



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Efectos de la Casiopeína Ilgly en el material genético de linfocitos humanos *in vitro* de sangre periférica.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

SOLEDAD GUEVARA CHÁVEZ

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Elia Roldán Reyes

MÉXICO, D. F.

ENERO, 2008





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.

Tesis dirigida por la Dra. Elia Roldán Reyes, en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis (L-2 PA) de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) a cargo del Dr. Mario A. Altamirano Lozano. La UNIGEN es parte de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

El desarrollo de este trabajo contó con el apoyo de PAPIIT IN206303

DEDICATORIA

A Dios: Que me dio todo lo necesario para llegar a disfrutar de este bellissimo momento.

A mis padres: Raúl Guevara García y Amparo Chávez Díaz. A quien amo, respeto, admiro y confío por sobre todas las cosas. Gracias por su apoyo incondicional, por su confianza, y por todo lo que me han dado durante toda mi vida...

A Uriel: Por que has sido el motorcito que me impulsa y con quien puedo compartir mis triunfos y fracasos. En quien confío y amo. Gracias por estar con mígo...

Gracias, por las atenciones que han tenido hacia mi persona, a las Sras. María de la Luz Galicia Charola Y Martha Chávez Galicia, Martín López Chávez, José y Manuel Perea Chávez.

A mi mamá Delfa: Gracias por inculcarme valores, por todo su cariño el cual vale más que oro para mí. La quiero mucho...

A mi padrino Nico: Gracias por todos sus consejos, que le aseguro que no han sido depositados en saco roto, también gracias, por todo su apoyo incondicional, lo quiero, respeto y admiro muchísimo...

A mis primos: Marisela, Martha, Griselda, Gerardo, Manuel, Ofelia y Bertha Camarena Chávez, por motivarme ha seguir con mis estudios y verlos como algo esencial para mi vida. Refu Guevara Terrero, Isa y Fer García Guevara, por compartir con mígo parte de la niñez y adolescencia...

A mis amigos: Luis Montiel Fuentes, Angélica Cerritos Amador, Samy Torres Marques, Irma Muños Pliego, Carlos Hernández Cordero, Jacqueline González Zamora, Lupe Muños Martines, David Medina Ramirez, Naomi Medina Castro, Roció Castro Juárez, Martín Mercado Vazquez, Juan Carlos López Zarate y sus papás y hermanos, Carmina Ortega Sánchez, Edmundo Losada Gallardo, Sergio Díaz Martínez, D. Nayeli Rodríguez Toledano, Dulce Balderas López, Juan Romero, Roció P. Montiel Bustos, Claudia de la Rosa Mera, Carmelo Peralta, Yolanda Moreno Santiago, Anahí M. Pérez Mora, Elia Roldán Reyes. A todos ustedes gracias por su amistad...

En memoria de los que ya no están con mígo: Erica Guevara Chávez, Antonio Guevara Valenzuela, Esperanza García Díaz, Ignacio Chávez Vázquez.

Esperando tener muchos momentos de logros, superación y felicidad como este y seguir compartiéndolos con todos ustedes...

LO QUE HE APRENDIDO EN LA VIDA...

Con el correr de los años...

- He aprendido, que cuando estas enamorado, se te nota.
Que una persona diciéndome, "Me alegraste el día"... alegra mi día.
Que siempre puedo rezar por alguien, cuando no tengo otro modo de ayudarlo.*
- Que no importa que tan serio requiera la vida que seas, todos necesitamos un amigo con el que podamos reír a carcajadas.*
- Que algunas veces, todo lo que una persona necesita, es una mano que sostener y un corazón que entender.*
- Que la vida es como un espiral. Mientras más se acerca al fin, más rápido camina.*
- Que el dinero no compra la clase.*
- Que esas pequeñas cosas que pasan diariamente, son las que hacen la vida espectacular.*
- Que debajo del duro escudo de las personas, hay alguien que quiere ser apreciado y amado.*
- Que Dios no lo hizo todo en un solo día... ¿qué me hace pensar que yo puedo?*
- Que ignorar los hechos... nunca los cambia.*
- Que es el amor y no el tiempo... el que cura todas las heridas.*
- Que cada persona a la que conoces, merece ser obsequiada con una sonrisa, porque nunca se es tan pobre para no poder regalarla, ni tan rico como para no necesitarla.*
- Que nadie es perfecto... hasta que te enamoras de alguien.*
- Que las oportunidades nunca se pierden, alguien más tomara aquella que tu dejaste pasar.*
- Que uno debe decir palabras suaves y tiernas, porque más adelante puedo tener que tragarme las ofensas.*
- Que una sonrisa es la manera más barata, de lucir mucho mejor.*
- Que no puedo elegir como me siento, pero puedo elegir que hacer con respecto a eso.*
- Que todos quieren estar en la cima de la montaña, sin darse cuenta que toda la felicidad y experiencias agradables, suceden mientras se escala hacia ella.*
- Que no puedo hacer que alguien me ame, solo convertirme en alguien a quien se pueda amar; el resto ya depende de los otros.*
- Que por mucho que me preocupe por los demás, muchos de ellos no se preocuparan por mí.*
- Que puede requerir años construir la confianza y únicamente segundos para destruirla.*

Que lo que verdaderamente cuenta en la vida, no son las cosas que tengo alrededor, sino las personas que tengo alrededor.

Que puedo encantar a la gente por 15 minutos, después de eso necesito poder hacer más.

Que no debo compararme con lo mejor de lo que hacen los demás, si no con lo mejor que puedo hacer yo.

Que lo más importante no es lo que sucede sino lo que hago al respecto.

Que hay cosas que puedo hacer en un instante que ocasionan dolor durante toda la vida.

Que es importante practicar para convertirme en la persona que yo quiero ser.

Que siempre debo despedirme de las personas que amo con palabras amorosas; podría ser la última vez que los vea.

Que puedo llegar mucho más lejos que lo que pensé posible.

Que soy responsable de lo que hago, cualquiera que sea el sentimiento que tenga.

Que, controlo mis actitudes o ellas me controlan a mí.

Que por más apasionada que sea la relación en un principio, la pasión se desvanece y algo más debe tomar su lugar.

Que los héroes son las personas que hacen aquello de lo que están convencidos, a pesar de las consecuencias.

Que aprender a perdonar requiere mucha práctica.

Que con los amigos podemos hacer cualquier cosa, o no hacer nada, y tener el mejor de los momentos.

Que a veces las personas que creo que van a patear cuando estoy caído, son aquellas las que me ayudan a levantar.

Que en muchos momentos tengo el derecho de estar enojado, más no el derecho de ser cruel.

Que la verdadera amistad y el verdadero amor, continúan creciendo a pesar de las distancias.

Que simplemente por que alguien no me ama de la manera que yo quisiera, no significa que no me ama a su manera.

Que la madurez tiene que ver más con las experiencias que he tenido y aquello que he aprendido de ellas, que con el número de años cumplidos.

Que mi familia no siempre estará pendiente de mí, mientras que otras personas no relacionadas podrían preocuparse por mí, amarme y enseñarme a confiar de nuevo; las familias no son biológicas.

Que por bueno que sea el amigo, tarde o temprano me voy a sentir lastimado por él y debo saber perdonarlo por ello.

Que no siempre es suficiente ser perdonado por los otros; a veces tengo que perdonarme a mí mismo.

Que por más fuerte que sea mi duelo, el mundo no se detiene por mi dolor.

Que siempre por que dos personas pelean, no significa que no se aman la una a la otra; y que simplemente por que dos personas no discuten, no significa que sí se amen.

Que no tengo que cambiar de amigos si comprendo que los amigos cambian.
Que no debo afanarme averiguando un secreto; podría cambiar mi vida para siempre.

Que dos personas pueden mirar la misma cosa y ver totalmente algo diferente.

Que hay muchas maneras de enamorarse y permanecer enamorado.
Que sin importar las consecuencias; cuando soy honesto con mígo mismo llego más lejos en la vida.

Que muchas cosas pueden ser generadas por la mente; el truco es el autodomínio.

Que por muchos amigos que tenga, si me convierto en su salvador, me sentiré solitaria y perdida en los momentos que más los necesite.
Que aún cuando pienso que no puedo dar más, cuando un amigo pide ayuda, logro encontrar la fortaleza para ayudarlo.

Que tanto escribir como hablar puede aliviar los dolores emocionales.
Que los títulos en la pared no nos convierten en seres humanos decentes.
Que las personas mueren demasiado pronto.

Que aunque la palabra amor pueda tener diferentes significados, pierde su valor cuando se utiliza con ligereza.

Que es muy difícil determinar dónde fijar el límite entre no herir los sentimientos de los demás y defender lo que creo.

Que aunque quiera mucho a la gente, algunas personas no me devolverán ese amor.

Que la mejor enseñanza que se aprende de la vida es estar junto a una persona adulta.
Que la violencia atrae más violencia.

Que las personas que critican a los demás, también me criticarán cuando tengan la oportunidad.

Que hay mucha diferencia entre la perfección y la excelencia.
Que es mucho mejor expresar mis sentimientos que guardármelos dentro de mí.
Que ganar no lo es todo... es lo único.

Que sentir duelo por tu mascota, cuando la has perdido te hace ser noble.
Que el medioambiente no me pertenece, más bien soy parte de él, por lo tanto todo lo que le haga, repercutirá en mí y mi descendencia.
Que nunca se deja de aprender, mientras siga respirando...

Anónimo.

AGRADECIMIENTOS MUY ESPECIALES

A mis padres: Raúl Guevara García y Amparo Chávez Díaz, por todo lo que me han dado, tanto material como emocional.

A la Dra. Elia Roldán Reyes por todas su apoyo, enseñanzas, sugerencia, paciencia y tiempo invertido en la elaboración de este trabajo, para verlo finalmente concluido y poder lograr así un objetivo más de mi formación académica.

Al Dr. Mario Altamirano Lozano por darme la oportunidad de ser parte del laboratorio.

A los miembros del Jurado:

Dra. Elia Roldán Reyes

Biol. Cristina Alvarado Domínguez.

Dra. Lucila Álvarez Barrera.

Dra. Ma. del Carmen García Rodríguez.

Biol. Carlos Martínez Montoya

Por su tiempo y aportaciones para el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación y por permitirme aprender de ustedes.

*A todos los integrantes de la **Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN)**, Por hacer posible un ambiente cordial de trabajo, y por la ayuda que me brindaron.*

*En especial a tí, **Anahí**, por toda tu ayuda desinteresada, pero sobre todo por tu amistad.*

A todos mis profesores de la Carrera de Biología. Por sus enseñanzas.

A mis amigos y amigas de la carrera con los cuales trabaje hombro con hombro y que compartimos más que simplemente notas y estudio, con los cuales aprendí y pude trabajar realmente en equipo.

CONTENIDO

I. Resumen	1
II. Introducción.....	3
1. El material genético: ácido desoxirribonucleico (ADN).....	4
2. Ciclo celular	5
3. Cáncer	10
4. Tratamientos contra el cáncer	12
5. Quimioterapia	12
6. Casiopeínas	14
7. Casiopeína Ilgly	19
8. Antecedentes genotóxicos de las Casiopeínas.....	20
9. Linfocitos	23
10. Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH's)	26
III. Justificación	33
IV. Hipótesis.....	35
V. Objetivos.....	36
VI. Material y Método.....	37
VII. Evaluaciones	39
VII. Análisis Estadístico	40
IX. Resultados.....	41
X. Análisis de resultados	51
1. Genotoxicidad	51
2. Citotoxicidad.....	58
3. Citostaticidad.....	61
XI. Conclusiones	66
XII. Comentarios Finales y Perspectivas.....	68
XIII. Referencias Bibliográficas	70

ABREVIATURAS

AC: Aberraciones Cromosomitas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AS: Cromosomas Satelitados Asociados.

ACE: Aberraciones Cromosomitas Estructurales.

ACN: Aberraciones Cromosomitas Numéricas.

Cdc2: Quinasa

CDC: Cinética de División Celular.

EAUG: Electroforesis Unicelular Alcalina en Gel.

EE: Error Estándar.

G1: *gap 1*. Primer estadio del ciclo celular.

G2: *gap 2*. Segundo estadio del ciclo celular.

ICHs: Intercambio de Cromátidas Hermanas.

IM: Índice Mitótico.

KCl: Cloruro de potasio.

M: Mitosis del ciclo celular.

RH: Recombinación Homóloga.

S: Fase de síntesis del ciclo celular.

SB: Síndrome de Bloom.

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido.

TPL: Tiempo de Proliferación Linfocítica.

X: media

I. RESUMEN

Actualmente, diversas instituciones de nuestro país se centran en la búsqueda, aislamiento y síntesis de nuevos agentes terapéuticos con propiedades anticancerígenas. Las Casiopeínas son una familia de compuestos químicos que han sido patentados por la Facultad de Química de la UNAM, las cuales, fueron creadas tomando como base la estructura química del Cis-platino el cual es un anticancerígeno de excelencia, pero que desafortunadamente presenta un alto grado de toxicidad. Actualmente se sigue estudiando las propiedades anticancerígenas de las Casiopeínas, las cuales son compuestos con centro metálico: cobre II (Cu II), lo que les proporciona algunas ventajas: toxicidad menor, ya que el cobre es un elemento esencial para el organismo y, económico, ya que es más abundante que otros elementos (como el platino), por lo tanto más accesible para las personas de bajos recursos. Este nuevo compuesto ha demostrado que tienen actividad antineoplásica en sistemas de prueba tanto *in vitro* e *in vivo*, además de inducir apoptosis en líneas celulares murinas (L1210 y CH1).

Los objetivos de este trabajo fueron, evaluar la actividad genotóxica, citotóxica y citostática de Casiopeína IIgly, mediante el Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs), Índice Mitótico (IM), Cinética de División Celular (CDC), Tiempo de Proliferación Linfocítica (TPL), e Índice de Replicación (IR) en linfocitos humanos *in vitro*, tratados con 0.33, 0.66 y 1.00 µg/ml, de Casiopeína IIgly durante 24 horas.

Los resultados mostraron que se incrementaron los ICHs (8.05, 8.30, 11.38 VS 5.52), disminuyendo el IM (2.45, 1.45, 1.37 VS 3.93), se invierte el comportamiento de la CDC (1er.ciclo 18.05, 27.96, 37.25, VS 15.41, 2do.ciclo 29.55, 30.85, 38.29 VS 27.59 3er.ciclo 52.39, 41.18, 24.46 VS 56.92), el TPL se incremento (20.6, 22.61, 25.74 VS 20.01), y por último el IR disminuyó (2.09, 1.92, 1.64 VS 2.17). Todos fueron comparados con el testigo negativo, y todos con excepción del TPL mostraron en las tres concentraciones trabajadas ([0.33, 0.66, 1.00 µg/ml] expuestas durante 24 hrs) diferencias estadísticamente

significativas. Lo cual nos llevo a concluir que la Casiopeína Igly, indujo un efecto genotóxico, citotóxico y citostático en los linfocitos de sangre periférica humana *in vitro*.

II. INTRODUCCIÓN

A partir de 1909, cuando el biólogo William Bateson, bautizó con el nombre de *genética* a esta ciencia que acumula cada vez más conocimientos en torno a la herencia biológica [Lorente, 2004], se ha podido trabajar en tres áreas diferentes:

1) La *genética clásica*: la cual se ocupa de la teoría cromosómica de la herencia, la concepción de que los genes están dispuestos de forma lineal en los cromosomas; las posiciones relativas de los genes. 2) La *genética evolutiva*: que estudia los mecanismos del cambio evolutivo y los cambios en las frecuencias genéticas de las poblaciones. 3) La *genética molecular*: es el estudio del material genético y su estructura, replicación y expresión. Donde también se incluye la información surgida de los descubrimientos de las técnicas del ADN recombinante (ingeniería genética) [Tamarín, 1996].

Gracias a los esfuerzos a gran escala se ha llegado a secuenciar varios genomas (virus, bacterias, hongos, gusanos, vegetales, aves, etc.) entre ellos el de los mamíferos que constan de 25,000 genes y aproximadamente 3×10^8 pares de bases (pb)¹ [Lewin, 2007]. En particular, el genoma humano tiene 3,2 mil millones de pb y aproximadamente 24 000 genes y un solo gen tiene cerca de 27 000 pb de longitud y solo cerca del 25% del DNA se transcribe en RNA y menos del 2% codifica proteínas [Pierce, 2006].

1. EL MATERIAL GENETICO: ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)

¹ Entendiéndose por genoma, el conjunto de ADN de un organismo y en su interior se encuentran todos los genes que posee dicho organismo. La publicación de la secuencia completa del genoma humano, se realizó en el 2003 [Chieri, 2001].

El ADN, descubierto el 28 de febrero de 1953, por James Watson y Francis Crick **[Lorente, 2004]**, es un polímero, constituido por la unión de muchas unidades simples llamadas monómeros, cada uno de ellos está integrado por tres moléculas: cuatro bases nitrogenadas (las purinas y las pirimidinas), un azúcar (la desoxirribosa) y fosfatos (el ácido fosfórico) **[Audesirk y Audesirk, 1996; Chieri y Zannoni, 2001]**. Las bases nitrogenadas que se insertan a la cadena, sobre el azúcar, se llaman: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C)², de estas son aproximadamente 3,000 millones **[Soberón, 2004; Hidalgo et al., 2006]**. El ordenamiento de las bases nitrogenadas permite que los genomas de los seres humanos sean idénticos en el 99.9% de su secuencia, existiendo variaciones entre individuos solamente en el 0.1% **[INMEGEN, 2006]**. Las variaciones genéticas, como los SNPs³ (Single Nucleotide Polymorphism), nos confieren individualidad y pueden determinar el riesgo que tenemos a padecer alguna enfermedad crónica degenerativa **[INMEGEN, 2006]**.

El ADN es una doble hélice, integrado por dos cadenas que son complementarias **[Soberón, 2004]**. Esta cadena mide cerca de metro y medio, pero se compacta y alberga en el núcleo de cada una de los trillones de células que forman el cuerpo humano. El genoma humano se compacta en los cromosomas, estructuras que se agrupan en 23 pares es decir, 22 pares autonómicos y 1 par sexual **[Hidalgo et al., 2006] (Figura. 1)**.

² La adenina y la guanina son llamadas purinas, y la citosina y la timina, pirimidinas. **[Lorente, 2004; Soberon, 2004; Hidalgo et al., 2006]**

³ Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (Single Nucleotide Polymorphism) es una variación en la secuencia de ADN que afecta a un solo nucleótido (A, T, C o G) del genoma. Por ejemplo, un SNP puede hacer que la secuencia AAGCCTA pase a ser AAGCTTA. Una de estas variaciones debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como un SNP. Los SNP forman hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, y aparecen cada 100 a 300 bases a lo largo del genoma humano. Dos tercios de los SNP corresponden a la sustitución de una citosina (C) por una timina (T). Estas variaciones en la secuencia del ADN pueden afectar a la respuesta de los individuos a enfermedades, bacterias, virus, productos químicos, fármacos, etc. Los SNP son de gran utilidad para la investigación médica en el desarrollo de fármacos. Debido a que los SNP no cambian mucho de una generación a otra, es sencillo seguir su evolución en estudios de poblaciones. También se utilizan en algunos tipos de pruebas genéticas. Los SNP se consideran una forma de mutación puntual que ha sido lo suficientemente exitosa evolutivamente para fijarse en una parte significativa de la población de una especie [Yunis y Yunis 2002, <http://es.wikipedia.org/wiki/SNP>]

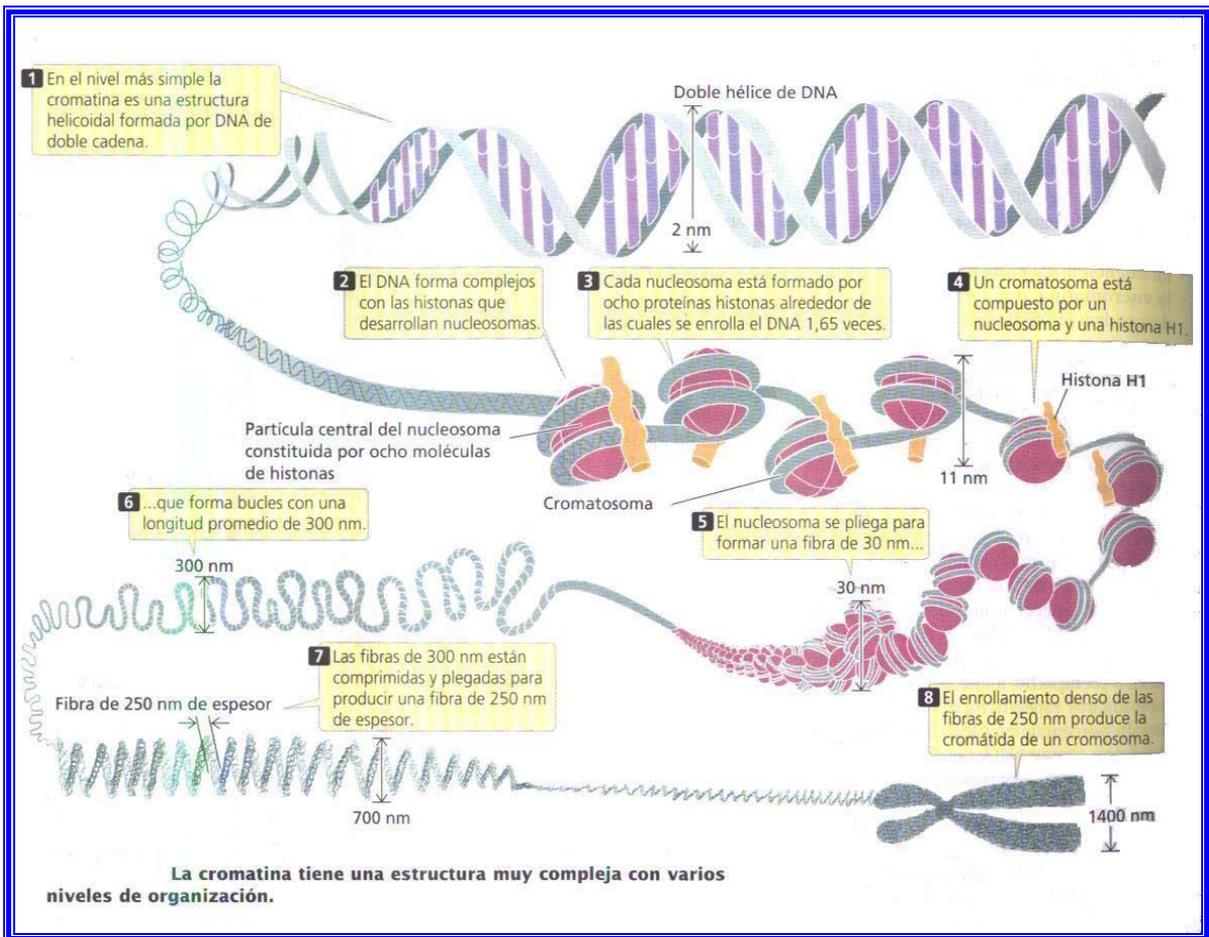


Figura 1. Estructura del ADN (Ácido desoxirribonucleico) (Tomada de **Pierce, 2006**).

2. CICLO CELULAR

Debido a que todos los organismos vivos tienen una o más células, y todas las células descienden de células preexistentes, la reproducción celular es absolutamente esencial para la existencia de la vida en la tierra **[Audesirk, 1996]**.

Casi todas las células se reproducen como se expresa en estas frases reiterativas: crecimiento y división en dos, crecimiento, división en dos, etc. Este proceso llamado división celular, produce dos células hijas que, si todo funciona de manera adecuada, tienen exactamente la misma información genética que la célula que les dio origen, la cual está contenida en los

cromosomas, que son copias exactas de los cromosomas originales. Cada ciclo de crecimiento y división celular recibe el nombre de ciclo celular **[Audesirk, 1996]**.

El ciclo celular eucariótico consta de dos fases principales. La primera, la interfase: que es el periodo entre las divisiones celulares, durante la cual la célula adquiere nutrientes del medio, crece y duplica el material genético. Durante la segunda fase, la división celular (también llamada fase M), se divide una copia de cada cromosoma y la mitad del citoplasma aproximadamente entre cada una de las dos células hijas (**Figura. 2**) **[Audesirk, 1996]**.

La interfase está dividida en tres fases, llamadas G1, S, G2. El periodo posterior a la división celular más reciente y previa a la duplicación de los cromosomas es la fase G1. La mayor parte del crecimiento y de la actividad de las células ocurre durante la fase G1. Esta fase es un punto llamado de restricción, ya que en la célula ocurre una especie de “evaluación interna” de su capacidad para completar el ciclo celular y producir dos células hijas viables. Si la evaluación resulta negativa, la célula no se divide; si resulta positiva, la célula está autorizada para duplicar el ADN y entrar en la división celular. Una vez que se ha dado la señal de “siga”, la célula no puede regresar **[Audesirk, 1996]**.

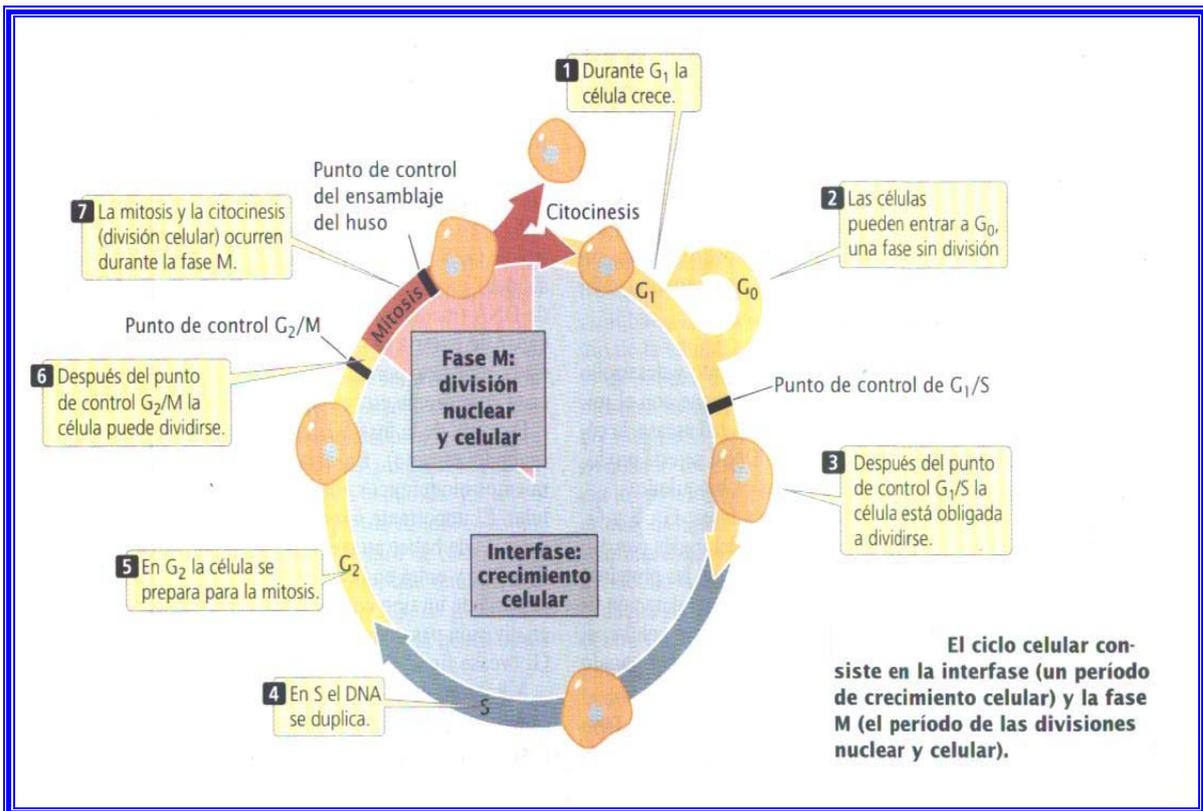


Figura 2. Ciclo celular (Tomada de Pierce, 2006).

La duplicación de cromosomas define la fase de síntesis o fase S; este es el único momento de síntesis de ADN que ocurre en condiciones normales. Cada cromosoma se duplica (sólo una vez). Durante la fase S, en los animales también se duplican los centríolos. El periodo posterior a la síntesis de ADN, pero previo a la próxima división celular, es la fase G₂ [Audesirk, 1996].

Muchos tipos de células de mamíferos progresan lentamente durante la interfase, pasando aproximadamente, cinco horas en la etapa G₂, siete duplicando su ADN durante la fase S, y tres horas en G₂ preparándose para la división celular. Aunque la división celular generalmente dura en promedio una hora, algunos otros son muy cortos, mientras que otros pueden durar semanas o toda la vida sin duplicarse [Audesirk, 1996].

El ciclo celular promedio de los linfocitos dura aproximadamente 24 horas, donde: G₁ es de doce horas, la fase de síntesis o (S), seis horas, G₂ cuatro

horas y finalmente mitosis que solo dura una hora [Watt y Stephen, 1986; Lodish et al., 2005]. La división celular consiste de una división nuclear y una división citoplasmática. Durante la división nuclear, copias completas e idénticas de todos los cromosomas quedan contenidas en dos núcleos nuevos.

La división nuclear recibe el nombre de mitosis (del griego “hilos”). Durante la división citoplasmática, la *citocinesis*⁴; el citoplasma se divide en dos células hijas, recibiendo cada célula uno de los núcleos recientemente formados y de manera general, cantidades casi iguales de citoplasma. Por consiguiente las dos células hijas son esencialmente idénticas. Aunque casi todas las células se ajustan a este esquema, la división nuclear y la división citoplasmática son acontecimientos potencialmente independientes [Audesirk, 1996].

La mitosis es un proceso continuo, sin embargo, y con fines descriptivos, se divide en cuatro estadios: profase, metafase, anafase y telofase (en griego: pro-, antes; meta-, medio; ana- detrás; telo-, final). La duración de los cuatro estadios varía entre especies, entre órganos dentro de una misma especie, e incluso entre células dentro de un tipo celular dado. Aparentemente, la división celular se halla bajo el control general de dos proteínas, una que permanece constante a lo largo de todos los ciclos celulares, llamada cdc2 (por *cell-división cycle protein number two* o proteína número 2 del ciclo de división celular) y otra, que oscila durante el ciclo celular, denominada ciclina. Cuando se combinan y modifican, estas dos proteínas inician la división celular. La proteína cdc2 es una quinasa, una enzima que transfiere un grupo fosfato del ATP a otras proteínas. Una forma habitual que emplean las células para regular la actividad enzimática es controlando el nivel de fosforilación de las enzimas [Tamarin, 1996].

La primera fase de la mitosis recibe el nombre de profase, y se caracteriza por un acortamiento y engrosamiento de los cromosomas, de manera que éstos se

⁴ En la mayor parte de las células, durante la telofase se inicia la división del citoplasma en dos partes casi iguales. En las células animales, los microfilamentos compuestos de las proteínas actina y miosina forman anillos alrededor del plano ecuatorial de la célula, rodeando los restos del huso mitótico. Los microfilamentos se fijan a la membrana plasmática. Durante la citocinesis, los anillos se contraen y jalan el plano ecuatorial de la célula. Finalmente la “cintura” se contrae completamente, dividiendo el citoplasma en dos células hijas. La citocinesis en las células vegetales es muy diferente [Audesirk, 1996].

pueden distinguir unos de otros (condensación de los cromosomas). También en este momento la envoltura (membrana) nuclear se desintegra, el nucléolo desaparece, los centriolos cuando están presentes se duplican y migran a polos opuestos de la célula y se forma el aparato mitótico o huso (esto se conoce también como: ensamble del huso mitótico y captura de los cromosomas por parte del huso) **[Tamarín, 1996]**.

A medida que avanza la profase, se puede observar que cada cromosoma está formado por dos cromátidas hermanas y que las fibras del huso se unen a los cromosomas individuales por sus cinetocoros, dos estructuras proteicas discoideas en cada centrómero. Los cinetocoros se encuentran en lados opuestos del centrómero, y cada uno está asociado con una cromátida hermana esta disposición asegura que las cromátidas se separen unas de otras durante el siguiente estadio de la mitosis **[Tamarín, 1996]**.

El segundo estadio de la mitosis es la metafase, donde los cromosomas son dirigidos a su posición en el plano ecuatorial del huso. La alineación de los cromosomas en este plano marca el final de la metafase. La siguiente etapa es la Anafase, la cual inicia con la separación de las cromátidas hermanas, siendo éstas arrastradas a polos opuestos de la célula. El arrastre tiene lugar a velocidad uniforme, y los cromosomas parecen ser empujados hacia los centriolos por acción de las fibras del huso **[Tamarín, 1996]**.

La telofase, último estadio, donde ahora la célula recorre a la inversa los pasos de la profase para volver al estadio de interfase activa. Los cromosomas se desenrollan y empiezan a llevar a cabo sus funciones fisiológicas (dirección de la síntesis de proteínas, replicación, etc). Se forma de nuevo una envoltura nuclear alrededor de cada conjunto de cromosomas, se forman los nucléolos, y tiene lugar la citocinesis. La célula ha entrado ahora en la fase G1 del ciclo celular **[Tamarín, 1996]**.

El ciclo celular es muy importante y delicado, ya que un mal funcionamiento de los controles de crecimiento de las células pueden desencadenar diversas anomalías en el organismo, que en el mejor de los casos pueden ser tratados y

algunos curados. Por otra parte, cuando se pierde el control del ciclo celular se puede desencadenar enfermedades como el cáncer, donde una célula se ha escapado del proceso de regulación normal y que se divide sin control; esta enfermedad se caracteriza por tener una gran proliferación celular que posteriormente se puede diseminar y causar la muerte.

3. CÁNCER

En la actualidad se reconoce al cáncer como un proceso complejo que involucra anomalías genéticas en el ámbito celular, que implica una serie de mutaciones secuenciales en los genes de control de división celular [Butterworth y Bogdanffy, 1999; Yodada, 2000]. Muchos de estos genes actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, y la pérdida o inactivación de estos genes da lugar a dos procesos sucesivos; el aumento en la proliferación de un grupo de células denominadas tumor o neoplasia, y la posterior adquisición de estas células de la capacidad invasiva que les permite migrar de su sitio natural en el organismo, colonizando y proliferando en otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis (aspecto más crítico del cáncer) [Bruce *et al.*, 1989; Muñoz, 1997; Butterworth y Bogdanffy, 1999; Yodada, 2000].

El cáncer puede ser, el resultado de que en una célula se produzca de forma aleatoria varias acciones indeseables, cuyos efectos son acumulativos. Se conocen algunos efectos químicos, físicos y biológicos que juegan un papel importante en las alteraciones genéticas que son necesarias para transformar células normales en cancerosas. [Klug y Cummings, 2000] El aumento de la probabilidad de estos sucesos críticos, hasta el punto lo suficientemente alto, se hace prácticamente inevitable, que al menos una célula se convierta en cancerosa [De Vita *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1996; Gil *et al.*, 1997].

Por otra parte, algunos genes que regulan la apoptosis son cruciales en esta transformación celular, como los miembros de la familia de genes *bcl-2*: *bcl-2* y *bcl-X_L*, que codifican productos proteínicos que inhiben la apoptosis. Por lo que

se piensa que una alta expresión de esta familia de genes ayudan a transformar las células linfoides en células cancerosas de linfomas por inhibición de las señales que inducirían en condiciones normales la muerte celular. **[Goldsby, 2003]** Las mutaciones en los genes también juegan un papel muy importante en este evento. Un suceso como el cáncer requiere al menos de mutaciones en cinco genes: c-myc, c-fos, c-ras, c-sys y c-cyg **[Valle y Weiss, 2003]**.

El aumento de la proliferación de un grupo de células denominado tumor o neoplasia y la posterior adquisición de estas células de la capacidad invasiva que les permite migrar de su sitio natural en el organismo, colonizando y proliferando en otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis. Ambas alteraciones son necesarias para definir un cáncer, ya que, si sólo tiene lugar un aumento del crecimiento de un grupo de células en el lugar donde normalmente se hallan, se habla de un tumor benigno, mientras que, cuando las células de un tumor son capaces de invadir los tejidos circundantes o distantes tras penetrar en el torrente sanguíneo o linfático, se habla de un tumor maligno **[Bruce et al., 1989; Muñoz, 1997]**.

4. TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER

A lo largo del tiempo, se han desarrollado distintas formas de tratamiento para el cáncer, ya que antes la estrategia fundamental era la extirpación quirúrgica del tumor local, por lo que no existían alternativas para los pacientes con neoplasias metastásicas. Durante la década de los 40's y 50's surgió la radioterapia como opción alternativa para algunas localizaciones primarias, tales como el cáncer del cuello del útero y el cáncer de las zonas de la cabeza, así como para los linfomas. La radiación también resultó eficaz como terapia de muchas formas de cáncer metastásico, incluyendo la infiltración del hueso.

Posteriormente, con el desarrollo de fármacos antineoplásicos (década de los 50's) la quimioterapia del cáncer comenzó a ser utilizada para las neoplasias diseminadas [De Vita *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1996].

Actualmente la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia han llegado a ser modalidades terapéuticas básicas, ya que han incrementado la posibilidad de supervivencia de los pacientes además de reducir los efectos secundarios del tratamiento, aunque hoy en día existen otros tipos de procedimientos terapéuticos tales como: la fototerapia, la hipertermia, la crioterapia, y la inmunoterapia [Murphy *et al.*, 1996].

5. QUIMIOTERAPIA

Una gran proporción de la investigación clínica sobre el cáncer se centra en el problema de como matar selectivamente las células cancerosas. El uso apropiado de un agente contra el cáncer depende, del entendimiento de su mecanismo de acción a nivel molecular, celular, de tejidos y órganos, así como dentro del animal como un todo. Sin este conocimiento solo se pueden tomar decisiones intuitivas para la elección de agentes anticancerígenos y esperar que el resultado clínico sea útil [Sport y Suh, 2000].

La quimioterapia del cáncer, es el uso de fármacos de composición conocida para tratar a los tumores diseminados y esta dirigida contra tumores que se han extendido desde un inicio o que tienen una alta capacidad de metástasis. El índice terapéutico de la quimioterapia del cáncer varía marcadamente de un tumor a otro y de fármaco a fármaco, según su actividad bioquímica y su origen, por lo que se han clasificado en: agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, alcaloides vegetales, agentes hormonales y compuestos misceláneos [Magrath, 1989; Murphy *et al.*, 1996].

Aunque los principios de la quimioterapia han sido claramente demostrados en animales (perros, gatos, conejos, ratón) [Gómez *et al.*, 1994; Quiroz *et al.*,

1996; Fuentes et al., 2002], así como en estudios clínicos en humanos, ninguno de los agentes anticancerígenos existentes es ideal, debido a la falta de eficacia, de selectividad y a sus efectos tóxicos producidos [**Bruce et al., 1989**].

Muchas de las más recientes drogas son sintetizadas con la tecnología de la química orgánica. La síntesis química produce agentes con una alta pureza. La gran ventaja de estas drogas sintéticas es que se pueden hacer cambios en la estructura del fármaco durante el proceso de síntesis y estos cambios pueden realzar la actividad farmacológica o reducir sus efectos [**Burgen, 1986; Sarel et al., 1992**].

La química orgánica tradicional sintetiza y purifica un nuevo compuesto. La bioquímica estudia el metabolismo de los procesos vivos. La toxicología investiga los efectos dañinos potenciales del químico. La farmacología examina las actividades farmacológicas específicas y su relación estructura-actividad. La ciencia de la computación, utiliza máquinas y softwer sofisticados para analizar y evaluar los nuevos fármacos. Cada una de estas disciplinas contribuye con el desarrollo de nuevos fármacos [**Chi-Jen, 2000**].

El descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos es particularmente difícil debido a varios factores; a) a la falta de un adecuado conocimiento en la bioquímica de diferentes tipos celulares de tumores, b) a la heterogenicidad de los tumores, c) al desarrollo de resistencia bioquímica de los fármacos, y d) a la baja predictibilidad en modelos animales. Existe una continua necesidad de descubrir y desarrollar nuevos agentes antineoplásicos debido a su escasez [**Magrarh, 1989**].

Dentro de la quimioterapia existe un gran número de fármacos antineoplásicos tanto de origen orgánico como inorgánico, sin embargo, la existencia de tumores refractarios a estos tratamientos, su toxicidad y costos elevados, estimulan la búsqueda de nuevas moléculas. Por ejemplo, existen 44 compuestos aprobados para su uso contra el cáncer, de ellos solo dos, el

cisplatino y el carboplatino son fármacos inorgánicos basándose en el platino, y ninguno de ellos son de tecnología nacional [Bravo *et al.*, 2002].

6. CASIOPEÍNAS

Actualmente, diversas instituciones de nuestro país se centran en la búsqueda, aislamiento y síntesis de nuevos agentes terapéuticos con propiedades anticancerígenas, como las Casiopeínas (su nombre proviene de la constelación Casiopea, formada por seis estrellas, ordenadas con el mismo arreglo molecular de estos compuestos) las cuales comprenden una serie de compuestos de coordinación de cobre (II) como centro metálico, esta constituida por una parte inorgánica (fenantrolina) y otra orgánica (glicina), en la esfera de coordinación presenta un ligante bidentado del tipo diiminas (N-N) y otro que puede ser aminoácido (N-O) o donador (O-O) (**Figura 3**). Los complejos estudiados de esta familia han demostrado tener actividad citostática, citotóxica y antineoplásica [Keppler, 1993].

Las Casiopeínas fueron desarrolladas en la Facultad de Química de la UNAM, tomando como base la estructura molecular del Cis-platino el cual resulta un anticancerígeno de excelencia, que desafortunadamente presenta un alto grado de toxicidad. Por lo que el centro metálico cobre (II), proporciona a las Casiopeínas ciertas ventajas, como el ser económicas (más que el Cis-platino), debido a que el cobre es un metal abundante en la naturaleza; así mismo también presenta una menor toxicidad ya que este elemento es esencial en los organismos vivos y puede ser eliminado fácilmente por medio de procesos homeostáticos en comparación con los complejos de platino. [Ruiz Azuara, 2000; Bravo *et al.*, 2002]. La Dra. Lena Ruiz Azuara consideró a las Casiopeínas como componentes quimioterapéuticos, por lo que inició su desarrollo en 1976, como una alternativa para el cáncer [Santiago, 2004; Atilano, 2007].

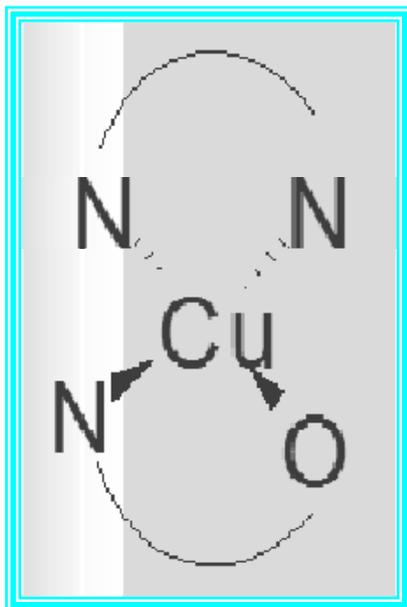
Cuando un fármaco es prometedor, como las Casiopeínas, se someten a una serie de evaluaciones preclínicas, para identificar sus propiedades farmacológicas, farmacocinéticas, toxicológicas y genotóxicas; dentro de esta última es necesario evaluar el daño producido al material genético. Así como en las clínicas, para evaluar su relación estructura-actividad, sus efectos a corto plazo, la dosis óptima, los riesgos y su eficacia en el humano, entre otros, para que pueda salir al mercado **[Chi-Jen, 2000]**. Cabe resaltar que se están llevando a cabo trabajos en los que se trata de establecer los mecanismos de inducción de daño de las Casiopeínas **[Verdejo et al., 1998; Carvallo et al., 2002]**.

Al realizar estudios para observar las interacciones de las Casiopeínas con el ADN, se obtuvo que solo hay interacciones con la adenina, mediante el apilamiento entre los sustituyentes biperidina o fenantrolina del complejo mixto y el anillo de la base, lo cual lleva a pensar que las Casiopeínas actúan como intercalantes **[Tovar et al, 2002]**.

Por otra parte, todas las Casiopeínas contienen el ligante diimina distinto, con características hidrofóbicas, que le permiten actuar como intercalante con las bases del ADN **[Cirigo et al, 2002; Tovar et al, 2002]**. El ligante hidrofílico le permite a la molécula ser transportada con facilidad. La naturaleza, el número y la posición de los ligantes, son los responsables de generar selectividad preferencial sobre algunos tejidos tumorales específicos **[Ruiz Azuara, 2000; Bravo et al, 2002; Alemón et al., 2006]**.

También se ha propuesto que el mecanismo de acción de las Casiopeínas, está relacionado con la reducción del átomo de cobre (II) a cobre (I) en su estructura, lo que subsecuentemente generaría la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como hidroxilo (OH) o super óxido (O_2^-), las cuales pueden reaccionar con diferentes macromoléculas tal como los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos de la membrana, causando un daño oxidativo en el interior de la célula **[Alemón et al., 2006; Rivero Müller et al., 2007]**.

La fórmula general de las Casiopeínas son:



Donde:

(N-N) = Ligante del tipo diimina (fenantrolinas o bipyridinas substituidas)

(N-O) = Ligante aminoacidatos o péptidos

(O-O) = Ligante donador (acetilacetionato o salicilaldehidato)

Figura. 3. Estructura química general de las Casiopeínas.

Este grupo de compuestos fue diseñado pensando en:

- ❖ Que la planaridad en la geometría de la molécula y el ligante diimina con carácter hidrofóbico le conferirían la posibilidad de actuar como intercalante a través de interacciones con las bases del ADN y el ligante cargado le proporcionaría una polaridad necesaria para el transporte de la molécula.
- ❖ Que estos ligantes presenten propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas, le confiere la característica de quelatos mixtos.
- ❖ La naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el ligante diimina serían los responsables de la variación en la actividad biológica.
- ❖ Al presentar un núcleo metálico de transición que es esenciales para los procesos vitales como el cobre II, tiene una geometría más cercana a los compuestos de platino (Cis-platino), pues al igual que éste, el cobre forma estructuras cuyos átomos se encuentran en un mismo plano.

- ❖ El uso de elementos esenciales disminuye de manera importante la toxicidad de los fármacos, ya que los organismos tienen procesos homeostáticos para regular los aspectos de elementos esenciales.
- ❖ El cobre puede o no intercambiar algunos de sus ligantes para coordinarse directamente en el nitrógeno de las bases, formando enlaces similares a los observados con el Cis-platino.
- ❖ Los ligantes son los responsables de la modulación en la distribución y transporte, y por tanto de la selectividad tumoral de la molécula.
- ❖ Los ligantes quelatos aumentarían la estabilidad de los sistemas y mantendrían la geometría *cís*, la cual es la más activa [Ruiz Azuara, 2000].

Durante la década de los 80's, se comprobó la actividad antitumoral de algunos compuestos de la familia de las Casiopeínas en ensayos *in vivo* basados en protocolos internacionales [Ruiz-Ramírez *et al.*, 1991; Gracia *et al.*, 2001], posteriormente fueron patentados en 1992, por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en la facultad de química [Ruiz-Azuara *et al.*, 1992].

Tabla 1. Sub-familias y fórmulas generales de las Casiopeínas®.

Sub-familias	Fórmula general
Casiopeína I	[Cu(4,7-difenil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína II	[Cu(4,7-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína III	[Cu(N-N)(O-O)]NO ₃
Casiopeína IV	[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína V	[Cu(5R-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VI	[Cu(5,6-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VII	[Cu(fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína IX	[Cu(bipiridina)(O-N)]NO ₃

Hasta el momento, de las más de 100 Casiopeínas que han sido sintetizadas y caracterizadas [Ruiz-Ramírez *et al.*, 1992; Gasque *et al.*, 1999], se han

seleccionado las más activas y menos tóxicas para realizar pruebas preclínicas en animales. Del total de compuestos se eligieron 24, de los cuales se seleccionaron cinco, y finalmente, tres, los más prometedores por su solubilidad y su selectividad para leucemia y carcinomas. Estos tres compuestos que llevan el nombre de Casiopeínas I, II y III, han demostrado tener actividad antineoplásica en los ensayos exigidos por el “Cancer Chemotherapy National Service Center del National Center Institute”, de los Estados Unidos [Ruiz-Azuara *et al*, 1995; Müller *et al.*, 1999].

7. CASIOPEÍNA IIgly

Particularmente, la Casiopeína IIgly, con fórmula: Aqua (4,7-diimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre (II) Nitrato, tiene un peso molecular de 425.89 g/mol y un pKa de 5.4, es estable en estado sólido y una vez disuelta en agua hasta por 21 días en condiciones de oscuridad y refrigeración, se degrada fácilmente cuando se expone a la luz [Ruiz-Azuara, 1992]. Es un polvo fino color azul intenso, con una densidad aparente de 0.425 g/ml, con un tamaño de partícula >40 y <50 micras [Fuentes *et al.*, 2004], que no se puede administrar por vía oral, pues el pH del estómago es de 1 y la Casiopeína se disocia a ese pH, por lo que no presentaría actividad farmacológica [Ferrer *et al.*, 1995]. Es soluble en agua, etanol y metanol y se puede abreviar con la siguiente clave Cas IIgly (Figura 4). Se ha reportado que la Casiopeína II-gly se une eficientemente a las proteínas plasmáticas como la albúmina [García y Fuentes, 2002], lo que implica que puede ser transportada a los diferentes órganos del cuerpo.

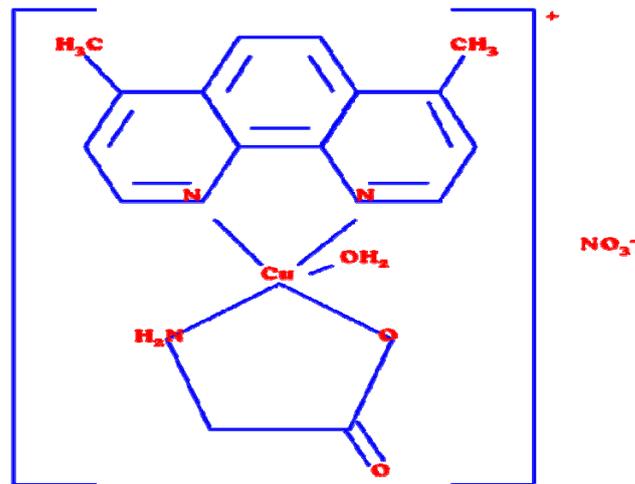


Figura. 4 Estructura química de la Casiopeína IIgly.

[4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, glicina cobre II) nitrato]

[Tomado de Reyes *et al.*, 2003]

En distintas pruebas, la Casiopeína IIgly a mostrado una mayor reducción del Índice Mitótico en contraste con el Cisplatino y la Mitomicina C; además tiene un espectro de acción amplio contra tumores sólidos y contra líneas celulares HeLa, CaLo, L1210, S180, B16 y LW1; es citotóxica y también elimina células por apoptosis; puede degradar ADN y realizar interacciones con la Adenina y con la proteínas plasmáticas como la albúmina, además de ser embriotóxica y teratogena [Huber *et al.*, 1987; Morales *et al.*, 1995; De Vizcaya *et al.*, 1996; Rivero, Müller *et al.*, 1998; Tovar *et al.*, 2002; González, 2004].

A la par de los tratamientos empleados actualmente en el cáncer, se han realizado grandes esfuerzos para identificar sustancias o mezclas complejas que puedan en un futuro ayudar a tratar o inhibir el cáncer, tal es el caso de las Casiopeínas. Aun con todas estas investigaciones, en la actualidad se les ha dado un enfoque hacia la prevención del cáncer. Estudios en los que se revela una reducción en el padecimiento del cáncer, si se incrementa el consumo de frutas y vegetales, así como de algunos fitonutrientes como los flavonoides, carotenoides, entre otros. [De Vita *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1996; Gil *et al.*, 1997; García *et al.*, 2001; Young y Ferguson, 2003].

A la fecha las Casiopeínas se encuentran en la fase preclínica y se están realizando los estudios necesarios para obtener información sobre su farmacodinámica y sus propiedades toxicológicas, dentro de esta última, es necesario evaluar el daño producido al material genético [Verdejo *et al.*, 1998; Santiago, 2004; Carvallo, 2007].

8. ANTECEDENTES DE LAS CASIOPEÍNAS®

Los estudios de genotoxicidad, se refieren al estudio sistemático de los efectos de diversos agentes físicos, químicos y biológicos presentes en el ambiente, sobre el material genético de los organismos [Prival, 1980; Moutsschen, 1985].

Dado que las Casiopeínas I, II, y III, han demostrado tener una mayor actividad antineoplásica, éstas han sido sometidas a un gran número de pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*, por ejemplo, un estudio realizado por Ruiz-Ramírez *et al.*, (1991), reportó que las Casiopeínas I, II, y III tienen actividad antineoplásica *in vivo* en líneas tumorales, tales como, L1210 (leucemia), S180 (sarcoma), B16 (melanoma) y L5178 (de un clon llamado LW).

García *et al.*, (1991) señala que los ratones que fueron tratados con Casiopeína IIgly (2.0mg/Kg) presentan hipotermia, diarrea leve y una pérdida de peso de aproximadamente el 13%, la muerte se presenta a las 12 hrs después de la inyección, dicha muerte se debe aparentemente al decrecimiento de la actividad motora, hipotermia y alteraciones en la respiración. Posteriormente se demostró que la Casiopeína IIgly interactúa directamente con las mitocondrias aisladas o dentro de las células intactas, causando una variedad de efectos en diferentes sitios, como la inhibición tanto de la fosforilación oxidativa, como de la síntesis de ATP [Marín *et al.*, 2003].

Este compuesto es citotóxico en líneas tumorales humanas de Sarcoma S189, CaLo y HeLa, además, a través de estudios toxicológicos (LD₅₀) han mostrado

ser menos tóxicas **[Ruiz-Ramírez et al., 1993]**. Otros estudios, indican que las Casiopeínas producen mutaciones somáticas en ojos y alas de *Drosophila melanogaster* **[Ruiz-Ramírez et al., 1993; Cruces et al., 1994]**, Por otra parte, la inhibición del índice mitótico es 4 veces menor en comparación con el Cisplatino o la Mitomicina C **[Morales et al., 1995]**.

De Vizcaya et al., (2000), mostró que la Casiopeína IIgly es capaz de inducir muerte celular por apoptosis en líneas celulares, tales como, de leucemia murina L1210 y de carcinoma ovárico humano CHO, y cuando se realizó el análisis de la morfología nuclear éste mostró condensación de cromatina y fragmentación nuclear (apoptosis). Estudios de microscopía electrónica y fluorescente, apoyan la hipótesis de que la intercalación con la adenina es el mecanismo de acción entre las Casiopeínas y el ADN **[Cirigo et al., 2002]**. Otros estudios confirman que las Casiopeínas tienen actividad antineoplásica en las líneas celulares murina (B16) y humana (HeLa, SiHa, CaSki, C33-A y CaLo), y que además tienen una mayor actividad en líneas celulares humanas cérvico-uterinas **[Gracia-Mora, 2001; Rico et al., 2002]**.

Así mismo, Vizcaya et al., (2003), encontró que la Casiopeína IIgly, induce anemia hemolítica en ratas, provocada por un daño directo a los eritrocitos. González (2004), demostró que la Casiopeína IIgly, es embriotóxica y teratogena en ratones de la cepa CD-1. Florín et al., (2004) reportó que la Casiopeína IIgly ejerce un efecto citotóxico, y que induce daño al ADN que se refleja en el incremento de la longitud de los cometas, así como en la aparición de células con daño total. Castañeda et al., (2004) utilizando ratones CD-1, encontró que la viabilidad espermática se reduce cuando se administra la Casiopeína II-gly en dosis de 1.1 y 2.2 mg/kg (que corresponden a 1/4 y 1/8 de la LD50) en tratamientos de 60 días.

Más recientemente Atilano y Roldán, (2006), reporta que la Casiopeína IIgly es un estupendo agente antineoplásico, puesto que es capaz de inhibir la división celular con eficacia, sin incrementar considerablemente el contenido de micronúcleos en células sanas, además de que no induce aberraciones cromosómicas estructurales. Cermeño et al., (2006), reporta que hay

disminución de la viabilidad en las células del corazón, hígado, bazo, riñón, y testículo de ratones de la cepa CD-1 cuando se expusieron por 24hrs a la Casiopeína IIgly a $\frac{1}{2}$ de la LD50, también los resultados de electroforesis unicelular alcalina mostraron incremento en la longitud total de los cometas. Así mismo Alemón *et al.*, (2006) reporta que las Casiopeínas manifestaron actividad citotóxica y genotóxica en células HeLa y tumores xenotransplantados.

Por otro lado, Carvallo, (2007) demostró, que la Casiopeína IIgly induce apoptosis y oncosis a HCT-15 (en las dosis 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$). Inhibe la proliferación celular, es irritante en la administración intraperitoneal. Tiene actividad antitumoral sobre HeLa transplantando al ratón desnudo en las dosis utilizadas.

Todos estos estudios que se han realizado hasta la fecha, tanto en líneas tumorales como en animales de laboratorio, han demostrado baja toxicidad y una alta selectividad por algunos tumores, lo cual las hacen una serie de compuestos con mucho futuro, tal es el caso de la Casiopeína IIgly, que fue seleccionada como uno de los compuestos más apropiados de esta familia para realizar estudios de genotoxicidad [**Santiago, 2004**], ésta es una fuerte candidata a convertirse en un fármaco de uso común para combatir el cáncer. No obstante, aún se requiere la realización de varias pruebas para realizar este fin [**Atilano, 2007**].

9. LINFOCITOS

En 1950, se reconocieron los linfocitos como las células, a cargo de las inmunidades celular y humoral, estas células son uno de muchos tipos de glóbulos blancos que se producen en la medula ósea por el proceso de hematopoyesis [**Goldsby, 2003**].

Los linfocitos salen de la medula ósea, circulan en la sangre y los sistemas linfáticos. Residen en diversos órganos linfoides. Debido a que producen y muestran receptores en su superficie celular que unen antígenos, los linfocitos median los atributos inmunológicos definidores de especificidad, memoria y autorreconocimiento **[Goldsby, 2003]**.

En la sangre de las personas sanas, las concentraciones de linfocitos varía mucho con la edad, encontramos por ejemplo en un adulto de 21 años el número de estas células es de $2500/\text{mm}^3$, mientras que en los recién nacidos la cantidad es más del doble ($5500/\text{mm}^3$) **[Nataranjan y Obe, 1982]**. Un adulto normal tiene alrededor de cinco litros de sangre con unos 2000 linfocitos/ mm^3 para un total de casi 10^{10} linfocitos. Durante una infección aguda aumenta la cifra de linfocitos de cuatro a 15 veces y se obtiene una cuenta total de linfocitos de 40 a 50×10^9 . Debido a que el sistema inmunitario no puede sostener un incremento tan masivo de las cifras de células por un periodo prolongado, el sistema requiere un medio para eliminar los linfocitos activados innecesariamente una vez que pasa la amenaza antigénica. Se estima que una célula plasmática aislada puede liberar más de 2000 moléculas de anticuerpos por segundo **[Goldsby, 2003]**.

Los linfocitos constituyen del 5% de los glóbulos blancos del cuerpo humano (los límites dependen del tamaño del cuerpo y la edad $\sim 10^{10}$ a 10^{12}) **[Rooney y Czepulkowski, 1978; Goldsby, 2003]**.

Los linfocitos B y T en reposo son células pequeñas móviles, no fagocíticas, que no es posible diferenciar a nivel morfológico. Los linfocitos B y T que no han interactuado con antígeno, son conocidos como vírgenes o sin cebar, son células en reposo en la fase G_0 del ciclo celular. Dichas células que se llaman asimismo linfocitos pequeños, solo tienen alrededor de $6 \mu\text{m}$ de diámetro. Los linfocitos pequeños tienen cromatinas empacadas a gran densidad, pocas mitocondrias y un retículo endoplásmico y aparato de Golgi poco desarrolladas. A menudo se piensa que el linfocito virgen posee un periodo de vida corto. La interacción de linfocitos pequeños con antígeno, en presencia de ciertas citosinas, inducen a estas células a entrar en el ciclo celular y progresar de G_0

a G1 y más adelante a S1, G2 y M. A medida que transcurren a través del ciclo celular, los linfocitos crecen hasta células blasto de 15 µm de diámetro llamadas linfoblastos; éstos muestran una relación citoplasma-núcleo más alta y mayor complejidad de organelos que los linfocitos pequeños **[Goldsby, 2003]**.

La evaluación de daño genético inducido por agentes físicos y químicos, por ejemplo: estudios de individuos expuestos a agentes químicos industriales y al desarrollo de nuevos compuestos farmacéuticos y terapéuticos, y de células en cultivo, han mostrado que los linfocitos humanos de sangre periférica son un indicador extremadamente sensitivo de cambios en la estructura cromosómica inducidos tanto *in vivo* **[Evans et al., 1979; Evans, 1982; Yüzbaşıoğlu et al., 2006]**, como *in vitro* **[Evans, 1970; Buckton y Evans, 1973; Yüzbaşıoğlu et al., 2006]**. Dichos cambios en la estructura cromosómica ofrece una evidencia morfológica de daño al material genético. A pesar de los problemas que existen en la extrapolación de los resultados *in vitro* a la situación *in vivo*, los linfocitos ofrecen muchas ventajas como sistema de prueba.

1. Se obtiene fácilmente un gran número de células humanas: en pocos ml de sangre periférica que se extraen fácil y repetidamente de un individuo se obtienen por cada ml de 1 a 3×10^6 linfocitos.
2. Los linfocitos se distribuyen en todo el cuerpo, circulando en todos los tejidos y una proporción tiene vida larga.
3. Virtualmente todos los linfocitos de sangre periférica son una población celular sincronizada en el mismo estado G0 de la interfase, y en individuos sanos, estas células no se encuentran en proliferación mitótica *in vivo*.
4. Una proporción de los linfocitos puede ser estimulada por mitógenos para inducir a la división en cultivo, son fácilmente cultivables y esto provee de una fuente rápida de células en división para la evaluación de parámetros citogenéticas como las Aberraciones Cromosómicas

5. Los linfocitos han demostrado poseer una baja actividad de reparación y presentan una vida media de dos a cuatro años, lo que permite que acumule lesiones en su ADN, por lo que durante mucho tiempo han sido uno de los sistemas ideales para el estudio del efecto de la exposición crónica a bajas concentraciones de mutágenos, y realizar una gran variedad de análisis, como las ya mencionadas [**Evans, 1970; Buckton y Evans, 1973; Evans et al., 1979; Evans y O’Riordan, 1975; Evans, 1982; Nataranjan y Obe, 1982; Albertini et al., 1982, Moutschen, 1985; Roldán y Altamirano, 1990; Tucker y Preston, 1996; Albertini et al., 2000**].

10. INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICHs)

El hecho de que la naturaleza del material genético o ADN, sea esencialmente la misma en todos los organismos ha permitido utilizar una serie de modelos biológicos de prueba para obtener información útil sobre el potencial mutagénico de los agentes químicos [**Prival, 1980; Moutschen, 1985**].

Los Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs) son transposiciones simétricas en el mismo locus entre las cromátidas de un mismo cromosoma, que no produce alteraciones estructurales⁵ (**Figura 5**). Los ICHs ocurren de manera natural, como eventos asociados a la replicación normal del ADN y sobre el colapso natural de la horquilla. Con una estimación de existencia de 3 a 4 intercambios por célula por ciclo celular, bajo condiciones donde los niveles de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) es muy poco o inexistente [**Albertini et al.,**

⁵ Pueden llegar a existir ICHs asimétricos los cuales son el resultado de algunas fracciones de cambio que ocurren en *locis* no homólogos, y estos ICHs, pueden representar eventos mutacionales o deleciones cromosómicas o estar relacionados con amplificaciones de ADN [**Bagpayee, et al., 2005**].

2000; Roldán, 2002; Bajpayee *et al.*, 2005; Wilson y Thompson, 2007]. Los ICHs solo son detectables en las cromátidas hermanas diferenciándose por su tinción (**Figura 5 y 6**), por lo que un incremento en su frecuencia en los linfocitos de la sangre, es utilizada como un marcador de daño en el material genético producido por agentes químicos, genotóxicos, mutagénicos, carcinogénicos, ultrasonido, luz UV, radiación ionizante, desnutrición y temperatura entre otros [Kato, 1980; Ortiz y Betancourt, 1984; Morales *et al.*, 1987, 1988; Tsuji, *et al.*, 1988; Betancourt *et al.*, 1992; Barale *et al.*, 1993; Gennart *et al.*, 1993; Lakhanisky *et al.*, 1993; Leonard y Gerber, 1994; Sivikova y Dianovsky, 1995; Donovan *et al.*, 1997; Albertini *et al.*, 2000; Roldán, 2002; Bajpayee *et al.*, 2005; Wilson y Thompson, 2007].

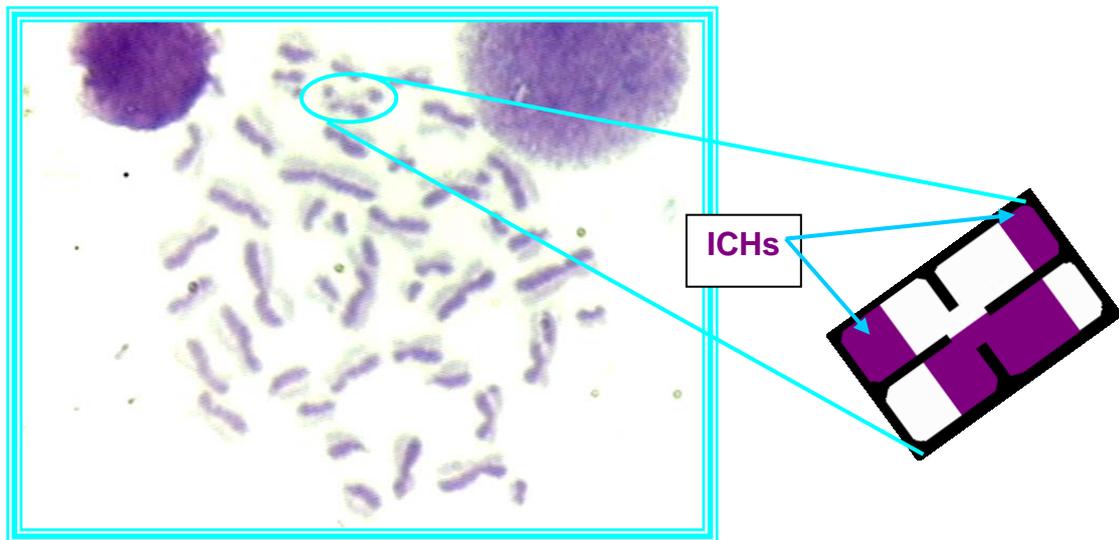


Figura 5. Fotomicrografía que muestra una metafase de segundo ciclo de división con tinción diferencial presentando ICHs, en linfocitos humanos *in vitro* (100X).

El Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs) fue descubierto hace 68 años por Barbara McClintock en los cromosomas del maíz, y son observados por primera vez por Taylor Philip en células de plantas usando autorradiografía con timidina tritiada. Descubrió que la incorporación de análogos de base (BrdU) en combinación con Hoechst 33258 hace diferenciar las cromátidas hermanas y revela los ICHs [Wojcik *et al.*, 2004; Wilson y Thompson, 2007].

En 1974, Latt, Perry y Wolff de manera independiente implementaron una técnica de Tinción Diferencial de cromátidas hermanas (**Figura. 6**) que ha aportado valiosos datos acerca del efecto de las sustancias químicas en el ADN [**Evans y O’Riordan, 1975; Tucker y Preston, 1996; Albertini et al., 2000; Wojcik et al., 2004; Aydemir et al., 2005; Bajpayee et al., 2005**]. Actualmente la metodología de Tinción Estándar o Diferencial, se utiliza para visualizar los cambios que ocurren dentro del desarrollo celular es la Fluorecencia más Giemsa, utilizando en el medio de cultivo, la BrdU. Debido a que la replicación del ADN es semiconservativa, la BrdU que se encuentra en el medio es incorporado eficientemente dentro de la hebra hija de cada duplex, durante el segundo ciclo de división. Observándose que la hebra patrón es normal y la otra hebra es transparente a causa del efecto de la BrdU [**Wojcik et al., 2004; Wilson y Thompson, 2007**].

Por lo tanto, la técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas requiere la replicación del ADN en presencia de (BrdU), por dos ciclos celulares consecutivos [**Tucker y Preston, 1996; Albertini et al., 2000**] y su posterior revelado mediante el uso de luz ultra violeta y colorantes como la Giemsa, de tal modo las células cuyo ADN ha incorporado BrdU por un ciclo de duplicación (monofilamente sustituidas) estarán teñidas de una manera homogénea, mientras que las células que ya han pasado por dos ciclos de replicación y cuyos cromosomas muestran una cromátida monofilamente sustituida y la otra bifilarmente sustituida, es decir, teñirán de una manera diferencial, oscura la primera y pálida la segunda [**Perry y Wolff, 1974**]. De esta manera se pueden diferenciar los intercambios entre las cromátidas hermanas y además evidenciar que el ADN se replica semiconservativamente [**Wilson y Thompson, 2007**].

INCORPORACIÓN DE BrdU

(Tinción diferencial de Cromátidas Hermanas)

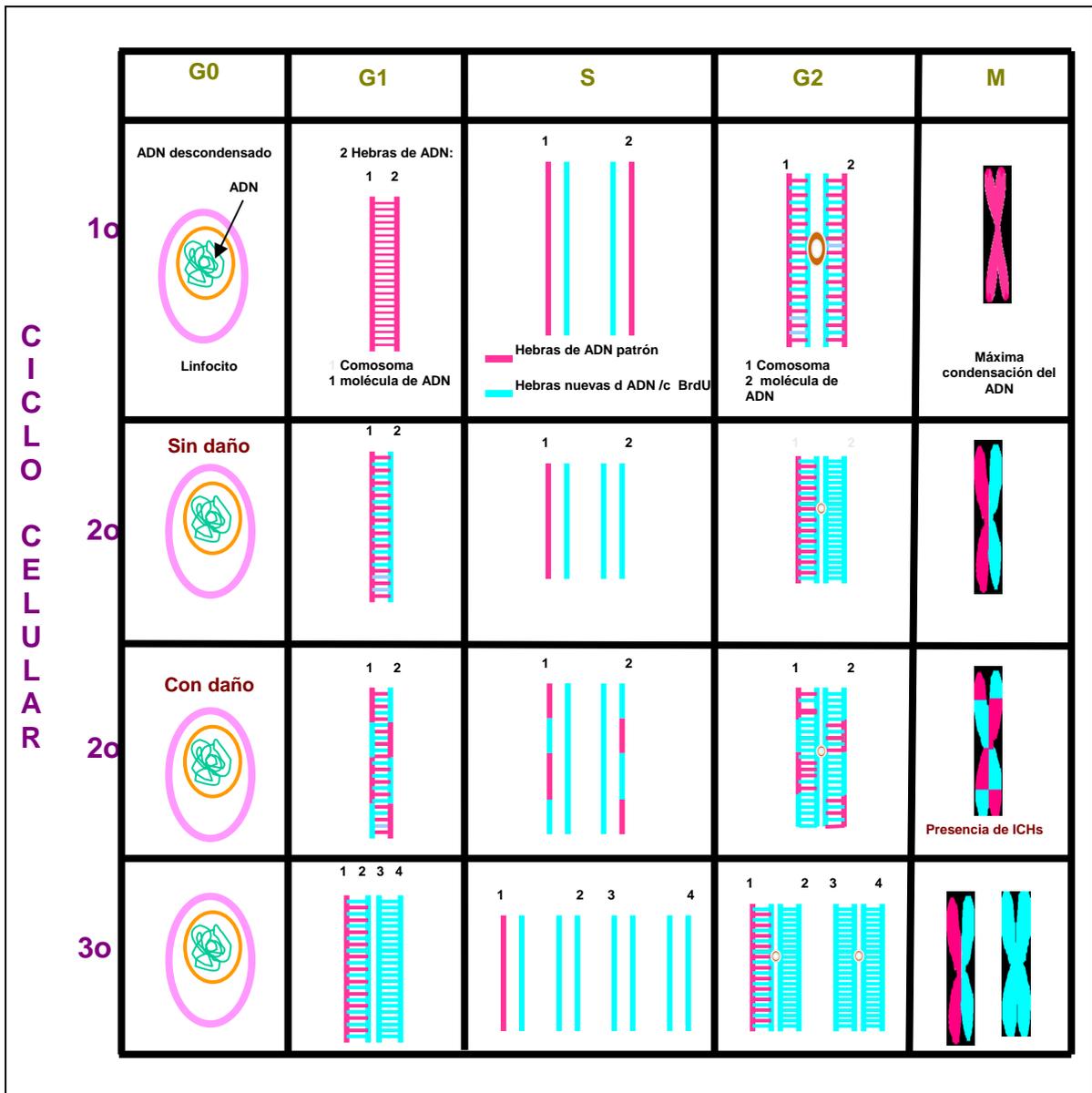


Figura 6. Es la incorporación de BrdU al ADN de linfocitos humanos, para que en los cromosomas de metafases en segundo ciclo de división celular sean observables los ICHs. Por el efecto de la tinción diferenciadas de las cromátidas.

Esta técnica citogenética de ICHs es una de las más frecuentes y se ha desarrollado ampliamente hasta la fecha para determinar el potencial genotóxico de un compuesto. Algunos autores mencionan que ninguna discusión citogenética estaría completa si no se hace mención de esta prueba.

Debido a que en la evaluación de los ICHs en exposiciones *in vivo* muestran una acumulación y persistencia limitada, a causa del proceso de reparación del ADN [Tucker y Preston, 1996], se ha considerado a esta técnica como un marcador esencial de genotoxicidad en estudios *in vitro* [Aydemir *et al.*, 2005], porque ha mostrado ser una prueba clastogénica altamente sensible (incluso más que AC), económica, muy rápida (incluso más que cualquier metodología citogenética), sencilla y produce datos cuantitativos empleando pequeñas concentraciones, además se puede desarrollar de manera *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo* en humanos, animales de laboratorio y plantas [Tucker y Preston, 1996; Albertini *et al.*, 2000; Aydemir *et al.*, 2005; Bajpayee *et al.*, 2005; Yüzbasıoglu, 2006; Wilson y Thompson, 2007].

Todo esto ha llevado a ser a esta técnica muy atractiva, sin embargo la falta de especificidad para la detección de actividad mutagénica (como AC) la ha mantenido con un uso reducido [Tucker y Preston, 1996]. Su mecanismo de formación y su significado biológico son confusos e inciertos, quizás estas características sean las desventajas que pudiera presentar esta metodología.

Respecto al proceso de formación de los ICHs se han propuesto algunos modelos que tratan de explicar este fenómeno [Tucker *et al.*, 1993], entre los cuales destaca, el de Painter, (1980) que propuso, que los ICHs son el reflejo de errores en la síntesis, e involucran rompimiento y reunión del ADN en loci homólogos de las cromátidas, como resultado de una mala replicación de la hebra molde de ADN dañado, probablemente por recombinación o pérdida de velocidad de la horquilla de replicación.

Además, posiblemente los intercambios de dos filamentos entre las dos moléculas de ADN ocurren por alguna de las tres siguientes vías: 1) Un intercambio entre cromátidas que han sido rotas independientemente en sitios homólogos; 2) Un sistema de reparación que opera durante la replicación del ADN y 3) Un error en la replicación del ADN [Knuutila, 1979; Iannuzzi *et al.*, 1991; Morales *et al.*, 1995; Tucker y Preston, 1996].

Otros autores mencionan que los ICHs están relacionados con el rompimiento de cadenas doble del ADN en ambos brazos del cromosoma y su posterior reubicación, sin llegar a alterar la morfología del cromosoma; así como, errores en la replicación del material genético [**Perry y Evans, 1975; Tucker y Preston, 1996; Albertini et al., 2000; Aydemir et al., 2005; Bajpayee et al., 2005; Wilson y Thompson, 2007**].

También se cree que es un proceso recombinacional que puede presentarse espontáneamente, o bien que se origina por lesiones en el ADN que persisten antes del periodo de síntesis [**Wolff et al., 1974; Kato, 1980**]. Se ha obtenido evidencia de que este evento es también causado por la inhibición de la síntesis de ADN o de las enzimas involucradas en este proceso [**Rainaldi y Mariano, 1982**]. Recientemente se ha propuesto que los ICHs son el producto de la Recombinación Homóloga (RH), estrechamente ligado con el proceso de replicación [**Sonoda et al., 1999; Droonkert et al., 2000; Wang et al., 2003; Bajpayee et al., 2005; Wilson y Thompson, 2007**].

Wilson y Thompson, (2007) señalan que las vías por las que probablemente ocurren los ICHs es a través de la mediación de la RH de un rompimiento en la horquilla de replicación del ADN cuando se encuentra un nick o gap en una hebra parental. En otras palabras, el incremento de los ICHs sugiere que hay deficiencia para reparar las lesiones que probablemente son la consecuencia del colapso de la horquilla y la iniciación de la reparación por RH. Lo que conlleva a pensar que, la no reparación de los Rompimientos de Cadena Sencilla (RCS) y la progresión del mecanismo de replicación, hacen que el RCS se convierten en Rompimiento de Cadena Doble (RCD) que es potencialmente una consecuencia de la RH la cual determina la frecuencia de los cambios. Estos autores implican a los RCS, como el primer intermediario genético de la naturaleza de los ICHs. Además sugieren que puede haber más de una vía molecular responsable de la formación de los ICHs.

De igual manera, se ha sugerido que las lesiones en el ADN que no fueron reparadas durante la G1 podrían causar ICHs en la siguiente división sucesiva [**Morimoto, 1983**] y si ellas trascienden el periodo de síntesis del ADN pueden

causar ICHs en divisiones sucesivas [**Morales et al., 1984, 1988, 1990, 1992, 1995**] a menos que fueran reparadas en la subsecuente G1 [**Gonzalez, 2004**].

Mientras que para el significado biológico, no se ha observado una asociación entre el aumento de la frecuencia de ICHs y el riesgo de padecer cáncer, sin embargo, el incremento de los ICHs es usado clínicamente como un marcador de diagnóstico para el Síndrome de Bloom (SB) [**Wilson y Thompson, 2007**]. Así como también se ha reportado que no son letales o citotóxicos, pero son ampliamente usados como una prueba en citogenética y mutagénesis [**Tucker y Preston, 1996; Albertini et al., 2000; Bajpayee et al., 2005; Wilson y Thompson, 2007**].

III. JUSTIFICACIÓN

Como todo compuesto químico que se proponen como un posible medicamento para la cura parcial o total de los efectos de las enfermedades crónico-degenerativas (como el cáncer), es necesario someter al compuesto a una serie de estudios preclínicos, antes de su aplicación.

El camino para el desarrollo de un fármaco es verdaderamente complicado, largo y costoso. Al final, el resultado es impredecible y puede llegar a ser desfavorable. Cientos de compuestos químicos deben ser aislados o sintetizados y probados para encontrar el que resulte óptimo para lograr una actividad farmacológica específica, sin que esta involucre efectos colaterales de consideración.

En el caso de las Casiopeínas, las cuales fueron propuestas como posibles antineoplásicos en humanos, es necesario someterlas a pruebas preclínicas. Actualmente se encuentran en esta etapa. Dentro de las pruebas preclínicas se ubica a las de Toxicología y dentro de estas a las de Toxicología Genética, donde se evalúan diferentes parámetros, como la clastogenicidad, mutagenicidad, genotoxicidad, toxicidad y citostaticidad, etc.

Debido a que no es posible observar directamente una molécula de ADN para verificar si ha sido dañado o no, es necesario recurrir a pruebas de toxicología genética. Una de éstas es el Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs), la cual mediante la tinción diferencial de los cromosomas de linfocitos humanos se convierte en una técnica muy sensible donde se pueden detectar mutágenos y/o carcinógenos que dañan el ADN tanto *in vivo* como *in vitro*. Los estudios donde se investiga la relación de los ICHs y las expresiones de genotoxicidad, muestran una correlación positiva entre la sobrevivencia y alteraciones en la cinética del ciclo celular. Lo que hace aun más completa la información arrojada por dicha metodología.

Por tal motivo en este trabajo se trata de colaborar y complementar otras investigaciones, para que la evaluación de la Casiopeína IIgly sea más completa, y finalmente sea aceptada, como un compuesto anticancerígeno.

IV. HIPÓTESIS

Si se sabe que la Casiopeína IIgly (Aqua (4,7-diimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre (II) Nitrato), ha inducido daño al ADN que se expreso como Cometas, Micronúcleos y Aberraciones Cromósomicas en sistemas *in vitro*. Entonces si en linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de Casiopeína IIgly, se presentaran cambios, en la Frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs), Índice Mitótico (IM), Cinética de División Celular (CDC), Índice de Replicación (IR), Tiempo de Proliferación Linfocitica (TPL), indicaría que el compuesto está causando algún tipo de alteración en el ADN o en el proceso de división celular.

V. OBJETIVOS

GENERAL:

Evaluar los efectos genotóxico, citotóxico y citostático de la Casiopeína IIgly con concentraciones de 0.33, 0.66 y 1.00 µg/ml, en cultivo de linfocitos humanos.

PARTICULARES:

- Determinar el efecto genotóxico de la Casiopeína IIgly por medio de la técnica de Tinción Diferencial del Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs).
- Analizar el efecto citotóxico de la Casiopeína IIgly, usando como parámetro el Índice Mitótico (IM).
- Evaluar la citostaticidad de la Casiopeína IIgly, por medio de la Cinética de División Celular (CDC), el Tiempo de Proliferación Linfocítica (TPL) y el Índice de Replicación (IR).

VI. MATERIAL Y MÉTODO

A partir de donadores clínicamente sanos, se extrajeron por punción venosa 5 ml de sangre periférica con una jeringa heparinizada (PiSA, México). Posteriormente 0.5 ml de está sangre se cultivaron en 4.75 ml de medio RPMI-1640 (Sigma, USA) suplementado con 0.25 ml de fitohemaglutinina M (Sigma, USA), y se incubaron durante 72 hrs a 37°C.

Posteriormente a las 24 hrs de incubación, se adiciono 0.1 ml de la solución bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma, USA) en una concentración final de 5 µg/ml y a las 48 hrs se aplicó el tratamiento que consistió en añadir: 0.33, 0.66, 1.00 µg/ml de la Casiopeína IIgly. Se utilizo un control negativo (sin tratamiento) y un positivo de Mitomicina C (200 ng/ml) (Sigma, USA).

A las 70 hrs se adiciono 0.1 ml de una solución de colcemida (IRVINE SCIENTIFIC, USA) en una concentración final de 4 µg/ml y se dejo actuar por dos horas. A las 72 hrs los cultivos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos (**Figura 7**). El paquete celular se sometió a un choque hipotónico con una solución de KCl (Beker, México) 0.075M, durante 20 mín a 37 °C. Se realizó otra centrifugación y las células se fijaron en una solución de metanol-ácido acético (Beker, México), frío y recién preparado (3:1) con tres cambios en la mezcla fijadora 15, 10 y 5 min. En el último cambio se resuspendió el botón celular en 0.5 ml de fijador.

Luego de esto se realizaron las preparaciones por goteo y se dejaron secar al aire. Las laminillas con el material genético se irradiaron con luz ultravioleta durante 20 minutos sumergidas en una solución acuosa. Trascurrido este tiempo se incubaron por 20 minutos en una solución citrato salina 2xSSC (Cloruro de sodio 0.30M (Sigme, USA) + Citrato de sodio 0.03M (Beker, México)) a 50 °C en una caja coplin. Se lavaron las preparaciones con agua destilada y luego se tiñeron con Giemsa (Sigma) (1:10) durante 10 minutos. Se lavaron en agua corriente y se dejaron secar al aire.

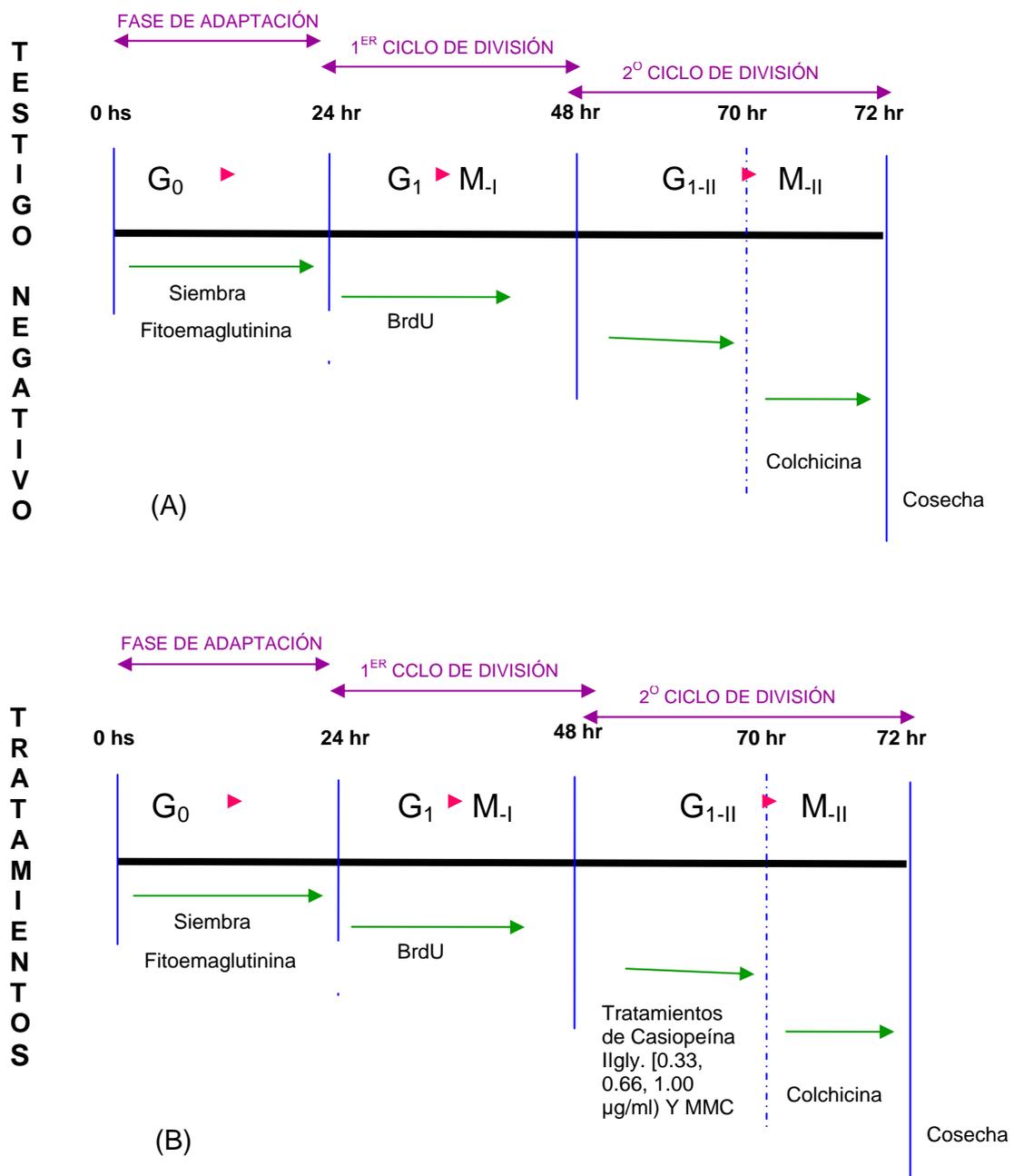


Figura 7. Esquema de tratamientos. A. Es el testigo negativo, B. esquematiza en que momento se adicionan los tratamientos de Casiopeína IIgly y la Mitomicina C (200 ng/ml) la cual funciona como testigo positivo.

VII. EVALUACIONES

Para el análisis de la frecuencia de ICHs, se analizan 30 células en metafase bien extendidas de segundo ciclo duplicación y se cuantifico el número y tipo de ICHs. Considerando a los intercambios terminales como uno y a los intersticiales como dos. (**Figura 5 y 10**)

Para la determinación del Índice Mitótico (IM) se evaluaron 1000 células por tratamiento, incluyendo células en interfase y metafase, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{IM} = \text{No. De células en división} / \text{N}^{\circ} \text{ total de células} \times 100$$

Mientras que para la CDC el TPL y el IR se cuantifican 120 células en metafase, por tratamiento. Para determinar la CDC se cuantifican las células en M_1 , M_2 y M_3 .

Para calcular el TPL se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{TPL} = [48 \text{ hrs de BrdU} / 1(M_1) + 2(M_2) + 3(M_3)] \times 120$$

Y para el IR se utilizó la fórmula que a continuación se presenta:

$$\text{IR} = 1(M_1) + 2(M_2) + 3(M_3) / 120$$

Donde M_1 , M_2 y M_3 son células en primera, segunda y tercera división respectivamente.

Por cada concentración se realizan tres experimentos independientes, con su respectivo duplicado. Se utilizó un microscopio de campo claro a 100X y 40X respectivamente.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis y evaluación de los resultados que se obtuvieron se aplicó a la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs), la prueba estadística de "t" de Student, para la Cinética de División Celular (CDC) e Índice de Replicación (IR), Ji cuadrada (X^2), y para el Tiempo de Proliferación Linfocítica (TPL) y en el Índice Mitótico (IM) se emplea la Z para proporciones. Con el valor mínimo de significancia de $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS

Para poder cumplir con los objetivos planteados, fue necesario primeramente identificar microscópicamente el estadio en el que se encontraban los linfocitos, ya sea que se encontraran en interfase o metafase, una vez identificados de esta manera se podía analizar el Índice Mitótico. Posteriormente, a las metafases completas (46 cromosomas) encontradas, se les evaluaba la cantidad de veces que habían realizado su proceso de división celular, en otras palabras la cantidad de veces que hayan ciclado.

La **Figura 8**, muestra una célula que se encuentra en interfase y otra que se encuentra en metafase, mientras que en la **figura 9** se encuentra una metafase de primer ciclo de división celular, donde los cromosomas están homogéneamente teñidos; en la **figura 10** hay otra metafase, pero a diferencia de la anterior esta se encuentra en segundo ciclo de división celular, donde se pueden apreciar los ICHs, de la misma manera se observan los cromosomas, que pueden presentar uno o varios ICHs, ya sea sencillos o dobles o una combinación de ambos. La **figura 11**, presenta una metafase de tercer ciclo de división celular, donde se pueden presentar cromosomas pálidos, cromosomas con una cromátida sin teñir y la otra bien teñida. Una vez identificados los ciclos de división en el que se encontraban los linfocitos con la ayuda de la tinción diferencial antes mencionada, se pueden evaluar los siguientes parámetros, ICHs, IR, CDC y TPL. Todo esto fue observado en todos los tratamientos realizados.

Figura 8. Fotomicrografía, de dos células humanas, una que se encuentra en interfase y la otra en metafase (100X).

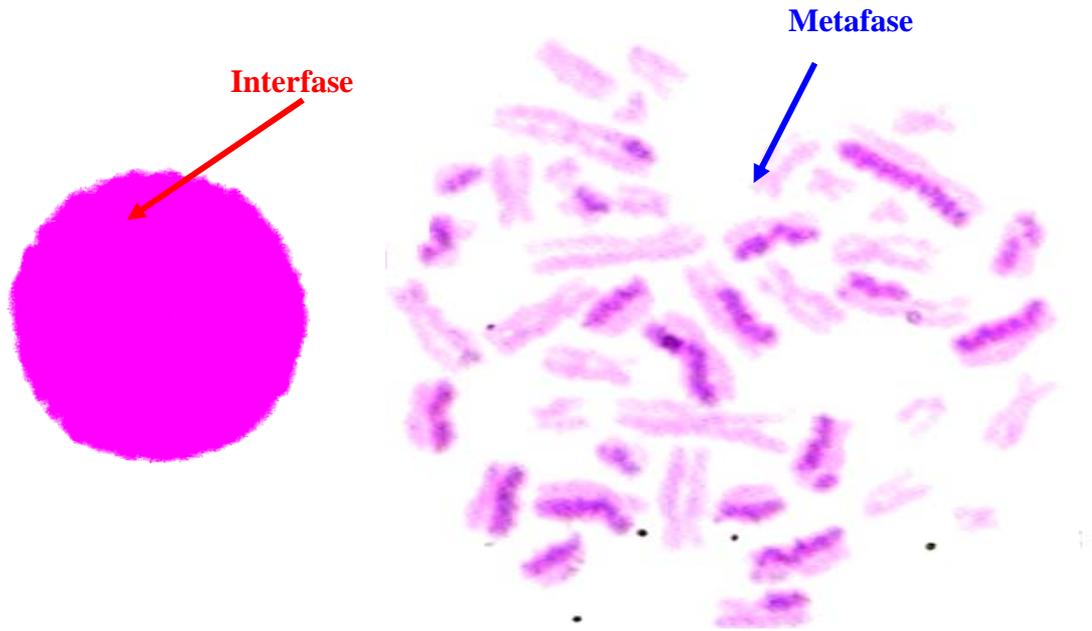


Figura 9. Fotomicrografía de una célula humana en metafase que se encuentra en primer ciclo de división celular (100X).



Figura 10. Fotomicrografía, de una célula humana en metafase con tinción diferencial que se encuentra en segundo ciclo de división celular, señalado los cromosomas que tienen ICHs. La flecha señala el único cromosoma que presenta un ICHs intersticial o doble (100X).

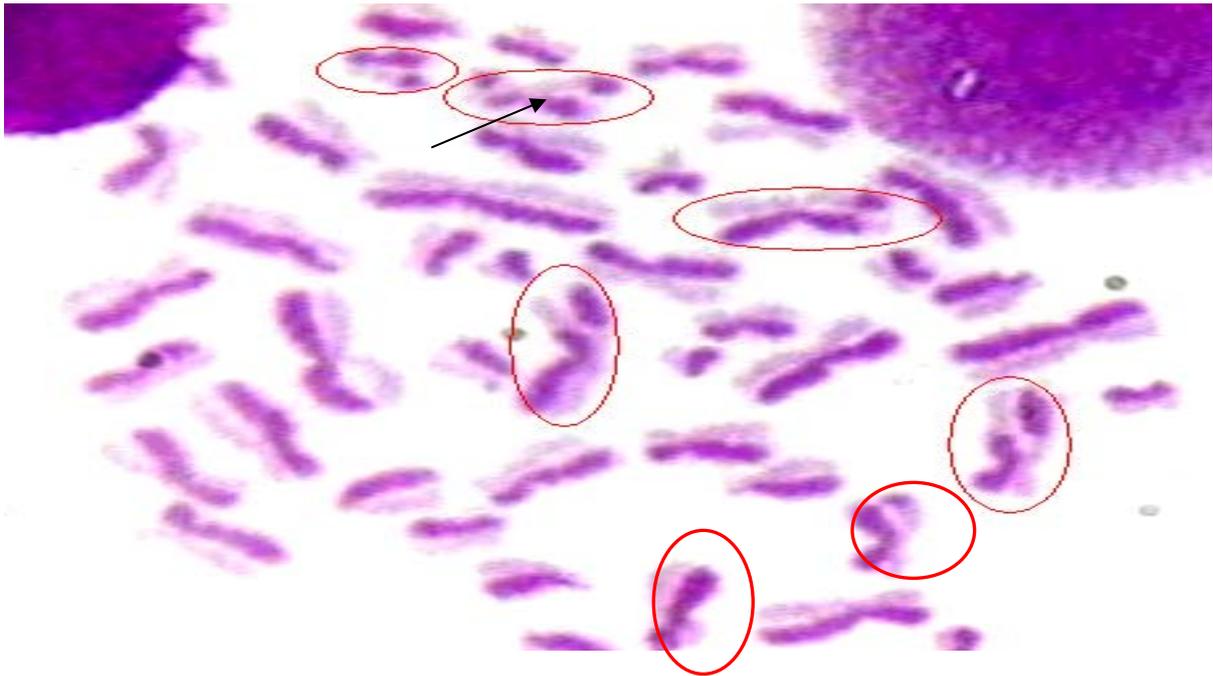
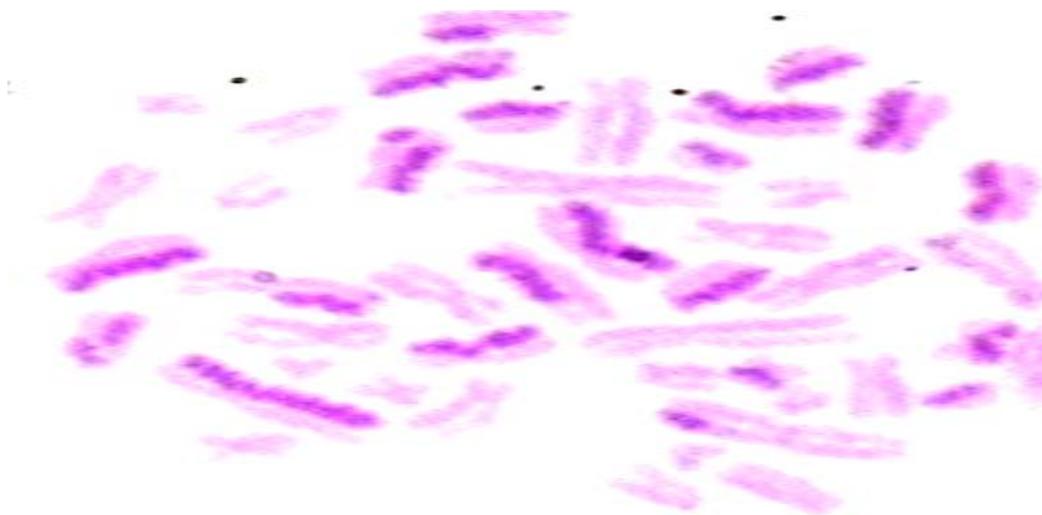


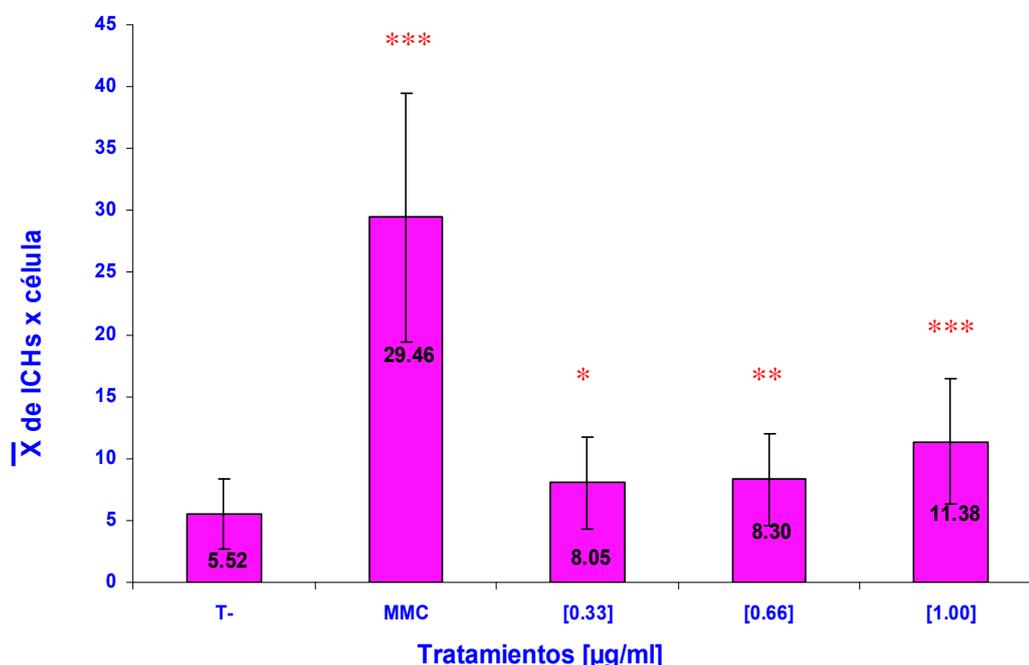
Figura 11. Fotomicrografía, de una célula humana en metafase, que se encuentra en tercer ciclo de división celular (100X).



El número de ICHs encontrado en los tres experimentos independientes con sus respectivos duplicados por concentración de Casiopeína IIgly, después de 48 hrs. de incubación, se muestran en la **gráfica 1**. Aquí se puede apreciar que todas las concentraciones de la Casiopeína IIgly inducen un incremento estadísticamente significativo de ICHs, comparados con el testigo negativo.

Esta diferencia se presenta desde la primera concentración [0.33 µg/ml] siguiendo un comportamiento dosis-dependiente. Donde los ICHs incrementan al aumentar la concentración de la Casiopeína Ilgly, llegando a duplicarse en la concentración más alta [1.00 µg/ml] respecto al testigo negativo (de 5.52 VS 11.38). El máximo y mínimo de ICHs que se presentaron en las metafases, en las tres concentraciones de la Casiopeína se muestran en la **Tabla 2**.

Gráfica 1. Frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs) en linfocitos humanos tratados *in vitro* con Casiopeína Ilgly.



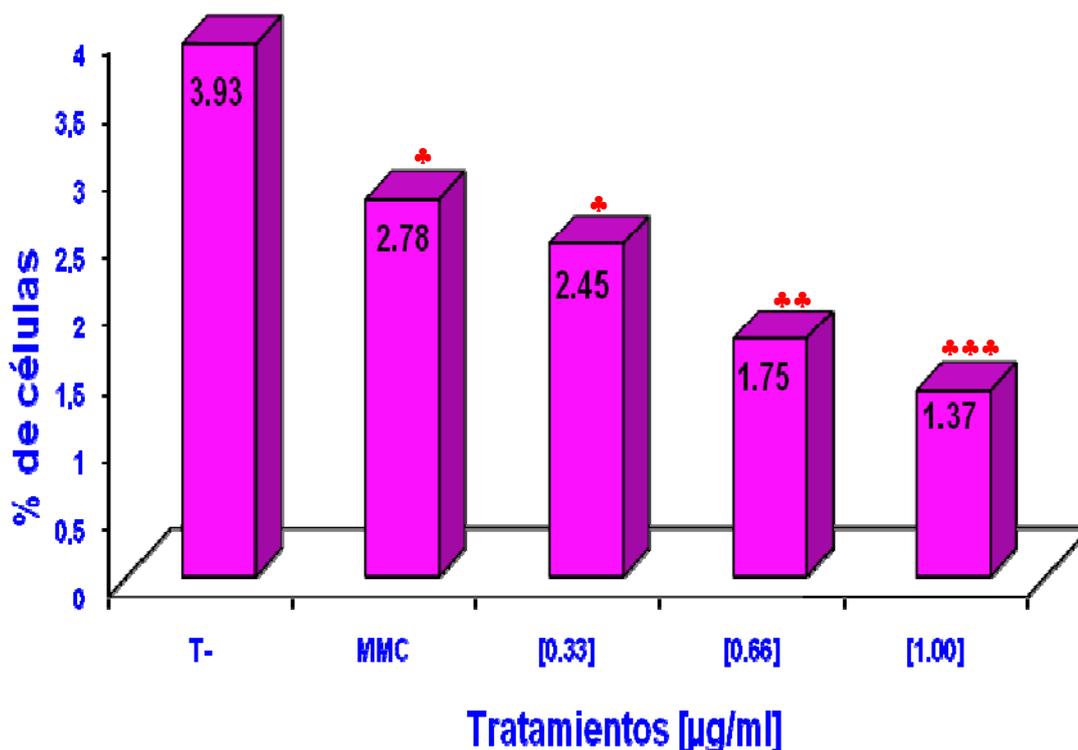
Promedio de tres experimentos independientes con sus respectivos duplicados por concentración. Se evaluaron un total de 180 células en segundo ciclo de división.

*p < 0.025, ** p < 0.01, *** p < 0.0005 ("t" de Student)

La distribución del daño citotóxico, evaluado con el Índice Mitótico de los linfocitos de sangre periférica humana expuestos a tres concentraciones (0.33, 0.66 y 1.00 µg/ml) diferentes de Casiopeína Ilgly, se muestran en la **grafica 2**. En este se puede notar una tendencia de abatimiento proporcional al aumento de la concentración de la Casiopeína Ilgly. Por lo que, conforme aumenta la concentración de la Casiopeína Ilgly el IM disminuye significativamente, (p<0.05 a p< 0.002) apreciando que en la concentración más alta [1.00 µg/ml]

hay una disminución aproximadamente tres veces menor del IM comparando con el testigo negativo.

Gráfica 2. Índice Mitótico (IM) de linfocitos humanos tratados *in vitro* con Casiopeína Igly.



Promedio de tres experimentos independientes con sus respectivos duplicados por concentración. Evaluando un total de 6000 células (en interfase y metafase).

* $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.002$. (Z para proporciones).

La **gráfica 3**, muestra todos los resultados de la evaluación de la CDC de los linfocitos expuestos a las mismas concentraciones ya mencionadas de Casiopeína Igly, donde se aprecia un comportamiento inverso en relación con el testigo negativo, respecto a la capacidad de las células para seguir ciclando.

Recordando que el ciclo celular promedio de los linfocitos varía entre las 24 horas [Watt y Stephen, 1986; Lodish *et al.*, 2005], y que en este experimento las células se mantuvieron incubadas durante 72 horas, se ve en la gráfica, que los linfocitos del testigo negativo, los cuales no tuvieron interacción con el compuesto, ciclan la gran mayoría tres veces, ya que es pequeña la cantidad

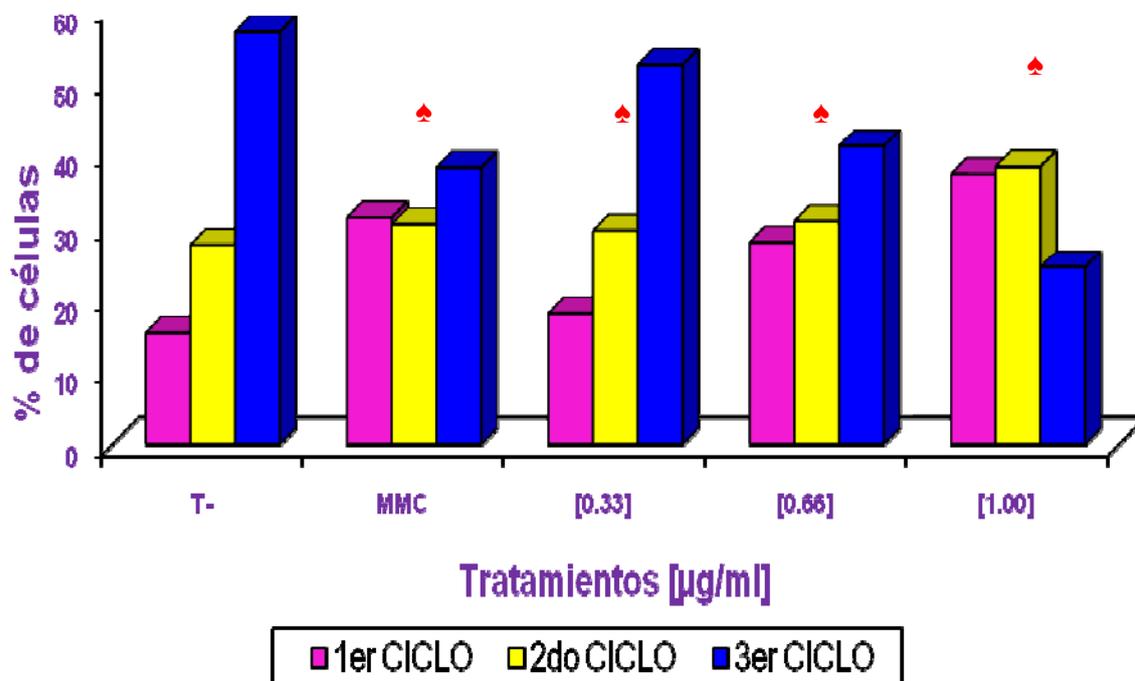
de células que quedan en primero y segundo ciclo comparadas con las que alcanzan a llegar a la tercera división.

Lo anterior sería el comportamiento normal de una células sin tratamiento, pero cuando los linfocitos interactúan con la Casiopeína IIgly a una concentración de [0.33 µg/ml] vemos un ligero aumento en las células que quedan en primer y segundo ciclo y una disminución significativa ($p < 0.0005$) en las células de tercer ciclo, en relación al testigo negativo.

Cuando la concentración se duplica [0.66 µg/ml] aquí es más evidente una dificultad que presentan las células para ciclar tres veces, ya que aquí, un mayor número de células se quedan en primer y segundo ciclo, disminuyendo las células que pasan al tercer ciclo. Por último en la concentración más alta [1.00 µg/ml] es evidente que la Casiopeína IIgly está impidiendo de alguna manera a las células que puedan seguir ciclando, debido a que se observa una mayor cantidad de células que se quedan en primer ciclo y que no alcanzan a ciclar tres veces, por lo que en esta última etapa el número de células disminuye.

Por lo tanto, se ve una disminución del número de células que llegan a ciclar tres veces, conforme aumenta la concentración de la Casiopeína IIgly, contrario a esto, el número de células que se quedan estancadas en el primer ciclo aumentan comportamiento dosis-dependencia. Presentándose una diferencia estadísticamente significativa en todos los tratamientos según la prueba de *Ji cuadrada*.

Gráfica 3. Cinética de División Celular (CDC), de linfocitos humanas tratados *in vitro* con Casiopeína IIgly.



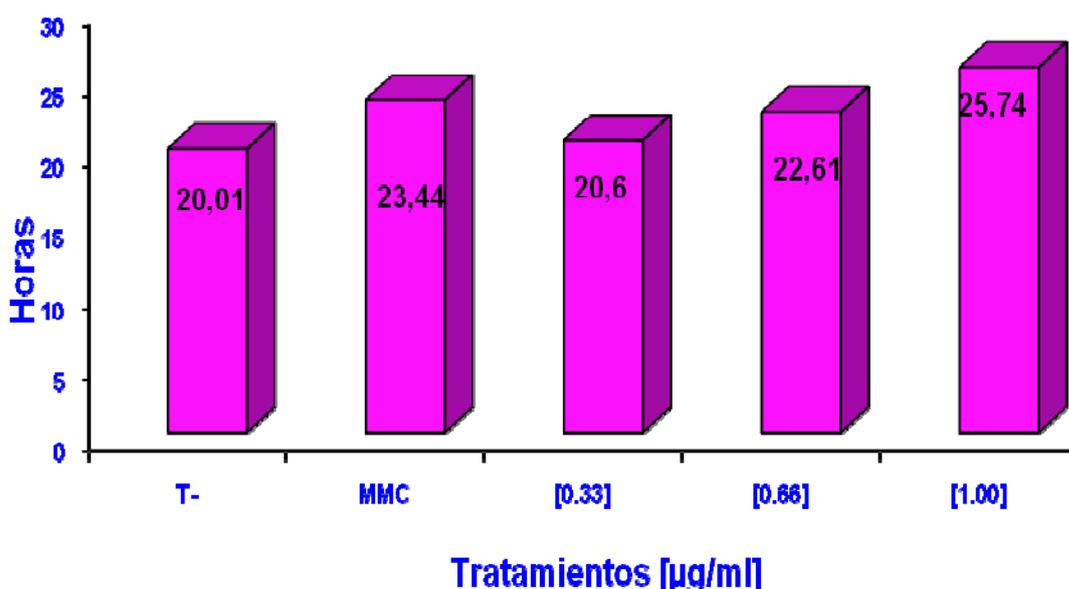
Promedio de tres experimentos independientes con sus respectivos duplicados por concentración.
Evaluando un total de 720 metafases.
♠ $p < 0.0005$ (Ji cuadrada)

Para el caso del TPL no se presentó una diferencia estadísticamente significativa, en ninguno de los tratamientos de la Casiopeína IIgly, sin embargo se presenta una tendencia de aumento del tiempo de división celular, conforme incrementa la concentración del tratamiento, comparadas con el testigo negativo. Reflejándose en la **gráfica 4** una tendencia dosis-respuesta, ya que al incrementar las concentraciones del tratamiento, se aumenta el tiempo que requieren las células para ciclar, por lo que el TPL obtenido para la dosis más alta resultó mucho mayor que el correspondiente a las dosis más bajas.

Por ejemplo, el testigo negativo, necesita aproximadamente 20 horas para concluir su ciclo celular, mientras que las células que tienen la concentración más alta de la Casiopeína IIgly [1.00µg/ml] requieren de seis horas aproximadamente, para realizar su ciclo celular.

A pesar de que no se presenta la diferencia estadísticamente significativa, son muy coherentes los resultados si se comparan con los de la CDC, ya que si nos enfocamos, solo por mencionar algo en la concentración más alta [1.00 µg/ml] de la Casiopeína Ilgly, se puede apreciar que es lógico que a mayor concentración del compuesto las células necesitan de más tiempo para ciclar, por lo que 72 hrs., que fue lo que se dejó el tratamiento en incubación, no les bastó para llegar a ciclar tres veces, quedándose estancadas en los dos primeros ciclos de división celular.

Gráfica 4. Tiempo de Proliferación Linfocítica (TPL), en células humanas *in vitro* tratadas con Casiopeína Ilgly.

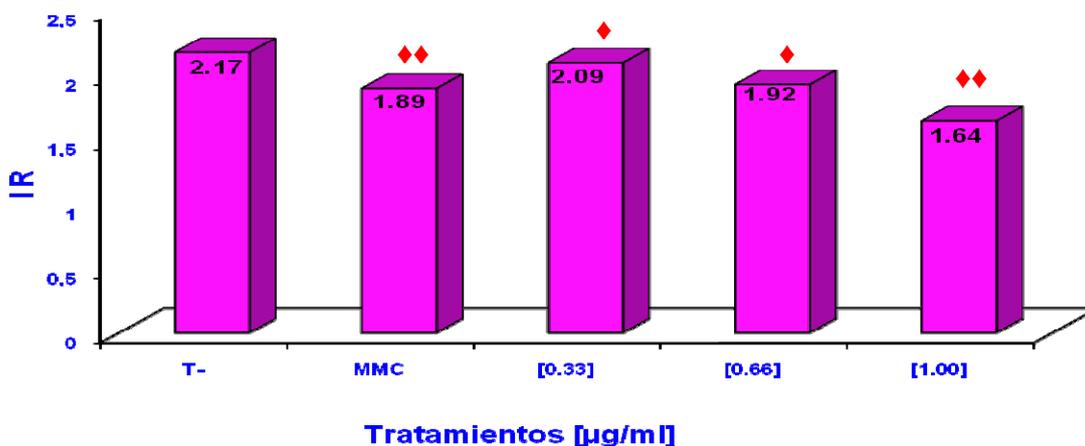


Promedio de tres experimentos independientes con sus respectivos duplicados por concentración.

Evaluando un total de 720 células en metafase.

Por último, la **gráfica 5**, representa los resultados del IR, el cual muestra que la Casiopeína Ilgly disminuye significativamente este Índice comparados con el testigo negativo. Presentándose un comportamiento inverso dosis-respuesta, ya que al aumentar las concentraciones del compuesto el IR decrece de forma significativa. La cual muestra diferencias a partir de la primera concentración.

Gráfica 5. Índice de Replicación (IR) de linfocitos humanos tratados *in vitro* con Casiopeína Ilgly.



Promedio de tres experimentos independientes con sus respectivos duplicados por concentración. Evaluando un total de 720 metafases.

♦ $p < 0.1$, ♦♦ $p < 0.2$, Ji cuadrada.

En la **tabla 2**, se resumen los resultados obtenidos de las evaluaciones de todos los parámetros. Aquí están los datos mencionados en las gráficas, para que puedan verse de manera conjunta. En esta tabla se observa la frecuencia de ICHs presente por cada tratamiento de Casiopeína Ilgly, así como la cantidad mínima y máxima de ICHs que se presentaron en las metafases. De la misma manera se puede observar el comportamiento del IM, así como los linfocitos encontrados en cada ciclo de división celular por cada concentración en el caso de la CDC, también es apreciable, el TPL y por último el IR. Cada uno muestra su diferencia estadísticamente significativa evaluada con diferentes pruebas dependiendo el parámetro.

Tabla 2. Media de ICHs, IM, IR, CDC y TPL de linfocitos humanos *in vitro* tratados con Casiopeína IIgly.

Tratamientos ($\mu\text{g/ml}$) (48 hrs)	ICHs/cel ($X \pm EE$)	ICH		IM ($X \pm EE$)	CDC			IR($X \pm EE$)	TPL ($X \pm EE$) (hrs)
		min - max			M ₁	M ₂	M ₃		
Testigo Negativo	5.52 \pm 0.48	0 - 13		3.93 \pm 0.68	15	27	57	2.17 \pm 0.05	20.01 \pm 0.73
Testigo Positivo (MMC) 0.2	29.46 \pm 1.79**	7 - 77		2.78 \pm 0.75*	31 [^]	30 [^]	38 [^]	1.89 \pm 0.16**	23.44 \pm 1.09
Casiopeína IIgly: 0.33	8.05 \pm 0.65*	0 - 21		2.45 \pm 0.33 [^]	18 [^]	29 [^]	52 [^]	2.09 \pm 0.12 [^]	20.6 \pm 0.72
0.66	8.30 \pm 0.65**	2 - 23		1.72 \pm 0.29**	28 [^]	31 [^]	41 [^]	1.92 \pm 0.14 [^]	22.61 \pm 3.60
1.00	11.38 \pm 0.90***	4 - 27		1.37 \pm 0.40***	37 [^]	38 [^]	24 [^]	1.64 \pm 0.04**	25.74 \pm 11.92

Se evaluaron en total: 180 metafases en segundo ciclo de división celular para los ICHs, 720 células en metafase para CDC, TPL e IR, y 6000 células en metafase para el IM.

* p< 0.025, ** p< 0.01, *** p< 0.0005 (t-de Student).
[^] p< 0.5, ^{**} p< 0.01, ^{***} p< 0.002 (Z para proporciones).
[^] p< 0.0005 (Ji Cuadrada).
[♦] p< 0.01, ^{♦♦} p< 0.02, (Ji Cuadrada).

X. ANALISIS DE RESULTADOS

Recordando el objetivo del presente trabajo, el cual consistía en hacer una evaluación de los efectos de la Casiopeína Ilgly, tanto de genotoxicidad como de toxicidad y citostaticidad con las siguientes concentraciones de 0.33, 0.66 y 1.00 µg/ml, en cultivos de linfocitos humanos *in vitro*. Por lo que se ha analizando los siguientes parámetros ICHs, IM, CDC, TPL, y IR.

1. GENOTOXICIDAD

Evaluar el efecto genotóxico de drogas anticancerígenas en células no tumorales, es de especial importancia, debido a la posibilidad de que estas puedan inducir tumores secundarios en pacientes con cáncer [Aydemir *et al.*, 2005]. Es por ello la importancia de determinar el potencial genotóxico de una droga que se pretende usar como un quimioterapéutico en las células humanas

Un gran número de compuestos químicos, como los alquilantes inducen un incremento en la frecuencia de ICHs, tanto en células animales y humanas *in vivo* e *in vitro*, la gran mayoría de estos compuestos aumentan el daño al ADN y a los cromosomas e incluso pueden causar mutaciones en los genes [Bajpayee *et al.*, 2005]. De la misma manera, hay otros compuestos químicos que no son alquilantes, como las Casiopeínas, pero que también inducen ICHs y al parecer tienen íntima relación con el material genético. Sin embargo, hay evidencias de que las Casiopeínas tienen bajo potencial para inducir inestabilidad geonómica en una variedad de líneas celulares tumorales tanto *in vivo* como *in vitro* [Marín *et al.*, 2003] a diferencia de otros compuestos como la MMC y el Cis-platino.

Para poder verificar el potencial que tiene la Casiopeína Ilgly de generar daño al ADN de los linfocitos humanos en cultivo, en el presente trabajo, se evaluó su genotoxicidad determinando la frecuencia de los Intercambios de Cromátidas Hermanas lo que nos muestra un comportamiento dosis-

dependiente (**Gráfica 1, Tabla 2**). Lo que indica que el efecto genotóxico (que observamos con los ICHs) es producto del incremento de las concentraciones. En otras palabras, la frecuencia de los ICHs aumenta significativamente al aumentar la concentración, presentándose este comportamiento a partir de la concentración más baja (0.33 µg/ml). Esto quiere decir que la Casiopeína IIgly es capaz de inducir la formación de ICHs, por lo tanto, está manifestando alteraciones en el material genético.

Otros autores proponen que los comportamientos dosis-dependencia de drogas anticancerígenas, como en nuestro caso, están relacionados con un efecto directo del compuesto químico con el ADN para la inducción de rompimientos [**Blasiak et al., 2002**]. Así mismo, Carvallo, (2007) dice que los efectos citostáticos y antiproliferativos de la Casiopeína IIgly pueden estar relacionados con su capacidad de producir daño al ADN. En otros trabajos, cuando se evaluó la genotoxicidad con los ICHs, también se manifestó un comportamiento dosis-dependencia [**Blasiak et al., 2002**] lo que estaría indicando, interacción de la Casiopeína con el ADN. Esto a su vez nos lleva a pensar de la misma manera que Carvallo, (2007) que la citostaticidad y la citotoxicidad son consecuencia del primer efecto.

Con respecto a lo anterior, sobre el comportamiento dosis-dependencia, sería normal que ocurriera este daño al aumentar la concentración del compuesto ya que uno de los principales blancos de las drogas a bases de quelatos mixtos de cobre (II), es el ADN, dada su demostrada actividad nucleasa [**Sigman et al., 1979**]. El ion de cobre (II) en presencia de peróxido de hidrógeno es capaz de romper el ADN, e incluso de una forma más agresiva que el daño causado por Fe^{+3} [**Aruoma et al., 1991**]. Aunado a lo anterior, el cobre unido a 1-1-fenantrolina tiene una actividad nucleasa comprobada, la que esta basada en su habilidad de romper ADN a través de un mecanismo oxidativo [**Kuwabara et al., 1986; Kuwabara y Sigman, 1987**]. El hecho de que, otros investigadores demostraron que el complejo 1,10-fenentrolina-cobre con peroxido de hidrogeno como correactante, es una nucleasa artificial que rompe ADN por un mecanismo oxidativo en condiciones fisiológicas [**Sigman et al., 1979; Zelenko**

et al., 1998], demuestra que la Casiopeína de alguna manera esta diseñada para causar daño al ADN.

Por otra parte los datos del trabajo realizado por Trejo *et al.*, (2005) apuntaron al centro metálico cobre (II) y a su ligante (1, 10-fenantrolina) como los responsables de la inducción de apoptosis. Por lo que, se postula que el cobre unido a 1,10 fenantrolina es una molécula muy permeable, lo que aunado a su lipofilidad favorece el transporte del cobre a través de membranas biológicas **[Cai et al., 2007]**. Facilitando de esta manera la interacción del compuesto con el material genético, lo que justifica la presencia de ICHs en linfocitos humanos al ser tratados con Casiopeína Ilgly.

Un estudio posterior de genotoxicidad realizado por Atilano, (2007) en el que utilizó el mismo compuesto (Casiopeína Ilgly) y las mismas concentraciones que se emplean en este trabajo (0.33, 0.66 y 1.00 µg/ml) evaluó micronúcleos (MN) *in vitro* y también reportó un comportamiento dosis-respuesta, semejante a nuestros resultados. Antes también se había reportado que la Casiopeína Ilgly tiene la capacidad de inducir un ligero incremento en la frecuencia de micronúcleos en el sistema de linfocitos humanos bajo las mismas condiciones ya señaladas. **[Atilano y Roldán, 2004]** Por otra parte, Florín, (2005) señala en su trabajo con linfocitos humanos tratados con Casiopeína Ilgly [1.04, 2.08, 4.17, 8.35, 16.0 µg/ml] sometidos a Electroforesis Unicelular Alcalina en Gel (EAUG), que la Casiopeína Ilgly es capaz de producir rompimientos de cadena sencilla (RCS) en concentraciones que no afectan la viabilidad celular. También indica que el efecto genotóxico es ocasionado por el fármaco y no por una consecuencia derivada de un efecto citotóxico. Por lo que siendo los MN y la EAUG parámetros de genotoxicidad al igual que los ICHs, sustentan los resultados aquí reportados, con lo cual se puede afirmar que la Casiopeína es **genotóxica**.

De la misma manera Atilano, (2007) encuentra que en la concentración más alta de la Casiopeína Ilgly (1.00 µg/ml) hay presencia de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), recordando que los rompimientos de cadena doble (RCD) son las principales lesiones en el proceso de formación de

ACE, MN e ICHs [**Brusick, 1987; Obe et al., 2002**]. Por lo tanto se puede inferir que el daño causado a las células por la Casiopeína Ilgly es producto de la acción directa en el ADN. Ya que en todas las concentraciones se produce RCS según Florín y según Atilano en la concentración más alta (1.00 µg/ml) se produce RCD, mientras que los datos reportados en este trabajo señalan incremento de la frecuencia de los ICHs en todas las concentraciones. Manifestándose de esta manera que la Casiopeína Ilgly tiene una interacción directa con el ADN, causando en él diferentes efectos (RCS, RCD, ICHs) que se manifiestan de una u otra manera en todas las concentraciones de la Casiopeína Ilgly.

Según Wilson y Thomsom, (2007) implica a los RCS como el primer intermediario genético de la naturaleza de los ICHs. Ya que si una célula no lleva a cabo de manera adecuada la reparación de los RCS y continúa con la progresión del mecanismo de replicación se convierten en RCD, lo que a su vez conduce a incrementar la frecuencia de los ICHs. Por lo que se puede inferir, que la observación de ICHs se debe a que el daño causado por la Casiopeína Ilgly rebasó la capacidad de la célula para reparar el daño en las concentraciones aquí trabajadas.

En reportes previos, donde se utilizaron células murina (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 Ilgly 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**].

Comparando las concentraciones y resultados de Atilano, (2007) de Florín, (2005) y los nuestro, con el trabajo anterior de De Vizcaya y Gracia, se aprecia que las concentraciones de Casiopeína Ilgly utilizadas por Florín en células sanas, son mayores a las de todos los trabajos antes mencionados, presentando viabilidad celular por lo menos en las tres primeras concentraciones y RCS en todas las concentraciones, por lo tanto, aunque hay daño genotóxico, las células siguen siendo viables, por otra parte, en los

resultados obtenidos de las células murinas y las transformadas humanas de De Vizcaya y Gracia, las cuales son tratadas con concentraciones menores de Casiopeína IIgly y una de ellas igual a nuestra concentración más alta, se reporta muerte celular, lo que permite concluir que los modelos de cáncer son más sensibles al efecto genotóxico del compuesto.

Lo anterior es confirmado con el trabajo realizado por Alemón *et al.*, (2006), donde al tratar células HeLa y linfocitos humanos con diferentes Casiopeínas, las primeras mostraron mayor sensibilidad a los compuestos. Por otro lado Tucker y Preston, (1996) mencionan que las líneas celulares que presentan defectos en la reparación del ADN, incrementan su sensibilidad para detectar efectos químicos y de radiación. El que las células cancerosas sean más sensibles que las células sanas sería ideal, ya que si la Casiopeína IIgly altera al genoma de las células transformadas sin dañar de manera significativa las células sanas, muchos de los efectos secundarios que se generan con el progreso de los tratamientos contra el cáncer con diferentes fármacos, podrían ser evitados y así la recuperación de esta enfermedad sería menos tortuosa.

En otros trabajos que reportan que la Casiopeína IIgly no es genotóxica como el realizado por Santiago, (2004), donde al evaluar MN *in vivo*, con las concentraciones 3.3 y 4.4 mg/kg en ratones, no encuentra una diferencia significativa respecto a su control, para el caso de las hembras y machos sin preñar, tratados de forma aguda y subcrónica. Por otro lado, señala que sí es genotóxica en los fetos obtenidos de hembras tratadas de manera subcrónica con 3.3 mg/kg. El que no se presente genotoxicidad en machos y hembras sin preñar tratadas de forma aguda y subcrónica, quizás se pueda explicar con lo reportado por Reyes *et al.*, (2003), demostrando mediante cromatografía de líquidos, que al administrar 8 mg/kg de Casiopeína IIgly a ratas, ésta es eliminada del plasma en un corto tiempo, y se observa que al tiempo cero se obtuvo en plasma una concentración de 25.67 µg/ml de Casiopeína, lo que hace pensar que la Casiopeína IIgly fue metabolizada rápidamente, y si causara daño genotóxico este sería inmediato.

Recordando que el centro metálico de la Casiopeína IIgly es el cobre dos, es importante señalar que en humanos, la sobrecarga de cobre (hasta 15 veces el consumo base) puede ser tolerado por largos periodos sin evidenciar síntomas de toxicidad. Esta tolerancia esta asociada a la rápida movilización y excreción del cobre y con la inducción de mecanismos desintoxicantes, como metalotioneína, la que se une e inactiva los excesos de cobre en los tejidos [Daniel *et al.*, 2005], lo que indica que este compuesto Casiopeína IIgly tiene menos efectos indeseables.

Estos resultados a diferencia de los nuestros son *in vivo*, (en estas condiciones el metabolismo del organismo, es una variable que marca diferencias entre ambas condiciones), sin embargo, el efecto de genotoxicidad, al igual que en los trabajos antes mencionados, se sigue manifestando por lo menos en los fetos. Dicho comportamiento se deba quizás, a que estos presentan una mayor división celular debido a que se están desarrollando y esto al parecer les proporciona cierta vulnerabilidad al ser expuestos a los agentes químicos, en este caso la Casiopeína IIgly. Lo cual se ve apoyo por Rotember *et al.*, (1999), [citado en González, 2004] donde dice que las células más susceptibles son aquellas que tienen una alta capacidad de proliferación, aun que también se afectan las células normales que suelen tener un alto recambio. Por lo que tal vez, la Casiopeína IIgly, está dañando el ADN de estas células en constante división, y probablemente genere conflictos de información a la hora de la síntesis, la transcripción o la traducción del ADN, lo que impediría que las células sigan dividiéndose adecuadamente y cause diversos efectos. Como lo que reporta Trejo *et al.*, (2005) y Carvallo, (2007), cambios morfológicos celulares relacionados con oncosis y apoptosis. Y a la larga genere embriotoxicidad (incremento de la frecuencia de reabsorción y disminución en el peso fetal), y/o Teratogénesis (incidencia de malformaciones macroscópicas) o incluso la muerte, como lo reporta en sus resultados González, (2004).

Así mismo De Vizcaya *et al.*, (2000), demostró que la Casiopeína IIgly es capaz de inducir muerte celular por apoptosis en líneas celulares, tales como, de leucemia murina L1210 y de carcinoma ovárico humano CH1, y cuando se

realizo el análisis de la morfología nuclear esté mostró condensación de cromatina y fragmentación nuclear (apoptosis). Por otro lado, Carvallo, (2007) observo un barrido de ADN, que relaciona con un hallazgo compatible con la degradación del ADN, en las concentraciones 5 y 10 µg/ml, trabajando con electroforesis en gel de agarosa (2%) de ADN de carcinoma de colón HCT-15 expuestas *in vitro* a Casiopeína Igly. Lo anterior sigue reafirmando la interacción de la Casiopeína Igly con el ADN de los linfocitos humanos tratados bajo las condiciones y concentraciones ya mencionadas del presente trabajo.

Otras investigaciones, siguen confirmando esta aseveración Tovar *et al.*, (1993) dice que estudios de la interacción del ADN con la Casiopeína I, II y III, en ensayo cometa muestran que las Casiopeínas I y II interactúan fuertemente con el ADN. Así mismo Ruiz-Ramírez *et al.*, (1992) dice que hay una interacción entre la Casiopeína y el ADN, en las pruebas mutagénicas realizadas a *Drosophila melanogaster*. Con todo lo analizado, se refuerza el argumento de que la Casiopeína Igly presenta un efecto genotóxico detectable con la prueba de ICHs en linfocitos de sangre periférica humana, por lo tanto todos los antecedentes mostrados y nuestros resultados, apoyan la idea de que probablemente el efecto genotóxico observado en los tratamientos de este trabajo, sea debido al daño directo al ADN.

2. CITOTÓXICIDAD

El Índice Mitótico es un marcador biológico sensible y citogenético que permite determinar muerte celular y alteraciones en la progresión del ciclo celular. Este parámetro evalúa la toxicidad (la cual esta dada por su capacidad para causar lesiones graves, intoxicación, deterioro de la calidad de vida, e incluso la muerte del organismo) [Rodríguez, 2001; Di Saia y Creasman, 2002] inducida por los agentes químicos en el sistema celular. La disminución del IM es generalmente consecuencia del retraso en la mitosis por arrestos en alguna de las fases del ciclo celular, pero también, es debida a la perdida permanente de

la capacidad de proliferación que finalmente conduce a la muerte celular [Scout *et al.*,1991; Kirkland y Müller, 2000]. El análisis de este parámetro consiste en evaluar microscópicamente las células que se encontraban en mitosis de una población de 1000 células [Muehlbauer y Schuler, 2003].

García *et al.*, (1991) menciona que las Casiopeínas presentan una baja cinética de proliferación celular e Índice Mitótico, en cultivos de linfocitos humanos comparando con concentraciones equivalentes o menores que las del Cisplatino y Mitomicina C.

El abatimiento del IM en este trabajo, refleja la muerte celular (citotoxicidad) causada por la Casiopeína Ilgly, de aquellas células que no fueron capaces de superar el daño al ADN, aún cuando éste, estuviera presente solo como RCS.

En la **gráfica 2**, se aprecia como entre más se eleve la concentración de la Casiopeína Ilgly, la muerte celular se incrementa, presentándose de manera clara un comportamiento inverso de dosis-dependencia. Trejo *et al.*, (2005) reporta que las células de gliomas C6 de ratas tratadas con Casiopeínas Ilgly se inhibe significativamente la viabilidad en las siguientes concentraciones 1.0, 2.5, 5.0, 10 µg/ml, observando que a mayor concentración menor viabilidad, inverso a esto, a mayor concentración mayor inducción de apoptosis. La concentración más baja para Trejo es la más alta para nosotros, sin embargo sigue siendo significativa la muerte celular para ambos trabajos en esta concentración. Esto nos está indicando que se afecta de igual manera la viabilidad celular, tanto de las células sanas como las transformadas, por lo menos en la concentración más alta de nuestro este trabajo (1.00 µg/ml).

En otras investigaciones también se reporta que la Casiopeína Ilgly *in vitro* sobre células de carcinoma de colon HCT-15, tratadas durante 24 hrs. disminuyó la viabilidad e indujo apoptosis a partir de la primera concentración, (1.25, 2.5, 5.0, 10 µg/ml), respecto al testigo [Carvallo, 2007]. Comparando con nuestros resultados se puede apreciar que aunque las concentraciones que nosotros utilizamos son menores y las células son linfocitos de donadores sanos, se sigue viendo el mismo comportamiento dosis respuesta.

Así mismo el efecto citotóxico *in vivo* de la Casiopeína IIgly en ratones xenotransplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon humano HCT-15, muestra que con 1.00 µg/ml de Casiopeína IIgly el Índice Mitótico tumoral disminuye alrededor del 50% con relación al grupo testigo **[Carvalho, 2007]**. Aunque en nuestro trabajo fue de forma *in vitro*, semejante a Carvalho en la concentración de 1.00 µg/ml de Casiopeína IIgly, nosotros también observamos un aumento en la muerte celular muy significativo. Lo anterior nos indica que las células están respondiendo al compuesto, impidiendo que estas sigan proliferando.

Tovar *et al.*, (2004) señala que las células L1210 expuestas a la Casiopeína IIgly, presentan fragmentaciones en el ADN, indicando que el complejo mixto mata a las células, preferentemente por apoptosis. Más recientemente se ha reportado que la Casiopeína IIgly produce citotoxicidad en las células de sangre, corazón, hígado, riñón y testículo a partir de 12 horas de tratamiento en ratones de la cepa CD-1 expuestos durante 24 horas, a 4.4 mg/Kg (que corresponde a ½ de la LD50). En otros trabajos se observa que la reducción del cobre (II) incrementa considerablemente la citotoxicidad afectando tanto a las células HeLa y a los linfocitos, observando una sobrevivencia menor del 50 % en ambas células, tratadas con 100 µM de Casiopeína IIgly. Respecto a la toxicidad se observa en este mismo trabajo que las células transformadas son más sensibles que los linfocitos, al daño inducido por las Casiopeína **[Alemón et al., 2006]**. Con los datos reportados y los antecedentes mostrados se puede inferir que la Casiopeína IIgly al igual que otros compuestos no son selectivos para algún tipo de células ya sea dañadas o no, sin embargo, las células transformadas presentan mayor sensibilidad según algunos autores, De esta misma manera, la Casiopeína IIgly, comparada con otros compuestos e incluso con otras Casiopeínas, es menos agresiva respecto a su toxicidad. Por ejemplo, se tiene reportado que la Casiopeína III E-a es actualmente la más genotóxica seguida por la Casiopeína I gly y finalmente por la Casiopeína III-H-a **[Alemón et al., 2006]** (comparada con otros compuestos el Cis-platino es más tóxico). Todo lo expuesto anteriormente esta fundamentando el hecho de que la Casiopeína IIgly es citotóxica, tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes

tipos celulares, entre ellas los linfocitos. Lo anterior apoya nuestros resultados, donde se puede apreciar (**grafica 2**) que conforme aumenta la concentración del compuesto disminuye el Índice Mitótico, esto también está indicándonos que la Casiopeína Ilgly es citotóxica.

Trejo *et al.*, (2005) menciona que la administración de la Casiopeína Ilgly en tumores murinos incrementa el promedio de vida, similar a otras drogas antineoplásicas. Por lo que se puede adjudicar a la Casiopeína Ilgly que tiene la característica de tener un mayor potencial para atacar las células dañadas y proporcionar un periodo de vida más amplio. Sin embargo, este compuesto no es totalmente selectivo ya que también daña las células sanas como lo podemos apreciar en este trabajo (**grafica 2**).

El decremento del IM observado en este experimento puede ser debido a muchas posibilidades, algunas de ellas son: que existe un bloqueo en la fase G2, la cual previene a la célula de entrar en mitosis o puede ser causado por un decrecimiento en los niveles de ATP o por el estrés, o por la inhibición de ciertas proteínas específicas del ciclo celular o enzimas que inhiben la síntesis de ADN, o por la inhibición del huso, o la mala orientación de ensamblaje [**Yüzbasigolu, 2006**]; una o más de estas posibilidades pueden explicar el efecto antimitótico de la Casiopeína Ilgly Sin embargo se tiene que seguir investigando cual es la vía, es importante señalar que la interpretación de este parámetro nos permite analizar la cobertura del daño que es causado por el compuesto químico en los linfocitos humanos [**Muchlbaver, 2003**]. Este es uno de los motivos por lo que se evaluó este parámetro.

Sin embargo aunque las células transformadas son más sensibles a la Casiopeína, según algunos autores y el presente trabajo, este compuesto no está exento de presentar daños secundarios al igual que otros compuestos anticancerígenos, ya que sigue siendo no selectivo y dañando una buena porción de células sanas. Sin embargo como presenta menor toxicidad que otros compuestos químicos presenta mayores posibilidades de utilizarse como un quimioterapéutico.

3. CITOSTATICIDAD

La evaluación citostática provee información acerca de agentes químicos, permitiendo la identificación de las moléculas que pueden estimular o entorpecer su división celular al alterar el ciclo celular [Fenech, 1997]. La CDC, el TPL y el IR, son parámetros de citostaticidad, los cuales fueron empleados en esta investigación para evaluar el efecto citostático de la Casiopeína Ilgly en el cultivo de linfocitos.

Los datos obtenidos en este trabajo para la citostaticidad se presentan en las **gráficas 3, 4 y 5**, donde se puede determinar que la Casiopeína Ilgly tiene un comportamiento dosis-dependencia para la CDC y el TPL, mientras que para el IR es un comportamiento inverso dosis-respuesta, ya que al analizar estos datos podemos ver que en la CDC, el comportamiento del ciclo celular se esta invirtiendo, lo que quiere decir que en la concentración más baja [0.33 µg/ml] del compuesto a las 72 hrs, una buena proporción de las células llegan a ciclar tres veces, manteniéndose una baja proporción celular que se quedaron en un primer ciclo, por otro lado, para la concentración más alta [1.00 µg/ml] este comportamiento se invierte, quedando de la siguiente manera, a las 72 hrs de cultivadas las células en las mismas condiciones ideales, la mayoría permanecen en primera división siendo muy poca la proporción de éstas que alcanza a ciclar tres veces.

Contrastando este comportamiento con los datos del TPL, aunque no muestren una diferencia significativa se aprecia claramente una tendencia a incrementar el tiempo necesario que requieren las células para llevar a cabo su ciclo (**grafica, 4**), presentando un comportamiento dosis-dependencia, conforme incrementa la concentración se necesitan más horas para que las células ciclen, en otras palabras el ciclo celular de las células tratadas con Casiopeína Ilgly, es más largo (4.7 horas más), respecto al testigo negativo.

En suma, si las células tratadas requieren mayor tiempo para ciclar conforme aumenta la concentración, es normal que las células a las 72 hrs, que deberían

de haber ciclado tres veces en condiciones normales, ahora requieran más tiempo para llevar a cabo su división celular, por lo que en este periodo de tiempo muy pocas células hayan alcanzado con éxito estas tres divisiones.

Este pequeño éxito se debe probablemente a los mecanismos de reparación de las células que están intactas y por lo tanto trabajan bien. Así como a la susceptibilidad, metabolismo, respuesta a agentes ambientales, edad y la salud del individuo, así como a las condiciones del cultivo [Rojas *et al.*, 1992; Aydemir *et al.*, 2005].

Aunado a estos datos, es lógico que la replicación de las células tenga un comportamiento inverso dosis-respuesta (**grafico 4**) a mayor concentración menor replicación. Por lo que en concentraciones altas, las células requieren más tiempo para replicarse, por lo tanto, a las 72 hrs hay un menor número de éstas.

Lo anterior se ve respaldado en el trabajo en el que las células estuvieron expuestas durante 28 hrs a la Casiopeína Ilgly (1.00, 0.66 y 0.33 µg/ml), donde se observó que los linfocitos tienden a disminuir su Índice de Proliferación en relación con el testigo negativo, (a demás de presentar un potencial citostático ligeramente mayor al de Cis-platino) [Atilano, 2004]. También se ha reportado que la Casiopeína Ilgly disminuye el Índice de División Nuclear (IDN) en las mismas concentraciones y tiempo de exposición [Roldán y Atilano, 2005]. Como se puede apreciar las concentraciones y tiempo de exposición es el mismo al que nosotros empleamos, lo que fortalece aun más la aseveración de que **la Casiopeína Ilgly es citostática.**

Por otro lado Ruiz-Ramírez *et al.*, (1993), menciona que las Casiopeínas han demostrado inhibir el desarrollo de células *in vitro* de líneas celulares de tumores humanos, en HeLa y CaLo muestran un comportamiento dosis respuesta similar al de la Mitomicina C y el Cis-platino.

De la misma manera, la exposición de las células C6 de glioma con Casiopeínas Ilgly inhibe significativamente la proliferación celular, el volumen

del tumor, tanto *in vivo* como *in vitro*, según Trejo *et al.*, (2005) y Alemón *et al.*, (2006) Además, Ruiz-Ramírez *et al.*, (1993) demostró que se inhibe el crecimiento celular en líneas tumorales humanas de Sarcoma S189, CaLo y HeLa, tratadas con esta Casiopeína. Por otro lado, Marín *et al.*, (2003), reporta que se inhibe el desarrollo celular de varias líneas tumorales cuando se incuban durante 24 hrs con Casiopeína IIgly a $1\mu\text{M}$ o $1\text{ nmol}/10^6$.

Si todo este análisis es correcto la Casiopeína IIgly, primero interactuaría con el ADN ya sea por alguno de estos dos mecanismos siguientes: como un intercalante (interacción Casiopeína-adenina, mediante el apilamiento entre los sustituyentes bipyridina o fenantrolina del complejo mixto y el anillo de la base) o por medio de la reducción del átomo de cobre (II) a cobre (I) en su estructura, lo que subsecuentemente generaría la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden reaccionar y alterar la capacidad de apareamiento de las bases del ADN y/o romper las hebras de ADN.

Si la Casiopeína IIgly se une al ADN por este último mecanismo, entonces, las células activaran su mecanismo de reparación, proceso que incluye cortes en el ADN que finalmente conducen a un aumento de rompimientos, que finalmente se manifiestan como ICHs; dándose así la genotoxicidad, lo cual alteraría los medios de información celular, que no permitirían que se llevara de manera adecuada la división celular o incluso que no se realice; generando así el efecto citostático, que culminaría en un efecto citotóxico, provocando por lo tanto, daños irreversibles como lo es la muerte. De cualquier manera el mecanismo de acción de la Casiopeína IIgly debe seguir siendo estudiado.

Un trabajo que de alguna manera apoya el planteamiento antes citado, es el de Cermeño, (2007) diciendo que la toxicidad celular de la Casiopeína IIgly, se presenta a partir de 12 horas y el efecto genotóxico desde 3 horas de exposición al trabajar con ratones de la cepa CD-1 expuestos durante 24 hrs a 4.4 mg/Kg de la Casiopeína IIgly (que corresponde a $\frac{1}{2}$ de la LD50). Esto constata que primero se manifiesta la genotoxicidad y como consecuencia la citotoxicidad. Entre otras cosas también señala que la Casiopeína IIgly es un agente genotóxico, debido al aumento en el número de las células con daño y

al incremento de la longitud de los cometas en los tejidos y órganos analizados (los órganos más susceptibles fueron riñón e hígado seguidos de testículo y corazón). También observó un comportamiento tiempo-dependiente en el daño al ADN. Por otra parte, Florín, (2005) también reporta algo semejante, señalando que las diferencias estadísticas muestran que la Casiopeína Ilgly es capaz de inducir daño al ADN desde los 20 min de exposición con 8.35 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto, efecto que se ve acentuado en 30, 60, y 180 min de tratamiento. De la misma manera reporta que la Casiopeína Ilgly disminuye la viabilidad celular en dosis altas y con tres horas de exposición. Lo cual está también indicando que primero se da el daño genotóxico y por último el citotóxico.

Así es que, aunque resulte un poco complicada la relación de los resultados de la Casiopeína Ilgly, de las pruebas *in vivo* como *in vitro*, de cualquier manera en ambas se sigue presentando daño en el ADN.

Los resultados obtenidos por Alemón-Medina, (2006), sugieren que el aumento de la generación de ROS es causa de citotoxicidad, la cual parece estar relacionada con daño genético. Esto sigue apoyando la propuesta anterior.

Así es que todo lo anterior nos permite determinar que la Casiopeína Ilgly, está alterando el ciclo de división celular, haciendo que las células ya no puedan proseguir con su división. Lo cual es perfecto para el caso de las células cancerosas las cuales se caracterizan por una división exagerada, por lo que dicho desarrollo podría ser contrarrestado por la Casiopeína Ilgly.

Las tres características aquí evaluadas de la Casiopeína Ilgly nos lleva a deducir que, si el cáncer se caracteriza por la proliferación celular descontrolada, entonces la Casiopeína Ilgly ya sea por una o por la combinación de dos o las tres actividades (genotóxica, citotóxica o citostática) que presenta según los resultados de este trabajo, contrarrestarán a este comportamiento celular. Dicha característica convierte a este compuesto químico hasta el momento como un buen candidato, como agente terapéutico contra el cáncer.

XI. CONCLUSIONES

1. Debido a que el grupo control negativo no presento diferencias estadísticamente significativas y que el grupo control positivo haya presentado una diferencia mayor estadísticamente significativa en comparación con los resultados mencionados anteriormente de la Casiopeína Ilgly. (con excepción del TPL), se puede decir, que se evaluó, de manera adecuada todos los parámetros ICHs, IM, CDC, TPL, e IR para la Casiopeína Ilgly en los cultivos de linfocitos humanos *in vitro*.
2. Con la evaluación de la frecuencia de los Intercambios de Cromátidas Hermanas, se puede determinar que la Casiopeína Ilgly **presenta un comportamiento de genotoxicidad** para los linfocitos de sangre periférica humana *in vitro* en las siguientes concentraciones 0.33, 0.66 y 1.00 µg/ml.
3. Así mismo, con los resultados del Índice Mitótico se puede decir que la Casiopeína Ilgly es **citotóxica** para estas mismas células, bajo las mismas condiciones.
4. Por otro lado, con los resultados y la evaluación respectiva de CDC, TPL e IR, se concluye que la Casiopeína Ilgly es **citostática**, inhibiendo de alguna manera el desarrollo celular.
5. Todo lo anterior nos lleva a deducir que si el cáncer se caracteriza por la proliferación celular descontrolada, entonces la Casiopeína Ilgly ya sea por una o por la combinación de dos o las tres actividades, genotóxica, citotóxica o citostática, que presenta según los resultados de este trabajo, contrarrestan a este comportamiento celular. Por lo que este estudio siguen confirmando la aseveración de que la Casiopeína Ilgly es hasta el momento un buen candidato, como agente terapéutico contra el cáncer.

Resumiendo, los datos obtenidos de la Casiopeína Igly, bajo las condiciones y concentraciones ya expuestas y evaluaciones realizadas hasta el momento, permiten afirmar que es **genotóxica, citotóxica y citostática**, en linfocitos de sangre periférica humana *in vitro*.

XII. COMENTARIOS FINALES Y PERSPECTIVAS

Hasta el día de hoy el sueño de contrarrestar 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 este caso nos dimos a la tarea de evaluar algunas propiedades del compuesto Casiopeína Ilgly, el cual se ha venido proponiendo desde su descubrimiento, como una buena alternativa para el tratamiento del cáncer. Los resultados arrojados por dicha investigación señalan que: es genotóxica, citotóxica y citostática. Sin embargo considero que hay que implementar otras técnicas y otros proyectos de investigación para cerciorarnos de los efectos de este compuesto.

1. Seguir evaluando el efecto de la Casiopeína Ilgly hasta que ya no haya discrepancias en los resultados de las respectivas investigaciones.
2. Establecer el mecanismo de acción de la Casiopeína Ilgly.
3. Implementar otras técnicas como la de FISH y cariotipo espectral¹ en la UNIGEN, para ver si el compuesto químico tiene alguna afinidad en específico por algún o algunos cromosomas.
4. Estandarizar una metodología de secuenciación de bases de ADN para cerciorarnos de que la adenina es la base purica con la cual tiene interacción la Casiopeína, como vía alternativa de acción.
5. Verificar hacia que tipo de tumor en específico iría dirigido el tratamiento con Casiopeína Ilgly.

¹ FISH: Hibridación *in situ* fluorescente. Las fluorescencias son producidas por dos sondas diferentes. Cariotipo espectral: los diferentes cromosomas humanos se identifican mediante sondas distintas, cada una específica para un cromosoma que producen un color diferente cada una. [Pierce, 2006]

El trabajo es arduo y extenso, sin embargo, para lograr lo anterior, hay que trabajar en equipo con la misma finalidad... encontrar algún tratamiento que contrarreste los efectos y consecuencias del cáncer o por lo menos que se dignifique la vida de quien padece esta enfermedad.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertini, R. D., Sylverter, D. L. y Allen, E. F. (1982). "The G-thioguanine – resistant peripheral blood lymphocytes assay for direct mutagenicity testing in humans". En: *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*. Academic Press, N. Y.

Albertini, R. D. Anderson, D., Douglas, G., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A., Norppa, H., Shuker, D., Tice, R., Waters, M., Antero, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* 463:111-172.

Alemón M, R., Breña V. M., Muños S. J. L., García M. M. I., Ruiz A. L. (2006). Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drug (Casiopeínas®). *Cancer Chemother Pharmacol.* No. 364

Atilano, A. y Roldán E. (2004) Evaluación de micronúcleos en cultivos de linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis tratados con Casiopeína Ilgly. Memorias del Primer Congreso de Química Médica: Dedicado a la Investigación en Cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma de "Benito Juárez" de Oaxaca. México.

Atilano, A. y Roldan E. (2006) Evaluación de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y asociaciones de satélite en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Ilgly. Segundo Congreso de Química Médica Dedicado a la Investigación en Cáncer y Diabetes. Querétaro. México.

Atilano, A. (2007). Evaluación de daño genotóxico, citotóxico y citostático inducido por Casiopeína Ilgly en cultivo de linfocitos humanos. Tesis para obtener título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. FES-Zaragoza. México.

Audesirk, T y Audesirk G. (1996). "Biología, la vida en la tierra". 4ª ed. Ed. Prentice Hall, México.

Aruoma, O. I., Halliwell B., Gajewski, Disdaroglu M. (1991). Copper-ion-dependent damage to the bases in ADN in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 273:601-604.

Aydemir, N., Celikler S., Bilaloglu R. (2005). *In vitro* genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes. *Mutation Research.* 582: 35-41.

Bajpayee, M., Pandey A. K., Parmar D., and Dhawan. (2005). Current Status of Short-Term Tests for Evaluation of Genotoxicity, Mutagenicity, and Carcinogenicity of Environmental Chemicals and NCEs. *Taylor & Francis*, 15:155-180.

Barale, R., Barraï, I., Sbrana, I, Migliore, L., Marrazzini, A., Scarcelli, V., Bacci, E., Di Sibio, A., Tessa, A., Cocchi, L., Lumbrano, V., Vassale, C. y He, J. (1993). Monitoring human exposure to urbana in pollutants. *Environ. Health Perspect. Suppl.* 101: 89-95.

Betancourt, M., Ortiz, R. y González, C. (1992) Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. *Mutation Research.* 283:173-177.

Blasiak, J., Gloc E., y Warszawski M. (2002). A comparison of the *in vitro* genotoxicity of anticancer drug idarubicin and mitoxantrone. *Acta Biochimica Polonica.* 49: 145-155.

Bravo, E., Tovar, A., Ruiz, M., Ruiz. L., Moreno R., (2002). Diseño síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas. Primer Congreso de Casiopeínas, UNAM.

Bruce, A. Bray, D. Lewis, J. Roberts K., Watson, J., (1989). "Molecular Biology of the Cell". Garland publishing. New York.

Brusick, D., (1987). "Principles of genetic toxicology". 2a ed. Ed. Plenum Press. New York.

Buckton, K, E., y **H.J. Evans.** (Eds.) (1973). "Methods for Analysis of Human Chromosome Aberrations", Ed. World Health Organization, Geneva.

Burgen, A. (1986). "The road to rational drug design, in innovative approaches in drug research", Ed. Amsterdam; Elsevier Publishing Company.

Butterworth, B.E. y **Bogdanffy, M. S.** (1999). A comprehensive approach for integration of toxicity and cancer risk assessments. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 29:23-36

Cai, X., Pan N., Zou G. (2007). Copper 1-10 phenantroline-induced apoptosis in liver carcinoma Bel-7402 cells associates with copper overload, reactive oxygen species production, glutathione depletion and oxidative DNA damage. *Biometals.* 20:1-11.

Carvallo, F., Mejía, C., Gómez, C., Constantino, F., Roldán, E., Gracia, I. (2002). Determinación *in vitro* de las células vías de inducción de apoptosis por Casiopeínas III en células de carcinoma humano. 1er congreso en Casiopeínas y 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM Facultad de Química.

Carvalho, F., (2007) Efectos antiproliferativos y apoptóticos de las Casiopeínas II-gly y II-IA en líneas tumorales Humanas. Tesis para obtener el título de Doctor en ciencias de la producción y de la salud animal. Universidad Nacional Autónoma de México. Programa de doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal. México. D. F.

Castañeda, P. A., Aragón-Martínez A y Altamirano-Lozano MA. 2004. Toxicidad reproductiva masculina de la Casiopeína II-gly. 1º Congreso Nacional de Química Médica. Oaxaca, Oaxaca.

Cermeño, G. J. R., Rodríguez, M. J. J. Altamirano L. M. A. (2006) Estudio del efecto genotóxico inducido *in vivo* por la Casiopeína II-gly y por la Casiopeína III-ia. Segundo Congreso de Química Médica Dedicado a la Investigación en Cáncer y Diabetes. Querétaro. México.

Cermeño, G. J. R., (2007) Estudio del efecto genotóxico inducido *in vivo* por la Casiopeína II-gly y por la Casiopeína III-ia. Tesis para obtener el título de biólogo. Fes-Zaragoza. UNAM. México.

Chieri, P., y **Zannoni E. A.**, (2001). "Prueba del ADN". 2ª ed. Ed. Astrea. Buenos Aires.

Chi-Jen, L., (2000). "Development and evaluation of drug. From Laboratory Through Licensure to Market. USA ; CRC Press", Inc. U. S. A.

Cirigo, C., Moreno, R., Ruiz, L. (2002). Interacción entre complejos ternarios del tipo Casiopeína II con el DNA y sus constituyentes. 1er Congreso en Casiopeínas y 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM- Fac. Química.

Cruces, M., De la rosa, E., Pimentel, E., Gracia, I., Ruiz, L. (1994). Pruebas de genotoxicidad. 1ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Fac. de Química, UNAM. Resumen 14.

Daniel, K. G., Chen D., Orlu S., Cui Q. C., Miller F. R., Dou Q. P., (2005). Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 7: 897-908.

Di Saia, P. J. y **Creasman, W. T.** (2002). "Principios básicos de la quimioterapia Oncología, ginecología clínica". Ed. 6ª. Impreso en Madrid, España.

De Vita, V., Hellman, S. Rosenberg, S. (1993). Cancer; Principles & Practice of Oncology. Ed. J. B. Lippincott company , E. U. 4: 915

De Vizcaya, A., García, I., Castilla, M., Saldivar, L., Ruiz, L. (1996). Análisis post-mortem de cobre en órganos tratados con Casiopeínas II. 2ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química.

De Vizcaya, A., Paredes, P., Ruiz-Ramírez, L., Cancanosa, A., Mateos, T., Sumano, L. (1996). Farmacocinética básica y eficacia de la Casiopeína II en el tratamiento de perros con tumor venéreo transmisible. Segunda jornada de Trabajo en Casiopeína II. UNAM.

De Vizcaya, R. A., Rivero M. A., Ruiz R. L., Kass G. E., Orr R. M., y Dobrota M. (2000) Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, Casiopeína II, in L1210 murine leukemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology in vitro.* 194; 103-113.

De Vizcaya, R. A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Howarth, J., Debrot, M. (2003) "Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeína II". *Toxicology*, 194; 103-113.

Donovan, P. J., Smith., G. T., Lawlor, T. E., Cifone, M. A., Murli, H. y Keefer, L. K. (1997). Quantification of diazeniumdiate mutagenicity in four different *in vitro* assays. *Nitric Oxide* 1:158-166.

Dronkert, M. L. G., H. B. Beverloo, R. D. Johnson, J. H. Jhoeijmakers, M. Jasin y R. Kanar (2000). Mouse *RAD54* Affects DNA Double-Strand Break Repair and Sister Chromatid Exchange. *Mol. Cell Biol.*,20:3147-3156

Evans, H. J. (1970). Population cytogenetics and environmental factors. En: Pfizer Medical Monographs, Edinburgh University Press, 55:192-216

Evans, H. J. (1982). Chromosomal mutations in human populations. *Cytogenet. Cell Genet.* 33:48-56.

Evans, H.J. y O'Riordan, M. L. (1975). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test. *Mutation Research.* 31:135-148.

Evans H. J. K. E. Buckton, G. E. Hamilton y A. Carothers (1979). Radiation induced chromosome aberration in nuclear-dockyard workers. *Nature*, 277:531-534.

<http://es.wikipedia.org/wiki/SNP>

Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research.* 392: 11-18.

Ferrer, S., Gasque, L., Moreno, E., Ruiz-Azuara, L. (1995). Equilibrio en disolución. 1ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química.

Florín, D. (2004) Evaluación de los rompimientos en el ADN inducidos por la Casiopeína II-gly en leucocitos Humanos de sangre periférica. 1º Congreso

Nacional de Química Médica. Dedicado a la investigación del cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca.

Florín, D. (2005). Estimación de los rompimientos de cadena sencilla inducidos en el ADN de leucocitos humanos de sangre periférica expuestos a Casiopeína II-gly. Tesis para obtener el título de biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. FES-Z. México D. F.

Fuentes, I., Jarquín, A., Ruiz-Ramírez, L. (2002). Farmacocinética preclínica de Casiopeína III-ia en ratas, conejos y perros y su distribución en sangre total". 1er Congreso en Casiopeínas y 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química.

Fuentes, N. I., Rodríguez R. F., Ruiz R. L. y Portilla M. (2004). Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica (Casiopeína IIIi). 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.

Fuentes N. I, Ruiz R. L, Tovar T. A, Rico M. H y Gracia MI. 2002. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína III-ia in rat plasma. *J. Chromat. B.* 772: 115-121.

García E., Medina M., Rojas Y., Ostrosky P., Rodríguez R. (1991). Acute toxicity of Casiopeine, a new type of cytotoxic agent. *Pharmacol.*34: 65-67.

García R. M. C., López S. V. y Altamirano L. M. (2001) Effect of Chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research*, 496; 145-151.

García R. M. O. y Fuentes N. I. (2002) Unión a proteínas de la Casiopeína II por el método de ultra filtración. 5 a Jornada de trabajo 1º Congreso en Casiopeínas.

Gasque, R. Moreno Esperanza, E. Molins, J. L. Briansó, L. Ruiz Ramírez, G. Medina Dickinson. (1999). (Salicylaldehyde-O, O)(nitrate)(5,6dimethyl-1,10-phenanthroline-N,N)copper (II). *Acta Cryst.*, C55 1063-1065

Gennart, J. Ph., Baleux, Ch. Verellen-Dumoulin, J. P., Buchet, R., de Meyer y Lauwerys, R. (1993) Increased sister-chromatid exchanges and tumor markers in workers exposed to elemental chromium-cobalt-and nickel-containing dusts. *Mutation Research.* 299: 55-61

Gil, I., Rabadán, I., Bustamante, I. (1997). "Carcinogénesis; fundamentos etiológicos del cáncer". Universidad de Valladolid.

Goldsby, R. (2003). Inmunología", 5ª ed. Ed. Mc Graw-Hill, México.

Gómez, E., Galicia, P., Gracia, M., Sumano, H., (1994). Informe de casos clínicos de perros y gatos tratados con Casiopeínas. 1ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química, resumen 12.

González, M. E. (2004). Efecto teratogénico de la Casiopeína II. Tesis para obtener el título de biólogo. FES-Zaragoza. UNAM. México.

González B. F. (2004) Reparabilidad durante G1 de las lesiones Inductoras de intercambio en las cromátidas hermanas Inducidos por agentes alquilantes en el ADN sustituido y no sustituido con BrdU, en células de la glándula salival de ratón *in vivo*. Para obtener el título de doctorado en ciencias (Biología). Fac. Ciencias. UNAM. México.

Gracia M. I., Ruiz R. L., Gómez R. C., Tinoco M. M.; Márquez Q. A., Romero D. L., Marín H. A., Macías R. L. y Bravo G. M. (2001) "Knight'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*. 8:1-28.

Hidalgo, A.; Silva-Zolezzi I.; Barrientos, E.; March, S.; del Bosque P. L.; Pérez, G. O. A.; Balam, O. E.; Contreras, A.; Dávila, C.; Orozco, L.; Jiménez-Sánchez, G. (2006). Proyecto mapa genómico de los mexicanos. *Ciencia y desarrollo*. 32:32-52.

Huber, K., Sridhar, R., Griffith, E., Amma, E. y Roberts, J. (1987). Superoxide dismutase-like activities of copper (II) complexes tested in serum. *Biochemical Biophysical Acta*. 915:267-276.

Iannuzzi, L., Di Meo, G. P., Ęrucatti, A., Ferrara, L. Gustavsson, I. (1991). Sister chromatid exchange in chromosome of cattle from three different breeds Under similar conditions. *Hereditas* 114:201-205.

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) 2006.
www.inmegen.gob.mx

Kato, H. (1980). Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet Cytogenet*. 2:69-77.

Keppler, B. K. (Ed), (1993). Metal complexes in Cancer Chemotherapy, VCH, Weinheim.

Kirkland D y Müller L (2000) Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutation Research*. 464:137-147

Klug, W. y Cummings, M., (2000) "Conceptos de genética, 5ª ed. Ed. Prentice Hall, México.

Knuutila, S (1979). Human bone marrow cell in the study of cytogenetic abnormalities. Dissertation, University of Helsinki.

Kuwabara, M., Yoon C., Gozne T., Thederahn T., Sigman S. D., (1986) Nuclease activity of 1, 10-Phenanthroline copper ion: Reaction with CGCGAATTCGCG and its complexes with Neotripsin and EcoRI. *Biochemistry*. 26:7401-7408.

Kuwabara, M., Sigman D. S., (1987). Foot printing DNA-protein complexes *in situ* following gel retardation assays using 1, 10 phenanthroline-copper ion: *Escherichia Coli* RNA polymerase-*lac* promoter complexes. *Biochemistri*. 26:7234-7238.

Lakhanisky, T., Bazzoni, D., Jadot, P., Joiris, I., Laurent, C., Ottogali M. Pays, A., Planard, C., y Vlemynky, C. (1993). Cytogenetic monitoring of a village population potentially exposed a low level of environment pollutants. Phase 1: SCE analysis. *Mutation Research*. 319:317-323.

Latt, S. A. (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: Detection by fluorescence and induction by mitomicyn C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71:3162-3166.

Leonard, A. I. y Gerber, G. B. (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutation Research*. 317:81-82.

Lewin B. (2007). "Genes IX" . Ed. Jones and Bartlett Publishers. Boston.

Lorente J. A. (2004). "Un detective llamado ADN". Ed. Temas ´de hoy, Madrid.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J. (2005) "Biología celular y molecular", 5a ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires. Pag. 854.

Magrath, I. (1989). New direction in cancer treatment. Springer verlang. International Union Ag. pag.215

Marín H., A., García M. I., Ruiz R. L., Moreno S. R. (2003). Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology*, 65;1979-1989.

Morales, P., Vallarino K. y, Rodríguez. R. (1995) Determinación del potencial citostático de drogas antineoplásicos en desarrollo mediante su efecto sobre el índice mitótico en células la médula ósea de ratón *in vivo*. 1ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química de la UNAM, Resumen 5.

Morales R. P., T. Vallarino K. y R. Rodríguez (1984). *In vivo* persistence of sister chromatid exchange (SCE) induced by gamma rays in mouse marrow cells, *Environ. Mutagen.*, 6:529-537.

Morales R., Rodríguez R. R. y Villarino K. Y. (1987). Analysis of spontaneous sister-chromatid exchanges *in vivo* by three-way differentiation. *Mutation, Res.* 178:49-56.

Morales R. P., T. Villarino K. y R. Rodríguez R. (1988). Occurrence *in vivo* of sister chromatid exchange at the same locus in successive cell divisions causing by no repairing lesion induced by gamma rays. *Environ. Mol. Mutagen.* 11:183-193.

Morales R. P., T. Villarino K. y R. Rodríguez R. (1990). Lesions that elicit sister-chromatid exchanges. *Mutation. Research.*, 232:77-88.

Morales R. P., Rodríguez R. y T. Villarino K. (1992). *In vivo* fate of MMS induced lesions that elicit SCE. *Mutation Research.* 272:215-221.

Morales R. P., Rodríguez R., R. y Villarino K. T. (1995). Fate lesion that elicit sister chromatid exchanges (FLE-SCE) produced in DNA by alkylating agents *in vivo*. *Mutation Research.* 344:13-26.

Morimoto, K. (1983). Induction of sister chromatid exchanges and cell division delays in human lymphocytes by microsomal activation of benzene. *Cancer Res.*, 43:1330-1334.

Moutschen, J. (1985). "Introduction to Genetic Toxicology". Ed. John Wiley & Sons. N. Y.

Muñoz, A. (1997). "Cáncer; genes y nuevas terapias". Ed, Helice, España.

Murphy, G., Lawrence, W. Jr., Lenhard, R. (1996). "Oncología Clínica; Manual de la American Cancer Society". 2ª ed. Ed. Publicaciones Científicas No. 559, Organización Panamericana de la Salud.

Müller, L., Kikuchi. Y., Probst, G., Schechtman, L., Shimada, H., Sofuni, T., Tweats. D. (1999) ICH-Hermonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Research*, 436; 195-225.

Muehlbauer, P. A. y **Schuler** (2003). Measuring the mitotic index in chemically-treated human lymphocyte cultures by flow cytometry. *Mutation research.* 537:117-130

Natarajan, A. T. y **Obe, G.** (1982). "Mutagenic testing with cultured mammalian cells. Citogenetic assays". En: Mutagenicity: A New Horizons in Genetic Toxicology. Acad. Pres. N. Y.

Obe, G., Pfeiffer P., Savage K., Johannes C., Goedeck W., Jeppesen P., Natarajan A., Martínez W., Folle A., Drets E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification, and distribution. *Mutation Research*. 504:17-36.

Ortiz, R. y Betancourt, M. (1984). Cell proliferation in bone marrow cell of severely malnourished animals. *J. Nutr.* 114:472-472.

Painter, R. B. (1980). A replication model of sister chromatid exchange. *Mutation Research*. 70:337-341.

Perry, P. y Evans, H. J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258:121-125.

Perry, P. y Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 257:156-158.

Pierce B. (2005). "Genética: un enfoque conceptual". 2a ed. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Madrid.

Prival, M. J. (1980). Genetic toxicologic: Regulatory aspects. *J. Environm. Pathol. Toxicol.* 3:99-111.

Quiroz, R., Candanosa, E., Gracia, I., Tinoco, M., Ruiz, L. (1996). Toxicidad aguda de Casiopeína II por administración intravenosa en ratones. Estudio anatómico-histológico. 2ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química.

Rainaldi, R. y T. Mariano (1982) "The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool for identifying agents directly interacting with DNA", *Mutation Research*. 10: 333-337.

Reyes, L., Fuente-Noriega, I., Ruiz-Ramírez. L., Macías, L. (2003). Development and validation of a liquid chromatography method for Casiopeína IIgly in rat plasma. *Journal of Chromatography*. 791; 111-116.

Rico, H., Gracia, I., Ruiz, L., Sumano, H. (2002). Actividad antineoplásica de la Casiopeína III sobre diferentes líneas tumorales humanas xenotransplantadas al ratón desnudo. 1er Congreso en Casiopeínas y 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química.

Rivero-Müller A., De Vizcaya-Ruiz A., Plant N., Ruiz L., Dobrota M. (2007) Mixed chelate copper complex, Casiopeína IIgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*.

Rodríguez M. J.J. (2001) Evaluación de los efectos genotóxico y citotóxicos inducidos en cultivos de células de sangre periférica expuestos a tetraóxido de

Vanadio. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. FES-Zaragoza, UNAM, México.

Rojas, E., Montero R., Herrera L., Sordo M., Gonsebatt M., Rodriguez R., and Ostrosky-Wegman P. (1992). Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints toxicology testing? *Mutation Research*.282: 283-286.

Roldán, R. E. y Altamirano L. M. A. (1990). Chromosomal aberration, sister chromatid exchanges, cell cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 245:61-65

Roldán R. E. y Atilano A. (2005) Evaluación de micronúcleos en cultivo de linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis tratados con Casiopeína IIgly. Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética. Memorias. Hidalgo.

Roldán E. (2002). Estudio del mecanismo de acción de la cafeína y su participación en la producción de intercambio de cromátidas hermanas, inducidas por el pentóxido de vanadio. Tesis para obtener el grado de doctorado en ciencias (Biología). FES-Zaragoza, UNAM, México.

Rooney D. E. y Czepulkowski B. H. (1978) "Human cytogenetics" Ed. IRL PRESS. Oxford.

Rotemberg, A., Komar, D. y Kaneshi, N. (1999). Fármacos Antineoplásicos. (en línea) 1999. URL disponible en http://lafacu.Com/apuntes/medicina/forma_antineo/-28K.html

Ruiz-Azuara, L. (1992). Dirección General de Invenciones, Marcas y desarrollo Tecnológico (SECOFI), Registro Núm. 18801-120579 y 18802-120580. U. S. Patents: Number Ap. 21, 5, 107, 005; Nov. 19 (1996), 5, 576, 326, Feb. 18, (1997).

Ruiz-Azuara, L., Moreno, E., Ferre, S. y Gasque, L. (1995). Diseño, síntesis y caracterización de las Casiopeínas. Primera Jornada de Trabajo en Casiopeínas, Facultad de Química. UNAM: Resumen 1.

Ruiz-Azuara, L., (2000). Casiopeínas: síntesis, caracterización y desarrollo de evaluación preclínica. Concurso para el apoyo a proyectos de investigación del CONACYT.

Ruiz-Ramírez, L., Gracia, I., Moreno, R., Díaz, D., Gasque, L., Huerta, L., Mayet, L., Lomelí, C., (1991). The antitumor activity of several transition metal complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 43, (2-3) 615.

Ruiz-Ramírez L., García M. I., De la Rosa M. E. Sumano H., Gómez C., Arenas F., Gomes E., Pimentel E., Cruces M. (1992). Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeínas I, II, III. *Journal of Inorganic Biochemistry*.43: 1-2.

Ruiz-Ramírez L., Gasque, L., Martínez, A., Moreno, R., And Solan, X. (1992). Copper (II) Hydrate mixed chelate complexes. Part III. Structure of (L-Alaninato) (aqua)(2,2-bipyridine) copper (II)Nitrate Monohydrate and Aqua (2,2-bipyridine(L-tyrosinato)copper(II) Chloride Trihydrate. *Acta Crystallographica*, C48 1785-1788.

Ruiz-Ramírez, L., Gracia, I., de la Rosa, ME., Sumano, H., Gómez, L., Arenas, F., Gómez, E., Pimentel, E., and Cruces, M., (1993). Cytostatic, Mutagenic, Antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) new drug; Casiopeínas I, II, and III. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 51(1-2); 406.

Santiago, M. Y., (2004) Efecto genotóxico de los tratamientos agudos y subcronicos de la Casiopeína IIgly en machos, hembras, hembras preñadas y fetos de ratón CD-1. Tesis para obtener el titulo de bióloga. FES-Zaragoza, UNAM. México.

Sarel, S., Mechoulam, R., y Agranat, I. (1992). "Rational drug design, in trends in medicinal chemistry" 90. Oxford; Blackwell Scientific.

Sigman D. S., Graham D.R., D´Aurora V., Stern A. M. (1979). Oxygen-dependent cleavage of AND by the 1, 10 penentroline cuprous complex. Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Biol Chem*. 254:12269-12272.

Scott D., Galloway M., Marshall R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J y Myhr C. (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions. *Mutation Research*. 257 :147-204.

Sivikova, K. y Dianousky, (1995). Sister-chromatid exchanges after exposure to metal-containing emissions. *Mutation Research*. 327:17-22.

Soberón G, (2004). "El secreto de la vida en la geometría escultórica, soberonita el genoma humano", INMEGEN, México.

Sonoda E., M. S. Sasaki, C. Morrison, Y. Yamaguchi-Iwai, M. Takata y S. Takeda (1999) "Sister Chromatid Exchanges Are Mediated Homologous Recombination in Vertebrate Cells", *Mol. Biol.*, 19:5166-5169.

Sport, M. y Suh, N. (2000). Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*. 21.3:525-530.

Tamarín, A. (1996). "Genética". 1º edición. Ed. Reverté. México.

Trejo S. C., Palencia G., Zúñiga S., Rodríguez R. A., Osorio R. L., Sánchez T. LL., García M. I., Márquez R. L., Sánchez A., Moreno G. M. E., Cruz A., Bravo G. M. E., Ruiz R. L., Rodríguez E. S., and Sotelo J. (2005). Cas IIgly Induce Apoptosis in Glioma C6 Cells *In Vitro* and *In Vivo* through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Research Article*. 7:563-574.

Título de Marca: Casiopeína. Reg. 407543 SECOFI (1992)

Tovar, A., Ruiz, L., Campero, A. (2002) "Interacciones entre Casiopeínas y adenina". 1er Congreso en Casiopeínas y 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Fac. Química. UNAM. México.

Tovar T A., Ruiz R. L., Moreno E. R., Briansó J. L. (1993) Interaction of Casiopeínas III with methionine, adenosine, emonophosphate, puric, and pyrimidic bases". *Inorganic biochem*. 51:1-2.

Tovar T A., Ruiz-Ramirez L., Campero A., Romerosa A., Moreno-Esparza R., Rosalez-Hoz M. (2004) "Structural and reactivity studies on 4,4'-dimetthyl-2,2'-bipyridine acetylacetonate copper (II) nitrate (Casiopeína III-ia®) with methionine, by UV-visible and EPR techniques". *Journal of Inorganic Biochemistry*. 98: 1045-1053.

Tsuji, H., Heartlein, MW. Y Latt, S.A. (1988) "Disparate effects of 5-bromodeoxyuridine en sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in bloom syndrome fibroblasts". *Mutation Research*. 198: 241-253.

Tucker J. D., A. Auletta, M. C. Cimino, K. L. Dearfield, D. Jacobson-Kram, R. R. Tice y A. V. Carrano. (1993) "Sister chromatid exchange: second report of the gene program", *Mutation Research.*, 297:101-180.

Tucker, J. D. Y Preston, J. R. (1996) "Chromosomal aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research*. 365:147-159.

Verdejo, A., Ruiz, L., Espinosa, J., Muños, R. (1998) "Estudio de la interacción cyp-Casiopeína". 3ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM-Fac. Química.

Valle M. A. y Weiss S. B. (2003) Origen Molecular del Cáncer. *Vertientes*, 6(1): 3-8

Wang W., M. Seky, Y. Narita, T. Nakagawa, A. Yoshimura, M. Otsuki, Y. Kawabe, S. Tada, H. Yagi, Yishii y T. Enomoto. (2003) Functional relational among RecQ family helicases RecQL1, RecQL5, and BLM in cell growth and sister chromatid exchange Formation", *Mol. Cell. Biol.*, 23:3527-3535.

Watt, J. L. y Stephen, G, S. (1986). "Lymphocyte Culture for Chromosome Analysis. En: Human Cytogenetics". Rooney D. E. y Czeepulkowski, B. H. (Eds.), IRL PRESS, Oxford. Washington DC.

Wilson D. M. y Thompson L. H. (2007) Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research*. 616: 11-23.

Wojcik A., Bruckmann E., y Obe G. (2004) Insights into the mechanisms of sister chromatid exchange formation. *Cytogenetic and Genome Research*. 104: 304-309.

Wolff S, y P. Perry (1974) "Differential Giemsa Staining of Sister Chromatids and the Study of Sister Chromatid Exchanges without Autoradiography", *Chromosome*. 48:341-353.

Young, J. S., y Ferguson, L. (2003) "Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens molecular mechanisms and chemopreventive potential-highlights of a symposium. *Mutation Research*, 523-524; 1-8.0.

Yodada, J. (2000) Tumor progresión and metástasis. *Carcinogénesis*. 21:497-503.

Yunis T. E. J. y Yunis L. J. J (2002) "El ADN en la identificación humana", Ed. Temis. S. A. Bogotá-Colombia.

Yüzbasioglu D., Celik M., Yilmaz S., Ünal F., Aksoy H. (2006) "Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes". *Mutation Research*. 604: 53-59.

Zelenko O., Galagher J., Xu Y., Sigman D. S. (1998) "Chemical nuclease activity of 1, 10phenantroline-copper. Isotopic probes of mechanism. *Inorg Chem*. 37:2198-2204.