



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR Y DAÑO  
GENOTÓXICO INDUCIDOS *In vitro* POR UN  
NUEVO COMPUESTO DE COBRE CASIOPEÍNA  
Igly”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

PATRICIA URIBE LEÓN



DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELIA ROLDÁN REYES

MÉXICO, D.F.

MAYO, 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 realizada en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza en la  
UMIEZ en el laboratorio de Citogenética y Mutagénesis de la UNIGEN  
con el apoyo de:

**PAPIIT: IN221808-3**

## Dedicatorias

A mis Padres Celia e Ignacio, por hacerme la mujer que soy hoy en día, por darme todo lo que siempre necesite y por apoyarme en todos mis proyectos durante todos estos años. Muchas gracias por todo lo que quiero mucho.

A mi hermana Berenice, sin ti no hubiera logrado nada de esta tesis, gracias por los desvelos, por tu ayuda en la estadística y por siempre estar ahí para oírme aunque a veces no entendieras ni una palabra de lo que decía, eres la pura onda. Este trabajo también es tuyo. Te quiero mucho.

A la Doctora Elia, por ser más que mi maestra mi “mamá académica” muchas gracias por todos los momentos que compartió conmigo y por sus regaños a tiempo. Por enseñarme tantas cosas dentro y fuera del laboratorio. La quiero mucho.

A mi comadre Araceli, por ser mi paño de lágrimas, por escucharme cuando más neurótica estaba y por sacarme el estrés siempre que podías. Siempre recordare todo lo que has hecho por mí en todos los aspectos de mi vida. ¡Te quiero muchísimo comadre!

A mi comadre Cinthia, por siempre ayudarme con todos mis proyectos, por apoyarme siempre a pesar de las cosas que pasan, a pesar de mis errores, gracias por todos los consejos y sobre todo por escucharme aunque nadie más lo haga, ¡te quiero mucho comadre!

A mis apa's Luis y Nancy por ser una parte muy importante en mi vida por siempre estar ahí para mí. Gracias por hacer de el 7° semestre el mejor semestre de toda mi carrera, y sobre todo gracias a Nancy por enseñarme todo lo que se sobre los linfocitos, gracias am'a por todo tu conocimiento.

A mi manita Nancy “la borrega” por ser mi amiga y por darme la oportunidad de estar juntas, por siempre estar atenta conmigo para los linfocines ;), por mostrarme una nueva forma de ser y de mejorar mi persona. Muchas gracias manita por todo aquello que me has enseñado te quiero muchoooooo.

A mi otra manita genética Gabriela Vianey, porque a pesar del poco tiempo que teníamos de conocernos me has aceptado como tu amiga, no puedo decirte cuanto te agradezco toda tu ayuda con el Word y el Excel, sin ti realmente esta tesis nunca se hubiera completado, gracias también por todas nuestras aventuras juntas y por siempre oírme y darme tu mejor consejo. Te quiero “Wuaby”.

A Gaby, por ser mi amiga desde el día uno y por darme la oportunidad de conocerte y de todo lo que hemos vivido juntas, se que nos falta más por hacer amiga.

A Yuye pues a mi manita que tanto quiero y que tanto hemos vivido, gracias por tu apoyo que siempre tengo a pesar de todo y de todos siempre estas ahí.

A Ale mi prima :p que desde que nos conocemos nos hicimos grandes amigas por como eres, gracias por apoyarme también en todo y no dejarme caer por nada ni por nadie, por enseñarme a ser una mejor persona.

Gracias a las tres por hacer de mi estancia en la facultad una de las mejores experiencias de mi vida desde el primer día que nos conocimos y que nos hicimos amigas, gracias por estar siempre para mí, por sus consejos y regaños. Por las noches en el depa y las salidas a Guerrero. Las quiero mucho siempre están en mi corazón.

A mi sensei Soledad por tu amistad sobre todo y a pesar del poco tiempo que tenemos de conocernos, gracias por todo lo que me has enseñado Sol. Eres una gran inspiración para mí.

À mon gardien de la lune que d'une certaine manière, elle était ici avec moi, Je t'aime

Parce que dans cette vie essentiel est invisible à l'oeil

## Indice

	Página
<b>Abreviaturas</b> .....	i
<b>Resumen</b> .....	ii
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Tipos de tratamientos contra el cáncer.....	1
1.2. Quimioterapéuticos .....	1
1.3. Metales en la medicina.....	5
1.4. Cobre .....	6
1.5. Casiopeínas .....	7
1.6. Casiopeína Igly.....	9
1.7. Mecanismo de acción de las Casiopeínas.....	10
1.8. El Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis (EMBC).....	11
1.9. Micronúcleos .....	13
1.10. Puentes Nucleoplásmicos .....	15
1.11. Apoptosis .....	17
1.10.1. Vía extrínseca .....	18
1.10.2. Vía intrínseca o mitocondrial .....	19
1.12. Necrosis .....	23
1.13. Ensayo de Tinción Diferencial para Intercambio de Cromátidas Hermanas.....	26
<b>2. Justificación</b> .....	29
<b>3. Hipótesis</b> .....	30
<b>4. Objetivos</b> .....	31
4.1. General .....	31
4.2. Particulares .....	31
<b>5. Materiales y Métodos</b> .....	32
5.1. Prueba de Viabilidad .....	32
5.6. Micronúcleos .....	32
5.3. Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs) .....	33
5.4. Análisis estadístico .....	37
<b>7. Discusión</b> .....	49
7.1. Citotóxicidad.....	49

7.2. Citostaticidad.....	51
7.3. Genotoxicidad.....	52
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>55</b>
<b>9. Perspectivas.....</b>	<b>56</b>
<b>10. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>57</b>

## Abreviaturas

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ATP:** Adenosin Trifosfato

**Bad:** Proteína proapoptótica tipo BH-3

**Bak:** Proteína proapoptótica de tipo multidominio, que encuentra en el interior de la mitocondria

**Bax:** Proteína proapoptótica de tipo multidominio, que se encuentra en el exterior de algunos organelos.

**Bcl XI:** Proteína antiapoptótica del grupo Bcl-2

**Bcl-2:** Grupo de proteínas involucradas en la apoptosis.

**Bid:** Proteína proapoptótica tipo BH-3, que propicia la abertura del poro mitocondrial.

**Bim:** Proteína proapoptótica tipo BH-3, que ayuda a la introducción de la proteína Bax a la mitocondria

**BrdU:** Bromodesoxiuridina

**C33-A:** Línea celular de cáncer cervico-uterino VPH negativa

**CaLo:** Línea celular de cáncer cervico uterino estadio 2

**Casio:** Casiopeína

**CaSki:** Línea celular de cáncer cervico uterino en pacientes con VPH-16

**CDC:** Cinética de División Celular

**Cit-B:** Citocalasina B

**DaXX:** Proteína asociada a muerte número 6

**EMCB:** Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis

**ERO:** Especie Reactiva de Oxígeno

**FADD:** Factor de muerte asociado con Fas

**Fas:** Proteína transmembrana “receptora de muerte”

**FISH:** Técnica de Hibridación Fluorescente *in situ*

**HeLa:** Línea celular de cáncer cervico uterino proveniente de pacientes con VPH18

**IAPS:** Inhibidor de las caspasas

**ICDN:** Índice de Citotoxicidad de División Nuclear

**ICH:** Intercambio de Cromatidas Hermanas

**IM:** Índice Mitótico

**IPBC:** Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis

**IR:** Índice de Replicación

**KCL:** Cloruro de Potasio

**MCF-7:** Línea celular de cáncer de seno

**HCT-15:** Línea celular de cáncer de colon

**MMC:** Mitomicina C

**MN:** Micronúcleo

**OH:** Radical Oxidrilo

**PN:** Puente Nucleoplásmico

**Raidd:** Receptor de dominio de muerte asociado con interleucina

**RPM:** Revoluciones Por Minuto

**SiHa:** Línea celular de cáncer cervico uterino, proveniente de pacientes con VPH16

**SMAC/DIABLO:** Proteína inhibidora de los inhibidores de caspasas

**TNF:** Tumoral Necrosis Factor

**TPL:** Tiempo de Proliferación Linfocítica

**Tradd:** Dominio de muerte asociado con el receptor TNF

**Traf:** Factor asociado al receptor TNF

**TUNEL:** Método de marcaje *in situ* del ADN fragmentado

**VPH:** Virus del Papiloma Humano

## Resumen

Actualmente en México se sintetizan compuestos con centro metálico de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), llamados Casiopeínas agrupados en diferentes familias de las cuales la **Casiopeína Igly** [(4,7-difenil-1,10 fenantrolina)(glicina)Cu(II)nitrato] ha mostrado tener actividades citostática y citotóxica tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que pueden representar una alternativa quimioterapéutica para los enfermos de cáncer. Antes de pasar a la fase clínica se hacen pruebas del daño secundario que puede ocasionar, de tal forma que los estudios Toxicológicos son importantes en este sentido, dentro de estos el estudio de la proliferación celular debe incluir el parámetro de muerte celular, que tradicionalmente se divide en dos: **Necrosis** o muerte accidental o espontánea, la segunda, **Apoptosis** ó muerte celular programada, las cuales forman parte del ensayo *in vitro* de **Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis**, donde también se evaluaron los **Puentes Nucleoplasmicos**.

En el presente proyecto se evaluó el efecto **citotóxico**, **citostático** y **genotóxico** de la Casiopeína Igly; mediante los ensayos de **Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis** (EMNBC) y de **Intercambio de Cromatidas Hermanas** (ICHs).

Se extrajeron 10 ml de sangre por punción venosa, se separo por sedimentación y se agrega aproximadamente 1 ml de sangre en tubos con medio de **cultivo RPMI-1640**, a las 44hrs se aplica la **Casiopeína Igly [0.615, 1.23, 2.46  $\mu\text{g/ml}$ ]** y **Mitomicina C [0.2 $\mu\text{g/ml}$ ]**; a las 48 hrs la **Citocalasina B [6  $\mu\text{g/ml}$ ]**. A las 72 hrs., se cosechan las células, se elaboran las laminillas y se tiñen con May-Grünwald:Giemsa; en el caso del ensayo de **Micronúcleos**.

Mientras que para el ensayo de **Intercambio de Cromatidas Hermanas** se obtuvieron 5 ml de sangre por punción venosa, se agregaron aproximadamente 1 ml de sangre en tubos con medio de cultivo **RPMI-1640**, a las 24 hrs se agrega **BrdU [5 $\mu\text{g/ml}$ ]**, a las 48 hrs se agregaron los tratamientos de **Mitomicina C**

[0.2µg/ml] y de **Casiopeína Igly** [0.615, 1.23, 2.46 µg/ml]. A las 70 hrs se agrega **Colchicina** [4µg/ml] y a las 72 hrs se comienza la cosecha. Los tubos se centrifugan y se somete a las células a un choque hipotónico con **KCL (0.075M)** a 37°C, posteriormente se lavan con fijador etanol-ácido acético proporción 3:1, que después se gotean en laminillas limpias. Para la tinción diferencial se irradiaron con luz UV las laminillas en solución acuosa por 20 min, posteriormente se incubaron en solución 2XSSC de Citrato de sodio-cloruro de sodio a 50°C y luego se tiñen con Giemsa al 7%.

Las evaluaciones se realizaron tomando en cuenta el porcentaje de células apoptóticas, necróticas, y células polinucleadas, en el caso de ensayo de Micronúcleos; además para el ensayo de Intercambio de Cromatidas Hermanas se evaluaron las mitosis e interfases encontradas en las laminillas, las células en diferentes estadios de (primero, segundo y tercer ciclo) y dentro de las células en segundo ciclo se evaluaron las que presentaban ICHs.

Los resultados muestran que la **Casiopeína Igly** induce la muerte por **apoptosis** más que por la vía **necrótica**, en todas las concentraciones; además el **Índice Mitótico** se redujo en las tres concentraciones y al realizar la prueba del **Índice de Citotoxicidad de División Nuclear** ocurrió un comportamiento similar; así se puede decir que el compuesto es citotóxico comparándolo con el testigo negativo. Mientras que para la **citostaticidad** se evaluaron el **Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis** que se redujo en las tres concentraciones; el **Tiempo de Proliferación Linfocítica** se vio aumentado en todas las dosis aplicadas aunque solo resulto estadísticamente significativo dos de ellas. Con esto se puede corroborar el efecto citostático de la Casiopeína Igly. De manera complementaria se evaluaron también **Cinética de División Celular** y el **Índice de Replicación**, aunque en ninguna de estas dos evaluaciones los resultados cambiaron de manera significativa.

Respecto a la genotoxicidad se valoraron los parámetros de **Micronúcleos, Puentes nucleoplásmicos e Intercambio de Cromatidas Hermanas**. Los tres parámetros aumentaron con respecto al testigo negativo y estas diferencias son estadísticamente significativas en todas las concentraciones, con lo concluimos que la Casiopeína Igly también induce genotoxicidad.

## **Introducción**

### **1.1. Tipos de tratamientos contra el cáncer**

Las terapias establecidas contra el cáncer son varias y entre ellas se encuentra la cirugía que es preferente para cuando se presentan tumores identificados y en zonas accesibles. A pesar de que este tipo de terapia es exitosa la mayor parte de las veces, no se puede hablar de un 100% de efectividad ya que es imposible remover todas las células cancerosas de un tejido, si el tumor se encuentra cercano a órganos vitales no puede ser removido y además tampoco puede ser utilizada en casos de metástasis (Hellman y Vokees, 1996; Lavelly y Poen, 1995).

Otro tipo de terapia es la de **radiación ionizante**, que consiste en el uso de radiación (**Rayos-X** o **gamma**) para originar iones en las células neoplásicas que puedan romper las cadenas de ADN, creando daños irreparables al mismo que contribuyan a la muerte de la célula o bien eliminarlas directamente. Una de las principales ventajas de este método es que se puede radiar sobre zonas muy pequeñas, conservando así los tejidos sanos. Como en la cirugía, este tipo de tratamientos no pueden ser utilizados en metástasis ya que se corre un gran riesgo de dañar tejidos sanos (Hellman y Vokees, 1996; Lavelly y Poen, 1995; Mc Laughling, 1995).

Para los casos de cáncer en la etapa de metástasis se puede recurrir a otro tipo de tratamientos tal como la quimioterapia.

### **1.2. Quimioterapéuticos**

Los quimioterapéuticos son cualquier tratamiento médico basado en la administración de medicamentos y tienen como característica contrarrestar la división celular, sobre todo en células con un alto índice de división, sin embargo, las células normales, incluyendo las que se encuentran en la sangre, el cabello y

el revestimiento del tracto gastrointestinal, también se dividen muy rápidamente, lo cual significa que la quimioterapia también causa daño o mata estas células sanas.

Cuando esto ocurre, se pueden presentar efectos secundarios como náuseas, anemia y pérdida del cabello. Generalmente se aplica junto con otros tipos de fármacos que tengan la misma acción citotóxica o citostática (Mc Laughling, 1995)

En algunas ocasiones las células cancerígenas resultan resistentes a este tratamiento e incluso puede favorecer su desarrollo y crecimiento (Hellman y Vokees, 1996).

La clasificación de los antineoplásicos se realiza según el mecanismo de acción y dentro de éste según la estructura química del antineoplásico.

## **Citostáticos que actúan sobre el ADN**

### **1. Agentes alquilantes**

Fueron los primeros agentes alquilantes creados y el prototipo de ellos, en general todos son depresores de la médula ósea porque es su principal efecto tóxico. Como ejemplo tenemos a la Ciclofosfamida y Ifosfamida (Lane, 1999).

### **2. Antimetabolitos**

Todos son depresores de la médula ósea y su toxicidad depende de la dosis y el tiempo de administración. A continuación se presentan algunos ejemplos de compuestos dentro de esta categoría (Didier y Chistal, 2004).

#### Análogos del ácido fólico

- Metotrexato®.

#### Análogos de la pirimidina

- Fluorouracilo®.
- Citarabina®.
- Gemcitabina.

#### Análogos de la purina

- Cladribina.
- Mercaptopurina®.
- Fludarabina.

### **3. Antibióticos antitumorales**

Funcionan al unirse con el ADN para evitar la síntesis de ARN. Estos fármacos también impiden el crecimiento celular al imposibilitar la replicación de ADN. Los antibióticos antitumorales evitan que el ADN se vuelva a fijar a sí mismo, lo que provoca la muerte celular (Didier y Chistal, 2004). Algunos ejemplos son:

- Doxorubicina o Adriamicina.
- Epirubicina.
- Bleomicina.
- Mitomicina.
- Mitoxantrona.

### **4. Inhibidores de las topoisomerasas**

Las topoisomerasas son enzimas que ayudan al ADN en la replicación, por lo tanto al evitar que estas se generen provocan daños irreparables que conllevan a la muerte celular (Aranda, 2004).

- Irinotecan.
- Etoposido.

- Teniposido.

## **5. Platinos**

Todos son inyectables, no existen medicamentos que puedan ser administrados por vía oral. Son complejos de metales pesados que actúan de forma semejante a los agentes alquilantes (Aranda, 2004).

- Cisplatino.
- Carboplatino.
- Oxaliplatino.

## **6. Fármacos que actúan sobre la mitosis celular sin afectar al ADN**

Alcaloides de la vinca

Estos fármacos impiden la división celular. Durante la metafase, los husos mitóticos contienen los dos juegos de DNA que la célula necesita para dividirse. Los husos son producidos usando una proteína llamada tubulina. Los alcaloides de la vinca se unen a la tubulina, lo que impide la formación de husos mitóticos. Sin éstos, la célula no puede dividirse. Estos fármacos son derivados de plantas (Celorio, 1986).

- Vinblastina.
- Vincristina.
- Vindesina.
- Vinorelbina.

### 1.3. Metales en la medicina

El uso de metales como tratamientos médicos se remonta alrededor del año 1500 A.C. cuando se usaba el zinc aplicado tópicamente para promover que las heridas se cerrarán (Gray y Lippard, 1994).

Uno de los primeros usos para los metales en el tratamiento de enfermedades fue como agentes antibacteriales. Las sales de mercurio y plata fueron las de uso más frecuente en un inicio, aunque en la actualidad las sales de plata son las más usadas mientras que las de mercurio son evitadas debido a su elevada toxicidad particularmente en el riñón. Un ejemplo usado en el tratamiento de quemaduras intensas es el sulfadiazeno de plata. En general el mecanismo de acción de estas sales es el desprendimiento lento del ion metálico, el cual inhibe la pared celular bacteriana (McClevert y Meyer, 2004). El titanio también fue usado como antibacterial contra la tuberculosis y su infección cutánea a principios del siglo pasado. Años después, en 1963, otro grupo de investigación reportó que el  $TiO_2$  presenta actividad contra *Stafilococcus aureus* y *Escherichia coli* (Schwiertert y McCue, 2004). Otro metal usualmente usado en desordenes gastrointestinales debido a sus propiedades anti-ácido y astringentes es el bismuto; usado también por su efecto contra la bacteria *Helicobacter pilori*.

Otro fármaco con base metálica es el carbonato de litio, el cual tiene un gran impacto en la clínica por ser tratamiento para la psicosis maniaco-depresiva. Otro interesante uso de compuestos metálicos en medicina son aquellos de vanadio, los cuales tienen propiedades similares a la insulina. El ion vanadato (V) es efectivo como hipoglucemiante si es administrado oralmente. Por último tenemos los compuestos de oro usados en la práctica clínica como agentes antirreumáticos en la artritis desde 1940 (McClevert y Meyer, 2004).

En base a lo anterior podemos ver que los metales en la medicina ha tenido una gran cantidad de aplicaciones en diferentes tipos de enfermedades. En el caso de las Casiopeínas podemos ver un ejemplo del uso de metales en la medicina, en este caso el cobre.

## 1.4. Cobre

El cobre es un metal de transición de color rojizo y brillo metálico que, junto con la plata y el oro, forma parte de la llamada familia del cobre, caracterizada por ser los mejores conductores de electricidad . Gracias a su alta conductividad eléctrica, ductilidad y maleabilidad, se ha convertido en el material más utilizado para fabricar cables eléctricos y otros componentes eléctricos y electrónicos.

En las plantas, el cobre posee un importante papel en el proceso de la fotosíntesis y forma parte de la composición de la plastocianina. Alrededor del 70% del cobre de una planta está presente en la clorofila, principalmente en los cloroplastos. Los primeros síntomas en las plantas por deficiencia de cobre aparecen en forma de hojas estrechas y retorcidas, además de puntas blanquecinas. Las panículas y las vainas pueden aparecer vacías por una deficiencia severa de cobre, ocasionando graves pérdidas económicas en la actividad agrícola (Yruela, 2005).

En los seres humanos el cobre contribuye a la formación de glóbulos rojos y al mantenimiento de los vasos sanguíneos, nervios, sistema inmunológico y huesos; y por tanto es esencial para la vida humana. El cobre se encuentra en algunas enzimas como la citocromo c oxidasa, la lisil oxidasa y la superóxido dismutasa (O'Connor, 2001) .Las necesidades diarias son de aproximadamente 2 mg.

El desequilibrio de cobre en el organismo cuando se produce en forma excesiva ocasiona una enfermedad hepática conocida como enfermedad de Wilson (Barceloux, 1999), el origen de esta enfermedad es hereditario, y aparte del trastorno hepático que ocasiona también daña al sistema nervioso. Se trata de una enfermedad poco común.

Puede producirse deficiencia de cobre en niños con una dieta pobre en calcio, especialmente si presentan diarreas o desnutrición. También hay enfermedades que disminuyen la absorción de cobre, como la enfermedad celiaca, la fibrosis quística o al llevar dietas restrictivas (Giannaula, 2002).

El cobre se encuentra en una gran cantidad de alimentos habituales de la dieta tales como ostras, mariscos, legumbres, vísceras y nueces entre otros, además del agua potable y por lo tanto es muy raro que se produzca una deficiencia de cobre en el organismo (Sancha, 2006).

Así el cobre se puede considerar como un micronutriente importante en la dieta de los seres humanos, además de esto se puede considerar como una buena alternativa para incorporar en los medicamentos contra el cáncer, como es el caso de las Casiopeínas.

### 1.5. Casiopeínas

Las **Casiopeínas** fueron concebidas como una alternativa quimioterapéutica para el tratamiento contra el cáncer; diseñadas por la Dra. Lena Ruiz Azuara y su grupo de investigación en la Facultad de Química de la UNAM (Ruiz, 1992).

Son un grupo de compuestos de centro metálico de cobre, al observar que este metal, en combinación con moléculas orgánicas, puede impedir la reproducción de las células cancerosas, al interferir directamente con su ADN; estos compuestos se basan en la estructura química del Cisplatino (Ramades *et al.*, 2007).

Además su centro metálico de cobre determina que la absorción, distribución y eliminación del cuerpo sean mejores que las del cisplatino. La actividad antitumoral ha sido evaluada en sistemas *in vitro* como *in vivo*. Existen más de 100 compuestos diferentes y, algunos de ellos han mostrado actividad antineoplásica<sup>1</sup> (De Vizcaya, 2000; Gómez *et al.*, 2006; García *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 1993), de los cuales se han escogido los más activos y menos tóxicos, así en la actualidad tenemos que hay 9 grupos de **Casiopeína** (tabla 1), siendo los más efectivos las de los grupos **I**, **II** y **III**.

---

<sup>1</sup> Que impide el crecimiento de tumores.

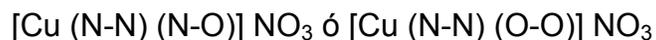
**Tabla 1.** Sub-familias y fórmulas generales de las Casiopeínas® Guevara, 2008.

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

Como todos los fármacos antes de su salida al mercado, las Casiopeínas se han sometido a una serie de evaluaciones preclínicas, para identificar sus propiedades farmacológicas, farmacocinéticas, toxicológicas y genotóxicas. 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 (Guevara,2008).

Al analizar las interacciones de las Casiopeínas con el ADN, se obtuvo que solo existen interacciones con la adenina, mediante el apilamiento entre los sustituyentes bipiridina o fenantrolina del complejo mixto y el anillo de la base, lo cual lleva a pensar que las Casiopeínas actúan como intercalantes (Tovar, 2002). Por otra parte, todas las Casiopeínas contienen el ligante diimina distinto, con características hidrofóbicas, que le permiten actuar como intercalante con las bases del **ADN** (Cirigo, 2002). El ligante hidrofílico le permite a la molécula ser transportada con facilidad. La naturaleza, el número y la posición de los ligantes, son los responsables de generar selectividad preferencial sobre algunos tejidos tumorales específicos (Alemón, 2007; Bravo *et al.*, 2002; Ruiz, 2000).

La fórmula general de las Casiopeínas (**fig. 1**) es:

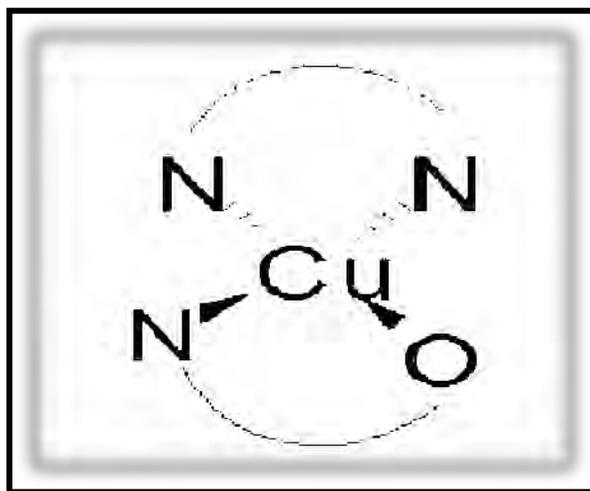


Donde:

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

(N-O) = Ligante aminoacidatos o péptidos

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



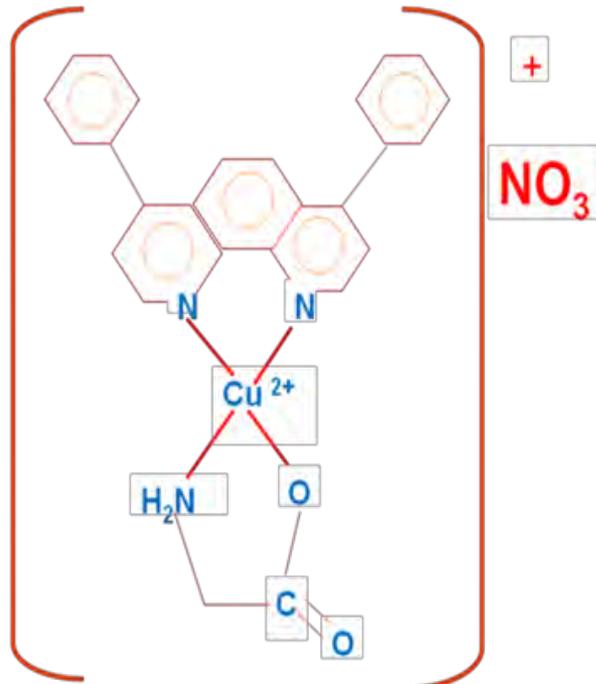
**Fig. 1.** Estructura química de las Casiopeínas® (Guevara,2008)

### 1.6. Casiopeína Igly

Entre las **Casiopeínas** se encuentra la **Casiopeína Igly** con formula química 4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(glicina)Cu(II)nitrato, con un peso molecular de 531.6 g/mol, que es soluble en etanol, dimetil sulfoxido (DMSO) o etanol agua ( en proporción 3:10);la concentración inhibitoria media es de 1.23µg en células de la línea CaLo<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Células de carcinoma epidermoide no queratinizada de morfología epitelial. Estadio II. Carcinoma Cervico Uterino Humano.

En la **figura 2** se aprecia la estructura química de la **Casiopeína Igly**, donde podemos ver el centro metálico de Cu (II) y su acompañante orgánico, el aminoácido glicina.



**Fig. 2.** Estructura química de la **Casiopeína Igly** (Pérez, 2008).

### 1.7. Mecanismo de acción de las Casiopeínas.

Respecto al mecanismo de acción de las **Casiopeínas** se ha propuesto que estos fármacos promueven un incremento en las llamadas **Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)** que provocan un daño en la mitocondria, que lleva a una posterior **apoptosis** que ocurre a través de las vías caspasa-dependiente y caspasa-independiente (Tovar *et al.*, 2004; Alemon, 2007; Rivero-Miller, 2007).

Este mecanismo de acción parece estar promovido por las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, en donde participan metales pesados tales como el Fe o el Cu, donde se crean las ERO  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  (Navarro *et al.*, 2007).

Dando como resultado la liberación de oxígeno molecular, cerrando el proceso de cesión de los electrones por oxidación del metal. Acoplado a todo el sistema formado por las distintas reacciones, se producen radicales  $OH\cdot$  que pueden seguir desarrollando un mecanismo en cascada de consecuencias importantes para el equilibrio interno de la célula. Además, estos OH inducen daños sobre el **ADN**, lo que puede conducir a carcinogénesis por alguna de estas rutas (Navarro *et al.*, 2007):

- Alteraciones producidas en oncogenes y factores de crecimiento.
- Alteraciones en los genes supresores de tumores.
- Alteraciones en los genes reguladores del crecimiento.

### **1.8. El Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis (EMBC).**

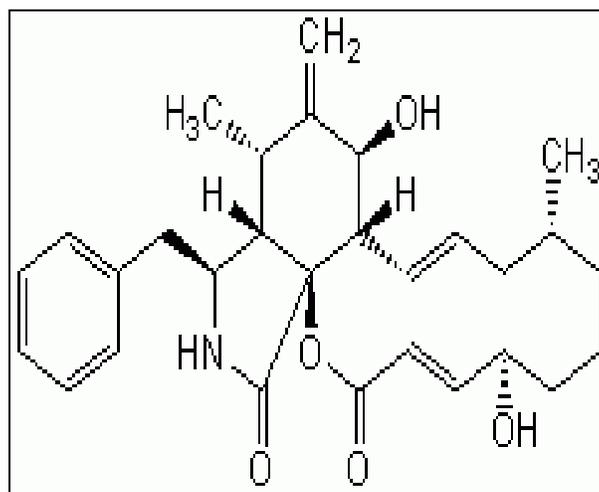
El estudio del daño al **ADN** en un nivel cromosómico es una parte esencial de la genética toxicológica, porque las aberraciones cromosómicas son un evento importante en la carcinogénesis; así los ensayos de aberraciones cromosómicas son un excelente indicador del daño a los mismos, al enumerar los errores directamente en la metafase. Sin embargo esta técnica presenta una gran complejidad debido a que los daños deben ser apreciados por personal altamente capacitado en el conocimiento de los cromosomas en metafase, en la búsqueda de una técnica que permita observar estos fenómenos de una manera mas accesible, nace la técnica del ensayo de micronúcleos.

Fue propuesta de manera independiente por Heddle (1973) y Schmid (1975) para identificar los daños *in vivo* al medir los llamados **Micronúcleos (MN)**, también conocidos como cuerpos de Howell-Jolly entre los hematólogos (Velasco, 2005),

estos **MN** se presentan en poblaciones celulares que se dividen rápidamente tales como los de la médula ósea. Actualmente el ensayo de micronúcleos en médula ósea y eritrocitos es una de las técnicas mejor establecidas para ensayos de citogenética en estudios *in vivo* e *in vitro* en el campo de la toxicología genética.

Así en el año de 1985 la técnica fue modificada por Fenech y Morley al desarrollar la técnica del **bloqueo de la citocinesis** que se basa en la aplicación de un metabolito llamado **Citocalasina-B (Cit-B)**. En la **figura 4** se esquematiza el proceso de formación de células binucleadas.

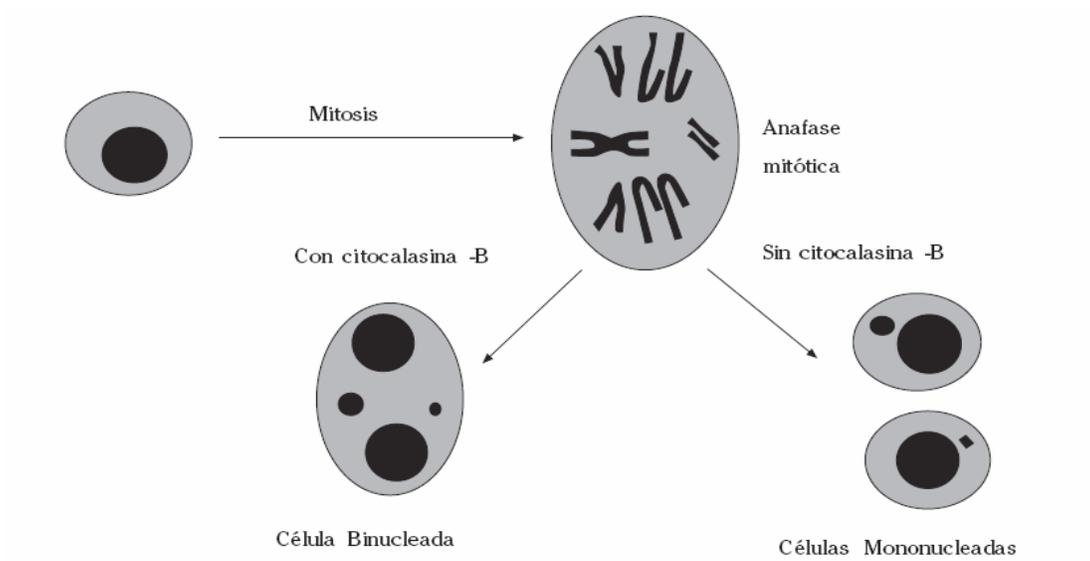
La **Citocalasina B** es aislada del hongo *Drechslera dematoideum* (anteriormente *Helminthosporium dematoideum*) que inhibe la polimerización de actina (que se encuentra en el citoesqueleto de la célula), impidiendo la citocinesis. Esta molécula no afecta a las fibras del huso ni a la división del núcleo, por lo que origina células binucleadas y que han sufrido una sola división (Evans, 1997, Sigma-Aldrich 2008-2009). Su estructura química se puede apreciar en la **figura 3**.



**Fig. 3.** Fórmula química de la Citocalasina B (Modificado de Pérez, 2008)

Así este ensayo ha evolucionado hasta convertirse en una de las herramientas más útiles en el estudio de la citogenética clásica, ya que con un solo ensayo podemos evaluar múltiples parámetros; entre ellos los **Puentes Nucleoplasmicos (PN)**, células **Apoptóticas** y células **Necróticas**.

Además este ensayo combinado con otras técnicas moleculares tales como FISH brindan información aun más precisa respecto a muchos aspectos del mismo.



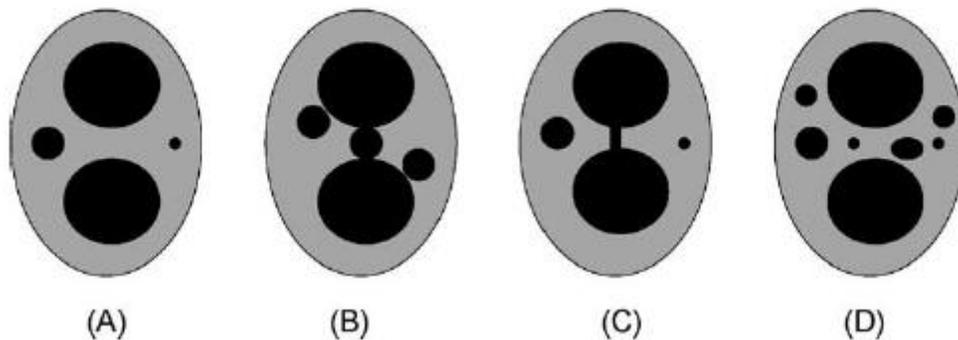
**Fig. 4** Formación de células binucleadas por la acción de la Citocalasina B. En la figura se muestran las dos posibilidades de crecimiento de la célula, una sin la aplicación de la Cit-B y la otra con la aplicación de Cit-B que genera a una célula con dos núcleos en un mismo citoplasma (Zalacain *et al.*, 2005).

## 1.9. Micronúcleos

Los **Micronúcleos (MN)** son pequeñas formaciones nucleares que se presentan además de los dos núcleos típicos que se forman en la telofase. Generalmente se forman a consecuencia de un retraso de un cromosoma en anafase o de fragmentos de cromosomas que no se han incluido en ninguno de los núcleos telofásicos. Los micronúcleos generalmente no persisten, ni tampoco las células

de las que forman parte, ya que el núcleo de la célula presenta un déficit correspondiente a los genes incluidos en el micronúcleo (Fenech, 2000).

El micronúcleo es formado durante la anafase/ telofase y de este modo la división es requerida para el daño cromosómico/ genómico para ser expresado como micronúcleo. Un aspecto fundamental para el ensayo de micronúcleos es la cinética de división. Un micronúcleo debe contener por ende un cromosoma(s) completo(s) o un fragmento(s) acéntrico(s). Para estudios con linfocitos humanos es importante reconocer las variables que pueden afectar la frecuencia de micronúcleos como los son: edad, género exposición ocupacional y antecedentes genéticos (Tucker y Preston, 1996). En la **figura 5** se muestra de forma esquematizada los diferentes tipos de células con micronúcleos y la **tabla 2** muestra los criterios utilizados para evaluar las células con MN.



**Fig.5.** Criterios para evaluar células binucleadas con **MN**. (A) Célula binucleadas con dos **MN**, uno con un tercio del tamaño del núcleo principal y el otro con una novena parte; (B) Un **MN** tocando los núcleos principales, sin solapar ninguno de los núcleos; (C) Célula binucleadas con un **PN** y dos **MN**; (D) Una célula binucleadas con seis **MN** de diferentes tamaños, este tipo de células son raramente vistas (Fenech,2003).

**Tabla 2.** Criterios definidos por el HUMN-project para la selección de células binucleadas y micronúcleos en cultivo de células humanas (Fenech *et al.*, 2003).

<b>CRITERIO PARA CÉLULAS BINÚCLEADAS</b>	<b>CRITERIO PARA MICRÓNÚCLEOS</b>
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 binucleadas.
Pueden tocarse pero no solaparse.	Pueden tocar los núcleos de la célula binucleadas pero no solaparse con ellos.
Ninguno de los núcleos debe encontrarse en etapas de apoptosis.	

### 1.10. Puentes Nucleoplásmicos

Otro de los parámetros que nos permite medir el **EMBC** son los llamados **Puentes Nucleoplásmicos (PNs)**.

Se sabe que los **PNs** se producen cuando los centrómeros de los cromosomas dicéntricos son atraídos a los polos opuestos de la célula en la anafase. Por ello rara vez es posible observar puentes dicéntricos en anafase en ensayos donde no se ha aplicado **Cit-b**, pues antes se forma la membrana nuclear, por lo que las células que proceden de la anafase a la telofase rápidamente, completando la citocinesis y finalmente ocurre la rotura de los **PNs** cuando la célula se separa. Sin embargo las células hijas, en el **EMBC** permite la acumulación de células binucleadas porque la citocinesis se inhibe y la membrana nuclear logra dividirse,

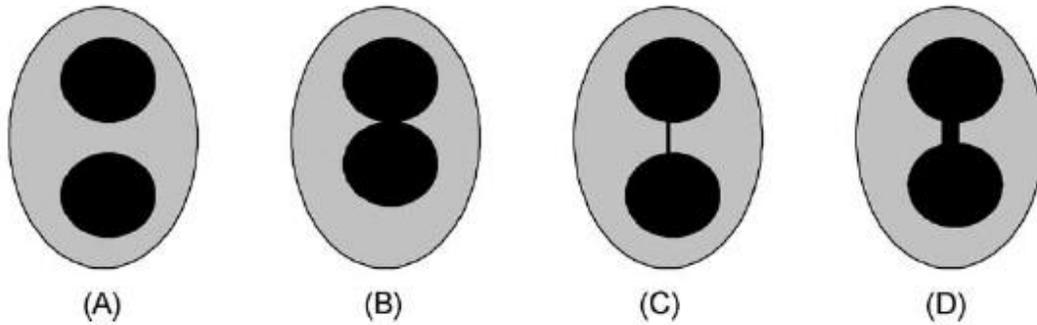
los cromosomas dicéntricos se van hacia los lados opuestos de la célula pero como esta no se termina de dividir permanecen intactos y de esta manera se logran formar los **PN** (Fenech, 2006).

Hasta hace poco tiempo este parámetro no era considerado como una prueba de daño al ADN, pero la importancia de la evaluación de los **PNs** no debe subestimarse ya que proporciona una evidencia directa de los daños resultantes al ADN y de la mala reparación de los rompimientos en el ADN que de lo contrario 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 (Thomas *et al.*, 2003; Fenech, 2006).

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

1. Los **PN** son un vínculo permanente entre el citoplasma de los núcleos de una célula binúcleadas.
2. 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.
3. Los **PN** debe tener las mismas características de tinción de los núcleos principales.
4. En raras ocasiones más de un **PN** se puede observar en una célula binúcleada.
5. Una célula binúcleada con un **PN** pueden además contener uno o más micronúcleos.

Los **PN** son preferentemente evaluados en las células binúcleadas con los núcleos claramente separados (**fig. 6**), ya que suele ser difícil para observar un **PN** cuando los núcleos se tocan o están superpuestos (Fenech *et al.*, 2003).



**Fig.6.**Esquema que representa las células que pueden ser tomadas para evaluar **MN** y **PN**. (A) Célula binucleada; (B) Célula binucleada con los dos núcleos muy cercanos, más no superpuestos; (C) Un **Puente Nucleoplásmico** delgado entre ambos núcleos; (D) Un **Puente Nucleoplásmico** más grueso entre los dos núcleos (Fenech *et al.*, 2003).

### 1.11. Apoptosis

La **Apoptosis** es un término que indica la muerte celular programada o "suicidio celular"; proviene de la raíz griega apo: "fuera de" o "separación" y ptosis: "caída" y representa una serie de eventos moleculares y bioquímicos organizados por un programa genético (Aimee y Thompson, 2004) .

La **apoptosis** se caracteriza por: activación de caspasas, reducción del volumen celular, fragmentación nuclear, exposición del lípido fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, y formación de cuerpos apoptóticos (Saikumar, 1999). La ejecución en sí depende bien de factores externos a la célula (generalmente variaciones de concentración de factores de crecimiento, estímulos para la permanencia en el tejido o bien estímulos apoptóticos directos desde linfocitos) activando el ligando de FAS en la membrana celular, o bien de factores internos en los que la célula expresa metabólicamente su programa de muerte celular como consecuencia de un daño celular. Se debe matizar "daño", puesto que en este contexto, daño implica desde oxidación por radicales libres que la célula evalúa como irreparable hasta el acortamiento de telómeros debido a sucesivos ciclos de división celular, lo cual, en última instancia, produciría daño genético por pérdida de información en caso de nuevas divisiones celulares,

pasando esta definición de "daño" por todos los que generan **apoptosis**, ninguno de los cuales sería suficiente para suspender el programa (en su caso hablaríamos de célula tumoral, es decir, aquella que debiendo ejecutar su programa de apoptosis no lo hace y continúa dividiéndose) (Skulachev, 2006).

La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, controlado e interactivo. Existen mecanismos pro- y anti-apoptóticos, regulados genéticamente, que actúan de forma activa (pues consumen energía) y equilibrada. Como función necesaria para evitar la sobreproducción celular se sospechaba de su existencia, pero es un proceso ordenado y "silencioso" que no produce reacción tisular y por ello difícil de captar. En 1972, Kerr y col., estudiando orgánulos en células neoplásicas, detectaron que muchas células desaparecían en los cultivos (Velasco, 2005). Esto llevó al estudio de imágenes cinemáticas que mostraron mediante microscopía electrónica las alteraciones que sufre la célula en un proceso que es de corta duración (menos de una hora) (Oliveri, 2000).

La apoptosis puede estar frenada, en equilibrio o estimulada. Está en equilibrio respecto de la mitosis en los tejidos adultos sanos y además se presenta por dos vías la vía extrínseca o la vía intrínseca.

### **1.10.1. Vía extrínseca**

La vía extrínseca o de los "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas (**fig. 7**). Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína FAS y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Skulachev, 2006).

La proteína transmembrana FAS en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD (factor associated death domain), nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula FAS que participa en la muerte celular, activando las caspasas-8 y -10. En cambio, si la parte interna de la

molécula se asocia a otro factor llamado DaXX, se activan proteín-kinasas que conducen al efecto contrario, es decir, estimulan el ciclo celular y la mitosis. Esta vía Fas permanece inactiva hasta que se produce en su parte externa el enlace con un cofactor llamado ligando FAS, proteína que actúa como detonador que enciende una vía en que sólo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparado para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores (Aimee y Thompson, 2004).

Algo similar sucede con el otro receptor de membrana TNF. Su porción intracelular conecta con proteínas como Tradd (TNF receptor associated death domain) y Raidd (receptor associated interleukine death domain) que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado Traf (TNF receptor associated factor) activan proteín-kinasas y estimulan la proliferación celular, es decir, el efecto contrario (Skulachev, 2006).

### **1.10.2. Vía intrínseca o mitocondrial**

Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial. Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el Citocromo C. En la **figura 7** se puede apreciar, en forma de resumen, la vía intrínseca.

El Citocromo C, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa-9. Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis (Bossy y Green, 1999).

Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan en tres familias: la familia de las proteínas antiapoptótica (Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1 y otras); la familia de proteínas proapoptótica de tipo "multidominio" (Bax y Bak) y las proteínas proapoptótica de tipo "BH3-only" (Bid, Bim, Bad y otras). Las proteínas tipo multidominio pueden producir poros por si solas en liposomas, lo que indica que probablemente son suficientes para formar el poro mitocondrial que permite la liberación del Citocromo c. Las proteínas tipo *BH3-only* activan a estas proteínas, y las antiapoptótica inhiben la formación del poro. Estas proteínas son los reguladores más importantes del proceso de apoptosis (Desagher y Martinou, 2000).

Además de la salida de Citocromo c desde la mitocondria, otra proteína llamada SMAC/DIABLO, que es inhibidor de los inhibidores de caspasas (IAPS) sale de la misma. Así se tiene una vía en la que la caspasa efectora está libre de actuar (dado que sus inhibidores fueron neutralizados por SMAC/DIABLO).

La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9 (Green, 2005).

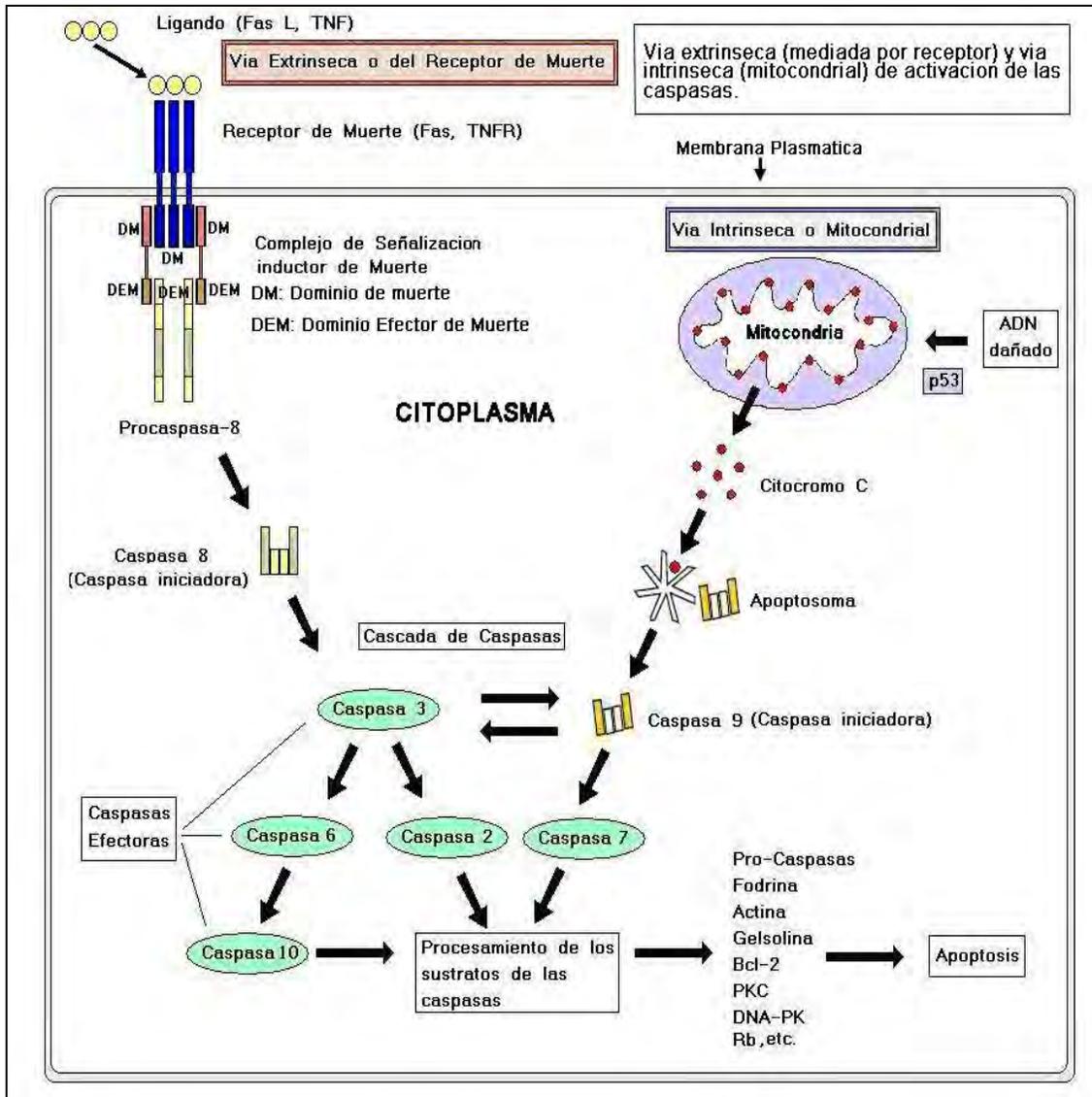
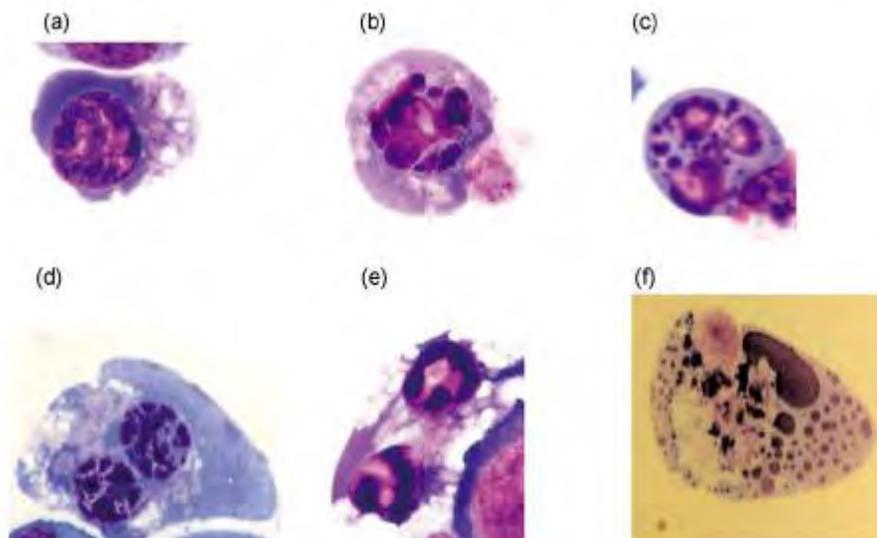


Fig. 7. Esquema que explica las dos vías de muerte celular por apoptosis.

El criterio para la evaluación de las células binucleadas de acuerdo con Fenech y *col* (2003) son los siguientes:

1. Las células apoptóticas en estadios tempranos se pueden identificar por la presencia de condensación de la cromatina en el núcleo y las membranas citoplasmáticas y nucleares intactas.
2. Las células apoptóticas en estadios finales presentan fragmentación del núcleo (cuerpos apoptóticos) con una membrana citoplasmática intacta.
3. La tinción es usualmente más intensa en los fragmentos nucleares, el núcleo y el citoplasma que en las células viables.

Además en la **figura 8** se muestran algunos ejemplos de células apoptóticas.



**Fig.8.** Fotomicrografías que muestran algunos ejemplos de células apoptóticas encontradas en los ensayos de EMBC. (a-c) Células mononucleadas en varios estadios de apoptosis que muestran cromatina condensada en el núcleo y citoplasma más teñido. (d-e) Células binucleadas que presentan apoptosis.(f) Célula en un estadio muy avanzado de apoptosis, con el núcleo completamente fragmentado, pero con el citoplasma y la membrana citoplasmática intacta. Una característica inusual de (d) es la presencia de grandes vacuolas en el citoplasma, que sugieren un cambio entre apoptosis a necrosis (Fenech *et al.*,2003).

## 1.12. Necrosis

La necrosis, a diferencia de la apoptosis, se caracteriza por pérdida del ATP nuclear, daño de los organelos intracelulares, hinchazón y posterior vacuolización del citoplasma (Proskuryakov *et al.*, 2003), con la formación de ampollas que son fagocitadas con signos de inflamación.

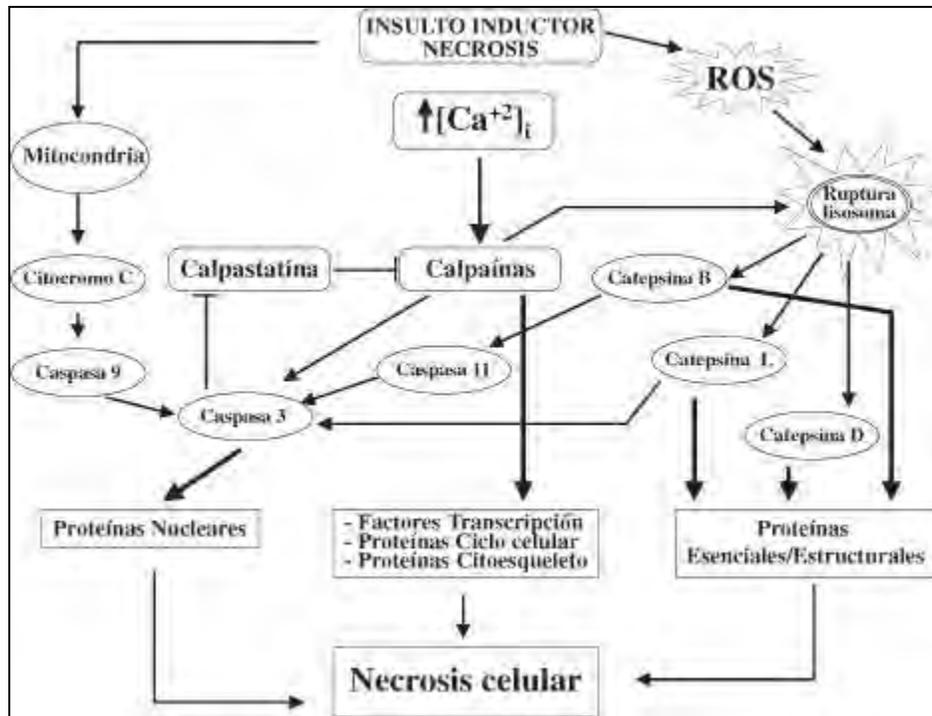
Además podemos decir que la necrosis es un proceso pasivo en el cual la carga osmótica originada por el aumento de permeabilidad de la membrana celular lleva al edema celular.

Las células sufren necrosis cuando son expuestas a estrés extremo. Distintos tipos celulares toleran grados diferentes de estrés. Todas las células poseen mecanismos homeostáticos elaborados que pueden compensar cambios ambientales y mantener el compartimiento interno estable, pero la mantención de la integridad es limitada (Bernhardi, 2004). Condiciones adversas intensas que superan la capacidad de los sistemas de protección comprometerán en forma irreversible los mecanismos homeostáticos, dañando y eventualmente causando la muerte celular. Tales condiciones adversas pueden ser la falta de oxígeno o nutrientes esenciales (isquemia), temperatura elevada, compuestos tóxicos, y estrés mecánico (trauma).

En contraste al conocimiento sobre la apoptosis, se sabe poco sobre los mecanismos moleculares de la necrosis. Más que un programa definido, la necrosis se consideraba como la ruptura caótica e inexorable de la célula en condiciones intolerables. Este desconocimiento se explica por dos motivos principales: la necrosis parecía carecer de características propias bien definidas y hasta hace poco tiempo, no se tenían modelos animales confiables que reprodujeran aspectos de la necrosis (Syntichaki y Tavermarakis, 2002). Estas limitaciones están siendo solucionadas y hoy existe evidencia que la necrosis también se asociaría a ciertos patrones regulares (Syntichaki y Tavermarakis, 2002).

Las proteasas lisosomales y citoplasmáticas, incluyendo las caspasas, han sido involucradas en la ejecución de la necrosis (**fig. 9**). De hecho, el sistema lisosomal es clave en los estadios finales de la destrucción celular. La destinación errada de contenido celular al lisosoma o la salida de enzimas hidrolíticas desde los lisosomas hacia el citoplasma pueden inducir necrosis. Los cambios lisosomales se correlacionan espacial y temporalmente con el envejecimiento y las patologías neurodegenerativas asociadas al envejecimiento. Los cambios en el sistema endosoma-lisosomal se empiezan a observar temprano en la vida adulta, como lo indica el aumento de lisosomas positivos para lipofucsina y las alteraciones en la química lisosomal. Alteraciones lisosomales inducidas experimentalmente o secundarias a alteraciones genéticas se asocian a características propias de los cerebros de humanos ancianos (Bernhardi, 2004).

En ambos casos, a la disfunción lisosomal se asocia la salida gradual de enzimas lisosomales como la catepsina D hacia el citoplasma. Se ha propuesto que la salida de catepsina y otras enzimas hidrolíticas desde los lisosomas dependería del daño de la membrana lisosomal ya sea por radicales libres, o por la acción de hidrolasas específicas.

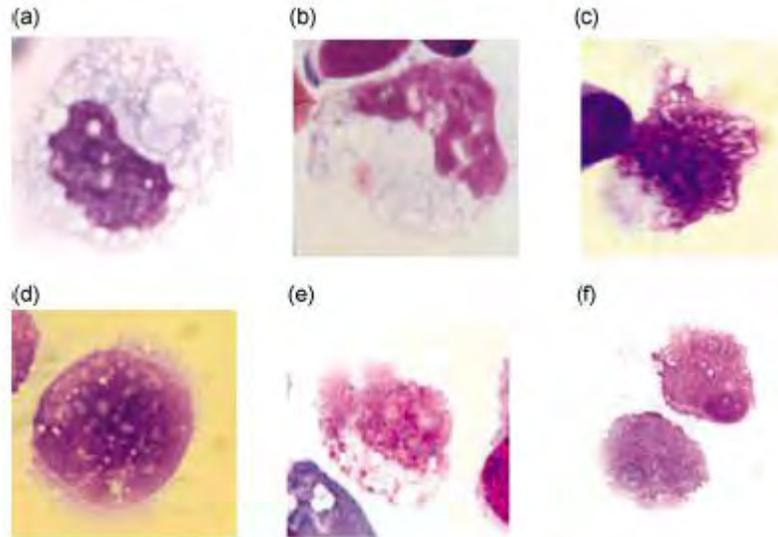


**Fig. 9.** Posible mecanismo efector de la necrosis. Tomado de (Bernhardi, 2004)

El criterio de selección de células necróticas de acuerdo con Fenech *et al.* (2003) es el siguiente:

1. Las células en estadios tempranos de necrosis se pueden reconocer por la presencia de un citoplasma pálido con numerosas vacuolas (sobre todo en el citoplasma y algunas en el núcleo), una membrana citoplasmática con daño y un núcleo intacto.
2. Las células en estadios avanzados de necrosis muestran pérdidas de citoplasma y una membrana nuclear irregular/dañada solo con una parte del núcleo intacta y usualmente con material nuclear saliendo del límite del núcleo.
3. La intensidad de la tinción es usualmente menor que la que se observa en las células viables.

En la **figura 10** se pueden apreciar ejemplos de células necróticas que se pueden encontrar en este ensayo.



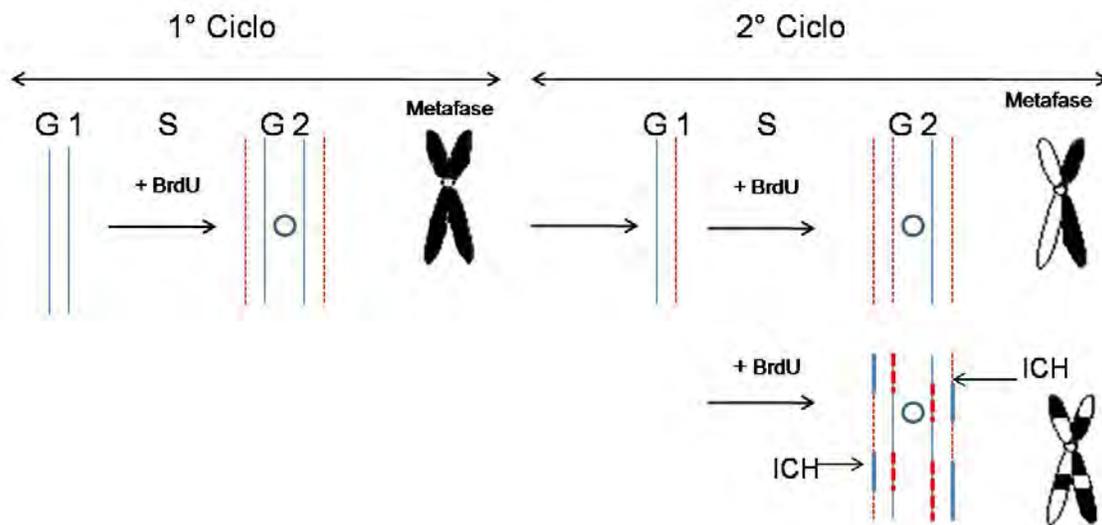
**Fig. 10.** Fotomicrografías de células necróticas encontradas en el **EMNBC**. (a-c) Células en estadios tempranos de necrosis cuando el citoplasma esta vacuolado y pálido, el núcleo esta solo un poco conservado. (d-f) Células en un estadio avanzado de necrosis cuando el citoplasma y la membrana citoplasmática se pierden y el núcleo no se encuentra intacto y en un claro proceso de degradación (Fenech *et al.*, 2003).

### **1.13. Ensayo de Tinción Diferencial para Intercambio de Cromátidas Hermanas.**

Los Intercambios de Cromatidas Hermanas (ICHs) fueron descritos por primera vez por Taylor (1953) en tejidos vegetales (Perry y Thompson, 1984) quien descubrió que si se permite a los cromosomas replicarse una vez en la presencia de timidina tritiada, y después en la ausencia del isotopo, que solo una cromátida de cada cromosoma estaba marcada; este fenómeno se presentaba como resultado de la replicación semi-conservativa del ADN. Taylor observó que ocasionalmente ocurrían cambios simétricos entre estos cromosomas marcados y decidió llamarlos Intercambios de Cromatidas Hermanas. Gracias al uso de las auto-radiografías se pudo observar que varios agentes químicos y físicos, podían alterar la incidencia de estos eventos (Perry y Thompson, 1984).

Pero este método fue cayendo en desuso pues suponía mucho trabajo y la calidad de las imágenes que se producían no eran las mejores, así que se inventó una nueva técnica con el uso de la 5-bromodesoxiuridina (BrdU) (Latt, 1980), que es un análogo de la base timina, este compuesto es incorporado en las hebras de ADN durante la replicación, así quedan hebras con BrdU incorporado y otras que no la presentan, dependiendo de cuántas veces pudo dividirse la célula. En la **figura 11** se presenta de manera resumida la incorporación de BrdU en las células.

Este ensayo puede ser utilizado en células cultivadas o *in vivo* con células de animales a los que se les ha administrado BrdU, además este ensayo ha demostrado ser útil para conocer el impacto de agentes clastogénicos administrados en la clínica, estas mediciones generalmente se aplican cuando los pacientes están siendo tratados con quimioterapia (Latt, 1980).



**Fig.11.** Esquema que presenta de manera resumida la incorporación de BrdU en el material genético de la célula y la obtención de células en segundo ciclo.

En la actualidad aún se desconoce el verdadero origen del intercambio de cromátidas pero se sabe que es el proceso por el cual, durante la replicación del ADN dos cromátidas hermanas se rompen y se vuelven a unir entre ellas, aparentemente en las regiones homólogas de intercambio de la hebra patrón en los cromosomas duplicados. Este proceso es considerado conservativo y libre de errores, dado que la información no es alterada durante este proceso. Estos intercambios involucran rompimientos de ADN y reunión del mismo y los análisis de ICHs permiten una excelente oportunidad para la detección citológica de intercambio en el ADN. Los análisis de ICHs también son útiles para evaluar el impacto citogenético de agentes potencialmente tóxicos (Wilson, 2007).

## 2. Justificación

En México el desarrollo de nuevos fármacos, en especial aquellos en la lucha contra el cáncer, no han tenido el apoyo necesario y por lo tanto se depende de fármacos que usualmente son extranjeros y muy costosos. Por eso cuando existen fármacos tales como las Casiopeínas se vuelve de suma importancia su estudio, no solo para su salida al mercado sino también para promover su desarrollo y producción nacional.

Así entre las múltiples evaluaciones que se realizan a los fármacos antes de su salida al mercado encontramos la medición de parámetros citotóxicos, citostáticos y genotóxicos, a través de diferentes tipos de ensayos tales como el ensayo de micronúcleos y el intercambio de cromátidas hermanas; estos estudios se pueden realizar tanto en sistemas *in vivo* e *in vitro*, tanto en líneas celulares transformadas y normales.

Así en el laboratorio de Citogenética y Mutagénesis decidimos comenzar el estudio *in vitro* de células normales que ha sido un parámetro poco estudiado y por lo tanto es de vital importancia comenzar con su evaluación.

### **3. Hipótesis**

La Casiopeína Igly ha probado tener efectos antineoplásicos, por lo tanto se pueden presentar efectos citostáticos, citotóxicos y genotóxicos que podrían ser corroborados por medio del ensayo de Micronúcleos y de Intercambio de Cromatidas Hermanas en un cultivo de linfocitos aislados humanos expuestos a este fármaco.

## 4. Objetivos

### 4.1. General

- Determinar si existen efectos **Citotóxicos**, **Citostáticos** y **Genotóxicos** de la **Casiopeína Igly** en un cultivo de linfocitos aislados humanos.

### 4.2. Particulares

- Evaluar los efectos **Citotóxicos** (**apoptosis**, **necrosis**), en linfocitos aislados humanos tratados con **Casiopeína Igly** mediante **Índice Citotóxico de División Nuclear (ICDN)** y el **Índice Mitótico (IM)**.
- Evaluar los efectos **Citostáticos** (proliferación celular) en linfocitos aislados humanos tratados con **Casiopeína Igly** mediante el **Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis (IPBC)**, la **Cinética de División Celular (CDC)**, el **Tiempo de Proliferación Linfocítica (TPL)** y el **Índice de Replicación (IR)**.
- Evaluar los efectos **Genotóxicos** en linfocitos aislados humanos tratados con **Casiopeína Igly** mediante la evaluación de **Micronúcleos (MN)**, **Puentes Nucleoplásmicos (PN)** e **Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs)**.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1. Prueba de Viabilidad

Para conocer la viabilidad de las células se utilizó el método del azul tripano, se colocó en el borde de una cámara de Neubauer aproximadamente 0.5ml de la solución de cultivo del testigo negativo, se colocó también una gota de azul tripano que se dejó actuar durante 10 min, después se coloca el cubre objetos y se observa al microscopio a 40x, se cuentan 100 células en cada campo de 16 cuadrículas, donde se evalúan las de color azul (las células muertas) y las incoloras ( las células viables).

Para obtener la cantidad de células se usa la siguiente fórmula: (Promedio de las células de los 10 cuadrantes contados)\*(Factor de dilución)\* volumen por cuadrante ( $10^{-4}\text{cm}^3$ )\* volumen original.

El factor de dilución se obtiene dividiendo (volumen total / volumen de la alícuota).

### 5.2. Micronúcleos

La siembra se realizó en condiciones de esterilidad en el cuarto de cultivo, comienza con la obtención de la muestra de sangre periférica por punción venosa (10 ml), luego se centrifuga durante 25 a 30 minutos a 1500 RPM en tubo cónico estéril. Se obtienen alícuotas de linfocitos (ya separados del resto de células sanguíneas), de este tubo y se agregan a 10 tubos estériles con 5ml de medio de cultivo suplementado con fitohemaglutinina, se etiquetan y se colocan en la incubadora a 37°C.

Los tratamientos se colocaron a las 44 hrs de cultivo y se adicionan 100µl de **Mitomicina C** (concentración final de 0.2µg/ml), será el testigo positivo (T+), al resto de los tubos (excepto el testigo negativo) se les adicionan las

concentraciones de **Casiopeína Igly** 0.615µg (5µl), 1.23µg/ml (10µl) y 2.46µg/ml (20µl). A las 48 horas se les agregan a todos los tubos 100µl (6 µg/ml) de **Citocalacina B**.

Para la cosecha se agrego a los tubos 5ml de solución hipotónica de **KCl** al 0.075M posteriormente se centrifugan los tubos por 5 min a 1500 RPM, luego se realizan lavados (centrifugando entre la aplicación de cada fijador) con los siguientes fijadores: metanol absoluto, metanol-ácido acético en proporción 3:1 y 85%-15% respectivamente, hasta obtener un botón celular limpio y blanco. Posteriormente en laminillas limpias, se gotean con las células obtenidas. Para la tinción se usaron May-Grünwald en una proporción de 2:1 con agua destilada durante 10 minutos y posteriormente Giemsa al 7% durante 5 minutos

A continuación se evalúan las laminillas en el microscopio a 40 X para los parámetros de células polinucleadas con 500 células evaluadas. A 100X para los parámetros de células **Apoptóticas** y **Necróticas** contando 500 células; **Micronúcleos** y **Puentes Nucleoplásmicos** evaluando 1000 células.

### 5.3. Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs)

Se extrajeron aproximadamente 5ml de sangre periférica por punción venosa, en una jeringa heparinizada. En tubos estériles (con 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 activado con **Fitoheماغlutinina**) se colocó aproximadamente 1ml de muestra. Después se incubó por 72hrs a 37°C.

A las 24 horas de comenzado el cultivo se adicionaron 100µl de **BrdU** (con una concentración final de 5µg/ml) a todos los tubos, luego a las 48 horas se adicionaron los tratamientos que son los siguientes: para el testigo positivo se agregan 100µl de **Mitomicina C** a una concentración de 0.2µg/ml. Para el resto de los tubos (excepto el testigo negativo) se agregaron 0.615µg (5µl), 1.23µg/ml (10µl) y 2.46µg/ml (20µl) de **Casiopeína Igly**.

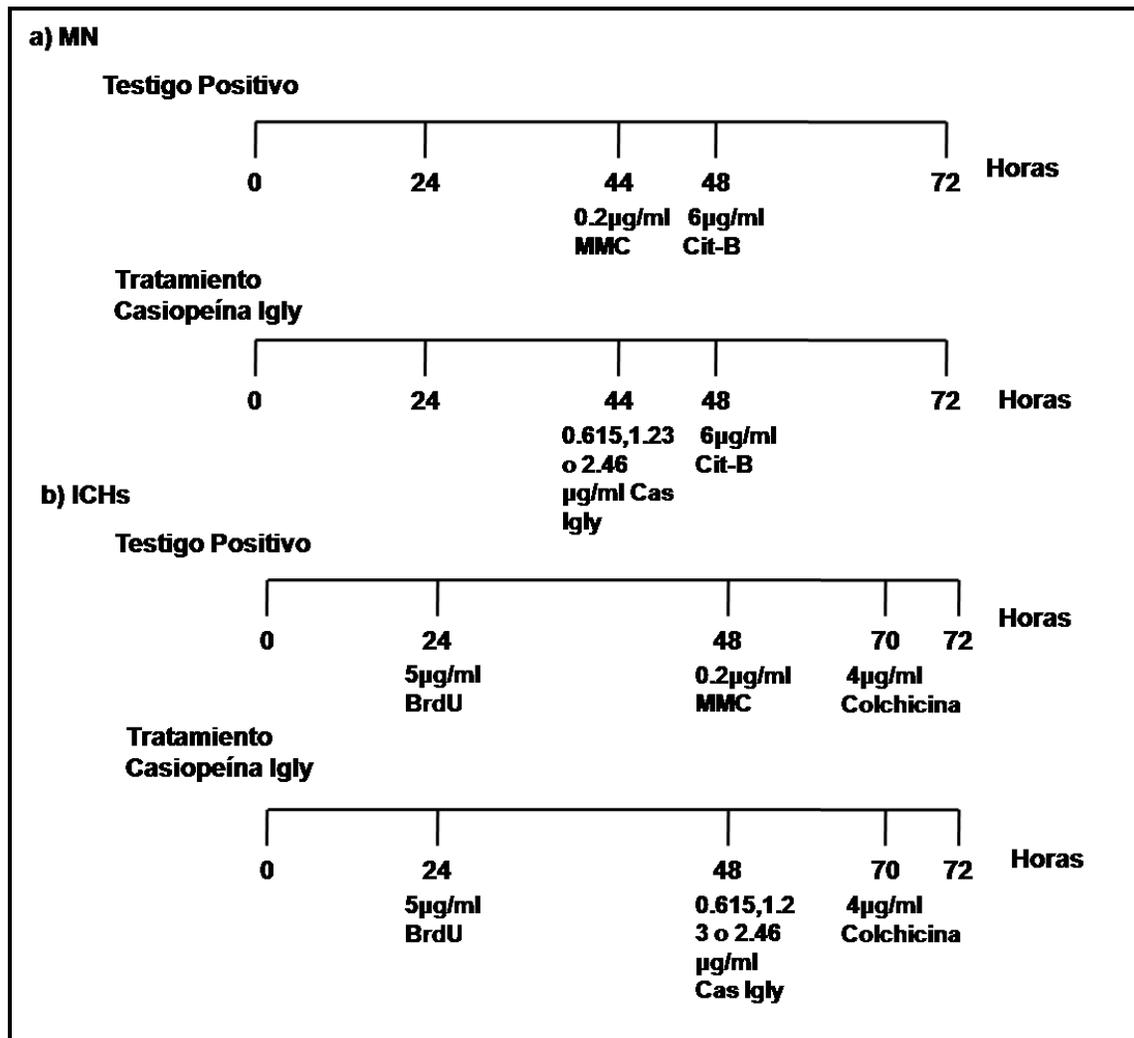
A las 70 horas se agrego 100 $\mu$ l de **Colchicina** a una concentración de 4 $\mu$ g/ml.

Después de 72 horas se inicio la cosecha, centrifugando los tubos a 1500RPM durante 5 minutos, para después adicionar solución hipotónica de **KCl** 0.075M por 20 min a 37°C. Posteriormente se realizo la fijación de las células con fijador Metanol-Ácido acético en proporción 3:1; se hacen 3 lavados y se dejo reposar la solución fijadora 15, 10 y 5 minutos (con centrifugaciones entre cada cambio) para al final resuspender el botón celular en 0.5ml del fijador limpio y frío, luego se gotearon en laminillas limpias y frías.

Para la tinción diferencial de cromátidas hermanas, se comenzó por irradiar las laminillas con luz U.V. por 20 minutos (las laminillas deben estar sumergidas en solución acuosa). Luego se incuban por 20 minutos en solución doblemente salina 2XSSC de Citrato de sodio-cloruro de sodio a 50°C en una caja Coplin. Se lavan las preparaciones con agua destilada y se tiñen con Giemsa al 7% por 10 minutos para luego eliminar el exceso en agua corriente, y se dejan secar al aire.

Se evaluaron al microscopio 30 metafases de buena calidad (bien teñidas, con cromosomas dispersos y completos), para la frecuencia de Intercambio de Cromatidas Hermanas por célula. Para la Cinética de División Celular y el Índice de Replicación se evaluaron 100 metafases tomando en cuenta las de primero, segundo y tercer ciclos, a 100X. Para el Índice Mitótico se registraron 1000 células tomando en cuenta tanto las metafases como las interfases a 40X. Estas evaluaciones fueron el promedio de dos experimentos independientes cada uno con su duplicado.

En la **figura 12** se muestra un esquema de los tiempos de tratamiento para los dos ensayos realizados.



**Fig.12.** Esquema de los tiempos de tratamientos realizados para los ensayos de micronúcleos (MN), e Intercambio de cromátidas hermanas (ICHs).

#### 5.4. Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas que se realizaran para evaluar los resultados del **Ensayo de Micronúcleos** son los siguientes:

Para las evaluaciones de **Apoptosis**, **Necrosis** se empleo Z de proporciones. Para el **Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis** y para el **Índice Citotóxico de División Nuclear** se empleo la prueba de Ji cuadrada. Y por ultimo para **Micronúcleos** y **Puentes Nucleoplasmicos** se empleo  $X^2$  con corrección de Yates.

Mientras que para las evaluaciones del ensayo de **Intercambio de Cromatidas Hermanas** se empleara la Z de proporciones para el **Índice Mitótico** y el **Tiempo de Proliferación Linfocítica**, se utilizara Ji cuadrada para la **Cinética de División Celular** y para el **Índice de Replicación**; y por ultimo para la frecuencia de **Intercambio de Cromatidas Hermanas** se empleara la “t” de Student.

## 6. Resultados

De acuerdo con los objetivos planteados en este trabajo se realizaron dos ensayos citogenéticos: el **Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis (EMBC)** y el ensayo de **Intercambio de Cromatidas Hermanas (ICHs)**; para ambos ensayos se determinaron parámetros de **Citotoxicidad, Citostaticidad, y Genotoxicidad**.

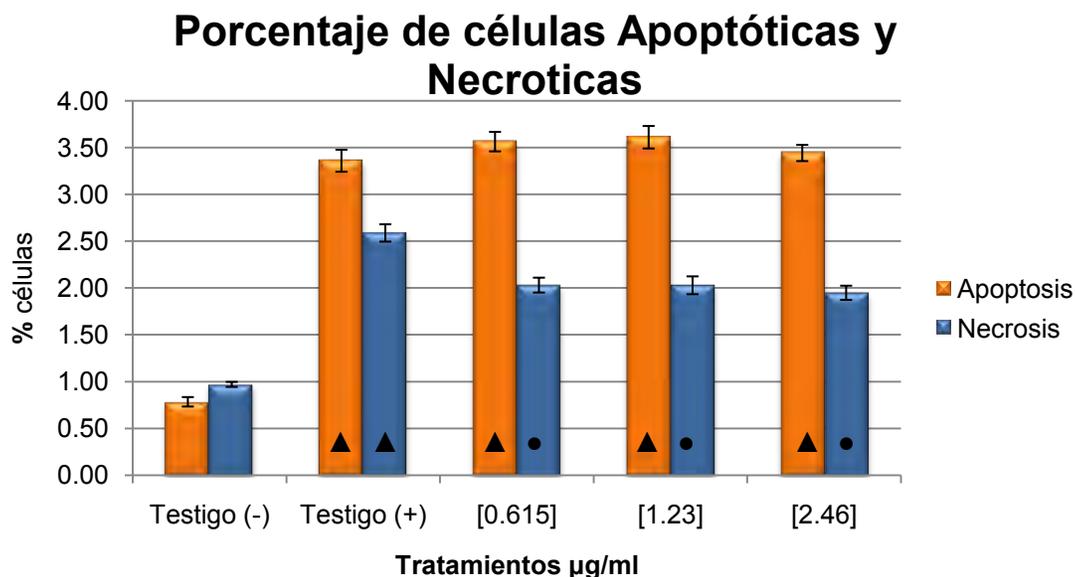
En el **EMBC** para **Citotoxicidad** se evaluaron las células **apoptóticas** y **necróticas** con lo cual se obtuvo el porcentaje de ambos tipos de muerte celular, y con estos datos también se obtuvo el **Índice Citotóxico de División Nuclear (ICDN)**. Para el parámetro de **Citostaticidad** se evaluaron las células polinucleadas con el que se obtuvo el **Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis (IPBC)**. Y por último para la **Genotoxicidad** se valoraron los **Micronúcleos (MN)** y **Puentes Nucleoplásmicos (PN)**.

Mientras que para el ensayo de **Intercambio de Cromatidas Hermanas (ICHs)** se realizaron las siguientes evaluaciones.

**Citotoxicidad:** Se leyeron las células interfásicas y metafásicas para obtener posteriormente el **Índice Mitótico (IM)**. Para **Citostaticidad** se valoraron las metafases en diferentes estadios (1°, 2° y 3° ciclo) para obtener la **Cinética de División Celular (CDC)**, el **Tiempo de Proliferación Linfocítica (TPL)** y el **Índice de Replicación (IR)**. Y para el parámetro de **Genotoxicidad** se evaluaron la frecuencia de **Intercambio de Cromatidas Hermanas (ICHs)** por célula.

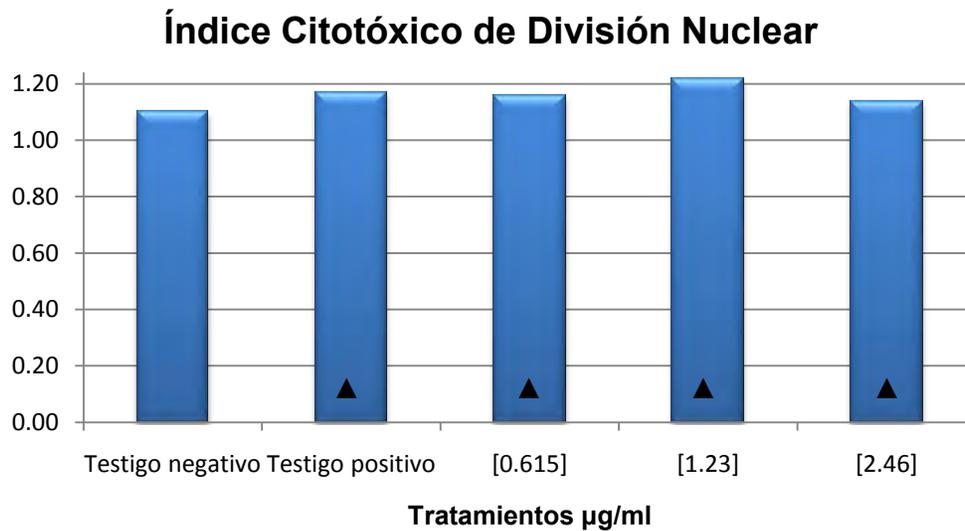
Todos los experimentos se realizaron dos veces cada uno con su duplicado.

## Citotóxicidad



**Fig.13.** Porcentaje de células apoptóticas y necróticas en cultivo de linfocitos humanos aislados, tratados con Casiopeína Igly., Promedio de dos experimentos. ▲ $p < 0.002$   
● $p < 0.01$ , Z para proporciones.

En la **figura 13** se pueden apreciar los resultados para apoptosis y necrosis. Existen en las tres concentraciones trabajadas una diferencia estadísticamente significativa, aunque la forma de muerte celular que predomina es la apoptótica.

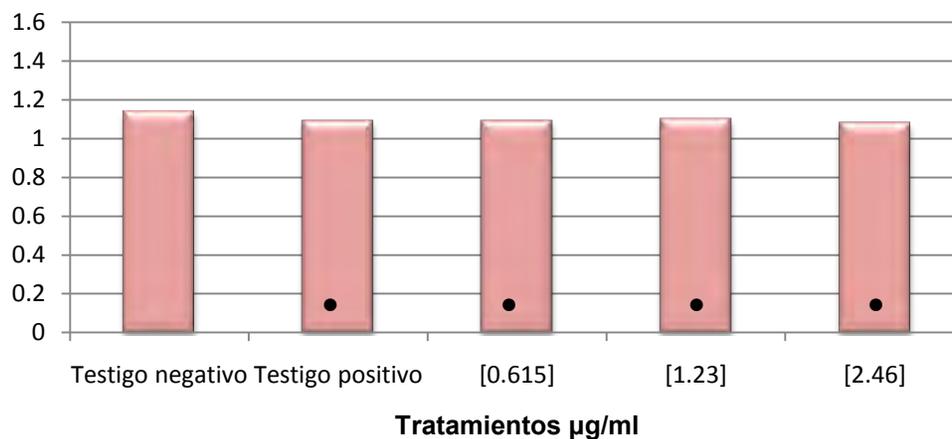


**Fig.14.** ICDN obtenido en cultivo de linfocitos aislados humanos tratados con Casiopeína Igly. Promedio de dos experimentos. ▲  $p < 0.05$ ,  $X^2$

En la **Fig.14** Se puede apreciar la gráfica que muestra los resultados obtenidos para ICDN en el ensayo, aunque no se puede apreciar un comportamiento dosis-respuesta, si se observo un ligero aumento con respecto al testigo negativo, en las tres concentraciones trabajadas.

## Citostaticidad

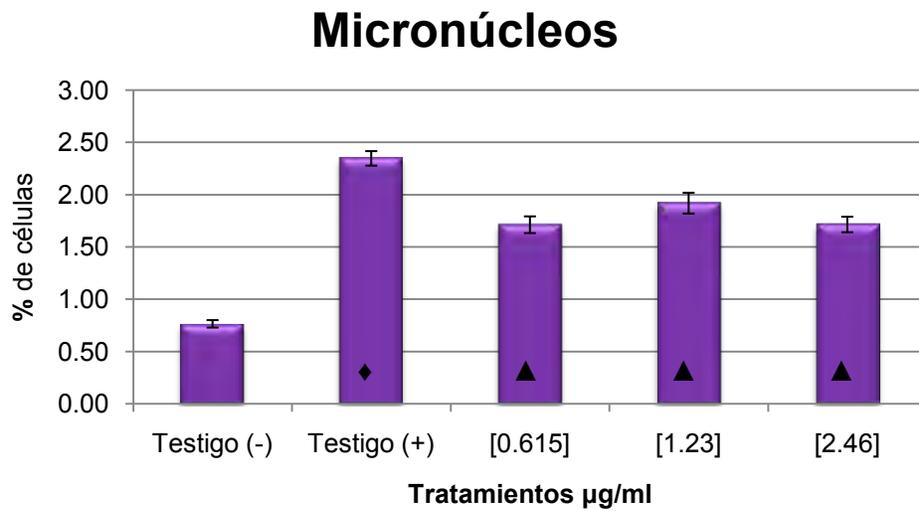
### Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis



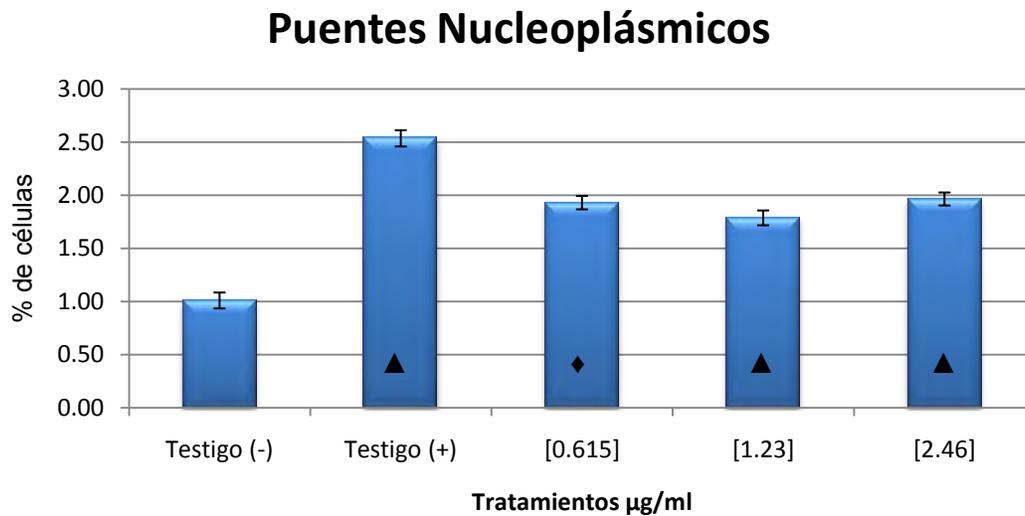
**Fig.15.** IPBC obtenido en cultivo de linfocitos aislados humanos tratados con Casiopeína Igly. Promedio de dos experimentos. •p < 0.005 X<sup>2</sup>

La **Fig. 15** muestra la disminución significativa del **IPBC** en las tres concentraciones trabajadas, al compararlas con el testigo negativo.

## Genotoxicidad



**Fig.16.** Porcentaje de MN obtenidos en cultivo de linfocitos aislados humanos tratados con Casiopeína Igly. Promedio de dos experimentos. ♦  $p < 0.005$  ▲  $p < 0.0005$   $X^2$ y.



**Fig.17.** Porcentaje de PN obtenidos en cultivo de linfocitos aislados humanos tratados con Casiopeína Igly. Promedio de dos experimentos. ♦  $p < 0.05$  ▲  $p < 0.0005$   $X^2$ y.

En las **figuras 16** y **17** se observan los porcentajes de **MN** y **PN** respectivamente; en el caso de los MN las tres concentraciones resultaron estadísticamente significativas al compararlas con el testigo negativo. Los PN también resultaron estadísticamente significativos en las tres concentraciones, esto indica un efecto genotóxico, aunque en ninguno de los dos casos se presentó una tendencia dosis-respuesta.

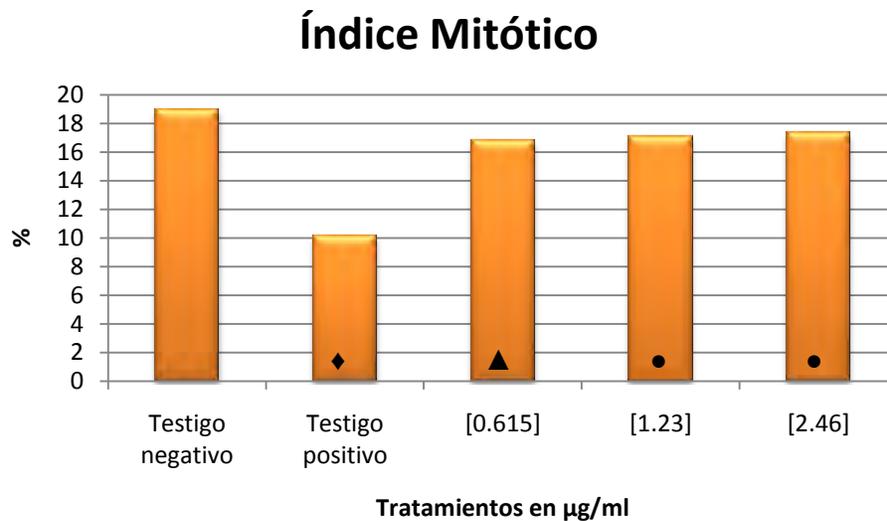
**Tabla 3.** Resultados de Apoptosis, Necrosis, MN, PN, ICDN e IPBC en el EMBC en cultivo de linfocitos aislados humanos tratados con Casiopeína Igly.

Tratamientos (µg/ml)	% de células				ICDN ( $\bar{X} \pm EE$ )	IPBC ( $\bar{X} \pm EE$ )	Total de células evaluadas
	Apoptosis ( $\bar{X} \pm EE$ )	Necrosis ( $\bar{X} \pm EE$ )	MN ( $\bar{X} \pm EE$ )	PN ( $\bar{X} \pm EE$ )			
Testigo (-)	0.78±0.02	0.97±0.01	0.76±0.01	1.01±0.03	1.10±.003	1.14±0.001	5026
MMC[0.2]	3.36±0.0 <sup>A</sup>	2.59±0.0 <sup>A</sup>	2.35±0.0 <sup>E</sup>	2.54±0.0 <sup>F</sup>	1.17±0.00 <sup>C</sup>	1.09±0.00 <sup>D</sup>	4493
Casiopeína Igly [0.615]	3.56±0.0 <sup>A</sup>	2.03±0.0 <sup>B</sup>	1.71±0.0 <sup>F</sup>	1.93±0.0 <sup>G</sup>	1.16±0.00 <sup>C</sup>	1.09±0.00 <sup>D</sup>	4476
[1.23]	3.61±0.0 <sup>A</sup>	2.03±0.0 <sup>B</sup>	1.92±0.0 <sup>F</sup>	1.79±0.0 <sup>F</sup>	1.22±0.00 <sup>C</sup>	1.10±0.00 <sup>D</sup>	4307
[2.46]	3.44±0.0 <sup>A</sup>	1.95±0.0 <sup>B</sup>	1.71±0.0 <sup>F</sup>	1.96±0.0 <sup>F</sup>	1.14±0.00 <sup>C</sup>	1.08±0.00 <sup>D</sup>	4419

Significancias **A** p<0.002, **B** p<0.01, Z para proporciones; **C** p<0.05, X<sup>2</sup>; **D** p< 0.005, X<sup>2</sup>; **E** p<0.005, X<sup>2</sup>y; **F** p<0.0005, X<sup>2</sup>y; **G** p<0.05, X<sup>2</sup>y.

Dentro de los objetivos del trabajo también se incluyeron las evaluaciones del Índice Mitótico, el Índice de Replicación, Tiempo de Proliferación Linfocítica, Cinética de División Celular e Intercambio de Cromatidas Hermanas.

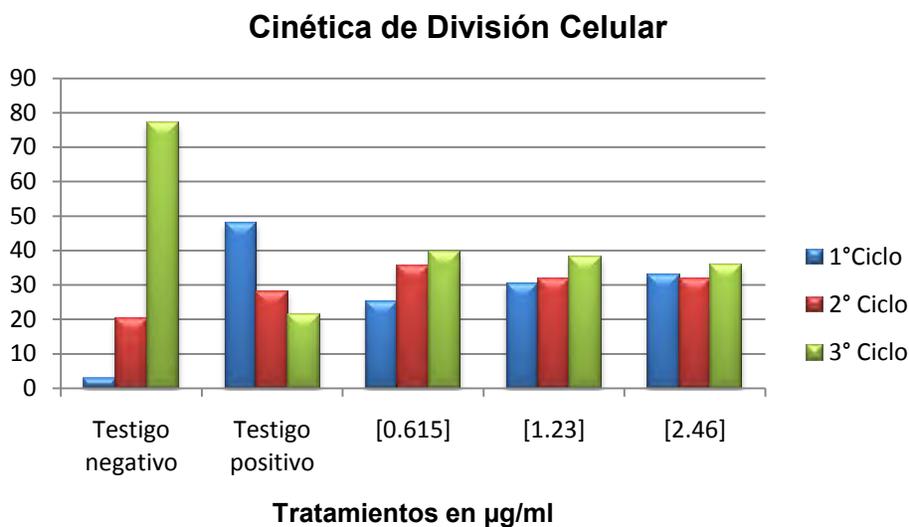
## Citotoxicidad



**Fig.18.** IM obtenido en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly. Promedio de dos experimentos. P<◆0.002 ▲0.005●0.01 Z de proporciones.

En la **figura 18** se aprecian los resultados obtenidos para el **IM**, en todas las concentraciones se encontraron resultados estadísticamente significativos al compararlos con el testigo negativo ( $p < 0.002, 0.005$  y  $0.01$ ).

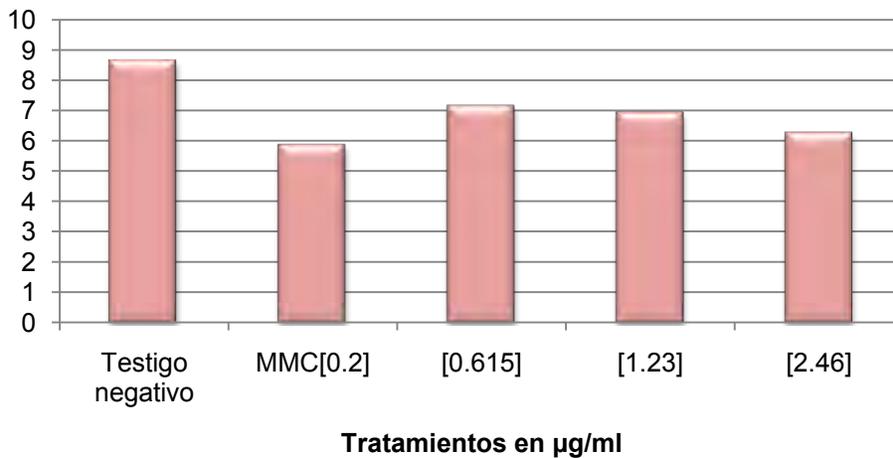
## Citostaticidad



**Fig.19.** CDC obtenido en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly. Promedio de dos experimentos.

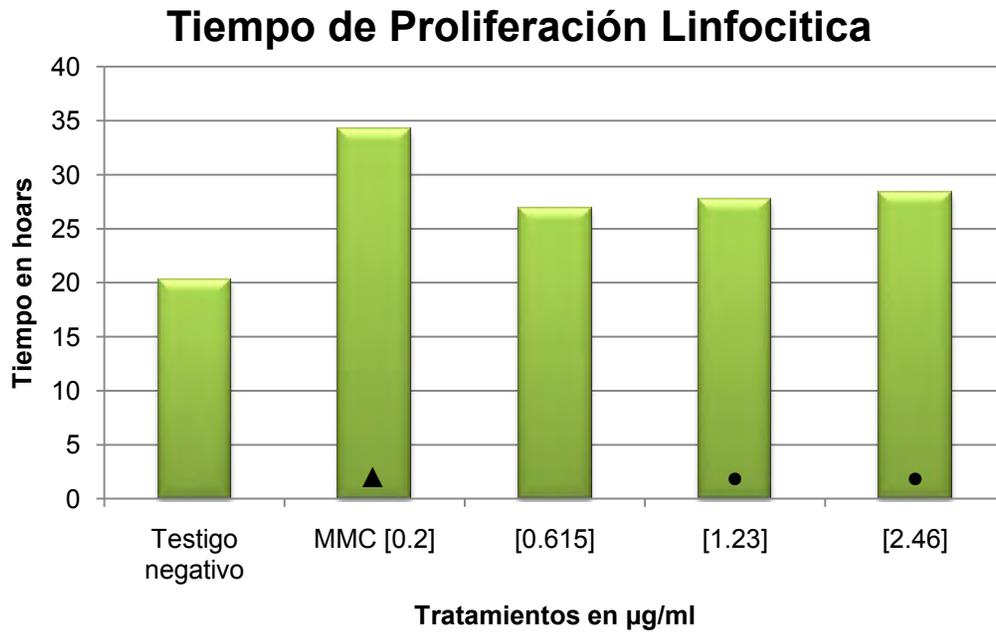
La **figura 19** presenta los resultados obtenidos para el **CDC** donde se encontraron, que la cantidad de células en diferentes estadios (1º, 2º o 3º ciclos) se presentaron de la manera esperada, aunque ninguno de ellos resulto estadísticamente significativo con la prueba de Z para proporciones.

## Índice de Replicación



**Fig.20.** IR obtenido en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly. Promedio de dos experimentos.

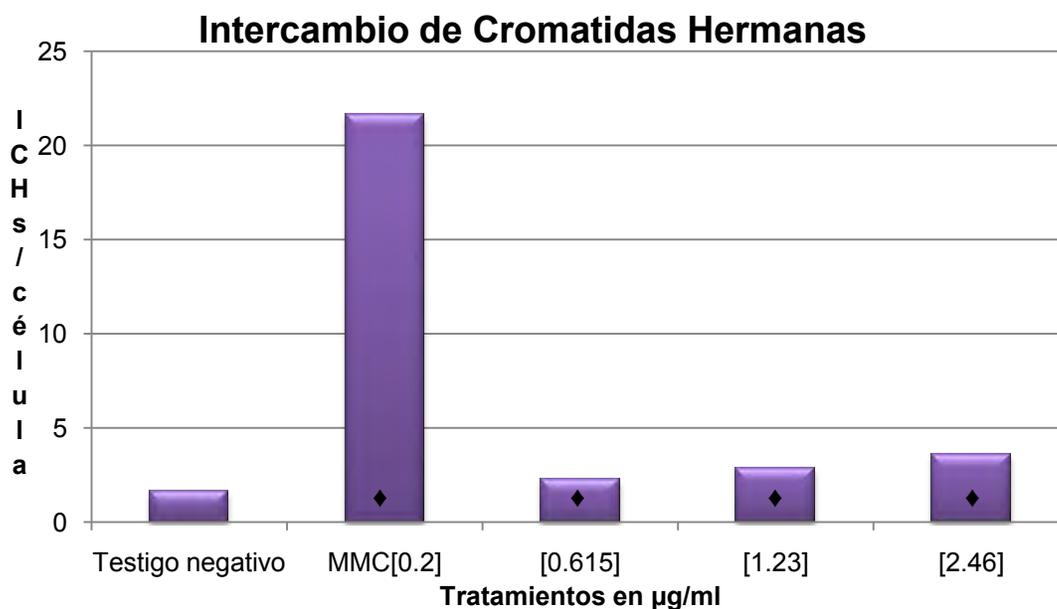
En la **figura 20** se presentan los resultados obtenidos para el **IR** en este caso no existió ningún resultado estadísticamente significativo para la prueba de Z para proporciones. Sin embargo se puede apreciar una tendencia a reducirse al aumentar la dosis de **Casiopeína Igly**.



**Fig.21.** TPL obtenido en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly. Promedio de dos experimentos. ▲p<0.005 ●0.05 Z para proporciones.

En la **figura 21** se presentan los resultados del **TPL** en donde se encontró que solo dos de las concentraciones que se trabajaron (1.23 y 2.46 µg/ml) se obtuvieron diferencias significativas (p<0.005 y 0.05).

## Genotoxicidad



**Fig.22.** Frecuencia de ICHs por célula en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly. Promedio de dos experimentos. ♦  $p < 0.0005$  "t" de Student.

La **figura 22** se observa que los resultados de **ICHs** presentaron un comportamiento dosis respuesta en las tres concentraciones presentadas. En la **tabla 4** se pueden apreciar los máximos y mínimos presentados en el ensayo.

**Tabla 4.** Resultados obtenidos en el ensayo de **ICHs** en cultivo de linfocitos humanos, tratados con **Casiopeína Igly**.

Tratamientos µg/ml	ICHs/cel ( $\bar{X} \pm EE$ )	ICHs min- max	IM ( $\bar{X} \pm EE$ )	M1	CDC M2	M3	IR ( $\bar{X} \pm EE$ )	TPL (hrs) ( $\bar{X} \pm EE$ )	Total de células
Testigo (-)	1.65±0.16	0 - 9	18.96±0.10	2.75	20.25	77	8.64±0.004	20.26±0.02	4004
MMC [0.2]	21.63±1.11 <sup>E</sup>	3 - 66	10.15±0.10 <sup>A</sup>	48	28	21.5	5.86±0.010	34.18±0.12 <sup>B</sup>	4206
Cas Igly [0.615]	2.28±0.13 <sup>E</sup>	0 - 9	16.81±0.09 <sup>B</sup>	25	35.5	39.5	7.15±0.010	26.85±0.07	4230
[1.23]	2.88±0.14 <sup>E</sup>	1 - 7	17.09±0.12 <sup>C</sup>	30.2	31.7	38	6.92±0.002	27.74±0.01 <sup>D</sup>	4095
[2.46]	3.57±0.20 <sup>E</sup>	1 - 13	17.31±0.12 <sup>C</sup>	32.7	31.5	35.7	6.26±0.006	28.40±0.04 <sup>D</sup>	4077

Significancias: **A** p<0.002, **B** p<0.005, **C** p<0.01, **D** p<0.05, Z para proporciones; **E** p<0.0005, "t" de Student.

## 7. Discusión

### 7.1. Citotóxicidad

Un agente citotóxico es aquel que suprime las funciones de las células o les induce la muerte (Reiger Y Green, 1982). Para el caso de el Ensayo de Micronúcleos, se emplearon dos parámetros el de el ICDN y el de los porcentajes de células apoptóticas y necróticas.

En el caso de la Casiopeína Igly tenemos que la muerte celular se presento de manera significativa en las dos vías que se evaluaron (apoptosis y necrosis), aunque la vía por la que se presento mayormente fue la vía apoptotica (**fig. 13**); aunque no se puede hablar de un comportamiento dosis respuesta podemos observar que en las tres concentraciones trabajadas son estadísticamente significativas al compararlas con el testigo negativo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros investigadores como Téllez en el año 2004 al realizar estudios con citometría de flujo en células de la línea HeLa encontró que la Casiopeína Igly provocaba un mayor índice de apoptosis (Téllez, 2004). De forma complementaria Pérez (2009) al realizar prueba de TUNEL a tres diferentes linajes celulares de cáncer (HeLa, MCF-7 y HCT-15) encontró que la Casiopeína Igly provocaba un aumento en la incidencia de la apoptosis en las tres líneas celulares. Además Trejo en 2005 reporto que la Casiopeína Igly producía apoptosis en células de Glioma C6, probablemente por la formación de EROs lo cual apoyaría la teoría de que las Casiopeínas tienen este mecanismo de acción.

El ICDN propuesto por Fenech y sus colaboradores en el año 2003, como una forma de complementar el IPBC (Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis), con el uso de las células apoptóticas y necróticas. Se puede evaluar fácilmente con ligeras modificaciones en el EMBC (Fenech *et al.*, 2003). Con el uso de este índice se puede conocer de manera más precisa que tipo de muerte celular se presenta en un ensayo (Süleyman *et al.*, 2009).

Para el ICDN aun no se ha reportado ningún estudio relacionado con las Casiopeínas, pero resultados en otras investigaciones demuestran que al aumentar este índice de manera significativa con respecto al testigo negativo muestra una actividad citotóxica (Süleyman *et al.*, 2009), como se observaron en nuestros resultados (**fig. 14**) este índice se aumenta en las tres concentraciones trabajadas.

En adición al EMCB se realizo también el Ensayo de Intercambio de Cromatidas Hermanas, en donde para el parámetro de Citotoxicidad se mido el IM y el CDC.

El IM es la medición de células en metafase e interfase, este índice nos da excelente información respecto al crecimiento y desarrollo de los cultivos, así el descenso de dicho parámetro nos revela información acerca de la citotoxicidad de un compuesto (Rojas *et al.*,1992) en nuestros resultados encontramos un descenso significativo en las tres concentraciones trabajadas (**fig. 18**) y estos resultados concuerdan con lo reportado por Pérez (2008) quien también encontró una disminución en el IM en las mismas concentraciones de Casiopeína Igly trabajadas en este estudio (0.615, 1.23 y 2.46µg/ml). Además y en condiciones similares a las de este estudio Beltran y Roldán en 2006 presenta también que existe una disminución en el IM.

Al juntar todos los resultados obtenidos se puede decir que la Casiopeína Igly es citotóxica ya que los datos obtenidos de ICDN, porcentaje de muerte celular, y el IM muestran un efecto citotóxico, confirmando por otros estudios que afirman que la Casiopeína Igly tiene este comportamiento. Entre ellos el de Alemón *et al.*(2002), donde trabajaron con la Casiopeínas Igly, III-E, y III-H en células HeLa y linfocitos humanos a las concentraciones de 10, 20, 40 y 80 µM, reportan que la Casiopeína Igly es ligeramente citotóxica, y que probablemente se deba a la producción de radicales libres originada por la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ . En adición a esto Rivero-Müller y sus colaboradores (2007), reporta que los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  son formadores de Especies Reactivas de Oxígeno y que la Casiopeína Igly es citotóxica por que es capaz de generar la formación de **EROs**.

Así mismo Alemón en el 2007 observo que la Casiopeína Igly es menos citotóxica comparada con las del grupo II, y III, en células HeLa y leucocitos, a una concentración de 100  $\mu$ M al evaluar la citotoxicidad con el porcentaje de supervivencia por el método de Strauss.

## 7.2. Citostaticidad

Un agente citostático es cualquier sustancia química o medicamento, capaz de detener el desarrollo o la multiplicación de las células (normales o transformadas) (Martinez *et al.*, 2002). En nuestro trabajo para la medición de este parámetro calculamos el IPBC que es el Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis; una actividad citostática se reflejará en la disminución de este parámetro ya que indica que se detiene el ciclo celular. En nuestro estudio las tres concentraciones que se evaluaron de Casiopeína Igly resultaron en disminuciones significativas al compararlas con el testigo negativo (**fig. 15**), al haber un incremento en la cantidad de células mononucleadas, es decir, de alguna manera se detiene el ciclo celular; estos resultados se confirman con lo obtenido por Pérez (2008) en donde se presenta un comportamiento similar, en las mismas concentraciones de 0.615, 1.23 y 2.46  $\mu$ g/ml de Casiopeína Igly en cultivo de linfocitos humanos.

Además se evaluó el IR (Índice de Replicación) que es un parámetro que nos indica el promedio de veces que las células se dividen en el medio de cultivo (M'Bemba-Meka *et al.*, 2007), una disminución en este índice podría indicar una inhibición en la síntesis de ADN (Lazutka y Margolin, 1990), los datos obtenidos arrojaron una disminución en el IR, aunque ninguno de ellos fue estadísticamente significativo (**fig. 20**), se puede observar una tendencia a la disminución. Tal comportamiento se puede confirmar con el trabajo de Guevara (2008) donde el IR disminuye en manera significativa al usar Casiopeína Igly en cultivo de linfocitos

humanos, en las concentraciones de 0.33, 0.66 y 1.0  $\mu\text{g/ml}$ .

La Cinética de División Celular es un parámetro que estima la cantidad de células en diferentes momentos de divisiones, así se convierte en un parámetro citostático que nos permite apreciar de manera general el comportamiento proliferativo del cultivo. En nuestros resultados se observó que las diferentes concentraciones de Casiopeína Igly disminuyeron la cantidad de células encontradas en tercer ciclo en todos los casos, aunque ninguna de ellas resultó con un descenso estadísticamente significativo (**fig. 19**); se pueden observar dichos cambios y se puede deducir que este compuesto tiene un efecto citostático.

Para el Tiempo de Proliferación Linfocítica (TPL) se encontraron que los tiempos de división en las tres concentraciones trabajadas aumentaron en comparación al testigo negativo (**fig. 21**), resultando estadísticamente significativa solo las concentraciones media y alta de Casiopeína Igly (1.23 y 2.46 $\mu\text{g/ml}$  respectivamente). Beltran y Roldán (2006) reportan que la Casiopeína Igly tiene un comportamiento citostático, en condiciones similares, también Guevara (2008) reporta un comportamiento similar en la Casiopeína Igly, en cultivo de linfocitos humanos, al presentarse un aumento significativo en el TPL, en sus ensayos.

Otro estudio que confirma la citostaticidad de las Casiopeínas es el de Márquez y sus solaboradores (2000) al reportar que la Casiopeína Igly es citostática para las líneas transformadas de carcinoma ovárico y cérvix en las líneas celulares HeLa 10 , SiHa 11, CaSki 12 , C33-A 13 y CaLo.

### **7.3. Genotoxicidad**

Las sustancias genotóxicas son aquellas que afectan los ácidos nucleicos y alteran sus funciones. Estas sustancias pueden unirse directamente al ADN o pueden llevar al daño del ADN 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 (University, 2008). Así para medir los efectos genotóxicos causados por algún compuesto, el **EMCB** resulta un excelente ensayo ya que por su simplicidad y funcionalidad se pueden obtener muchos resultados tales como células con **Micronucleos** y **Puentes Nucleoplasmicos**, además de los parámetros antes mencionados de **Apoptosis** y **Necrosis** (Kirsch-Volders *et al.*, 1997).

Nuestros resultados para el parámetro de **MN** (**fig. 16**) muestran un aumento estadísticamente significativo en las tres concentraciones trabajadas (0.615, 1.23 y 2.46 µg/ml), de la misma manera se presentaron los resultados de **PN** que en todas las concentraciones evaluadas se encontraron aumentos estadísticamente significativos con respecto al testigo negativo (**fig.17**), aunque en ambos casos no se pudo encontrar un comportamiento dosis-respuesta, es claro que la Casiopeína Igly tiene efectos genotóxicos ya que de alguna manera daña al ADN de los linfocitos lo que favorece la aparición de los **MN** y **PN**. El comportamiento de estos fenómenos está relacionado con la inducción al daño al ADN, causado por lesiones de rompimiento de cadena doble (Brusick, 1987; Obe *et al.*, 2002).

Otros investigadores han reportado también estos parámetros tal es el caso de Pérez (2008) quien trabajando en condiciones similares a las nuestras con Casiopeína Igly en **MN** y **PN** muestra un comportamiento similar a los resultados aquí presentados, un incremento en el porcentaje de **MN** y **PN** en relación al testigo negativo; Alemón y sus colaboradores (2002) trabajaron con Casiopeínas III-E, III-H y Igly en células HeLa y linfocitos humanos encontrando que la capacidad de daño al ADN de estos compuestos es inversamente proporcional a su tamaño, es decir las moléculas más pequeñas causaran un mayor daño. La Casiopeína más pequeña es la III-E, le sigue la III-H y por último la Igly.

En complemento a lo que se realizó con el **EMBC** se realizó también el ensayo de **ICHs**, se sabe que la aparición de **ICHs** implica algún tipo de cambio en las cromátidas (Perry y Thomson, 1984), pero aun se desconoce si existe algún tipo de daño al material genético involucrado. En este ensayo los datos se

comportaron con una tendencia dosis-respuesta, es decir a mayor concentración de **Casiopeína Igly** mayor cantidad de **ICHs** por célula se encontraron al compararlos con el testigo negativo (**fig.22**). Esto corrobora que la Casiopeína Igly tiene un efecto genotóxico que se refleja en forma de **ICHs**. Carvallo (2007) presento que los efectos citostáticos y antiproliferativos de la Casiopeína Igly pueden estar relacionados con su capacidad de producir daño al ADN, aunque este trabajo se haya realizado con otro compuesto, podrían ser comparado con la Casiopeína Igly ya que comparten el mismo ligando orgánico (el aminoácido Glicina) y probablemente tengan mecanismos de acción parecidos.

Existe una gran variedad de agentes químicos que inducen un incremento en la frecuencia de **ICHs**, la mayoría de estos compuestos producen daño al ADN y por consecuencia daño a los cromosomas e incluso en algunos casos pueden causar mutaciones en los genes (Bajpayee *et al.*, 2005; Roldán *et al.*, 1997). De la misma manera, las Casiopeínas, también inducen **ICHs** y al parecer tienen relación con el material genético. Sin embargo, hay evidencias de que las Casiopeínas tienen un potencial bajo para inducir inestabilidad geonómica, esto se ha probado en varias líneas celulares tumorales *in vivo* como *in vitro* (Marin *et al.*, 2003). Al realizar estudios para observar las interacciones de las Casiopeínas con el ADN, se obtuvo que solo hay interacciones con la adenina, mediante el apilamiento entre los sustituyentes biperidina o fenantrolina del complejo mixto y el anillo de la base, lo cual lleva a pensar que las Casiopeínas actúan como intercalantes (Tovar, 2002).

Por otra parte, todas las Casiopeínas contienen el ligante diimina distinto, con características hidrofóbicas, que le permiten actuar como intercalante con las bases del ADN (Cirigo, 2002; Tovar, 2002). El ligante hidrofílico le permite a la molécula ser transportada con facilidad. La naturaleza, el número y la posición de los ligantes, son los responsables de generar selectividad preferencial sobre algunos tejidos tumorales específicos (Alemón, 2007; Bravo *et al.*, 2002; Ruiz, 2000).

## 8. Conclusiones

En base a los objetivos propuestos en este trabajo tenemos que:

- La Casiopeína Igly en las tres concentraciones utilizadas (0.615, 1.23 y 2.46µg/ml) causaron muerte celular por apoptosis y necrosis, aunque el tipo de muerte celular que se presentó con mayor frecuencia fue la apoptosis. Comprobando su efecto citotóxico.
- Por otra parte presentaron disminuciones significativas en el ICDN e IM; por lo tanto tiene un efecto citotóxico.
- La aplicación de la Casiopeína Igly en las diferentes concentraciones utilizadas, provocó reducciones significativas del IPBC y aumentos en el TPL. Por lo tanto la Casiopeína Igly tiene efectos citostáticos.
- Los parámetros de MN, PN e ICHs encontrados fueron en todos los casos aumentos estadísticamente significativos al compararlos con el testigo negativo, por lo que se comprobó el efecto genotóxico de la Casiopeína Igly.
- Los parámetros proporcionados por el ensayo de MN e ICHs se relacionan con daños a la cadena doble del ADN, al resultar con aumentos significativos en ambos parámetros podemos deducir que la Casiopeína Igly tiene un comportamiento clastogénicos.

## 9. Perspectivas

- Realizar pruebas moleculares como FISH para conocer el origen de los PN y MN que provoca la Casiopeína Igly.
- Realizar experimentos de Micronúcleos en diferentes horas (24 y 44 hrs) para conocer si el daño que se presenta es S-dependiente o S-independiente.
- Realizar un experimentos con citometría de flujo laminar para comprobar la presencia de Apoptosis en los cultivos.

## 10. Referencias Bibliográficas.

Aimee L.E., Thompson B.C., (2004). Death by desing: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinión in Cell Biology* , 16: 663-669.

Alemón, R., Breña, M., y Serment, J. (2002). Inducción de daño por antineoplásicos de tipo quelatos de cobre. *Congreso de Casiopeínas* , 129.134.

Alemón-Medina, R. B. (2007). Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drug (Casiopeínas®). *Cancer Chemother Pharmacot* .

Aranda, A. E. (2004). Tratamiento del cáncer de colon en estadíos II,III y IV. *Oncología (Bar)* , 27: (4)130-133.

Bajpayee, M., Pandey, A. K., y Parmer, D. (2005). Current status of short-term tests for evaluation of genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity of enviromental chemicals NCEs. *Tailor y Francis* , 15:155-180.

Barceloux, D. G. (1999). Copper. *Clinical Toxicology* , 37: (2) 217-230.

Beltran, D., y Roldán, R. E. (2006). Evaluación del efecto genotxico (ICHs) de la Casiopeína Igly en cultivo de linfocitos humanos. 2° *Congreso Nacional de Química Médica* .

Bernhardi, R. M. (2004). Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis? . *Rev Chil Neuro-Psiquiat* , 42(4): 281-292 .

Bossy, E. W., y Green, D. R. (1999). Apoptosis: check point at the mitochondrial frontier. *Mutation Research* , 434:243–251.

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

Brusick, D. (1987). *Principles of Genetic Toxicology*. NY: Plenum Press.

Carvallo, F. (2007). *Efectos antiproliferativos y apoptoticos de las Casiopeínas*. Tesis para obtener el título de Doctor en ciencias de la producción y salud animal. UNAM. Programa de doctorado en ciencias de la producción y salud animal. Mexico DF.

Celorio, A. (1986). *Fundamentos de oncología ginecológica*. España: Ediciones Díaz de Santos.

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

De Vizcaya R A., R. M. (2000). Induction of apoptosis by novel copper based anticancer compound, Casiopeína IIgly in L1210 murine leukaemia and CH1human ovarian carcinoma cell. *Toxicol in vitro* , 14: 1-5.

Desagher, S., y Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology* , 369-377.

Didier, L., y Chistal, D. (2004). *Quimioterapia anticancerosa*. España: Elsevier.

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

Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research* , 600: 58–66.

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

Gracia M I., R. R. (2000). Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeínas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel. *Metal based drugs* , 8: 19-28.

German, J., & Alhadef, B. (1994). Analysis of Sister-Chromatid Exchanges. *Current Protocols in Human Genetics* .

Gómez, E., y Roldán, R. E. (2006). Evaluación de aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly. *Segundo congreso nacional de química médica dedicado a la investigación en cáncer y diabetes*.

Gray, M. B., y Lippard, J. S. (1994). Capítulo 9. En I. Bertini, *Bioinorganic chemistry* (pág. 611). USA: University Science Books.

Green, D. R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to die. *Cell* , 121:671-674.

Guevara, C. S. (2008). Efectos de la Casiopeína Ilgly en el material genético de linfocitos humanos in vitro de sangre periférica. *Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza* .

Giannaula, R. J. (2002). Enfermedad de Wilson. *Revista neurologica argentina* , 27: 72-82.

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

Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., y Van Hummelen, P. (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-end point assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and no.disjuncton. *Mutation research* , 392:19-30.

Lane, L. L. (1999). *Farmacología en enfermería*. España: Elsevier.

Lavelly RS., Poen. J. (1995). Principios de oncología radiante. En Cameron RB., *Oncología práctica*. Argentina: Editorial médica panamericana.

Latt, S. A., & Schreck, R. R. (1980). Sister chromatid exchange analysis. *Am J Hum Genet* , 32: 297-313.

Lazutka, J. R., y Margolin, B. H. (1990). Replication index in human lymphocytes: methods for statiscal analysis and possible role in genetic toxicology. *Envariomental and molecular mutagenesis* , 17:188-195.

Lown, J. W. (1979). The molecular mechanism of antitumor action of the mitomycin. En C. S. T, *Mitomycin C* (págs. 5-26). New York: Ademic Press.

Mason RJ., Z. D. (21 de Septiembre de 2009). *Biblioteca Nacional de Medicina de EU*. Recuperado el 29 de Octubre de 2009, de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002324.htm>

Marin, H. A., García, M. I., Ruiz, R. L., y Moreno, S. R. (2003). Toxic effects of cooper based antineoplastic drugs (Casiopeinas) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology* , 65:1979-1989.

Márquez, Q. A., Gómez, C., Ruiz, R. L., de la Rosa, D., García, I., Tinoco, M., y otros. (2000). Evaluación antineoplásica in vitro de nuevos fármacos (Casiopeínas) empleando líneas tumorales tumorales y murinas. *4° Jornada de trabajo de Casiopeínas* , 4-9.

Martinez, M. T., García, F., Manzera, J. T., y Garrigos, J. A. (2002). Los citostaticos. *Enfermería global* .

M'Bemba-Meka, P., Lemieux, N., y Chakrabarti, S. K. (2007). Role of oxidative stress and intracellular calcium in nickel carbonate hydroxide-induced sister-chromatid exchange, and alterations in replication index and mitotic index in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol* , 81:89-99.

Mc Laughling C.J. (1995). Principios de la quimioterapia. En C. RB, *Oncología práctica*. Argentina: Editorial médica panamericana.

McClevert, J. A., y Meyer, T. J. (2004). *Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. Comprehensive coordination chemistry II. From biology to nanotechnology. Vol 9*. Reino Unido: Elsevier.

Navarro, J. P., Aguilar, I. A., y López, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de intolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* , 10-25.

Obe, G., Pfeifferm, P., Savage, J. K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., y otros. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research* , 504:17-36.

O'Connor, J. M. (2001). Trace elements and DNA damage. *Biochemical Society Transactions* , 29: (2) 354-357.

Oliveri, R. (2000). Apoptosis en la insuficiencia cardiaca. *Rev. Argent. Cardiol.* , 603-607.

Pérez, A. M. (2008). *Evaluación del daño ocasionado al ADN en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly (nuevo compuesto de Cobre II)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.

Pérez, R. C. (2009). *Influencia de los sustituyentes periféricos de fenantrolina de las Casiopeínas y las modificaciones que producen en los efectos apoptóticos y citotóxicos en 3 líneas celulares*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Perry, P. E., y Thomson, E. F. (1984). The methodology of sister chromatid exchanges. En J. B. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, y C. Ramel, *Handbook of mutagenicity test procedures* (págs. 495-517). Netherland: Elsevier Science Publishers.

Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., y Gabai, V. L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* , 283:1-16.

Reiger, R., y Green, A. (1982). *Diccionario de genética y citogenética*. España: Editorial Alambra.

Rivero-Müller, A., De Vizcaya-Ruiz, A., Plant, N., Ruiz, L., y Dobrota, M. (2007). Mixed chelated copper Casiopeína II Gly binds and degrades nucleic acid: a mechanism of cytotoxicity. *Chemical-Biological interactions* .

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

Roldán-Reyes, E., Aguilar-Morales, S., Frias-Vásquez, S., y Altamirano-Lozano, M. (1997). Induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes by vanadium pentoxide in combination with caffeine. *Med.Sci.Res.* , 25:501-504.

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

Ruiz R L., García I., de la Rosa M E., Sumano H., Gómez C., Arenas F., Gómez F E., Pimentel E. y Cruces M P. (1993). Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeínas I, II and III. *Journal of inorganic biochemistry.* , 51:250.

Ruiz, L. A. (s.f.). Dirección general de invenciones, marcas y desarrollo tecnológico (SECOFI), Registro Núm 18801-120579 y 18802-120580. US patents: Number Ap. 21 (1992) 5, 107,005; Nov 19 (1996)5, 576, 326, Feb 18 (1997).

Saikumar P., D. Z. (1999). Apoptosis: Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease . *Am J Med* , 107:489 –506.

Sancha, A., & Lira, L. (2006). Presencia de cobre en aguas de consumo humano: causas, efectos y soluciones. *Universidad de Chile* , 1-7.

Schwiertert, C. W., y McCue, J. P. (2004). Coordination compounds in medicinal chemistry . *Coordination chemistry reviews* , 184: 67-89.

Skulachev, P. V. (2006). Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* , 11:473-485.

Süleyman, G., Asu, S., y Zeynep, t. (2009). Cytotoxic and genotoxic effects of sodium hypochlorite on human peripheral lymphocytes in vitro. *Cytotechnology* , 59:113–119.

Syntichaki, P., y Tavermarakis, N. (2002). Death by necrosis: uncontrollable catastrophe, or there is order behind the chaos? *EMBO rep* , 3: 604-609.

Téllez, L. A. (2004). *Evaluación por citometría de flujo del incremento en la tasa de apoptosis y necrosis en células HeLa tratadas con Casiopeína*. Tesis de Licenciatura. UAM-I .Universidad Autónoma Metropolitana.

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

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

Tovar, A. T., Ruiz, L. A., y Campero, A. C. (2004). Dos formas diferentes de interacción entre compuestos mixtos de cobre (II) (Casiopeína) y adenina, como una aproximación a su selectividad. *Primer congreso de química médica* , 159-161.

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

University, E. (29 de Julio de 2008). *Cancer quest*. Recuperado el 1 de Diembre de 2009, de <http://www.cancerquest.org/index.cfm?lang=spanish&page=482>

Velasco, R. C. (2005). La apoptosis en biología y patología. *Revista peruana de cardiología* , 119-128.

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

Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Braz- J. Plant Physiol.* , 17: (1) 145-156.

Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética. *An. Sist. Sanit. Navar.* , 28 (2): 227-236.