24 y 72 horas, siendo más acentuado el efecto con respecto al tiempo.

Por otro lado, Marín y colaboradores (2003), reportaron que en concentraciones de 10 μM la Casiopeína II-gly afecta la función de las mitocondrias, disminuye la actividad respiratoria y consecuentemente los niveles de ATP, mientras que por encima de esta concentración hay inhibición de la respiración, la cual puede producir muerte celular. La concentración de 10 μM , es semejante a la de 4.17 $\mu\text{g/ml}$ (9.8 μM) de este estudio, sin embargo, con esta dosis de casiopeína, no se encontró efecto significativo sobre la viabilidad celular, lo que se puede atribuir al modelo biológico usado, ya que con los resultados observados de ambos trabajos, se hace notar que el efecto tóxico de la casiopeína es mayor en organelos aislados (mitocondrias) que en las células íntegras (leucocitos).

1.2. Estimación de los rompimientos de cadena sencilla

Anteriormente, se ha mencionado que las casiopeínas tienen actividad antiproliferativa en diferentes sistemas tanto *in vivo* como *in vitro* (Fuentes *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2003), y que muchos de estos efectos pueden estar relacionados con alteraciones en el DNA. Sin embargo, se tienen pocos datos acerca de los mecanismos involucrados en la respuesta biológica.

En la búsqueda de los efectos biológicos De Vizcaya y colaboradores (2003), encontraron que una administración intravenosa de Casiopeína II-gly puede disminuir la cantidad de células sanguíneas, 12 horas después de la administración

de 3 mg/kg en ratas macho Wistar. Mientras que, la administración de 5 mg/kg disminuye la concentración de hemoglobina en la sangre y cambia significativamente la morfología de las células sanguíneas, con una ligera recuperación en la morfología al cabo de 5 días después del tratamiento, lo que indica que el proceso de eliminación del compuesto inicia en poco tiempo, ya que después de 15 días la apariencia de las células es muy semejante a las células de las ratas que no fueron tratadas.

Se tiene reportado que las casiopeínas ejercen efectos teratogénico y sobre la reproducción. Cuando la Casiopeína II-gly es administrada a ratones hembras de la cepa CD-1 durante la gestación, pueden producir malformaciones esqueléticas y defectos al nacimiento (González, 2004). Cuando se administra la Casiopeína III-ia en machos CD-1, se reduce la cantidad y motilidad de los espermatozoides, así, como incrementa la frecuencia de anomalías espermáticas y consecuentemente reduce la fertilidad (Bocanegra, 2005).

Se tienen pocos estudios referentes a la toxicidad que pueden producir estos compuestos en el material genético. Santiago (2004), encontró que el tratamiento crónico y subcrónico de Casiopeína II-gly en machos y hembras de ratones CD-1 no es capaz de inducir un efecto genotóxico con la prueba de micronúcleos.

Entre las diferentes metodologías que existen para estudiar el daño producido al material genético, se encuentra la prueba de aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas, las cuales permiten visualizar daño de manera gruesa, en los cromosomas (Brusick, 1987;

Albertini *et al.*, 2000). Mientras, el ensayo cometa puede detectar daño en las hebras del DNA, como son rompimientos de hebra sencilla o rompimientos de hebra doble, entre otro tipo de lesiones (Fairbairn *et al.*, 1995; McGregor y Anderson, 1999; Rojas *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000).

El ensayo cometa, es capaz de identificar efecto genotóxico inducido por agentes químicos incluyendo agentes intercalantes, alquilantes y oxidantes (Henderson *et al.*, 1998). Se ha reportado que los rompimientos de cadena pueden ser inducidos por la interacción directa de compuestos químicos con el DNA, los cuales son capaces de producir toxicidad en el genoma (Vock *et al.*, 1998). Se conoce además, que los compuestos metálicos inducen lesiones en el DNA, tales como rompimientos de cadena doble y sencilla, entrecruzamientos DNA-DNA, DNA-proteínas y modificaciones en las bases (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003); pero también, la fragmentación de la cadena de DNA puede ocurrir en el curso de la reparación de las lesiones, se presume que este es el mecanismo de acción de muchos agentes quimioterapéuticos.

La metodología del ensayo cometa, es considerada uno de los indicadores más sensibles para evaluar daño al DNA producido por nuevas drogas antineoplásicas y determinar sus posibles mecanismos de acción (McKelvey *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1999; Olive, 2000).

Se ha hecho referencia a que el daño causado por la Casiopeína II-gly sobre el material genético aumenta gradualmente (Tabla II). Estos resultados, concuerdan con lo reportado por Henderson y colaboradores (1998), quienes en células humanas TK6 realizaron tratamientos con 11 diferentes compuestos para comparar los efectos genotóxicos y citotóxicos, incluida la mitomicina C, que es un

medicamento utilizado en el tratamiento del cáncer, y mencionan que el incremento en la longitud de los cometas esta relacionada con la cantidad de lesiones que se inducen en el DNA, las cuales se incrementan conforme aumenta la dosis.

Muchos agentes genotóxicos inducen rompimientos de cadena sencilla, con concentraciones que inducen también muerte celular, lo que se comprobó al exponer células epiteliales a diferentes compuestos, entre los que se encuentran dos quimioterapéuticos, cisplatino y melfalan en concentraciones de 10 y 100 μM (Vock *et al.*, 1998); es decir, que a medida que aumenta la concentración del compuesto, aumenta la aparición de fragmentos de DNA y disminuye el número de células viables.

Al comparar los resultados entre los tratamientos de 60 minutos y 3 horas, el número de nubes cambia, esto se debe a que los núcleos con migración pasan a la categoría de nubes, producto de la acumulación del daño, que da como resultado una disminución en el número de cometas y un aumento en el numero de nubes. Este comportamiento va acompañado de un incremento en la longitud de la migración dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.

Algunos autores proponen que los comportamientos dosis-dependiente de drogas anticancerígenas están relacionados con un efecto directo del compuesto químico con el DNA para la inducción de rompimientos (Blasiak *et al.*, 2002). Por lo que, los efectos citostáticos y antiproliferativos de la Casiopeína II-gly pueden estar relacionados con su capacidad de producir daño al DNA.

La concentración más alta de casiopeína, 16.00 $\mu\text{g/ml}$, corresponde aproximadamente a la DL_{50} vía intravenosa para ratón NIH, a esta concentración se encuentra el mayor número de nubes, así como una mayor longitud de los cometas

encontrados y también el mayor número de células muertas en la prueba de viabilidad, es decir, que con esta concentración se da la máxima inducción de daño, daño que es acumulativo. La longitud aumenta de 2.7 a 3.5 veces con respecto al Testigo en los tratamientos con la concentración más alta.

Diversos agentes que son utilizados en la quimioterapia como mitomicina C, complejos de Pt, clorambucil, ciclofosfamida y busulfán (Clarysse *et al.*, 1975; McLaughlin, 1995; Tish *et al.*, 1984), inducen varios tipos de lesiones en el DNA; lesiones que a menudo describen el mecanismo de acción antitumoral de los agentes quimioterapéuticos y que permiten hacer las clasificaciones comunes de estos compuestos.

Dentro de estas clasificaciones, existen innumerables medicamentos con diferentes mecanismos de acción, por ejemplo, entre los que producen fragmentación del DNA se encuentra la dactinomicina, que es un compuesto que se intercala entre los pares de bases produciendo rompimientos, como consecuencia de la formación de un complejo dactinomicina-DNA, por lo que la transcripción se bloquea; mientras que estudios *in vitro*, indican que la bleomicina, causa rompimientos en la cadena de DNA al interactuar con oxígeno y hierro para formar especies reactivas de oxígeno; el efecto citotóxico de ambos químicos, se debe a su capacidad de dañar el genoma (Chabner *et al.*, 1996; Tish *et al.*, 1984).

En algunos estudios realizados por Tovar y colaboradores (2002) con diferentes casiopeínas, entre ellas la II-gly, se encontró que estos compuestos interactúan con el material genético, específicamente con la adenina. Ellos observaron la formación un triplete o dímero, es decir, una especie donde dos centros metálicos de cobre están relativamente cerca. La interacción que presenta la

casiopéina y la adenina, es mediante la formación de interacción por apilamiento entre el sustituyente fenantrolina del complejo y el anillo de la base nitrogenada. Por otro lado, Carson y colaboradores (1987) mencionan que los metales de transición, como el cobre, tienen la capacidad de intercalarse en el DNA con una gran afinidad. Y la manera en que ejercen su efecto algunos agentes utilizados en la quimioterapia es a través de la interacción con esta molécula, evitando así la replicación celular.

Los rompimientos en la cadena de DNA evaluados por el ensayo cometa, no siempre son indicativo de efecto genotóxico, por lo que los resultados deben ser apoyados con la prueba de viabilidad celular para evitar falsos positivos. La prueba de colorantes fluorocromados evaluada inmediatamente después del tratamiento, mostró que con la exposición de los leucocitos a la Casiopeína II-gly, hay un efecto citotóxico significativo solo en las concentraciones más altas. La viabilidad en dos donadores, es significativamente menor con 8.35 y 16 µg/ml, mientras que con los otros dos, la diferencia se presentó solo con 16 µg/ml, con lo que es posible confirmar que la Casiopeína II-gly es capaz de producir rompimientos de cadena sencilla en concentraciones que no afectan la viabilidad celular. Por lo anterior, el efecto genotóxico puede deberse al compuesto y no a una consecuencia derivada de un efecto citotóxico. Este hecho era de esperarse, ya que las casiopéinas fueron diseñadas para interaccionar con el material genético, y si esto sucede en cultivos, es posible que lo mismo suceda *in vivo*.

1.3. Velocidad de efecto

Para conocer los mecanismos por los cuales un fármaco cruza las membranas celulares, es importante conocer sus propiedades fisicoquímicas como el

tamaño, solubilidad y formas moleculares, las cuales le proporcionarán la capacidad de atravesar dichas barreras (Szachowics *et al.*, 2001).

Se sabe que las membranas biológicas son las barreras que debe atravesar un fármaco para llegar a su lugar de acción. El fenómeno de transporte, puede producirse por diferentes procesos: filtración o difusión simple, pinocitosis, transporte pasivo o difusión facilitada y transporte activo (Aïache *et al.*, 1983; Alberts *et al.*, 2002; Benet *et al.*, 1996; Llama y Avendaño, 1996; Szachowics *et al.*, 2001).

El proceso que describe el paso espontáneo de pequeñas moléculas tales como agua, iones hidrosolubles de volumen pequeño, es la filtración o difusión simple, y está determinada por el tamaño del poro de membrana. La pinocitosis es un proceso por el que la membrana celular es capaz de engullir gotas de líquidos extracelulares y materia coloidal mediante invaginaciones de la misma.

En el transporte pasivo o difusión facilitada, se incluyen la difusión mediada por canal y la difusión mediada por transportador; este mecanismo de transporte ocurre a favor de un gradiente de concentración. Es el utilizado por la mayoría de los fármacos de una zona de alta concentración a otra de baja concentración, que concluye cuando se iguala ésta a ambos lados de la membrana.

El último mecanismo de paso por la membrana es el transporte activo, que está siempre mediado por proteínas transportadoras, requiere de una entrada de energía metabólica y ocurre en contra de un gradiente de concentración.

Es importante conocer el tiempo en que un fármaco puede ejercer sus efectos. Para determinar, si la Casiopeína II-gly puede causar daño sobre el DNA en pocos minutos después de tener contacto con las células, este estudio se basó en la idea de utilizar una concentración en la que se produce un efecto positivo en los

tratamientos de 3 horas. De esta manera, al realizar tratamientos con 8.35 $\mu\text{g/ml}$ de Casiopeína II-gly durante diferentes tiempos de tratamiento (10, 20, 30 y 60 min), se pudo apreciar que además del efecto dependiente de la concentración, encontrado con 3 horas de tratamiento, también se presentó un efecto dependiente del tiempo de exposición al compuesto.

Para que un agente químico pueda ejercer su efecto debe entrar a la célula y es evidente que debe atravesar la membrana plasmática, generalmente los fármacos cruzan las membranas biológicas en cuestión de unos cuantos minutos y en algunos casos, en segundos (Benet *et al.*, 1996; Eytan, 2005).

Durante la evaluación del tiempo en que la casiopeína produce su efecto, se pudo apreciar que existe daño en el DNA estadísticamente significativo a partir de 20 minutos de tratamiento. A pesar de que se observó un incremento en la longitud de los cometas y un aumento en el número de células con daño desde los 10 minutos.

Debido a que la Casiopeína II-gly es soluble en agua y que produce daño al DNA en poco tiempo, se permite proponer que el compuesto es permeable a las membranas biológicas. Con esto, es posible sugerir que el paso de la Casiopeína II-gly por la membrana celular es por difusión simple o por transporte pasivo, dados los efectos observados en tan corto tiempo. Este tipo de mecanismos son los que usan muchos agentes químicos, donde, el compuesto pasa de una zona de alta concentración a una de baja concentración; ambos mecanismos de transporte no implican procesos que se lleven a cabo en lapsos largos de tiempo ya que pueden ocurrir de manera espontánea.

Finalmente, los resultados de este trabajo son fundamentales para continuar con la investigación de los efectos de las casiopeínas sobre el DNA, las células, los tejidos y el organismo, incluyendo otras variables como el tiempo de tratamiento o la exposición a otras casiopeínas.

1. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

- ✓ La Casiopeína II-gly disminuye la viabilidad celular en dosis altas y con tres horas de exposición, lo cual indica que este compuesto produce daño en la membrana que posiblemente conduce a muerte de las células.
- ✓ El ensayo cometa reveló que al exponer leucocitos humanos a la Casiopeína II-gly, hay un incremento en la magnitud del daño al DNA, daño que puede interpretarse como la inducción de rompimientos de cadena sencilla, sitios que en condiciones alcalinas son transformados en rompimientos y sitios donde se reparo una lesión.
- ✓ La Casiopeína II-gly causa rompimientos de cadena en el DNA a partir de 2.08 µg/ml y 3 horas de tratamiento, efecto que sigue un comportamiento dependiente de la concentración.
- ✓ Las diferencias estadísticas muestran que la Casiopeína II-gly es capaz de inducir daño al DNA desde los 20 minutos de exposición con 8.35 µg/ml del compuesto, efecto que se acentúa en 30, 60 o 180 minutos de tratamiento, lo cual indica, un comportamiento dependiente del tiempo.
- ✓ El efecto sobre el DNA da evidencia de que el compuesto puede transportarse al interior de la célula en pocos minutos, por lo cual, puede considerarse un agente muy permeable a las membranas biológicas.
- ✓ Posiblemente los efectos antiproliferativos de la Casiopeína II-gly descritos en otros trabajos pueden estar relacionados con su capacidad de producir daño al DNA.

1. REFERENCIAS

- Aaseth A y Norseth T. 1986. Copper. En: Handbook on the toxicology of metals. Editado por Friberg L, Nordberg GE y Vouk VB. Vol. II, 2ª ed. Elsevier Ámsterdam. 704 pp.
- Aïache JM, Devissaguet y Guyton AM. 1983. Biofarmacia. 2ª ed. Editorial El Manual Moderno, SA de CV. Francia. 487 pp
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki k, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DEG, Tice R, Waters D y Aitio A. 2000. IPCS, Guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*. 463:111-172
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. 2002. Molecular biology of the cell. 3ª edición. Editorial Omega, S.A. España, 1387 pp
- Atilano AA y Roldán RE. 2004. Evaluación de micronúcleos en cultivo de linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis tratados con Casiopeína II-gly. Memorias del Primer Congreso de Química Médica: dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México. p 52-55
- Benet LZ, Kroetz DL y Sheiner LB. 1996. Farmacocinética: dinámica de la absorción, distribución y eliminación de fármacos. En: Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editado por Hardman JL, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW y Gilman AG. 9ª ed. Vol. I. McGraw-Hill, México. 1996 pp.
- Bergoglio RM. 1993. Antibióticos. 5ª ed. Editorial Médica Panamericana, España. 491 pp.
- Blasiak J, Gloc E y Warszawski M. 2002. A comparison of the *in vitro* genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone. *Acta Biochimica Polonica*. 49:145-155.
- Blagosklonny MV. 2003. A new science-business paradigm in anticancer drug development. *Trends in Biotechnology*. 21:103-106.
- Bravo ME, Tovar TA, Ruiz M, Ruiz L. 2002. Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas[®], historia química de un

- proyecto exitoso. Memorias del Primer Congreso de Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM. México. p 1-9
- Brusick D. 1987. Principles of genetic toxicology. Second Edition. Plenum Press. New York. p. 13-37
- Bocanegra AD y Altamirano LM. 2004. Efecto teratogénico causado por la Casiopeína III-ia en embriones y fetos de la cepa CD-1. Memorias del Primer Congreso de Química Médica: dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México. p 28-31
- Bocanegra AD. 2005. Toxicología reproductiva de las Casiopeína III-ia en ratones macho de la cepa CD-I. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM. México.
- Calderón DJD, Petrone GVM, Constantino CF, Gómez RC, Gracia MI y Ruiz AL. 2004. Evaluación inmunohistoquímica y determinación del índice apoptótico por el virus de la enfermedad de Marek, en gallinas reproductoras tratadas con Casiopeína III-ia. Memorias del Primer Congreso de Química Médica: dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México. p 22-24
- Carson BL, Ellis HV y McCannJL. 1987. Toxicology and biological monitoring of metals in humans. Lewis Publishers Inc. USA. 328 pp
- Carvallo ChF, Macías RL, Gómez RC, Madrid MV, Constantino CF, Gracia MI y Ruiz AL. 2004. Evaluación preclínica de Casiopeína IIIia, Ilgly y 5,6-dm(acac) en tumores xenotransplantados al ratón desnudo. Memorias del Primer Congreso de Química Médica: dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México. p 125-130
- Castañeda PA, Aragón MA y Altamirano LM. 2004. Toxicidad reproductiva masculina de la Casiopeína II-gly. Memorias del Primer Congreso de Química Médica: dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México. p 135-138

- Chabner BA. 1990. Clinical strategies for cancer treatment: the role of drugs. En: Cancer chemotherapy, principles and practice. Editado por: Chabner BA y Collins JM. JBL Lippincott Company, USA. 545 pp
- Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA y Calabresi P. 1996. Fármacos antineoplásicos. En: Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editado por Hardman JL, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW y Gilman AG. 9ª ed. Vol. II. McGraw-Hill, México. 1996 pp.
- Chi-Jen L. 1993. Development and evaluation of drugs: from laboratory through. USA. 226 pp
- Clarysse A, Kenis Y y Mathé G. 1975. Cancer chemotherapy. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. USA. 566 pp.
- Clayson DB. 2001. Toxicological carcinogenesis. Lewis Publishers, USA. 196 pp.
- Cordier AC. 1992. *In vitro* strategy for the safety assessment of drugs. En: In vitro methods in toxicology. Editado por Jolles G y Cordier A. Academia Press, USA. 607 pp.
- De Vizcaya RA, Rivero MA, Ruiz RL, Kass GEN, Kelland LR, Orr RM y Dobrota M. 2000. Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, Casiopeína II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology in Vitro*. 14:1-5.
- De Vizcaya RA, Rivero MA, Ruiz RL, Howarth JA y Dobrota M. 2003. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeína II. *Toxicology*. 194:103-113
- Devore JL. 2001. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 5ª ed. Thomson Learning, Ing. México. p. 649-658
- Eytan GD. 2005. Mechanisms of multidrug resistance in relation to passive membrane permeation. *Biomed. Pharmacother*. 59(3):90-7
- Fairbairn DW, Olive PL y O'Neill KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*. 339:37-59.
- Ferrer SG, Gasque L, Moreno ER y Ruiz AL. 1994. Equilibrio en disolución. Memorias de la Primera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM. México. Resumen 4

- Fuentes NI, Ruiz RL, Tovar TA, Rico MH y Gracia MI. 2002. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína III in rat plasma. *Journal of Chromatography B*. 772:115-121.
- Fuentes NI, Rodríguez RF, Ruiz RL y Portilla M. 2004. Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica (Casiopeína II-gly y Casiopeína III). Memorias del Primer Congreso de Química Médica: dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México. p 150-153
- Furst A, Radding SB y Wurzel KA. 1998. Copper (Cu). En: Encyclopedia of toxicology. Editado por: Wexler P. Vol 1. Academia Press, USA.
- García OLE, Leal GMG, Sumano LH, Constantino CF, Mondragón VL, Luna del Villar VJ, Gracia MI y Ruiz AL. 2004. Determinación de los efectos cardiotoxicos y sistémicos de la Casiopeína III-ia y su terapia adyuvante. Memorias del Primer Congreso de Química Médica: dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México. p 45-48
- González VME. 2004. Efecto teratogénico de la Casiopeína II. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM. México.
- Gracia MI, Candanosa E, Quiroz RG y Ruiz AL. 1994. Dosis letales de Casiopeínas en ratón, vía I.P. e I.V. Memorias de la Primera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM. México. Resumen 8
- Gracia MI, Ruiz RL, Gómez RC, Tinoco MM, Márquez QA, Romero DLL, Marín HA, Macías RL y Bravo GME. 2001. Knighth's move in the periodic table, from Copper to Platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeínas, evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panel. *Metal Based Drugs*. 8:19-28.
- Guecheva T, Henriques JAP y Erdtmann B. 2001. Genotoxic effects of copper sulphate freshwater planarian in vivo, studied with single-cell gel test (comet assay). *Mutation Research* 497: 19-27.
- Hellman S y Vokes EE. 1996. Advancing current treatments for cancer. Scientific American. 275:84-89.

- Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C y Windebank S. 1998. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and citotoxins. *Mutagenesis*. 13:89-94
- Hernández EL. 2004. La cardiotoxicidad de las Casiopeínas II y III. Memorias del Primer Congreso de Química Médica: dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México. p 33-34
- Infante GS y Zárate LG. 1997. Métodos estadísticos: un enfoque interdisciplinario. Editorial Trillas, México. p. 537-548
- Klug WS y Cummings MR. 1999. Conceptos de genética. 5ª edición, Prentice Hall. Madrid, p. 625-642.
- Lavelly RS y Poen JC. 1995. Principios de la oncología radiante. En: Oncología Práctica. Editado por: Cameron RB. Editorial Médica Panamericana, Argentina. 769 pp
- Llama E y Avendaño C. 1996. Principios de farmacocinética y metabolismo de fármacos. En: Introducción a la química farmacéutica. Editado por: Avendaño LMC. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid. 1019 pp.
- Marín HA, Gracia MI, Ruiz RL y Moreno SR. 2003. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (casiopeínas) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology*. 65:1979-1989
- Marques DeCMJ. 1991. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. McGraw-Hill, SA de CV, México. 657 pp.
- McGregor D y Anderson D. 1999. DNA damage and repair in mammalian cells *in vitro* as indicators of exposure to carcinogens. En: The use of short- and medium-term test for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. Editado por: McGregor DB, Rice JM y Venit s. IARC Scientific Publications, Francia. 536 pp
- McKelvey VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool BL, De Méo MP y Collins A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a european review. *Mutation Research*. 288:47-63.
- McLaughlin CJ. 1995. Principios de la quimioterapia. En: Oncología práctica. Editado por: Cameron RB. Editorial Médica Panamericana, Argentina. 769 pp.

- Muntoni S. 1971. Quimioterapia antitumoral. Editorial Dossat SA, España. 163 pp
- Nebojsa M, Milovic y Kostic NM. 2001. Palladium (II) and Platinum (II) complexes as synthetic peptidases. En: Metal ions in biological systems. Editado por Sigel A y Sigel H. 38:146-184.
- Olivares M y Uauy R. 1996. Copper as an essential nutrient. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 63:1-13
- Olive PL, Woldek D, Durand RE y Banáth JP. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research*. 198:259-267
- Olive PL. 2000. The comet assay: an overview of techniques. En: Methods in molecular biology: in situ detection of DNA damage. Editado por VV Didenko Vol. 203, Humana Press Inc. USA.
- Pérez FG, García RMC y Altamirano LM. 2004. Estudio comparativo del daño genotóxico inducido por el cisplatino y por la Casiopeína III-ia; en ratones machos, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1. Memorias del Primer Congreso de Química Médica: dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México. p 49-52
- Pratt W y Ruddon R. 1979. The anticancer drugs. Oxford University Press. New York. 323 pp
- Reyes L, Fuentes I, Ruiz L y Macías L. 2003. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína IIgly in rat plasma. *Journal of Chromatography B*. 791:111-116.
- Rodríguez AE, Ruiz AL, Gómez RC, Macías RL, Telles AL, Cortés BE, Ortiz MR y Gracia MI. 2004. Efecto de seis casiopeínas de las familias I, II y III sobre el ciclo celular en células HeLa. Memorias del Primer Congreso de Química Médica: dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México. 138-141
- Rodríguez MJJ, Roldán RE y Altamirano LM. 2003. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology Letters*. 144:359-369.

- Rojas CE. 1992. Evaluación de sustancias antineoplásicas, el cultivo de linfocitos como sistema de prueba. Tesis de Doctorado. FES Zaragoza, UNAM, México.
- Rojas E, López MC y Valverde M. 1999. Single cell electrophoresis assay: methodology and applications. Review *Journal of Chromatography*. B. 722:225-254.
- Ross GM, McMillan TJ, Wilcox P y Collins AR. 1995. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. *Mutation Research*. 337:57-60.
- Ruiz AL, Moreno ER, Ferrer SG Y Gasque SL. 1994. Diseño, síntesis y caracterización de las Casiopeínas. Memorias de la Primera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM. México. Resumen 1
- Ruiz AL, Moreno R, Gasque L, Martínez A, Ferrer G, Redón R, Solans X, Briansó JL y Molis E. 1996. Estudio estructural de las Casiopeínas. Memorias de la Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM. México. p 2-5
- Ruiz RL, Gracia MI, de la Rosa ME, Sumano H, Gómez C, Arenas F, Gómez E, Pimentel E y Cruces M. 1993. Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) new drugs: casiopeínas I, II, III. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 51:406.
- Ruiz RL, De la Rosa ME, Gracia MI, Mendoza A, Pérez G, Ferrer SG, Tovar A, Breña M, Gutiérrez P, Cruces MMP, Pimentel E y Natarajan AT. 1995. Casiopeínas, metal-based drugs a new class of antineoplastic and genotoxic compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*. p 207.
- Sakurai H, Tamura H y Okatani K. 1995. Mechanism for a new antitumor vanadium complex: hydroxyl radical-dependent DNA cleavage by 1,10-phenanthroline-vanadyl complex in the presence of hydrogen peroxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 206:133-137.
- Sánchez BF, Gracia MI y Roldán RE. 2004. Estudio de los efectos genotóxicos, citostáticos y citotóxicos de la Casiopeína III-ia en médula ósea y sangre periférica de ratón. Memorias del Primer Congreso de Química Médica: dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de

- México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México. p 120-122
- Santiago MY. 2004. Efecto genotóxico de los tratamientos agudo y subcrónico de las Casiopeína II-gly en machos, hembras, hembras preñadas y sin preñar de ratón CD-1. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM, México.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, y Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in Individual cells. *Experimental Cell Research*. 175:184-191.
- Singh NP. 2000. Microgel for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research*. 455:111-117.
- Stokinger HE. 1981. Copper, Cu. En: Patty's Industrial hygiene and toxicology. Editado por Wiley J. Vol. II, 3ª edición. A Wiley-Interscience Publication, USA. 1847 pp.
- Szachowics PB, Figaszewski Z y Lewandowski W. 2001. Mechanisms of transport across cell membranes of complexes container in antitumor drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 222:169-182
- Tice RR, Andrews PW y Singh NP. 1990. The single cell gel assay: A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. Plenum Press. New York; p 291-301.
- Tice RR. 1995. The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. En: Environmental mutagenesis. Editado por: Phillips DH y Venitt D. Bios Scientific, Oxford. 312-339 pp.
- Tice RR, Andrews P y Vasquez M. 1996. Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. Integrated Laboratory Systems P. O. Box 13501. Research Triangle Park, NC 27709; p 1-8.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC y Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.

- Tish KMK, Fisher DS y Welch-McCaffrey D. 1984. Cancer chemotherapy: treatment and care. Second Edition. GK Hall Medical Publishers. USA. 343 pp
- Tovar TA, Ruiz RL, Moreno ER y Briansó JL. 1995. Interaction of casiopeínas III with methionine, adenosinemonophosphate, puric and pirimidic bases. *Journal of Inorganic Biochemistry*. p 206.
- Tovar TA, Ruiz RL y Campero CA. 2002. Interacción entre Casiopeínas y Adenina. Memorias del Primer Congreso de Casiopeínas. Facultad de Química, UNAM. México. p 121-128
- Tovar TA, Ruiz RL, Campero A, Romerosa A, Moreno ER y Rosalez HMJ. 2004. Structural and reactivity studies on 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine acetylacetonate copper (II) nitrate (CASIOPEINA III-ia[®]) with methionine, by UV-visible and EPR techniques. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 98:1045-1053.
- Trejo SC, Palencia G, Zúñiga S, Rodríguez RA, Osorio RL, Sanches TL, Gracia MI, Marquez RL, Sanchez A, Moreno GME, Cruz A, Bravo GME, Ruiz RL, Rodríguez ES, Sotelo J. 2005. Cas IIgly induces apoptosis in Glioma C6 cells *in vitro* and *in vivo* through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia*. 6:563-574
- Vock EH, Lutz WK, Hormes P, Hoffman HD y Vamvakas S. 1998. Discrimination between genotoxicity and citotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100 and Gamma irradiation. *Mutation Research*. 413:83-94.
- Zhang CX y Lippard S. 2003. New metal complexes as potential therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*. 7:481-489
- Zbinden G. 1992. Development of *in vitro* toxicology. En: *In vitro* methods in Toxicology. Editado por: Jolles G y Cordier A. Academic Press, USA. 607pp