



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIÓLOGO

**Evaluación de micronúcleos e intercambio de
cromátidas hermanas inducidos por un compuesto de
cobre (Casiopeína III-ia) en linfocitos humanos *in vitro*.**

DIANA ALEJANDRA CANCINO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Elia Roldán Reyes

PAPIIT IN-221808



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por que gracias a ellos, a su amor, a su ejemplo y a su apoyo hoy soy profesionista y por que no existen palabras para agradecerles.

A mis hermanos, por estar siempre a mi lado con sus consejos.

A Gerardo, por ser mi amigo, mi compañero, por su amor y por apoyarme siempre en este y todos mis sueños.

A mi hijo, por ser mi inspiración y por darme la fuerza necesaria para seguir adelante.

A la Dra. Elia, por su sabiduría, su infinita paciencia y su incondicional amistad.

A mis compañeras del laboratorio por darme siempre un ambiente agradable para trabajar.

A Dios, por estar conmigo y darme la oportunidad de finalizar este proyecto.

ÍNDICE

	Página
TABLA DE ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	
Cáncer	7
Tratamientos generales	8
Quimioterapeúticos	8
Mitomicina C	9
Cis-Platino	10
Cobre	11
Casiopeína	12
Casiopeína III-ia	14
Sistemas de prueba	15
Linfocitos humanos <i>in vitro</i> como sistema de prueba	16
Micronúcleos	18
Intercambio de Cromátidas Hermanas	21
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	
General	26
Particulares	26
MATERIALES Y MÉTODOS	
Cultivo de linfocitos humanos	27
Técnica de micronúcleos	27
Técnica de intercambio de cromátidas hermanas	28
Evaluaciones	28
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	43
COMENTARIOS FINALES Y PERSPECTIVAS	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

RESUMEN

Por su selectividad ante leucemias y células de carcinomas, se eligieron los compuestos más prometedores de entre más de cien **Casiopeínas®**, donde se ubicó la Casiopeína III-ia, ya que es capaz de inducir apoptosis en líneas tumorales, citotóxicidad y cistostaticidad en sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Evaluamos los efectos genotóxico, citotóxico y citostático, en linfocitos humanos *in vitro*, tratados con Casiopeína III-ia, con tres diferentes concentraciones (correspondientes a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, y $\frac{3}{4}$ de la LC₅₀) mediante los ensayos de micronúcleos (**MN**), e Intercambio de Cromátidas Hermanas (**ICHs**).

Sangre completa de donadores humanos clínicamente sanos fue cultivada durante 72 hrs. Para evaluar MN, se necesitó obtener células binucleadas mediante la adición de citocalasina-B (6µg/ml) a las 48 horas de cultivo, y todos los tratamientos se hicieron a las 44 horas de la siguiente manera: testigo negativo (sin tratamiento), testigos positivos con Cis-Platino (0.1µg/ml) y Mitomicina-C (0.2µg/ml), y tres diferentes concentraciones de Casiopeína III-ia (4.2, 8.4 y 12.6µg/ml), a las 72 horas se hizo la cosecha que consistió en dar un choque hipotónico (KCl 0.075M), posteriormente fijar las células y finalmente se tiñeron (McGrunwald-Giemsa).

Para el ensayo de ICHs, a las 24 hrs. de cultivo se adicionó a todos los cultivos 5-BrdU, los tratamientos fueron adicionados a las 48 hrs. siguiendo el mismo orden ya mencionado (testigo negativo, dos testigos positivos y tres concentraciones de Cas III-ia). A las 70 hrs. de incubación se agrego la colcemida (4µg/ml). Dos horas después se realizó la cosecha, y finalmente realizamos la tinción diferencial (se irradiaron las células con luz UV y negra en medio acuoso, y se sometieron a un baño con una solución 2XSSC y se tiñeron con Giemsa).

Los resultados muestran que a 4.2, 8.4 y 12.6 $\mu\text{g/ml}$ de Cas III-ia los linfocitos humanos detienen su división de manera significativa. Además la frecuencia de MNs aumenta de manera estadísticamente significativa en todas las concentraciones utilizadas de Cas III-ia (4.2, 8.4 y 12.6 $\mu\text{g/ml}$), al igual que la cantidad de ICHs presentes en los linfocitos humanos. Por lo tanto la **Casiopeína III-ia**, es **citostática, citotóxica y genotóxica**.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

Los cánceres son el producto de mutaciones que liberan a las células de los controles habituales de proliferación y de supervivencia. Una célula del organismo muta por una serie de accidentes al azar y adquiere la capacidad de proliferar sin los impedimentos normales. Su progenie hereda las mutaciones y da lugar a la formación de un tumor que puede crecer ilimitadamente. Además, tarde o temprano, la mayoría de los tumores malignos generarán células con capacidad de abandonar el tumor primario produciendo metástasis, que hoy en día son la causa del 90% de de las muertes asociadas con tumores.

La meta terapéutica del cáncer es lograr activar la muerte celular selectiva a las células neoplásicas. En principio, existen al menos dos estrategias para alcanzar esta meta. La primera, es importante que el fármaco se acumule en el tejido tumoral para que favorezca su acumulación en las células transformadas. La segunda, se busca activar selectivamente la maquinaria de muerte celular en las células tumorales sin dañar las células sanas¹.

Las estadísticas revelan que en los próximos años, el cáncer afectará a una de cada tres personas y que en occidente, es la causa de alrededor de una de cada cuatro muertes. Tanto en México como en el mundo, el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardíacas. La Organización Mundial de la Salud predijo que para el año 2020 habrá 20 millones de nuevos pacientes con cáncer por año. Entre los hombres, las 8 principales localizaciones mortales con cáncer son: colon-recto, pulmón, estómago, hígado, esófago, boca-faringe, y ganglios linfáticos. En las mujeres

los órganos más afectados por esta enfermedad son la glándula mamaria, el estómago, el colon-recto, cuello del útero, pulmón ovario esófago e hígado.

TRATAMIENTOS GENERALES

La terapia establecida para el tratamiento de cáncer y la más utilizada es la cirugía. La eliminación quirúrgica de un tumor es rápida y efectiva, y es considerada para un gran número de casos. Desafortunadamente, esta forma de tratamiento presenta algunas desventajas, ya que, el remover la masa tumoral no garantiza la eliminación de células cancerosas, y si el tumor se encuentra adyacente a órganos vitales no puede ser extirpado, además no se utiliza en caso de metástasis.

La terapia con radiación ionizante es preferible y se propone para la mayoría de los casos. Con este método, el tumor es irradiado con rayos X o gamma, que originan iones en las células neoplásicas y bajo la influencia de dicha radiación los iones pueden romper las hebras de ADN, dando lugar así a muchas mutaciones, lo que causa suficiente daño al ADN para eliminar directamente las células, o bien, para inducir muerte celular. Además la conservación de tejidos normales, una ventaja que presenta sobre la cirugía es que se pueden eliminar extensiones microscópicas del tejido tumoral que con la cirugía no se pueden extraer, pero al igual que la cirugía, la radioterapia no puede ser utilizada en el tratamiento de metástasis, ya que se corre el riesgo de dañar órganos sanos, en tales casos, los médicos recurren a la quimioterapia, que es la administración de drogas con actividad anticancerígena ^{5, 6}.

QUIMIOTERAPEUTICOS

En un paciente para eliminar a la mayoría de las células neoplásicas, es posible la utilización en tratamientos repetidos, drogas que son tóxicas selectivamente para las células en división; generalmente una pequeña proporción de ellas es resistente a la droga y el efecto que ha tenido el

tratamiento ha resultado ser el de favorecer la expansión y evolución de las células con esta característica ⁵.

Una gran parte de la investigación clínica se centra en el problema de cómo matar selectivamente las células cancerosas. Sólo existen algunas pequeñas diferencias bioquímicas entre las células tumorales y las normales de proliferación rápida. Los niveles de enzimas y las velocidades de reacción difieren ligeramente entre las células malignas y las normales, son estas pequeñas diferencias cuantitativas las que se aprovechan por los métodos de tratamiento actuales.

Actualmente existen numerosos fármacos antineoplásicos tanto de origen orgánico como inorgánico, sin embargo, la existencia de tumores refractarios a estos tratamientos, la elevada toxicidad de los existentes y su alto costo estimulan la búsqueda de nuevas moléculas que mejoren las características mencionadas.

Los antineoplásicos más comúnmente usados son la Mitomicina C y el Cis-Platino, sin embargo ambos tienen efectos secundarios muy severos, es por eso que fueron elegidos como testigos positivos para los experimentos.

MITOMICINA-C (MMC)

La mitomicina-C es derivada de la bacteria *Streptomyces caespitosus* (**figura1**). Es un antibiótico que, cuando es activado, actúa como un agente alquilante del ADN. Esto resulta en el desemparejo de las bases, rompimiento en la cadena del ADN, y uniones cruzadas de cadenas complementarias que previene la síntesis del ADN. La ARN polimerasa dependiente del ADN también es inhibida, disminuyendo la transcripción. Este agente puede llevar a mutaciones en el ADN.

La mitomicina-C se utiliza específicamente para tratar adenocarcinoma del estómago y del páncreas, ya que, desacelera o detiene el crecimiento de las

células cancerígenas en el cuerpo. Además también se usa para tratar el adenocarcinoma del colon y del recto; el carcinoma escamocelular de la cabeza y del cuello, de los pulmones y del cuello uterino; el adenocarcinoma y el carcinoma de las células del conducto de las glándulas mamarias; y el cáncer de vejiga.

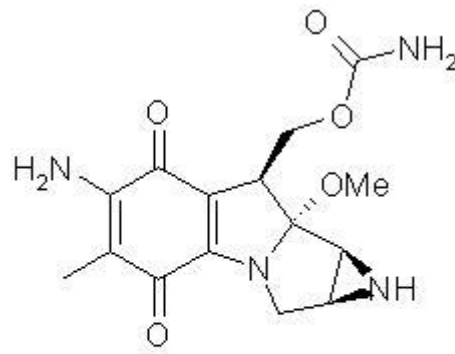


Figura 1. Estructura de la molécula de MMC extraída a partir de la bacteria *Streptomyces caespitosus*

Los efectos secundarios más severos que presenta la mitomicina-C son que puede causar una disminución en el número de células sanguíneas en la médula ósea y también puede causar daño renal.

CISPLATINO (CIS-P)

Avances significativos en el tratamiento de muchos tipos de cáncer han sido alcanzados por mejoras en las técnicas de radioterapia y el diseño de nuevas drogas.

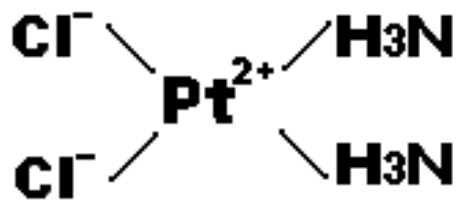


Figura 2. Estructura de la molécula de Cis-Platino en la cual se basaron para el diseño de las Casiopeínas.

El cisplatino es una de las drogas antineoplásicas más comúnmente usadas (**figura 2**), y ha probado ser efectivo en el tratamiento de una gran variedad de tumores sólidos, particularmente el de cáncer testicular. El cisplatino es un agente alquilante y ejerce su acción mediante la producción de aductos y enlaces intra e inter cadenas de ADN, generación de especies reactivas de oxígeno, activación de p53, etc

Desafortunadamente, el éxito clínico del cisplatino ha sido limitado por sus severos efectos secundarios en la función renal y por el descubrimiento de que muchas líneas celulares han desarrollado resistencia al compuesto.

COBRE

El Cobre (Cu) tiene un peso atómico de 63.54; número atómico de 29; densidad de 8.9 g/ml; punto de fusión de 2595 °C; su estado de oxidación es de 1⁺ y 2⁺. El cobre es un metal maleable, dúctil y un buen conductor de calor y electricidad.

El cobre es un metal esencial y es parte fundamental de muchas enzimas. El requerimiento diario de cobre ha sido estimado en 2 mg en humanos adultos.

Además es un metal de transición que es esencial en los sistemas biológicos, sus propiedades químicas le permiten la participación en procesos fundamentales que involucran la transferencia de electrones asociada a enzimas oxidativas. La concentración de cobre no excede de 10^{-15} M dentro de las células.

Cerca del 50 % del cobre ingerido vía oral es absorbido. La absorción es normalmente regulada por mecanismos homeostáticos. El cobre es encontrado en todos los órganos; y la concentración más alta en adultos y recién nacidos está en el hígado. La principal vía de excreción del cobre es la bilis y sólo un pequeño porcentaje se encuentra en la orina. Además su tiempo de vida media en el organismo es de 4 semanas.

La ingestión accidental de sales de cobre, usualmente de 15 a 75 mg causa malestar gastrointestinal. La inhalación de este metal puede causar irritación en el tracto respiratorio y fiebre. Efectos sistémicos, especialmente hemólisis, daño en hígado y riñón han sido reportados después de una gran ingestión de sales de cobre. La exposición crónica a este elemento aún no ha sido reportada en seres humanos.

El cobre en su estado de oxidación (II) puede coordinar ligantes siguiendo una geometría cuadrada plana o pirámide de base cuadrada. Son las características citadas las que llevaron a su selección como centro metálico para el diseño de los compuestos conocidos como Casiopeínas. Adicional a esto al ser un metal esencial se espera que su toxicidad sea menor que la de los compuestos de platino⁹.

CASIOPEÍNAS

Las Casiopeínas (figura3) son una familia de compuestos de coordinación de cobre (II) como centro metálico que en la esfera de coordinación presenta un ligante bidentado del tipo diimina (N-N) y otro que puede ser un aminoácido (N-O) o donador (O-O)

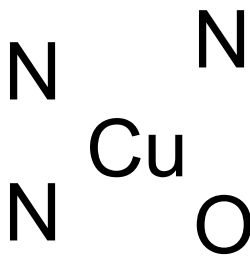


Figura 3. Estructura química general de los más de 100 compuestos de la familia de Casiopeínas

La familia de Casiopeínas fue diseñada pensando en que la planaridad en la geometría de la molécula y el ligante diimina, con carácter hidrofóbico, le conferirían la posibilidad de actuar como intercalante a través de interacciones con las bases púricas y pirimídicas del ADN y el ligante cargado le conferiría una polaridad necesaria para el transporte de la molécula. La naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el ligante diimina son responsables de la variación en la actividad biológica. El centro metálico por su parte puede participar en ciclos redox para liberar especies reactivas de oxígeno y que oxiden al DNA dando como resultado daños irreparables en su estructura, adicionalmente el cobre puede o no intercambiar alguno de sus ligantes para coordinarse directamente con los donadores por Nitrógeno de las bases formando enlaces similares a los observados con el Cis-platino , , ,

Las Casiopeínas son complejos de coordinación recientemente sintetizados que han sido considerados como una prometedora alternativa quimioterapéutica para el tratamiento de cáncer, desde que ha mostrado citotoxicidad y genotoxicidad en muchas líneas celulares y tumores xenotransplantados, además de acuerdo con algunos otros experimentos preeliminares han mostrado tener actividad antineoplásica tanto *in vivo*, como *in vitro* , , , .

Se tiene reportado que las Casiopeínas ejercen efectos teratogénicos y sobre la reproducción. Cuando la Casiopeína II-gly es administrada a ratones hembras de la cepa CD-1 durante la gestación, puede producir malformaciones esqueléticas y defectos al nacimiento. Además algunos trabajos sugieren que la Casiopeína IIgly es ligeramente genotóxica y tiene efecto citotóxico en

linfocitos humanos *in vitro*. Otros trabajos suponen que las Casiopeínas resultarían un estupendo agente antineoplásico, puesto que es capaz de inhibir la división celular sin incrementar considerablemente la cantidad de MN en células sanas.

Se ha visto que mecanismo de acción de las Casiopeínas puede deberse a su centro metálico, que se reduce de cobre (II) a cobre (I), ocasionando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como los radicales hidroxilo (OH) ó superóxido (O₂), los cuales pueden reaccionar con diferentes macromoléculas como los ácidos nucleicos, causando daño oxidativo dentro de la célula, que se observa como una alta frecuencia de MN y de ICHS

Casiopeína III-ia

De los mas de cien compuestos de casiopeínas, las mas prometedoras son las de la familia III, y de ellas la Cas III-ia (**figura4**).

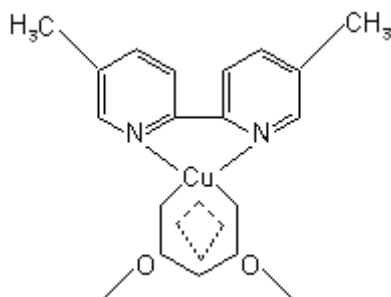


Figura 4. Estructura de la Casiopeína III-ia (acetil-acetonato)

- Nombre común: Casiopeína III-ia
- Clave: Cas III-ia
- Fórmula [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO₃*2H₂O

d) Fórmula condensada: $\text{CuC}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{19}2\text{H}_2\text{O}$

e) Peso molecular 444.93 g/mol (con dos moléculas de agua de cristalización)

f) Características:

1. Soluble en H_2O , EtOH, MetOH
2. No es estable por debajo de pH6
3. Estable en solución acuosa por 7 días

Soluciones amortiguadoras recomendadas: MOPS y TRIS

La Cas III-ia ha demostrado disminuir la viabilidad celular en líneas celulares HeLa, adenocarcinoma de pulmón SK-LU-1 y adenocarcinoma mamario MCF7. También se ha demostrado que la Cas III-ia tiene actividad antitumoral debida al bloqueo de la fosforilación oxidativa del compuesto¹¹. Algunos otros estudios realizados demuestran que, cuando se administra la Casiopeína III-ia en machos CD-1, se reduce la cantidad y motilidad de los espermatozoides, así como incrementa la frecuencia de anomalías espermáticas y consecuentemente disminuye la fertilidad²⁶.

La Casiopeína III-ia parece ser un compuesto muy prometedor en contra del cáncer, sin embargo es necesario conocer sus efectos en células sanas en algunos sistemas de prueba.

SISTEMAS DE PRUEBA

Los aspectos genotóxicos son abordados por la Toxicología Genética la cual se encarga del estudio sistemático de los efectos de los agentes físicos químicos y biológicos presentes en el ambiente, sobre el sistema genético del organismo, así como las consecuencias de tipo genético para el futuro de las especies. Mediante la Genética Toxicológica podemos evaluar la habilidad de las sustancias químicas para inducir cambios en el material hereditario, mediante una gran variedad de sistemas celulares de prueba.

Para evaluar el daño genético inducido por agentes físicos y químicos, varios sistemas de prueba han sido descritos en bacterias y células de mamíferos tanto *in vivo* como *in vitro* y en plantas³¹. Uno de estos sistemas de prueba es el cultivo de linfocitos humanos³¹, de los cuales los intercambios entre cromátidas hermanas (ICHs) y micronúcleos (MN) han sido los más extensamente estudiados^{31, 35}.

Ahora se sabe que las anomalías citogenéticas son de muchos tipos y son inducidas por gran cantidad de agentes por diferentes mecanismos, muchos de los cuales son parcialmente entendidos, pero restan algunos otros. En sistemas mamíferos, las anomalías cromosómicas han sido encontradas en casi todos los tipos de células o tejidos que pueden ser examinados. Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que las alteraciones citogenéticas pueden resultar debido a la exposición a químicos y a la radiación. La asociación entre alteraciones citogenéticas específicas y la formación de tumores es muy estrecha. Es por eso que se incluyen estudios citogenéticos en la evaluación toxicológica de químicos industriales, compuestos terapéuticos y nuevos fármacos descubiertos.

Los modelos donde se emplean células en cultivo, se utilizan principalmente para la evaluación de moléculas con actividad tóxica, dentro de la selección de ciertos compuestos con alguna actividad química. Estos modelos *in vitro* son muy prometedores para detectar los posibles efectos indeseables de los compuestos antes de ser empleados como medicamentos, y sobre todo para la elucidación de los mecanismos de acción³³.

Entre los diferentes métodos que existen para estudiar el daño producido al material genético, se encuentra la prueba de aberraciones cromosómicas (AC), micronúcleos (MN), e intercambio de cromátidas hermanas (ICHs), las cuales permiten visualizar daño de manera gruesa en los cromosomas.

LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO* COMO SISTEMA DE PRUEBA

Los linfocitos son células de la serie blanca de la sangre que media la respuesta inmune específica contra una molécula extraña (un antígeno). Los linfocitos B producen moléculas de anticuerpo. Los linfocitos T reconocen y responden contra moléculas extrañas que se presentan sobre la superficie de otras células y colaboran en la regulación del comportamiento de los linfocitos B ¹.

Ambos tipos de linfocitos derivan originalmente de las células madres hematopoyéticas pluripotenciales del embrión que forman, al diferenciarse, los linfocitos, como una de sus progenies más importantes.

El ciclo celular promedio de los linfocitos es de aproximadamente 24 h. Donde G1 tiene una duración aproximada de 12 h y el tiempo promedio de la fase de síntesis (S) del ADN en estas células es aproximadamente de 6 horas y G2 es de 4 h. La mitosis (profase, metafase, anafase y telofase), tiempo durante el cual los cromosomas son visibles, es de aproximadamente una hora.

Por su parte los estudios de individuos expuestos y de células en cultivo, han mostrado que los linfocitos humanos de sangre periférica son un indicador extremadamente sensible de cambios en la estructura cromosómica inducidos tanto *in vivo*, como *in vitro* ¹⁴. Dichos cambios en la estructura cromosómica ofrecen una evidencia morfológica de daño al material genético. A pesar de los problemas que existen en la extrapolación de los resultados *in vitro* a la situación *in vivo*, los linfocitos ofrecen las siguientes ventajas como sistema de prueba:

1. Se obtiene fácilmente un gran número de células humanas: en pocos ml de sangre periférica que se extraen fácil y repetidamente de un individuo se obtienen por cada ml de 1 a 3×10^6 linfocitos.

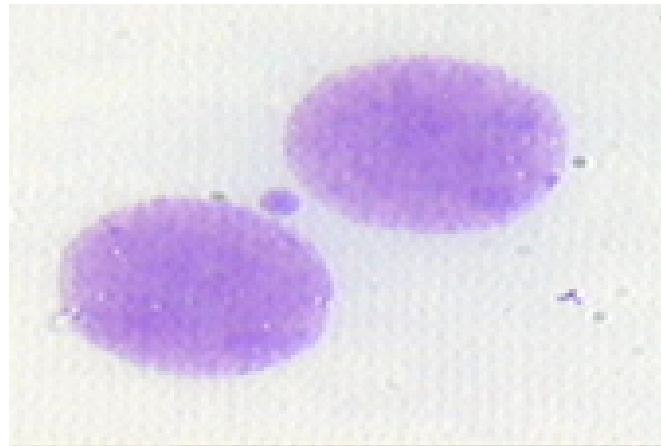
2. Los linfocitos se distribuyen en todo el cuerpo, circulando en todos los tejidos y tienen una vida larga.
3. Virtualmente todos los linfocitos de sangre periférica son una población celular sincronizada en el mismo estado G0 o G1 de la interfase, y en individuos sanos, estas células no se encuentran en proliferación mitótica *in vivo*.

Una proporción de los linfocitos puede ser estimulada por mitógenos para inducirlos a la división en cultivo, son fácilmente cultivables y esto provee de una fuente rápida de células en división para la evaluación de parámetros citogenéticos como las aberraciones cromosómicas numéricas (ACN) y estructurales (ACE) y los intercambios de cromátidas Hermanas (ICHs), el índice mitótico (IM), la cinética del ciclo celular (CCC), el índice de replicación (IR), tasa de proliferación linfocítica (TPL), cromosomas satelitados asociados (AS), etc.

MICRONÚCLEOS (MN)

Con el ensayo del bloqueo de la citocinesis, Fenech y Morley (1985) proveen a la comunidad científica de 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*. Lo que permite la observación de daño cromosómico causado por exposición a la radiación iónica o químicos carcinogénicos. Es por eso que la técnica de MN ha sido usada como indicador de daño cromosómico desde hace más de 20 años. El ensayo de Micronúcleos en células binucleadas es actualmente el método más comúnmente usado para medir la frecuencia de MN en linfocitos humanos *in vitro*.

Micronúcleo



Núcleos

Citoplasma

Figura 5. Fotomicrografía de un micronúcleo entre dos núcleos de un linfocito binucleado (100x).

Los micronúcleos son formados por la pérdida de cromosomas completos o porciones de cromosomas que no fueron incluidos en los núcleos principales de las células hijas durante la mitosis, y son frecuentemente usados para identificar exposición a químicos o a radiación (figura5). Comparado con otras pruebas citogenéticas, el ensayo de micronúcleos tiene muchas ventajas, incluyendo la rapidez y facilidad del análisis y el no-requerimiento de que la célula se detenga en metafase³⁹.

Los fenómenos básicos para la formación de MN en células mitóticas son el rompimiento cromosómico y la disfunción en el aparato mitótico, los MN pueden estar formados por cromosomas acéntricos o fragmentos cromosómicos que escaparon a la incorporación de los núcleos de las células hijas⁴⁸, y aparecen como pequeños núcleos adicionales en el citoplasma de células en interfase.

Las células más frecuentemente analizadas para este tipo de ensayo son las del sistema hematopoyético, linfocitos y eritrocitos. Otro tipo de células que también pueden ser examinadas en humanos son las células uroteliales y células exfoliadas de la boca y mucosa nasal³⁹. Muchos mecanismos diferentes están involucrados en la formación de micronúcleos incluidos el rompimiento cromosómico (clastogénesis) y la interrupción del huso (aneuploidogénesis), además son eventos importantes en la aparición del cáncer y el envejecimiento, , .

Hasta hace algunos años se manejaba la teoría de que un micronúcleo grande era causado por una interrupción en el huso y podría contener un cromosoma completo, mientras que, pequeños micronúcleos consistirían de uno o más fragmentos cromosómicos. Aunque es cierto que existe cierta relación entre el tamaño de los micronúcleos y el mecanismo de origen de los mismos, ahora sabemos que es imposible determinar su formación a partir de su tamaño³⁹.

En el ensayo de micronúcleos con células binucleadas, las células que han completado una división nuclear son bloqueadas en la citocinesis usando Citocalacina-B (Cit-B) y son por consecuencia fácilmente identificadas por su apariencia binucleada (figura6). La Cit-B es un compuesto tóxico que inhibe a la actina, encargada de la formación del anillo contráctil que separa al citoplasma para la formación de las células hijas^{51,52}.

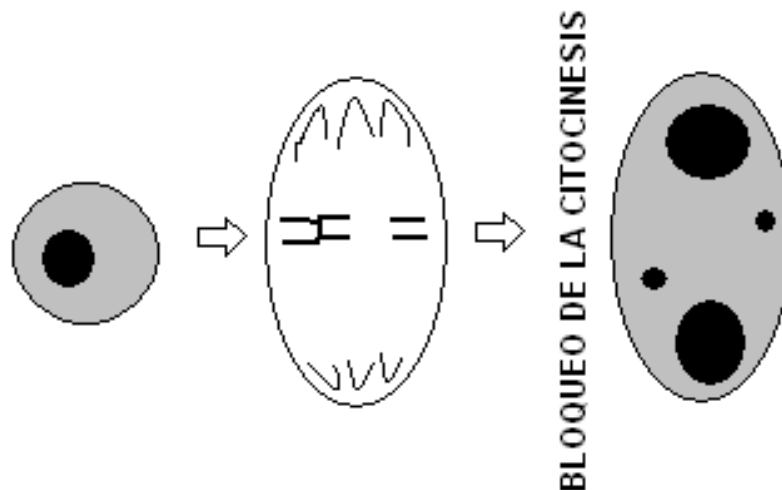


Figura 6. Esquema de una célula binucleada con dos micronúcleos, que pueden haber sido originados a partir de un cromosoma completo y fragmentos de un cromosoma⁴⁷ .

El análisis de micronúcleos (MN) ha ido ganando popularidad como una prueba de genotoxicidad *in vitro* y como biomarcador de exposición genotóxica en humanos. Esto se debe a que en comparación con la prueba de aberraciones cromosómicas (AC), el conteo de MN es más simple, requiere menor tiempo de entrenamiento para su evaluación y el conteo es más sencillo, además es estadísticamente más sensible que la prueba de AC⁵⁰.

El ensayo de MN en células binucleadas fue elegido porque es una prueba muy sensible y rápida, además brinda información invaluable de genotoxicidad *in vitro* y adicionalmente la información obtenida se puede extrapolar para predecir riesgo en la salud humana⁴⁷.

Intercambio de cromátidas hermanas (ICHs)

Muchos compuestos catalogados como mutágenos-carcinógenos y los clastógenos no mutagénicos son capaces de inducir intercambios de

cromátidas hermanas (ICHs) en células humanas y su actividad inductora es aproximadamente paralela a su actividad mutagénica en sistemas de prueba bacterianos.

	G1	S	G2	M	
A)					PRIMER CICLO
B)					SEGUNDO CICLO
C)					SEGUNDO CICLO

Figura 7. Incorporación de Brdu (-----) en cromosomas de linfocitos humanos, durante dos ciclos de replicación: (A) primer ciclo, (B) segundo ciclo, (C) segundo ciclo mostrando un intercambio terminal (T) e intersticial (I).

Sin embargo este hecho no significa necesariamente que todos los humanos respondan similarmente a un mutágeno o un clastógeno particular, debido a que se sabe que la habilidad de los seres humanos para metabolizar estos agentes químicos y reparar el daño inducido por ellos es muy heterogénea. Como ejemplos extremos tenemos a las células del Síndrome de Bloom y Xeroderma pigmentosum, donde ambas enfermedades predisponen al cáncer, muestran una frecuencia alta y espontánea de ICHs y son susceptibles a la inducción de estos por luz UV.

Durante la fase S del ciclo celular, el ADN es replicado, y cada cromosoma se duplica en dos cromátidas hermanas, las cuales están unidas por un delgado centrómero. Las cromátidas hermanas son claramente distinguibles citológicamente en profase tardía y metafase temprana de la mitosis. Los ICHs son el proceso donde las cromátidas hermanas se rompen y vuelven a reunirse intercambiando físicamente sus regiones (figura7)⁶¹, es decir son el reflejo del daño al ADN, inducido por agentes químicos mutagénicos, carcinogénicos, ultrasonido, luz UV, radiación ionizante, desnutrición y temperatura entre otros⁶¹.

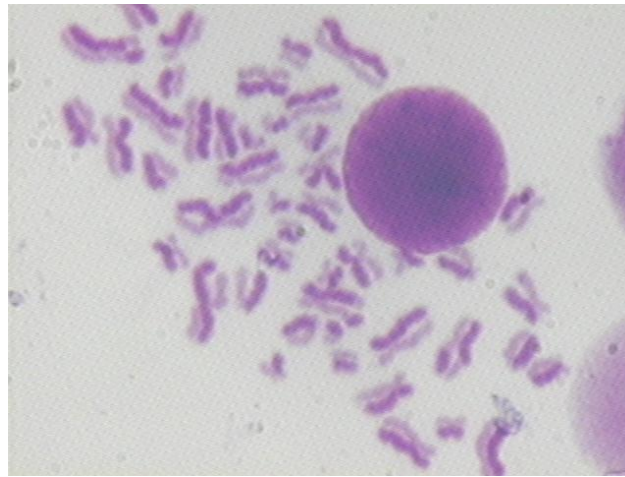


Figura 8. Se observa intercambios entre cromátidas, en A se observa un intercambio sencillo (a 100x)

Los ICHs son transposiciones simétricas en el mismo locus entre las cromátidas de un mismo cromosoma (figura8), que no producen alteraciones estructurales y su frecuencia es utilizada como un indicador de daño producido al material genético y su análisis ofrece la posibilidad de ensayos rápidos, sensibles y cuantitativos empleando dosis de 10 a 100 veces menores que las utilizadas en aberraciones cromosómicas.

Los ICHs han sido comúnmente empleados para evaluar las respuestas citogenéticas a la exposición química y han establecido excelentes relaciones dosis-respuesta para cientos de químicos en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los ICHs pueden ser evaluados en cualquier célula eucariótica capaz de crecer en presencia de bromodesoxiuridina (BrdU), detenida en metafase y en segundo ciclo celular; además han sido evaluados en sistemas *in vivo* e *in vitro* así como en humanos, animales de laboratorio y plantas³⁹.

La 5'-bromodesoxiuridina (BrdU) es un análogo de la timidina que se incorpora selectivamente dentro del ADN durante la fase de síntesis.

La inducción de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) ha sido descrito como una rápida y sensible prueba de clastogenicidad. Un incremento en la frecuencia de ICHs puede ser un indicador persistente de daño al ADN .

JUSTIFICACIÓN

Particularmente en México la necesidad de importación de fármacos antineoplásicos incrementa su costo, lo cual los hace inaccesibles a la mayoría de la población; por lo que el desarrollo de productos con tecnología mexicana adquiere prioridad.

Debido a esto, a finales de la década de los 70's en la Facultad de Química (UNAM) el grupo de trabajo de la Dra. Lena Ruíz inició un proyecto encaminado al desarrollo de fármacos antineoplásicos a partir de metales de transición, de preferencia esenciales biológicamente, con el propósito de disminuir su toxicidad y costo. El cobre en su estado de oxidación (II) puede coordinar ligantes siguiendo una geometría cuadrada plana o pirámide de base cuadrada. Son las características citadas las que llevaron a su selección como centro metálico para el diseño de las Casiopeínas.

La familia de compuestos Casiopeínas es un grupo de compuestos de coordinación de cobre (II), como centro metálico, que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diimina (N-N-) y otro que puede ser un aminoacidato o donador (O-O).

El desarrollo de las Casiopeínas que son compuestos con cierta actividad antiproliferativa, han mostrado ser menos tóxicas y de menor costo en comparación con otros agentes utilizados en la quimioterapia. Entre estos compuestos se encuentra la Casiopeína III-ia, que es una de las que ha mostrado mayor actividad antineoplásica, sin embargo, es necesario realizar estudios de Toxicología Genética para conocer sus efectos en células sanas.

HIPÓTESIS

La planaridad en la molécula de Casiopeínas y las características de sus ligantes, le confieren la interacción con el ADN. El centro metálico por su parte participa en ciclos redox resultando en daños irreparables similares a los observados con el Cis-platino, por ello se espera que la Casiopeína III-ia tenga efecto citostático, citotóxico y ligeramente genotóxico en linfocitos humanos *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los daños citostáticos, citotóxicos y genotóxicos en linfocitos *humanos in vitro* tratados con un nuevo compuesto antineoplásico hecho a base de cobre denominado Casiopeína III-ia (en tres diferentes concentraciones 4.2, 8,4 y 12.6 µg/ml) mediante la técnica de micronúcleos (MN) e Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs).

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Evaluar los efectos citostático y citotóxico mediante el Índice de División Nuclear (IDN), de la Cinética de proliferación celular (CPC), así como el Índice Mitótico (IM), respectivamente.
- b) Determinar el efecto clastógeno de la Casiopeína III-ia mediante la técnica de micronúcleos.
- c) Evaluar el efecto genotóxico de la Casiopeína III-ia mediante la metodología de tinción diferencial de cromátidas hermanas (ICHs).

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de linfocitos humanos.

A partir de donadores humanos clínicamente sanos, se extraen por punción venosa 5ml de sangre periférica con una jeringa heparinizada. Posteriormente 0.5ml de esta sangre se cultiva en 4.75 ml de medio RPMI (Sigma) suplementado con 0.5µg/ml fitohemaglutinina Sigma y se incuba durante 72 horas a 37° C en la oscuridad.

Técnica de MN

Tratamiento. A las 44 horas de haberse iniciado los cultivos se agrega Cis-Platino (0.1µg/ml), Mitomicina-C (0.2µg/ml) y $\frac{1}{2}$ (4.2µg/ml), $\frac{1}{4}$ (8.4µg/ml) y $\frac{3}{4}$ (12.6µg/ml) de las dosis inhibitoria media (LC₅₀) de Casiopeína observada para líneas celulares HeLa y CaLo, (16.84 µl/ml para Casiopeína III-ia), luego de 48 horas se adiciona solución de Citocalacina (Cit-B) (6µg/ml).

Cosecha. Veinticuatro horas después de aplicada la Cit-B las muestras se centrifugan a 1500 rpm, durante 5 minutos. Una vez que se ha retirado el sobrenadante el paquete celular se somete a choque hipotónico 5 ml (KCl 0.075M) a 37° C. durante 10 min, después de lo cual se centrifuga nuevamente. La fijación de las células se hace con una solución metanol-ácido acético en una proporción 3:1 efectuando 3 cambios de 15, 10 y 5 minutos. Posteriormente se realizan lavados con fijador (en proporción 85:15) centrifugando las muestras en cada cambio. En la última fijación, se adicionan 0.5ml de la mezcla para que el paquete de linfocitos permanezca en solución. Las preparaciones se hacen por goteo, (3 laminillas por cultivo).

Tinción. Con colorante May Grünwald (en agua destilada 2:1), y finalmente con Giemsa 10% (durante 10 min con cada colorante y alternadamente), después de la cual se lavan y se dejan secar las laminillas.

Técnica de ICH's.

Tratamiento. A las 24 horas de iniciados los cultivos, se adiciona 0.1ml de una solución de 5-bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma) en una concentración 5µg/ml. A las 48 horas se agregan los tratamientos de Casiopeína III-ia (4.2, 8.4 y 12.6µg/ml), Cis-platino (0.1µg/ml) y Mitomicina-C (0.2µg/ml), para adicionar a las 70 horas 0.1ml de colcemida (4µg/ml) y dejar actuar 2 horas.

Cosecha. Una vez transcurrido este tiempo los cultivos se centrifugan a 1000rpm durante 5 min y el paquete celular se somete a choque hipotónico con una solución de KCl por 20 min a 37° C. posteriormente se realiza otra centrifugación y cambios de la mezcla fijadora 20, 15 y 10 min. Se hacen preparaciones por goteo y se dejan secar al aire.

Tinción. Las preparaciones se irradian con luz UV por 20 min sumergidas en una solución acuosa, posteriormente se incuban con una solución doblemente salina (2XSSC) durante 20 min a 50° C. Finalmente las preparaciones se lavan y tiñen con una solución de Giemsa al 10% durante 10 min, después se lavan en agua corriente y se dejan secar al aire.

Evaluaciones

Frecuencia de micronúcleos (FMN). Se evalúan en 6000 células binucleadas en las que se cuenta la cantidad de células con micronúcleo(s) y sin ellos. Para establecer diferencias estadísticas se compara contra el testigo negativo (T⁻), y se aplica la prueba de ji cuadrada con corrección de Yates (χ^2_Y).

Porcentaje de células multinucleadas. Se obtiene al evaluar células polinucleadas, calculando la proporción de células mono, bi, tri y tetranucleadas en total de 3000 células.

Nota: La evaluación de los micronúcleos se llevó a cabo en un microscopio de luz a 100x y a doble ciego, mientras que las células multinucleadas se observaron a 20x y a doble ciego.

Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs): Se evalúa en 180 metafases en segundo ciclo, contando la cantidad de intercambios en cada metafase. La prueba estadística aplicada es “t” de student.

Cinética de proliferación celular (CPC). Se evalúa en 2000 células tomando en cuenta la cantidad de las mismas en 1º, 2º y 3º ciclo de división.

Índice Mitótico (IM). Se evalúa en 6000 células señalando el número de estas en metafase y en interfase.

Dónde:

- Cel. división.- células en división
- N.- total de células evaluadas.

La prueba estadística aplicada para la evaluación de Células multinucleadas, CPC, e IM es “z” para proporciones.

RESULTADOS

Porcentaje de células multinucleadas

En la **tabla 1** se observa que el porcentaje de células en división se ve disminuido de manera significativa ($p < 0.01$ y $p < 0.05$), en las concentraciones de 8.4 y 12.6 $\mu\text{g/ml}$ de Casiopeína III-ia en relación con el testigo negativo. En la **figura 9** esta representado el porcentaje de células binucleadas en el testigo negativo, positivos y tratamientos, en los cuales se observa claramente que la cantidad de células binucleadas es menor en las concentraciones media y alta de Casiopeína III-ia (8.4 y 12.6 $\mu\text{g/ml}$). Mientras que para los testigos positivos la mayoría de las células observadas presentan una marcada disminución ($p < 0.005$) **tabla 1**.

Frecuencia de micronúcleos

En la **tabla 1** se observa que la Casiopeína III-ia aumenta la frecuencia de MNs de manera significativa en 4.2 ($p < 0.01$), 8.4 y 12.6 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.0005$) con 28, 37 y 49 MNs respectivamente, comparando con el testigo negativo que sólo presenta 11 MNS.

Además en la **figura 10** se observa el comportamiento dosis-respuesta de la Casiopeína III-ia sobre los linfocitos.

Tabla 1. Porcentaje de células multinucleadas y frecuencia de micronúcleos.

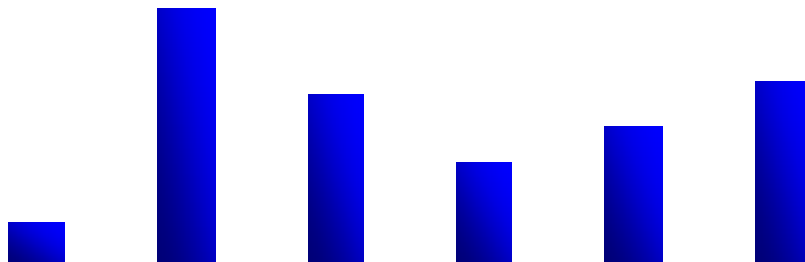
Tratamiento ($\mu\text{g/ml}$)	PORCENTAJE DE CELULAS MULTINUCLEADAS				MNs	
	Mono \pm DS	Bi \pm DS	Tri. \pm DS	Tetra. \pm DS	FMNs \pm	DS
T-	7.98 \pm 4.11	59 \pm 12.8	12.5 \pm 5.2	20.5 \pm 6.8	11 \pm	0.6
MMC 0.2	45.4 \pm 0.3C	24.4 \pm 11.7 C	14.9 \pm 0.8 C	15.4 \pm 1.4 C	69 \pm	6.5**
Cis-P 0.1	42.1 \pm 7C	30.1 \pm 7 C	13.6 \pm 1 C	14.2 \pm 2.3 C	46 \pm	5.7**
CasIII- ia 4.2	16.8 \pm 18.23	62. \pm 10.2	9.2 \pm 6.3	11.4 \pm 8.3	28 \pm	2.5*
CasIII- ia 8.4	23.8 \pm 11.1A	56.3 \pm 24 A	9.3 \pm 4.3 A	10.7 \pm 5.7 A	37 \pm	2.1**
CasIII- ia 13	29.6 \pm 4.7B	50.5 \pm 16.8 B	9.8 \pm 0.4 B	10.2 \pm 1.3 B	49 \pm	3.1**

* $p < 0.01$, ** $p < 0.0005$ VS T- con

A $p < 0.05$, **B** $p < 0.01$, **C** $p < 0.0005$ VS T- con

Tabla 1. La tabla muestra el tratamiento utilizado en cada experimento, la concentración utilizada ($\mu\text{g/ml}$), el porcentaje de células multinucleadas (mono, bi, tri y tetranucleadas) \pm desviación estándar y la frecuencia de micronúcleos \pm desviación estándar (**FMNs \pm DS**). La cantidad de células multinucleada evaluadas fue de 3000 en total y para la frecuencia de micronúcleos se evaluaron 6000 células binucleadas.

desviación estándar. A, $p < 0.05$, B $p < 0.01$, C $p < 0.0005$ VS T- con $p < 0.05$ VS T- con χ^2



tres diferentes concentraciones de Casiopeína III-ia. A $P < 0.01$; B $P < 0.0005$ VS T- con χ^2

Figura 9. En la figura se observa el porcentaje de células con dos núcleos (binucleadas), así como su

Figura 10. Frecuencia de MN en células binucleadas de linfocitos humanos *in vitro* tratados con MMC, Cis-Platino y

Intercambios de cromátidas hermanas (ICHs)

La **tabla 2** muestra que la cantidad máxima de intercambios pertenece a la concentración más alta de Casiopeína III-ia (12.6 µg/ml) con 15 intercambios, le sigue la concentración media (8.4 µg/ml) con 13 ICHs y por último la concentración baja (4.2 µg/ml). La **figura 11** se representa la media de ICHs por célula. En la cual se aprecia que la concentración de 4.2 µg/ml tiene 4.18 intercambios, la concentración 8.4 µg/ml presenta 4.88 ICHs y la de 12.6 tiene 5.55 intercambios. Además es posible ver el comportamiento dosis-respuesta de los linfocitos a la Casiopeína III-ia.

Cinética de proliferación celular (CPC)

En la **tabla 2** se observa disminución significativa de la división celular en las tres concentraciones de Cas III-ia (4.2, 8.4 y 12.6µg/ml) con respecto al control negativo; lo cual se representa en la **figura 12**, donde se observan la cantidad de metafases en 1º, 2º y 3º ciclo de división y en dónde se nota que es menor la cantidad de metafases que llegaron al 3º ciclo. Es importante mencionar que se sigue un comportamiento dosis-respuesta.

Índice mitótico (IM)

La última columna de la **tabla 2** muestra que el índice mitótico se ve disminuido significativamente ($p < 0.05$) en la concentración más elevada de Cas III-ia (12.6 µg/ml) con un índice de 2.37 comparado con el testigo negativo que es de 5.16; mientras que, para las concentraciones media y baja (4.2 y 8.4 µg/ml) se ve disminuido pero no de manera significativa. En la **figura 10** se observa que el índice mitótico va disminuyendo conforme aumenta la concentración de Casiopeína III-ia.

Tabla 2. La frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas, Cinética de Proliferación Celular e Índice Mitótico producido por Casiopeína III-ia en linfocitos humanos *in vitro*

Tratamiento ($\mu\text{g/ml}$)	Min- max (ICHs)	ICHs		Cinética de Proliferación Celular						IM \pm DS	
		/cel \pm	DS	M1 \pm DS	M2 \pm DS	M3 \pm DS	IM \pm	DS			
T-	0-4	1.59 \pm	1.1	46.5 \pm 4.72	70.5 \pm 1.5	83.0 \pm 2.52	5.16 \pm	6.0			
MMC	0,2	28.71 \pm	8.3 *	38.5 \pm 1.5	108.5 \pm 4.35	97.0 \pm 2.89 A	1.475 \pm	0.4 $\clubsuit\clubsuit$			
Cis-P	0,1	16.56 \pm	6.25 *	57.0 \pm 3.6	101.0 \pm 1.91	89.5 \pm 4.99 A	3.25 \pm	0.2 \clubsuit			
CasIII-ia	4,2	4.18 \pm	2.03 *	63.0 \pm 4.7	91.5 \pm 1.5	58.5 \pm 2.22 A	4.625 \pm	0.6			
CasIII-ia	8,4	4.88 \pm	2.45 *	62.5 \pm 2.5	98.0 \pm 2.94	70.0 \pm 3.16 A	4.375 \pm	1.2			
CasIII-ia	12,6	5.55 \pm	2.45 *	52.5 \pm 2.1	109.0 \pm 4.04	79.0 \pm 5.26 A	2.375 \pm	0.4 \clubsuit			

* P < 0,0005 vs T- ("t" student)
A P < 0,0005 con X²
 \clubsuit P < 0,05, $\clubsuit\clubsuit$ P < 0,0005 VS T- (Z para proporciones)

Tabla 2. La primera columna de la tabla presenta el tratamiento, concentración ($\mu\text{g/ml}$), mínimo y máximo de intercambios por ensayo (**Min-max**), Intercambios de Cromátidas Hermanas por célula \pm Desviación Estándar (**ICHs \pm DS**), n° de metafases en primero, segundo y tercer ciclo (**M1**, **M2**, **M3**) en la Cinética de Proliferación Celular y por último Índice Mitótico \pm Desviación Estándar (**IM \pm DS**). Se muestra la prueba estadística aplicada.

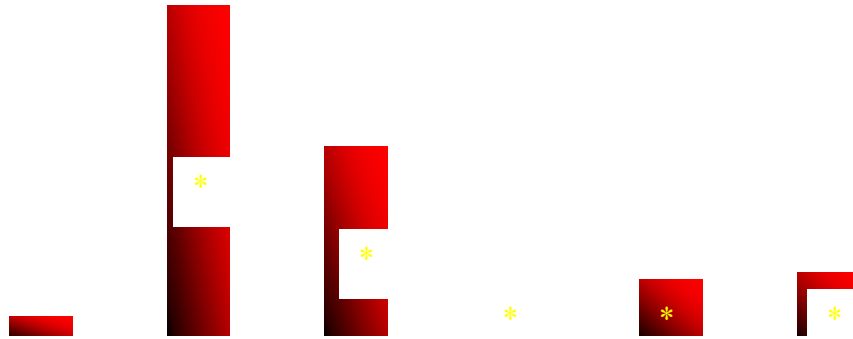


Figura 11. Intercambio de Cromátidas Hermanas observado en metafases de linfocitos humanos *in vitro* tratados con MMC, Cis-P y tres concentraciones de Casiopeína III-ia. * P < 0.0005 VS T- con "t" de student

ses de linfocitos humanos *in vitro* tratados con MMC, Cis-P y tres concentraciones de Casiopeína III-ia. * P < 0.0005 VS T- con "t" de student

Figura 12. Cinética de proliferación celular en linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres diferentes concentraciones de Cas III-ia, donde se observan la cantidad de células en 1º, 2º o 3º ciclo de replicación en el control negativo, testigos positivos (MMC y Cis-P). A P < 0.0005 VS T- χ^2

focitos humanos *in vitro* tratados con tres diferentes concentraciones de Cas III-ia, donde se observan la cantidad de células en 1º, 2º o 3º ciclo de replicación en el control negativo, testigos positivos (MMC y Cis-P). A P < 0.0005 VS T- χ^2

Índice Mitótico

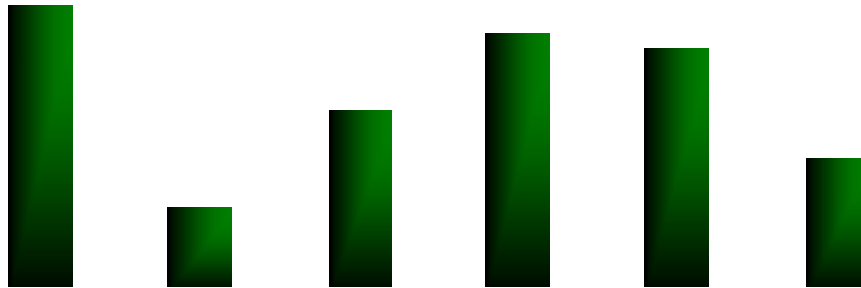


Figura 13. Índice Mitótico observado en linfocitos humanos *in vitro* tratados con MMC y Cis- P como testigos positivos y tres concentraciones de Casiopeína III-ia. A $P < 0.05$, B $P < 0.002$ VS T- con Z para proporciones

DISCUSIÓN

En este estudio se investigaron los efectos citostático, citotóxico y genotóxico de la Casiopeína III-ia, en cultivos de linfocitos humanos por medio del análisis de MN e ICHs respectivamente; para lo cual, se utilizaron tres concentraciones diferentes de Cas-III-ia 4.2, 8.4 y 12.6 µg/ml correspondientes a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y $\frac{3}{4}$ de la CI50 (concentración inhibitoria media) del compuesto. Comportamientos dosis-respuesta se observaron en la mayoría de los resultados, los cuales se discutirán a continuación.

Citostaticidad

El porcentaje de células multinucleadas, es un parámetro que nos da información acerca del efecto citostático que tiene un agente químico; es decir, como fue la división nuclear en nuestros cultivos y los tratamientos. La Casiopeína III-ia demostró tener efectos citostáticos lo cual se aprecia mediante el análisis del porcentaje de células multinucleadas, y lo que se pudo mostrar es que la división del núcleo se detiene de manera significativa, lo que nos indica que el ciclo celular esta siendo alterado. Probablemente debido a que hay un problema en alguna de las fases del ciclo celular, provocado por el compuesto, lo cual impide la correcta progresión del ciclo celular, dichos efectos pueden ser causados por muchos sucesos, algunos de ellos son: que exista un bloqueo en la fase G2, la cual previene a la célula de entrar en mitosis o puede ser causado por un decrecimiento en los niveles de ATP por daño en la mitocondria, ya que uno de los blancos principales de la Casiopeína III-ia es la mitocondria, el cual es un organelo en el que se produce la fosforilación oxidativa y se sintetiza la mayor cantidad de ATP de la célula eucariota. De tal manera que la Casiopeína III-ia afecta los sitios de formación de ATP en la mitocondria, inhibiendo así la energía del metabolismo¹², lo que afecta directamente a la progresión normal del ciclo celular. Otra de las causas puede ser por la inhibición de ciertas proteínas específicas del ciclo celular o enzimas que inhiben la síntesis de ADN durante la

fase S; lo cual llevará a la célula a detenerse ³³ para reparar el “error”. Esto podría ser la causa del daño citostático observado en los cultivos tratados con Casiopeína III-ia en este trabajo.

Citotoxicidad

Aunado a lo que se mencionó en el punto anterior, se sabe que algunos metales y compuestos químicos en general, tienen la propiedad de modificar el proceso de división celular, el análisis del Índice Mitótico (IM) y de la Cinética de Proliferación Celular (CPC) son evidencia y ponen al descubierto la existencia de aquellas alteraciones que entorpecen la progresión del ciclo celular, puesto que una disminución del IM y de la CPC, generalmente es consecuencia de una reducción en el promedio de las células en división⁴⁵, .. Sin embargo, esta disminución también puede ser ocasionada por la pérdida permanente de la capacidad para proliferar, observada como citostaticidad que finalmente conduce a la muerte celular o citotoxicidad . . En este caso el IM y la proliferación celular se vieron disminuidas conforme aumentó la concentración de Casiopeína III-ia, lo que nos lleva a pensar que el ciclo celular se ve disminuido con respecto al control negativo, por lo que es evidente el efecto citotóxico del compuesto. Estos datos coinciden con lo observado por Roldán³⁰, quién trabajó con varias y diferentes concentraciones a las trabajadas en este proyecto, de la Casiopeína III-ia, mostró que el IM y la CPC se ven disminuidas bajo los efectos de la Casiopeína III-ia. Así mismo, Atilano (2007), también observa una drástica disminución en la cantidad de metafases observadas en los cultivos tratados con Casiopeína II-gly, y donde es evidente la citotoxicidad del compuesto, además García (1991), reporta que las Casiopeínas presentan una baja cinética de proliferación celular e índice mitótico, por lo tanto el abatimiento del IM y CPC se deben a la citostaticidad del compuesto, que posteriormente llevara a la citotoxicidad de aquellas células que no fueron capaces de reparar el daño al ADN nuclear de la célula. Éste daño puede ser inducido por reacciones de óxido-reducción, en las cuales pueden

participan los quelatos de cobre. Ya que en otros trabajos se ha encontrado que el cobre (II), al igual que otros metales, es capaz de detener a la célula en la **fase G1** del ciclo celular y posteriormente inducir **apoptosis**, así mismo, Carvalho (2007) encontró que la **apoptosis** es uno de los mecanismos relacionados con la inducción de muerte en células de carcinoma de colón por Cas III-ia, estando estos mecanismos relacionados con la mitocondria²⁸. Es por eso que sugerimos que todos los mecanismos antes mencionados están relacionados con la citotoxicidad de la Casiopeína III-ia sobre los linfocitos humanos *in vitro*.

Clastogenicidad y Genotoxicidad

El ensayo de micronúcleos ha sido diseñado como un marcador real y sensible de daño citogenético, ya que los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que quedaron fuera de los dos núcleos principales durante la división nuclear de la mitosis y aparecen como pequeños núcleos adicionales en el citoplasma de la célula en interfase. Por lo tanto el ensayo de MNs detecta clastogenicidad (rompimiento cromosómico) y/o aneugenicidad (cromosomas perdidos debido a la disfunción en el aparato mitótico y/o centrómero). Por lo tanto, el origen de los micronúcleos encontrados en este trabajo pueden deberse a anomalías cromosómicas que son consecuencia directa de daño al ADN por la Casiopeína III-ia, es decir que la estructura cromosómica está incompleta, evidencia que indica que las anomalías cromosómicas son consecuencia directa y manifestación de daño a nivel del ADN, por ejemplo los rompimientos cromosómicos pueden ser el resultado de rompimientos de cadena doble. Lo que sugiere que las Casiopeínas,⁶⁹ son compuestos capaces de producir rompimientos de doble cadena (RCD), que anteriormente se presentaron como rompimientos cadena sencilla (RCS), los cuales son el origen de deleciones o rompimientos cromatídicos, que son observados como daño cromosómico causado por exposición a la Casiopeína

III-ia, y que ocasionó alteraciones al material genético de los linfocitos humanos cultivados, visualizado como micronúcleos en los tratamientos.

Así mismo, la prueba de ICHs es un método rápido y sensible para la detección de daño cromosómico, que nos provee de un ensayo poderoso para detectar químicos mutágenos. Por lo tanto sugerimos que el incremento significativo en todas las concentraciones probadas de Casiopeína III-ia en los cultivos de linfocitos humanos, se iniciaron con el rompimiento de una de las cadenas de ADN, explicados mediante el modelo de Wilson y Thompson (2007), que implican a los rompimientos de cadena sencilla (RCS) como el primer intermediario genético en la naturaleza de los ICHs. Ya que si una célula no lleva a cabo de manera adecuada la reparación de RCS y continúa con la progresión de la replicación se convierte en rompimiento de cadena doble (RCD), lo que a su vez conduce a incrementar la frecuencia de ICHs⁶¹. El mecanismo más aceptado, por el cual ocurren los ICHS es a través de la recombinación homóloga que comienza con el rompimiento en la horquilla de replicación del ADN, en el cual se encuentra un nick o un gap en una de las cadenas molde, lo cual sugiere primordialmente la incapacidad de la célula para reparar eficientemente lesiones resultantes en horquilla de replicación y la iniciación de la reparación en la recombinación homóloga,.

Otros estudios realizados con compuestos que inducen incremento en la frecuencia de ICHs y aberraciones cromosómicas de manera dosis-dependiente en cultivos de sangre periférica en humanos, son reportados como clastógenos y posibles genotóxicos en humanos, tal es el caso de compuestos organofosfatados (pesticidas como el Afugan); por lo tanto, a pesar de que la Casiopeína III-ia no tiene relación química con los compuestos antes mencionados, es evidente que muestra un comportamiento parecido (en todas las concentraciones utilizadas en este trabajo), lo que nos apoya en la propuesta de que la Casiopeína III-ia es **clastógena** y por lo tanto **genotóxica**.

Es por eso que se puede deducir que el daño provocado por la Casiopeína III-ia a los linfocitos humanos es directo al ADN, y se presenta como RCS que posteriormente conducirá a un RCD, debido a la incapacidad de la célula para reparar el daño y, a la continuación del proceso de replicación.

Es importante señalar que el hecho de que todas las concentraciones de Casiopeína III-ia hayan resultado significantes para el estudio de ICHs y para MN también puede ser debido a que la molécula de Casiopeína III-ia interacciona más específicamente con los ácidos nucleicos, ya que se ha visto que el tamaño, forma y polaridad de la molécula, así como los sustituyentes y la naturaleza química de los átomos presentes interacciona con el material genético del núcleo, de tal manera que, se establecen enlaces de apilamiento con los sustituyentes de la molécula de Casiopeína III-ia, es decir por un lado entre la biperidina y una adenina y por el otro entre el ciclo formado por el acetilacetato y otra molécula de adenina, lo cual nos lleva a pensar que estos complejos tendrán un mecanismo de acción de intercaladores, distorcionando.

En trabajos anteriormente realizados se ha encontrado que cuando se relaciona la toxicidad del Grupo III de la familia de Casiopeínas, a la cual pertenece la Casiopeína III-ia se observa que las líneas celulares HeLa son más sensibles que los linfocitos¹⁹. Lo que es un punto a favor de la Casiopeína III-ia, ya que a pesar de ser tóxica para los linfocitos humanos ha mostrado que algunas líneas celulares son mucho más sensibles al compuesto, además ha manifestado cubrir los requerimientos de función antitumoral y retraso específico del crecimiento en cáncer cérvico-uterino, por lo que probablemente podría ser un buen candidato para el tratamiento en contra del cáncer. Sin embargo, es necesario seguir haciendo estudios para que el compuesto pueda ser recetado a pacientes con cáncer, ya que la toxicología genética sólo cubre una pequeña parte del total de evaluaciones que debe cumplir un compuesto para ser administrado al hombre, en estudios clínicos.

En base a nuestros resultados y a estudios previos, sugerimos que la Casiopeína III-ia tiene más de un mecanismo de acción para dañar a la célula, ya sea por apilamiento con la adenina, o por RCS imposibles de reparar (en algunos casos), y que posteriormente llevaran a un RCD, o por generación de especies reactivas de oxígeno, o por daño a la mitocondria, lo cual llevara a la célula a morir, ya sea por apoptosis o necrosis. Aunque, cabe mencionar que Carvalho (2007)²⁸, encontró que la Casiopeína III-ia es capaz de inducir muerte celular por apoptosis, que es un proceso benigno, mediante el cual los núcleos de la células se encogen, y con frecuencia se fragmentan; de tal manera, que pueden ser eficientemente fagocitadas por macrófagos o por células del tejido adyacente. En cambio, la necrosis implica un proceso inflamatorio en el cual la célula dañada revienta y derrama su contenido sobre las células vecinas. Por lo tanto el hecho de que la Casiopeína III-ia induzca muerte celular por apoptosis es otra ventaja del compuesto.

CONCLUSIONES

1. La evaluación de los parámetros de FMNs, porcentaje de células multinucleadas, ICHs, CPC e IM se realizó de manera adecuada y exitosa, ya que los controles positivos presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, como se esperaba.
2. La Casiopeína III-ia es genotóxica a las concentraciones de 4.2, 8.4 y 12.6 $\mu\text{g/ml}$ pues origina micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas.
3. Con los datos obtenidos en el ensayo de MN e ICHs, se concluye que la Casiopeína III-ia es genotóxica y clastógena en linfocitos humanos *in vitro* a concentraciones 4.2, 8.4 y 12.6 $\mu\text{g/ml}$.
4. La Casiopeína III-ia es citostática pues es capaz de detener la división celular a concentraciones de 8.4 y 12.6 $\mu\text{g/ml}$.
5. A concentraciones elevadas (12.6 $\mu\text{g/ml}$), la Casiopeína III-ia es citotóxica para los cultivos de linfocitos humanos.
6. La Casiopeína III-ia resulto ser clastógena, genotóxica, citostática y citotóxica en el sistema de prueba de linfocitos humanos *in vitro*.

PERSPECTIVAS Y COMENTARIOS FINALES

Hasta ahora no se ha encontrado un fármaco específico en contra de células cancerosas, sin embargo la Casiopeína III-ia ha demostrado ser un buen candidato en contra del cáncer, ya que se ha visto que es muy tóxica para algunas líneas celulares, como HeLa y no de la misma intensidad para los linfocitos. Aún así es necesario hacer más estudios con este compuesto, para saber más acerca de sus mecanismos de acción, por ejemplo:

1. Desarrollar la prueba de aberraciones cromosómicas y asociación de satélites, lo cual nos daría más información acerca de su mecanismo de acción.
2. Implementar la técnica de FISH (Hibridación In Situ con Fluorescencia, por sus siglas en inglés) para conocer el origen de los micronúcleos y poder determinar si la Casiopeína III-ia es aneuploidogena, clastógena o ambas.
3. Discernir en que etapa del ciclo celular actúa la Casiopeína III-ia.
4. Las Dependencias de salud implicadas en el tratamiento del cáncer deberían dirigir un tratamiento efectivo con la Casiopeína III-ia, en pacientes terminales con cáncer cervico-uterino, en el cual ha demostrado tener mayor eficiencia.

El trabajo es difícil y muy extenso, pero el sueño de encontrar un fármaco que no sea tan agresivo en contra de las células sanas, cure o contrarreste los efectos del cáncer, impulsa a los investigadores a elaborar un plan de trabajo que nos ayude a hacer posible este sueño.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B., Bray, D., Jonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts K., y Walter, P. (1999) Control del ciclo celular y muerte en: INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA CELULAR, ediciones Omega, Barcelona. pp 589-590.

² Sporn, M.B. (1996) The war on cancer, *Lancet* 347:1377-1381.

³ Parkin, D.M., Pisan, P., Ferlay, J. (1985) Estimates of the world wide incidente of eighteen major cancers in 1985. *Int. J. Cancer*, 54:594-606

⁴ World Health Organization. (1998) The world health report. Life in the 21^a century. A vision for all. World Health Organization (Geneva), Switzerland, pp1-8.

⁵ Hellman, S., Vokes, E.E. (1996) Advancing current treatments for cancer. *Scientific American* 275: 84-89.

⁶ Lavelly, R.S., y Poen, J.C. (1995) Principios de oncología radiante, en: ONCOLOGÍA PRÁCTICA, Editorial Médica Panamericana, Argentina.

⁷ Blagosklonny, M.V. (2003) A new science-business paradigm in anticancer drug development, *Trends in Biotechnology* 21:103-106.

⁸ McLaughlin, C.J. (1995) Principios de la quimioterapia, en: ONCOLOGÍA PRÁCTICA. Edit. Médica Panamericana, Argentina.

⁹ Bravo, M., Tovar, a., Ruiz, M., Ruiz, L., Moreno, R. (2002) Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas, Memorias del 1º Congreso de Química Médica pp 1-9.

¹⁰ Medline Plus Trusted Health Information for you. Encontrado septiembre 2, 2008. Disponible: www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/medmaster

¹¹Marín-Hernández, A; Gracia-Mora, I; Ruíz-Ramirez, L; Moreno-Sánchez, R. (2003) Toxic effects of copper based antineoplastic drugs (Casiopeínas®) on mitochondrial functions, *Bioch. Phar.* pp 1979-1989.

¹²Hernandez, E.L., Marin, H.A., Pavon, N., Carvajal, K., Moreno, S.R. (2005) Cardiotoxicity of cooper-based antineoplastic drugs Casiopeínas is related to inhibition of energy metabolism, *Elsevier Toxicology and Applied Pharmacology*, pp. 1-10.

¹³Williams, S.D., Einhorn, L.H. (1982) Cisplatinum in the treatment of testicular and other cancers, *ADV. Intern. Med.* 27:531-545.

¹⁴ Evans, H.J. (1970) Populations cytogenetics and environmental factors, en: PFIZER MEDICAL MOMNOGRAPHS, Edinburgh University Press, pp192-216.

¹⁵ Sánchez, F., Gracia, I., Roldán, E., Ruiz, L. (2002) Estudio de los efectos genotóxicos, citostáticos y citotóxicos de la Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia en médula ósea y sangre periférica de ratón. Memorias del 1º Congreso de Química Médica, pp. 56-60.

¹⁶ Ruíz-Azuara, L., Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos, Tipo1, Patente de invención, SECOFI, enero 26, (1994), no. 172967

¹⁷ Ruíz-Azuara, L., Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos, Tipo1, Patente de invención, SECOFI, diciembre 9, (1993), no. 172248

- 18 Ruíz-Azuara, L., Process to obtain next mixed copper aminoacidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. U. S. Patent, Patent N° 5, 576,326. nov. 19 (1996).
- 19 Alemón-Medina, R., Breña-Valle, Matilde., Muñoz-Sánchez, J.L., Gracia-Mora, M., Ruíz-Azuara, Lena. (2007) Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas), *Cancer Chemother Pharmacol*, 60:219-228.
- 20 De Vizcaya-Ruíz, A., Rivero- Müller, A., Ruíz-Ramírez, L., Howarth, J.A., Dobrota, M. (2003) Hematototoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeína II. *Toxicology* 194:103-113.
- 21 Gómez, C., De la Garza, J.G., Arenas, F., Ruíz-Ramírez, L., Gracia-Mora, M.I. (1993) Quimiosensibilidad *in vitro* de células de cáncer cervicouterino por efecto de Casiopeínas I, II y III. *Tumor: Oncología Interdisciplinaria* 6(4):136.
- 22 Gracia-Mora, M.I., Ruíz-Ramírez, L., Gómez-Ruíz, C., Tinoco-Méndez, M., Márquez Quiñones, A., Romero de Lira, M., Marín-Hernández, A., Macías-Rosales, L., Bravo-Gómez, M.E. (2001) Knights move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeínas, evaluated by an *in vivo* human and murine cancer cell line panel, *Metal Based Drugs* 8:19-28.
- 23 Ruíz-Ramírez, L., Gracia-Mora, M.I., Moreno, E.R., Gasque, L., Huerta, L., Mayet, L., Ortiz, V., Lomeñí, C. (1991) The antitumor activity of several transmittion metal complexes, *J Inorg Biochem* 43(2-3):615.
- 24 Ruíz, Ramírez L., García, I., de la Rosa, M.E., Sumano, H., Gómez, L., Arenas, F., Gómez, E., Pimentel, E., and Cruces, M. (1993) Cytostatic, mutagenic, Antineoplastic activities and preliminary toxic cooper (II) new drugs; Casiopeinas I, II and III. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 51 (1-2); 406.
- 25 Santiago-Moreno, Y. (2000); Efecto genotóxico de los tratamientos agudo y subcrónico de la Casiopeína II-gly en machos, hembras, hembras preñadas y sin preñar de ratón CD-1. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza, UNAM, México.
- 26 Roldán Elia, Atilano Arturo. (2002) Evaluación de aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly. *Memorias del 1º Congreso de Química Médica* pp. 30-33.
- 27 Ruíz, Ramírez L., García, I., de la Rosa, M.E., Sumano, H., Gómez, L., Arenas, F., Gómez, E., Pimentel, E., and Cruces, M. (1993) Cytostatic, mutagenic, Antineoplastic activities and preliminary toxic cooper (II) new drugs; Casiopeínas I, II and III. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 51 (1-2); 406.
- 28 Carvallo-Chagineau, F. (2007) Efectos Antiproliferativos y apoptóticos de la Casiopeínas II-gly y III-ia en líneas tumorales humanas, Tesis para obtener el título de Doctor, Programa de doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- 29 Barrón-Sosa, L. (2006) Influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa y apoptótica del quelato mixto de cobre casiopeína III-ia en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos, Tesis para obtener el título de química. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 30 Roldán, R.E., Ramírez, M.A., Barrón, S.L., Ruiz, A.L., Macias, R.L., Gracia, M.I. (2002) Genotoxicidad, Citotoxicidad y Citostaticidad de la Casiopeína III-ia, *Memorias del 1º Congreso de Química Médica*. pp 78-86.

- 31 Palitti, F., Tanzarella, R., Cozzi, R., Ricondy, E., Vitagliana, A., Fiori, M. (1982) Comparison of frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone-marrow spleen and spermatogoneal cells of mice, *Mutat. Res.* 103:191-195.
- 32 Celik, M., Unal, F., Yuzbasioglu, D., Ergun, O., Arslan, O., Kassap, R. (2004) *In vitro* effect of karathane LC (dinocap) on human lymphocytes, *Mutagenesis* 20:101-104.
- 33 Yuzbasioglu, D. (2006) Cytogenetic effects of fungicide Afugan on the meristematic cells of *Allium cepa* L., *Cytology* 68:237-243.
- 34 Evans, H., O'Riordan, M. (1975) Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutat. Res.* 31:135-148.
- 35 Ruppia, D., Reddy, P., Reddi, O. (1989) Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of cotton field workers exposed to the pesticides, *Environ. Res.* 49:1-6.
- 36 Rencuzogullari, E., Ila H., Kayraldiz, A., Arslan, M., Budak, S., Tpkatas, M. (2004) The genotoxic effect of the new acaricide etoxazole, *Russ. J.* 40:1300-1304.
- 37 Gómez, S., Díaz Y., Meneses M., Villalobos, R., De León J. (2000) Ciyogenetic biomonitoring in a Mexican floriculturure worker group exposed to pesticides, *Mutat. Res.* 466:117-124.
- 38 Preston, R.J. (1995) Genetic injury, in: J.E. CRAIGHEAD (Ed) *Pathology of environmental and Occupational Disease*, St. Louis, Mosby-Yearbook Inc.
- 39 Tucker, J.D., Preston, R.J. (1996) Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment, *Mutat. Res.* 365:147-159.
- 40 Zbinden G. (1992) Developmental *in vitro* toxicology, en: IN VITRO METHODS IN TOXICOLOGY. Editado por: Jolles G y Cordirer A. Academic Press, USA pp. 607.
- 41 Guyton, M.D., Hall, Ph.D. (2001) Resistencia del organismo a la infección en: TRATADO DE FISIOLOGÍA MÉDICA, ediciones McGraw-Hill, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.
- 42 Watt, J.L., y Stephen, G. S. (1986) Lymphocyte Culture for Chromosome Analysis. En: HUMAN CYTOGENETICS. Rooney D.E. y Czeepulkowski, B.H., (Eds.), IRL PRESS, Oxford. Washington DC.
- 43 Evans, H.J. (1982) Chromosomal mutations in human populations. *Cytogenet. Cell Genet.* 33:48-56.
- 44 Evans, H.J., Buckton, K.E., Hamilton, G.E., y Carothers, A., (1979), Radiation-induced chromosome aberrations in nuclear-dockyard workers. *Nature* 277:531-534.
- 45 Roldán, E., y Altamirano M. (1990) Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, cell Kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutat. Res* 245:61-65.
- 46 Kirsch-Volders, M; Elhajouji, A., Cundari, E; Van, H.P (1997) The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non disjunction , *Genetic, toxicology and environmental mutagenesis*, 392:19-30.
- 47 Fenech, M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique, *Mutat. Res.* 455 81-95

- 48 Fenech, M., Morley, A., (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* 147:29-36
- 49 Evans H.J., (1977), Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations, in: Scott D., Bridges B.A. Sobels F.H (Eds.), PROGRESS IN GENETIC TOXICOLOGY, Elsevier North Holland Biomedical Press, pp. 57-74
- 50 Norppa, H., Falck, Ghita. (2003) What do micronuclei contain?, *Mutagenesis.* 18:221-233.
- 51 Sanjeev, N., Madhu, K., Srikante, K. (2006) Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay, *Toxicology in vitro* 20: 1168-1172.
- 52 Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart B., Mavournin, K., MacGregor, J.T., Newell, G.W., and Salomone, M.F. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gen-Tox Program, *Mutat. Res.* 123:61-118.
- 53 Evans, H.J. (1990) Cytogenet: Overview. *Prog. Clin. Biol. Res.* 340:301-323.
- 54 Dellarco, V.J., Mavournin, R.R., (1985), Tice, Aneuploidy and health risk assesment: current status and future directions, *Environ. Mutagen.* 7:405-424.
- 55 Guttenbach, M., Schmidt, M., (1994), Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures, *Exp. Cell. Res.* 211:127-132.
- 56 Shirashi, Y., Sandberg, A. (1980) Effects of caffeine on chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges induced by mitomycin-C in BrdU labelled human chromosomes, *Mutat. Res.* 62:139-149.
- 57 Giri, A., Mukhopadhyay, A. (1998) Mutagenicity assay on salmonella and in vivo sister chromatid exchange in bone marrow cells of mice for four pyrazolone derivatives. *Mutat. Res.* 420:15-25.
- 58 Madle, E., Obe, G., Hansen, J., y Ristow, H. (1981) Harman and Norharman: induction of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro and interaction with isolated DNA. *Mutat. Res.* 433:42.
- 59 Giri, A., Sanyal, R., Sharma, A., y Talukder (1979) Cytological and cytochemical changes induced through certain heavy metal son mammalian systems. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 2:391-166.
- 60 Donovan, P., Smith, G., Lawlor, T., Cifone, M., Murli, H., y Keefer, L. (1977) Quantification of dianzeniumdiolate mutagenicity in four different in vitro assays. *Nitric. Oxide.* 1:158-166.
- 61 Wilson, M., Thompson, L. (2007) Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange, *Mutat. Res.* 616:11-23.
- 62 Tucker, J., Auleta, A., Cimino, M., Desifield, K., Jacobson-Kram, D., Tice, R., y Carrano, A., (1993), Sister chromatid exchange, second report gene. tox. Program. *Mutat. Res.* 297:101-180.
- 63 Sivikova, K., y Dianovsky, J. (1995) Sister-chromatid exchange alter exposure to metal-containing emissions. *Mutat. Res.* 327:17-22.
- 64 Perry, P; Wolff, S. (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid, *Nature* 251:156-158.
- 65 Cardoso, R., Takahasi, S., Peitl, P., Ghilardi, T., Sakamoto E. (2001) Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 21:431-439.

- 66 Rodríguez, J. (2001) Evaluación de los efectos genotóxicos y citotóxicos inducidos en cultivos de células de sangre periférica expuestos a tetraóxido de Vanadio. FES Zaragoza, UNAM. Tesis de Maestría.
- 67 Rojas, E., Montero, R., Herrera, L., Sordo, M., Gonsebalt, M., Rodríguez, R., Ostrosky, P. (1992) Are metals dietary carcinogens? *Mutat. Res.* 443:157-181.
- 68 Kirkland, D., y Müller, L. (2000) Interpretation of the biological relevant of genotoxicity test results: the importance of thresholds, *Mutat. Res.* 464:137-147.
- 69 Atilano, A. (2007) Evaluación de daño genotóxico, citotóxico y citostático inducido por Casiopeína II-gly en cultivo de linfocitos humanos. Tesis para obtener el título de biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. FES-Zaragoza. México
- 70 García, E., Medina, M., Rojas, Y., Ostrosky, P., Rodríguez, R. (1991) Acute toxicity of Casiopeína, a new type of cytotoxic agent. *Pharmacol.* 34:65-67.
- 71 Martell, A.F., Calvin, M. (1952) Chemistry of the metal chelate compounds. Prentice Hall, New York, pp. 112-119.
- 72 Gaiddon, C., Jeannequin, P., Bischoff, P., Pfeffer, M., Sirlin, C., Loeffler, JP. (1983) Ruthenium (II) derived organometallic compounds induces.
- 73 Pastor, S., Gutiérrez, A., Creus, A., Cebulska, Wasilewska, R. (2001) Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and bucal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides, *Mutat. Res.* 495:147-156.
- 74 Elhajouji, A., Cunha, M; Kirsch-Volders, M. (1998) Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate in the citokinesis-block assay, *Mutagenesis*, 13:193-198.
- 75 Florin, D. (2005) Estimación de los rompimientos de cadena sencilla inducidos en el ADN de leucocitos humanos de sangre periférica expuestos a Casiopeína II-gly. Tesis para obtener el título de biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. FES-Z, México D.F.
- 76 Savage, J. (1993) Update on target theory as applied to chromosomal aberrations, *Env. Mutagen.* 22:198-207.
- 77 Carrano, A.V., Johnston, G.R. (1977) The distribution of mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian muntjac, *Chromosoma* 64: 97-107.
- 78 Thompson, I., Brookman, K., Dillehay, L., Carrano, A., Mazrismas, J., Money, C., Minkler, A. (1982) A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand break repair, and extraordinary baseline frequency of sister chromatid exchange, *Mutat. Res.* 95:427-440.
- 79 Arnaudeau, C., Lundin, C., Helleday, T. (2001) DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells, *J. Mol. Biol.* 307:1235-1245.
- 80 Balaji, M. y Sasikala, K. (1993) Cytogenetic effect of malathion *in vitro* culture of human peripheral blood, *Mutat. Res.* 301:13-17.
- 81 Tovar, A., Ruíz, L., Campero, A., Bravo, M., Tovar, a., Ruiz, M., Ruiz, L., Moreno, R. (2002) Interacción entre Casiopeínas y adenina, Memorias del 1º Congreso de Química Médica, pp. 121-128.

