



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“Evaluación del daño ocasionado al ADN en cultivo
de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly
(Nuevo Compuesto de Cobre II)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Anahi Martha Pérez Mora

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Elia Roldán Reyes

Septiembre 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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**, responsable de la **Línea de Investigación en Citogenética y Mutagénesis (L-2 PA)** de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (**UNIGEN**). La UNIGEN es parte de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (**UMIEZ**), **UNAM**.

El desarrollo de este trabajo contó con el apoyo de **PAPIIT IN221808**.

A g r a d e c i m i e n t o s

Gracias *Dios* por haber permitido que llegara a este momento.

A mis padres:

Joel Pérez Mora por darme la vida
Carolina Mora Santiago por darme la vida, sus enseñanzas y cariño hasta el último momento que compartimos.

A mis hermanos, sobrinos y primos por creer y confiar en mí. Dios los bendiga.

A mis profesores por compartir sus conocimientos y vivencias.
Especialmente a Cristina Alvarado, David Organista, Magdalena Ordóñez, Isaías Salgado y José Luís Márquez.

A la Dra. Elia Roldán por sus consejos, paciencia y ser una luz en mi formación científica.

A los miembros de jurados:

Dr. Elia Roldán Reyes
Dr. Juan José Rodríguez Mercado
M. en C. Hugo López Muñoz
Biol. Cristina Alvarado Domínguez
Biol. Ana Laura Maldonado

Gracias por enriquecer este trabajo y espero sigan contribuyendo a la ciencia ya que creo es muy satisfactorio para todos. Les deseo lo mejor siempre.

A mis amigos y compañeros de la carrera:

Soledad, Aníbal, Sarahi, Rasviet, Yazmín, Viridiana, Gabriela, Luis Emilio, Alejandro, Jacqueline, Deyra, Ismael, Misael, Mauricio, Edgar, Karen, Matilde, Paty, Nancy E. Nancy C, Liliana y Wille gracias por compartir momentos juntos y por haber soportado mi sarcasmo, contribuyendo a mi formación académica y personal.

"Los investigadores alimentamos el instinto de saber; somos operarios del patrimonio intelectual de la humanidad." José María Martín Senovilla

"La ciencia es la benefactora de la humanidad; ella reclama hoy, a la vez, la dirección material, la dirección intelectual y la dirección moral de las sociedades"
Marcellin Berthelot

D e d i c a t o r i a

A mi madre donde quiera que este mil gracias

A mis Hermanos:

Otilia, Diana, Edgar, Guillermo, Joel, Alberto y Noé. Mil gracias por todo lo que me han dado sin obligación alguna y por confiar en mí.

A todos mis Sobrinos especialmente a
Noemí, Carolina, Miguel, Edgar y Maricarmen

A mi cariño por el tiempo compartido

"¡Que gran consuelo... el de sentirse seguro con alguien, sin tener que calibrar los pensamientos ni medir las palabras, dejándolos salir tal como son, con el grano y la paja, en la certeza de que los recogerá y tamizará una mano fiel que sabrá quedárselo" Dinah Craik

"La naturaleza hace que los hombres nos parezcamos unos a otros y nos juntemos; la educación hace que seamos diferentes y que nos alejemos." Confucio

ÍNDICE

	Página
I. -Resumen	1
II. -Marco teórico	
1.- Cáncer	2
1.2.- Incidencia de cáncer en México	4
1.3.- Antineoplásicos	6
1.4.-Mitomicina C (MMC)	8
1.5.- Cobre	9
1.6.- Casiopeínas	11
1.7.- Posibles Mecanismos de acción de las Casiopeínas	13
1.8.- Casiopeína Igly	14
1.9.- Toxicología Genética	14
1.10.- Micronúcleos	15
1.11.-Linfocitos como sistema de prueba	18
1.12.- Citoesqueleto	21
III. -Justificación	26
IV. -Hipótesis	27
V. -Objetivos	28
VI. - Materiales y métodos	
Cultivo de linfocitos humanos	29
Técnica de micronúcleos in vitro con bloqueo de la citocines	30
Evaluaciones y análisis estadístico	31
VII. -Resultados	34
VIII. - Discusión	40
IX. -Conclusiones y perspectivas	50
X. -Referencias Bibliográficas	52

I. RESUMEN

Actualmente en la búsqueda de antineoplásicos menos tóxicos se diseñaron a las Casiopeínas, un grupo de fármacos contra el cáncer, las cuales son sintetizadas y patentadas por la UNAM desde 1992, siendo los primeros antineoplásicos mexicanos. Dentro de estas encontramos a la Casiopeína Igly, la cual ha mostrado tener actividad citostática, citotóxica y antineoplásica tanto *in vivo* como *in vitro*. Como se pretende usar en clínica en pacientes con cáncer, se deben realizar una serie de pruebas antes de ser utilizada, entre ellas las de Toxicología que incluyen las de tipo Genotóxico. Para evaluar la genotoxicidad se cuenta con una batería de pruebas dentro de las cuales destaca la de **micronúcleos** por las ventajas que ofrece: su evaluación es rápida, sencilla, no se requiere mucha experiencia y las células analizadas tienen que haberse dividido al menos una vez, lo que indica que son viables.

Los objetivos planteados en este trabajo, fueron evaluar la actividad genotóxica, citotóxica y citostática de la Casiopeína Igly en linfocitos humanos *in vitro*, para ello se partió de la concentración inhibitoria media para la línea celular CaLo de 1.23 μ g/ml donde se evaluó el Índice Mitótico (IM), para obtener una curva dosis respuesta y elegir las concentraciones para los experimentos siguientes en los cuales se realizó la técnica de bloqueo de citocinesis con Citocalasina B. El tratamiento de los cultivos fue a las 44 hrs. con las concentraciones **0.615, 1.23 y 2.46 μ g/ml**, de la Casiopeína Igly, se contó con un testigo positivo (Mitomicina C, 0.2 μ g/ml), además de un testigo negativo. Para obtener parámetros como el Índice de Proliferación en células con bloqueo de la citocinesis (IBPC) que evalúa citotoxicidad, el porcentaje de células polinucleadas (citostaticidad), la frecuencia de micronúcleos (MN) y la formación de puentes nucleoplásmicos (PN), que evalúan la genotoxicidad.

Las frecuencias de MN y PN aumentaron en función de la concentración, con una tendencia dosis respuesta, esto nos indica actividad genotóxica, el IPBC tiende a disminuir y presentó un comportamiento inverso dosis respuesta, por lo tanto se observa un efecto citotóxico. El porcentaje de células polinucleadas refleja un efecto citostático. En base al análisis de resultados se puede concluir que la Casiopeína Igly es genotóxica, citotóxica y citostática para los linfocitos humanos *in vitro* a las concentraciones antes mencionadas.

II. MARCO TEÓRICO

1. Cáncer

En la actualidad se reconoce al cáncer como una anomalía genética en el ámbito celular, que implica la mutación de un pequeño número de genes o en un solo gen. Las alteraciones genómicas asociadas con el cáncer pueden implicar cambios a pequeña escala, como la sustitución de un solo nucleótido, o a gran escala, como reordenaciones cromosómicas, ganancia o pérdida de cromosomas o incluso la integración de genomas virales en el cromosoma (Klug y Cummings, 1999; Alberts *et al.*, 2002).

Las alteraciones a gran escala son un gran rasgo común del cáncer; la mayoría de los tumores en la especie humana se caracteriza por cambios cromosómicos visibles. Por lo tanto es una enfermedad genética, resultado del cúmulo de alteraciones en un conjunto de genes que tienen a dos grupos oncogenes¹ y genes supresores² cuyos productos ejercen funciones básicas para el funcionamiento, crecimiento y muerte de todas nuestras células (Klug y Cummings, 1999; Alberts *et al.*, 2002).

Las células de los tumores malignos presentan dos características que las distinguen de las normales. La primera que consiste en la reproducción descontrolada, la segunda consiste en invadir y colonizar tejidos u órganos distantes. La combinación desafortunada de estos eventos celulares, es lo que hace tan peligrosa y mortal a la mayoría de las formas del cáncer. Así pues, si en un momento dado una célula aislada presenta características aberrantes, pero su crecimiento está restringido como el de sus vecinas, no

¹ Genes implicados en el desarrollo del cáncer

² Genes normales cuya ausencia puede conducir al cáncer

ocurrirá un daño mayor. Sin embargo, si su crecimiento fuese desordenado las consecuencias seguramente serían devastadoras, pues terminarían con la vida del organismo que las origino (Klug y Cummings, 1999; Alberts *et al.*, 2002).

Evidentemente una única mutación no es suficiente para convertir una célula sana típica en una célula cancerosa que prolifere sin restricciones, porque de ser así no seríamos organismos viables. Diversas líneas de evidencia indican que en realidad el origen de un cáncer requiere que se produzcan en la misma célula varios accidentes independientes, y poco frecuentes (Klug y Cummings, 1999; Alberts *et al.*, 2002).

Se ha estimado que se requieren entre 3 y 7 sucesos independientes al azar, cada uno de ellos de baja probabilidad, para que una célula normal se transforme en un tumor: masa de células que no controlan el crecimiento y proliferación celular, convirtiéndose en un tumor benigno o maligno en el primero la proliferación de las células dañadas no invade otros tejidos y por lo tanto es mas fácil eliminar estas células. Por otra parte el tumor maligno se convierte en un verdadero problema ya que este tiene la capacidad de invadir otros tejidos (Alberts *et al.*, 2002).

Los tumores se clasifican generalmente según el origen de las células de donde surgen y se agrupan en:

- 1.-Carcinomas: aquellos cuyo origen son las células epiteliales
- 2.-Sarcomas: cuyo origen son las células del tejido conectivo y las células musculares (tejidos blandos)

3.-aquellos que no se ajustan a ninguna de las dos categorías anteriores y que incluyen la leucemia y los tumores del sistema nervioso (Klug y Cummings, 1999; Alberts *et al.*, 2002; Jiménez y Merchant, 2003).

Las células cancerosa pueden ser extirpadas quirúrgicamente o destruidas con agentes químicos o con radiación, pero es difícil erradicarlas todas y cada una de ellas. La cirugía raramente puede descubrir todas las metástasis³ y los tratamientos que matan a las células cancerosas generalmente también son tóxicos para las células normales. Además si quedan unas cuantas células cancerosas pueden proliferar y producir un resurgimiento de la enfermedad; a diferencia de las células normales, pueden desarrollar resistencia a los tóxicos utilizados en su contra. (Alberts *et al.*, 2002).

1.2. Incidencia de cáncer en México

Durante la Cumbre Mundial contra el Cáncer para el Nuevo Milenio, celebrada en febrero de 2000, se estableció mediante la Carta de París, que el día 4 de febrero de cada año sea declarado Día Mundial contra el Cáncer. Por ello el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), presenta información referente a la mortalidad y proporción de la población mexicana con tumores malignos ya que esta enfermedad afectan a ambos sexos; el cáncer de pulmón, tráquea y bronquios con mayor incidencia en los varones y, los de tipo ginecológico, en la población femenina (**figura 1**) (www.inegi.gob.mx).

El INEGI reporta que las tres principales causas de muerte por tumores malignos en los hombres corresponden a: cáncer de próstata (17.1%) tráquea, bronquios y pulmón (16.6%), y estómago (10.4 %). En las mujeres, el

³ Habilidad de las células cancerosas para penetrar dentro de los vasos sanguíneos y linfáticos permitiéndole circular a través del torrente sanguíneo para después invadir tejidos normales de otras partes del cuerpo

de mama (15%), el cuello del útero o cérvico-uterino (13.9%), e hígado y vías biliares, (7.9%), tienen la mayor incidencia (**figura 1**) (www.inegi.gob.mx)

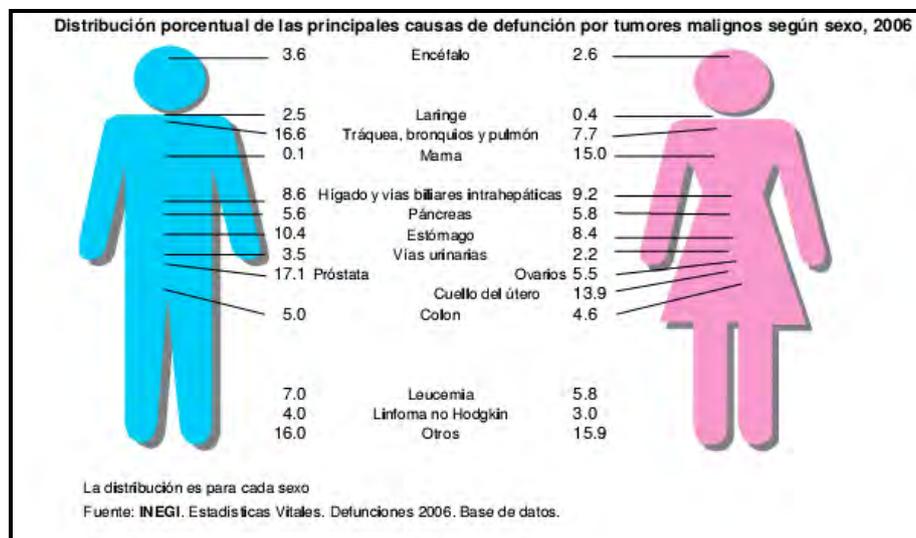


Figura 1. Distribución de cáncer por sexo (www.inegi.gob.mx).

Por otra parte en el 2006, los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en México, 63 888 personas fallecieron por éstos, el volumen representa 12.9% del total de las defunciones registradas. En la **figura 2**, se muestra el porcentaje de defunciones causadas por los tumores malignos para varios años, el total y por sexo (www.inegi.gob.mx).

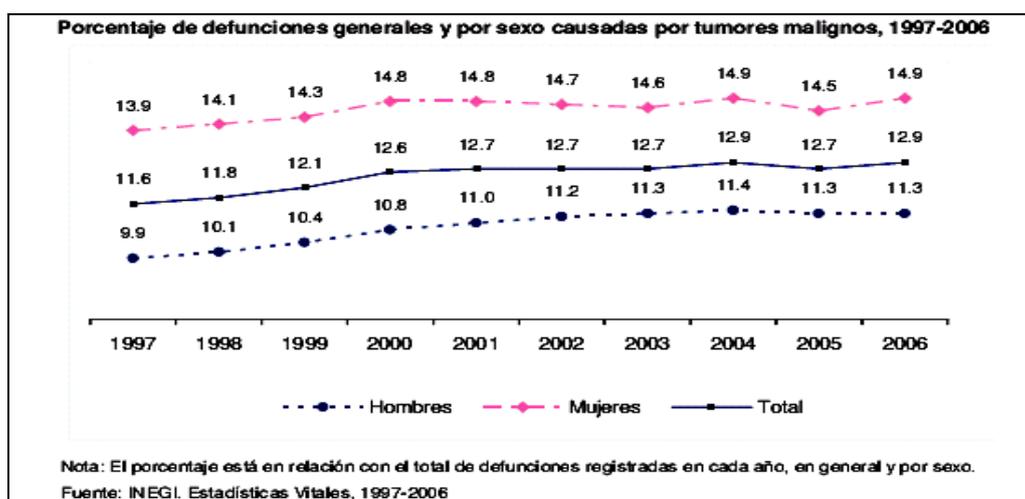


Figura 2. Porcentaje de defunciones generales y por sexo causadas por algún tumor maligno registradas de 1997 al 2006 (www.inegi.gob.mx).

Actualmente existen una gran variedad de tratamientos para la cura de cáncer entre ellos la cirugía, la radioterapia, la fototerapia 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 (Murphy *et al.*, 1996). En la quimioterapia se utilizan antineoplásicos los cuales se describen a continuación.

1.3. Antineoplásicos

Los antineoplásicos son fármacos que actúan sobre células cancerosas. La clasificación de estos es muy variada ya sea de acuerdo a su mecanismo de acción, los que actúan sobre el ADN, agentes específicos de fase y no específicos entre otros. En el **cuadro 1** se muestra los antineoplásicos más utilizados en clínica (Rankin y Kaye, 1990; González *et al.*, 1992; Mehta *et al.*, 1992; Mitsuhashi *et al.*, 1992; Ozols, 1992). Cabe señalar que fue modificada al adicionar la definición del antineoplásico y algunos ejemplos (McLaughlin, 1995; Hellman y Vokes, 1996).

Cuadro 1. Antineoplásicos mas utilizados en la clínica.

Clasificación	Agente	Mecanismo
Antimetabolitos: Compuestos que poseen una estructura molecular semejante a los metabolitos de la célula, pero capaces de interferir con las funciones de antimetabolitos propios.	Metotrexato, Citosina de Arabinosa (Ara-C), 6-mercaptopurina (6MP)	Inhiben enzimas que bloquean selectivamente las vías metabólicas.
Alquilates: compuestos que sustituyen átomos de hidrogeno por grupos alquilo.	Mecloretamina, Ciclofosfamida, Cisplatino, Clorambucil, Melfalán, Busulfan.	Producen modificaciones tanto estructurales como funcionales en el ADN.
Antibióticos: antitumorales: compuestos heterogéneos de origen bacteriano.	Bleomicina, Actinomicina D, Mitomicina C , Gramicidina D. Doxorubicina	Todos actúan a nivel de ADN, sus mecanismos de acción son muy variados
Alcaloides: sustancia orgánica nitrogenada, con propiedades alcalinas	Vincristina, Vinblastina, Vindesina	Inhiben la división célula, su efecto se debe a una alteración estructural y funcional del aparato mitótico.
Inhibidores de la topoisomerasa I: enzima intranuclear implicada en el desenrollamiento de las hebras de ADN	Topotecan e Irinotecan	Evita la replicación y transcripción del ADN.
Misceláneos:	Hexametilmelamina, Hidroxiurea y Procarbazina.	Los mecanismos de acción son variados.

Rankin y Kaye, 1990; González *et al.*, 1992; Mehta *et al.*, 1992; Mitsuhashi *et al.*, 1992; Ozols, 1992; McLaughlin, 1995; Hellman y Vokes, 1996.

Dentro de esta lista de antineoplásicos se utilizó la mitomicina C de la cual se dan algunas características a continuación.

1.4. Mitomicina C

La mitomicina C (MMC), (**figura 3**). Es un antibiótico aislado de *Streptomyces caespitosus* (Lown, 1979). La cual presenta actividad antitumoral, es muy tóxica. Se utiliza en clínica como tratamiento para los tumores de cervix, ovario, pecho, pulmón, estómago, páncreas, recto y colon (Crooke y Bradner, 1976; Carter y Crooke, 1979; Loebel y Spratto, 1986). La MMC se usa como testigo positivo en muchas pruebas toxicológicas donde se utilizan bacterias, cultivos celulares de linfocitos y fibroblastos entre otros, en donde actúa como agente alquilante mono-funcional (Orozco, 1993). Se conoce que la MMC es un agente alquilante del ADN e interactúa covalentemente con el ADN *in vitro* e *in vivo*, inhibe la síntesis de ADN ocasionando ruptura del ADN y Aberraciones Cromosómicas (AC) e induce la formación de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs) y Micronúcleos (MN) (Schale-Bartusiack *et al.*, 2002; Medina, 2005; Seutap *et al.*, 2005).

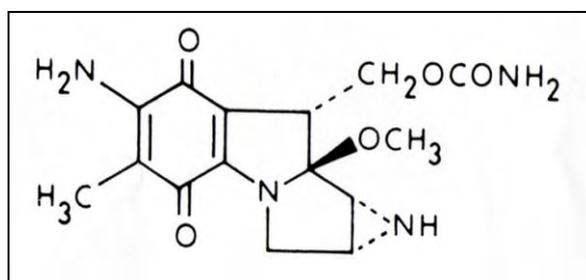


Figura 3. Estructura química de la Mitomicina C (Carter y Crooke, 1979)

Sin embargo el surgimiento de tumores refractarios a la combinación de estos tratamientos, los efectos tóxicos desagradables y los costos elevados de estos tratamientos, han promovido la búsqueda continua de moléculas que posean actividad antineoplásicas (Magrath, 1989; Boyd y Paull, 1995).

Personal de la Universidad Nacional Autónoma de México realizaron investigaciones con metales que pudieran tener efecto anticancerígeno entre ellos el cobre.

1.5. Cobre

El cobre es esencial para la sobre vivencia de plantas y animales, algunos estudios han mostrado que esta involucrado en la función de varias enzimas entre las que se incluyen la tirosina (implicada en la formación de la melanina) y varias oxidasas como citocromo oxidasa, super oxido dismutasa y amino oxidasa (Carson *et al.*, 1987, Olivares y Uauy 1996).

Algunos estudios confirman que este metal se requiere en cantidades apropiadas durante el crecimiento en mamíferos incluyendo el humano. En los niños para la maduración de células blancas y rojas, para dar la resistencia a los huesos, en el metabolismo del colesterol y la glucosa, el desarrollo del cerebro, entre otros. Por ello la Comisión de Alimentos y Nutrición de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América (1980), recomienda ingerir 0.5-1.0 mg/día los lactantes, 1.0-2.0 mg/día adolescentes y 2.0-3.0 mg/día adultos (Orten y Neuhaus, 1984)

Las condiciones ácidas del estomago facilitan la solubilidad del cobre permitiendo su paso a la sangre, en donde juega un papel importante en la incorporación de hierro en la hemoglobina. Reportando 93 a 108 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

como contenido normal de este metal en la sangre. Los casos de toxicidad por cobre en humanos son raros, se producen con la ingesta de dosis superiores a 10 mg/día, causando náuseas, vomito y diarrea (Stokinger, 1981; Furst *et al.*, 1998).

El cobre esta ampliamente distribuido en los alimentos pero es especialmente abundante en el hígado, riñón, yema de huevo, ostras y algunas legumbres. Debido a su abundancia en los alimentos, la deficiencia del cobre es poco frecuente en el ser humano. Si se presenta su deficiencia se produce la enfermedad de Menkes, en donde se ha observado que ocasiona alteraciones en desarrollo mental, anemia, leucocitopenia⁴, defectos óseos, y debilidad en las paredes intestinales, este padecimiento se debe a que la absorción o el transporte del metal son deficientes. Por otra parte el exceso de este metal ocasiona la enfermedad de Wilson, donde se acumula las concentraciones de cobre en el tejido hepático y cerebral (Orten y Neuhaus, 1984; Carson *et al.*, 1987; Olivares y Uauy, 1996; Mckee y McKee, 2003).

La actividad anticancerígena del cobre se reporto por primera vez en los años sesentas cuando se realizaron estudios con sales de este elemento empleadas como complemento diario en la dieta o el agua administrada a ratas o ratones sujetos a un tratamiento con carcinógenos químicos. Los resultados observados sugieren que el cobre es capaz de inhibir la acción carcinogénica de una amplia variedad de compuestos (Rojas, 1992).

Se ha reportado que los metales de transición entre ellos el cobre tiene la capacidad de intercalarse en el ADN con una gran afinidad y que la unión del cobre es selectiva sobre las células tumorales. Algunos estudios reportan

⁴ Reducción de la concentración de leucocitos en la sangre

que este elemento tiene efectos anticancerígenos, reducen el crecimiento y el tamaño de tumores malignos (Rojas, 1992).

Estas características llevaron a la selección del cobre como centro metálico para el diseño de nuevos compuestos antineoplásicos llamados Casiopeínas.

1.6. Casiopeínas

En busca de antineoplásicos menos tóxicos basados en metales, fue que se diseñaron y sintetizaron una mezcla de quelatos⁵ basados en cobre, dando como resultado los compuestos llamados Casiopeínas: una familia que comprende una serie de compuestos de coordinación de Cu^{2+} como centro metálico que en la esfera de coordinación, presenta un ligante bidentado neutro del tipo diiminas (N-N) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o donadores (O-O) (Ruiz *et al.*, 1993; Gracia-Mora *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2006).

Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran un potencial antineoplásico de las Casiopeínas al igual que el cisplatino en una gran variedad de líneas de células tumorales (De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2000; Gracia-Mora *et al.*, 2001).

Estos compuestos con las características descritas fueron diseñados por Lena Ruiz Azuara científica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y su grupo de trabajo. Marcando un avance en el camino de fármacos con actividad antineoplásica. Las Casiopeínas han sido sintetizadas y patentadas por dicha institución (Ruiz-Azuara, 1992).

⁵ Estructura molecular en la que los iones metálicos se hallan unidos a un compuesto orgánico bidentado por valencias residuales

A la fecha se han sintetizado aproximadamente 100 compuestos y algunos de ellos han mostrado actividad antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo*. (Bravo, 1997; Márquez, 2000; Romero, 2000; Trejo-Solís *et al.*, 2005). Se han seleccionado las más activas y menos tóxicas para realizar pruebas preclínicas. 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).

Actualmente 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).

Los trabajos realizados en esta fase llevo a la Dra. Lena Ruiz recibiera el premio Canifarma⁶ 2007, por sus trabajos orientados, a desarrollar los primeros fármacos producidos en México para combatir el cáncer con el proyecto "*Desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos: Casiopeínas. Evaluación preclínica*", elegido entre mas de 40 trabajos científicos de excelente calidad (Romero, 2008).

⁶ Galardón otorgado anualmente por la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica

Ventajas de las Casiopeínas con respecto a otros fármacos antineoplásicos

- ✓ Reduce costos, ya que el cobre es mucho más económico que el platino
- ✓ La aplicación de dosis es menor que otros antineoplásicos
- ✓ Tienen la misma o mayor actividad que otros anticancerígenos y una toxicidad mucho menor.
- ✓ Las Casiopeínas son los primeros anticancerígenos hechos en México (Pía, 2007).

1.7. Posibles Mecanismos de acción de las Casiopeínas

Los complejos mixtos de cobre denominados Casiopeínas interactúan preferentemente con Adenina, esta interacción es de tipo apilamiento, lo cual llevaría a pensar que estos complejos (si es que llegan íntegros al ADN) tendrán como mecanismo de acción el de intercaladores (Tovar *et al.*, 2004).

Se sugiere 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, como el radical hidroxilo o el ión súper oxido, las cuales pueden reaccionar con diferentes macromoléculas tales como los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos de la membrana; causando un daño oxidativo en el interior de la célula (Alemón *et al.*, 2007).

Debido a los escasos antecedentes de tipo general de la Casiopeína Igly nos dedicamos a estudiarla. La cual presenta las siguientes particularidades.

1.8. Casiopeína Igly

La fórmula química de la Casiopeína Igly es $[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolina}) (\text{glicina})] \text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (figura 4), tiene un peso molecular de 568.05 g/mol, es estable en estado sólido e inerte si se disuelve en etanol o dimetilsulfoxido (DMSO) o en etanol/agua (3:100), poco soluble en glicerol y tarda varios días en descomponerse. La concentración inhibitoria media (CI_{50}) es de 1.23 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para la línea celular CaLo^7 (Ruiz *et al.*, 1994; Márquez *et al.*, 2000a).

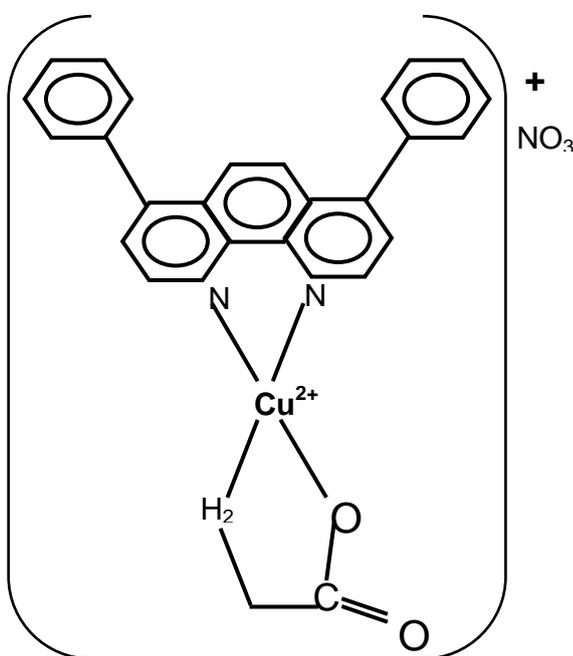


Figura 4. Estructura química de la Casiopeína Igly

1.9 Toxicología Genética

La Toxicología Genética es una disciplina científica que trata de identificar y analizar los mecanismos de acción y las propiedades de aquellos agentes

⁷ Células de carcinoma epidermoide no queratinizado, de morfología epitelial. Estadio II. Carcinoma Cérvico-Uterino Humano

físicos, químicos o biológicos que sean capaces de producir efectos tóxicos en el material genético de los seres vivos (Brusick, 1987).

A partir de esta definición la toxicología genética permite evaluar la habilidad de las sustancias químicas para inducir el cambio en el material hereditario de los organismos, mediante una variedad de tipos celulares. Desarrollando varias pruebas en las que se usan modelos biológicos *in vivo* e *in vitro*. Incluyendo bacterias, levaduras, hongos, cultivo de células de mamífero, células somáticas y germinales, de plantas superiores (Hoffmann, 1982; Roldán, 1992, Yüzbasioglu *et al.*, 2006).

Entre las pruebas para evaluar el daño al ADN se encuentran las AC Estructurales o Numéricas, ICHs y MN. Las dos primeras se aprecian en células en mitosis mientras que los Micronúcleos se observan en células en interfase que han pasado por al menos un ciclo de división. Estas pruebas, incluyendo las variantes que de estas se desprenden, pueden medirse en cultivo de células de mamífero, y tienen la finalidad de detectar la inducción de rompimientos en los cromosomas (efecto clastogeno) o alteraciones en la maquinaria del huso mitótico y/o desactivación del centrómero que conducen a un inadecuado reparto de material genético durante la división celular (efecto aneugénico) (Anderson, 1993; Obe *et al.*, 2002; Natarajan y Boei, 2003). Enseguida se definen los Micronúcleos.

1.10. Micronúcleos

Los Micronúcleos (MN) son cuerpos que contienen cromatina, representan fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros que no se incorporaron al núcleo al final de la mitosis (**figura 5**). Estas pequeñas formaciones nucleares se presentan además de los dos núcleos típicos que se forman en

la telofase. Habitualmente se forman a consecuencia de un retraso de un cromosoma en anafase o de fragmentos de cromosomas que no se han incluido en ninguno de los núcleos telofásicos (Schmid 1975; Tucker y Preston 1996).

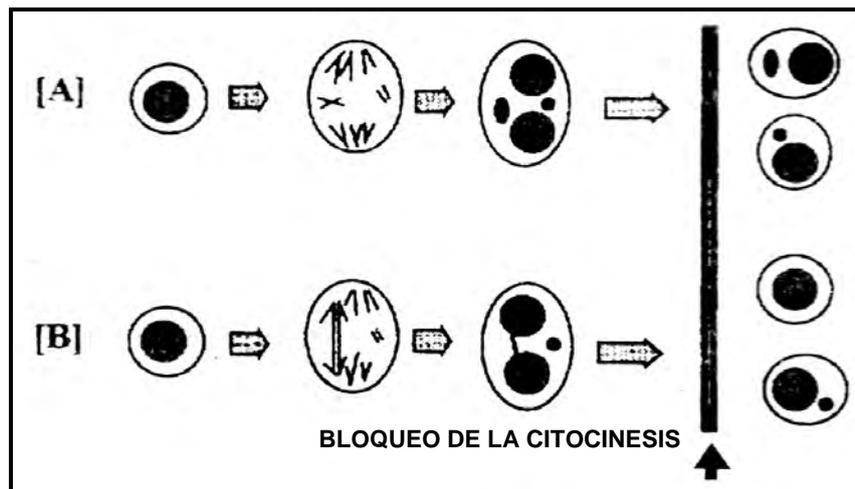


Figura 5. Diagrama ilustrativo de (A) Origen de MN por fragmentos acéntricos o cromosomas completos en células en división, (B) Origen de un puente nucleoplásmico o puente dicéntrico en una célula binucleada. (Fenech, 1997).

El uso de MN como una medición del daño cromosómico en linfocitos humanos fue propuesto por primera vez por Countryman y Heddle (1976), y subsecuentemente modificada por Fenech y Morley (1985) al bloquear la citocinesis con Citocalasina B (Cit-B), provén un método esencial para distinguir a las células que no se han dividido de las que han completado una división nuclear durante el cultivo *in vitro* (Parry *et al.*, 2002). Así se introdujeron a los linfocitos como un sistema celular útil, para la detección del daño cromosómico mediante la determinación de la producción de MN, recomendando a este sistema como biomarcador en diseños experimentales.

Las ventajas del ensayo son las siguientes: sensitivo, simple, reproducible, las células pueden ser contadas rápidamente, tiene una estadística poderosa ya que se cuentan muchas células, y evalúa clastogenicidad y/o aneugenicidad de xenobióticos además de ser un marcador de daño citogenético confiable (Kirsch-Volders, 1997; Miller *et al.*, 1997; Fenech, 2000; Pastor *et al.*, 2001; Mateuca *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2007). Este ensayo también da información para complementar resultados de genotoxicidad *in vitro* (Stopper *et al.*, 1997). Adicionalmente, la información obtenida por esta técnica puede ser extrapolada para predecir riesgos de salud en humanos (Sanjeeu *et al.*, 2006).

Desventajas: no permite determinar el tipo de aberración cromosómica (Surrallés y Natarajan, 1997).

Tipos celulares para el ensayo de Micronúcleos

El ensayo de MN se realiza en diferentes tipos celulares como son: células germinales (Lähdetie y Parvienen, 1981), Células del hígado fetal (Cole *et al.*, 1981), linfocitos (Fenech y Morley, 1985; Fenech y Crott, 2002), en eritrocitos policromaticos de Hamsters Chino, de ratas, ratones y de peces (Liu *et al.*, 1998; Sugher *et al.*, 2003; Trosic *et al.*, 2002; Ateeq *et al.*, 2002, Campana *et al.*, 1999), células de colon (Heddle *et al.*, 1983), y exfoliados de células que son obtenidos de numerososo tejidos, incluyendo mucosa bucal, bronquio, vejiga urinaria, uréter y estomago (Stich y Rosin, 1982).

A partir de los trabajos de Fenech 1997 y 2000, Fenech *et al.*, 2003 donde utiliza la técnica de bloqueo de citocinesis con citocalasina B, actualmente se consideran los siguientes criterios para evaluar MN y Puentes Nucleoplásmicos (PN). Los puentes nucleoplásmico son cromosomas

dicéntricos; es decir cromosomas con dos centrómeros que forman puentes de tensión en anafase cuando cada centrómero tiende a migrar a un polo diferente (Guízar-Vazquez, 1988; Fenech, 2000). Ahora bien en el **cuadro 2** se describen las características de la células binucleadas para este tipo de ensayo.

Cuadro 2. Características de las Células para el ensayo de Micronúcleos

Células binucleadas	Frecuencia de MN	Puentes Nucleoplásmicos
<ul style="list-style-type: none"> ➤ El citoplasma debe distinguirse claramente. ➤ Membrana citoplasmática y nuclear intactas. ➤ Núcleos con similar grado de condensación de cromatina, igual tamaño, forma (ovalados) y patrón de tinción. ➤ Ninguno de los núcleos debe encontrarse en etapa de apoptosis. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se observar en células binucleadas. ➤ Los núcleos no pueden estar unidos por puentes nucleoplásmicos. ➤ El diámetro del MN no debe ser menor a 1/3 de los núcleos. ➤ El MN debe ser oval o redondo, teñido similar a los núcleos y separado de estos. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se observan en células binucleadas. ➤ La amplitud del puente varia pero usualmente no excede 1/4 parte de los núcleos. ➤ Deben tener la misma tinción que los núcleos.

Fenech 1997 y 2000, Fenech *et al.*, 2003

1.11. Linfocitos como sistema de prueba

En la sangre hay diferentes tipos de células con funciones diversas, todas se forman por el tejido hematopoyetico en médula ósea. Esta célula madre hematopoyética (ó formadora de sangre) es por lo tanto pluripotencial, ya

que da lugar a distintos tipos de células sanguíneas diferenciadas. Las células sanguíneas se pueden clasificar en eritrocitos (rojas) y leucocitos (blancas). Los glóbulos blancos en base a su aspecto microscópico se clasifican en granulocitos, monocitos y linfocitos (**figura 6**). Con respecto a los linfocitos hay de dos tipos B y T. Los linfocitos B fabrican anticuerpos, su concentración en la sangre es de 2×10^9 . Los linfocitos T matan células infectadas por virus y regulan la actividad de otros glóbulos blancos, la concentración en la sangre es de 1×10^9 . Presentan una vida media de 2-4 años lo que permite que acumule daño al ADN, estado definido el ciclo celular G₀, baja actividad de reparación (Alberts, *et al.*, 2002)

Al presentar estas características ha permitido realizar una gran variedad de análisis, como AC, ICHs, asociación de satélites (AS), cinética de división celular (CDC), MN, mutaciones puntuales (MP) (Evans y O'Riordan, 1975; Natarajan y Obe, 1982; Albertini *et al.*, 1982; Celik *et al.*, 2004). Esto llevo a que el cultivo de linfocitos humanos sea un modelo biológico ampliamente empleado en ensayos citogenéticos (Evans *et al.*, 1979; Roldán y Altamirano, 1990; Tucker y Preston 1996; Albertini *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2004). Donde se puede evaluar la genotoxicidad *in vitro* ya que da información para posibles efectos tóxicos de compuestos farmacéuticos (Castell y Gómez-Lechón, 1997).

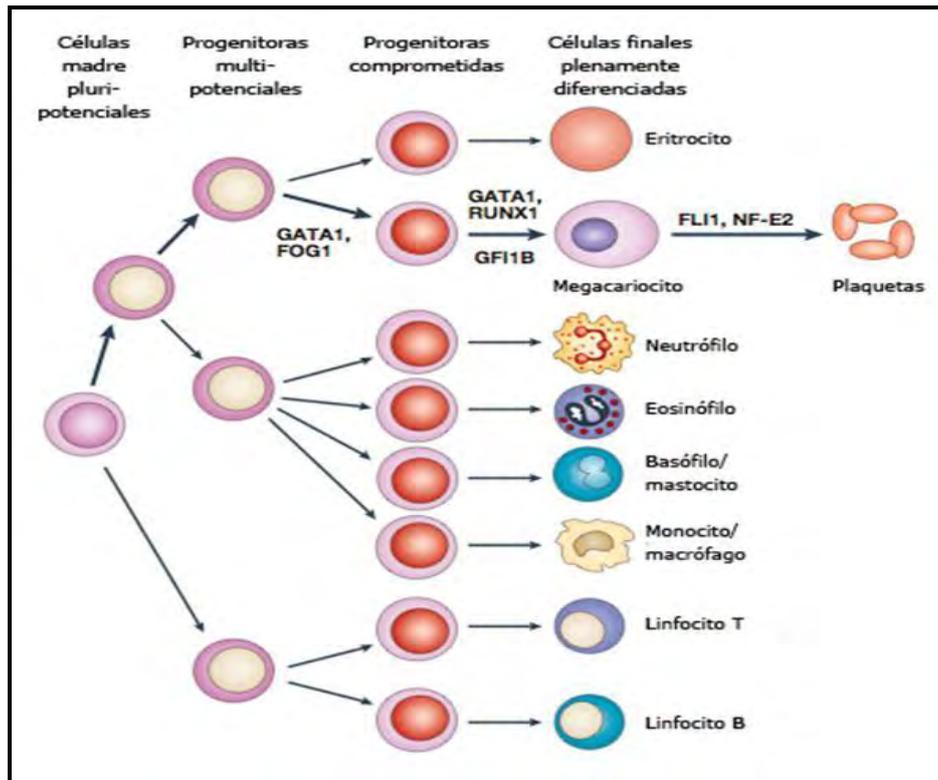


Figura 6. Hematopoyesis (www.down21.org/salud/salud/leucemia_sd.htm)

El cultivo de linfocitos es utilizado en pruebas de genotoxicidad como las AC, ICHs y AS entre otros. A continuación se dan algunas características de la colchicina ya que es un compuesto que inhibe la formación del huso mitótico, permitiendo observar células en metafase ya que para estas pruebas se necesitan células en esta etapa del ciclo celular.

Colchicina

La colchicina es un alcaloide derivado del azafrán silvestre y utilizada como planta medicinal para el tratamiento de la gota desde la época de los antiguos egipcios. En la figura 7 se muestra la estructura de la colchicina, la cual es utilizada en laboratorio para estudios de citogenética donde se necesita evaluar células en metafase. Ya que la colchicina envenena el extremo de un microtúbulo donde se encuentra la tubulina y cada molécula

de colchicina se une fuertemente a una molécula de tubulina evitando que no se forme el huso mitótico en las células tratadas con bajas concentraciones de colchicina (Klug y Cummings, 1999; Alberts *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 2002). Este es solo un compuesto que afecta a la célula, dentro de una gran variedad. En este trabajo utilizamos otro compuesto que afecta a los microfilamentos de la célula para ello, primero se mencionara los tipos de filamentos que existen en el citoesqueleto de la célula.

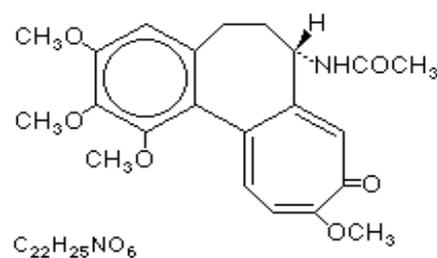


Figura 7. Estructura química de la colchicina (www.med.javeriana.edu.com)

1.12. Citoesqueleto

El citoesqueleto es una estructura sumamente dinámica que se reorganiza continuamente mientras que la célula cambia de forma, se divide y responde a su entorno, también se conoce con el nombre de citomusculatura. La capacidad de adoptar una gran variedad de formas y llevar acabo movimientos direccionales y coordinados depende de una red compleja de filamentos proteicos que extienden a través del citoplasma. Las diversas actividades del citoesqueleto se dividen en tres tipos de filamentos proteicos: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios además de una red microtubular (Lodish *et al.*, 2002; Jiménez y Merchant, 2003)

Microtúbulos: son estructuras tubulares largas y huecas más rígidas que los filamentos de actina, tienen un diámetro de 25 nm. Están constituidas por unidades de tubulina, intervienen en el movimiento de los cromosomas. Son sensibles a temperatura, presión y drogas como la colchicina, vinblastina y taxol. Se consideran los organizadores primarios del citoesqueleto (Lodish *et al.*, 2002; Jiménez y Merchant, 2003).

Presentan estructuras polares con un extremo más (+) que es capaz de crecer a gran velocidad mientras que el otro extremo menos (-) tiene tendencia a perder subunidades si no está estabilizado. En la mayoría de las células el extremo menos está estabilizado mediante la unión a una estructura que recibe el nombre de centrosoma y los extremos más están libres para añadirse a moléculas de tubulina (Lodish *et al.*, 2002; Jiménez y Merchant, 2003).

Red microtubular: emerge a partir del centrosoma, constantemente forma nuevos microtúbulos que reemplazan a los viejos que se han despolimerizado, es parte de la materia básica del citoplasma, sirve como soporte e interconexión a diversos organelos del citoplasma (Lodish *et al.*, 2002; Jiménez y Merchant, 2003)

Filamentos intermedios: estructuras parecidas a cuerdas que tienen un diámetro de 8-10 nm y están formados por diversas proteínas como queratina, vimentina, desmina etc. Uno de los tipos de filamentos intermedios forma una red llamada lámina nuclear. Otros filamentos intermedios se extienden a lo largo del citoplasma proporcionando a las células resistencia mecánica. Se encuentran entre los finos filamentos de actina y el de los gruesos filamentos de miosina (Lodish *et al.*, 2002; Jiménez y Merchant, 2003).

Filamentos de actina o microfilamentos: son polímeros helicoidales enroscados de dos en dos tienen un diámetro de 5-9nm y estructuras flexibles, formados por la proteína actina, están dispersos por el citoplasma de la célula pero altamente concentrados por debajo de la membrana citoplasmática especialmente para que se lleven a cabo los movimientos en la superficie celular (Lodish *et al.*, 2002; Jiménez y Merchant, 2003).

Tienen una estructura polar con dos extremos distintos, un extremo menos (-) relativamente inerte y de crecimiento lento y un extremo más (+), de crecimiento rápido. Son sensibles a drogas como la faloidina y **citocalasina** las cuales alteran su distribución, grado de polimerización y están involucrados en procesos de motilidad celular y movimiento intracelular (Lodish *et al.*, 2002; Jiménez y Merchant, 2003).

Las citocalasinas son productos sintetizados por hongos, que impiden la polimerización de la actina ya que se une al extremo más de actina. Se ha demostrado que esta sustancia inhibe diversas actividades celulares en la que participan algunos tipos de microfilamentos por ejemplo la contracción del músculo liso, el latido de las células cardíacas, la migración celular, la citocinesis, la endocitosis, la exocitosis entre otros (Lodish *et al.*, 2002; Jiménez y Merchant, 2003).

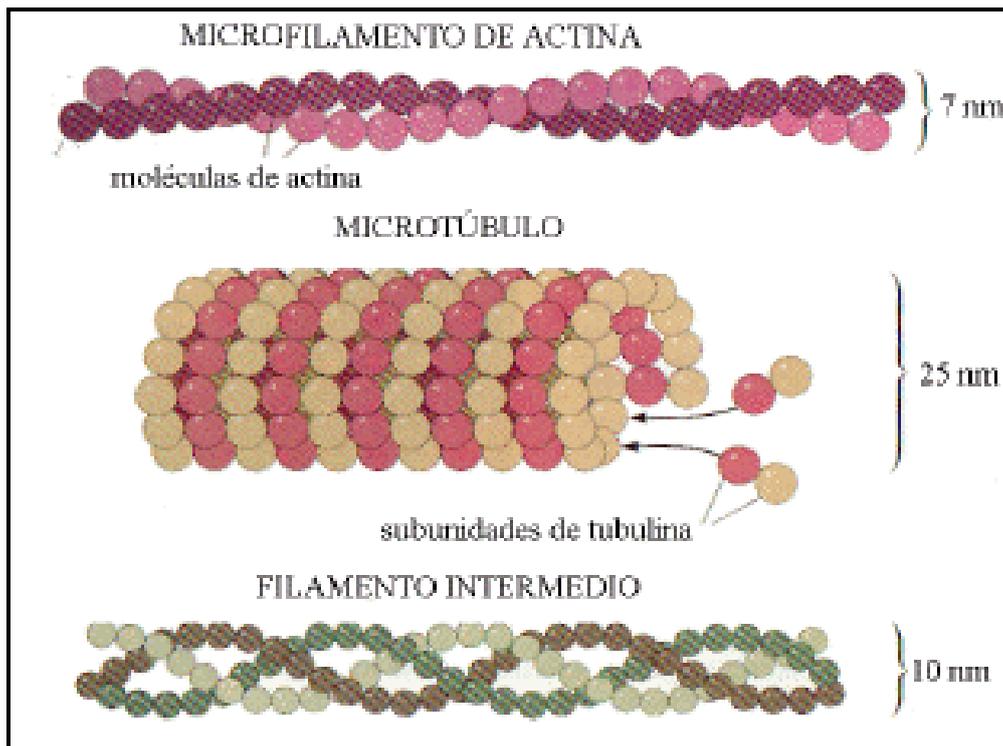


Figura 8. Filamentos del citoesqueleto
(www.bioitj.blogspot.com/2007/04/citoesqueleto.html)

Citocalasina B

La citocalasina B (Cit-B) es metabolito extraído del un hongo del genero *Drechslera* (*Heiminthosporium* anteriormente) *dematioidea*. Es un potente inhibidor de la polimerización de la actina. La actina es necesaria al final de la telofase, durante la citocinesis, para formar el anillo contráctil de actina y miosina que terminara por dividir a la célula en dos células hijas. Así las células divididas una vez tendrán una apariencia binucleada (Evans, 1997; Sigma-Aldrich, 2008-2009).

Perturba la disposición regular de los microfilamentos asociados con algunas de estas funciones por ejemplo el anillo contráctil de los microfilamentos observados durante la citocinesis también llamada clivaje celular. Los

microfilamentos sensibles a la Citocalasina B constituyen la maquinaria contráctil de las células no musculares (Robertis *et al.*, 1978).

La citocalasina afecta solo a la citocinesis que forma parte de la mitosis, pero no a la contracción muscular, ya que esto no implica polimerización-despolimerización de la actina (Jiménez y Merchant, 2003).

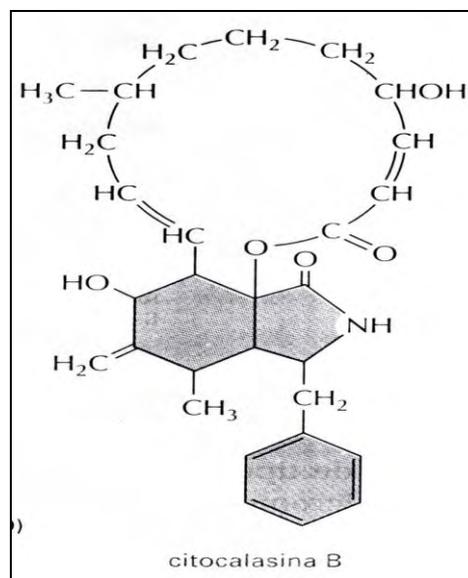


Figura 9. Estructura química de la Citocalasina B (Alberts *et al.*, 2002)

III. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo tiene el propósito de contribuir al avance de medicamentos con actividad antineoplásica como es el caso de la Casiopeína Igly la cual se encuentra en fase preclínica. Por lo tanto se deben realizar estudios de toxicidad ya que son necesarios y tienen gran importancia en los programas de identificación y elección de los fármacos a desarrollar, por tal razón, deben de ser aplicados a todos los compuestos químicos que presentan un interés terapéutico. Por ello se realizaron estudios de genotoxicidad donde se evalúa la frecuencia de MN, debido que es una prueba que se utiliza en el desarrollo de fármacos.

Estas evaluaciones también son importantes ya que todos estamos expuestos a padecer algún tipo de cáncer, además que apoya la investigación en un fármaco mexicano lo cual es interesante debido a que es el primero en la gran lista de compuestos antineoplásicos, que pretenden ser más accesibles para la población afectada y de pocos recursos.

IV. HIPÓTESIS

Las Casiopeínas son una familia que comprende una serie de compuestos de coordinación de Cu^{2+} , creadas a partir de la geometría química del Cisplatino. Y han mostrado actividad antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto sí la Casiopeína Igly presenta como centro metálico al cobre, que es un elemento que utiliza el hombre como micronutriente, entonces ocasionará menor daño al ADN, que otros agentes antineoplásicos que no presentan esta característica, daño que se manifestará en forma de Micronúcleos (MN).

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar las actividades citotóxica, citostática y genotóxica de la Casiopeína Igly en cultivo de linfocitos humanos.

OBJETIVO PARTICULARES:

- Evaluar la actividad citotóxica de la Casiopeína Igly por medio del índice de proliferación en células con bloqueo de la citocinesis (IPBC) en las mismas condiciones.
- Evaluar la actividad citostática de la Casiopeína Igly por medio del porcentaje de células polinucleadas bajo las mismas condiciones.
- Evaluar la inducción de MN por la Casiopeína Igly con las tres diferentes concentraciones elegidas a partir de la curva dosis respuesta.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de Linfocitos Humanos

Siembra

Al medio de cultivo RPMI-1640 de 100ml se le adiciona 0.5ml de fitohemaglutinina se agita y en tubos se colocan 5ml del mismo. Posteriormente se extrae sangre periférica 5ml con una jeringa heparinizada, agregar 1ml de sangre en cada tubo, enseguida se incuban a 37°C por 72 hrs.

Tratamientos

Para obtener la curva dosis-respuesta de la Casiopeína Igly en función del índice mitótico los cultivos fueron tratados a las 44 hrs con la Casiopeína Igly en las siguientes concentraciones 0.41, 0.615, 1.23, 2.46, 3.69, 4.92 µg/ml al testigo positivo se le adiciono MMC, a una concentración de 0.2 µg/ml; al testigo negativo no se adiciona nada. A las 70 hrs de iniciado los cultivos, se adiciono la colchicina (concentración final de 4 µg/ml). Al cumplir las 72 hrs se lleva acabo la cosecha. Las concentraciones elegidas de la Casiopeína Igly se escogieron a partir de la CI_{50} con la línea CaLo (Márquez *et al.*, 2000a). Todos lo tratamientos se realizan por duplicado y con dos repeticiones.

Cosecha

Consistio en centrifugar a 1500 revoluciones por minutos (rpm) por 5 minutos (min) las muestras, pasado el tiempo se elimina el sobrenadante, al paquete celular se le adiciono 5ml de solución hipotónica KCL 0.075M a 37°C y se dejo incubar por 20 min, posteriormente se fijan las células. En este paso al paquete celular se le adiciono 5ml de solución fijadora (metanol-acido acético 3:1 frío) y se dejo ahí por 10 minutos, cumplido el tiempo se elimina el sobrenadante (centrifugando los cultivos a 1500 rpm), y nuevamente se repite la operación para lavar del paquete celular hasta que el botón se limpio, una vez logrado esto, se re suspende en 0.5ml del fijador, y se elaboran las laminillas por goteo.

Preparación de laminillas

El goteo del botón celular se realiza en laminillas limpias, desengrasadas, frías y marcadas se realiza a 30 cm mínimo de distancia y se dejan secar al aire.

Tinción

Las laminillas se introducen en Giemsa al 10% durante 15 min. Después se lavan a chorro de agua de la llave y dejan secar al aire. Por último se realizan las observaciones en el microscopio de campo claro con un aumento de 40x para evaluar el índice mitótico.

Técnica de Micronúcleos *in vitro* con bloqueo de la citocinesis

Se realiza la **siembra** de los linfocitos de la manera descrita anteriormente. Los cultivos de linfocitos fueron tratados a las 44 hrs después de la siembra con las concentraciones 0.615, 1.23 y 2.46 µg/ml de Casiopeína Igy, como testigo positivo 0.2 µg/ml de MMC. A las 48 hrs se adiciona 6 µg/ml de Citocalasina B (Cit-B), también se contó con un testigo negativo, al completarse las 72 hrs de la siembra se realizó la cosecha.

En la **cosecha** los cultivos se centrifugan a 1000 rpm por 10 min pasado el tiempo se elimina el sobrenadante, quedando el paquete celular al cual se le dio un choque hipotónico con 5ml de solución KCL 0.075M por 10 min a 37°C. Posteriormente se centrifugan nuevamente a 1000 rpm por 10 min y se elimina el sobrenadante y, enseguida se realizó la fijación con 5ml de solución de metanol-ácido acético en una proporción 3:1 frío, efectuando dos cambios a los 15 y 10 min respectivamente. Al término de estas fijaciones se realizaron lavados del paquete celular con una solución fijadora de metanol-acético en proporción 85:15, hasta que el paquete celular quede limpio. En seguida, se resuspende el paquete el 0.5ml de la misma solución y se procedió al goteo de las laminillas.

El goteo se realizó a una distancia no mayor a 10cm y tres laminillas por tratamiento de cada experimento, estas se dejan secar al aire. Finalmente se realizó la tinción la cual es doble primero con el colorante May-Grünwald en una relación 2:1 por 6min se lavaron y dejaron secar, la segunda tinción se hace con Giemsa al 10% durante 15 min nuevamente se lavan y dejan secar. Una vez teñidas se realizaron las observaciones en el microscopio de campo claro con un aumento de 40x para la evaluación del porcentaje de células en división y con el aumento de 100x para la evaluación del porcentaje de puentes nucleoplásmicos y porcentaje de micronúcleos. Cabe señalar que se realizaron tres experimentos independientes cada uno con su duplicado.

Evaluaciones y análisis estadístico

Evaluación del Índice Mitótico

Para el índice mitótico (IM), se deben contar 1000 células por tratamiento como mínimo, en el microscopio óptico, con el objetivo de 40x, contando las células en división distinguiéndolas de la que se encontraban en interfase para aplicar la siguiente formula:

$$IM = (N^{\circ} \text{ de célula en división} / N^{\circ} \text{ total de células}) (100)$$

El análisis estadístico consistió en aplicar la prueba "Z" para proporciones (Z/proporciones).

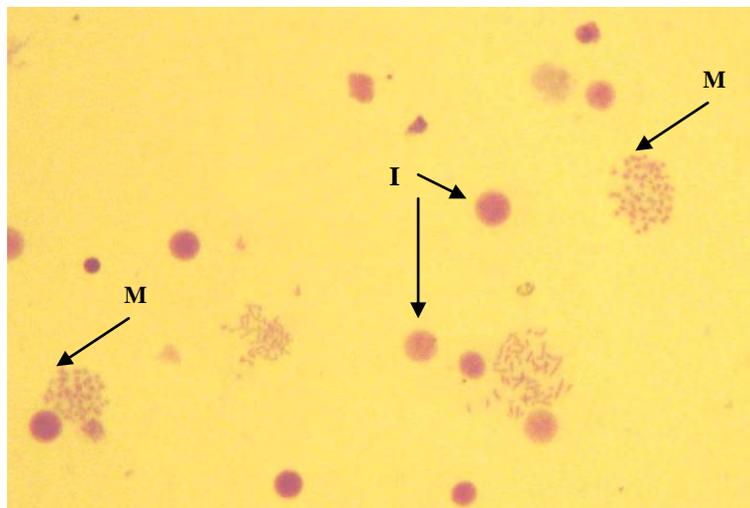


Figura 10. Microfotografía de células en **metafase (M)** e **interfase (I)** de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly (40x).

Con el ensayo de MN se pueden evaluar parámetros para conocer la citotoxicidad, genotoxicidad y citostaticidad entre ellos índice de Proliferación en células con Bloqueo de la de la Citocinesis (IPBC), porcentaje de MN, porcentaje de Puentes Nucleoplásmicos, y porcentaje de células en división respectivamente.

Evaluación del Índice de Proliferación en células con Bloqueo de la Citocinesis (IPBC)

Se calculo con los datos obtenidos de la lectura de 500 células polinucleadas como mínimo tal como lo reporta Surrallés *et al.*, 1995 y utilizando la siguiente formula:

$$\text{IPBC} = (1 \cdot M1) + (2 \cdot M2) + (3 \cdot (M3 + M4)) / \text{Total de células polinucleadas}$$

El análisis estadístico consistió en aplicar la prueba estadística de Ji cuadrada con corrección de Yates (χ^2 y).

Evaluación del porcentaje de células polinucleadas

Se obtiene a la par con las células polinucleadas contadas para el IPBC. Se le aplicó la prueba estadística Z para proporciones

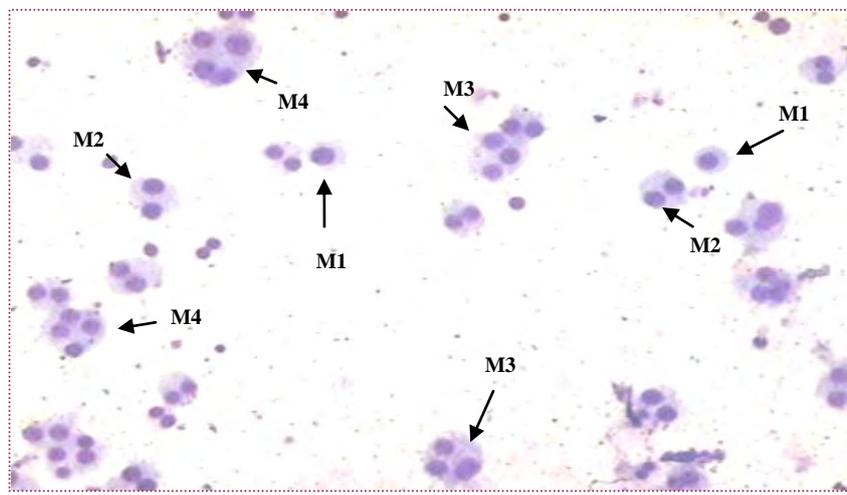


Figura 11. Microfotografía de células polinucleadas de linfocitos humanos con inhibición de la citocinesis con citocalasina B, tratados con Casiopeína Igly M1: célula mononucleada, M2: célula binucleada, M3: célula trinucleada, M4: célula tetranucleada (40x).

Evaluación del porcentaje de MN

Se evaluó utilizando los criterios descritos en el cuadro 2. Donde se registraron al menos 1000 células binucleadas al azar, considerando las que presentaban MN y las que no los presentaban por cada tratamiento. La lectura de laminillas se hace en un microscopio de campo claro con el objetivo de 100X. La prueba estadística aplicada fue (χ^2 y).



Figura 12. Microfotografía de célula binucleada con micronúcleo en linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly e inhibición de la citocinesis (100x).

Evaluación del porcentaje de Puentes Nucleoplásmicos (PN)

Se obtuvo con el registro de 1000 células binucleadas al azar, considerando las que presentaban PN y las que no, de acuerdo con las características mencionadas en el cuadro 2, por cada tratamiento. La lectura de laminillas se hace en un microscopio de campo claro con el objetivo de 100x. La prueba estadística aplicada es la misma de MN (χ^2).

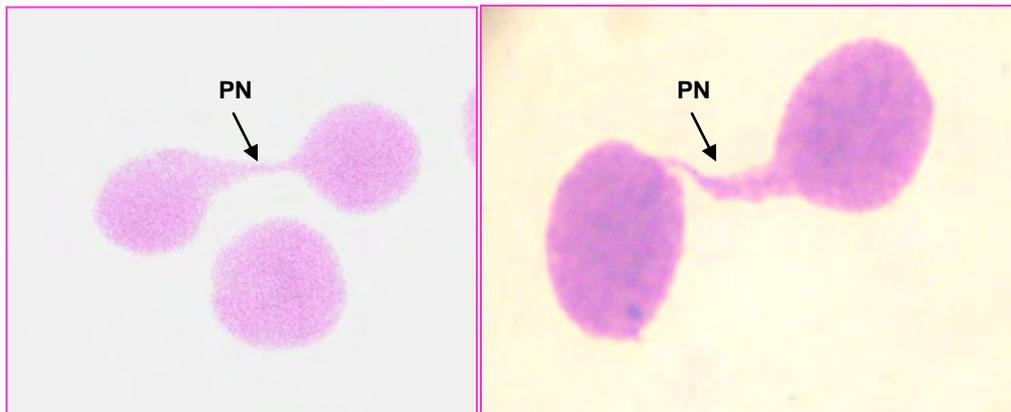


Figura 13. Microfotografía de PN en linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly (100x).

VII. RESULTADOS

Los distintos parámetros citogenéticos evaluados para conocer el efecto de la Casiopeína Igly en linfocitos humanos *in vitro* fueron porcentaje de MN, PN y células en división e IPBC. El IM se utilizó para obtener la curva dosis respuesta de la Casiopeína Igly. Se partió de la concentración inhibitoria media para la línea celular CaLo (1.23 $\mu\text{g/ml}$). De ahí se selecciono una concentración inferiores que corresponden a un 1/3 y el doble de la CI_{50} . Cabe señalar que el experimento se realizo dos veces cada uno con su duplicado (los resultados no se muestran).

En la **figura 14** se presentan los resultados del porcentaje de MN, donde se puede apreciar que al aumentar la concentración de la Casiopeína Igly la presencia de MN lo hace de la misma manera es decir hay un efecto dosis-respuesta. Este efecto tiene una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0005$) respecto al testigo negativo en todas las concentraciones. La presencia de MN nos esta indicando que hay un efecto genotóxico al igual que los PN los que se muestran en la figura 15.

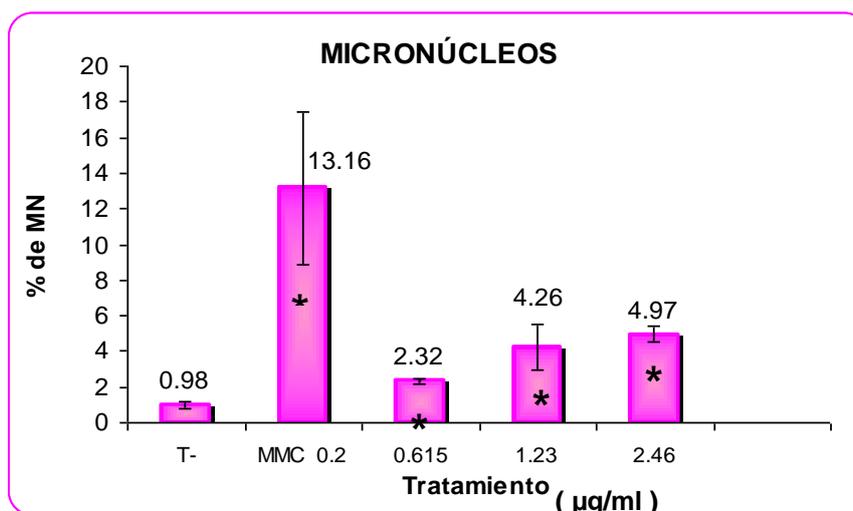


Figura 14. Porcentaje de micronúcleos en linfocitos humanos *in vitro* con bloqueo de la citocinesis tratados con Casiopeína Igly. Promedio de 3 experimentos independientes con su duplicado. * $p < 0.0005$ (X^2) VS Testigo negativo.

La **figura 15** muestra los resultados de la evaluación del porcentaje de PN donde se aprecia que tiende aumentar la presencia de estos conforme se incrementa la concentración de la Casiopeína Igly. Este aumento de PN es significativo con respecto al testigo negativo ($p < 0.0005$, $p < 0.001$, $p < 0.005$) en todas las concentraciones. Además se puede apreciar que también presenta un efecto dosis-respuesta lo mismo que sucede en el porcentaje de MN.

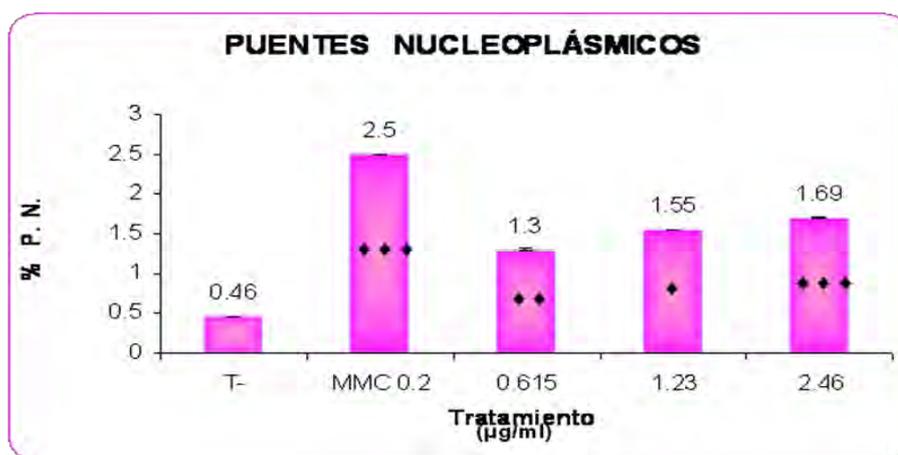


Figura 15. Porcentaje de puentes nucleoplásmicos en linfocitos humanos *in vitro* con bloqueo de la citocinesis tratados con Casiopeína Igly. Promedio de 3 experimentos independientes con su duplicado.
 ◆◆◆ $p < 0.0005$, ◆◆ $p < 0.001$, ◆ $p < 0.005$ (X^2) VS Testigo negativo.

En el cuadro tres se muestra el porcentaje células polinucleadas a partir de linfocitos en cultivo tratados con Casiopeína Igly y con bloqueo de la citocinesis. Donde se nota que a todas las concentraciones es más difícil que la célula se divida ya que en cada tratamiento el porcentaje de células mononucleadas aumenta de forma significativa en relación al testigo negativo ($p < 0.05$). Lo que nos está indicando que la mayoría de células se están quedando sin dividir, es decir un porcentaje menor en relación al testigo se está dividiendo, lo cual se puede constatar en el porcentaje de células bi, tri y tetranucleadas. Esto quiere decir que la Casiopeína Igly

tiene un efecto citostático pero éste, no indica un comportamiento dosis-respuesta. Sin embargo nuevamente se manifiesta la actividad citostática de la familia de las Casiopeínas que las caracteriza y que ha sido mostrada en diferentes sistemas de prueba.

Porcentaje de Células Polinucleadas				
Tratamiento $\mu\text{g/ml}$	%Mononucleadas	%Binucleadas	%Trinucleadas	%Tetranucleadas
T-	45.89	39.35	6.53	8.2
MMC 0.02	74.67*	29.54*	1.71*	0.96*
0.615	53.63*	37.37	4.46*	4.2*
1.23	71.89*	27.35*	0.64*	0.35*
2.46	78.27*	21.33*	0.31*	0.09*

Cuadro 3. Porcentaje células polinucleadas de los linfocitos en cultivo tratados con Casiopeína Igly. Promedio de 3 experimentos independientes con su duplicado. * $p < 0.05$, Z p/proporciones.

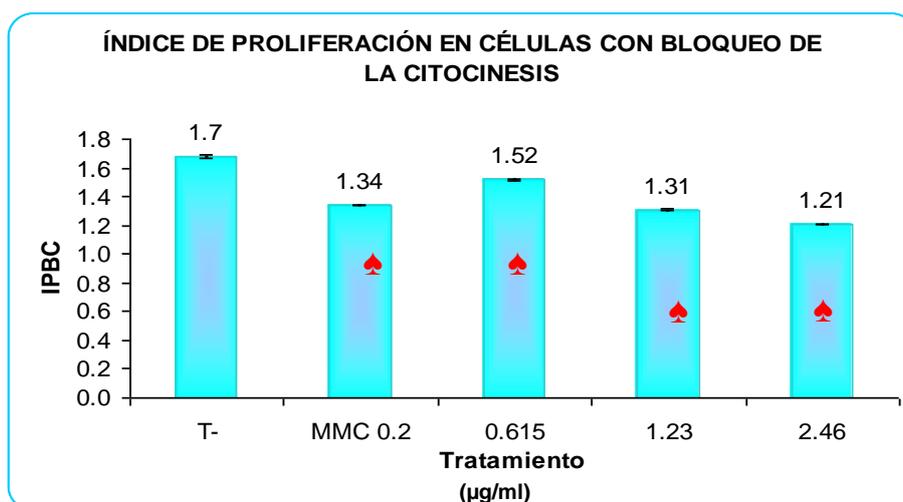


Figura 16. Índice de Proliferación Celular con Bloqueo de la Citocinesis (IPBC) en linfocitos humanos *in vitro* tratados con Casiopeína Igly. Promedio de tres experimentos independientes con su duplicado. * $p < 0.0005$ VS Testigo negativo (χ^2).

La **figura 16** representa el IPBC (Índice de Proliferación Celular con Bloqueo de la Citocinesis), del promedio de tres experimentos, donde se observa que al aumentar las concentraciones de la Casiopeína Igly tiende a disminuir el IPBC significativamente ($p < 0.0005$) con respecto al testigo negativo en todas las concentraciones, presentado un comportamiento inverso dosis-respuesta.

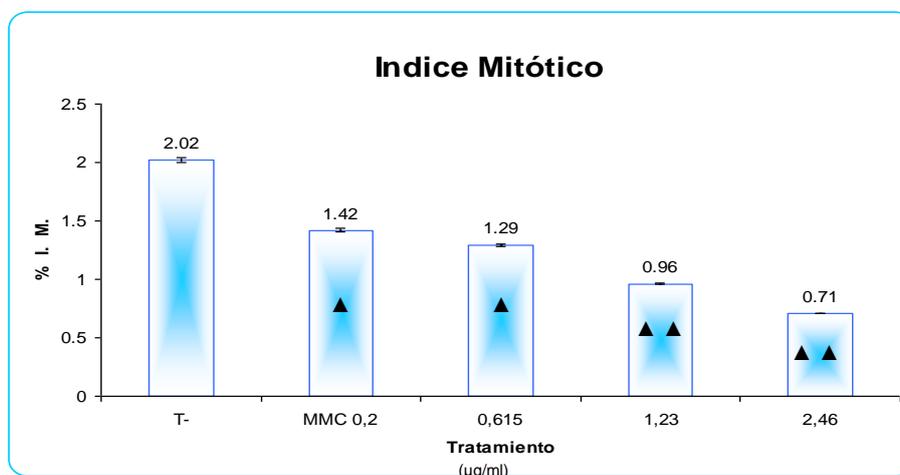


Figura 17. Índice Mitótico de linfocitos humanos *in vitro* con inhibición de la citocinesis, tratados con Casiopeína Igly. Promedio de tres experimentos independientes. ▲ $p < 0.01$, ▲▲ $p < 0.002$ VS Testigo negativo, Z p/ proporciones.

La **figura 17** muestra el IM evaluado en las laminillas del ensayo de MN linfocitos humanos *in vitro* tratados con Casiopeína Igly ya que se encontraron células en metafase sin haber adicionado colchicina.

Así en esta gráfica se puede ver que al aumentar la concentración de la Casiopeína Igly, el índice mitótico disminuye significativamente ($p < 0.01$, $p < 0.002$) comparada con el testigo negativo.

El cuadro 4 resume los resultados obtenidos de todos los parámetros evaluados a partir del ensayo de MN de manera conjunta. Para observar el promedio de tres experimentos independientes más-menos su desviación estándar ($X \pm D.S.$) del porcentaje de MN, de PN, IBPC e IM y el total de células leídas para cada uno de estos.

Cuadro 4. Resumen de los resultados del Promedio de MN, PN, IPBC e IM en el ensayo de Micronúcleos en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly.

Tratamientos		MN	PN	IPBC	IM	Células Contadas para			
($\mu\text{g/ml}$)	(hrs)	($X \pm DS$)	($X \pm DS$)	($X \pm DS$)	($X \pm DS$)	MN	PN	IPBC	IM
Testigo (-)		0.98 \pm 0.23	0.46 \pm 0.03	1.68 \pm 0.42	2.48 \pm 1.61	6,077	6,646	3,239	6,235
Testigo (+)	44	13.02 \pm 4.25*	2.50 \pm 0.69***	1.34 \pm 0.20	1.43 \pm 1.15 \blacktriangle	5,563	6,233	3,085	6,414
MMC 0.2									
Cas Igly									
0.615	"	2.32 \pm 0.19 *	1.30 \pm 0.29**	1.52 \pm 0.36 \blacktriangle	1.29 \pm 0.84 \blacktriangle	6,104	6,245	3,103	6,273
1.23	"	4.26 \pm 1.29*	1.55 \pm 0.08 \blacktriangle	1.31 \pm 0.17 \blacktriangle	0.96 \pm 0.38 $\blacktriangle\blacktriangle$	6,172	6,164	3,114	6,119
2.46	"	4.97 \pm 0.41*	1.69 \pm 0.61***	1.21 \pm 0.08 \blacktriangle	0.56 \pm 0.14 $\blacktriangle\blacktriangle$	5,146	5,077	3,146	5,603
Citocalasina B	48								

* $p < 0.0005$, *** $p < 0.0005$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.005$, \blacktriangle $p < 0.0005$ VS Testigo negativo, (χ^2).

\blacktriangle $p < 0.01$, $\blacktriangle\blacktriangle$ $p < 0.002$ VS Testigo negativo, (Z p/proporciones).

VIII. DISCUSIÓN

De acuerdo con los objetivos planteados del presente trabajo, se evaluó el efecto de la Casiopeína Igly en linfocitos humanos *in vitro* con las concentraciones 0.615, 1.23, 2.46 $\mu\text{g/ml}$, mediante el porcentaje de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y células polinucleadas; índice mitótico, e índice de proliferación en células con bloqueo de la citocinesis.

Citotoxicidad

Se entiende por citotóxico a aquel agente o proceso que citotóxico a las células, lo cual significa que suprime las funciones de las células o le provoca la muerte (Reiger y Green 1982). En el ensayo de MN se utiliza el Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis como parámetro de citotoxicidad, Pastor *et al.*, 2001 y Díaz, *et al.*, 2007, señalan que si un agente físico o químico presenta citotoxicidad se reflejará en la disminución de este parámetro ya que indica que se detiene el ciclo celular. De acuerdo con estos autores y los resultados presentados en la **figura 16** se observó que el IPBC tiende a disminuir significativamente con el testigo negativo ($p < 0.0005$) al aumentar la concentración de la Casiopeína Igly por lo tanto se ve reflejado el efecto citotóxico que presenta la Casiopeína Igly en los linfocitos humanos *in vitro* a las concentraciones de 0.615, 1.23 y 2.46 $\mu\text{g/ml}$.

Por otra parte se ha señalado que el análisis del Índice Mitótico pone al descubierto la existencia de aquellas alteraciones que entorpecen la progresión del ciclo celular. Una disminución del índice mitótico, es consecuencia de una reducción en el promedio de las células en división, la cual puede ser ocasionada por la pérdida permanente de la capacidad para proliferar, que finalmente conduce a la muerte celular o citotoxicidad (Roldán y Altamirano 1990; Rodríguez, 2001).

Para ello se evaluó el IM en el ensayo de MN debido a que se encontraron metafases, lo cual no se esperaba, ya que no se adiciono un veneno del huso mitótico (colchicina y/o colcemida) para obtener células en esta fase de la división (metafases) ver **figura 17**. Cabe señalar que la OECD⁸ tiene lineamientos para la prueba de micronúcleos *in vitro* donde menciona que la frecuencia de mitosis puede ser utilizado para evaluar toxicidad siempre y cuando no se le haya adicionado citocalasina B, en estos casos se debe utilizar el parámetro de IPBC y con ello se da la pauta para entender que si se pueden observar células en mitosis pero no se toman en cuenta (OECD, 2007).

Aun con los lineamientos de la OECD se evaluó el IM en el ensayo de MN ya que Evans, (1997), Jiménez y Merchant, (2003) y Sigma-Aldrich, (2008-2009), señalan que la citocalasina B solo afecta a la citocinesis en la polimerización de la actina, que es necesaria al final de la telofase, durante la citocinesis, para formar el anillo contráctil de actina y miosina que terminara por dividir a la célula en dos células hijas. Además pone de manifiesto que la Casiopeína Igly en los cultivos de linfocitos humanos no tiene un efecto mitogénico ya que no estimula la división celular, ya que al

⁸ Organización de Economía y Cooperación al Desarrollo

augmentar la concentración de la Casiopeína Igly el IM tiende a disminuir de manera significativa comparada con el testigo negativo ($p < 0.01$) ver figura 17, y muestra al mismo tiempo la citotoxicidad de la Casiopeína Igly con la disminución de este parámetro.

Con los resultados obtenidos de IPBC e IM de los linfocitos humanos *in vitro* tratados con Casiopeína Igly a las concentraciones de 0.615, 1.23, 2.46 $\mu\text{g/ml}$, se dice que esta presenta un efecto citotóxico, previamente mencionado.

Existen trabajos anteriores que refuerzan los resultados obtenidos en este trabajo entre ellos el de Alemón *et al.*, (2002), donde trabajaron con la Casiopeínas Igly, III-E, y III-H en células HeLa y linfocitos humanos a las concentraciones de 10, 20, 40 y 80 μM , reportan que la Casiopeína Igly es ligeramente citotóxica, y que probablemente se deba a la producción de radicales libres originada por la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} . Esto concuerda con Rivero-Müller *et al.*, (2007), ya que reporta que los complejos de Cu^{2+} son formadores de Especies Reactivas de Oxígeno (EROS) y que la Casiopeína IIgly es citotóxica por que es capaz de generar la formación de ERO.

Trabajos preliminares por Beltrán y Roldán (2006), reporta que la Casiopeína Igly es citotóxica en linfocitos humanos *in vitro* a las concentraciones de 0.615, 1.23, 2.46 $\mu\text{g/ml}$. Así mismo Alemón *et al.*, (2007) observo que la Casio Igly es menos citotóxica comparada con las del grupo II, y III, en células HeLa y leucocitos, a una concentración de 100 μM al evaluar la citotoxicidad con el porcentaje de supervivencia (método de Strauss, 1991).

De acuerdo con los antecedentes presentados en este trabajo y los resultados obtenidos, se plantea que la citotoxicidad que genera la Casiopeína Igly en este sistema de prueba es debido a la formación de EROS como señala Alemón *et al.*, (2007) ya que la reducción del átomo de Cobre (II) a cobre (I) en su estructura, subsecuentemente generaría la formación de especies reactivas de Oxígeno, como el hidroxilo o súper oxido, las cuales pueden reaccionar con diferentes macromoléculas tales como los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos de la membrana; causando un daño oxidativo en el interior de la célula.

Por otra parte Alemón *et al.*, (2007), reporta a la Casiopeína Igly menos citotóxica que la Casiopeína III-H-a que contiene acetilacetato. Con ello se puede decir que este efecto está relacionado también con los acompañantes de las Casiopeínas, ya que como recordaremos la Casiopeína Igly tiene como grupo neutro a dimetil-fenantrolina y como donador a la glicina, la cual hace que sea menos tóxica que la III-H; ya que la glicina es un aminoácido que forma parte de las proteínas de los seres vivos.

Avellar *et al.*, 2004 observa que el complejo de Fe-fenantrolina es generadora de EROS pero no dañan al ADN. Por estas razones la citotoxicidad se le atribuye a la glicina, más que a la fenantrolina, de acuerdo con Cai *et al.*, (2007) reporta que el cobre unido a 1,10 fenantrolina es una molécula muy permeable, lo que aunado a su lipofilidad⁹, favorece el transporte del cobre a través de membranas biológicas, como es el caso de la Casiopeína Igly.

⁹ Afinidad que tiene una sustancia para disolverse en grasas

Citostaticidad

Cualquier agente físico o químico capaz de inhibir el crecimiento y la multiplicación celular indica un efecto citostático (Reiger y Green 1982). De acuerdo con esta definición se realizó la evaluación del porcentaje células polinucleadas (monucleadas, binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas). Este porcentaje se muestra en el **cuadro 3** y se puede observar que al aumentar la concentración de la Casiopeína Igly el porcentaje de células binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas tiende a disminuir de manera significativa ($p < 0.05$), mientras que las células mononucleadas aumentan, con estos resultados se nota que la Casiopeína presenta un efecto citostático ya que es capaz de inhibir y/o retrasar el ciclo celular.

Este retraso celular que se aprecia con el aumento del porcentaje de células mononucleadas y la disminución de las células binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas, concuerda con los trabajos preliminares de Beltrán y Roldán (2006) ya que mencionan que la Casiopeína Igly es citostática a las concentraciones de 0.615, 1.23 y 2.46 $\mu\text{g/ml}$ en linfocitos humanos *in vitro* al aumentar el tiempo generacional promedio. Es decir que al aumentar la concentración de la Casiopeína Igly las células se tardan más tiempo en dividirse.

También existen otros trabajos que respaldan esta información como es el caso de Márquez *et al.*, (2000a) al reportar que la Casiopeína Igly es citostática para las líneas transformadas de carcinoma ovárico; y cérvix en las líneas celulares HeLa¹⁰, SiHa¹¹ CaSki¹², C33-A¹³ y CaLo.

¹⁰ Células de adenocarcinomas de cérvix queratinizados, de morfología epitelial. Estadio IV A.

¹¹ Carcinoma de células escamosas de cérvix, de morfología epitelial. Estadio III B.

¹² Carcinoma de células epidermoide de cérvix de morfología epitelial. Estadio II B.

Por otra 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 HeLa y CaLo, y muestran un comportamiento dosis respuesta similar al de la Mitomocina C y el Cis-platino. Y esta característica apoya a la Casiopeína Igly como un buen candidato para usarse en la clínica.

El hecho de presentar un efecto citostático en linfocitos humanos esta indicando que tiene el mismo comportamiento que otros antineoplásicos ya que todos ocasionan una disminución, en la producción de linfocitos provocando que el sistema inmunológico decaiga con estos tratamientos, pero como era de esperarse ya que desafortunadamente no hay algún fármaco selectivo hasta el momento, pero aun así se puede observar que el porcentaje de células binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas en los tratamientos con la Casiopeína Igly son mayores que en el caso de la MMC, la cual es utilizada en clínica, al observar estos resultados es posible que al complementar las pruebas preclínicas (farmacodinámica y farmacocinética, entre otras) sobre la Casiopeína Igly, sea utilizado en pacientes con cáncer.

Genotoxicidad

Kirsch-Volders, (1997) y Garriott *et al.*, (2002) señalan que la prueba de Micronúcleos *in vitro* es usada en las primeras etapas de desarrollo farmacéutico para evaluar genotoxicidad. El ensayo de MN fue evaluado en este trabajo para conocer el efecto genotóxico de la Casiopeína Igly en linfocitos humanos *in vitro* a través del porcentaje de MN y PN.

¹³ Células de carcinoma de cerviz de morfología epitelial. Estadio III A.

Los puentes nucleoplásmicos son cromosomas dicéntricos; es decir cromosomas con dos centrómeros que forman puentes de tensión en anafase cuando cada centrómero tiende a migrar a un polo diferente. Este cromosoma dicéntrico puede resultar de una translocación de cromosomas no homólogos o de traslocaciones de las dos cromátidas del mismo cromosoma (Guízar-Vazquez, 1988; Kilbey *et al.*, 1984). Así los PN dan información extra y complementan la medición de un nuevo arreglo de cromosomas y se consideran como un biomarcador de rearrreglo cromosómico (Fenech, 2000; Thomas, 2003).

Ahora bien de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a la presencia de estos PN señalan que se inducen en todas las concentraciones de manera dosis dependiente de manera significativa ($p < 0.005$) (**figura 15**). Lo que indica que si es genotóxica y que hay un nuevo arreglo cromosómico por ello es necesario realizar otro tipo de pruebas, como la de aberraciones cromosómicas (AC).

Debido a que trabajos preliminares de Gómez y Roldán (2006), con Casiopeína Igly en linfocitos humanos *in vitro* utilizando las mismas concentraciones de este estudio 0.615, 1.23, 2.46 $\mu\text{g/ml}$, reportan que el porcentaje de aberraciones cromosómicas tiende a aumentar significativamente ($p < 0.05$ con Z para proporciones comparado con el testigo negativo).

En cuanto al porcentaje de MN se reporta una basal de 0-5 como mínimo y 8-25 como máximo por cada 1000 células binucleadas contadas. Aunque puede variar de acuerdo con la edad, género, alimentación y ocupación con un incremento promedio de 0.17 MN por año (Surrallés y Natarajan, 1997; Wu *et al.*, 2004). Los resultados que se obtuvieron en el testigo negativo concuerdan con los reportados por estos autores, (**figura 14**). Con respecto

a los MN presentes en linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly a las concentraciones de 0.615, 1.23 y 2.46 $\mu\text{g/ml}$ se observó una tendencia de comportamiento dosis-respuesta al igual que el porcentaje de PN.

Recordando que los MN pueden ser fragmentos de cromosomas o cromosomas completos. Indica que esta genotoxicidad puede ser producida por una sustancia tanto clastógena como aneugénica, para descartar entre una y otra existe una prueba llamada hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH).

Alemón *et al.*, (2002), trabajaron con la Casio III-E, Casio III- H y Casio Igly en células HeLa y linfocitos humanos a las concentraciones de 10, 20, 40 y 80 μM , reporta que el daño al ADN va en relación inversa con el tamaño de la molécula dado que la más pequeña Casio III-E es la más genotóxica en ambos tipos celulares mientras que la Casio III- H y Casio Igly, son en este orden menos genotóxica y de mayor tamaño.

Otros trabajos de genotoxicidad de la Casiopeína Igly son los de Sánchez (2006), Beltrán y Roldán (2006), el primero reporta que la Casiopeína Igly es genotóxica a una concentración de 0.47 $\mu\text{g/ml}$ al evaluar el intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) en linfocitos humanos *in vitro*. Por otro lado Beltrán y Roldán reporta un aumento significativo ($p < 0.005$ con Z para proporciones) en la frecuencia de ICHs por célula en linfocitos humanos *in vitro* a la concentración de 2.46 $\mu\text{g/ml}$.

Como se menciona anteriormente es necesario complementar estos datos con los de aberraciones cromosómicas ya que se ha visto en otros trabajos como el de Atilano (2007) reporta que la Casiopeína IIgly induce MN a las concentraciones 0.33, 0.66, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ con una tendencia dosis respuesta mientras que al evaluar aberraciones cromosómicas estructurales encontró

diferencia significativa comparada con el testigo negativo solo en la última concentración, y mostró que no hay formación de aberraciones cromosómicas numéricas

Por su parte los MN y PN presentan una tendencia a aumentar conforme a la concentración de la Casiopeína Igly. Este comportamiento está relacionado con inducción de daño al ADN, causado por lesiones de rompimiento de cadena doble, de acuerdo con lo que menciona Blasiack *et al.*, (2002) "*el comportamiento dosis respuesta de drogas anticancerígenas, está relacionado con un efecto directo sobre el ADN*". Así mismo Brusick (1987) y Obe *et al.*, (2002) reportan que para la formación de, MN AC estructurales e ICHs, es necesaria la presencia de lesiones al ADN en forma de rompimientos de cadena doble.

Otra posibilidad para explicar la genotoxicidad de la Casiopeína Igly en estas condiciones de trabajo, sería por el mecanismo de acción de tipo apilamiento del cobre de la Casiopeína, propuesto por Tovar *et al.*, (2004), donde señala que los complejos de cobre formados con fenantrolina y aminoácidos tendrán un efecto intercalante mucho mayor que aquellos complejos que contienen bipyridinas. Es el caso de la Casiopeína Igly (ligante 1,10 fenantrolina y glicina). Es por ello que se propone que la genotoxicidad se debe a que el cobre se une a las adeninas presentes en el ADN, provocando daño al material genético, que se manifiesta con la presencia de los micronúcleos y puentes nucleoplásmicos. O bien por la formación de EROS de acuerdo con lo que reporta Fenech (1997), que en células tratadas con sistemas que generan radicales, como la radiación ionizante y peróxido de oxígeno se observan puentes nucleoplásmicos.

Es decir el efecto genotóxico de la Casiopeína Igly puede llevarse a cabo por cualquiera de los mecanismos antes mencionados. En base con estos

resultados y a los posibles mecanismos de acción de la Casiopeína lleva a que se sigan realizando más estudios y también a clasificarla dentro de los antineoplásicos misceláneos.

Al observar el porcentaje de MN y PN presentes en el testigo positivo (MMC) es mayor que el que presentan las diferentes concentraciones de la Casio Igly aún con tales efectos es utilizada en clínica. Por tal razón aunque la Casio Igly es genotóxica de acuerdo a las condiciones de trabajo ya mencionadas se propone realizar otras pruebas de genotoxicidad como es el caso de aberraciones cromosómicas, ya que Miller *et al.*, (1997) muestran que los resultados obtenidos con la Prueba de MN se correlaciona con la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas en células por algún clastógeno. Además con estos resultados también se puede aceptar la hipótesis planteada en este trabajo "Sí la Casiopeína Igly presenta como centro metálico al cobre, que es un elemento que utiliza el hombre como micronutriente, entonces ocasionará menor daño al ADN, que otros agentes antineoplásicos que no presentan esta característica, daño que se manifestará en forma de Micronúcleos", donde se observó que, el daño fue menor.

Por último de acuerdo con la investigación realizada se puede apreciar que el daño genotóxico ocasionado a los linfocitos, producido por la Casiopeína Igly es multifactorial ya sea por la reducción del cobre y consecuentemente la generación de EROS, rompimientos de cadena doble, o apilamientos con la adenina del ADN. Y los efectos a nivel de la proliferación celular. Es necesario seguir estudiando más afondo estos efectos, para poder encontrar el mecanismo que mejor manifieste el daño ocasionado a las células.

IX. Conclusiones

- ❖ Al evaluar el índice de proliferación en células con bloqueo de la citocinesis se observó que la Casiopeína Igly es **citotóxica** en el cultivo de linfocitos humanos a las concentraciones de 0.615, 1.23, 2.46 $\mu\text{g/ml}$.
- ❖ Con base en el porcentaje de células polinucleadas en los linfocitos humanos *in vitro* se mostró que la Casiopeína Igly es **citostática** a las concentraciones ya mencionadas.
- ❖ Los resultados del porcentaje de MN y PN sugieren que la Casiopeína Igly es **genotóxica** para este sistema de prueba.

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 **citotóxica, citostática y genotóxica** en cultivo linfocitos humanos.

PERSPECTIVAS

Realizar FISH para distinguir si la Casiopeína Igly es clastógena o aneugénica. Evaluar sí la Casiopeína Igly ocasiona daño de cadena sencilla mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa). Para poder complementar y comparar los resultados de genotoxicidad obtenidos en este estudio.

Evaluar los efectos apoptóticos y necróticos en cultivo de linfocitos humanos para tener información complementaria respecto a la citotoxicidad de la Casiopeína Igly.

Si pasa las otras pruebas preclínicas representa una esperanza de vida para los enfermos de cáncer. Y debido a su naturaleza química sería más accesible a la población, al disminuir los costos para los pacientes y/o el sector salud, ya que las Casiopeínas se diseñaron en México y se esperaba que se sintetizaran en su lugar de origen.

ABREVIATURAS

AC: Aberraciones cromosómicas

ADN: Ácido desoxirribucleico

CI₅₀: Concentración Inhibitoria Media

Cit-B: Citocalasina B

Cu: Cobre

EROS: Especies Reactoras de Oxígeno

ICHs: Intercambio de cromátidas hermanas

IM: Índice mitótico

IPBC: Índice de Proliferación en células con Bloqueo de la Citocinesis

MMC: Mitomicina C

MN: Micrunucleos

nm: nanómetros

PN: Puentes Nucleoplásmicos

KCl: Cloruro de potasio

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertini, R., Anderson D., Douglas D. G., Hagmar J., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A., Norppa H., Shuker D., Tice R., Waster M. y Aitio A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, 463: 111-172.

Albertini, R., 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.

Alberts, B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts Keith., Watson J. D. (2002). *Biología molecular de la célula*, 3ra ed. Editorial Omega S. A.

Alemón-Medina, R., Breña-Valle. M., Muñoz-Sánchez. J. L., Gracia-Mora M. I., Ruiz-Azuara, L. (2007). Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drug (Casiopéinas ®). *Cancer Chemother Pharmacot*, 60: 219-228.

Alemón, R. Breña M., y Serment J. (2002). Inducción de daño oxidante por antineoplásicos de tipo quelatos de cobre. Primer Congreso de Casiopéinas, pag. 129-134.

Anderson D., (1993) *Cytogenetics* En: *General y Applied Toxicology*. Ed Ballantyne B, Marrs T y Turner P, Vol 2. The Macmillan Press Ltd, UK.

Ateeq, B., Abul-Farah M., Niamat M., Waseem A. (2002). Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish (*Clarias batrachus*) by 2,4 dichloro-phenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research* 518:135-144.

Atilano, A. (2007). Evaluación de daño genotóxico, citotóxico y citostático inducido por Casiopéina IIgly en cultivo de linfocitos humanos, Tesis de Licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM.

Avellar, I. G., Magalhaes M. M., Silva A. B., Souza L. L., Leitao A. C., Hermes-Lima M. (2004). Reevaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative

reaction involving ferrous ions and DNA damage. *Biochim Biophys, Acta* 1647: 46-53.

Beltrán y Roldán E. (2006). Evaluación del efecto genotóxico de la Casiopeína Igly en cultivos de linfocitos humanos. Segundo Congreso Nacional de Química Médica dedicado a la Investigación en Cáncer y Diabetes, 4-8 de Septiembre del 2006, Querétaro, Qro.

Blasiack, J., Gloc E., y Warszawski M. (2002). A comparasion of the *in vitro* genotoxy of anticancer drug adarubicin and mitoxontrone. *Acta Biochimica Polonica*, 49:145-155.

Boyd, M. y Paull K. (1995). Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute *in vitro* anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research*, 34: 91-109.

Bravo, G. Ma. E. (1997). Evaluación antineoplásica de compuestos de coordinación de cobre (Casiopeínas) en modelo tumoral murino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Brusick, D., (1987). *Principles of Genetic Toxicology*, Plenum Press, NY. Cap.1-3.

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

Campana, M. A., Panzeri A. M., Moreno V. J., Dulot F. N. (1999). Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micrcunucleus test in erythrocytes of the fish (*Cheirondon interruptus*). *Mutation Research*, 283:287-294.

Carson, B. L., Ellis H. V., y McCann J. L., (1987), *Toxicology and biological monitoring of metals in humans*, Lewis Publishers Inc. USA. Pag. 328.

Carter, S. K. y Crooke A. N. (1979). *Mitomycin C current status and new developments*, ed. Academic Press Inc, States United of America.

Carvallo, F. (2007). Efectos antiproliferativos y apoptoticos de las Casiopeínas IIgly y II-IA en líneas tumorales humanas. Tesis doctoral. Programa de posgrado en ciencias de la producción y de la salud animal. FMVZ, UNAM.

Castell, J. V. y Gómez-Lechón M. (1997). *In Vitro* Methods in Pharmaceutical Research. Academic Press, Cap. 14.

Celik, M., F. Ünal, D. Yüzbasioglu, M.A. Ergün, O. Arslan, R. Kasap (2004). *In vitro* effect of karathane LC (dinocap) on human lymphocytes. *Mutagenesis*, 20:101-104.

Cole, R., Taylor J., Cole J. y Arlet C. (1981). Short-term test for transplacental active carcinogens, 1. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblast. *Mutation Research*, 122:347-357.

Countryman, J. I., y Heddle, J. A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutation Research*, 41:321-332.

Crooke, S.T., y Bradner, W. T. (1976). *Cancer Treat. Rev.* 31, 121-139.

De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller A, Ruiz Ramírez L, Kelland L. R., Orr R. M., Dobrota M. (2000). Induction of apoptosis by a novel Copper-based anticancer compound, Casiopeína II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cell. *Toxicol In Vitro*, 14, 1-5.

Diaz, D., Scott A., Carmichael P., Shi W., Costales C. (2007). Evaluation of an automated *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells. *Mutation Research*, 630:1-13.

Evans, H. John, (1997). Historical perspectives on the development of the *in vitro* micronucleus test: a personal view. *Mutation Research*, 5-10.

Evans, H. J., Bucton, K. E., Hamiltan G. E. y Carother A. (1979). Radiation induced chromosome aberrations in nuclear-dockyard workers. *Nature*, 277:531-534.

Evans, H., y O'Riordan M. (1975). Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Test. *Mutation Research*, 31: 135-148.

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

Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455:81-95.

Fenech, M. Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003). HUMN Project: detailed description of scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534, 65-75.

Fenech, M. y Crott J. W. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocyte-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis micronucleus assay. *Mutation Research*, 504:131-136.

Fenech, M. y Morley A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Research*, 147:29-36

Furst, A., Radding S. B., Wurzel K. A. (1998). Copper (Cu). En *Enciclopedia of toxicology*, editado por Wexler P. Vol. 1, Academia Press, USA.

Garriott, L. M., Barry Phelps J., Hoffman P. W. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test I. Contributions to the development of protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemical with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, 517:123-134.

Goldsby, R. (2003), *Inmunología*, 5ta ed. ED. McGraw-Hill, México

Gómez, A. y Roldán E. (2006). Evaluación de aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly. Segundo Congreso Nacional de Química Médica dedicado a la Investigación en Cáncer y Diabetes, 4-8 de Septiembre del 2006, Querétaro, Qro.

González, F. F. A., Pérez C. J., García D. C. (1992). Quimioterapia en hematología. *Medicina* 6: 576-86.

Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramirez L., Gómez C., Tinoco M., Marquez A., Romero L., Marin A., Macias I., Bravo E. (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 Base Drug*, 8(1):1-28.

Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez L., Tinoco-Méndez M., Márquez-Quiñones A., Romero de Lira L., Marín Hernández A., Macías-Rosales L., Bravo Gómez ME. (2000). 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, 19-28.

Guízar-Vazquez J. J., (1998), *Genética Clínica diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias.* Editorial el manual moderno, S. A. de C.V.

Heddle, J., Hite M., Kirkhart B., Mavournin K., MacGregor J., Newel G. y Salamone M. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, a report of the U.S. Environmental Protection Agency Genetox Program. *Mutation Research*, 123:61-118.

Hellman, S. y Vokes E. E. (1996). Advancing current treatments for cancer. *Scientific American* 275:84-89.

Hoffmann, G. R. (1982). Overview of genetic toxicology. *Basic Life Sci.* 21:5-27.

Jiménez, L. F. y Merchant H. (2003). *Biología Celular y Molecular*, Editorial Pearson Educación México.

Kilbey, B. J., Legator M., Nichols W., y Ramel C. (1984). *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2da edición, Editorial Elsevier New York, Capítulo 18.

Kirsch-Volders, M. (1997). The *in vitro* Micronucleus Assay in Human Lymphocytes, *Mutation Research*, 392, Special Issue(1,2).

Klug, W. S., y Cummings R. M. (1999). *Conceptos de Genética*, 5ta ed. Editorial Prentice Hall México.

Lähdetie, J. y Parvienen M. (1981). Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rats. *Mutation Research*, 81: 103-115.

Liu, Y, Wu Z., Chen J. (1998). Differential effects of aneugens and clastogens on incidences of multinucleated cell and micronucleate cell in Chinese hamster lung (V79) cell line *in vitro*. *Mutation Research*, 43:39-45.

Lodish, H., Berk A., Zipursky L. S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2002). *Biología Celular y Molecular*, 4ta ed. Editorial medica panamericana México.

Loebl, S., y Spratto G. (1986). *Manual de Farmacología*, ed. Limusa, México.

Lown, J.W. (1979). The molecular mechanism of antitumor action of the mitomycins. En: *Mitomycin C*. Eds. Carter S.K. y Crooke S.T. Ed. Academic Press, New York. Pág. 5-26.

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

Márquez, Q. A., (2000), Determinación de la actividad antineoplásica *in vitro* de compuestos de coordinación de cobre mediante el empleo de líneas humanas de carcinoma cérvico uterino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Márquez, Q. A., Gómez C., Ruiz R. L. de la Rosa D. Gracia I., Tinoco M., Macias L. (2000 a). Evaluación antineoplásica *in vitro* de nuevos fármacos (Casiopéinas) empleando líneas tumorales humanas y murinas, 4ta Jornada de Trabajo de Casiopéinas. Pág 4-9.

Mateuca, R., Lombaert N., Aka P. V., Decordier e., Kirsch-Volders M., (2006), Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie*, 88:1515-1531.

Mckee, T., y Mckee J. R. (2003). Bioquímica la base molecular de la Vida, Editorial McGraw-Hill/ Interamericana de España. pag

McLauhling, C. J. (1995). Principios de la quimioterapia en: Oncología práctica. Editado por Cameron R. B. Editorial Médica Panamericana, Argentina Pág. 769.

Medina, R. H. (2005). Efecto de la desnutrición y de fármacos sobre la frecuencia y tipo de micronúcleos en eritrocitos de rata. Tesis de maestría en biología experimental, UNAM, Iztapalapa.

Mehta, B. M., Rosa E., Fissekis J. D., Bading J. R., Biedler J. L., Larson S. M. (1992). *In vivo* identification of tumor multidrug resistance with tritium-3-colchicine. *J. Nucl. Med.* 1992; 33: 1373-7.

Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, U., Lorge, E. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, 392:45-59.

Mitsubishi, Y, Inaba M, Sugiyama Y, Kobayashi T., (1992), *In vitro* measurement of chemosensitivity of human small cell lung and gastric cancer cell lines toward cell cycle phase-nonspecific agents under the clinically equivalent area under the curve. *Cancer*, 70: 2540-6.

Murphy, G., Lawrence, W., Lenhard, R. (1996). Oncología clínica, manual de la American Cancer Society, 2da ed. Editorial Publicaciones científicas, N°559, Organización Panamericana de la Salud.

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

Natarajan, A. T., y Boei J. J., (2003). Formation of chromosome aberrations: Insights from FISH. *Mutation Research* 544:299-304.

Natarajan, A. y Obe G. (1982). Mutagenic Testing With Cultured Mammalian Cell. Mutagenicity, Adad. Pres. N. Y.

Obe, G., Pfeifferm P., Savage JRK., Johannes C., Goedecke W., Jeppesen P., Natajaran A. T., Martínez-López W., Folle G. A. y Drets M. E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. Mutation Research, 504:17-36.

Olivares, M. y Uauy R. (1996). Copper as an essential nutrient. The American Journal of Clinical Nutrition 63:1-13.

Organización de Economía y Cooperación al Desarrollo (OECD) (2007). Guideline for the Testing of Chemical, Draft Proposal for a New Guideline 487: *In Vitro* Micronucleus Tests.

Orozco, S. P. G. (1993). Efecto protector de la vitamina E y de los b-carotenos en contra de la mutagenicidad de la MMC en la prueba somática de ala *Drosophila melanogaster*, Tesis de Maestra en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM.

Orten, J. M. y Neuhaus Otto W. (1984). Bioquímica Humana, Editorial Médica Panamericana.

Ozols, R. F. (1992). Chemotherapy for advanced epithelial ovarian cancer. Hematol/Oncol Clin North Am, 6: 879-93.

Parry, E. M., Parry J. M., Corso C., Doherty A., Haddad F., Hermine T. F., Johnson G., Kayani M., Quick E., Warr T., Williamns J. (2002). Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemical, Mutagenesis, 17:(6), 509-52.

Pastor, S., Gutierrez S., Creus A., Cebulska-Wasilewska A., Marcos R. (2001). Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and bucal epithelial cells of polish farmers exposed to pesticides. Mutation Research, 495:147-157.

Pía Herrera (2007). Aportaciones de la Universidad a la Lucha Contra el Cáncer, Gaceta UNAM,3959:8-9.

Rankin, E. M. y Kaye S. B. (1990), Principles of chemotherapy. In: Treatment of cancer, Sikora K, Halnan KE, editors. London: Chapman and Hall Medical, p. 127-45.

Reiger, R. y Green A. (1982). Diccionario de genética y citogenética. 4ta ed. Editorial Alambra.

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

Robertis, E.D.P., Saez A. F., Robertis E. M. F. (1978). Biología celular. Capitulo 22, 9na ed. Editorial el Ateneo.

Rodríguez J. (2001). Evaluación de los efectos genotóxicos y citotóxicos inducidos en cultivos de células de sangre periférica expuestos a tetraóxido de Vanadio. Tesis de Maestría. FES-Zaragoza, UNAM.

Rojas, C. E. (1992). Evaluación de sustancias antineoplásicas en cultivo de linfocitos como sistema de prueba. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM.

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

Roldán, E. (1992). Efecto Mutagénico y Teratogénico del Pentóxido de Vanadio. Tesis de Maestría. FES-Zaragoza, UNAM.

Romero, de Lira L. (2000). Evaluación antineoplásica *in vitro* de cuatro Casiopeínas empleando líneas tumorales murinas y humanas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Romero, L. (2008). Ganar científicos el Premio Canifarma, Gaceta UNAM, 4,045. Pag.3-4.

Romero, R. A., Fuentes Noriega Ines., Cañas Alonso Roberto., Rosales Macías Lucía., Ruiz Azuara Lena (2006). Estudio preliminar de farmacocinética en ratas con análisis de datos urinarios de Casiopeína III-ia, Segundo Congreso Nacional de Química Médica Dedicado a la Investigación en Cáncer y Diabetes.

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

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

Ruiz-Ramírez L., Gracia I., de la Rosa M. E., Sumano H., Gómez C., Arenas F., Gómez F. E., Pimentel E. y Cruces M. P. (1993). Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeínas I, II y III. *J. Inorganic Biochemistry*. 51:(1-2), 250.

Ruiz, R. L., Moreno Esparza R., Gasque Silva L., Quere A., Gadea L. R. Ferrer S. G., Rendón de la Fuente R., Ortega V, N. (1994). Estabilidad de las Casiopeínas. 1era Jornada de Casiopeínas, Pág. 6-7.

Sánchez, B. F. (2006). Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las Casiopeínas Igly, IIgly y III-ia en linfocitos humanos, medula ósea de ratón y linfocitos humanos en cultivo. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.

Sanjeeu, N., Kaasinathan M., Kumar R. (2006). Evaluation of apigenin using *in vitro* cytochalasin blocked micronucleus assay. *Toxicology in vitro* 20: 1168-1172.

Santiago M. Y. (2004). Efecto genotóxico de los tratamientos agudos y subcrónicos de la Casiopeína IIgly en machos, hembras, hembras preñadas y fetos de ratón CD-1, Tesis de licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM.

Shale-Bartusiack, K., Stembalska-Kozłowska A., Berbady M., Kudyba M., Sasiadek M. (2002). Analysis of adaptative response to bleomycin and mitomycin C. *Mutation Research* 513:75-81.

Schmid, W. (1975). The micronucleus test, *Mutation Research*, 31:9-15.

Seutap, A., Basaran A., Basaran N. (2005). The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutation Research* 581:43-53.

Sigma-Aldrich, (2008-2009). Productos para ciencias de la vida e investigación, Pág. 555.

Stich, H. y Rosin M. (1982). Micronucleus in exfoliated human cell as an internal dosimeter for exposures to carcinogens. In: Stich H. (ed) *Carcinogens and mutagens in the environment*, Vol 2, CRC, Boca Raton. Pág. 17-25.

Stokinger, H. E. (1981). Copper, Cu. En *Patty's industrial hygiene and toxicology*, Eds. Wiley J. Vol. 2, 3ra ed. Wiley-Interscience Publication, USA, Pp. 1847.

Stopper, H., Full M., Helbig R. (1997). Micronucleus induction by neocarzinostatin and methyl methanesulfonate in ionizing radiation sensitive *Chinese hamster V79* cell mutants. *Mutation Research*, 383: 107-112.

Strauss, G. H. S. (1991). Non-random cell killing in cryopreservation: Implication for performance of the battery of leukocyte test (BLT) I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutation Research*, 252:1-15.

Sugher, K. M., Unnikishnan M. K., Uma D. P. (2003). Effect of 5-aminosalicylic acid on radiation induced micronuclei in mouse bone marrow. *Mutation Research*, 527: 7-14.

Surrallés, J. y Natarajan A. T. (1997). Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutation Research*, 392:165-174.

Thomas, P., Umegaki K., y Fenech M. (2003). Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 18 (2) : 187-194.

Tovar, T. A., Ruiz-Azuara L., y Campero C. A., (2004), Dos formas diferentes de interacción entre complejos mixtos de cobre (II) (Casiopéina) y Adenina, como una aproximación a su selectividad, Primer Congreso de Química Médica, pag. 159-161.

Trejo-Solís, C., Palencia G., Zuñiga S., Rodríguez-Ropon A., Osorio-Rico L., Sánchez T. L., Gracia-Mora I., Márquez-Rosado L., Sánchez A., Moreno-García M. E., Cruz A., Bravo G. M. E., Ruiz-Ramírez L., Rodríguez-Enriquez S., Sotelo J. (2005). Cas II gly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cell *In Vitro* and *In Vivo* Trough Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Neoplasia*, 7:563-574.

Trosic, I., Busleta I., Kasuba V., Rozgas R. (2002). Micronucleus induction alter whole body microwave irradiation of rats. *Mutation Research*, 521:73-79.

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

Verdejo, A., Ruiz L., Espinosa J., Muñoz R. (1998). Estudio de la interacción cyp-casiopéina. Tercera Jornada de Trabajo en Casiopéinas. UNAM, Facultad de Química, Pag. 84-86.

Wu, Ping-An., Loh Ching-Hui., Hsieh Ling-Ling., Liu Tsung-Yun., Chen Chien-Jen., Liou Saou-Hsing (2004). Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutation Research*, 562:27-38.

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

Paginas consultadas

- www.bioitj.blogspot.com/2007/04/citoesqueleto.html (consultado el 10 de abril de 2008).
- www.down21.org/salud/salud/leucemia_sd.htm (consultado el 5 de abril de 2008)
- www.inegi.gob.mx, consultado el 12 de mayo de 2008.
- www.med.javeriana.edu.com (consultado el 8 de abril de 2008).