



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Evaluación de los efectos toxicológicos inducidos
por un compuesto de Cu (Casiopaina IIgly)
durante las fases G1-S y G2-M mediante el
ensayo de micronúcleos *in vitro*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
NANCY ELIZABETH CORDERO PADILLA

DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Elia Roldán Reyes



MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

El desarrollo de este trabajo contó con el apoyo de PAPIIT IN-221808-3

DEDICATORIA

A DIOS: Porque me dio la vida, me sustenta y está conmigo siempre.

A MI PADRE: Gregorio Mario Cordero Hernández. A quien amo, admiro, respeto y confié. Gracias papá porque confiaste en mí y me apoyas siempre te quiero mucho.

A LA DRA. Elia Roldán Reyes. Por todo lo que me enseñó más allá del conocimiento, por su paciencia y comprensión. Le pido a Dios que la bendiga siempre.

A MIS AMIGOS: Gabriela Vianey, Nancy, Patricia, Soledad, Alma bella, Cesia, Beyibet, Christian Azucena, Carmen, Claudia, Carolina, Araceli y Sara. Los cuales estuvieron conmigo en los momentos más importantes de mi carrera y de mi vida.

SE FELIZ HOY

Nos convencemos a nosotros mismos de que la vida será mejor después de terminar la escuela, después de casarnos, después de tener un hijo, y entonces después de tener otro, entonces nos sentimos frustrados de que los hijos no son lo suficientemente grandes y que seremos más felices cuando lo sean.

Después de eso nos frustramos porque son adolescentes y que seguramente seremos más felices cuando salgan de esta etapa. Nos decimos que nuestra vida estará completa cuando a nuestro esposo (a) le vaya mejor, cuando tengamos un mejor carro o una mejor casa, cuando nos podamos ir de vacaciones, cuando estemos retirados. La verdad es que no hay mejor momento para ser felices que ahora. Si no es ahora, ¿Cuándo?

Tu vida siempre estará llena de retos. Es mejor admitirlo y decidir ser felices de todas formas. Siempre esperamos largo tiempo para comenzar a vivir la vida de verdad, siempre habrá algún obstáculo en el camino, algo que resolver primero, algún asunto sin terminar, tiempo por pasar, una deuda que pagar y no nos damos cuenta de que todos estos obstáculos son parte de la vida.

Esta perspectiva nos deja ver que no hay un camino a la felicidad. La felicidad es el camino. Así que, atesora cada momento que tienes, y atesóralo más cuando lo compartiste con alguien especial, lo suficientemente especial para compartir tu tiempo, y recuerda que el tiempo no espera por nadie...

Así que deja de esperar hasta que tengas más dinero, hasta que bajes 10 kilos, hasta que tengas hijos, hasta que tus hijos se vayan de casa, hasta que te cases, hasta que te divorcies, hasta el viernes por la noche, hasta el domingo por la mañana, hasta la primavera, el verano, el otoño, el invierno, o hasta que mueras, para decidir que no hay mejor momento que este para ser feliz...

La felicidad es un trayecto, no un destino.

*Trabaja como si no necesitaras dinero, Ama como si nunca te hubieran herido, y
baila como si nadie te estuviera viendo.*

Porque no sabemos cuánto tiempo nos queda por vivir.

Índice de contenido

	Página
Abreviaturas.....	i
Resumen	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ciclo celular.....	1
1.2. Transición G ₁ →S.....	3
1.3 Transición G ₂ →M.....	4
1.4.Punto de control de la mitosis	4
1.5.Antineoplásicos.....	5
1.6.Casiopéínas.....	11
1.7.Casiopéína IIgly	16
1.7.1. Antecedentes.....	17
1.8.Linfocitos como sistema de prueba.....	21
1.9.Ensayo de Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis(CBMN).....	23
1.10. Necrosis.....	31
1.11. Apoptosis	32
1.12. Eliminación de los cuerpos apoptóticos.....	36
1.13. Rutas de señalización del proceso de apoptosis.....	38
1.14. Vía de los receptores de muerte	41
1.15. Vía mitocondrial	43
2. JUSTIFICACIÓN	48
3. HIPÓTESIS.....	49
4. OBJETIVOS	50

4.1. General.....	50
4.2. Particulares	50
5. MÉTODO	51
5.1. Evaluaciones	53
5.2. Análisis estadístico	55
6. RESULTADOS.....	56
7. DISCUSIÓN	64
7.1. Genotoxicidad	65
7.2. Citotoxicidad	72
7.3. Citostaticidad.....	77
8. CONCLUSIÓN	81
9. PERSPECTIVAS	82
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

ABREVIATURAS

MNBC: Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis.

MN: Micronúcleos.

PN: Puentes Nucleoplásmicos.

ICDN: Índice Citotóxico de División Nuclear.

ADN: Acido Desoxirribonucleico.

MPF: Factor Promotor de la Maduración.

ARN: Acido Ribonucléico.

MMC: Mitomicina C.

AC: Aberraciones Cromosómicas.

ICHs: Intercambio de Cromátidas Hermanas.

ACE: Aberraciones Cromosómicas Estructurales.

Cdk: Cinasas dependientes de ciclinas.

G0: Fase de reposo del ciclo celular.

G1: Gap 1. Primer estadio del ciclo celular.

G2: Gap 2. Segundo estadio del ciclo celular.

S: Fase de síntesis del ciclo celular.

M: Mitosis del ciclo celular.

P53: gen p53 supresor tumoral, induce la respuesta de la célula ante el daño al ADN, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación.

P21: gen p21 regulador del progreso del ciclo celular a nivel de la fase G1

O₂⁻: Superóxido o hiperóxido.

pKa: Fuerza que tienen las moléculas para disociarse.

CI₅₀: Concentración inhibitoria cincuenta.

LD₅₀: Dosis letal cincuenta.

pH: Potencial de hidrogeno.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral.

Fas: Proteína de superficie.

FasL: Ligando Fas.

TRAIL: Factor de necrosis tumoral relacionado con el ligando inductor de apoptosis.

DD: Dominio de muerte.

FADD: Fas asociadas con el dominio de muerte.

DEDS: Dominios efectores de muerte.

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte.

Bid, Bad, Bax y Bak: Proteínas proapoptotica.

FLIP: Proteína inhibidora de la caspasa 8.

ATP: Adenosín trifosfato.

ANT: Traslocador del nucleótido adenina.

VDAC: Canal dependiente del anión de voltaje.

Bcl-2: Células B de linfoma 2.

Smac: Segundo activador de las mitocondrias que deriva de las caspasas.

DIABLO: Proteína obligatoria directa del IAP con el punto isoeléctrico bajo.

IAP: Familia de proteínas supresoras de la apoptosis.

Apaf-1: Factor que activa una de las proteasas apoptóticas.

dATP: Desoxiadenosina trifosfato.

AIF: Factor inductor de apoptosis.

PARP: Poli ADP ribosa polimerasa.

OH-: Grupo hidroxilo.

EROS: Especies reactivas de oxigeno.

HeLa: Línea de células de un carcinoma cervical las cuales fueron extraídas quirúrgicamente de Henrietta Lacks de la cual proviene su nombre.

C6: Células de glioma.

HCT-15: Células de carcinoma de colon.

L1210: Células leucémicas.

CD-1: Cepa de ratones desnudos et/et hipotímicos.
S189: Células de líneas tumorales de sarcoma.
Sarcoma 180: Tumor indiferenciado que se descubrió en ratas albino macho en 1914.
Melanoma B16: Línea celular de melanoma de raton.
L5178: Línea celular de leucemia de raton.
CHO: Carcinoma ovárico humano.
Caski: Línea celular de carcinoma epidermoide cervical.
C 33-A: Células de carcinoma cervical.
HCT-15: Línea celular derivada de carcinoma de colon.
SiHa: Línea celular de carcinoma de cuello uterino.
CaLo: Células de cáncer cervicouterino.
Ap: Apoptosis.
Nec: Necrosis.
M1.: Mononucleadas.
M2: Binucleadas.
M3: Trinucleadas.
M4: Tetranucleadas.
X²Y: Ji cuadrada con corrección de Yates.
Z: Z para proporciones.
X²: Ji cuadrada.
DS: Desviación estándar.
 \bar{x} : Media.

RESUMEN

En todo organismo debe existir un equilibrio entre la generación o proliferación y la desaparición o muerte de sus células. La pérdida de este equilibrio es la causa de enfermedades como el cáncer. Es por eso que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas ocupa un lugar importante en la investigación contra esta enfermedad. En la Facultad de Química (UNAM), se han diseñado más de cien compuestos de coordinación con centro metálico de (Cu II) llamadas Casiopeínas[®], que han mostrado tener actividad citostática, citotóxica, genotóxica y antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo*. En el presente trabajo se evaluó el efecto genotóxico, citotóxico y citostático mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC) de la Casiopeína IIgly [Aqua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre (II) Nitrato]. Se extrajeron 10 ml de sangre periférica de individuos clínicamente sanos no fumadores (entre 20 y 30 años de edad), se separaron los linfocitos por gradiente de densidad, se cultivaron en 5ml de medio RPMI-1640 con Fitoheماغlutinina (a 37°C), a las 20 y 44hrs. se aplicó la Mitomicina C (T+) (0.2 µg/ml) y la Casiopeína IIgly (0.33, 0.66, 1.0) respectivamente. A las 48hrs. se adicionó la Citocalasina B (6.0 µg/ml) y a las 72 hrs. se cosecharon las células, se fijaron con metanol absoluto y

metanol-ácido acético (proporciones 3:1 y 85:15 respectivamente), se elaboraron las laminillas y se tiñeron. Los resultados mostraron un notable incremento significativo ($p < 0.002$) en la necrosis y la apoptosis con un comportamiento dosis respuesta solo en la última. Se observó un incremento significativo ($p < 0.0005$) en los puentes nucleoplásmicos (PN) en la concentración de $1.0 \mu\text{g/ml}$. Los MN se incrementaron significativamente ($p < 0.05$) solo en la concentración de $0.66 \mu\text{g/ml}$ en el caso de los tratamientos a las 20hrs. Para los tratamientos a las 44hrs. la apoptosis aumentó significativamente ($p < 0.002$) en todas las concentraciones y para la necrosis solo en la concentración de $0.33 \mu\text{g/ml}$. Los PN se incrementaron significativamente ($p < 0.001$) en la concentración de $1.0 \mu\text{g/ml}$ y, en los MN se incrementaron significativamente ($p < 0.05$) en todas las concentraciones.

Por lo que la Casiopeína IIgly induce efectos genotóxicos ya que existen MN pero son más evidentes cuando los tratamientos son aplicados en la fase G2-M y con respecto a los PN existe este tipo de daño solo en la concentración más alta para ambos tiempos de tratamiento. Mostrándonos con esto que nuestro compuesto tiene un comportamiento S dependiente. El tipo de muerte celular predominante fue la apoptosis teniendo un comportamiento dosis respuesta en ambos tiempos de

tratamiento, además por medio de ICDN se observó un efecto citotóxico y citostático.

Lo que permite concluir que la Casiopeína IIgly, indujo un efecto genotóxico, citotóxico y citostático en los linfocitos aislados humanos in vitro en las condiciones ya mencionadas.

INTRODUCCIÓN

1.1. Ciclo celular

El ciclo celular (Fig.1) es una serie ordenada de acontecimientos que conducen a la replicación celular con una repetición alternante de periodos de crecimiento y división celular. Es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto. Se distinguen varias fases: en la fase G_0 o de "reposo" las células permanecen sin dividirse, pero conservan la capacidad de reiniciar el ciclo para repoblar un tejido [1,2]; la fase llamada G_1 (gap 1) o de presíntesis, la célula aumenta su tamaño (casi duplicándolo) incluyendo orgánulos y macromoléculas, se completa la dispersión total del material hereditario compactado en forma de cromosomas y se inicia la lectura de la información recibida de la célula madre, lo que permite iniciar el mecanismo de síntesis que permitirá la producción de las proteínas específicas que mediaran en las distintas actividades de la células, esto implica necesariamente, la síntesis de los distintos ARN entre ellos el mensajero, su translación al citoplasma para llegar a los ribosomas y así poder realizar la síntesis [3]. Tiene una duración de entre 6 y 12 horas; en la fase S se produce la replicación del DNA de los $2n$ cromosomas

individuales. Cada hebra de este DNA sirve de molde para la síntesis de otra nueva, que permanece asociada por apareamiento de bases. Las dos moléculas de DNA resultantes permanecen unidas por el centrómero, dando así lugar a cromosomas con 4 hebras de DNA; cada doble hebra constituye una cromátida. De este modo, el número de cromosomas permanece constante (diploide, $2n$). Tiene una duración de unas 6 a 8 horas. Una vez finalizada la replicación la célula entra en la fase G₂ (gap 2) o de postsíntesis tiene una duración de 3 y 4 horas, previo a la división celular o segunda fase de crecimiento en el que se sigue sintetizando ARN y proteínas; el final de este periodo queda marcado por la aparición de cambios en la estructura celular, que se hacen visibles con el microscopio, y que indica el inicio de la fase M o de mitosis tiene una duración de aproximadamente 30 min. a 1 hora [4,5,6,7]. Esta fase M se divide a su vez en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis [8]. La duración del ciclo celular varía según la estirpe celular, siendo la duración media del ciclo completo de aproximadamente 24 horas [6].

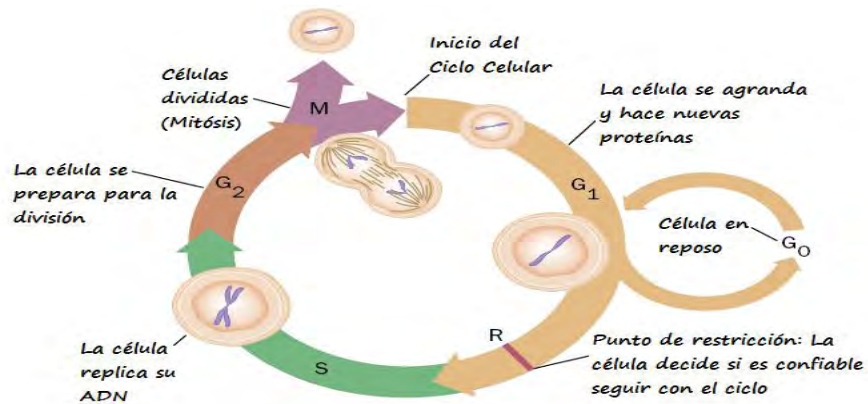


Fig. 1. Ciclo celular (modificado de Weinberg, 1996 [9])

El ciclo celular cuenta con puntos internos de control donde ciertas proteínas vigilan la estructura del ADN de los cromosomas. En varios puntos se verifican si la fase anterior del ciclo no tuvo problemas. Otros tipos de proteínas verifican si las condiciones favorecen la división celular. Ambos producto de los genes de los puntos de control constituyen el mecanismo que puede impulsar, retrasar o bloquear el ciclo celular [4,7,10].

En el ciclo celular existen tres puntos de control cruciales (<<tres checkpoints>>): La transición de G₁ a S, la transición de G₂ a M y un punto de control en la Mitosis [4,7,10].

1.2. Transición G₁→S

Existe en la fase G₁ un punto del ciclo denominado puntos sin retorno o punto R (R de restricción). Una vez franqueado, la célula entra de

manera irreversible en la fase S de síntesis del ADN. En realidad, aun tendrá dos posibilidades <<división o suicidio>>, pues ciertas células se orientan hacia apoptosis. La proteína Cdk-2 y Cdk-4 están implicadas especialmente en el control de los acontecimientos de la fase G1 [4,7,10].

1.3. Transición G2→M

Durante la fase G2 interviene el otro control, en el <<punto T>> (T de transición). Esta etapa del ciclo se conoce mejor que la anterior. La proteína cdk-1 y la ciclina B se asocian y desempeñan un papel esencial para desencadenar la entrada en mitosis. Las diversas enzimas implicadas serán activadas o inactivadas por fosforilación o defosforilación, según sea el caso [4,7,10].

1.4. Punto de control de la mitosis

En este punto se comprueba, antes de iniciarse la migración de los cromosomas en la anafase, tanto la formación correcta de las fibras del huso como su unión a los cinetocoros de las cromátidas. Si por alguna razón el huso no se ha formado completamente o no ha ocurrido un adecuado enganche, la mitosis se detiene. Este punto de control parece

estar regulado, no por un complejo Cdk-ciclina, sino mas bien por enzimas proteolíticas específicas cuya producción se ha estimulado por el Factor Promotor de la Maduración (MPF) [4,7,11].

En todo organismo multicelular adulto debe existir un equilibrio entre la generación o proliferación y la desaparición o muerte de las células que lo componen, con el fin de mantener un tamaño constante. La pérdida de esta regulación es la causa de enfermedades como el cáncer donde una línea celular posee la capacidad de proliferación ilimitada e incontrolada debido a mutaciones genéticas [12].

El cáncer hoy en día es un problema de salud pública no solo en México si no en todo el mundo. A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad, se le atribuyen 7.9 millones de defunciones ocurridas en 2007(aproximadamente 13% del total). Se prevé que el número de muertes por cáncer siga aumentando en todo el mundo y que alcance los 9 millones en 2015 y los 11,4 millones en 2030. Así mismo, la mortalidad más alta es debida al cáncer de pulmón, seguido por el de estomago, hígado, colon y mama; por sexo las incidencias más frecuentes en los hombres son el cáncer de pulmón, estomago, hígado, colon-recto, esófago y próstata; y para las mujeres al de mama, pulmón, estomago, colón-recto y cuello uterino [13]. La quimioterapia

ha sido el tratamiento de elección para combatir la mayoría de los tumores humanos por lo que es importante saber sus mecanismos de acción.

1.5. Antineoplásicos

El termino quimioterapia suele reservarse a los fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas que tiene como función el impedir la reproducción de las células cancerosas. El mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. Por lo tanto, la quimioterapia es la utilización de diversos fármacos que tienen la propiedad de interferir con el ciclo celular, ocasionando la destrucción de las células [14].

Los fármacos antineoplásicos se pueden clasificar en familias en relación a su actividad bioquímica o a sus orígenes. Otra clasificación de los agentes quimioterapéuticos se basa en su actividad sobre el ciclo celular, dividiéndose en “específicos del ciclo celular” (cicloespecíficos) o “no específicos del ciclo celular” (no ciclo-específicos). Los agentes ciclo-específicos son aquellos cuya actividad citotóxica principal acontece en células en división. A su vez los agentes ciclo-específicos se subclasifican

en: 1) Fase específicos: actúan en una o más fases del ciclo celular, pero no en todas las fases; 2) No fase específicos: pueden actuar en cualquier fase del ciclo. La característica general de los agentes cicloespecíficos es que, a pesar de que pueden afectar a las células en G₀, son más activos sobre células en ciclo, por lo que suelen administrarse de manera repetida o en forma de infusión prolongada con el fin de exponer todas las células tumorales a medida que llegan a la fase sensible del ciclo. Los agentes no específicos del ciclo celular son aquellos antineoplásicos que pueden actuar en todas las fases del ciclo celular, incluyendo la fase G₀, es decir, pueden causar muerte celular independientemente del estado proliferativo.

Se pueden agregar también a los agentes S dependientes y los S independientes.

Los agentes S dependientes inducen aberraciones de tipo cromatídico (afectan a una sola cromátida del cromosoma) en cualquier fase del ciclo celular y las alteraciones solo se visualizan una vez que la célula atraviese la fase S del ciclo celular, este tipo de aberraciones pueden ser provocadas por radiación ultravioleta, agentes alquilantes entre otros. Y los agentes S-independientes inducen aberraciones de tipo cromosómico (afectan a ambas cromátidas del cromosoma) cuando actúan durante

las fases G_0 y G_1 , aberraciones de tipo cromatídico durante la fase G_2 estas pueden ser provocadas por, radiaciones ionizantes y algunos compuestos químicos radiomiméticos como bleomicina y neocacinostatin [15].

En general los quimioterapéuticos son drogas con una citotoxicidad proporcional a la dosis total administrada. A continuación se destacan rasgos en el mecanismo de acción de las distintas familias que los componen [14]:

- **Antimetabolitos:** Incluyen análogos de pirimidinas, análogos de purinas y otros (p. ej. Metotrexate). Interfieren con la síntesis del ADN o ARN y son activos sobre todo en fase S. El metotrexate y compuestos relacionados inhiben el enzima dihidrofolato reductasa, que es esencial para la síntesis de ADN; los análogos de pirimidinas, tales como la citosina arabinosida, bloquean la síntesis de ADN, al menos en parte mediante incorporación en las hebras de ADN en formación y terminación de cadena; las fluorópirimidinas, tales como 5- fluoróuracilo, inhiben tanto la síntesis de ADN como de ARN.
- **Agentes alquilantes:** Incluyen a la mostaza nitrogenada, nitrosoureas y análogos de platino (p. ej. cisplatino y análogos):

estos provocan su acción citotóxica mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleofílicas presentes en las células. Actúan preferentemente a nivel del ADN y, en concreto, de las bases nitrogenadas. También pueden reaccionar con los grupos fosfato y alquilar bases del ARN. Probablemente bloquean la reparación de ADN.

- **Alcaloides de las plantas:** Incluyen los alcaloides de las vincas y los taxanos (p. ej. vincristina y paclitaxel/docetaxel, respectivamente) bloquean la polimerización, respectivamente, de microtúbulos y por tanto interfieren con la división celular.
- **Inhibidores de topoisomerasas:** Incluyen antraciclinas, epipodofilotoxinas, y otros. Las antraciclinas (p. ej. dextrorubicina y daunorubicina) probablemente actúan a múltiples niveles, que incluyen interacción en el ADN, inhibición de la ADN topoisomerasa (topo) II, producción de radicales libres y unión a las membranas plasmáticas. Agentes como topotecan (inhibidor de topo I) y etopósido (inhibidor de topo II) interfieren con la transcripción, síntesis de ADN, y mitosis [14].
- **Antibióticos:** Incluyen la Bleomicina, Actinomicina D, Mitomicina C, etc. Compuestos heterogéneos de origen bacteriano. Todos

actúan a nivel de ADN, sus mecanismos de acción son muy variados.

- **Miscelaneos:** Incluye a la Hexametilmelamina, Hidroxiurea y Procarbazina. Los mecanismos de acción son variados.

La mayoría de agentes quimioterapéuticos, independientemente de su mecanismo de acción, inducen muerte celular programada (apoptosis). Tras provocar daño sobre el ADN, la progresión a lo largo del ciclo celular se detiene en dos puntos de control del ciclo; la frontera entre la fase G1 y S, y entre G2 y M. El bloqueo en G1 esta mediado por activación del gen supresor de tumor p53, que induce la expresión del inhibidor dependiente de ciclina cinasa p21. El bloqueo en G1 permite que el daño sobre el ADN sea reparado antes de la replicación del ADN, y el bloqueo en G2 permite la reparación antes de la mitosis. Si el daño del ADN es irreparable, entonces las células mueren por apoptosis, que puede ser dependiente o independiente de p53 [14].

Un ejemplo de este tipo de terapia es el uso del cisplatino el cual ha encontrado un lugar importante en la quimioterapia del cáncer, pero se ha observado que muchos tumores son totalmente refractarios a él y que su toxicidad es alta. Otro antineoplásico altamente usado es la

mitomicina C la cual se describe a continuación ya que se utilizo como testigo positivo en este estudio:

La mitomicina C (MMC), (Fig.2) es un antibiótico aislado de *Streptomyces caespitosus*. La cual presenta actividad antitumoral, es muy toxico. Se utiliza en clínica como tratamiento para los tumores de cérvix, ovario, mama, pulmón, estomago, páncreas, recto y colon. 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. 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 el Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs) y Micronúcleos (MN) [16].

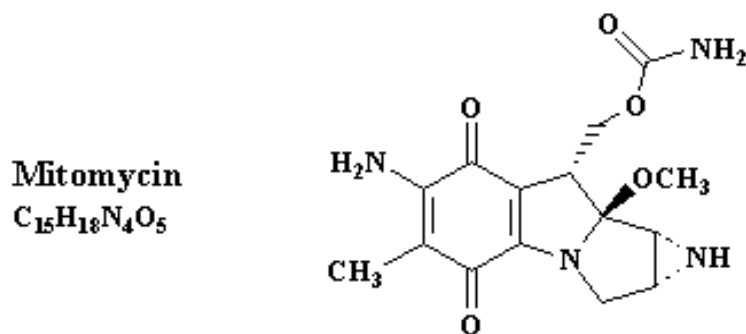


Fig. 2. Estructura química de la MMC [17].

Muchos de los antineoplásicos frecuentemente usados para la quimioterapia han mostrado efectos secundarios severos y costos muy elevados; este hecho ha estimulado el diseño, síntesis y evaluación de muchos nuevos agentes en la búsqueda de compuestos metabólicos con toxicidad reducida y diferentes propiedades biológicas.

1.6. Casiopeínas

En México la necesidad de importación de estos productos quimioterapéuticos y su tan elevado costo, hace que el desarrollo de nuevos productos antineoplásicos adquiera prioridad; por lo que en la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz, se han diseñado un grupo de más de 100 compuestos de coordinación agrupados en diferentes familias con centro metálico de cobre (Cu^{II}) de formula general $\{Cu (N-N) (N-O)\} NO_3$ o $\{Cu (N-N) (O-O)\}NO_3$ (Fig.3), análogos al cisplatino que reciben el nombre Casiopeína® (su nombre proviene de la constelación Casiopea, formada por seis estrellas, ordenadas con el mismo arreglo molecular de estos compuestos [18]), algunos de estos compuestos han demostrado tener actividad citostática, citotóxica y antineoplásica en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* [19].

Tabla 1. Sub-familias y fórmulas generales de las Casiopeínas® [18].

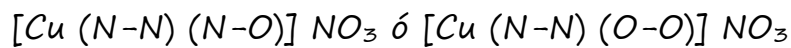
Sub-familias	Fórmula general
Casiopeína I	[Cu(4,7-difenil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína II	[Cu(4,7-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO₃
Casiopeína III	[Cu(N-N)(O-O)]NO ₃
Casiopeína IV	[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína V	[Cu(5R-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VI	[Cu(5,6-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VII	[Cu(fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína IX	[Cu(bipiridina)(O-N)]NO ₃

Cuando un fármaco es prometedor, como las Casiopeínas, se someten a una serie de evaluaciones preclínicas, para identificar sus propiedades farmacológicas, farmacocinéticas, toxicológicas y genotóxicas; dentro de esta última es necesario evaluar el daño producido al material genético. Así como clínicas, para evaluar su relación estructura-actividad, sus efectos a corto plazo, la dosis óptima, los riesgos y su eficacia en el humano, entre otros, para que pueda salir al mercado [18].

Al realizar estudios para observar las interacciones de las Casiopeínas con el ADN, se obtuvo que solo hay interacciones con la adenina, mediante el apilamiento entre los sustituyentes bupiridina o fenantrolina del complejo mixto y el anillo de la base, lo cual lleva a pensar que las Casiopeínas actúan como intercalantes [20]. Por otra parte, todas las Casiopeínas contienen el ligante diimina distinto, con características

hidrofóbicas, que le permiten actuar como intercalante con las bases del ADN [20,21]. El ligante hidrofílico le permite a la molécula ser transportada con facilidad. La naturaleza, el número y la posición de los ligantes, son los responsables de generar selectividad preferencial sobre algunos tejidos tumorales específicos [22,23,24].

La fórmula general de las Casiopeínas es:



Donde:

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

(N-O) = Ligante aminoacidatos o péptidos

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



Fig. 3. Estructura química de las Casiopeínas® [18].

Este grupo de compuestos fue diseñado pensando en:

- ❖ Que la planaridad en la geometría de la molécula y el ligante diimina con carácter hidrofóbico le conferirían la posibilidad de actuar como intercalante a través de interacciones con las bases del ADN y el ligante cargado le proporcionarían una polaridad necesaria para el transporte de la molécula.
- ❖ Que estos ligantes presenten propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas, le confieren la característica de quelatos mixtos.
- ❖ La naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el ligante diimina serían los responsables de la variación en la actividad biológica.
- ❖ Al presentar un núcleo metálico de transición que es esencial para los procesos vitales como el Cu^{2+} , tiene una geometría más cercana a los compuestos de platino (Cis-platino), pues al igual que este, el cobre forma estructuras cuyos átomos se encuentran en un mismo plano.
- ❖ El uso de elementos esenciales disminuye de manera importante la toxicidad de los fármacos, ya que los organismos tienen procesos homeostáticos para regular los aspectos de elementos esenciales.

- ❖ El cobre puede o no intercambiar algunos de sus ligantes para coordinarse directamente en el nitrógeno de las bases, formando enlaces similares a los observados con el Cisplatino.
- ❖ Los ligantes son los responsables de la modulación en la distribución y transporte, y por tanto de la selectividad tumoral de la molécula.
- ❖ Los ligantes quelatos aumentarían la estabilidad de los sistemas y mantendrían la geometría cis, la cual es la más activa [22].

Durante la década de los 80's, se comprobó la actividad antitumoral de algunos compuestos de la familia de las Casiopeínas en ensayos *in vivo* basados en protocolos internacionales, posteriormente fueron patentados en 1992, por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en la Facultad de Química [18].

A la fecha de estos más de 100 compuestos las Casiopeínas I, II y III han mostrado ser las más activas y menos tóxicas. Su mecanismo de acción está relacionado con la reducción del átomo de cobre (II) a cobre (I) en su estructura, lo que como consecuencia generaría la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS), como súper oxido (O_2^-) o hidroxilo (OH^-), las cuales pueden reaccionar con diferentes macromoléculas tal

como los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos de la membrana, causando un daño oxidativo en el interior de la célula [24,25]. En este estudio se trabajó con la Casiopeína IIgly.

1.7. Casiopeína IIgly

Con fórmula: Aqua (4,7-diimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre (II) Nitrato (Fig.4), tiene un peso molecular de 425.89 g/mol, un pKa. de 5.4 y su Cl_{50} es de 0.33 µg/ml, es estable en estado sólido y una vez disuelta en agua es activa hasta por 21 días en condiciones de oscuridad y refrigeración, se degrada fácilmente cuando se expone a la luz [26]. Es un polvo fino color azul intenso, con una densidad aparente de 0.45 g/ml, con un tamaño de partícula >40 y <50 micras [27] no se puede administrar por vía oral, pues el pH del estómago es de 1 y la Casiopeína se disocia a ese pH, por lo que no presentaría actividad farmacológica [28]. Es soluble en agua, etanol y metanol. Se ha reportado que la Casiopeína IIgly se une eficientemente a las proteínas plasmáticas como la albúmina [29], lo que implica que puede ser transportada a los diferentes órganos del cuerpo.

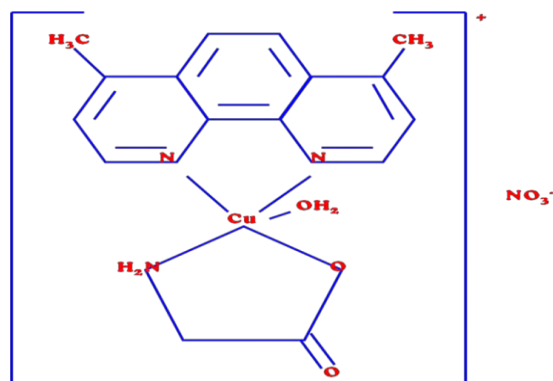


Fig. 4. Estructura química de La Casiopeína IIgly.[4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, glicina cobre
II) nitrato [18].

1.7.1. Antecedentes

El grupo I, II y III de las Casiopeínas han mostrado tener una actividad antineoplásica elevada han sido sometidas a un gran número de pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se ha reportado anteriormente que este grupo de Casiopeínas en modelos *in vivo* tienen actividad antineoplásica en líneas tumorales como en líneas celulares de leucemia L1210, sarcoma S180, melanoma B16 y de un clon llamado LW L5178 [30].

En un modelo *in vivo* realizado en ratones que fueron tratados con la Casiopeína IIgly (2.0mg/Kg) se observó que presentan hipotermia, diarrea leve y pérdida de peso llegando a la muerte a las 12hrs después de la inyección, esto pudo deberse a que la actividad motora, temperatura y respiración decreció [31]. Posteriormente se demostró que la Casiopeína IIgly interactúa directamente con las mitocondrias

aisladas o dentro de las células intactas, causando una variedad de efectos en diferentes sitios, como la inhibición tanto de la fosforilación oxidativa, como de la síntesis de ATP [32].

Se ha mostrado que la Casiopeína IIgly es citotóxica en líneas tumorales humanas de Sarcoma S189, CaLo y HeLa y a través de estudios toxicológicos (LD50) han mostrado ser menos tóxicas [33]. Otros estudios, indican que las Casiopeínas producen mutaciones somáticas en ojos y alas de *Drosophila melanogaster* [34,35].

Se ha mostrado también que la inhibición del índice mitótico es 4 veces menor en comparación con el Cisplatino o la Mitomicina C [36].

La Casiopeína IIgly es capaz de inducir muerte celular por apoptosis en líneas celulares, tales como, de leucemia murina L1210 y de carcinoma ovárico humano CHO, y cuando se realizó el análisis de la morfología nuclear éste mostró condensación de cromatina y fragmentación nuclear (apoptosis) [37].

Estudios de microscopia electrónica y fluorescente, apoyan que la intercalación con la adenina es el mecanismo de acción entre las Casiopeínas y el ADN [21].

Otros estudios confirman que las Casiopeínas tienen actividad antineoplásica en las líneas celulares murina (B16) y humana (HeLa,

SiHa, CaSki, C33-A y CaLo), y que además tienen una mayor actividad en líneas celulares humanas cervicouterinas [38,39].

Vizcaya et al., (2003) [40] observó que la Casiopeína IIgly, induce anemia hemolítica en ratas, provocada por un daño directo a los eritrocitos.

González (2004) [41], demostró que la Casiopeína IIgly, es embriotóxica y teratógena en ratones de la cepa CD-1.

Florín-Ramírez, (2004) [42] reportó que la Casiopeína IIgly ejerce un efecto citotóxico, y que induce daño al ADN que se refleja en el incremento de la longitud de los cometas, así como en la aparición de células con daño total.

Otro estudio muestra que al administrar Casiopeína IIgly a ratones de la cepa CD1 la viabilidad espermática se reduce cuando se administra en dosis de 1.1 y 2.2 mg/kg (que corresponden a 1/4 y 1/8 de la LD₅₀) en tratamientos de 60 días [43].

Se ha mostrado también que las Casiopeínas han manifestado actividad citotóxica y genotóxica en células HeLa y tumores xenotransplantados [24].

La Casiopeína IIgly a inducido apoptosis en HCT-15 inhibiendo como consecuencia la proliferación celular (en dosis de 1.25, 2.5, 5 y 10 µg/ml) [44].

Atilano y Roldán, (2007) [45], reporta que la Casiopeína IIgly es un estupendo agente antineoplásico, puesto que es capaz de inhibir la división celular con eficacia, sin incrementar considerablemente el contenido de micronúcleos en células sanas.

Guevara, (2008) [18], mostro que la Casiopeína IIgly es capaz de inducir intercambios de cromátidas hermanas a las concentraciones de 0.33, 0.66 y 1 µg/ml con un comportamiento dosis respuesta.

Cermeño *et al.*, (2007) [46], reporta que hay disminución de la viabilidad en las células del corazón, hígado, bazo, riñón, y testículo de ratones de la cepa CD-1 cuando se expusieron a la Casiopeína IIgly a ½ de la LD₅₀.

Ya que la Casiopeína IIgly ha mostrado ser una de las más efectivas y con una toxicidad baja puede convertirse en un agente anticancerígeno de origen mexicano muy importante. No obstante, aún se requiere la realización de varias pruebas para lograr este fin [47].

Esta Casiopeína se encuentra en la fase clínica y se están realizando los estudios necesarios para obtener información sobre su farmacodinamia

y sus propiedades toxicológicas, dentro de esta última, es necesario evaluar el daño producido al material genético [18].

1.8. Linfocitos como sistema de prueba

Entre los diferentes sistemas de prueba *in vitro* los linfocitos han destacado por la facilidad de su utilización, desde 1950 se reconocieron como células a cargo de las inmunidades celular y humoral, estas células son uno de muchos tipos de glóbulos blancos que se producen en la médula ósea por el proceso de hematopoyesis.

Una proporción de los linfocitos puede ser estimulada por mitógenos como la fitohemaglutinina para inducir a la división en cultivo [48] y así ser fácilmente cultivables con lo que se provee de una fuente rápida de células en división para la evaluación de parámetros citogenéticos. Por medio de ensayos citogenéticos se puede cuantificar la exposición de agentes químicos, compuestos farmacéuticos o radiación. En este caso se ha utilizado el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC) por lo fácil y rápido que es este ensayo y porque no exige células en metafase. Por lo tanto, muchos tipos de células son susceptibles de análisis de micronúcleos, y la mayoría pueden ser empleados en estudios con seres humanos y animales tanto *in vivo* como

in vitro. Las células más frecuentemente analizadas son las del sistema hematopoyético, es decir, los linfocitos periféricos y los eritrocitos ya que estas células son accesibles en los seres humanos y animales de laboratorio [49].

Con este ensayo también pueden observarse otros tipos de daños genotóxico, citotóxico y citostático; como, puentes nucleoplásmicos, apoptosis y necrosis, respectivamente [50,51,52].

1.9. Ensayo de Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN)

Los micronúcleos (MN) son cuerpos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase, más pequeños y morfológicamente idénticos al núcleo celular. Se originan a partir de fragmentos acéntricos o cromosomas enteros que se retrasan en la división celular y fallan en su incorporación a los núcleos hijos. Dado que los MN pueden ser expresados solamente en células que han completado un ciclo de división celular, se desarrolló un método que permite la identificación de dichas células por su aspecto binucleado cuando se bloquea la citocinesis mediante el agregado de citocalasina-B, un inhibidor del ensamblaje de los microfilamentos [53].

El uso de la técnica del recuento de MN como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesta por primera vez por Countryman y Heddle en 1976, cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica [8]. Más tarde, en 1985, el ensayo de genotoxicidad fue mejorado por Fenech y Morley, consiguiendo frenar el proceso de división celular cuando la célula sólo hubiese sufrido una división mitótica, para ello desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: cytokinesis- block micronucleus) cuyo fundamento es la utilización de un agente químico denominado citocalasina-B (Fig.5) cuya función es impedir la citocinesis celular.

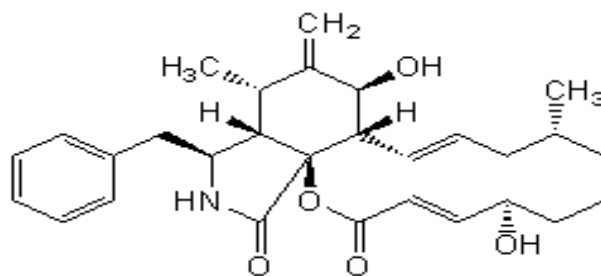


Fig. 5. Estructura química de la Citocalasina B [16].

La citocalasina-B es una molécula aislada del hongo *Drechslera dematoideum* (anteriormente *Helminthosporium dematoideum*), que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis al

imposibilita la creación del anillo contráctil, constituido por microfilamentos de actina y miosina, necesario para la partición celular en telofase mitótica. Esta molécula no afecta a las fibras del huso ni a la división del núcleo, por lo que origina células binucleadas y que han sufrido una sola división (Fig.6).

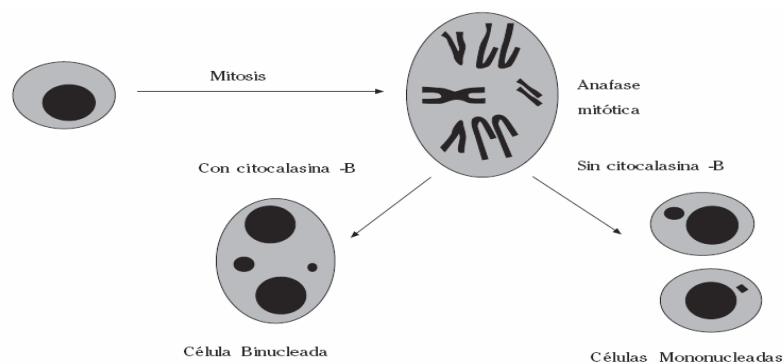


Fig. 6. Formación de micronúcleos debido a la pérdida de un cromosoma entero y fragmentos cromosómicos de tipo acrocéntrico en anafase mitótica. El esquema muestra el bloqueo con citocalasina-B y la consecuente obtención de células binucleadas, sin el cual se observarían células mononucleadas con pérdida cromosómica siendo imposible diferenciar si se trata de células madres o hijas [54].

El año 1999 fue crucial para el ensayo de MN, ya que la técnica fue validada a nivel mundial y considerada como un biomarcador efectivo de daño en el ADN. Para la validación se creó un programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: HUMAN MicroNucleus Project), diseñado por Michael Fenech y Stefano Bonassi con el fin de recopilar las frecuencias basales de MN obtenidas en diferentes laboratorios y poblaciones del mundo

[<http://ehs.sph.berkeley.edu/holland/humn/>]. El principal objetivo consistió en identificar las fuentes y niveles de variabilidad capaces de influir en la frecuencia basal de micronúcleos en linfocitos humanos, comparar las distintas técnicas utilizadas para definir un protocolo estándar y realizar así un estudio prospectivo por parte de todos los laboratorios implicados e incluso intentar establecer una asociación entre la frecuencia de MN y enfermedades como el cáncer [54]. Se han descrito criterios de selección para reconocer tanto las células en las que se va a realizar el recuento, como criterios para seleccionar los MN que presenten las características necesarias para ser reconocidos como tales y que el recuento realizado sea fiable y objetivo (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios definidos por el HUMN-project para la selección de células binucleadas y micronúcleos en cultivo de células humanas [51].

CRITERIO PARA CELULAS BINUCLEADAS	CRITERIO PARA MICRONÚCLEOS
El citoplasma debe distinguirse claramente.	El diámetro oscila entre 1/16-1/3 de la media del diámetro del núcleo principal.
Membrana citoplásmica y nuclear intactas.	No refractarios.
Núcleos con similar grado de condensación de la cromatina.	Intensidad de tinción similar a los núcleos principales o superior.
Igual tamaño, forma (ovalados) y patrón de tinción	Forma similar a los núcleos de la célula binucleadas.
Pueden estar unidos por puentes nucleoplásmicos.	No conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleada.
Pueden tocarse pero no solaparse.	Pueden tocar los núcleos de la célula binucleada pero no solaparse con ellos.
Ninguno de los núcleos debe encontrarse en etapas de apoptosis.	

Otro tipo de daño que se puede observar por medio del ensayo de micronúcleos son los puentes nucleoplásmicos (PN) (Fig.7), los cuales se pueden formar cuando los centrómeros de los cromosomas o las cromátidas discéntricas se tiran a polos opuestos en la anafase, son fácilmente visibles con el ensayo de MN y en la figura 8 se presentan de manera esquematizada la formación de PN y MN [55].

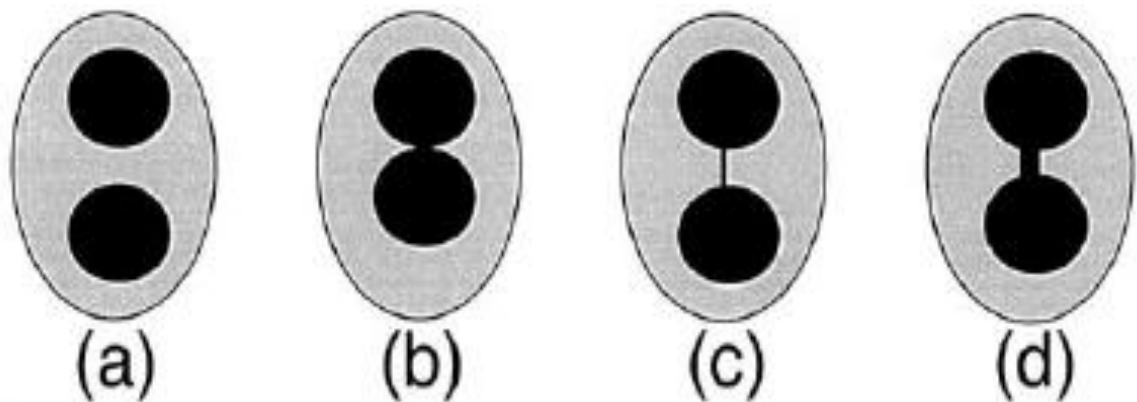


Fig. 7. Criterios de selección de células binucleadas en el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis. (a) Célula binucleada, (b) binucleada con sus núcleos tocándose, (c) binucleada con un puente nucleoplásmicos entre sus núcleos, (d) binucleada relativamente con un puente nucleoplásmicos amplio [50].

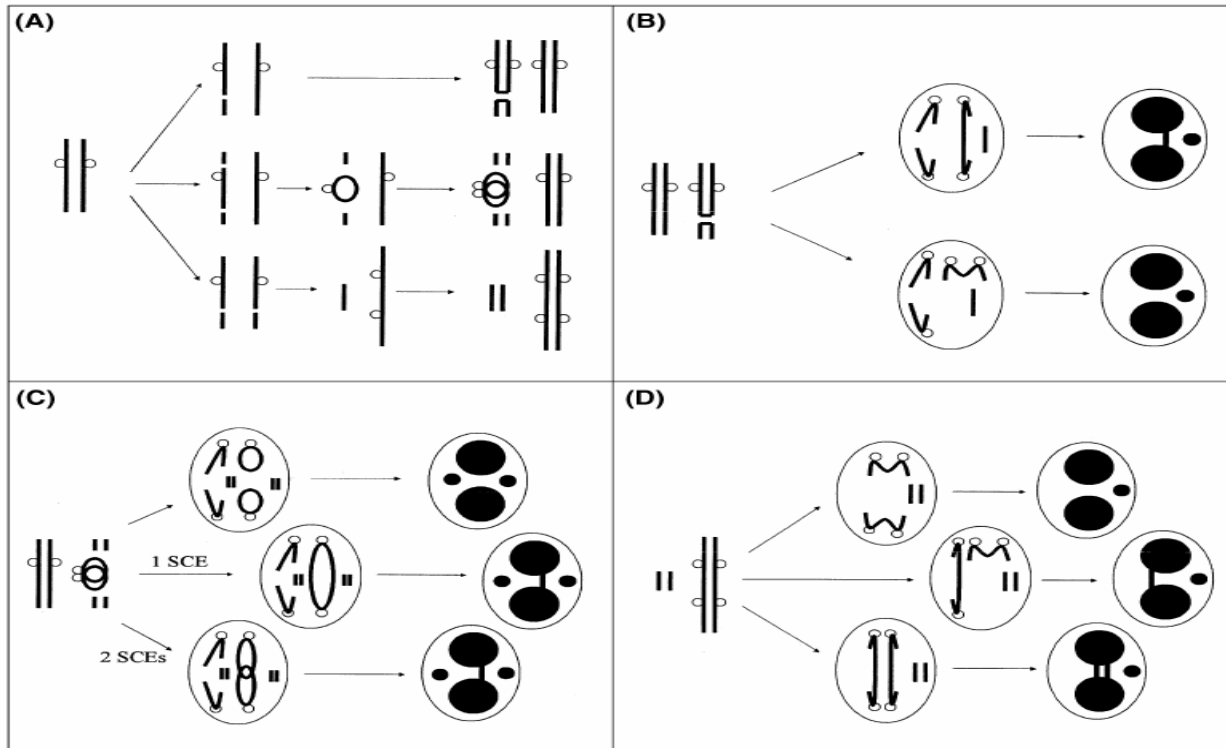


Fig.8. A) (Arriba) la doble cadena de ADN se rompe esto es inducido en un cromosoma, pero sigue sin repararse hasta después de la replicación. Invirtiéndose el sitio de unión de los extremos rotos después de la replicación con lo cual se obtiene una cromátida dicéntrica y un fragmento acéntrico. **(Medio)** dos rompimientos de la cadena de ADN a ambos lados del centrómero de un cromosoma. Estos extremos rotos del cromosoma se invierten al unirse con lo que se produce un anillo de cromátidas y dos fragmentos acéntricos los cuales posteriormente se replicaran. **(Abajo)** dos rompimientos de la cadena del ADN son inducidos en cromosomas homólogos o no homólogos. Invirtiéndose el sitio de unión de los extremos rotos y se lleva a cabo la formación de un fragmento cromatídico dicéntrico y uno acéntrico que posteriormente se replicara. **B) (Arriba)** los centrómeros de la cromátida dicéntrica se tiran a polos opuestos en la anafase para formar un PN y el fragmento de las cromátidas acéntricas se rezagan para formar un MN. **(Abajo)** los centrómeros de la cromátida dicéntrica son atraídos hacia el mismo polo de la célula y no se forma un PN, sin embargo, el retraso del fragmento acéntrico da como resultado un MN. **C) (Arriba)** el anillo de las cromátidas se separa normalmente, pero los fragmentos acéntricos se retrasan en la anafase y se forman dos MN. **(Medio)** las dos cromátidas en anillo, después de completar un (ICHs), se transforma en un anillo dicéntrico de gran tamaño que conduce a la formación de un PN, cuando los centrómeros se tiran a los polos opuestos de la célula en la anafase, los fragmentos acéntricos se retrasan y se forman dos MN. **(Abajo)** las dos cromátidas en anillo después de completar dos (ICHs), concadenados, conducen a la formación de un PN cuando los centrómeros se tiran a los polos opuestos de la célula en anafase. Y los fragmentos de acompañamiento acéntrico se retrasan en la anafase para formar dos MN. **D) (Arriba)** los centrómeros de las cromátidas dicéntricas se tiran a los polos opuestos de la célula y no se forma un PN. **(Medio)** los centrómeros de una de las cromátidas dicéntricas se tiran a los polos opuestos de la célula y forman un PN. **(Abajo)** los centrómeros de ambas cromátidas dicéntricas se tiran a los polos opuestos de la célula y se forman dos PN. Y a partir de los fragmentos acéntricos que se retrasaron en la anafase se forma un MN [56].

Este parámetro no era considerado como una prueba de daño al ADN, pero la importancia de la evaluación de los PN no debe subestimarse ya que proporciona una evidencia directa de los daños y de la mala reparación de los rompimientos del ADN, que no es posible visualizar con solo evaluar a los MN.

Además la evaluación de este fenómeno podría ser utilizado para identificar defectos en la recombinación del ADN, errores en las vías de reparación o para identificar y diferenciar entre los mecanismos genotóxicos de diferentes agentes [56,57].

Para que los PN sean evaluados deben de cumplir con las siguientes características:

- ❖ Los PN son un vínculo permanente entre el citoplasma de los núcleos de una célula binucleadas.*
- ❖ La anchura de un PN pueden variar considerablemente pero por lo general no excede de un cuarto del diámetro de los núcleos dentro de la célula.*
- ❖ Los PN debe tener las mismas características de tinción de los núcleos principales.*
- ❖ En raras ocasiones más de un PN se puede observar en una célula binucleadas.*

- ❖ Una célula binucleada con un PN puede contener uno o más micronúcleos [51].

Otro tipo de eventos que podemos evaluar por medio del ensayo de MN es el de muerte celular como apoptosis y necrosis de las cuales debemos conocer también sus características [50,51].

El estado normal o fisiológico de un organismo se consigue con respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos. Para ello, una variedad de sistemas y procesos están implicados en el mantenimiento de la integridad celular, desde la membrana celular (procesos de endocitosis y exocitosis), a cambios metabólicos y de expresión génica, o a los mecanismos de defensa y a los sistemas de reparación [58].

Sin embargo, un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por

microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes [58].

La muerte celular, según criterios clásicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos regulados, como la apoptosis, y la no regulada necrosis (Fig.9).

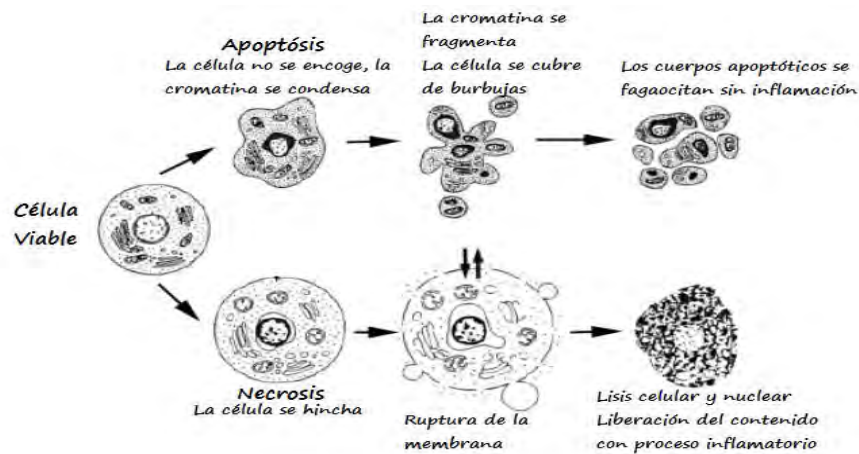


Fig. 9. Procesos de muerte celular Apoptosis y Necrosis [58].

1.10. Necrosis

La muerte celular se puede producir por necrosis, cuando el daño es letal o se produce una muerte accidental. La necrosis (Fig.9) del griego nekrós “muerte” es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias

determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos o, por ejemplo, por una infección o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune. Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que las células se hinchan, se deterioran las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra. La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias [58,59].

1.11. Apoptosis

Otros tipos de muerte celular conllevan la activación de mecanismos específicos que dictan que se produzca un suicidio o muerte celular programada: una serie de eventos que culminan en la muerte de la célula de forma genéticamente regulada. Estos mecanismos fisiológicos de muerte son empleados por los organismos multicelulares durante el desarrollo, la morfogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis

tisular en el organismo adulto, así como para controlar el número de células y eliminar células infectadas, mutadas o dañadas [58,59].

Este tipo de muerte celular se realiza de una forma ordenada y silenciosa, y confiere ventajas al conjunto del organismo durante su ciclo vital. Para definir a este último proceso, y como sinónimo de muerte celular programada, se acuñó el término apoptosis, neologismo tomado del griego clásico (apo: “fuera de” o “separación” y ptosis: “caída”) [58,59].

La muerte por apoptosis es más limpia que la necrosis; se detectan cambios morfológicos particulares la membrana celular no se destruye engloba a los cuerpos apoptóticos o material celular y no se produce inflamación ya que las células fagocitarias reconocen, captan y eliminan los cuerpos apoptóticos [58,59].

La apoptosis se puede definir como “el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos”. En este caso, una serie de estímulos o señales hacen que la célula decida su propia muerte; es lo que se ha calificado como la muerte que permite vivir.

Este tipo de muerte se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva entre organismos tan diversos como los nematodos y los mamíferos. El programa de autodestrucción es complejo y se requiere una precisa coordinación entre la activación y la ejecución de varios subprogramas de la maquinaria de muerte. Las características generales de la muerte celular por apoptosis y necrosis se observan en (Tabla 3) [58].

Tabla 3. Características generales de la apoptosis y necrosis [58].

APOPTOSIS	NECROSIS
Muerte fisiológica. Proceso muy regulado y controlado.	Muerte no fisiológica; muerte accidental traumática. Proceso no regulado.
Se produce durante el desarrollo, mantiene la homeostasis tisular y elimina células dañadas.	No se produce durante el desarrollo.
Inducida por estímulos intracelulares o extracelulares.	Inducida por un daño celular o tisular.
Proceso energéticamente activo y requiere de biosíntesis de proteínas.	Proceso energéticamente pasivo.
Sigue un orden específico de eventos. Condensación de la cromatina y fragmentación internucleosomal del DNA genómico. Mantenimiento estructural de orgánulos.	La célula se hincha, se lisan orgánulos subcelulares y se desintegran en forma desordenada.
Mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática. El contenido celular queda englobado en los cuerpos apoptóticos. No se produce la liberación del contenido celular. No se produce inflamación.	La ruptura de la membrana conduce a la liberación del contenido celular al espacio extracelular, asociada con inflamación.
Participación activa de componentes celulares. Degradación mediada por caspasas.	Proceso pasivo.
Fagocitosis de cuerpos apoptóticos.	Lisis celular, y daño a las células vecinas.

La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos que definen el proceso (Fig.9). La adhesión celular y los contactos intercelulares disminuyen y se produce una pérdida de estructuras especializadas de la superficie celular (por ejemplo, los microvilli). En la membrana plasmática, que inicialmente se mantiene íntegra, se producen cambios en la distribución de los fosfolípidos y se forman protusiones, proceso conocido como el burbujeo. El volumen celular disminuye y el citoplasma se condensa. El núcleo se reduce y la cromatina se compacta, adquiriendo una distribución marginal alrededor de la envoltura nuclear, con agregación de los poros nucleares y disolución focal de la lámina nuclear. Las proteínas del citoesqueleto se desensamblan y la función mitocondrial se reduce. Finalmente, la célula colapsa, produciéndose una escisión en múltiples estructuras, denominadas cuerpos apoptóticos, constituidos por partes del citoplasma y orgánulos rodeados de membrana plasmática. Todo este proceso ocurre sin liberación del contenido citoplasmático u orgánulos subcelulares al medio exterior ya que, a diferencia de la muerte celular por necrosis, no se produce ruptura de la membrana plasmática. En el ámbito fisiológico, los cuerpos apoptóticos o picnóticos son retirados del espacio

extracelular por células fagocitarias y, por tanto, no cursa ningún proceso de respuesta a daño celular o inflamación [58,59].

1.12. Eliminación de los cuerpos apoptóticos

La muerte por apoptosis es efectiva si los restos celulares (los cuerpos apoptóticos) se eliminan a través de un proceso complejo y muy regulado. La limpieza de estos restos celulares se puede realizar por los macrófagos “profesionales” o por células vecinas, fagocitos “semi-profesionales” que manifiestan su primitivo potencial fagocitario [58,59].

Las células fagocitarias claramente reconocen y discriminan entre una célula apoptótica y una célula viable. La eliminación específica y efectiva se basa en la existencia de sistemas de reconocimiento (receptores) localizados en la membrana plasmática de los fagocitos y en las señales denominadas “cómeme” que portan las células apoptóticas, moléculas indicadoras de su estado. En las primeras etapas de la apoptosis la célula que se ha preparado para morir libera una serie de factores o señales (“encuéntrame”) que facilitan el reclutamiento de fagocitos. Entre estas señales, para que se localice la célula apoptótica, se

encuentra la lisofosfatidilcolina, lípido que se secreta, aunque se desconoce el tipo de receptor del fagocito que lo reconoce [58,59].

Un mecanismo de reconocimiento se fundamenta en uno de los eventos tempranos que se produce en la célula apoptótica, que sirve como marcador particular de los cuerpos apoptóticos, y que está relacionado con la asimetría de la membrana plasmática. La distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática, bicapa lipídica de composición y orientación precisa de fosfolípidos, es asimétrica, aunque existe un dinamismo o intercambio entre los fosfolípidos de ambas caras. En el mantenimiento de la asimetría están implicadas varias actividades enzimáticas. La externalización de la fosfatidilserina (fosfolípido normalmente confinado a la cara interna de la membrana plasmática) es el resultado de un balance, regulado por los niveles de calcio intracelulares, entre la actividad de la aminofosfolípido translocasa y la escramblasa [58,59].

En las células apoptóticas se inhibe la aminofosfolípido translocasa y se activa la escramblasa produciéndose una pérdida de la asimetría de la membrana plasmática. Esto provoca la exposición en la cara externa de la membrana de moléculas de fosfatidilserina asociadas en forma de

parches: una de las señales “cómeme”. La fosfatidilserina es reconocida por un receptor especializado del macrófago [58,59].

El reconocimiento de los cuerpos apoptóticos también se ha relacionado con otros cambios que se producen en las células apoptóticas. Uno de ellos afecta a los hidratos de carbono de proteínas y lípidos de la superficie celular [58].

Se ha descrito la pérdida de residuos terminales de ácido siálico exponiéndose regiones normalmente enmascaradas que, en este caso, pueden ser reconocidas por las lectinas de la superficie de macrófagos. Además, hay otros elementos candidatos a funcionar como señales; son sitios a los que pueden unirse moléculas del fluido extracelular (como el componente C1q del complemento o la trombospondina, entre otras moléculas) que, tras la unión posiblemente a la fosfatidilserina, marcarían a la célula apoptótica. Por último, en el fagocito, un repertorio de receptores reconocería el conjunto de señales. Además de las lectinas, algunas integrinas de las subfamilias $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 5$, receptores de limpieza (scavenger), el receptor C1q y el receptor CD14, parecen estar implicados en el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos [58].

1.13. Rutas de señalización del proceso de apoptosis

La apoptosis, como proceso activo dependiente de energía, se puede iniciar por una gran variedad de estímulos, intracelulares o extracelulares, participando las células en su propia muerte de una forma organizada y eficiente. Un conjunto variado de moléculas que pueden sobreexpresarse o activarse, o que pueden reprimirse o inhibirse, están implicadas en la apoptosis. La estimulación de moléculas pro-apoptóticas o la inhibición de factores anti-apoptóticos dependen del tipo celular y del insulto. Se ha descrito una redundancia asociada a una especialización funcional de las moléculas que constituyen las diferentes familias implicadas en el desarrollo del programa apoptótico. La multiplicación de los reguladores de la muerte celular permite que los miembros de una familia puedan realizar su función según su localización subcelular o, por ejemplo, dependiendo de las interacciones proteína-proteína que puedan establecer. Esta división de labores permite a los organismos multicelulares detectar y responder diferencialmente a distintos estímulos. Así, en humanos, en la muerte inducida a través de receptores de muerte y por estrés de retículo endoplásmico o genotóxico, participan las caspasas 8, 4 y 2, respectivamente [58].

El programa de apoptosis se desarrolla en varias etapas. En la primera, etapa efectora o de determinación, la célula reacciona ante un estímulo determinado o ante su ausencia (señales de desarrollo, estrés celular, alteración del ciclo celular, etc.) decidiendo iniciar el proceso de apoptosis. En la segunda, etapa de ejecución o degradativa, la célula sufre un conjunto de alteraciones moleculares que desencadenan la muerte celular. A éstas hay que añadir la fase de limpieza o eliminación de los cuerpos apoptóticos. Las diferentes rutas a través de las que se regula el proceso de apoptosis, así como las moléculas implicadas en su activación y ejecución, se muestran en la Figura 10 [58].

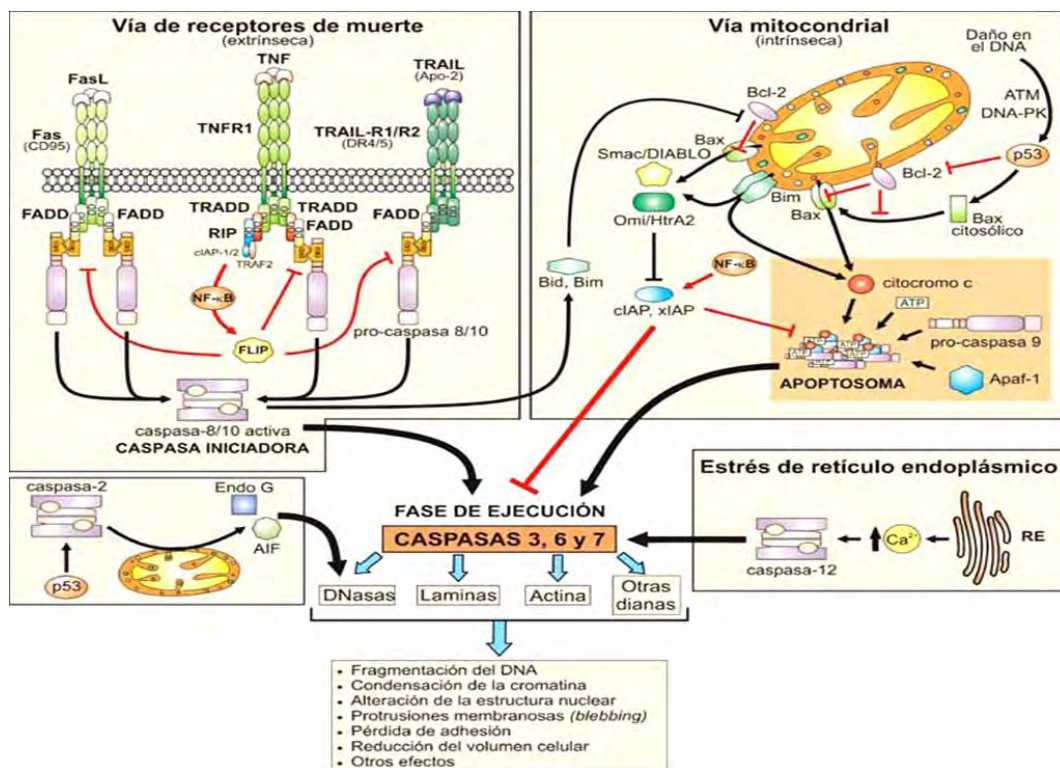


Fig. 10. Rutas que regulan el proceso de apoptosis [58].

1.14. Vía de los receptores de muerte

Una primera ruta de señalización del proceso de apoptosis tiene su origen en la membrana celular a través de lo que se conoce como vía extrínseca o de receptores de muerte. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor de TNF (TNFR) cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína, un dominio transmembrana y una secuencia en su dominio citoplasmático para acoplar el receptor con el resto de la maquinaria apoptótica.

Estos receptores también participan en el control de otros procesos como la respuesta inmune e inflamatoria, la homeostasis ósea y el desarrollo y diferenciación de estructuras epiteliales [58].

La señal se inicia tras la unión de los correspondientes ligandos (citoquinas pro-apoptóticas y proinflamatorias como FasL, TNF, etc.) a sus respectivos receptores de muerte (Fas, TNFR1, TRAILR1, etc.). La unión del ligando provoca la homotrimerización del receptor y, de este modo, el receptor de muerte es capaz de reclutar proteínas adaptadoras hacia la membrana celular. Este proceso implica la interacción homofílica entre los dominios de muerte DD (Death Domain) de los receptores con los de las moléculas adaptadoras (proteínas puente entre el receptor y la caspasa) como la proteína

FADD (Fas Associated Death Domain). Las moléculas adaptadoras poseen los dominios efectores de muerte DEDs capaces de interactuar homofílicamente con algunos miembros de la familia de las caspasas provocando su activación. Así, se forma un complejo de señalización de muerte (DISC; Death-Inducing Signaling Complex) que contiene a la proteína FADD y las caspasas 8 o 10 [58].

La activación de la procaspasa-8 requiere su asociación con la molécula adaptadora FADD a través de los dominios DED, situándose la caspasa-8 en la vía apoptótica mediada por receptores de muerte. La caspasa-8 se activa, dirigiendo de esta forma la ejecución de la apoptosis ya que, a su vez, activa a las caspasas ejecutoras. Además, la caspasa-3 puede eliminar un dominio de la proteína Bid amplificando la señal de muerte celular ya que causa un daño a la mitocondria [58].

Por otro lado, a través de la vía de señalización de los receptores de muerte, la activación de las caspasas puede ser regulada por la proteína FLIP (Flice-like Inhibitory Protein). Ésta contiene el dominio DED, lo que le permite unirse al prodominio de la procaspasa-8 bloqueando la interacción de dicha caspasa con los complejos receptor-proteína adaptadora e interfiriendo en el proceso apoptótico [58].

1.15. Vía mitocondrial

El orgánulo mediador central de una segunda vía es la mitocondria, que también puede ser mediador de la necrosis y de la autofagia. La importancia de estos orgánulos es manifiesta ya que defectos en la cadena de transporte electrónico pueden inducir la formación de EROS causando peroxidación lipídica y daños en la Membrana [58].

En 1994 se propone a la mitocondria como una de las primeras dianas durante la apoptosis. Además de otros estudios previos puntuales que relacionaban la apoptosis y la mitocondria, en esa fecha se describen los cambios observados en las etapas iniciales de la apoptosis: el potencial de membrana mitocondrial disminuye asociado a un desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico y síntesis de ATP, y se reduce la traducción [58].

La permeabilidad de la membrana mitocondrial está controlada por un poro complejo conocido como el mega canal mitocondrial o el poro de transición de permeabilidad mitocondrial, que mantiene la homeostasis de la matriz mitocondrial. La apertura de este canal poliproteico conduce a un incremento en la permeabilidad de la membrana interna permitiendo la entrada o salida de diferentes moléculas, proceso que

está estrictamente controlado. Como componentes mínimos de este poro se ha descrito a la proteína de la membrana interna ANT (Adenine Nucleotide Translocator), a VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) de la membrana externa y la ciclofilina D de la matriz mitocondrial [58].

Algunos miembros de la familia Bcl-2 regulan la actividad de canal de las proteínas ANT y VDAC. Una gran parte de estímulos apoptóticos (estrés celular, drogas, radiaciones, agentes oxidantes, etc.) utilizan esta segunda ruta de señalización que se conoce como la vía mitocondrial o intrínseca, que está regulada por proteínas de la familia Bcl-2 [58].

Los daños mitocondriales y la liberación de proteínas mitocondriales amplifican la señal apoptótica en células de mamífero; cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial causan la liberación al citoplasma de más de 40 moléculas implicadas en la apoptosis [58].

Entre ellas se liberan de la mitocondria al citoplasma diversas proteínas apoptogénicas como el citocromo C, el factor inductor de apoptosis AIF, la endonucleasa G, la proteína Smac/DIABLO (Smac: Second mitochondria-derived activator of caspases; DIABLO: Direct IAP Binding Protein with low isoelectric point) y la serín-proteasa Omi/Htr A2 (Oocyte Maturation Inhibitor/High temperatura requirement

protein A2). Además, se genera un flujo de calcio y se liberan EROS [58].

La liberación del citocromo C es un evento crítico ya que éste interacciona con la proteína citosólica Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1). Esta última actúa como molécula adaptadora en esta vía, con dATP y, posteriormente con la pro-caspasa-9. Se forma el megacomplejo heptamérico conocido como apoptosoma que ejecuta el programa apoptótico. La formación del complejo conduce a un cambio conformacional y activación de la procaspasa-9 que, a su vez, rompe el prodominio de caspasas efectoras, como las caspasas 3, 6 y 7, activándolas. El proceso global requiere energía y que la maquinaria de la célula no esté muy dañada; si el daño alcanza ciertos niveles, la célula que ha iniciado las primeras fases de la apoptosis puede continuar su muerte vía necrosis [58].

Otra de las proteínas que se libera de la mitocondria es AIF, una oxidorreductasa mitocondrial que, a diferencia del citocromo C, una vez en el citoplasma se transloca al núcleo y activa a la PARP-1. Como resultado el DNA se fragmenta de forma independiente de la actividad de las caspasas. Cuando la proteína pro-apotótica Smac/DIABLO se libera al citoplasma, interacciona con inhibidores endógenos de las

caspasas (IAP) neutralizándolos y, por tanto, previniendo el bloqueo de la apoptosis [58].

Los daños mitocondriales se pueden originar por diversos mecanismos. Las proteínas pro-apoptóticas, como Bax y Bak, pueden interaccionar con VDAC. Así, se ha descrito que en ausencia de señales apoptóticas esta proteína de la membrana externa interacciona con Bax controlando de esta forma los efectos letales que ejerce Bax. Sin embargo, si se recibe una señal de muerte, miembros de la familia Bcl-2 como Bid o Bad desplazan a VDAC. Bax y Bak se activan y la membrana mitocondrial se hace permeable, liberándose las proteínas mitocondriales apoptogénicas que activan esta ruta. Por otro lado, Bax puede cooperar con ANT formando un canal oligomérico letal en la membrana mitocondrial [58].

Otros daños mitocondriales también pueden ser originados por la inducción de un influjo de potasio o por una interacción con la caspasa-2 (que ocurre independientemente de su actividad de caspasa). La vía intrínseca está estrictamente controlada por miembros de la familia Bcl-2 y, principalmente, conduce a la activación de caspasa-9. Sin embargo, en algunos tipos de células (p.ej. hepatocitos), esta vía puede operar en ausencia de caspasa-9 o de su activador Apaf-1 [58].

En este caso la vía extrínseca queda interrelacionada con la intrínseca formándose un bucle de amplificación de la señal mediada por receptores de muerte. En este bucle interviene la proteína pro-apoptótica Bid que se procesa en dos fragmentos por la caspasa-8. Uno de ellos, el C-terminal (tBid), actúa sobre la mitocondria haciendo que se libere el citocromo C. Por tanto, Bid funciona como un puente de unión entre las dos vías amplificando la activación de las caspasas [58].

En base a todos los antecedentes mencionados previamente, los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos que pueda tener la Casiopeína IIgly no solo dañara al material genético de células transformadas si no que también actuara sobre el de células sanas, por lo tanto el presente proyecto pretende estudiar dichos efectos en linfocitos humanos de donadores clínicamente sanos.

2. JUSTIFICACIÓN

Se prevé que el número mundial de muertes por cáncer siga aumentando y alcance los 9 millones en 2015 y los 11,4 millones en 2030. En la actualidad los objetivos del tratamiento en contra del cáncer consisten en obtener su curación, prolongar la vida y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Los métodos terapéuticos más utilizados son la cirugía, la radioterapia y quimioterapia. Este último ha sido el tratamiento de elección para la mayoría de los tumores humanos. Es por eso que en México y en todo mundo, es continua la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer con una eficacia mayor, una toxicidad reducida y un menor costo. En la Facultad de Química de la UNAM, se han diseñado un grupo de más de 100 compuestos de coordinación con centro metálico de cobre llamadas Casiopeínas® entre las cuales la Casiopeína IIgly ha mostrado tener una clara actividad genotóxica, citotóxica y citostática tanto en modelos tumorales *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, estos mismos efectos sobre células sanas han sido poco estudiados. Por tanto nuestro estudio se enfocará a analizar los efectos antes mencionados en el sistema *in vitro* de linfocitos humanos obtenidos de donadores clínicamente sanos.

3. HIPÓTESIS

Si todas las células tanto sanas como las tumorales derivan de una sola célula y las alteraciones que posee se transmiten de la célula sana y cancerosa inicial a sus células descendientes, por medio de dos posibilidades: por mutación o cambio genético en la secuencia del ADN, o por un cambio epigenético o alteración en el modo que se expresan los genes. Entonces al cultivar linfocitos humanos aislados de sangre periférica tratados con diferentes concentraciones de Casiopeína IIgly durante las fases G1-S y G2-M, se obtendrán variaciones en la frecuencia de micronúcleos (Genotoxicidad), índice citotóxico de división nuclear así como en la citostaticidad.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar los efectos genotóxicos, citotóxicos y citostáticos de la Casiopeína IIgly en linfocitos humanos mediante el ensayo de micronúcleos *in vitro* tratados en las fases G1-S y G2-M del ciclo celular.

4.2. Particulares

- Determinar el efecto genotóxico de la Casiopeína IIgly por medio del ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis (CBMN) administrada en diferentes fases del ciclo celular G1-S y G2-M (20 y 44 hrs. respectivamente de iniciados los cultivos).
- Analizar el efecto citotóxico y citostático, por medio del Índice Citotóxico de División Nuclear (ICDN), el cual incluye células polinucleadas, Apoptóticas y Necróticas.

5. MÉTODO

Siembra

Con una jeringa previamente heparinizada se extraerán 5 a 10 ml de sangre por punción venosa de un donador sano, la cual posteriormente se separará por gradiente de densidad [49,50]. Se tomarán alícuotas de los linfocitos aislados y se adicionarán proporcionalmente en 10 tubos con medio de cultivo RPMI 1640 activado con 1.0 ml de fitohemaglutinina para incubar por 72hrs. a 37°C. A las 20 y 44 hrs [50] de cultivo se aplicarán los tratamientos por separado, se contará con un testigo positivo, T (+) (0.2µg/ml) de Mitomicina C y las concentraciones de 0.33, 0.66 y 1.0 µg/ml de Casiopeína IIgly y un testigo negativo T (-) (sin tratamiento). A las 48hrs se agregará la Citocalasina B (6µg/ml) para el bloqueo de la citocinesis y se procederá a la Cosecha.

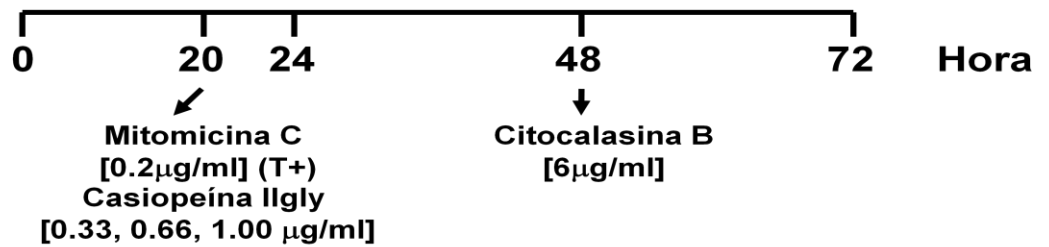
Cosecha

Una vez cumplido el tiempo de 72 hrs las muestras se centrifugarán por 5min con 2.5 ml de solución hipotónica (37°C) a 1500 RPM se retirará el sobrenadante y se procederá a la fijación con metanol- ácido acético en proporciones de 3:1 y 85:15 fríos respectivamente. Entre cada fijación se centrifuga por 5min a 1500 RPM y se retira el

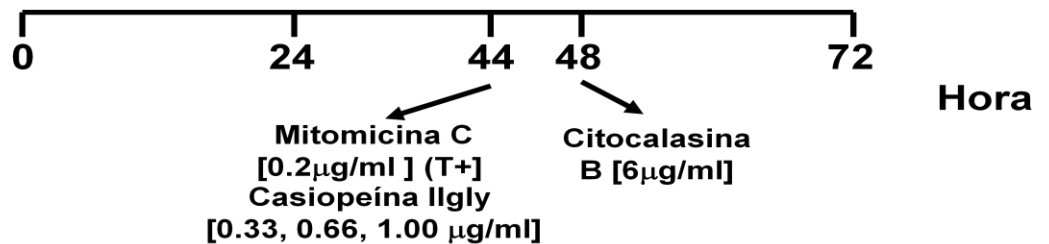
sobrenadante. Al termino de la última fijación el botón celular ya limpio se resuspenderá en 0.5ml de fijador limpio (85:15). Se gotearan las laminillas previamente rotuladas, a una distancia corta para preservar el citoplasma. Se teñirán las preparaciones con May Grünwald 2:1 por 5min y posteriormente con Giemsa al 7% por 15min. Se lavaran al chorro de agua en cada tiempo de tinción y se dejaran secar para posteriormente observarlas en el microscopio de campo claro con objetivos de 20,40 y 100x.

Fig. 11 Protocolo de tratamiento

a) 20h



b) 44h



a) A las 20hrs y b) A las 44hrs de iniciados los tratamientos

5.1. Evaluaciones

Para el análisis de la frecuencia de MN y PN, se analizan 1000 células binucleadas con el citoplasma bien definido y los núcleos bien teñidos.

Para el análisis de células polinucleadas, apoptóticas y necróticas, se analizan 500 células.

Para las células apoptóticas y necróticas se cuantifican aquellas que cumplan con los siguientes criterios: 1) Las células apoptóticas tempranas se pueden identificar por la presencia de condensación de la cromatina dentro del núcleo y límites citoplásmicos y nucleares intactos. 2) Las células apoptóticas avanzadas exhiben la fragmentación nuclear en cuerpos nucleares más pequeños dentro de una membrana citoplásmica del citoplasma intacto (cuerpos apoptóticos). De tal forma para las células Necróticas se debe tomar en cuenta los siguiente: 1) Las células necróticas tempranas se pueden identificar por la presencia de un citoplasma pálido con vacuolas numerosas (principalmente en el citoplasma y algo en el núcleo), membrana citoplásmica dañada con un núcleo intacto o casi intacto. 2) Las células necróticas avanzadas exhiben la pérdida de citoplasma y de la membrana nuclear dañada/irregular

y a menudo con el material nuclear que se escapa del límite nuclear [50,51].

Mientras que para el Índice Citotóxico de División Nuclear (ICDN) se cuantifican 500 células, por tratamiento y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{ICDN} = (\text{Ap} + \text{Nec} + \text{M1} + 2 (\text{M2}) + 3 (\text{M3}) + 4 (\text{M4}) / \text{N}$$

Donde Ap. Son células Apoptóticas, Nec. Células necróticas, M1, M2, M3 y M4, son células mono, bi, tri y tetranucleadas respectivamente, N total de células.

Por cada concentración se realizan dos experimentos independientes, cada uno con su duplicado. Se utiliza un microscopio de campo claro con objetivos de 20, 40 y 100X respectivamente.

5.2. Análisis estadístico

Para el análisis y evaluación de los resultados que se obtengan se aplicaran las siguientes pruebas estadísticas. Para la evaluación del porcentaje de Micronúcleos (MN) y Puentes nucleoplásmicos (PN) se realizará la prueba estadística Ji cuadrada con corrección de Yates ($\chi^2 Y$), para la evaluación de la muerte celular (Apoptosis y Necrosis) y proliferación celular se utilizará la prueba estadística de Z para proporciones. Para el ICDN se utilizara la prueba estadística de ji cuadrada (χ^2).

6. RESULTADOS

Los distintos parámetros citogenéticos evaluados para conocer el efecto de la Casiopeína IIgly en linfocitos humanos *in vitro* fueron Micronúcleos (MN), Puentes Nucleoplásmicos (PN) (Fig.12 A y B respectivamente), apoptosis (Fig.13 B), necrosis (Fig.13 A) y porcentaje de células polinucleadas (Fig.14 A y B). Cabe señalar que cada experimento se realizó dos veces, cada uno con su duplicado.

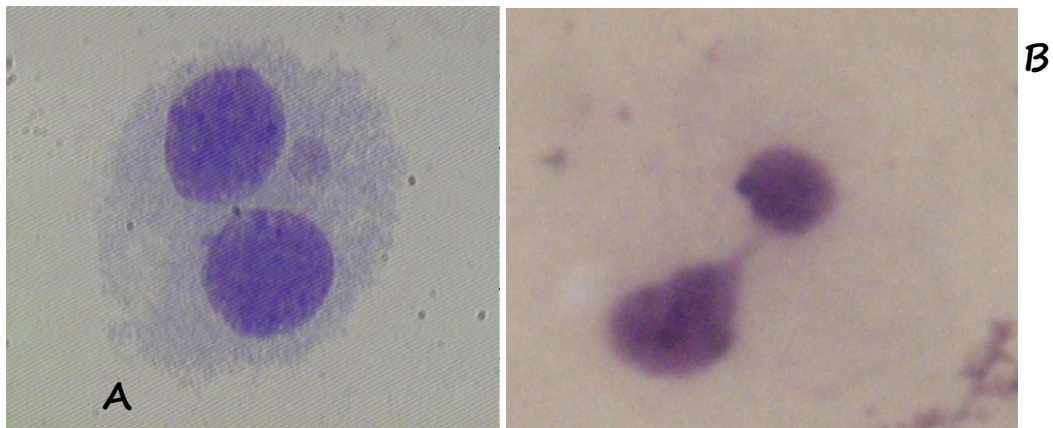


Fig. 12. Fotomicrofotografías de linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly A) Célula binucleada con micronúcleo y B) Célula binucleada con puente nucleoplásmico (100x).

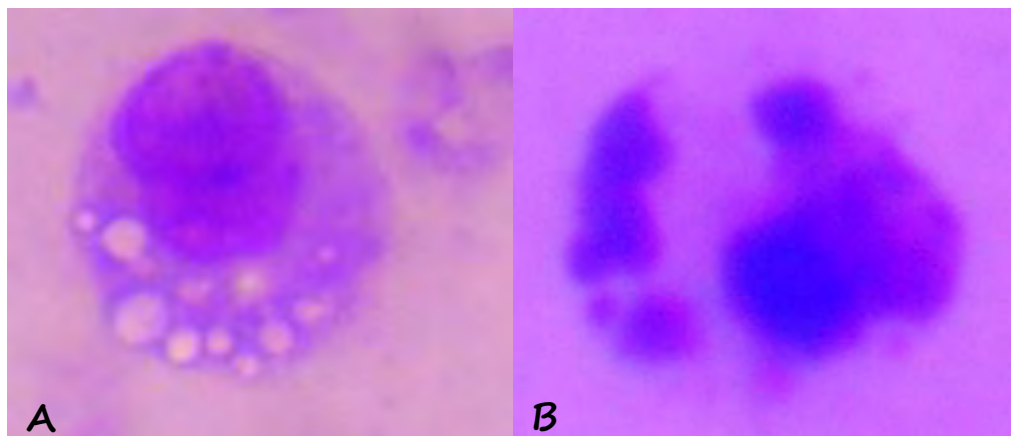


Fig. 13. Fotomicrofotografías de linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly A) Célula necrótica y B) Célula apoptótica (100x).

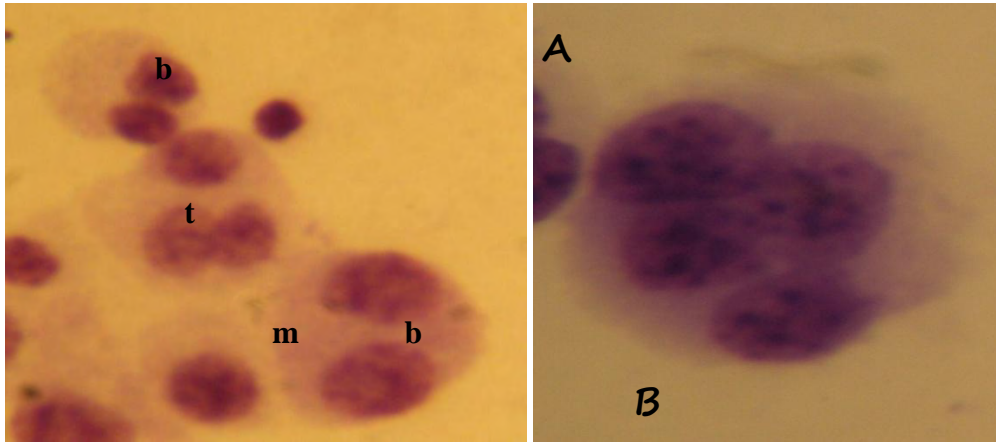


Fig. 14. Fotomicrofotografías de linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly A) Células mononucleada (m), binucleada (b) y trinucleada (t) y B) Célula tetranucleada (100x).

La tabla 4 y figura 15, representa el porcentaje de MN y PN a las 20 hrs de iniciados los cultivos, del promedio de dos experimentos, donde se muestra un incremento en el porcentaje de los PN ($p < 0.0005$) en la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ con respecto al testigo negativo y el porcentaje de MN se incrementa significativamente ($p < 0.05$) en la concentración de 0.66 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 4. Porcentaje de MN y PN en linfocitos humanos aislados tratados con Casiopeína IIgly (% , \pm DE) a las 20 horas de iniciados los cultivos.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	MN (% \pm DE)	PN (% \pm DE)	TOTAL DE CELULAS
TESTIGO (-)	0.47 \pm 0.02	0.30 \pm 0.03	4023
MMC 0.2	2.23 \pm 0.09***	1.52 \pm 0.09***	3761
0.33	0.65 \pm 0.04	0.34 \pm 0.03	4458
0.66	0.87 \pm 0.04*	0.59 \pm 0.05	4232
1	0.76 \pm 0.06	1.05 \pm 0.06***	3792

*** $p < 0.0005$, * $p < 0.05$ (X^2Y). (Promedio de dos experimentos con su duplicado).

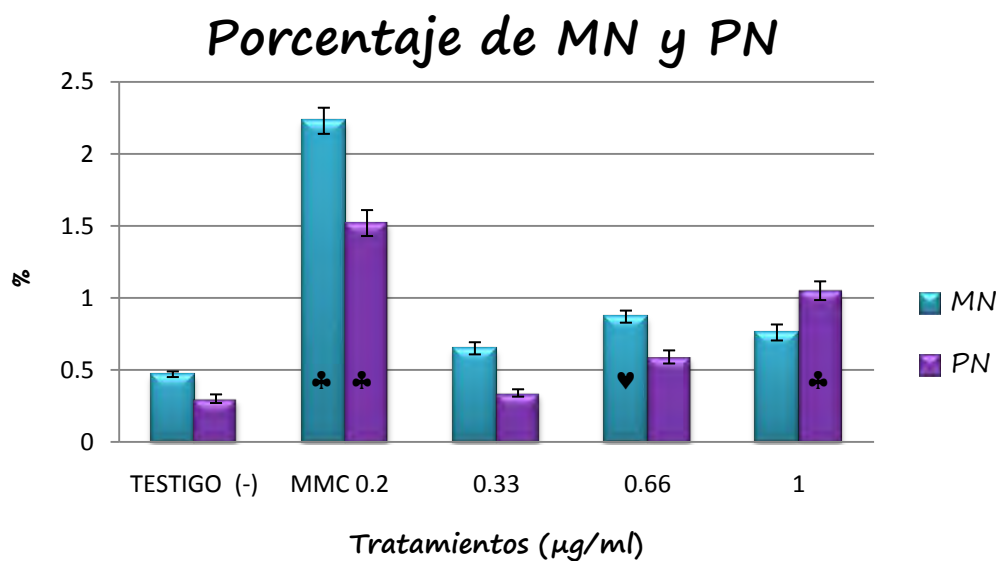


Fig. 15. Porcentaje de MN y PN en linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly a las 20 hrs de iniciados los cultivos $p < \heartsuit 0.05$, $\clubsuit 0.0005$ (χ^2 y).

Tabla 5 Células polinucleadas (\pm DE), porcentaje de células apoptóticas y necróticas (\pm DE), e ICDN de linfocitos humanos aislado tratados con Casiopeína IIgly a las 20hrs de iniciados los tratamientos.

Concentración (µg/ml)	M1 (% \pm DE)	M2 (% \pm DE)	M3 (% \pm DE)	M4 (% \pm DE)	APOP (% \pm DE)	NECRO (% \pm DE)	ICDN	TOTAL DE CEL.
TESTIGO (-)	38.32 \pm 0.68	57.22 \pm 0.67	1.29 \pm 0.08	2.90 \pm 0.16	0.14 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	1.68	7031
MMC 0.2	39.60 \pm 0.63 \clubsuit	57.29 \pm 1.12	0.55 \pm 0.04 \clubsuit	0.58 \pm 0.05 \clubsuit	1.10 \pm 0.07 \clubsuit	0.88 \pm 0.05 \clubsuit	1.60 \diamond	6565
0.33	40.62 \pm 0.69 \clubsuit	56.36 \pm 0.59 \clubsuit	0.83 \pm 0.06 \clubsuit	1.43 \pm 0.08 \clubsuit	0.35 \pm 0.02 \clubsuit	0.40 \pm 0.02 \clubsuit	1.62 \diamond	7910
0.66	39.59 \pm 0.79 \clubsuit	58.15 \pm 0.38 \clubsuit	0.73 \pm 0.03 \clubsuit	0.65 \pm 0.05 \clubsuit	0.52 \pm 0.02 \clubsuit	0.37 \pm 0.02 \clubsuit	1.61 \diamond	7278
1	42.62 \pm 0.78 \clubsuit	55.10 \pm 0.77 \clubsuit	0.45 \pm 0.03 \clubsuit	0.60 \pm 0.05 \clubsuit	0.76 \pm 0.04 \clubsuit	0.48 \pm 0.02 \clubsuit	1.57 \clubsuit	6882

$\clubsuit p < 0.002$, Z p/proporciones, $\clubsuit p < 0.05$, $\diamond p < 0.025$ (χ^2)
(Promedio de dos experimentos con su duplicado).

La figura 16 y tabla 5, representa el porcentaje de muerte celular a las 20 hrs de iniciados los cultivos, donde se observa un incremento significativo ($p < 0.002$) de muerte celular por apoptosis y necrosis con respecto al testigo negativo en todas las concentraciones, la apoptosis muestra un comportamiento dosis respuesta que la necrosis no muestra.

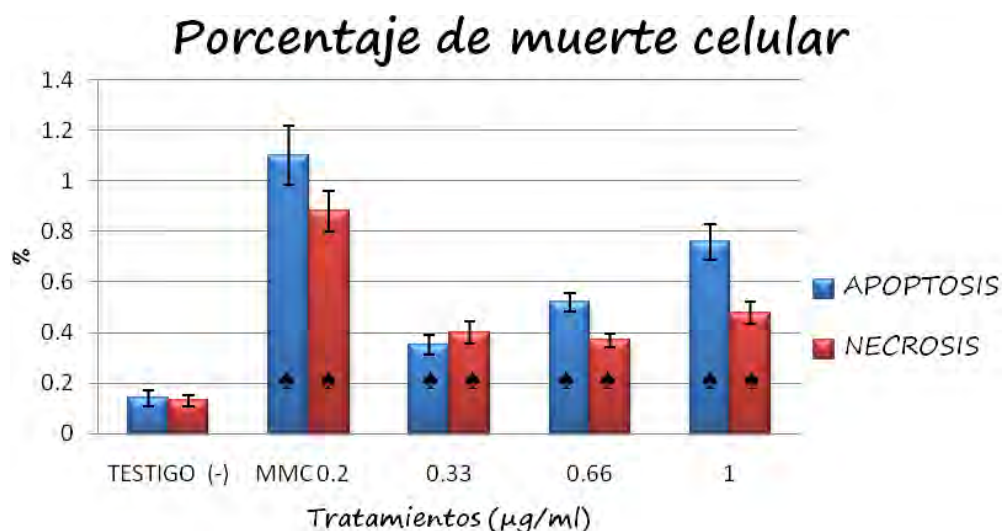


Fig. 16. Porcentaje de muerte celular en linfocitos aislados humanos tratados con Casiopeína IIgly a las 20 hrs de iniciados los tratamientos ♣ $p < 0.002$ (Z p/proporciones).

En la tabla 5, se muestra el promedio de células polinucleadas a partir de linfocitos en cultivo tratados con Casiopeína IIgly a las 20 hrs. mediante el ensayo de MN *in vitro*. Donde se nota que es más difícil que la células se dividan ya que en cada tratamiento las células mononucleadas y binucleadas predomina en relación al testigo negativo ($p < 0.002$).

La tabla 5 y figura 17, representa el Índice Citotóxico de División Nuclear (ICDN), muestra que a menos ICDN existe un mayor daño citotóxico y citostático por lo que en todas las concentraciones utilizadas se muestra este comportamiento.

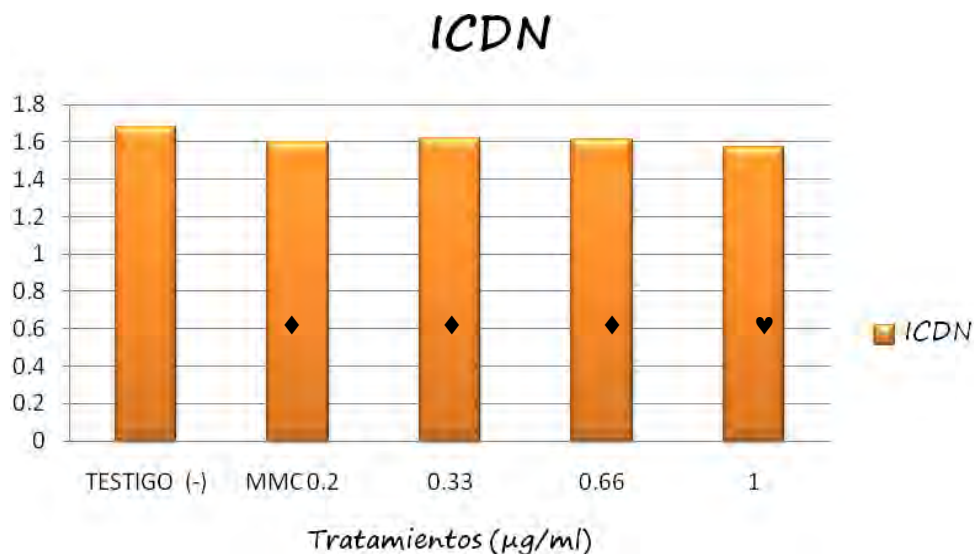


Fig. 17. Índice citotóxico de división nuclear en linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly a las 20 horas de iniciados los cultivos del promedio de dos experimentos ♦ $p < 0.025$, ♥ 0.05 (X^2)

La tabla 6 y figura 18, representa el porcentaje de MN y PN, muestra un notable incremento de PN significativamente en la concentración de 1 µg/ml ($p < 0.001$) con respecto al testigo negativo y en MN se observa un incremento significativo ($p < 0.0005$, 0.005 , 0.05) con respecto al testigo negativo en todas las concentraciones manifestando un comportamiento dosis respuesta.

Tabla 6. Porcentaje de MN y PN en linfocitos humanos aislados tratados con Casiopeína IIgly (% , ± DE) a las 44 hrs de iniciados los cultivos.

Concentración (µg/ml)	MN (% ± DE)	PN (% ± DE)	TOTAL
TESTIGO (-)	0.21±0.02	0.90±0.05	3344
MMC 0.02	2.19±0.06****	2.05±0.10****	2827
0.33	0.56±0.06**	0.96±0.05	3023
0.66	0.73±0.06*	1.24±0.06	2739
1	1.04±0.06****	1.72±0.07***	2206

♣ p<0.002 (Z p/proporciones), p< ****0.0005, ***0.001, **0.05, *0.005 (X²Y) (Promedio de dos experimentos con su duplicado).

Porcentaje de MN y PN

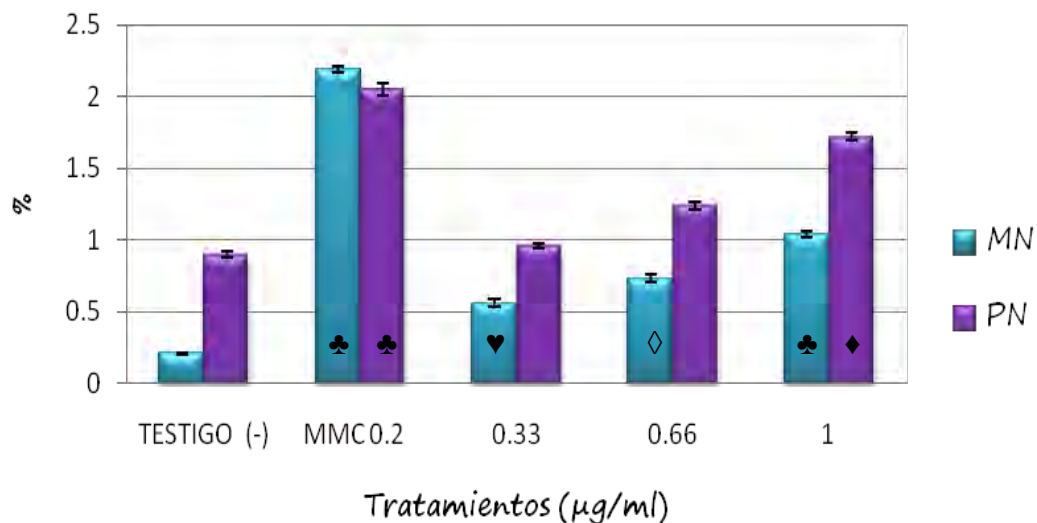


Fig. 18. Porcentaje de MN y PN en linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly a las 44 hrs de iniciados los cultivos P< ♣ 0.0005, ♦ 0.005, ♥ 0.05, ♦ 0.001 (x²y).

Tabla 7. Células polinucleadas (\pm DE), porcentaje de células apoptóticas y necróticas (\pm DE), e ICDN de linfocitos humanos aislados tratados con la Casiopeína IIgly a las 44 hrs de iniciados los cultivos.

Concentración (μ g/ml)	M1 (% \pm DE)	M2 (% \pm DE)	M3 (% \pm DE)	M4 (% \pm DE)	APOP (% \pm DE)	NECRO (% \pm DE)	ICDN	TOTAL DE CEL.
TESTIGO (-)	55.06 \pm 0.80	44.03 \pm 1.15	0.45 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01	1.45	7594
MMC 0.2	59.03 \pm 1.58♣	39.36 \pm 1.12♣	0.32 \pm 0.03♣	0.21 \pm 0.02	0.53 \pm 0.03♣	0.56 \pm 0.03♣	1.40♦	7183
0.33	56.83 \pm 1.32♣	41.74 \pm 0.75♣	0.48 \pm 0.03	0.39 \pm 0.04♣	0.22 \pm 0.02♣	0.35 \pm 0.02♣	1.43♣	7243
0.66	57.68 \pm 0.91♣	41.43 \pm 1.51♣	0.27 \pm 0.02♣	0.12 \pm 0.01	0.27 \pm 0.02♣	0.23 \pm 0.02	1.42♣	6611
1	59.91 \pm 1.07♣	38.86 \pm 0.86♣	0.48 \pm 0.03	0.21 \pm 0.02	0.35 \pm 0.02♣	0.19 \pm 0.02	1.40♦	5677

♣ $p < 0.002$ (Z p/proporciones), ♣ $p < 0.01$, ♦ 0.025 (X^2). (Promedio de dos experimentos con su duplicado).

La tabla 7 y figura 19, representa el porcentaje de muerte celular, donde se observa un incremento significativo ($p < 0.002$) de muerte celular por apoptosis con respecto al testigo negativo en todas las concentraciones mostrando un comportamiento dosis respuesta, en tanto que la necrosis va disminuyendo pero solo es significativa ($p < 0.002$) con respecto al testigo negativo en la concentración de $0.33 \mu\text{g/ml}$.

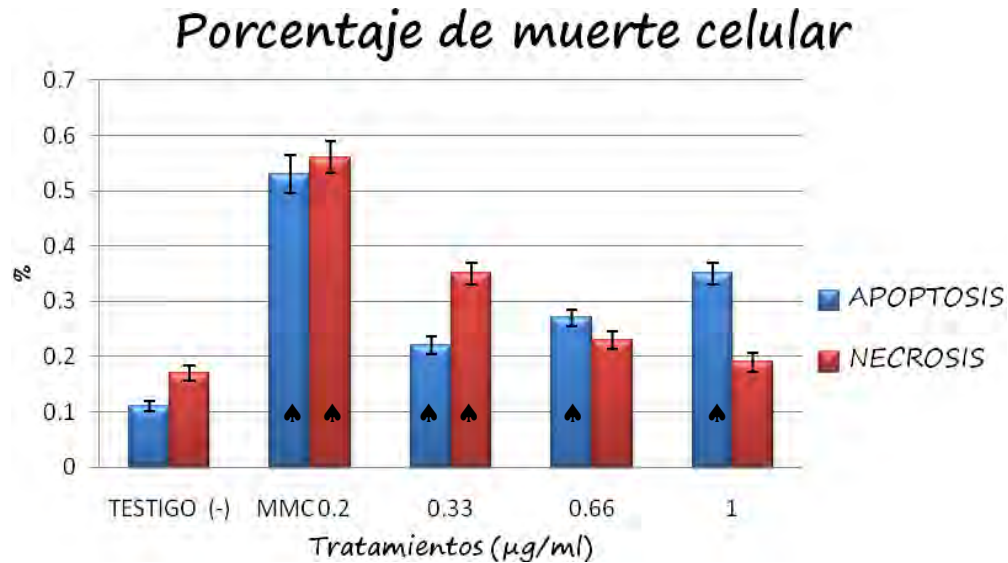


Fig. 19. Porcentaje de muerte celular en linfocitos humanos aislados tratados con Casiopeína IIgly a las 44 hrs de iniciados los cultivos ♣ $p < 0.002$ (Z p/proporciones).

En la tabla 7, se indica el promedio de células polinucleadas a partir de linfocitos humanos aislados tratados con Casiopeína IIgly a las 44 hrs. por medio del ensayo de MN *in vitro*. Donde se nota que es más difícil que la célula se divida ya que en cada tratamiento el promedio de células mononucleadas y binucleadas predomina en relación al testigo negativo ($p < 0.002$).

La figura 20 y tabla 7, representa el Índice Citotóxico de División Nuclear (ICDN) muestra que a menos ICDN existe un mayor daño citotóxico por lo que todas las concentraciones muestran este comportamiento siendo la más citotóxica la mayor concentración.

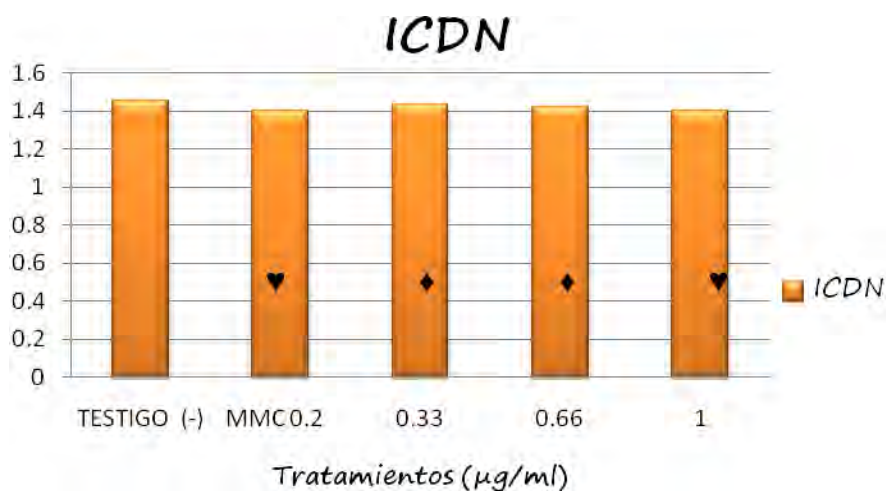


Fig. 20. Índice citotóxico de división nuclear en linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly a las 44 hrs de iniciados los cultivos $p < \blacklozenge 0.01$, $\heartsuit 0.025$ (χ^2).

Tabla 8. Resultados del total de células polinucleadas, porcentaje de células apoptóticas, necróticas, micronúcleos, puentes nucleoplásmicos e índice citotóxico de división nuclear en linfocitos humanos aislados tratados con Casiopeína IIgly a las 20 y 44hrs de iniciados los cultivos.

Concentración (µg/ml)	Tratamiento		Poli	% Apop	% Necro	% MN	% PN	ICDN
	Periodo (h)							
TESTIGO (-)	20		7012	0.14	0.13	0.47	0.30	1.68
MMC 0.2	20		6435	1.10♣	0.88♣	2.23****	1.52****	1.60♦
0.33	20		7850	0.35♣	0.40♣	0.65	0.34	1.62♦
0.66	20		7213	0.52♣	0.37♣	0.87**	0.59	1.61♦
1	20		6797	0.76♣	0.48♣	0.76	1.05****	1.57♣
TESTIGO (-)	44		7573	0.11	0.17	0.09	0.39	1.45
MMC 0.2	44		7105	0.53♣	0.56♣	0.85****	0.79****	1.40♦
0.33	44		7202	0.22♣	0.35♣	0.23**	0.40	1.43♥
0.66	44		6578	0.27♣	0.23	0.30*	0.51	1.42♥
1	44		5646	0.35♣	0.19	0.40****	0.66***	1.40♦

♣ $p < 0.002$ z p/ proporciones, **** $p < 0.0005$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.05$, * $p < 0.005$ (χ^2), ♦ $p < 0.025$,

♥ $p < 0.05$, ♠ $p < 0.01$ (χ^2).

7. DISCUSIÓN

En los últimos 17 años el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis se ha convertido en un método integral para la medición de la ruptura de cromosomas, pérdida de cromosomas, la no-disyunción, necrosis, apoptosis y citostasis [52].

De acuerdo con los objetivos planteados en el presente trabajo, se evaluó el efecto de la Casiopeína IIgly en linfocitos humanos *in vitro* usando las concentraciones de 0.33, 0.66, 1 $\mu\text{g/ml}$, en donde se evaluó el ICDN tomando en cuenta el promedio de células polinucleadas, apoptosis, necrosis. Y el porcentaje de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN).

7.1 Genotoxicidad

Los agentes genotóxicos son fármacos quimoterapéuticos que afectan los ácidos nucleicos y alteran sus funciones. Estos fármacos pueden unirse directamente al ADN o indirectamente al afectar las enzimas involucradas en la replicación del ADN o afectar otros participantes involucrados como el huso mitótico, cinetocoros, centrómeros y/o centriolos (ásters) [60].

Kirsch-Volders (1997) [61] y Garriott et al., (2002) [62] señalan que la prueba de MN *in vitro* es usada en las primeras etapas de desarrollo farmacéutico para evaluar genotoxicidad. Y en el caso de los PN dan información extra y complementan la medición de un nuevo arreglo de cromosomas y se considera como biomarcador de rearrreglo cromosómico [50].

Como se menciona antes los MN proceden de fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros que entran rezagados en la anafase durante la división nuclear y los PN son cromosomas dicéntricos que pueden llegar a formar puentes de tensión en anafase cuando cada centrómero migra a un polo diferente. Este cromosoma puede resultar de una translocación de cromosomas no homólogos o de translocaciones de las dos cromátidas del mismo cromosoma [63,64].

El diseño original de las Casiopeínas® contemplaba la posibilidad de interaccionar con la molécula de ADN y en consecuencia inducir un efecto genotóxico. Algunos datos apoyan esta posibilidad ya que en linfocitos humanos de sangre periférica y en células HeLa se ha mostrado que la Casiopeína IIgly induce fragmentación del ADN [65].

Sin embargo, no se ha estudiado a detalle desde que fase del ciclo celular está siendo provocado este efecto genotóxico, por lo que realizamos este trabajo en el cual, conforme a nuestros resultados desde la fase G1-S se observa la presencia de MN en la concentración de 0.66 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$).

Una posible explicación puede ser que el daño o efecto provocado se manifiesta y le permite a la célula seguir dividiéndose, pero al incrementarse la dosis los métodos de reparación que tiene el ADN se activan y reparan el daño o si el tipo de daño que se provocó es muy severo las células mueren y no puede ser observado.

En el caso del experimento realizado en la fase G2-M al evaluar la frecuencia de MN observamos que las tres concentraciones utilizadas de la Casiopeína IIgly son significativas con un comportamiento dosis respuesta por lo que podemos apuntar que se induce un mayor efecto genotóxico el cual al ir elevando la concentración de nuestro compuesto ya no puede ser reparado y se expresa el daño o muere la célula.

Con respecto a los PN para los experimentos a las 20hrs (G1-S) y 44hrs (G2-M) solo la concentración más alta resultó ser significativa.

Esto muestra que el daño o efecto que provoca la Casiopeína Ilgly sobre la cadena de ADN es reparado a bajas concentraciones pero al aumentarla estos mecanismos de reparación son insuficientes y se exhibe el daño ya sea como un efecto genotóxico o citotóxico.

La presencia de MN y PN indican que existe daño al ADN, causado por lesiones de rompimiento de cadena doble [66,67]. El cual nos proporciona una idea importante para distinguir de qué tipo es (aneugenico o clastógeno), ya que se sabe que cuando existe inducción de MN pero hay ausencia de PN el daño es aneugenico ya que el MN no sería el resultado de una ruptura cromosómica, lo que podría generar un PN, sino que al llevarse a cabo la anafase se perdió el cromosoma porque las fibras del huso no pudieron jalarlo y se formo por consiguiente un MN [56].

Por lo que podemos decir que la Casiopeína Ilgly provoca un daño de tipo clastógeno ya que existe la presencia tanto de MN como de PN.

Otra posible explicación para que exista daño genotóxico utilizando Casiopeína Ilgly es el de tipo de apilamiento, propuesto por Tovar et al., (2004) [68], donde señala que los complejos de cobre formados con

fenantrolina y aminoácidos tendrán un efecto intercalante. En este caso la Casiopeína IIgly posee un ligante 1,10 fenantrolina y glicina. Por esta razón proponemos 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 MN y PN. O bien por la formación de EROS de acuerdo con Fenech (1997) [69], el cual mostro que en células tratadas con sistemas que generan radicales, como la radiación ionizante y peróxido de hidrogeno se observan puentes nucleoplásmicos [16].

Dado que se observa la presencia de PN podemos proponer que la Casiopeína IIgly es capaz de generar especies reactivas de oxigeno cuando se reduce el Cu^{2+} a Cu^{1+} y como consecuencia generan radicales libres que son capaces de interactuar con la cadena de ADN y al tratar de reparar el daño se llevan a cabo rompimientos con lo cual se originan reordenamientos cromosómicos y se pueden formar así PN.

Estudios previos que respaldan el efecto genotóxico que induce la Casiopeína IIgly tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* dicen lo siguiente [25].

Atilano (2007) [47] reportó que la Casiopeína IIgLy induce MN a las concentraciones de 0.33, 0.66, 1.0 µg/ml con una tendencia dosis respuesta lo cual solo concuerda con el experimento que realizamos a las 44hrs de tratamiento ya que en el de las 20hrs no se observó este tipo de tendencia dosis respuesta.

Existe otro reporte en el que se utilizó la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) para evaluar la genotoxicidad de la Casiopeína IIgLy mostró que la frecuencia de ICHs aumenta significativamente al incrementar la concentración, por lo tanto, está manifestando alteraciones en el material genético (rompimientos de cadena doble) [18] lo cual concuerda con nuestro experimento realizado a las 44 hrs pero en el de las 20 hrs solo la concentración media resultó significativa ($p < 0.05$) lo que nos sugiere que el daño se da, pero al incrementarse la dosis el daño pudo ser reparado debido a que las células tienen más tiempo en contacto con nuestro compuesto, y/o fue muy severo y las células murieron por lo cual no se observó al hacer el conteo.

La Casiopeína IIgLy utilizada en un estudio *in vivo* no presentó daño genotóxico mediante la inducción de MN en organismos adultos (hembras y machos), ni en hembras gestantes. Pero si se incrementa de

manera secundaria el número de MN en las crías de hembras tratadas durante la gestación [33] lo cual concuerda con nuestro ensayo.

En un estudio en el cual se observó el efecto de seis Casiopeínas sobre el ciclo celular en células HeLa, la Casiopeína IIgly no mostró una alteración significativa en sus fases G1-S sin embargo en la fase G2 tuvo una diferencia significativa [70].

Sin embargo, el efecto genotóxico que tiene la Casiopeína IIgly al realizar el MNBC es insuficiente para evaluar con certeza si el daño que se está provocando es de tipo cromatídico (afectan a una sola cromátida del cromosoma) o de tipo cromosómico (afectan a ambas cromátidas del cromosoma), por lo que se puede complementar con la prueba de aberraciones cromosómicas. Miller et al., [71], mostró que sus resultados con la prueba de MN se correlaciona con la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas en células por algún clastógeno, lo cual puede ser de mucha ayuda para poder ubicar a la Casiopeína IIgly en S-dependiente o S-independiente.

Se sabe que los agentes S-independientes inducen aberraciones de tipo cromosómico cuando actúan durante las fases G₀ y G₁, aberraciones de tipo cromatídico durante la fase G₂, en cambio para los S-dependientes

se inducen aberraciones de tipo cromatídico en cualquier fase del ciclo celular y las alteraciones solo se visualizan una vez que la célula atraviese la fase S del ciclo celular [15].

Por lo que englobando nuestros resultados y utilizando los datos reportados por Atilano 2007 [47], por medio del ensayo de aberraciones cromosómicas en donde observo que el tipo de aberraciones que predominan son las estructurales (ACE) las cuales fueron en su mayoría de tipo cromatídico, podemos sugerir que la Casiopeína IIgly es S dependiente.

Para tener una mayor certeza y verificar estos datos tendríamos que realizar otros estudios, uno de ellos sería el de aberraciones cromosómicas con tratamientos a las 20 hrs. de iniciados los cultivos.

7.2. Citotoxicidad

Se entiende por citotoxicidad a cualquier agente o proceso que es toxico a las células lo cual significa que suprime las funciones de la célula o le provoca la muerte [¡Error! Marcador no definido.]. En el ensayo de MN se utilizo como parámetro de citotoxicidad al Índice Citotóxico de División Nuclear (ICDN) el cual utiliza datos de muerte celular (Apoptosis y Necrosis) y células polinucleadas (mono, bi, tri, tetra, etc.) [51].

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos, independientemente de su mecanismo de acción específico, inducen muerte celular programada (apoptosis) tras provocar daño sobre el ADN.

Pero se sabe que a lo largo del ciclo celular existen puntos de control en la fase G1-S, G2-M y en la Mitosis los cuales se encargan de verificar si la célula pasa a la siguiente fase o debido a algún daño provocado que no pueda ser reparado la célula deben morir ya sea por apoptosis o necrosis.

Con base en esto para nuestro ensayo realizado a las 20hrs y 44hrs después de iniciados los cultivos observamos en la figura 16 y 19 respectivamente que la Casiopeína IIgly es capaz de inducir muerte celular tanto por la vía apoptótica como por la vía necrótica, para esta última en el caso de el ensayo a las 44hrs solo en la concentración de 0.33 fue significativa ($p < 0.002$), es importante recalcar que la muerte celular que fue aumentando significativamente ($p < 0.002$) de manera dosis respuesta fue la apoptosis en ambos tiempos de tratamiento.

Sabemos que la muerte celular por apoptosis es la que se esperaría encontrar al utilizar muchos de los antineoplásicos en la actualidad ya que ocurre de manera limpia y no daña a células vecinas como sucede

en la necrosis en donde su contenido celular se difunde y daña a otras células.

Una posible explicación de por qué encontramos ambos tipos de muerte puede ser, que la apoptosis en su estado más avanzado puede llegar a ser necrosis en sistemas *in vitro* ya que no está presente el sistema de eliminación de cuerpos apoptóticos [58] por lo que podemos encontrar entonces este tipo de muerte celular en este ensayo.

Otra vía de inducción del proceso de apoptosis se inicia cuando se produce daño al ADN, ya que se cuenta con un sistema de reparación en el cual se decide si la célula puede seguir dividiéndose o por medio del factor de transcripción p53 que regula la transcripción de distintos genes en respuesta a una gran variedad de señales de estrés (daño al ADN, deficiencia de nutrientes, hipoxia, acortamiento de telómeros, etc) lo cual desencadena una serie de señales que tienen como fin la muerte celular [58].

Los resultados que se muestran en las figuras 16 y 19 se pueden comparar con varios experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* en los cuales se tuvo como resultado que el tipo de muerte que predomina para esta Casiopeína es la apoptosis siempre con un comportamiento dosis respuesta.

Para las células de glioma C6 de rata que fueron tratadas con Casiopeína IIgly se observó una acción dosis dependiente en el porcentaje de muerte celular [72] lo cual concuerda con nuestros resultados independientemente del tiempo en el que fueron administrados los tratamientos.

En un estudio realizado en la línea celular HeLa tratadas con varias Casiopeínas la IIgly mostró un incremento significativo en la muerte celular por apoptosis [73] lo cual concuerda con nuestro trabajo.

Otro estudio reporta que la Casiopeína IIgly *in vitro* sobre células de carcinoma de colon HCT-15 indujo apoptosis desde su primera concentración (1.25, 2.5, 5.0, 10 µg/ml) respecto a su testigo negativo [44]. Aunque ellos usaron concentraciones altas para esta Casiopeína sigue teniendo el mismo comportamiento que nosotros reportamos.

En otra investigación se observó que las células L1210 expuesta a la Casiopeína IIgly, mostraron fragmentaciones en el ADN, lo cual indica que este complejo mixto mata a las células, y muestra que preferentemente toman la ruta de la apoptosis [74] lo cual concuerda con nuestro estudio.

Otra investigación realizada en células del meduloblastoma mostró que la Casiopeína IIgly induce muerte celular principalmente por apoptosis [75] lo cual concuerda con este ensayo.

Se ha reportado que lo que origina este efecto citotóxico provocado por la Casiopeína IIgly se debe a la formación de EROS [24] los cuales son originados por la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} [25] lo que subsecuentemente genera radicales libres, como hidroxilo o súper oxido los 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 [24].

Otra posible explicación para el efecto citotóxico que provoca la Casiopeína IIgly estudiada por Avellar (2004) [76] en donde observa que el complejo de Fe-fenantrolina es generadora de EROS pero no dañan al ADN. Por lo que la citotoxicidad se le puede atribuir al complejo donador (glicina, aminoácido que forman parte de los seres vivos y es reconocida por la célula) que tiene la Casiopeína IIgly, más que a la fenantrolina; de acuerdo con Cai (2007) [77] el cual reporta que el cobre unido a 1,10 fenantrolina la cual es una molécula muy permeable y aunado a su lipofilidad, favorece el transporte de cobre a través de las membranas biológicas lo que puede facilitar el daño debido a que se generan especies reactivas de oxígeno dentro de la célula produciendo citotoxicidad.

Con base en todos estos antecedentes antes citados podemos decir que el tipo de vía por la cual la Casiopeína IIgly genera su acción es la vía mitocondrial o intrínseca ya que se ha observado que este orgánulo sufre daño en la bicapa lipídica de su membrana por medio de los radicales libres iniciándose así la cascada de caspasas que tiene como fin la muerte por apoptosis [24,46,65].

El comportamiento citotóxico que provoca la Casiopeína IIgly lo pudimos corroborar por medio del ICDN con el cual podemos decir que es capaz de inducir un efecto citotóxico desde la fase G1-S (ensayo a las 20hrs) figura 17 en todas las concentraciones utilizadas ($p < 0.025, 0.05$) y se sigue mostrando este daño en la fase G2-M para el de las 44hrs figura 20 en donde todas las concentraciones resultaron ser significativas ($p < 0.025, 0.01$) ambos con respecto al testigo negativo con un comportamiento dosis respuesta.

7.3. Citostaticidad

Se entiende por citostático cualquier agente, sustancia química o medicamento, capaz de detener el desarrollo o la multiplicación de las células (normales y anormales) [78]. De acuerdo con la tabla 5 y 7 para los experimentos tratados a las 20 hrs. y 44 hrs. respectivamente en donde se observa que a las células les cuesta más trabajo seguir

dividiéndose por lo que permanecen o predominan las células mononucleadas y binucleadas en todas las concentraciones.

Este comportamiento citostático lo evaluamos a través de el ICDN el cual nos mostro que tanto en los tratamientos que fueron administrados a las 20hrs como a las 44hrs muestran este efecto.

Una posible explicación al daño citostático que muestra la Casiopeína IIgly puede ser causa de: un bloqueo en la fase G₂, un decrecimiento en los niveles de ATP, estrés, la inhibición de ciertas proteínas que se encargan del ciclo celular, enzimas que inhiben la síntesis del ADN, la inhibición del huso o mal ensamblaje [79] y al tratar de ser reparado tardan más en pasar de una fase a otra y así lograr dividirse.

Tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* se han tenido estudios acerca del comportamiento que tiene la Casiopeína IIgly para producir un daño citostático en diferentes líneas celulares transformadas principalmente.

En un modelo *in vivo* donde se trato con 4.4mg/kg de la Casiopeína IIgly en diferentes órganos de ratones de la cepa CD-1 (células de corazón, hígado, bazo, riñón y testículo) se observo una disminución en la viabilidad celular [46] y al disminuir esta se afecta la proliferación celular lo cual concuerda con nuestros resultados.

Otros estudios *in vitro* han demostrado que la Casiopeína inhibe el crecimiento celular en líneas tumorales humanas de Sarcoma S189, CaLo y HeLa [35] lo que se observa en todas nuestras concentraciones.

Otra investigación muestra que la Casiopeína IIgly indujo inhibición de la proliferación de células HeLa, la cual se debe a los radicales libres que se genera al reducirse el cobre de este compuesto, induciendo como consecuencia muerte celular [80] y esto es de acuerdo con nuestros resultados.

Trejo (2005) menciona que al tratar células de glioma C6 con Casiopeína IIgly *in vitro* a diferentes dosis mostro una inhibición en la proliferación celular de manera dosis dependiente [72] lo cual coincide con nuestro estudio.

Otro dato que respalda nuestro estudio es el que se realizó en linfocitos humanos los cuales fueron tratados con la Casiopeína IIgly (1.00, 0.66 y 0.33 $\mu\text{g/ml}$) donde se observó que los linfocitos tienden a disminuir su índice de proliferación en relación con el testigo negativo [18].

Aunque en muchos de los experimentos se muestran la sensibilidad que tienen las células transformadas a ser dañadas con la Casiopeína IIgly, no se puede asegurar aun que este agente de nueva generación este

exento de presentar daños al igual que otros antineoplásicos en células sanas en este caso los linfocitos humanos, ya que es un agente no selectivo.

Dado que la Casiopeína IIgly tiene un centro de Cu este podría influir en su baja toxicidad ya que este es un oligoelemento que forma parte de varias enzimas y proteínas que se encuentran en nuestro organismo. Esto es de gran importancia ya que este compuesto de origen mexicano podría ser utilizado como un agente quimioterapéutico efectivo por las propiedades que presenta

8. CONCLUSIONES

- ❖ Los resultados del porcentaje de MN indican que la Casiopeína Ilgly muestra un mayor efecto genotóxico cuando los tratamientos son administrados en la fase de G₂-M.
- ❖ En el caso de los PN se observó que la Casiopeína produce rearrreglos cromosómicos en la concentración más alta para ambos tratamientos *antes* (20hrs G₁-S) o *después* (44hrs G₂-M) de la fase de síntesis (Fase S).
- ❖ Con nuestros resultados y con base en otros trabajos proponemos que este compuesto es *S dependiente*.
- ❖ Al evaluar el porcentaje de células apoptóticas y necróticas se observó que la Casiopeína Ilgly es citotóxica en el cultivo de linfocitos humanos a las concentraciones de 0.33, 0.66 y 1.0 µg/ml siendo la *apoptosis* el tipo de muerte celular por la que ejerció su acción esta Casiopeína, mostrando con el ICDN que todas las concentraciones son citotóxicas en ambos tiempos de tratamiento.
- ❖ Con base al ICDN se mostró que la Casiopeína Ilgly es citostática a las concentraciones (0.33, 0.66 y 1 µg/ml) ya mencionadas.

❖ Dichas características reafirman a este compuesto químico de origen mexicano, como un buen candidato, para ser utilizado como agente terapéutico contra el cáncer.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar el ensayo para aberraciones cromosómicas en donde se utilice como hora de tratamiento las 20hrs. (G1-S), para comprobar si la Casiopeína IIgly induce daño desde la fase G1-S del ciclo celular y saber si es S dependiente o S independiente.
- Realizar pruebas de viabilidad antes y después del tratamiento tanto a las 20hrs como a las 44hrs para tener más evidencias relacionadas con la muerte celular ya sea por apoptosis y/o necrosis mostrada en esta investigación.
- Realizar el ensayo de FISH (con diferentes sondas) para saber con certeza qué tipo de daño genotóxico está siendo provocado cuando se lleva a cabo la formación de PN y si el daño que se provoca es de tipo cromatídico o cromosómico con lo cual podemos reafirmar a nuestro compuesto como S dependiente.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 *Burgués, J.P. Pontones, J.L. Vera, C.D. y Jiménez, J.F., Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga, Actas Urol Esp., 29 (2005) 846-859.*
- 2 *Vázquez Frías, Sara. Ciclo celular en pacientes con alteraciones cromosómicas. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias, México, D.F., (1988) pp 67.*
- 3 *Montenegro, R., Biología evolutiva humana, Editorial brujas, Córdoba Argentina, (2004) pp 359.*
- 4 *Eberhard M.D., Genética, Texto y Atlas, 2ª ed., Médica Panamericana, Buenos Aires, (2004) pp 470.*
- 5 *Becker, M.W. Lewis, J.K. Hardin, J., El mundo de la célula, 6ª ed., Pearson educación, Madrid, (2007) pp 7-9.*
- 6 *Alberts, B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Watson, J.D., Biología Molecular de la Célula, 3ª ed., Ediciones Omega, Barcelona, (2002) pp 925-929.*

7 Benjamín, A., *Genética: un enfoque conceptual*, 2ª ed., Médica panamericana, Barcelona, (2005) pp 720.

8 Gagneten, A.M. Imhof, A. Marini, M. Zabala, J.M. Tomas, P. Ravera, L. Ojea, N., *Biología para el ingreso*, Universidad Nacional del Litoral, Argentina, (2007) pp 112.

9 Weinberg, R.A. (1996), *¿Cómo se deriva del Cáncer?*, Scientific American, Inc. 275 (3):62-70.

10 Étienne, J., *Bioquímica genética, biología molecular*, Manual, Editorial Masson, Elsevier España, (2001) pp 491.

11 Klug, W.S. y Cummings, M.R., *Conceptos de genética*, 5ª ed., Prentice hall iberia, Madrid, (1999) pp 840.

12 Agnés-Revol, Martínez, H. Barrera, H. (2004), *Control del ciclo celular y sus alteraciones*, Medicina Universitaria, 6 (22):33-38.

13 Instituto Nacional de Cancerología,(2007), <http://www.infocancer.org.mx/introducción-datos-y-cifras>. [Consulta: martes 12 de agosto 2008].

14 Rubio, E. and García, J., *Oncología clínica básica*, Aran ediciones, Madrid, (2000) pp 754.

15 Bolzán, A.D. Bianchi, M.S., *Analysis of streptozotocin-induced incomplete chromosome elements and excess acentric fragments in Chinese hamster cells using a telomeric PNA probe*, *Mutat. Res.*, 570 (2005) 237–244.

16 Pérez Mora, Anahi Martha. *Evaluación del daño ocasionado al ADN en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly (Nuevo Compuesto de Cobre II)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Campus II. México, D.F., (2008) pp 64.

17 www.clinicalpharmacology.com/.../mitomyci.gif [Consulta: sábado 26 de julio 2009].

18 Guevara Chávez, Soledad. *Efectos de la Casiopeína Igly en el material genético de linfocitos humanos in vitro de sangre periférica*. Tesis para Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Campus II. México, D.F., (2008) pp 82.

19 Tovar-Huerta, S. Gracia-Mora, I. Ruiz-Azuara, L., *Evaluación antineoplásica de dos compuestos de coordinación mediante el empleo de modelos in vitro*, 2° Congreso Nacional de Química Médica, Querétaro, México, RESPYN, Edición especial, 7 (2007) Resumen 102.

20 Tovar, A. Ruiz, L. Campero, A., *Interacciones entre Casiopeínas y adenina*, 1^{er} Congreso en Casiopeínas y 5^a Jornada de Trabajo en Casiopeínas, UNAM, Fac. Química. México, (2002) pp 121-128.

21 Cirigo, C. Moreno, R. Ruiz, L., *Interacción entre complejos ternarios del tipo Casiopeína II con el DNA y sus constituyentes*, 1^{er} Congreso en Casiopeínas y 5^a Jornada de Trabajo en Casiopeínas, UNAM, Fac. Química, México, (2002) pp 135-140.

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

23 Bravo, E. Tovar, A. Ruiz, M. Ruiz. L. Moreno R., *Diseño síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas*, 1^{er} Congreso de Casiopeínas y 5^a Jornada de Trabajo en Casiopeínas, UNAM, Fac. Química, México, (2002) pp 1-9.

24 Alemón-Medina, R. Breña, V.M. Muños, J.L. García, M.I. Ruiz, A.L., (2007) *Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drug (Casiopeínas®)*, *Cancer Chemother Pharmacol*, 60 (2): 219-228.

25 Rivero-Müller, A. De Vizcaya-Ruiz, A. Plant, N. Ruiz, L. Dobrota, M. (2007), *Mixed chelate copper complex, Casiopeína IIgly®, binds and*

degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity, Chemico-Biological Interactions, 165 (3):189-199.

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

27 Fuentes, N.I. Rodríguez, R.F. Ruiz, R.L. y Portilla, M., *Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica (Casiopéina IIgly y Casiopéina III-I)*, Memorias del 1^{er} Congreso de Química Médica, Dedicado a la investigación en cáncer, Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México, (2004) pp 150-153.

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

29 García, M.O. y Fuentes, N.I., *Unión a proteínas de la Casiopéina II por el método de ultra filtración*, 1^{er} Congreso en Casiopéinas y 5^a Jornada de trabajo, UNAM, Fac. Química, México, (2002) pp 101-106.

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

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

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

33 García-Rodríguez, M.C. Pérez-Flores, G. Moreno, S. y Altamirano-Lozano, M., *Estudio de los efectos genotóxicos y citotóxicos del cisplatino en ratones adultos y en el desarrollo embrionario y fetal, comparados con las Casiopeínas IIgly y III-ia un nuevo grupo de agentes antineoplásicos*, 2º Congreso Nacional de Química Médica, Querétaro, México, RESPYN, Edición especial, 7 (2007) Resumen 35.

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

35 Ruiz-Ramírez, L. Gracia-Mora, I. y De La Rosa, M.E., *Cytostatic, Mutagenic Antineoplastic activities and Preliminary Toxicity of Cooper (II) New Drugs: Casiopeínas I, II, III*, Journal of Inorganic Biochemistry, 51 (1993) 1-2.

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

37 Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Muller, A. Ruiz-Ramirez, L. Kass, E.N. Kelland, L.R. Orr, R.M. y Dobrota, M., *Induction of Apoptosis by a Novel Copper-based Anticancer Compound, Casiopeína II, in L1210 Murine Leukaemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells*, Toxicology in Vitro, 14 (2000) 1-5.

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

39 Rico, H. Gracia, I. Ruiz, L. Sumano, H., *Actividad antineoplásica de la Casiopeína III-ia sobre diferentes líneas tumorales humanas*

xenotransplantadas al ratón desnudo, 1^{er} Congreso en Casiopeínas y 5^a Jornada de Trabajo en Casiopeínas, UNAM, Fac. Química. México, (2002) pp 20-25.

40 Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, A. Ruiz-Ramírez, L. Liowarth, J.A. Dobrota, M., *Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeína II*, *Toxicology*, 194 (2003) 103-113.

41 González, M.E., *Efecto teratogénico de la Casiopeína II*. Tesis para Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Campus II. México, D.F., (2004) pp 9-12.

42 Florín-Ramírez, D. Rodríguez-Mercado, J.J. y Altamirano-Lozano, M.A., *Evaluación de los rompimientos en el ADN inducidos por la Casiopeína II-gly en leucocitos Humanos de sangre periférica*, *Memorias del 1^{er} Congreso Nacional de Química Médica, Dedicado a la investigación del cáncer, Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México, (2004) pp 41-44.*

43 Castañeda-Peralta, A. Aragón-Martínez, A. y Altamirano-Lozano, M.A., *Toxicidad reproductiva masculina de la Casiopeína II-gly*, *Memorias del 1^{er} Congreso Nacional de Química Médica, Dedicado a la*

investigación del cáncer, Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México, (2004) pp 135-138.

44 *Carvallo Chaigneau, Francisco Rubén. Efectos antiproliferativos y apoptóticos de las casiopeínas IIgly y III-ia en líneas tumorales humanas. Tesis doctoral en ciencias de la producción y de la salud animal. Universidad Nacional Autónoma de México. Programa de doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal. México. D.F., 2007 pp 142.*

45 *Atilano-Alvarado, A. y Roldán, E., Evaluación de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y asociaciones de satélite en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly. 2° Congreso de Química Médica, Querétaro, México, RESPYN, Edición especial, 7 (2007) Resumen 81.*

46 *Cermeño-García, J.R. Rodríguez-Mercado, J.J. Altamirano-Lozano, M., Estudio del efecto genotóxico inducido in vivo por la Casiopeína IIgly y por la Casiopeína III-ia, 2° Congreso de Química Médica, Querétaro, México, RESPYN, Edición especial, 7 (2007) Resumen 17.*

47 Atilano Alvarado, Arturo Huitzilihuitl. *Evaluación de daño genotóxico, citotóxico y citostático inducido por Casiopeína IIgly en cultivo de linfocitos humanos*, Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campus II. México, D.F., (2007) pp 48.

48 Goldsby, R., *Inmunología*, 5ª ed., Mc Graw-Hill, México, (2003) pp 665.

49 Tucker, J.D. Preston, R.J., *Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment*, *Mutat. Res.*, 365 (1996) 147-159.

50 Fenech, M., *The in vivo micronucleus technique*. *Mutat. Res.*, 455 (2000) 81-95.

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

52 Fenech, M. y Crott, J.W., *Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—*

evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis–block micronucleus assay, Mutat. Res., 504 (2002) 131–136.

53 Di Giorgio, M. Sardi, M. Busto, E. Valleria, M.B. y Taja, M.R., *Ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos como biosímetro de exposiciones in vivo agudas y crónicas, 6° Congreso Regional de Seguridad Radiológica y Nuclear, (2003) pp 229– 236.*

54 Zalacain, M. Sierrasesúмага, L. y Patiño, A. (2005), *El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos, An. Sist. Sanit. Navar, 28 (2):227–236.*

55 Randa, El-Zein. Matthew, B.S. Carol, J.E. Mirtha, S.L. Jamey, D.F. y Margaret, R.S. (2006), *Blocked Micronucleus Assay as a Novel Biomarker for Lung Cancer Risk, Cancer Research, 66 (12):6449–6456.*

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

57 Fenech, M., *Cytokinesis–block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, Mutat. Res., 600 (2006) 56–66.*

58 Lizarbe, M.A. (2007), *El suicidio y la muerte celular*, Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp), 101 (2):1-33.

59 Calderón, R. (2005), *La apoptosis en biología y patología*, Revista Peruana de Cardiología, 31 (2):119-128

60 <http://www.cancerquest.org/index.cfm?lang=spanish&page=482>
[Consulta 9 de septiembre].

61 Kirsch-Volders, M. Elhajouji, A. Cundari, E. y Hummelen, P.V. (1997), *The in vitro Micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction*, Mutat. Res., 392 (1-2):19-30.

62 Garriott, L. M. Barry, J. Hoffman P.W., *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*. Mutat. Res., 517 (2002) 123-134.

63 Guizar-Vazquez, J.J., *Genética Clínica diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*. Editorial el manual moderno, México, (1988) pp 985.

64 Kilbey, B.J. Legator, M. Nichols, W. y Ramel, C., *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2^{da} ed., Elsevier Biomedical, Amsterdam, (1984) pp 859.

65 Serment, J. Reyes, E. y Breña, M., *Fragmentación de ADN por diferentes casiopeínas*, 2° Congreso Nacional de Química Médica, Querétaro, México, RESPYN, Edición especial, 7 (2007) Resumen 95.

66 Brusick, D., *Principles of Genetic Toxicology*, Plenum Press, New York, (1987) pp 1-76.

67 Obe, G. Pfeifferm, P. Savage, R.K. Johannes, C. Goedecke, W. Jeppesen, P. Natajara, A.T. Martinez-Lopez, W. Folle, G.A. y Drets, M.E., *Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution*, *Mutat. Res.*, 504 (2002) 17-36.

68 Tovar, A. Ruiz, L. y Campero, C.A., *Dos formas diferentes de interacción entre complejos mixtos de cobre (II) (Casiopeínas) y adenina, como una aproximación a su selectividad*, Memorias del 1^{er} congreso de Química Médica, Dedicado a la investigación en Cáncer y Diabetes. Universidad Autónoma de México y Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, (2004) pp. 159-161.

69 Fenech, M., *The advantages and disadvantages the cytokinesis-block micronucleus method*, *Mutat. Res.*, 392 (1997) 11-18.

70 Téllez Aztorga, Lorena. *El efecto de seis Casiopeínas en el ciclo celular en células transformadas. Reporte del proyecto de investigación. Licenciatura en biología experimental. Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas de la salud, Campus Iztapalapa. México, D.F., 2004 pp 20.*

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

72 Trejo-Solís, C. Palencia, G. Zúñiga, S. Rodríguez-Ropón, A. Osorio-Rico, L. Sánchez, L. Gracia-Mora, I. Márquez-Rosado, L. Sánchez, A. Moreno-García, M. Cruz, A. Bravo, M. E. Ruiz, L. Rodríguez-Enríquez, S. y Sotelo, J. (2005), *Cas 11gly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanism*, *Neoplasia*, 7 (6):563-574.

73 Téllez Aztorga, Lorena. *Evaluación, por citometría de flujo, del incremento en la tasa de apoptosis y necrosis en células hela tratadas con Casiopeína. Reporte del proyecto de investigación del servicio social.*

Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas de la salud, Campus Iztapalapa. México, D.F., 2004 pp 29.

74 Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Muller, A. Ruiz-Ramirez L. Kass, E.N. Kelland, L.R. Orr, R.M. y Dobrota, M. *Induction of Apoptosis by a Novel Copper-based Anticancer Compound, Casiopeína II, in L1210 Murine Leukaemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells*, *Toxicology in Vitro*, 14 (2000) 1-5.

75 Mejia C. Ruiz-Azuara, L. (2008), *Casiopeínas IIgly and IIIia Induce Apoptosis in Medulloblastoma Cells*. *Pathol Oncol Res.*, 14 (4):467-72.

76 Avellar, I.G. Magalhaes, M.M. Silva, A.B. Sausa, L.L. Leitao, A. C. Hermes-Lima, M. *Revaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reaction involving ferrous ions and DNA damage*, *Biochim Biophys*, 1647 (2004) 46-53.

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

78 Martínez, M.T. García, F. Hernández, M.J. Manzanera, J.T. Garrigós, J.A., *Los citostáticos*, Revista electrónica semestral de Enfermería, 1 (2002) 1-16.

79 Yüzbaşıoğlu, D., Celik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H. "Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes". *Mutat. Res.*, 604 (2006) 53-59.

80 Alemón, R. Muñoz, J.L. Ruiz, L. Mendiola, M.T., *Determinación de la actividad oxidativa de las Casiopeínas cas IIgly, cas III-ia y Cas III-ea en células Hela*, 2º Congreso Nacional de Química Médica, Queretaro, México, RESPYN, Edición especial, 7 (2007) Resumen 03.