



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**“Evaluación de Yemas Nucleares en linfocitos humanos *in vitro* tratados con Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**ANA LAURA MARTÍNEZ CALDERÓN**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELIA ROLDÁN REYES**



**México, D. F.**

**Marzo, 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## *Agradecimientos*

*Esta tesis se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, en el **Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis**, que es parte de la Unidad de Investigación de Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), la cual a su vez pertenece a la Unidad Multidisciplinaria de Investigación de Estudios Zaragoza (UMIEZ); dicho laboratorio se encuentra bajo la responsabilidad de la:*

*Dra. Elia Roldán Reyes.*

*El desarrollo de este trabajo conto con el apoyo económico del **Programa de Apoyo a Proyectos de investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IN221808-3)**.*

## *Dedicatorias*

*A mis papis, **Guadalupe y Aniceto**, porque siempre me han cuidado y apoyado incondicionalmente, y se han preocupado por formarme como un buen ser humano. Les agradezco infinitamente.*

*A mis hermanos, **Liz, Edgar y Dany**, porque me han ayudado tanto académica como personalmente y me han brindado su confianza.*

*En general a mis papis y hermanos por compartir su vida conmigo y soportarme. Los quiero mucho.*

*A mi novio **Fabricio, mi amisi**, por tu apoyo y compañía, por cada día que me esperaste a que saliera del labo y te preocupabas por que llegara bien a casita. Por confiar en mí e impulsarme a tener aún más seguridad. Por tu compañía, ya que me divierto mucho contigo, amisi te amo. Eres el mejor panda del mundo.*

*A la **Dra. Elia** por sus buenos consejos, permitirme formar parte del laboratorio, compartir sus conocimientos y orientar mi camino en la investigación. Doctora hizo muy amena mi estancia en el laboratorio.*

*A **Sol**, porque al trabajar en equipo, aprendí mucho de ti y contigo, me ayudaste mucho en este trabajo. Tu compañía fue grata ya que en ti encontré una amiga.*

*A **Mary y Pame**, niñas fue grato convivir con ustedes en el labo, compartir la hora de la comida entre, risas, anécdotas e información de carácter meramente privado (chismes).  
Son unas buenas y divertidas amigas.*

*A aquellos que contribuyeron con su donación de sangre para que este trabajo se pudiera realizar, entre ellos **mi amisi, Cristobal, Jose Antonio, Daniel Damián, Sansininea y Eliseo**.*

**¡GRACIAS!**

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.</b> . . . . .	I
<b>LISTA DE FIGURAS</b> . . . . .	V
<b>LISTA DE TABLAS</b> . . . . .	VIII
<b>RESUMEN</b> . . . . .	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> . . . . .	1
1.1. Metales en la medicina . . . . .	1
1.2. Cobre . . . . .	2
1.2.1. Toxicidad del cobre . . . . .	4
1.2.2. Cobre y daño oxidativo . . . . .	4
1.3. EROs y daño a moléculas biológicas . . . . .	6
1.4. Casiopeínas . . . . .	7
1.4.1. Casiopeína Igly . . . . .	9
1.4.2. Casiopeína IIgly . . . . .	10
1.4.3. Casiopeína III-I-a . . . . .	14
1.5. Núcleo celular . . . . .	16
1.6. Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis (MNBC) . . . . .	17
1.6.1. Micronúcleos . . . . .	17
1.6.2. Puentes nucleoplásmicos . . . . .	18
1.6.3. Yemas nucleares . . . . .	19
1.7. Citotoxicidad . . . . .	29
1.7.1. Apoptosis . . . . .	30
1.7.2. Necrosis . . . . .	30
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> . . . . .	33
<b>3. HIPÓTESIS</b> . . . . .	34
<b>4. OBJETIVOS</b> . . . . .	35
<b>5. MÉTODO</b> . . . . .	36
	...

5.1. Ensayo de MNBC .....	36
5.2. Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH) .....	38
<b>6. EVALUACIONES Y ESTADÍSTICA .....</b>	<b>39</b>
6.1. Genotoxicidad .....	39
6.2. Citotoxicidad .....	40
6.3. Citostaticidad .....	40
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
7.1. Genotoxicidad .....	41
7.2. Citotoxicidad .....	49
7.3. Citostaticidad .....	54
<b>8. DISCUSIONES .....</b>	<b>59</b>
8.1. Genotoxicidad .....	59
8.2. Citotoxicidad .....	62
8.3. Citostaticidad .....	64
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>68</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>76</b>
12.1. Preparación de reactivos para ensayo de MNBC .....	76
12.2. Preparación de reactivos para la técnica de FISH .....	77
12.3. Participación académica .....	78

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**0.4xSCC:** Solución 0.4 salina.

**2xSSC:** Solución doblemente salina.

**A549:** Línea celular de adenocarcinoma humano de epitelio alveolar basal.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AMN:** Anormalidades morfológicas nucleares.

**APAF 1:** Factor activador de proteasa apoptótica 1 (por siglas en inglés).

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.

**AS-30D:** Línea celular de hepatoma de hígado de rata.

**Bax:** Proteína BCL-2 asociada al cromosoma X (por sus siglas en inglés).

**BCL-2:** B-cell lymphoma 2, proteína antiapoptótica.

**BID:** miembro proapoptótico de la familia Bcl-2.

**BN:** binucleada.

**BrdU:** 5-Bromodesoxiuridina.

**CaLo:** Línea celular de cáncer cervicouterino humano, estadio dos.

**CBN:** Células binucleadas.

**CCC:** Colchicina.

**CCS1:** Chaperona de cobre para SOD1.

**CH1:** Línea celular de carcinoma de ovario humano.

**CI<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria media.

**Cisplatino:** *cis*-diamino-dicloro platino (II).

**Cit-B:** Citocalasina B.

**COLO320DM:** Línea celular humana derivada de carcinoma de colon compuesto de células neuroendocrinas.

**Cu:** Cobre.

**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol.

**DMs:** Dobles minutos.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**dTMP:** Timidilato.

**dUMP:** Uridilato.

**E. E.:** Error estándar.

**EROs:** Especies reactivas de oxígeno.

**FADD:** Factor asociado al dominio de muerte (por siglas en inglés).

**FAS:** Proteína transmembranal receptora de muerte.

**FISEL:** Fluorescence *in situ* end labeling (por siglas en inglés).

**FISH:** Hibridación *in situ* con fluorescencia (por sus siglas en inglés).

**GSH:** Glutati6n.

**H157:** Línea celular de c6ncer de pulm6n humano de tipo carcinoma escamoso.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Per6xido de hidr6geno.



**HCT-15:** Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano.

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

**ICHs:** Intercambio de Cromátidas Hermanas.

**IDN:** índice de división nuclear.

**IM:** Índice mitótico.

**K:** Potasio.

**L1210:** Línea celular derivada de leucemia murina.

**MCF-7:** Línea celular de cáncer de mama humano.

**MMC:** Mitomicina C.

**MN:** Micronúcleos.

**MNBC:** Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis.

**MT:** Metalotioneínas.

**NADH:** Ubiquinona oxidoreductasa.

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** Ion superóxido.

**OH<sup>•</sup>:** Radical hidroxilo.

**P53:** Gen codificante para la proteína p53 supresora de tumores y promotora de procesos apoptóticos.

**PC-3:** Línea celular de adenocarcinoma humano de próstata, grado cuatro.

**PN:** Puentes nucleoplásmicos.

**Rad51:** Proteína que media la reparación de rompimiento de doble cadena de ADN por recombinación homóloga.

**RE:** Retículo endoplásmico.

**Redox:** Óxido-reducción.

**RFP:** Rompimiento-Fusión-Puente.

**RPM:** Revoluciones Por Minuto.

**SiHa:** Línea celular de cáncer cervico uterino proveniente de pacientes con HPV16.

**SK-LU-1:** Línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano, grado tres.

**SOD1:** Cu/Zn superóxido dismutasa.

**SPD8:** Línea celular originada de células pulmonares de hámster chino V79.

**T(-) :** Testigo negativo.

**tBID:** BID truncada.

**TNF:** Factor de Necrosis Tumoral (por siglas en inglés).

**TUNEL:** *Terminal deoxinucleotidil transferase-mediated* deoxiUridine triphosphate-Nick End Labeling. Método de marcaje *in situ* del ADN fragmentado.

**UTP:** Uridina 5'trifosfato.

**XIAP:** Inhibidor X-ligando de la Proteína de Apoptosis (por siglas en inglés).

**YN:** Yemas Nucleares.

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1.** Elementos esenciales para la vida en el cuerpo humano (modificado de Williams, 1972).

**Figura 2.** Estructura química de los complejos de platino y aducto formado por cisplatin (Todd y Lippard, 2009).

**Figura 3.** Absorción de Cu por enterocitos (Crisponi *et al.*, 2010).

**Figura 4.** Transporte de Cu en los hepatocitos (Crisponi *et al.*, 2010).

**Figura 5.** Casiopeína Igly (Uribe, 2010).

**Figura 6.** Casiopeína IIgly (Cordero, 2010).

**Figura 7.** Casiopeína III-I-a (Carvallo, 2010).

**Figura 8.** Células binucleadas (Fenech, 2000).

**Figura 9.** Formación de MN y PN (Fenech, 2000).

**Figura 10.** YN en células binucleadas (Fenech *et al.*, 2003).

**Figura 11.** Comportamiento intracelular de las DMs y generación de YN y MN (modificado de Shimizu, 2011).

**Figura 12.** Ciclo R-F-P (Rompimiento-Fusión-Puente) (Fenech y Crott, 2002; Fenech, 2006).

**Figura 13.** Formación de YN (Lindberg *et al.*, 2007).

**Figura 14.** Formación de YN y MN de la ruptura de un puente anafásico (Pampalona *et al.*, 2010).

**Figura 15.** Esquema de la hibridación de una sonda fluorescente con el material genético blanco (modificado de Guevara, 2011).

**Figura 16.** Apoptosis (Stephen y Douglas, 2010).

**Figura 17.** Separación de células blancas por gradiente de densidad.

**Figura 18.** Porcentaje de YN en linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína Igly.

**Figura 19.** Porcentaje de YN en linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína IIgly.

**Figura 20.** Porcentaje de YN en linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína III-I-a.

**Figura 21.** Microfotografías de células BN con YN en microscopía de campo claro, 100X tratadas con Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a.

**Figura 22.** Porcentaje de YN con y sin señal centromérica en linfocitos humanos *in vitro* tratados con las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a.

**Figura 23.** Microfotografías de células BN con YN en microscopía de fluorescencia, vistas con filtro para DAPI y rodamina a 100X, tratadas con Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a.

**Figura 24.** Porcentaje de apoptosis y necrosis en cultivos de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de la Casiopeína Igly.

**Figura 25.** Porcentaje de apoptosis y necrosis en cultivos de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de la Casiopeína IIgly.

**Figura 26.** Porcentaje de apoptosis y necrosis en cultivos de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de la Casiopeína III-I-a.

**Figura 27.** Microfotografías de células apoptóticas y necróticas tratadas previamente con Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a, 100X.

**Figura 28.** Microfotografías de células polinucleadas previamente tratadas con Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a, 40X.

**Figura 29.** Índice de división nuclear (IDN) de linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína Igly.

**Figura 30.** IDN de linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína IIgly.

**Figura 31.** IDN de linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína III-I-a.

**Figura 32.** Porcentaje de células binucleadas (CBN) en cultivos tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína Igly.

**Figura 33.** Porcentaje de CBN en cultivos tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína IIgly.

**Figura 34.** Porcentaje de CBN en cultivos tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína III-I-a.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Criterios de selección para células apoptóticas y necróticas (Fenech *et al.*, 2003).

**Tabla 2.** Concentraciones de los reactivos aplicados por tratamiento.

**Tabla 3.** Porcentaje de YN evaluadas en células binucleadas de linfocitos humanos *in vitro* tratados con las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a.

**Tabla 4.** Porcentaje de YN con y sin señal centromérica en linfocitos humanos binucleados *in vitro* tratados con las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a.

**Tabla 5.** Porcentaje de apoptosis y necrosis en cultivos de linfocitos humanos tratados con las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a.

**Tabla 6.** Porcentajes de células polinucleadas en cultivos tratados con las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a.

## RESUMEN

Las Casiopeínas® son una familia de compuestos quelatos mixtos con centro metálico de Cobre (II), presentan la fórmula general  $[Cu(N-N)(N-O)] NO_3$  o  $[Cu(N-N)(O-O)] NO_3$ . Fueron sintetizados con el fin de que fueran una alternativa entre los tratamientos contra el cáncer. Ha sido mostrado que las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a poseen actividad antineoplásica en células transformadas por lo que son de los compuestos más prometedores de la familia.

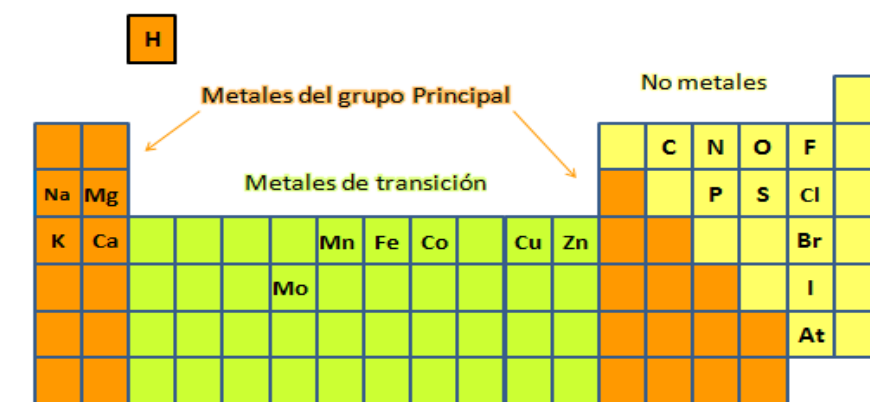
Se realizó el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC) en linfocitos humanos *in vitro* tratados con las Casiopeínas Igly (0.615, 1.23 y 2.46 µg/ml), Ilgly (0.33, 0.66, 1 µg/ml) y III-I-a (4.2, 8.4, 12.6 µg/ml), además fueron utilizados dos testigos positivos a los cuales se les aplicó mitomicina C (0.2 µg/ml) y colchicina (0.04 µg/ml), y un testigo negativo al cual no se aplicó tratamiento.

Fueron evaluados los efectos; genotóxico, mediante el análisis de yemas nucleares (en células binucleadas), en combinación con la técnica de FISH para detectar la presencia o ausencia de señal para ADN centromérico en yemas nucleares; citotóxico mediante la evaluación de células apoptóticas y necróticas; y citostático al examinar células polinucleadas.

Los resultados muestran que las tres Casiopeínas empleadas en el presente estudio provocan la formación de yemas nucleares las cuales en su mayoría no presentan señal de ADN centromérico e inducen muerte celular, tanto por apoptosis como por necrosis, lo cual indica que son genotóxicas mediante clastogénesis y citotóxicas por ambos tipos de muerte celular. El efecto citostático solo lo presentaron las Casiopeínas Igly y III-I-a mientras la Casiopeína Ilgly no resultó citostática en linfocitos humanos *in vitro* en las condiciones mencionadas.

## 1. INTRODUCCIÓN

Veinte elementos químicos son esenciales para la vida y el funcionamiento del cuerpo humano (**figura 1**), en los que se incluyen tanto metales como no metales, en general los primeros son divididos en dos clases; metales del grupo principal y metales de transición (**Williams, 1972**).



**Figura 1.** Elementos esenciales para la vida en el cuerpo humano, estos son veinte e incluyen tanto metales como no metales (modificado de **Williams, 1972**).

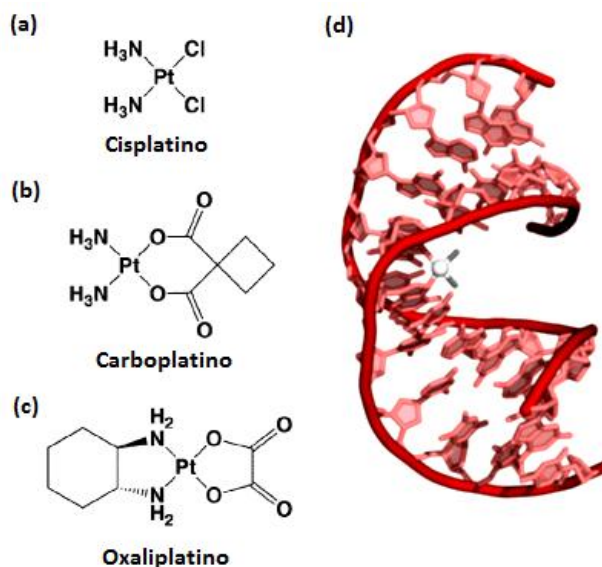
### 1.1. Metales en la medicina

Desde hace 5000 años árabes y chinos empleaban zinc para promover la cicatrización de las heridas, los egipcios utilizaban cobre para esterilizar el agua. Durante el renacimiento europeos usaban cloruro de mercurio como diurético y descubrieron el valor nutricional del hierro. El primer uso racional de un compuesto de metal en la medicina fue para el tratamiento de la tuberculosis con aurocianuro de potasio ( $K[Au(CN)_2]$ ) (**Chen et al., 2009**).

En la actualidad los complejos de metal son utilizados en el tratamiento de varias enfermedades, el cisplatino (*cis*-diamino-dicloro platino (II)) fue uno de los primeros complejos de metales usados en el tratamiento del cáncer, su actividad antineoplásica fue descubierta en la década de 1960. Tiene un papel importante en el tratamiento de los cánceres de testículo, ovario, cabeza, cuello, vejiga, cérvix, melanomas y linfomas, ejerce su efecto antineoplásico por interacción con el ADN formando aductos (**figura 2**) que



interfieren en la replicación y transcripción de éste, lo que desencadena el mecanismo de apoptosis. Sin embargo, la eficacia del cisplatino no resulta plena, esto se debe a efectos secundarios de toxicidad y a la resistencia de células transformadas, ya sea adquirida o inherente. Como alternativa fueron diseñados una segunda generación de compuestos de platino, dentro de estos se encuentra el carboplatino y oxaliplatino (figura 2). Su toxicidad es manejable en comparación con el cisplatino, pero todavía se busca incrementar el espectro de actividad de los complejos de platino hacia más tipos de cáncer. El éxito logrado con el cisplatino en quimioterapia ha estimulado la investigación de otros complejos de metal como potenciales antineoplásicos, entre ellos los complejos de cobre (Sadler y Guo, 1998; Chen *et al.*, 2009; Todd y Lippard, 2009).



**Figura 2.** Estructura química de los complejos de platino y aducto formado por cisplatin. (a) Estructura química del cisplatino, (b) carboplatino y (c) oxaliplatino. (d) Enlace cruzado en intracadena de ADN formado por el cisplatino en el sitio  $1,2\text{-}\{\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\}^{2+}\text{-d}(\text{GpG})$ , donde aproximadamente son formados el 65% de los aductos (Todd y Lippard, 2009).

## 1.2. Cobre

El cobre (Cu) es un elemento traza esencial, gran parte de este en el cuerpo humano en condiciones fisiológicas es funcional, se encuentra como cofactor de diferentes enzimas en las que se encuentran: ceruloplasmina, transporta el cobre en el plasma y asociada con la transferrina ayuda en el transporte de hierro; citocromo *c* oxidasa, enzima terminal de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa; Cu/Zn superóxido dismutasa, enzima antioxidante capaz de remover radicales superóxido de los tejidos; lisil oxidasa, inicia el ensamblaje covalente de las fibras de colágeno y elastina de la matriz extracelular; tirosinasa, relacionada en la síntesis de melanina; dopamina-beta-mooxigenasa, requerida para la síntesis de dopamina. El cobre además tiene funciones no enzimáticas en la

angiogénesis, mielinización de nervios, desarrollo del cerebro y es esencial para la reproducción **(Gaetke y Chow, 2003; Crisponi et al., 2010)**.

El Cu es absorbido en el tracto intestinal, entra a los enterocitos por el transportador de cationes humano 1 (hCTR1) y probablemente también por el transportador de dicaciones de metal 1 (DMT1) y ATP7A o proteína Menkes. En el citoplasma de los enterocitos los átomos de Cu son incorporados a metalotioneínas para prevenir daño oxidativo. Posteriormente, son transferidos a ATP7A, esta proteína regula el transporte de Cu hacia el portal sanguíneo en donde los iones Cu (II) son unidos a albúmina e histidina **(figura 3)** y se dirigen al hígado. El proceso de captación de Cu por los hepatocitos es probablemente iniciado por la unión del complejo Cu(II)-His-Alb o el complejo Cu(II)-His<sub>2</sub> seguido por la reducción de los iones cúpricos a cuprosos por NADH oxidasa en la membrana plasmática, así los iones Cu(I) entran en la célula a través de los transportadores de cationes humanos 1 y 2 (hCTR1 y hCTR2) **(figura 4)**. El Cu dentro de la célula se une rápidamente a proteínas llamadas chaperonas de cobre encargadas de llevar los iones de este metal a específicos sitios en la célula **(Wang y Guo, 2006; Crisponi et al., 2010)**.

La chaperona de cobre CCS1 y glutatión (GSH) llevan los iones de Cu(I) al antioxidante Cu/Zn superóxido dismutasa 1 (SOD1) en el espacio intermembranal de la mitocondria. La chaperona COX 17 interviene en la donación de iones de Cu en la mitocondria y coopera con Sco1, COX-11 y COX-2 en la transferencia de iones de Cu a citocromo c oxidasa. En la mitocondria el Cu puede ser almacenado en ceruloplasmina, metalotioneínas y chaperonas de cobre donde pueden ser destinados al compartimento tras Golgi o la ruta secretora cuando mucho Cu es acumulado en la célula **(Crisponi et al., 2010)**.

La chaperona de cobre Atox1 se encarga de llevar los iones de Cu a ATP7A y ATP7B que a su vez regulan la homeostasis del cobre en mamíferos, en el hígado cuando se localizan en la red trans Golgi proporcionan iones de Cu a cuproenzimas, mientras bajo estrés de Cu se translocan a la membrana celular para excretar los excesos de este metal en la bilis (MURR1/COMMD1 y HAH1 también están relacionadas con la ruta secretora de Cu). El Cu llevado a la red de tras Golgi es transportado por ATP7B en el aparato de Golgi e incorporado en vesículas con ceruloplasmina que atraviesan la membrana plasmática y

liberan al Cu unido a ceruloplasmina al plasma para ser transportado a los tejidos periféricos (figura 4) (Wang y Guo, 2006; Crisponi *et al.*, 2010).

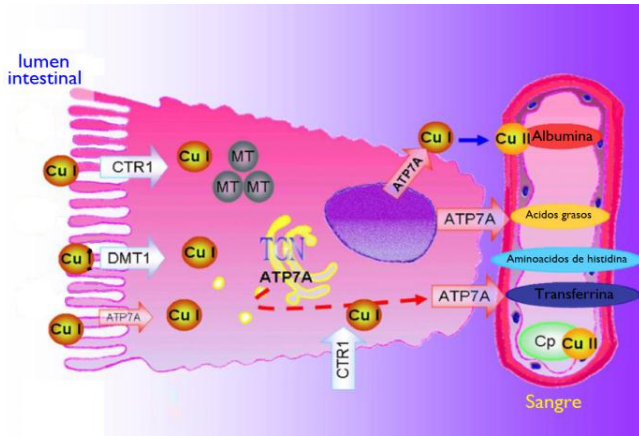


Figura 3. Absorción de Cu por enterocitos (Crisponi *et al.*, 2010).

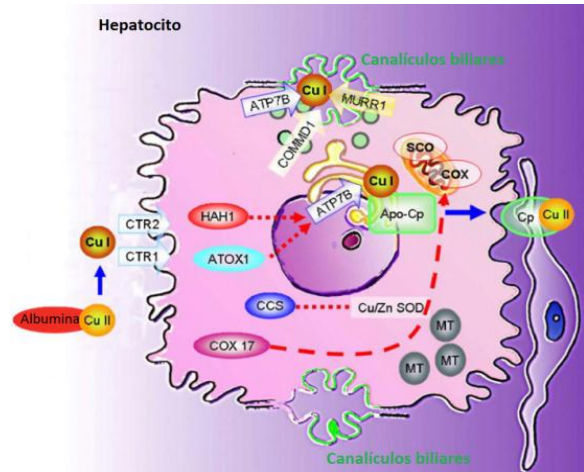


Figura 4. Transporte de Cu en los hepatocitos (Crisponi *et al.*, 2010).

### 1.2.1. Toxicidad del cobre

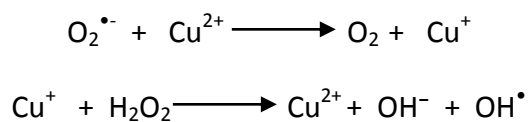
Los alimentos más que el agua proporcionan la mayor parte de Cu consumido por mamíferos, pero la cantidad de Cu consumida en la dieta y el agua es relativamente baja. La mayoría de los animales son capaces de controlar los excesos de este metal en el cuerpo, ya sea disminuyendo la absorción o incrementando la excreción. Sin embargo, la toxicidad es consecuencia de exposición a excesos de Cu causada por accidentes, riesgos laborales, contaminación ambiental, errores en el metabolismo de Cu. La toxicidad crónica del cobre primariamente afecta al hígado, es manifestada por el desarrollo de cirrosis hepática, daño a los túbulos renales, cerebro y otros órganos. Puede progresar a coma, necrosis hepática, colapso vascular y muerte (Gaetke y Chow, 2003).

### 1.2.2. Cobre y daño oxidativo

El oxígeno es la molécula más abundante en los sistemas biológicos, existe como un di-radical (un electrón impar en cada átomo), es particularmente susceptible a la reducción ganando de 1 a 4 electrones de manera secuencial, así generando moléculas parcialmente reducidas llamadas especies reactivas de oxígeno (EROs). Estas son formadas a través de

procesos metabólicos normales, también por irradiación con luz UV, rayos X y gamma y están presentes como contaminantes en la atmósfera. Son prominentes intermediarios toxicológicos que pueden ejercer un ataque nucleofílico en cualquier grupo químico deficiente de electrones y están comúnmente involucrados en el estrés oxidativo **(Kehrer, 2000; Plant, 2003; Valko et al., 2006)**.

El término estrés oxidativo es definido como una alteración entre el equilibrio prooxidante-antioxidante; a favor del primero lo que provoca daño potencial. En los sistemas biológicos existen especies reactivas las cuales pueden derivar de varias fuentes *in vivo*, como la autoxidación, reacciones fotoquímicas y enzimáticas que pueden involucrar compuestos endógenos y a varios xenobióticos. Numerosas enzimas han mostrado ser capaces de generar EROs entre las cuales se encuentran el citocromo P450, varias oxidasas, peroxidasas, lipoxigenasas e hidrogenasas. Los xenobióticos pueden ser de particular importancia en determinar el grado de EROs generadas por estas enzimas. Al parecer la fuente más importante de EROs *in vivo* es la mitocondria, donde particularmente se originan el anión superóxido y peróxido de hidrógeno, los cuales junto con un metal de transición, como lo es el Cu, pueden participar en la reacción Haber-Weiss ( $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$ ) que combinada con la reacción Fenton ( $M^{n+} + H_2O_2 \rightarrow M^{(n+1)+} + OH^{\bullet} + OH^-$ , donde  $M^{n+}$  es un metal de transición) catalizan la formación de radicales hidroxilo:



Los radicales hidroxilo son los más poderosos oxidantes que surgen en los sistemas biológicos y son capaces de reaccionar prácticamente con todas las moléculas biológicas. Otros agentes reductores tales como ácido ascórbico o glutatión (GSH) también pueden llevar a cabo la reducción de  $Cu^{2+}$  a  $Cu^+$  **(Gaetke y Chow, 2003; Valko et al., 2006)**.

Por lo anterior, podría pensarse que estamos en constante riesgo de formar potentes oxidantes, sin embargo, los efectos dañinos de los EROs son balanceados por la acción de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y

antioxidantes como vitamina C, vitamina E, carotenoides y flavonoides **(Valko et al., 2006)**.

### **1.3. EROs y daño a moléculas biológicas**

La presencia de bases de ADN oxidadas es un marcador de EROs; más de cien productos han sido identificados de la oxidación del ADN. El daño inducido por los EROs al ADN incluyen rompimiento de cadena sencilla y doble, modificaciones de las bases púricas y pirimídicas y de la desoxirribosa. El daño al ADN puede resultar en arresto celular o inducción de transcripción, inducción de rutas de señalización de transducción, errores en la replicación e inestabilidad genómica, de lo cual todo es asociado con carcinogénesis **(Valko et al., 2006)**.

Los lípidos brindan estructura y características funcionales a la membrana celular, cualquier trastorno puede conducir a la muerte celular, el doble enlace entre ácidos grasos poliinsaturados son blanco para el ataque de radicales libres. La eliminación de un átomo de hidrógeno de uno de estos dobles enlaces puede ser mediada por radicales libres y formar una nueva especie de radical que puede interaccionar fácilmente con oxígeno molecular resultando radicales como peroxilos lipídicos que pueden eliminar un átomo de hidrógeno de otro ácido graso generando otro radical y un hidroperóxido lipídico, además estableciendo una reacción en cadena que puede afectar los canales iónicos, las proteínas de transporte de membrana o enzimas pueden ser inactivadas, la bicapa lipídica puede volverse más permeable afectando la homeostasis de iones y algunas especies pueden afectar rutas de señalización incluyendo las que regulan la apoptosis **(Kehrer, 2000)**.

La oxidación de proteínas por EROs puede generar productos estables y reactivos. Entre los productos reactivos se encuentran hidroperóxidos proteicos que pueden generar más radicales interaccionando con iones metálicos de transición. Tales especies pueden alterar las funciones de las proteínas pero, el daño no es significativo debido al gran número de cada tipo de proteína, las células cuentan con sistemas eficientes para prevenir la oxidación de proteínas a través de antioxidantes o simplemente destruyendo las

especies modificadas (ya que las proteínas oxidadas tienden a desnaturalizarse haciéndolas fácilmente reconocibles y susceptibles a la proteólisis). Aunque las proteínas oxidadas son funcionalmente inactivas y removidas, algunas pueden acumularse gradualmente y contribuir a daño asociado con el envejecimiento, diabetes, aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas. También pueden ayudar a regular la remodelación y el crecimiento celular **(Kehrer, 2000; Plant, 2003)**.

Los EROs también tienen un papel fisiológico en varios aspectos de señalización intracelular y regulación, interfieren con la expresión de ciertos genes y en rutas de señalización de transducción. De acuerdo a su concentración pueden causar una respuesta positiva como la proliferación celular o negativa como arresto o muerte celular **(Valko et al., 2006)**.

#### **1.4. Casiopeínas**

La actividad de los complejos de metales no solo depende de la presencia de algún metal en su estructura, sino también del estado de oxidación, comportamiento redox, número y tipo de ligandos con los que esté unido y su coordinación geométrica. Los ligandos pueden modificar la biodisponibilidad oral y sistémica de los iones del metal, ayudar en la selección de tejidos específicos o de enzimas, liberar, mantener o secuestrar un ion metálico dependiendo de los requerimiento para la terapia, pueden proteger a los tejidos de iones metálicos tóxicos, mejorar la absorción de iones metálicos beneficiosos, modificar la reactividad o la velocidad en la sustitución de ligandos **(Thompson y Orving, 2006; Chen et al., 2009)**.

Las Casiopeínas son una familia de compuestos quelatos<sup>1</sup> mixtos de Cu (II) que fueron sintetizados en la Facultad de Química (UNAM) por el grupo de trabajo de la Dra. Lena Ruiz buscando que poseyeran actividad antitumoral. La fórmula general de las Casiopeínas es  $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$  o  $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$ , donde N-N es un ligando diimina bidentado donador de nitrógeno que puede ser 1,10-fenantrolina o 2,2-bipiridina que presentan

---

<sup>1</sup> Los quelatos son complejos formados por un metal y por moléculas llamadas ligantes. El ligante tiene más de un lugar enlazante por lo que se dice es bidentado, tridentado, etc., tal ligante puede, por formación de un anillo, sujetar al metal entre sus dientes mediante dos o más ligares enlazantes, a este proceso se le llama quelación **(Morrison y Boyd, 1996)**.

relativamente una alta afinidad al cobre, N-O es glicina un  $\alpha$ -L-aminoácido que fue escogido como segundo ligando debido a su afinidad por el complejo cobre-fenantrolina y su baja toxicidad. Finalmente O-O pueden ser los ligandos acetilacetato o salicialdehído que también tienen buena afinidad al complejo y pueden modular la propiedad redox del centro metálico (**Bravo et al., 2002; Bravo et al., 2009**).

El diseño de las moléculas fue basado en tres principales factores: (1) los componentes deben contener un metal esencial para disminuir la toxicidad, (2) contener quelatos que favorezcan la configuración *cis* alrededor del ion metálico y (3) quelatos mixtos que presenten diferentes niveles hidrofóbicos. En el diseño de estos compuestos se pensó que la planaridad en la geometría de la molécula y el ligante diimina (con carácter hidrofóbico) le conferirían la posibilidad de actuar como intercalante a través de interacciones con las bases púricas y pirimídicas del ADN, además el ligante cargado le conferiría la polaridad necesaria para el transporte de la molécula. La naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el ligante diimina son responsables de la variación en la actividad biológica. El centro metálico puede participar en ciclos redox para liberar EROs que oxiden al ADN, asimismo el cobre puede o no intercambiar alguno de sus ligandos N-O u O-O para coordinarse directamente con los donadores por nitrógeno de las bases formando enlaces similares a los observados con el cisplatino, también podrían modular la distribución y transporte lo que le conferiría selectividad tumoral. Durante la década de 1980 se comprobó la actividad antitumoral de algunos compuestos de esta familia y posteriormente en 1992 fueron patentados (**Gracia et al., 2001; Bravo et al., 2002**).

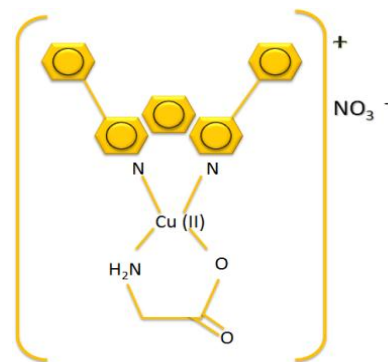
Ha sido mostrado que las Casiopeínas interactúan preferentemente con la base púrica adenina por apilamiento, porque probablemente tienen acción de intercalantes, el cual es mayor en los compuestos con fenantrolina y aminoácidos, que en los compuestos que poseen bipyridinas y acetilacetato o salicialdehído (**Tovar et al., 2002**).

Se ha determinado que el átomo de cobre en estos complejos siempre tiene una geometría plana cuadrada ligeramente distorsionada. Los dos ligandos diimina libres o como parte de un complejo metálico son capaces de unirse al ADN por intercalación y no-

intercalación, pero los complejos con fenantrolina resultan ser más activos (en líneas celulares HeLa<sup>2</sup>, SiHa<sup>3</sup>, MCF-7<sup>4</sup>, HCT-15<sup>5</sup> y en ratones machos ICR tratados con diferentes Casiopeínas) que sus análogos con bipyridina; tal vez el tercer anillo aromático (la única diferencia estructural entre los ligandos diiminas) puede incrementar la afinidad de unión al ADN. Otro factor que influye en la actividad es el efecto electrónico de los sustituyentes sobre fenantrolina y bipyridina, ya que influyen significativamente el potencial redox de Cu (II) /Cu (I), así mismo la reducción del centro metálico por agentes reductores celulares tales como NADH (ubiquinona oxidoreductasa), GSH (glutatión) y ascorbato es termodinámicamente factible y pueden catalizar la producción de OH<sup>•</sup>. La mayoría de los complejos de Casiopeínas son hidrofóbicos (incluyendo las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a), por lo que los ligandos actúan como un acarreador en el transporte celular de Cu (II) (**Bravo et al., 2009**).

#### 1.4.1. Casiopeína Igly

La Casiopeína Igly (**figura 5**) tiene la fórmula química [Acua (4,7-difenil-1,10 fenantrolina) (glicina) cobre (II) nitrato], con un peso molecular de 568.05 g/mol, es soluble en etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) o etanol/agua (en proporción 3:100), poco soluble en glicerol, tarda varios días en descomponerse, en estado sólido es estable. La concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) reportada para la línea celular CaLo<sup>6</sup> es 1.23 µg/ml (**Pérez, 2008; Uribe, 2010**).



**Figura 5.** Casiopeína Igly [Acua (4,7-difenil-1,10 fenantrolina) (glicina) cobre (II) nitrato] (**Uribe, 2010**).

<sup>2</sup> Línea celular de cáncer cervico uterino proveniente de pacientes con VPH18.

<sup>3</sup> Línea celular de cáncer cervico uterino proveniente de pacientes con HPV16.

<sup>4</sup> Línea celular de cáncer de mama humano.

<sup>5</sup> Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano.

<sup>6</sup> Línea celular de cáncer cervico uterino humano, estadio dos.



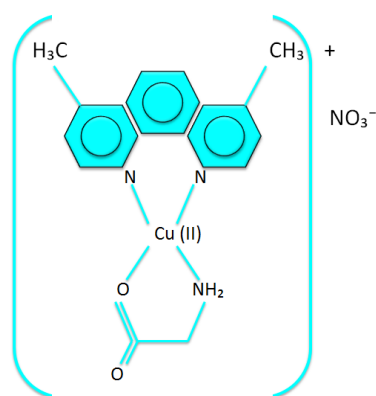
Ha sido reportado que la Casiopeína Igly disminuye la viabilidad de linfocitos humanos en G0 y células HeLa en presencia de ácido ascórbico. También induce la degradación de ADN, evaluado mediante electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa). Aunado a lo anterior, esta Casiopeína en presencia de ácido ascórbico es capaz de degradar ADN plasmídico. Se sugiere que esto puede deberse a la generación de EROs en sitios cercanos donde las Casiopeínas se intercalan con el ADN y la muerte celular resulta como consecuencia del daño genotóxico **(Alemón et al., 2007; Rivero et al., 2007)**.

Por otra parte, la Casiopeína Igly no ocasiona daño oxidativo a lípidos de membrana de linfocitos humanos y células HeLa por lo que aparentemente entra en las células sin ser disociada **(Alemón et al., 2007)**.

La Casiopeína Igly también induce el incremento de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN), yemas nucleares (YN), intercambio de cromátidas hermanas (ICHs), aberraciones cromosómicas estructurales, apoptosis y necrosis, disminuye el índice mitótico (IM) y la proliferación celular en linfocitos humanos en fases G1/S y G2/M, aunque el daño ocasionado por la Casiopeína Igly es mayor en G1/S **(Roldán y Gómez, 2008; Pérez, 2008; Uribe, 2010; Cruz, 2011b; Guevara, 2011)**.

#### 1.4.2. Casiopeína IIgly

La Casiopeína IIgly **(figura 6)** presenta la fórmula química [Acua (4,7-dimetil-1,10 fenatrolina) (glicina) cobre (II) nitrato], tiene un peso molecular de 425.89 g/mol, un pKa de 5.4. Es estable en estado sólido y una vez disuelta en agua tiene actividad biológica por 21 días en condiciones de oscuridad y refrigeración. Es soluble en agua, etanol y metanol, no puede ser administrada por vía oral ya que la Casiopeína se disocia al pH del estómago (pH=1) y no presentaría actividad farmacológica. La  $Cl_{50}$  reportada para la línea celular HeLa es de 0.33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  **(Cordero, 2010)**.



**Figura 6.** Casiopeína IIgly [Acua (4,7-dimetil-1,10 fenatrolina) (glicina) cobre(II) nitrato] **(Cordero, 2010)**.

**Arnaudeau y colaboradores (2000)** reportaron que la Casiopeína Igly tiene baja probabilidad de provocar inestabilidad genómica a través de recombinación homóloga en la línea celular de hámster chino SPD8<sup>7</sup> comparada con otras drogas usadas en quimioterapia tales como, cisplatino, inhibidores de topoisomerasa e inhibidores de síntesis de ADN. Esto es importante ya que la recombinación homóloga posiblemente está involucrada en la inducción de tumores secundarios.

Por otra parte, la Casiopeína Igly puede inhibir el estado 3 de la respiración (fosforilación oxidativa), y provoca el colapso del potencial de membrana en mitocondrias aisladas de hígado, riñón y hepatoma AS-30D<sup>8</sup> de ratas Wistar. Probablemente esta Casiopeína está relacionada con la apertura de canales de K<sup>+</sup> que provoca tumefacción mitocondrial, esto a su vez parece estar relacionado con la liberación del citocromo c. A diferencia de lo anterior, mitocondrias de corazón resultaron ser menos sensibles a la Casiopeína Igly **(Marín et al., 2003)**.

Ha sido mostrado que la Casiopeína Igly es capaz de inducir apoptosis y necrosis en líneas celulares CH1<sup>9</sup> y L1210<sup>10</sup> sensibles y resistentes al cisplatino, y ocasiona la activación de caspasas. Mientras que en células de meduloblastoma de la línea celular Daoy, disminuye el porcentaje de viabilidad celular y ocasiona la interrupción del potencial de membrana mitocondrial **(Vizcaya et al., 2000; Mejia y Ruiz, 2008)**.

Estudios que han mostrado el efecto antineoplásico de la Casiopeína Igly reportan que éste complejo puede disminuir la viabilidad, el potencial de membrana mitocondrial, inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis y muerte celular independiente de caspasas en células de glioma de rata. También puede inhibir la viabilidad celular e inducir apoptosis en células de adenocarcinoma colorrectal HCT-15. Aunado a lo anterior, la Casiopeína Igly presenta actividad antitumoral *in vivo* en ratones desnudos

---

<sup>7</sup> Línea celular originada de células pulmonares de hámster chino V79, exhibe una parcial duplicación del gen *hprt* (hipoxantina guanina fosforil transferasa) e incluye exones extra, expresando un fenotipo HPRT<sup>-</sup> que puede ser revertido por la pérdida de esos exones a través de recombinación ilegítima usando secuencias homologas.

<sup>8</sup> Línea celular de hepatoma de hígado de rata.

<sup>9</sup> Línea celular de carcinoma de ovario humano.

<sup>10</sup> Línea celular derivada de leucemia murina.

xenotransplantados con células HCT-15, HeLa y en ratas con glioma. No así en células PC-3<sup>11</sup> (Trejo *et al.*, 2005; Carvallo, 2007).

Por otra parte, la Casiopeína Ilgly mostró no ser citotóxica ni genotóxica (por inducción de micronúcleos en eritrocitos) en ratones machos y hembras de la cepa CD-1, bajo los tratamientos agudo y subcrónico, aunque en los fetos de hembras preñadas con tratamiento subcrónico si fueron observados los efectos genotóxico, citotóxico y teratogénico (malformaciones esqueléticas y defectos de nacimiento) (Santiago, 2004; Gonzales, 2004). A diferencia de lo anterior, Cermeño (2007) reporta que esta Casiopeína disminuye la viabilidad celular en sangre, corazón, hígado y bazo en la misma cepa de ratones tratados durante 12 horas y disminuye la viabilidad celular en testículo a las 24 horas. Asimismo, fue notable la migración de ADN en ensayo cometa, en células de sangre, corazón, hígado, bazo, riñón y células pequeñas testículo, en tratamientos de 3, 6, 12 y 24 horas, y en células grandes de testículo a partir de 6 hasta 24 horas.

Rivero y colaboradores (2007) reportaron que la Casiopeína Ilgly tiene la capacidad de unirse al ADN y degradarlo en presencia de ácido ascórbico u  $O_2^{\bullet-}$  por la formación de EROs (principalmente radicales  $OH^{\bullet}$ ). Puede que el ion  $O_2^{\bullet-}$  ocasione la oxidación del átomo de cobre a un estado  $Cu^{3+}$  (complejo oxo) y cuando se une al ADN en presencia de un agente reductor causa la transformación de la unión =O en  $OH^{\bullet}$ . Por lo que la Casiopeína Ilgly tiene potencial para reaccionar con moléculas biológicas y degradarlas por generación de EROs; tal reactividad parece ser el principal mecanismo de su citotoxicidad.

La Casiopeína Ilgly ha mostrado ser citotóxica disminuyendo la viabilidad de linfocitos humanos en G0 y células HeLa en presencia de ácido ascórbico (Alemón *et al.*, 2007). Un estudio posterior revela que la Casiopeína Ilgly más ácido ascórbico induce daño oxidativo en el citosol de células HeLa, pero en menor cantidad que el peróxido de hidrógeno, por lo que el daño oxidativo parece ser minimizado por las defensas antioxidantes naturales de las células. El efecto de la Casiopeína Ilgly puede estar restringido a otros compartimentos celulares tales como el núcleo y mitocondria. Aunado a lo anterior, la Casiopeína Ilgly con

---

<sup>11</sup> Línea celular de adenocarcinoma humano de próstata, grado cuatro.

o sin ácido ascórbico disminuye la proliferación celular, que es restaurada en mayoría, con la adición de DMSO<sup>12</sup>, por lo tanto los autores sugieren que la citotoxicidad ocurre por un mecanismo relacionado a la generación de EROs, principalmente radicales hidroxilo **(Alemón et al., 2008)**.

Se mostró que la Casiopeína IIgly puede catalizar una reacción tipo Fenton (evaluada con resonancia paramagnética electrónica) en las líneas celulares A549<sup>13</sup> y H157<sup>14</sup>, posiblemente GHS es una fuente de electrones para que se catalice esta reacción. También se detectó que induce la formación de EROs en mitocondria y ocasiona la despolarización de la membrana mitocondrial. En mitocondrias aisladas disminuye los niveles de proteínas del complejo I de transporte electrónico mitocondrial (estas proteínas están codificadas en el ADN mitocondrial junto con las del complejo III, IV y V, mientras las del complejo II son codificadas por el ADN nuclear) lo que ocasiona un desequilibrio en la expresión de proteínas y sobreproducción de EROs. Por tanto, la disrupción de la cadena respiratoria puede ser debida al daño ocasionado por esta Casiopeína al ADN mitocondrial **(Kachadourian et al., 2010)**.

Evaluaciones realizadas en linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly han mostrado disminución de la viabilidad celular y rompimiento de cadena sencilla o doble de ADN en ensayo cometa, inducción de MN, PN y YN en fases G1/S y G2/M, aberraciones estructurales de tipo cromatídico, lo que indica que la Casiopeína IIgly es S dependiente, además provoca ICHs, apoptosis, necrosis y disminución del IM **(Florín, 2005; Atilano, 2007; Guevara, 2008; Cordero, 2010; Guevara, 2011)**.

---

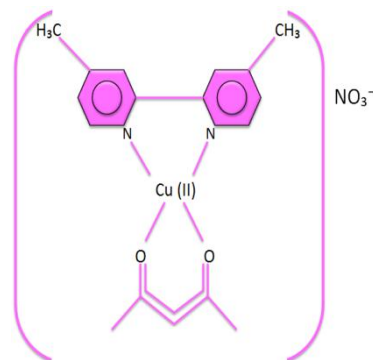
<sup>12</sup> El dimetilsulfóxido reacciona con los radicales hidroxilos, es citotóxico pero en concentraciones pequeñas no es letal.

<sup>13</sup> Línea celular de adenocarcinoma humano de epitelio alveolar basal.

<sup>14</sup> Línea celular de cáncer de pulmón humano de tipo carcinoma escamoso.

### 1.4.3. Casiopeína III-I-a

La Casiopeína III-I-a (**figura 7**) presenta la fórmula química [(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetionato) cobre (II) nitrato], tiene un peso molecular de 444.93 g/mol. Es soluble en agua, etanol y metanol, es estable en solución acuosa por siete días. En medios ácidos ( $\text{pH} \leq 5$ ) se protona y disocian los ligantes por lo que no puede ser administrada por vía oral. Tiene un  $\text{pKa}$  de 8.25. La  $\text{CI}_{50}$  reportada para las líneas celulares HeLa y CaLo es de 16.84  $\mu\text{g/ml}$  (**Carvallo, 2007; Cancino, 2008**).



**Figura 7.** Casiopeína III-I-a [(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetionato) cobre(II) nitrato] (**Carvallo, 2007**).

**Arnaudeau y colaboradores (2000)** reportaron al igual que para la Casiopeína IIgly, que la Casiopeína III-I-a tiene un índice de recombinación bajo al compararlo con los de otros quimioterapéuticos. Lo que indica menor probabilidad de que induzcan inestabilidad genómica a través de recombinación homóloga.

Ha sido mostrado que la Casiopeína III-I-a puede interactuar directamente con mitocondrias de hígado de ratas Wistar, inhibir la fosforilación oxidativa y provocar el colapso del potencial de membrana, aunque resulta menos activa que la Casiopeína IIgly (**Marín et al., 2003**).

Se ha reportado que las líneas celulares HeLa, MCF-7 y SK-LU-1<sup>15</sup> cuando son tratadas con la Casiopeína III-I-a muestran sufrir apoptosis, detectada por ensayo de TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-Nick End Labeling), y el incremento de proteínas involucradas en el mismo tipo de muerte celular, tales como Bcl2, Bax, y caspasa 3. También ocasiona la disminución de la expresión del antígeno Ki-67 (que se expresa en células que entran en el ciclo celular), por lo que resulta antiproliferativa. En células de meduloblastoma de la línea celular Daoy, la Casiopeína III-I-

<sup>15</sup> Línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano, grado tres.

a es capaz de disminuir la viabilidad celular, inducir cambios morfológicos compatibles con apoptosis y reducir el potencial de membrana mitocondrial. La Casiopeína III-I-a también muestra ser más activa que el cisplatino en las líneas celulares mencionadas (**Barron, 2006; Mejia y Ruiz 2008**).

En un estudio realizado en células de carcinoma de colon HCT-15 tratadas con Casiopeína III-I-a, fue notada la disminución de la viabilidad celular e inducción de apoptosis por aumento en los niveles de Bax, además ocasionó la fragmentación oligonucleosomal de ADN, lo que indica un mecanismo dependiente de caspasas. Por otra parte, la Casiopeína III-I-a mostró tener actividad antitumoral en células HCT-15 xenotrasplantadas a ratón desnudo a través de la inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis. Los autores sugieren que la Casiopeína III-I-a es un buen candidato para la terapia del cáncer con fenotipos resistentes, ya que las células HCT-15 tienen p53 alterado. Además, parecida a la Casiopeína IIgly, mostró poseer actividad antitumoral en células HeLa, pero no en células PC-3 (**Carvalho, 2007; Carvalho et al., 2008**).

**Cermeño (2007)** reportó la disminución de la viabilidad celular en bazo, desde las 12 horas de tratamiento, y en testículo a las 24 horas, en ratones CD-1 tratados con Casiopeína III-I-a. Además indujo daño al ADN, evaluado con ensayo cometa, en células de sangre, corazón, hígado, riñón y células pequeñas de testículo a las 3, 6, 12 y 24 horas de exposición; en células de bazo y células grandes de testículo a las 12 y 24 horas.

**Rivero y colaboradores (2007)** demuestran que la Casiopeína III-I-a causa la degradación de ADN plasmídico en presencia de ácido ascórbico.

Ha sido mostrado que la Casiopeína III-I-a en linfocitos humanos provoca ICHs, asociaciones de satélite, además en las fases G1/S y G2/M induce MN, PN, YN y aberraciones cromosómicas estructurales de tipo cromatídico y cromosómico, el daño genotóxico resulta ser menor durante G1/S. Las aberraciones estructurales cromatídicas son más frecuentes que las cromosómicas en ambas fases, por lo que es sugerido que la Casiopeína III-I-a presenta un efecto clastógeno S dependiente, además ocasiona

disminución del IM e inducción de apoptosis y necrosis (**Cancino, 2008; Sánchez, 2010; Tello, 2011; Guevara, 2011**).

### **1.5. Núcleo celular**

El núcleo celular es un compartimiento el cual contiene casi todo el ADN de una célula eucariota. Está delimitado por una envoltura nuclear formada por dos membranas concéntricas que están perforadas a intervalos por complejos de poro nuclear. A pesar de que la membrana nuclear interna y externa son un continuo presentan una composición proteica diferente. La membrana nuclear interna contiene proteínas que actúan como lugares de unión específicos de la cromatina y de la red proteica de la lámina nuclear. La membrana nuclear interna está rodeada por la membrana nuclear externa, la cual está tapizada por ribosomas que realizan la síntesis de proteínas y es continua con la membrana del retículo endoplásmico (**Alberts et al., 2003**).

Los complejos de poro nuclear están formados por más de 50 proteínas diferentes llamadas nucleoporinas y cada complejo de poro presenta uno o más canales acuosos abiertos a través de los cuales pueden difundir pasivamente las moléculas pequeñas solubles en agua (**Alberts et al., 2003**).

La lámina nuclear es una red de subunidades proteicas interconectadas denominadas láminas nucleares. Las láminas son un tipo especial de filamentos intermedios (10nm) que polimerizan formando una red bidimensional. Da forma y estabilidad a la envoltura nuclear a la cual se ancla por la unión de los poros nucleares y proteínas integrales de la membrana nuclear interna, también interacciona directamente con la cromatina. En la mayoría de las células de mamíferos, la lámina nuclear está compuesta por las láminas A, B y C (**Hozak et al., 1995; Alberts et al., 2003**).

Irregularidades en la morfología nuclear pueden estar asociadas con aberraciones cromosómicas. El estudio del daño al ADN a nivel cromosómico es una parte esencial de la toxicología genética, porque las alteraciones en los cromosomas son eventos importantes en la carcinogénesis. El recuento de estructuras nucleares anormales como son los

micronúcleos (MN) permite evaluar la inducción de daño cromosómico (Fenech, 2000; Gisselsson *et al.*, 2001).

### 1.6. Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis (MNBC)

Los MN solo son expresados en células que terminan la división nuclear, por lo que el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC) permite identificar a células que han completado la mitosis, por su apariencia binucleada (BN) (figura 8), por la adición de citocalasina B (Cit-B), la cual inhibe la polimerización de actina, hecho que a su vez impide la citocinesis (Fenech, 2000).

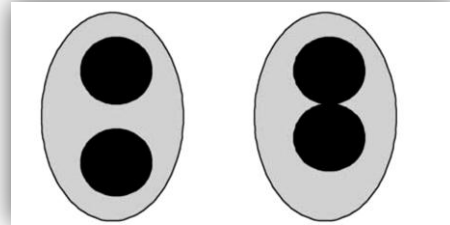


Figura 8. Células binucleadas (Fenech, 2000).

La actina es una proteína citoesquelética la cual polimeriza para formar filamentos. Los filamentos de actina proporcionan soporte mecánico, determinan la forma celular, permiten el movimiento de la superficie celular (esto posibilita a las células a migrar, engullir partículas y dividirse). Tras la mitosis, un anillo contráctil, formado por filamentos de actina y de miosina II, se ensambla debajo de la membrana plasmática, al contraerse tira progresivamente de la membrana plasmática hacia adentro, estrangulando la célula por el centro y dividiéndola en dos (los filamentos de actina se desensamblan a medida que avanza la contracción) (Cooper y Housman, 2002).

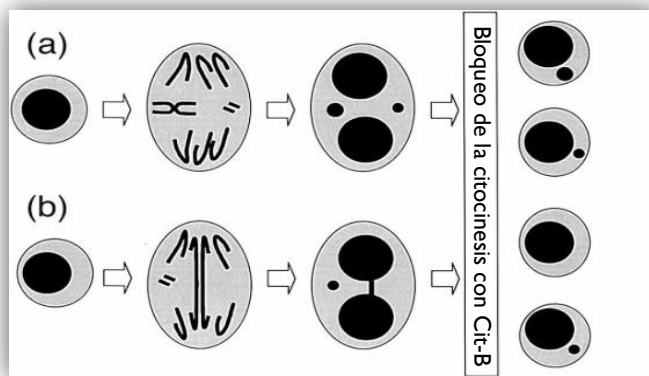
#### 1.6.1. Micronúcleos

Los MN principalmente son originados por fragmentos cromosómicos o cromatídicos acéntricos (carentes de centrómero) y/o cromosomas enteros que son incapaces de viajar hacia los polos de la célula en anafase, en telofase cuando se vuelve a formar la envoltura nuclear. Estos rezagos anafásicos son atrapados por la envoltura nuclear y gradualmente asumen la morfología de un núcleo interfásico, con la excepción que son más pequeños que el núcleo principal (figura 9) (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2003; Fenech *et al.*, 2011).



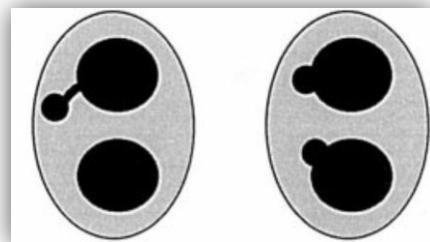
### 1.6.2. Puentes nucleoplásmicos

Los puentes nucleoplásmicos (PN) también pueden ser medidos en el ensayo de MNBC, estos son originados durante anafase cuando los centrómeros de cromosomas dicéntricos son jalados hacia polos opuestos de las células. Si no ocurre la ruptura del puente anafásico, la membrana nuclear rodea los núcleos hijos y el puente, de esta manera son formados los PN. El bloqueo de la citocinesis permite la acumulación de los PN ya que de lo contrario estos serían fraccionados (**figura 9b**). Los cromosomas dicéntricos son formados por reparaciones defectuosas de cromosomas rotos, por ruptura o fusión de telómeros, esto último es causado por el ensamble inapropiado de la proteína telosoma (**Fenech *et al.*, 2011**), la cual protege al telómero de sufrir acortamiento excesivo o lesiones en las secuencias teloméricas (**Fenech *et al.*, 2003; Fenech, 2006**).



**Figura 9.** Formación de MN y PN. (a) Origen de MN de retrasos de un cromosoma entero y fragmentos acéntricos en anafase. (b) Generación de PN de un cromosoma dicéntrico en el cual los centrómeros son jalados hacia los polos opuestos de la célula, también es ilustrada la formación de un MN (**Fenech, 2000**).

**Figura 10.** YN en células binucleadas (**Fenech *et al.*, 2003**).



### 1.6.3. Yemas nucleares

Las yemas nucleares (YN) han sido validadas como biomarcadores de inestabilidad genómica en el ensayo de MNBC en cultivo de linfocitos humanos **(Fenech y Crott, 2002)**. Son caracterizadas por poseer la misma morfología que un MN con la excepción de que presentan una conexión nucleoplásmica, ya sea amplia o angosta, con el núcleo principal **(figura 10)**. Ha sido reportado que las YN pueden contener amplificaciones de ADN, fragmentos cromosómicos y cromosomas completos, además puede existir relación en el origen de MN, PN y YN **(Fenech et al., 2003; Lindberg et al., 2007; Fenech et al., 2011; Shimizu, 2011)**.

Las dobles minutas (DMs) son pequeñas estructuras de cromatina extracromosomal en pareja, carecen de centrómeros y telómeros por lo que son moléculas de ADN circulares, generalmente se encuentran en células transformadas y malignas. Se ha observado que contienen múltiples copias de algún oncogén en diferentes tipos de cáncer **(Miller y Therman, 2001)**. Las células humanas COLO320DM<sup>16</sup> contienen DMs con amplificaciones del gen *c-myc*, en fase G1 las DMs son localizadas preferentemente en la periferia nuclear, además estas células presentan YN y MN, con gran frecuencia, que contienen DMs. De acuerdo con la cinética de formación de YN y MN en estas células, ambas estructuras incrementan de forma paralela al iniciar fase S y disminuyen al finalizar la misma, por lo que es posible que las DMs en la periferia originen YN y estas a su vez formen MN que serán liberados de la célula en fase S **(figura 11) (Itoh y Shimizu, 1998; Shimizu et al., 1998)**, ya que se han encontrado MN extracelulares con tres membranas y amplificaciones del gen *c-myc* **(Shimizu et al., 1998; Shimizu et al., 2000)**. Fue estimado que al menos cincuenta por ciento de los MN formados en cada ciclo celular de esta línea son producidos en la fase S. Además es posible que p53 esté relacionado en la formación de YN y MN porque la inactivación de p53 en fibroblastos humanos incrementa la frecuencia de YN y MN en fase S. Por otra parte, debido a que las células apoptóticas pueden generar anomalías nucleares parecidas a YN y MN, fue descartado por ensayo de TUNEL que

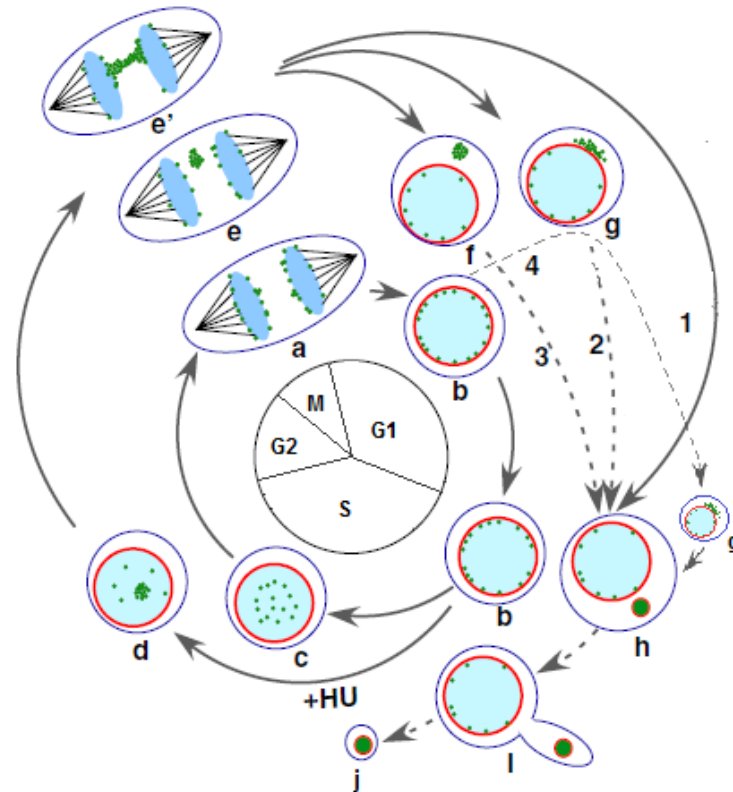
---

<sup>16</sup> Línea celular humana derivada de carcinoma de colon compuesto de células neuroendocrinas.

las YN, MN en citoplasma y MN expulsados de la célula fueran consecuencia de eventos apoptóticos (**Shimizu et al., 1998**).

**Tanaka y Shimizu (2000)** identificaron YN y MN en células COLO320DM, que contenían DMs, asociados y no asociados a la proteína lámina B en fase S, la frecuencia de YN y MN sin asociación a la proteína lámina B era mayor en los límites G1/S, pero disminuían mientras transcurría la fase S e incrementaban YN y MN asociados a esta proteína de la lámina nuclear, al terminar la fase S decreció la frecuencia de ambas estructuras. Por otra parte, las DMs en mitosis pueden agregarse a los extremos de cromosomas normales para segregarse de manera estable a las células hijas. Se observó en células tratadas con bajas concentraciones de hidroximetilurea que las DMs tienden a agregarse y separarse de los cromosomas (posiblemente porque sufren rompimiento de doble cadena) y forman puentes entre dos cromosomas hermanos en anafase. Si los puentes sufren una ruptura posiblemente son formadas YN o si sufren dos o más rupturas son generados MN, que en su mayoría no tiene asociación con la proteína lámina B (**figura 11**) (**Tanaka y Shimizu, 2000; Shimizu, 2011**). Estas estructuras pueden carecer de la proteína lámina B por que la cantidad no es suficiente y son capturadas hasta fase S, donde ha sido reportado que es sintetizada y antes de comenzar fase S es reorganizada. Además se notó la incorporación de BrdU solo en YN y MN que presentaban proteína lámina B. Lo cual es debido a que esta proteína puede permitir la replicación del ADN, ya que está vinculada espacialmente con los sitios de replicación. Otra posibilidad para que las DMs formen YN y MN al final de la mitosis sin asociación a la proteína lámina B, es porque están dañadas y no son rodeadas por las láminas nucleares (A, B y C) hasta que son reparadas en fase S (**Tanaka y Shimizu, 2000**).

Posiblemente las DMs son incorporadas en YN que formaran MN por su inapropiada localización nuclear, como el cromosoma X inactivo que se replica en la periferia y es a menudo encerrado en un MN. Otra explicación puede ser que proteínas dirijan a las DMs a la periferia nuclear y formar una yema nuclear hasta que la fusión de membranas produzca un MN (**Shimizu et al., 1998**).



**Figura 11.** Comportamiento intracelular de las DMs (puntos verdes) y generación de YN y MN. Las DMs se adhieren a los brazos cromosómicos en mitosis (a), después en G1 se localizan en la periferia nuclear (b), posteriormente en fase S son relocalizadas al interior del núcleo (c). Con bajas concentraciones de hidroxurea (HU) tienden a agregarse y separarse de los cromosomas (d), los agregados de DMs pueden formar micronúcleos, si quedan como retrasos en anafase (e) o puentes, si estos agregados también se adhieren a cromosomas (e'). Los restos de rupturas de puentes en anafase pueden originar YN o MN sin asociación a la proteína lámina B (línea roja) (f y g), aunque algunos retrasos anafásicos pueden ser rodeados por la proteína lámina B (1). En fase S las DMs son expulsadas del núcleo por gemación de la envoltura nuclear, originando YN que posteriormente se convertirán en MN, bajo condiciones que inducen daño al ADN (4). En fase S YN y MN con DMs son rodeadas por la proteína lámina B (2 y 3). Los micronúcleos son expulsados de la célula por la gemación de la membrana citoplasmática (i-j) (modificado de Shimizu, 2011).

En células de mamíferos expuestas a agentes que causan daño al ADN (radiación ionizante, etoposidos y colcemida), la proteína Rad51<sup>17</sup> puede encontrarse en el núcleo celular. Las señales para Rad51 son agrupadas y después localizadas en la periferia nuclear, donde por gemación son encerradas en MN. Tiempo después del tratamiento Rad51 solo es detectada en MN y la mayoría de estos muestra fragmentación del genoma típico de apoptosis,

<sup>17</sup> Rad51 media la reparación de rompimiento de doble cadena de ADN por recombinación homóloga.

revelado por la prueba de FISEL (fluorescence *in situ* end labeling). Se propone que Rad51 puede participar activa o pasivamente detectando y removiendo ADN no reparado, seguido por su degradación dentro de MN. Aunque las células tratadas con colcemida probablemente tienen bajos niveles de rompimiento, las señales de Rad51 pueden estar en ADN no replicado con una o muy pocas rupturas, y si el ADN no es reparado entonces el cromosoma o fragmento cromosómico es expulsado del núcleo; no obstante, también es posible que Rad51 solo sea un pasajero pasivo. En algunas células puede detectarse, junto con Rad51, a la proteína de replicación A en YN y MN. La proteína de la replicación A puede facilitar el apareamiento homólogo e intercambio de cadena de ADN mediado por Rad51 (**Haaf et al., 1999**).

En fibroblastos humanos de pacientes con síndrome de Bloom, ocurre la gemación de MN en fase S, los cuales contienen a la proteína de replicación A e incorporación de BrdU. *BML* es el gen mutado de este síndrome que codifica para una ADN helicasa (BLM), ha sido propuesto que esta ADN helicasa puede actuar deteniendo la horquilla de replicación después de daño al ADN, por tanto en células con síndrome de Bloom hay una alta frecuencia de eventos replicativos aberrantes. La expulsión de cromatina replicada por gemación demuestra que eventos de replicación en células con síndrome de Bloom fallan en alta frecuencia (**Yankiwski et al., 2000**).

Se ha reportado que en linfocitos humanos tratados con colcemida y mitomicina C, linfocitos de fumadores y linfocitos de cerdos infectados con *Taenia solium* (cisticerco), es notable el incremento en la frecuencia, de manera similar de YN y MN y la correlación positiva de estos. Se sugiere que posiblemente, YN y MN son creados por un mecanismo semejante. En tratamientos con colcemida (agente aneugénico) puede que cromosomas individuales retrasados en el proceso de llegar a núcleo nuevo en anafase, sean descondensados y la envoltura nuclear los rodee antes de integrarse completamente en telofase, formando así un compartimiento parcialmente separado que es observado como una YN. Esto también podría ocurrir en cromosomas multicéntricos o multirradiales, resultado de rompimientos y rearrreglos causados por clastógenos tales como la mitomicina C. Otra posibilidad sugerida es que las YN pueden corresponder a la ruptura de puentes

cromatínicos o rearrreglos que impiden la correcta organización de la cromatina en el núcleo interfásico **(Serrano y Montero, 2001)**.

Se ha mostrado que las YN en células malignas son transcripcionalmente activas, éstas presentan incorporación de anticuerpos específicos para la elongación de la polimerasa II, también UTP (uridina 5'trifosfato), el cual se incorpora en ARNm recientemente sintetizado *in situ*, y además poseen complejo de poro nuclear **(Hoffelder et al., 2004)**.

Los folatos son importantes micronutrientes, son requeridos para la síntesis de dTMP (timidilato) desde dUMP (uridilato), en deficiencia de folatos dUMP es acumulado y como resultado en lugar de timina es incorporado uracilo en el ADN. Cuando es excesiva la incorporación provoca mutaciones puntuales, ruptura de cadena sencilla y doble de ADN, rompimiento de cromosomas y MN. Los folatos también son requeridos para la síntesis de S-adenosilmetionina, el cual es un donador de metilos requeridos para la mantención de los patrones de metilación del ADN, su deficiencia puede estar relacionada con aneuploidias debidas a la desmetilación de heterocromatina causando defectos estructurales en centrómeros, induciendo así la anormal distribución de cromosomas durante la división nuclear **(Wang et al., 2004; Lehninger et al., 2009)**. En linfocitos humanos tratados con limitadas concentraciones de ácido fólico fue probado que existe correlación positiva entre MN, PN y YN, por lo que también es propuesto que puede haber un mecanismo común de formación iniciado por la falta de folatos **(Fenech y Crott, 2002; Fenech, 2006)**.

El modelo ciclo Rompimiento-Fusión-Puente (RFP) **(figura 12)** descrito por Barbara McClintock en 1942, fue propuesto para tratar de explicar la generación de PN, YN y MN en linfocitos humanos deficientes de ácido fólico. El ciclo RFP postula que cromátidas hermanas que han sufrido rompimiento de doble cadena se fusionan en la posición distal, formando un cromosoma dicéntrico con dos copias homólogas de genes entre los centrómeros, durante anafase este cromosoma es jalado hacia los polos opuestos de la célula formando un puente, en la citocinesis, si el cromosoma es roto de manera asimétrica se origina un cromosoma con dos copias de uno o más genes y un cromosoma sin esos

genes. Las cromátidas con múltiples copias de genes pueden fusionarse de nuevo en la interfase y formar un cromosoma dicéntrico, volviendo a ocurrir el ciclo RFP y además originar amplificaciones génicas. El ADN amplificado puede ser eliminado a través de la recombinación entre regiones homólogas con secuencias amplificadas, formando minicírculos de ADN acéntrico y atelomérico (DMs), que pueden ser expulsadas después de su segregación a la periferia del núcleo por gemación en fase S y formar MN (**figura 12**), por tanto, tal vez el núcleo tiene la capacidad de detectar exceso de ADN que no se ajustan en la matriz nuclear indicando un mayor orden de reparación del ADN. La unión de las YN con el núcleo, amplía o angosta, depende de la fase del proceso de gemación (**Fenech y Crott, 2002; Fenech, 2006**).

El ciclo RFP ha sido validado como mecanismo para la amplificación de genes en células de hámster chino, donde tratamientos de cofomicina, metotrexato y actinomicina D indujeron amplificaciones de los genes de adenilato desaminasa, dihidrofolato reductasa y el gen 1 de resistencia a multidroga respectivamente. En células de fibrosarcoma humano el N-fosfonacetil-L-aspartato indujo amplificación del gen CAD (**Fenech y Crott, 2002; Fenech, 2006**).

Con la técnica de FISH se han detectado centrómeros y telómeros en YN y MN de linfocitos humanos binucleados, tratados con diferentes concentraciones de ácido fólico y 5-metiltetrahydrofolato. La mayoría de las YN en linfocitos humanos, tanto privados como en concentraciones normales de folatos contienen fragmentos terminales<sup>18</sup> cromatídicos o cromosómicos y fragmento intersticiales<sup>19</sup>. Los MN contienen mayor porcentaje de fragmentos terminales que las YN pero, un bajo porcentaje de fragmentos intersticiales. Tanto MN como YN también presentan cromosomas<sup>20</sup>, pero estos preferencialmente se encuentran en MN. Los fragmentos céntricos<sup>21</sup> son escasos tanto en YN como en MN. Se sugiere que los fragmentos intersticiales podrían alternativamente ser DMs, productos de

---

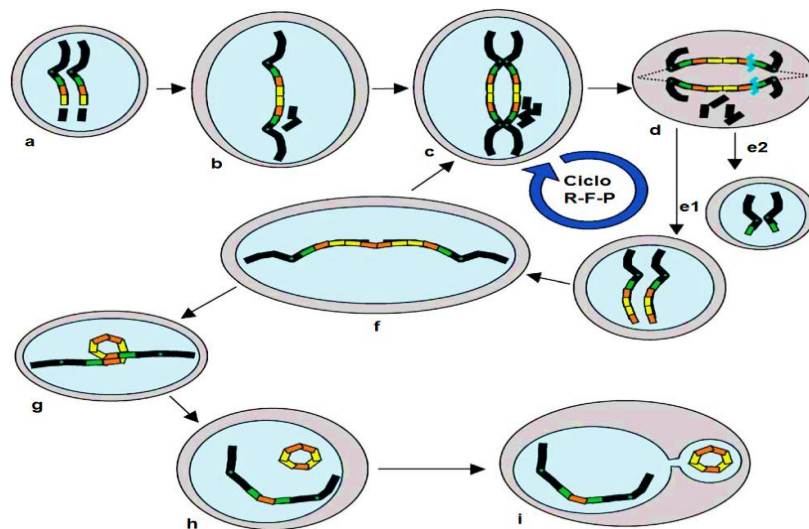
<sup>18</sup> Solo con señales para telómeros, si contienen una señal son considerados cromatídicos y con dos señales son fragmentos cromosómicos.

<sup>19</sup> Sin señales para telómero y centrómero.

<sup>20</sup> Con señales para telómero y centrómero.

<sup>21</sup> Solo con señal para centrómero

replicaciones fallidas y también pueden representar restos de puentes rotos en anafase (**figura 14**) o cromosomas en bucles. La presencia de señales para telómeros puede deberse a fragmentos cromatídicos terminales, ADN terminal no replicado, excesos de ADN que contienen secuencias teloméricas o al rompimiento de puentes cerca del sitio de fusión de telómeros. Con respecto a las YN con señales de telómero y centrómero tal vez la presencia de un cromosoma extra pueda causar distorsión del núcleo para ser expulsado por gemación. Las señales para centrómeros pueden representar fragmentos intersticiales céntricos, cromosomas céntricos en anillo o elementos cromosómicos replicados incompletamente, carentes de telómeros (**Lindberg *et al.*, 2007**).

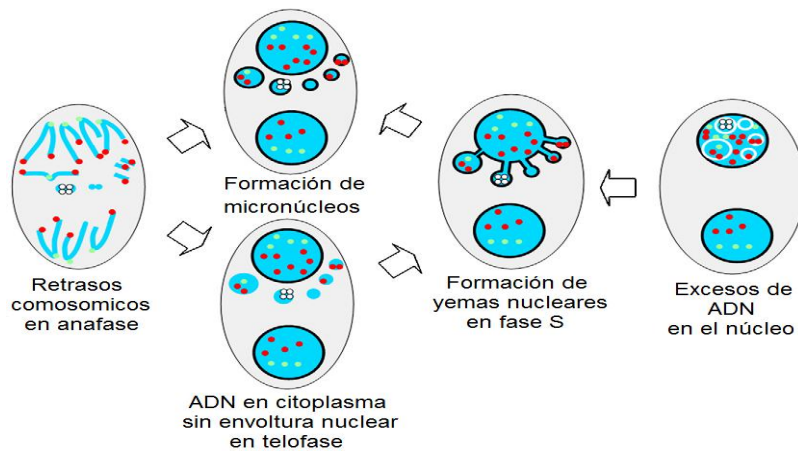


**Figura 12.** Ciclo R-F-P (Rompimiento-Fusión-Puente). Rompimiento de cromátidas hermanas (a), fusión de cadenas y formación de un cromosoma dicéntrico (b). El cromosoma dicéntrico es replicado en fase S (c) y forma un puente en anafase (d). El puente es roto en una región no central y una célula hija recibe cromosomas que contienen dos copias de uno o más genes iguales (e1), la otra célula hija pierde estos genes (e2). Los cromosomas con múltiples copias de genes pueden fusionarse de nuevo (f) y volver a replicarse (volver a paso c), o puede haber recombinación de secuencia homóloga (g) y ser separadas formando un fragmento acéntrico de ADN o doble minuta (h). Es formada una YN para la expulsión de la doble minuta (i) (**Fenech y Crott, 2002; Fenech, 2006**).

La presencia de cromosomas completos en YN indica que no pueden contener exclusivamente DMs, ni que los rompimientos de puentes en anafase son la única fuente de YN. Por lo que es propuesto un modelo que combina diferentes hipótesis para la generación de YN (**figura 13**), en el cual se plantea que cualquier resto de ADN retrasado en



anafase es encapsulado por la membrana nuclear y así generar MN en telofase o posteriormente en fase S los restos de ADN retrasado son encapsulados por la membrana nuclear para formar YN, que a su vez serán desprendidas del núcleo. También los excesos de ADN en general, pueden ser expulsados del núcleo por gemación y la subsecuente formación de MN. La diferencia entre el contenido de YN y MN puede reflejar la capacidad desigual para que sean atrapados por la envoltura nuclear en telofase o expulsados del núcleo por gemación (Lindberg *et al.*, 2007).



**Figura 13.** Formación de YN; Varios tipos de retrasos cromosómicos son formados en anafase. Los puntos verdes indican ADN centromérico, los puntos rojos ADN telomérico, los puntos blancos DMs u otros excesos de ADN y la ausencia de puntos fragmentos intersticiales, la envoltura nuclear se muestra como una línea negra. En telofase estos retrasos cromosómicos son considerados la principal fuente de MN, si no son encerrados por la envoltura nuclear en telofase ellos pueden ser atrapados por la proteína lámina B en fase S formando YN que pueden dar origen a MN. Los excesos de ADN (delineados por un círculo blanco) en un núcleo pueden formar YN que posteriormente originarán MN, en selectas condiciones de crecimiento (Lindberg *et al.*, 2007).

Trifluralina es un herbicida que presenta radicales  $\text{NO}_2$ , los cuales se unen a la tubulina evitando su polimerización y la subsecuente formación de microtúbulos y uso mitótico. En células de raíz de *Allium cepa* expuestas a trifluralina fueron observados núcleos irregulares, YN, MN y mini células que parecen ser causados por la poliploidización del material genético. Se sugiere por **Fernandes y colaboradores (2007)** que las alteraciones nucleares posiblemente muestran una secuencia de eventos para la expulsión de material genético en exceso, donde los núcleos con poliploidías forman núcleos irregulares en los que posteriormente se originaran YN, que se convertirán en MN para ser

totalmente liberados como mini células (constituídas con porciones pequeñas citoplasmáticas y contenido nuclear reducido). También se observó en algunas células que los MN y el núcleo principal carecían de sincronía, ya que los MN presentaban el material genético altamente compacto, por tanto los cromosomas perdidos no pueden ser reintegrados al genoma nuclear.

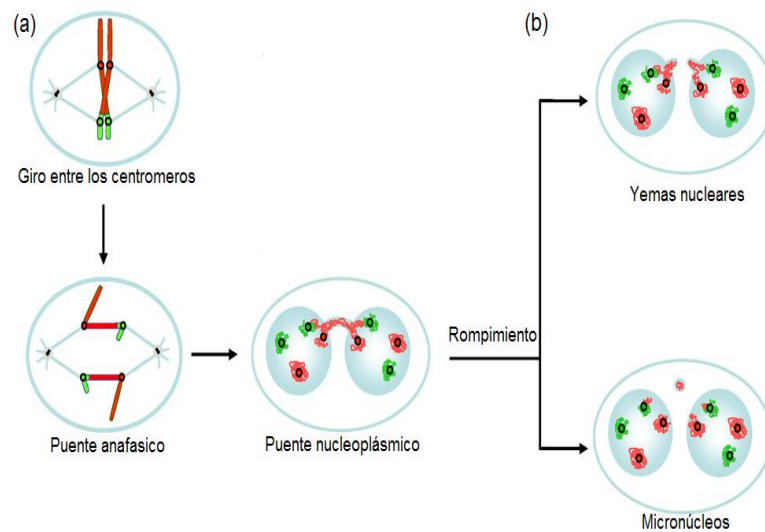
**Fernandes y colaboradores (2007)** proponen que el exceso de material genético (parcial o total) puede ser sometido a cierto grado de inactivación transformándolo en heterocromatina facultativa. La heterocromatina presenta la afinidad de fijar proteínas a la envoltura nuclear, por lo que este tipo de heterocromatina facultativa puede favorecer su migración hacia la periferia nuclear hasta que es expulsada del núcleo. La formación de mini células puede representar un evento que asegura la viabilidad celular, ya que la presencia de MN en la célula puede dañar su fisiología causando la muerte celular.

Las células epiteliales mamarias humanas pierden la actividad telomerasa y cuando se dividen en cultivo se observa la erosión de telómeros. Ha sido mostrado que los brazos cromosómicos 1q y 22p presentan pérdida de telómeros, además estos brazos cromosómicos se fusionan ocasionando la unión de dos cromosomas diferentes. También se ha observado, con microscopía confocal de lapso de tiempo (time-lapse microscopy), el destino de puentes anafásicos hasta el final de la división celular. Más de la mitad de los puentes son rotos y originan YN, de las cuales la mitad son incorporadas totalmente al núcleo principal, y en pocos casos son formados MN (**Pampalona et al., 2010**).

Los cromosomas 1 y 22 prevalecen en anormalidades morfológicas nucleares (AMN; PN, YN y MN), sobre otros cromosomas, pero hay preferencia en la formación de PN y YN, además el cromosoma 1 se encuentra en mayor frecuencia involucrado con las AMN que el cromosoma 22. Sin embargo, estas diferencias pueden ser explicadas considerando la morfología de los cromosomas, la fusión de los brazos largos del cromosoma 1 y los cortos del cromosoma 22, ocasiona un cromosoma dicéntrico con una larga región intercentromérica que consiste principalmente de los brazos del cromosoma 1, después de un giro entre los centrómeros se forma un puente que puede romperse en cualquier parte

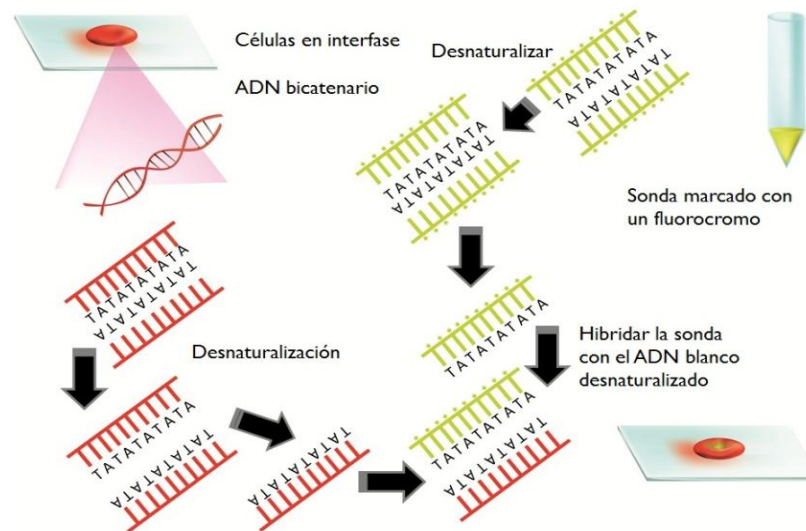
y formar YN (principalmente) y MN (**figura 14**). La variabilidad entre la formación de YN y MN es debida a que preferencialmente ocurrió solo una ruptura en los puentes anafásicos (**Pampalona *et al.*, 2010**).

Por otra parte, células HeLa tratadas con hidroxiaurea fueron observadas vivas por microscopía confocal de lapso de tiempo. Fue detectado que la ruptura de puentes cromatínicos originó YN y MN, además se observó la formación de YN al final de mitosis en ausencia de puentes y aparición de YN mucho tiempo después de terminar mitosis por un brote en los núcleos. En muy baja frecuencia las YN fueron convertidas a MN en interfase. Las YN generadas de rupturas de puentes cromatínicos y MN formados de retrasos cromatídicos son rodeados por lámina B y su nivel de condensación es parecida a la del núcleo, a diferencia de los MN derivados de rupturas de puentes ya que no presentan lámina B y la cromatina que contienen está más condensada que la del núcleo principal. Los autores sugieren que posiblemente las estructuras con lámina B y cromatina poco condensada pueden ser activas en replicación a diferencia de las estructuras sin estas características (**Utani *et al.*, 2010**).



**Figura 14.** Formación de YN y MN de la ruptura de un puente anafásico. Cromosoma dicéntrico formado por el cromosoma 1 (rojo) y el cromosoma 22 (verde) en el cual al segregarse en anafase ocurre un giro entre los centrómeros (círculos negros), esto origina un puente anafásico, formado principalmente por los brazos largos del cromosoma 1, y subsecuentemente un PN (a). Si el puente anafásico se rompe en un sitio son formadas YN y si se rompe en dos puntos son formados MN, ambas estructuras derivadas principalmente del cromosoma 1 (b) (**Pampalona *et al.*, 2010**).

Al ensayo de MNBC puede ser aplicada la técnica de FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia) para distinguir el origen de MN, YN y PN con el uso de sondas pancentroméricas y teloméricas (**figura 15**), lo anterior puede ayudar a establecer los mecanismos de daño genotóxico que ocurre de manera espontánea o por exposición a uno o varios agentes físicos, químicos y biológicos (**Guevara, 2011**).



**Figura 15.** Esquema de la hibridación de una sonda fluorescente con el material genético blanco (modificado de Guevara, 2011).

### 1.7. Citotoxicidad

Con el ensayo de MNBC también pueden evaluarse eventos de citotoxicidad, como apoptosis y necrosis, en linfocitos en cultivo expuestos a un agente tóxico. Esto es importante ya que aporta una descripción con mayor precisión sobre los mecanismos de acción y medición de la sensibilidad celular a elementos químicos o radiación. El uso de Cit-B puede facilitar la evaluación de células apoptóticas, por que se espera que inhiba la desintegración de estas células en cuerpos apoptóticos, ya que el proceso anterior requiere del ensamblaje de microfilamentos (**Fenech, 2000**).

### **1.7.1. Apoptosis**

Apoptosis es un programa codificado genéticamente que conduce a la muerte celular. Presenta determinadas características morfológicas tales como encogimiento celular, fragmentación nuclear, condensación cromatídica, todas estas son debidas a la actividad proteolítica de las caspasas. En las células de vertebrados la apoptosis procede por una de las dos cascadas de señalización denominadas ruta intrínseca y ruta extrínseca, las cuales son mostradas en la **figura 16 (Diamantis *et al.*, 2008; Stephen y Douglas, 2010).**

### **1.7.2. Necrosis**

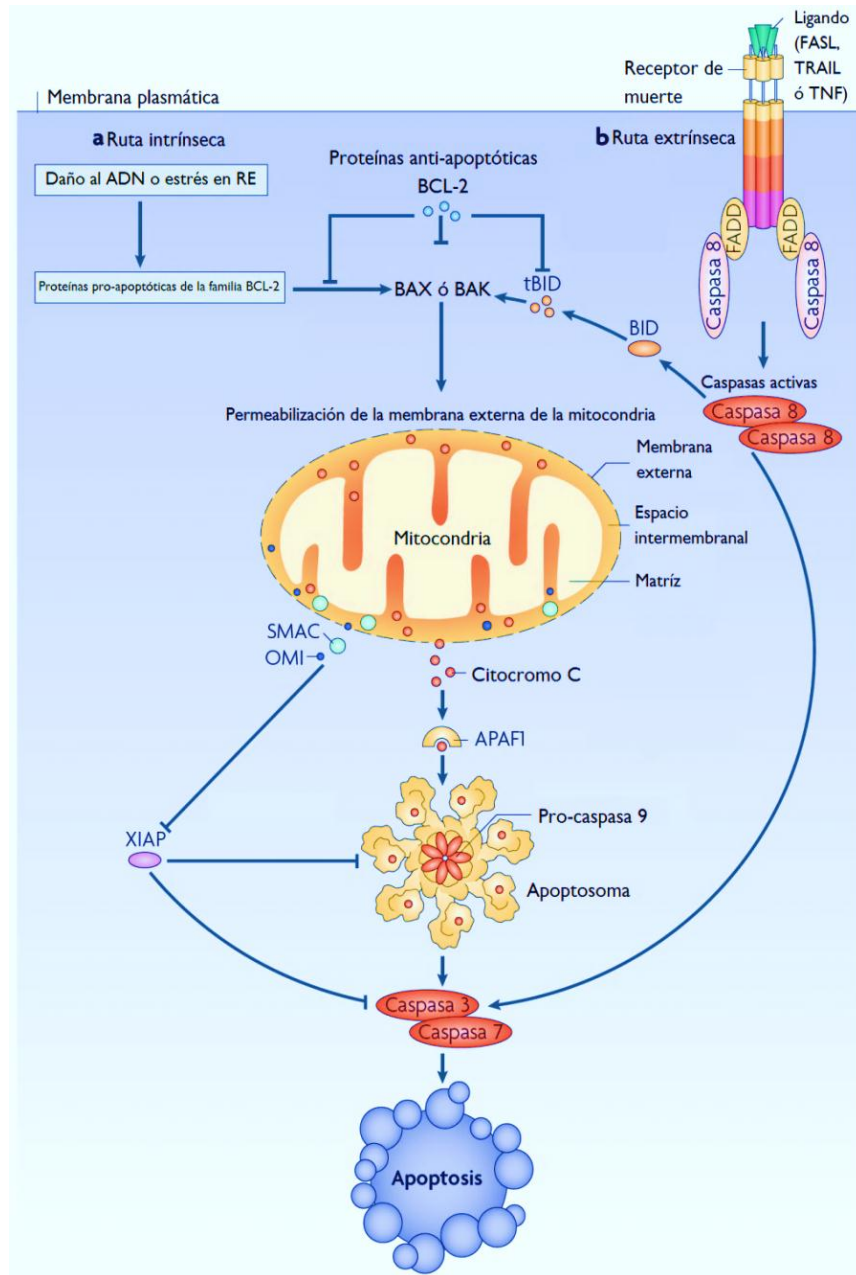
La necrosis es otro tipo de muerte celular, se refiere a una muerte accidental de las células en respuesta a severos cambios en las condiciones fisiológicas, como; hipoxia, hipoglucemia, exposición a toxinas, exposición a metabolitos reactivos de oxígeno, cambios extremos en la temperatura y privación de nutrimentos esenciales. La necrosis es un proceso pasivo en donde la carga osmótica originada por el aumento de permeabilidad de la membrana celular lleva al edema celular. La pérdida de viabilidad se asocia a la ruptura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando y provocando reacciones inflamatorias al tejido en el que se encuentra (**Syntichaki y Tavernarakis, 2002; Edinger y Thompson, 2004; Cruz, 2011a).**

Los criterios de selección para células apoptóticas y necróticas en el ensayo de MNBC se muestran en la **tabla 1 (Fenech *et al.*, 2003).**

**Tabla 1.** Criterios de selección para células apoptóticas y necróticas.

	<b>CÉLULAS APOPTÓTICAS</b>	<b>CÉLULAS NECRÓTICAS</b>
<b>Estadios tempranos</b>	Presentan cromatina condensada en el núcleo, membranas citoplasmáticas y nucleares intactas.	Muestran un citoplasma pálido con numerosas vacuolas (sobre todo en el citoplasma y algunas en el núcleo), membrana citoplasmática con daño y un núcleo intacto.
<b>Estadios avanzados</b>	Exhiben fragmentación del núcleo (cuerpos apoptóticos) con una membrana citoplasmática intacta.	Presentan pérdida de citoplasma y membrana nuclear dañada, solo con una parte del núcleo intacta.
<b>Intensidad de tinción</b>	Usualmente más intensa que en las células viables.	Comúnmente menor que en las células viables.

(Fenech *et al.*, 2003)



**Figura 16.** Apoptosis. (a) Ruta intrínseca; comienza por estímulos tales como daño al ADN o estrés en el retículo endoplásmico (RE), que activan a proteínas proapoptóticas de la familia BCL-2, que a su vez activan a BAX y BAK las cuales inducen la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria. Esto ocasiona la liberación de citocromo *c* del espacio intermembranal y se une a APAF1 (factor activador de proteasa apoptótica 1) induciendo su cambio conformacional y oligomerización formando así la plataforma activadora de caspasa llamada apoptosoma, que a su vez recluta, dimeriza y activa a caspasa 9 (iniciadora) la cual activa a las caspasas ejecutoras 3 y 7. SMAC/DIABLO y OMI/HTRA2 también son liberadas y bloquean al inhibidor X-ligando de la proteína de apoptosis (XIAP), que media la inhibición de la actividad caspasa por su unión con las caspasas 9, 3 y 7 activas. Interacciones entre Proteínas pro y antiapoptóticas de la familia BCL-2 regulan la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria. (b) Ruta extrínseca; ocurre cuando el receptor de muerte está unido con su ligando afín (FASL, FNT, TRAIL) que ocasiona el reclutamiento de moléculas adaptadoras, tales como la proteína FAS-asociada al dominio de muerte (FADD), que une dimeriza y activa a la caspasa 8 (iniciadora) que a su vez activa a las caspasas 3 y 7. La caspasa 8 también puede activar a BID, resultando tBID que induce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Stephen y Douglas, 2010).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La familia de compuestos de Cu (II) llamada Casiopeínas, fue creada a finales de la década de 1970, las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a han sido evaluadas en numerosos trabajos *in vivo* e *in vitro* demostrando que poseen actividad antineoplásica. Estudios adicionales han ido enriqueciendo el conocimiento y la comprensión de los efectos de estas moléculas, diversas pruebas de genotoxicidad han sido realizadas, entre ellas la evaluación de yemas nucleares en linfocitos humanos *in vitro*. El presente trabajo se enfoca en complementar la información existente sobre yemas nucleares con respecto a su contenido de ADN centromérico, que a su vez contribuye a inferir parte del mecanismo de acción de estas Casiopeínas con el material genético.



### **3. HIPÓTESIS**

Las Casiopeínas fueron diseñadas con características que les confirieran la posibilidad de tener actividad antineoplásica. Se sabe que son capaces de fragmentar ADN, formar especies reactivas de oxígeno por la oxidación de su centro metálico Cu(II) a Cu(I), como es bien sabido esto ocasiona daño oxidativo a la célula. Por lo tanto al tratar cultivos de linfocitos humanos con las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a se espera observar efectos; genotóxico, expresado como yemas nucleares; citotóxico, por la presencia de células apoptóticas; y citostático, mostrando como disminución de células polinucleadas.

## 4. OBJETIVOS

### General

- Evaluar los efectos genotóxico, citotóxico y citostático inducidos por las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a en linfocitos humanos *in vitro*.

### Particulares

- Analizar el efecto genotóxico de las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a por la cuantificación de yemas nucleares en linfocitos humanos binucleados.
- Evaluar la presencia de centrómero en yemas nucleares por el método de FISH.
- Determinar el efecto citotóxico de las Casiopeína Igly, IIgly y III-I-a en linfocitos humanos evaluando la frecuencia de células apoptóticas y necróticas.
- Valorar el efecto citostático de las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a en linfocitos humanos estimando el índice de división nuclear (IDN) y la frecuencia de células polinucleadas.

## 5. MÉTODO

### 5.1. Ensayo de MNBC

#### Cultivo de linfocitos humanos

Fue extraída por punción venosa sangre periférica con una jeringa heparinizada (PiSA, México) a donadores hombres jóvenes (entre 20 y 30 años de edad), no fumadores y clínicamente sanos. Posteriormente 0.5 ml de sangre fueron cultivados en 4.5 ml de medio RPMI 1640 (SIGMA, U.S.A.) con 0.25 ml de fitohemaglutinina (SIGMA, U.S.A.), por tratamiento, los cultivos se incubaron a 37° C durante 96 horas.

#### Tratamientos

A las 44 horas de iniciada la incubación fueron aplicados los tratamientos como se muestra en la **tabla 2**. Se contó con un testigo negativo al que no se aplicó tratamiento, dos positivos a los que se les adicionó mitomicina C (MMC) (SIGMA, U.S.A.) y colchicina (CCC) (SIGMA, U.S.A.), y se trabajó con tres concentraciones por cada Casiopeína (Facultad de Química, UNAM). A las 48 horas fue incorporada citocalasina B (SIGMA, U.S.A.) en todos los cultivos.

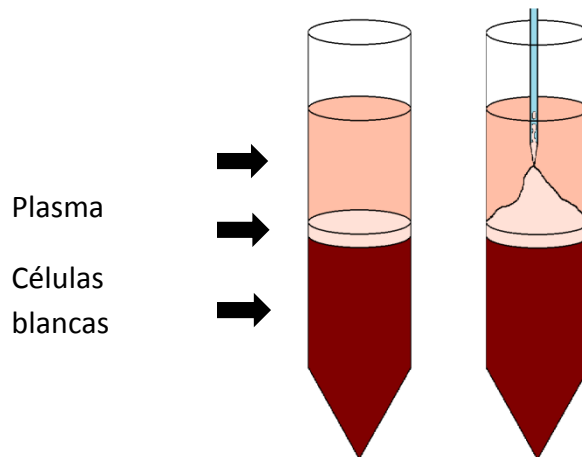
Las concentraciones utilizadas para los tratamientos con la Casiopeína Igly fueron escogidas con base en la  $CI_{50}$  reportada para la línea celular CaLo, mientras que, para las Casiopeínas IIgly y III-I-a fueron elegidas con base en la  $CI_{50}$  reportada para la línea celular HeLa.

**Tabla 2.** Concentraciones de los reactivos aplicados por tratamiento.

	Tiempo (hrs)	
	44	48
Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Citocalasina B (µg/ml)
Testigo negativo (T-)	-	6.0
Testigo positivo; MMC (clastogénico)	0.2	6.0
Testigo positivo; CCC (aneugénico)	0.04	6.0
Casiopeína Igly	0.615, 1.23, 2.46	6.0
Casiopeína IIgly	0.33, 0.66, 1.0	6.0
Casiopeína III-I-a	4.2, 8.4, 12.6	6.0

## Cosecha

Cumplidas las 96 horas de incubación se procedió a la separación de los linfocitos, lo cual consistió en centrifugar (EQUIPAR, México) las muestras a 3600 RPM durante 25 minutos. Una vez que transcurrió este tiempo con ayuda de una micropipeta (GILSON, Francia) se extrajo cuidadosamente la capa de células blancas que se encuentra en la parte media de las tres fases (**figura 17**).



**Figura 17.** Separación de células blancas por gradiente de densidad (Guevara, 2011).

Posteriormente se realizó la fijación con 5 ml de solución metanol-ácido acético (J. T. Baker, México) en una proporción 3:1, frío, a continuación se centrifugó a 1000 RPM durante 10 minutos, después el sobrenadante fue eliminado. Subsecuentemente se realizaron los lavados necesarios con metanol-ácido acético 85:15 hasta obtener un botón celular blanco y limpio. En seguida se resuspendió el botón celular en 0.5 ml de la misma solución y se procedió al goteo (en portaobjetos previamente lavados), y se dejó secar al aire.

## Tinción

Finalmente fue realizada una doble tinción, primero con colorante May-Grünwald (SIGMA, U.S.A.) en una relación 2:1 por 6 minutos, después se lavó en agua corriente, luego fueron teñidos con Giemsa (SIGMA, U.S.A.) al 10% durante 15 minutos, se volvió a lavar en agua corriente para eliminar el exceso de colorante y se dejó secar al aire.

Se realizó un ensayo con dos repeticiones.

## **5.2. Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)**

### Preparación de laminillas

Las laminillas con el material biológico que se empleó en esta técnica, se elaboraron en las mismas condiciones mencionadas para el ensayo de MNBC, y se guardaron sin tinción en condiciones de congelación (-20°C) para su posterior estudio. Después se descongelaron a temperatura ambiente y en seguida fueron sumergidas en solución ácido acético 70%: metanol 30%, a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, se pasaron a una solución 2xSSC (J. T. Baker, México) con pH 7.4 durante 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se procedió a deshidratar en un tren de alcoholes, etanol (J. T. Baker, México) al 70%, 85% y 100 %, durante 2 minutos a temperatura ambiente, respectivamente.

### Maduración

Las laminillas se colocaron en una solución 2xSSC con pH 7.4 a 37°C durante 15 minutos. Luego fueron sumergidas en un tren de alcoholes, etanol al 70%, 85% y 100%, a temperatura ambiente por 2 minutos, respectivamente.

### Preparación de la sonda

La sonda (KREATECH, POSEIDON, Ámsterdam.) es una mezcla de secuencias repetitivas alfoides presentes en cada cromosoma humano, identifica el ADN centromérico y se encuentra lista para su uso.

### Cohibridación

Se tomó una alícuota de 8 µl de sonda y se puso en un cubreobjetos de 22x22 mm, que posteriormente fue colocado sobre un portaobjetos en el área previamente marcada que contenía mayor calidad y cantidad de material biológico, seleccionada por microscopía en contraste de fases (microscopio Nikon, Japón). Después se llevó a cabo la desnaturalización

del ADN blanco y la sonda, en un hibridizador (Boekel, U.S.A.) a 75°C por 6 minutos. Se dejaron enfriar y se sellaron con Rubber Cement.

### Hibridación

Se incubó a 37 °C durante toda la noche en una cámara húmeda y en la oscuridad.

### Lavados post-hibridación

Se removió el Rubber Cement y el cubreobjetos de la muestra hibridada, inmediatamente se sumergió en un amortiguador de lavado 0.4xSCC/0.3% Igepal (KREATECH, POSEIDON, Ámsterdam) con pH 7.4, por 2 minutos a 73°C ± 1°C. Luego las laminillas se colocaron en una solución 2xSCC/0.1% Igepal a temperatura ambiente por 1 minuto. Por último se dejó escurrir y secar.

### Contratinción

Se aplicaron 8 µl de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; KREATECH, POSEIDON, Ámsterdam) en un cubreobjetos que a su vez fue puesto sobre el área que contenía la muestra hibridada. Las laminillas se almacenaron a -20 °C en condiciones de oscuridad para su análisis posterior.

Se realizó un ensayo con una repetición.

## **6. EVALUACIONES Y ESTADÍSTICA**

### **6.1. Genotoxicidad**

- Se evaluó en 1000 células binucleadas la frecuencia de YN en microscopía de campo claro (Nikon, Japón) a 100X, por tratamiento. Para establecer diferencias estadísticas se comparó contra el testigo negativo aplicando la prueba de Ji cuadrada (**Serrano y Montero, 2001**).
- En las laminillas preparadas con la técnica de FISH se evaluaron en 1000 células binucleadas la frecuencia de YN y a su vez la presencia o ausencia de la señal para ADN centromérico, observadas en microscopio de Epifluorescencia (Nikon, Japón) a

100X, bajo los filtros para DAPI (excitación; 359 nm y emisión, 461 nm) y Rodamina (excitación; 570 nm y emisión; 590 nm). La prueba estadística empleada fue Z para proporciones **(Murray y Spiegel, 1969)**.

## 6.2. Citotoxicidad

- Fue analizada la frecuencia de células apoptóticas y necróticas en 500 células polinucleadas, por microscopía de campo claro a 100X. La prueba estadística aplicada fue Z para proporciones **(Murray y Spiegel, 1969)**.

## 6.3. Citostaticidad

- Fue observada, en 500 células polinucleadas, la frecuencia de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas por microscopía de campo claro a 100X. Se estimó el índice de división nuclear (IDN) **(Fenech *et al.*, 2000)**:

$$\text{IDN} = (M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)) / N.$$

M1: monucleadas

M2: binucleadas

M3: trinucleadas

M4: tetranucleadas

N: total de células evaluadas.

La prueba estadística aplicada fue Z para proporciones **(Murray y Spiegel, 1969)**.

El nivel máximo de significancia empleado fue  $p < 0.05$  en todas las pruebas estadísticas.

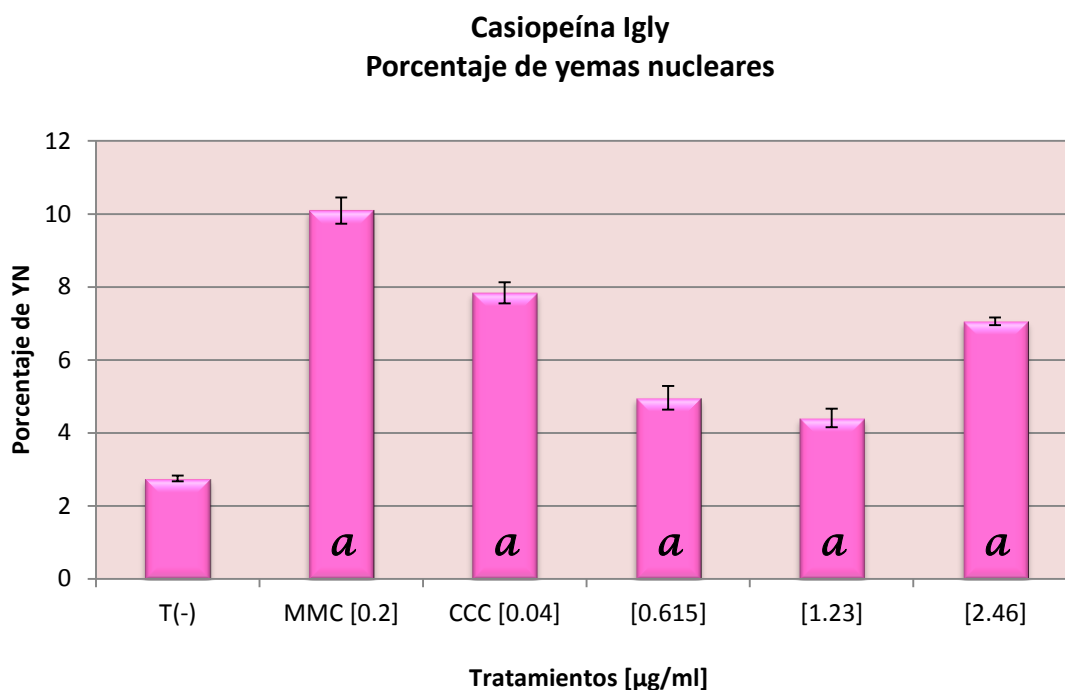
## 7. RESULTADOS

De acuerdo con los objetivos planteados para este trabajo se realizó el ensayo de MNBC para determinar los parámetros de genotoxicidad, citotoxicidad y citostaticidad.

### 7.1. Genotoxicidad

A continuación se presentan los porcentajes de YN observadas, por microscopía de campo claro, en linfocitos humanos binucleados tratados con las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a, en 3000 células por tratamiento (**figuras 18-21 y tabla 3**).

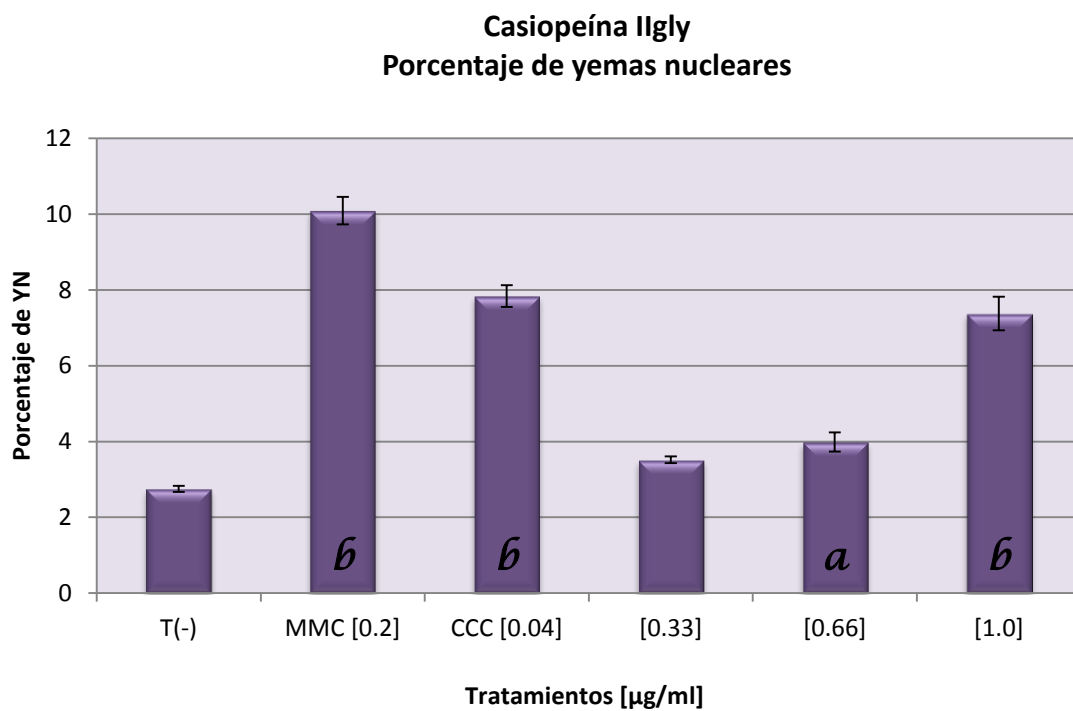
En la **figura 18 y tabla 3** se presentan los porcentajes de YN en linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly. Todas las concentraciones utilizadas son estadísticamente significativas ( $p < 0.0005$ ) comparadas con el testigo negativo, aunque no presenta un incremento de manera dosis dependiente.



**Figura 18.** Porcentaje de YN en linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína Igly. Testigo negativo; T(-), testigos positivos; mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).  
**a**  $p < 0.0005$ , Ji cuadrada.

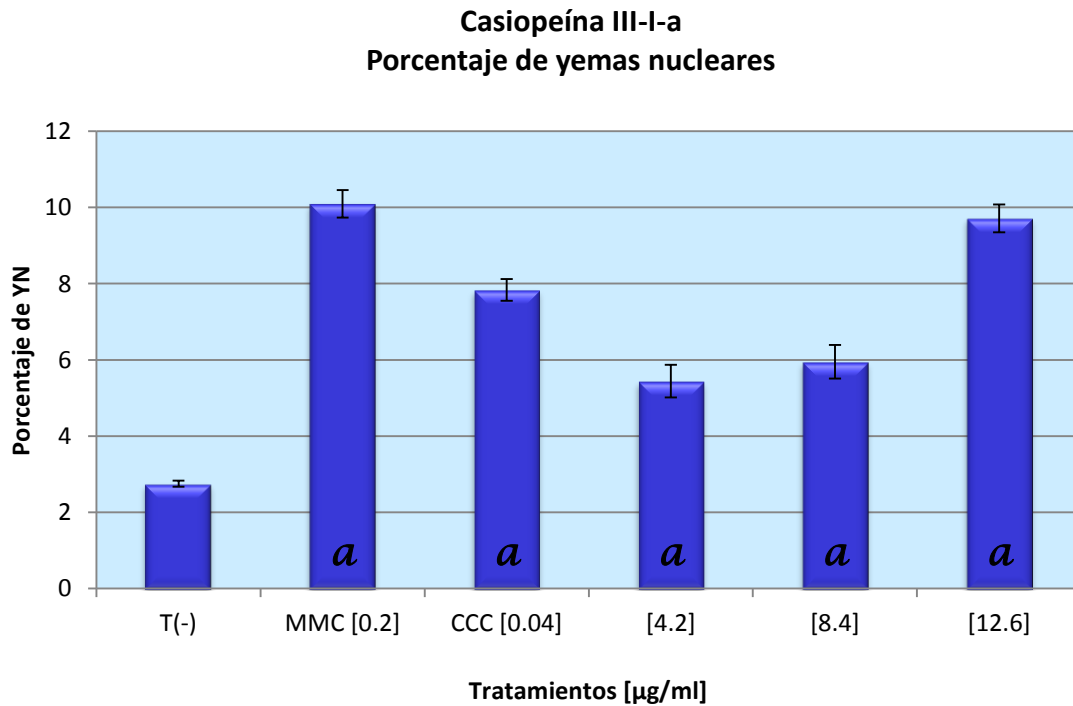


En los tratamientos con Casiopeína Igly solo las concentraciones mayores (0.66 y 1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) incrementaron de manera significativa ( $p < 0.01$  y  $p < 0.0005$  respectivamente) en comparación con el testigo negativo. La **figura 19** y **tabla 3** muestran el porcentaje de YN en linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly.



**Figura 19.** Porcentaje de YN en linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína Igly. T(-), testigos positivos, MMC y CCC.  
*a*  $p < 0.01$ , *b*  $p < 0.0005$ , Ji cuadrada.

Con respecto a la Casiopeína III-I-a en la **figura 20** y **tabla 3** puede apreciarse el incremento, en todas las concentraciones trabajadas, de los porcentajes de YN en linfocitos humanos, el cual resulta significativo ( $p < 0.0005$ ) en comparación con el testigo negativo, con un incremento de manera dosis dependiente.

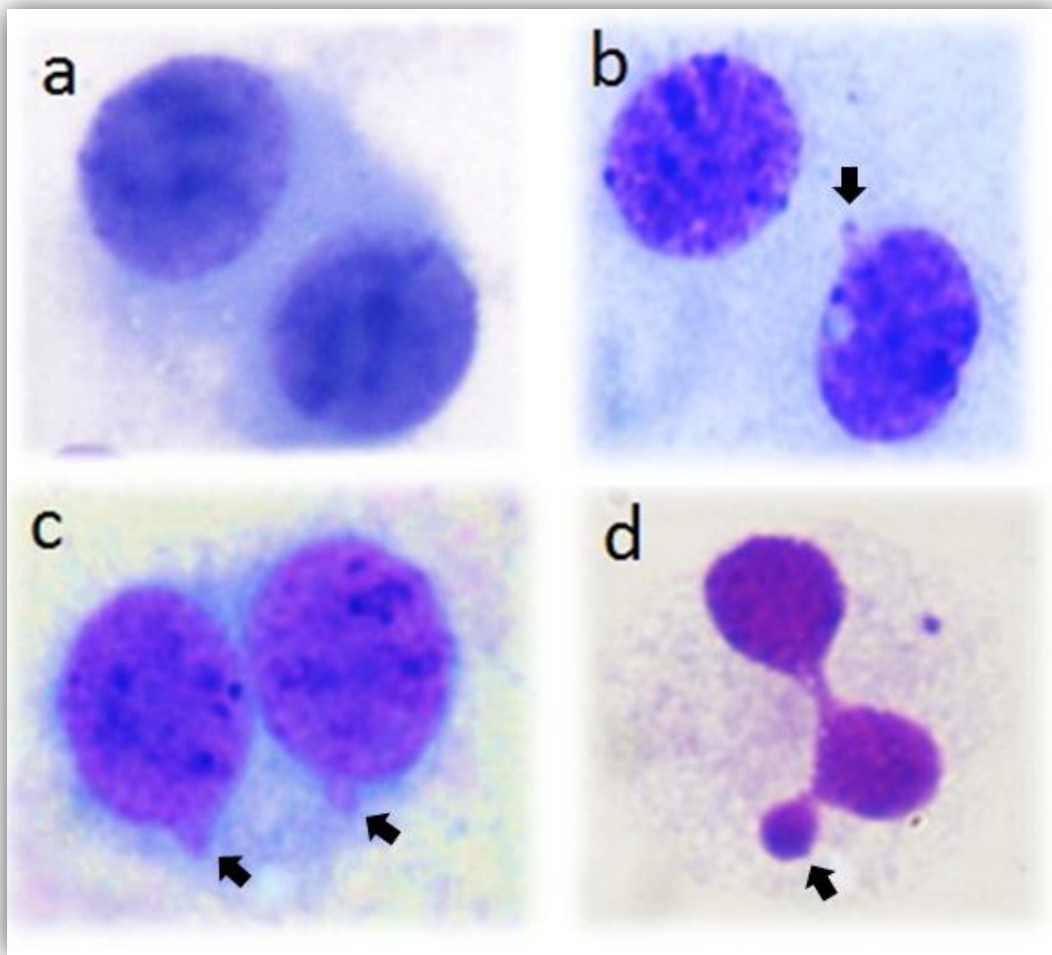


**Figura 20.** Porcentaje de YN en linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína III-I-a. T(-) y testigos positivos, MMC y CCC.  
**a**  $p < 0.0005$ , Ji cuadrada.

**Tabla 3.** Porcentaje de YN evaluadas en células binucleadas de linfocitos humanos *in vitro* tratados con las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a.

Tratamientos [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Porcentaje de YN $\pm$ E.E.	Total de células evaluadas (N)
T(-)	2.75 $\pm$ 0.07	3053
MMC [0.2]	10.09 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	3250
CCC [0.04]	7.83 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	2986
<b>Casiopeína Igly</b>		
[0.615]	4.96 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	2981
[1.23]	4.40 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	3018
[2.46]	7.06 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	3116
<b>Casiopeína IIgly</b>		
[0.33]	3.51 $\pm$ 0.09	3042
[0.66]	3.98 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	3083
[1.0]	7.37 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	3105
<b>Casiopeína III-I-a</b>		
[4.2]	5.44 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	3106
[8.4]	5.94 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	3143
[12.6]	9.71 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	3336

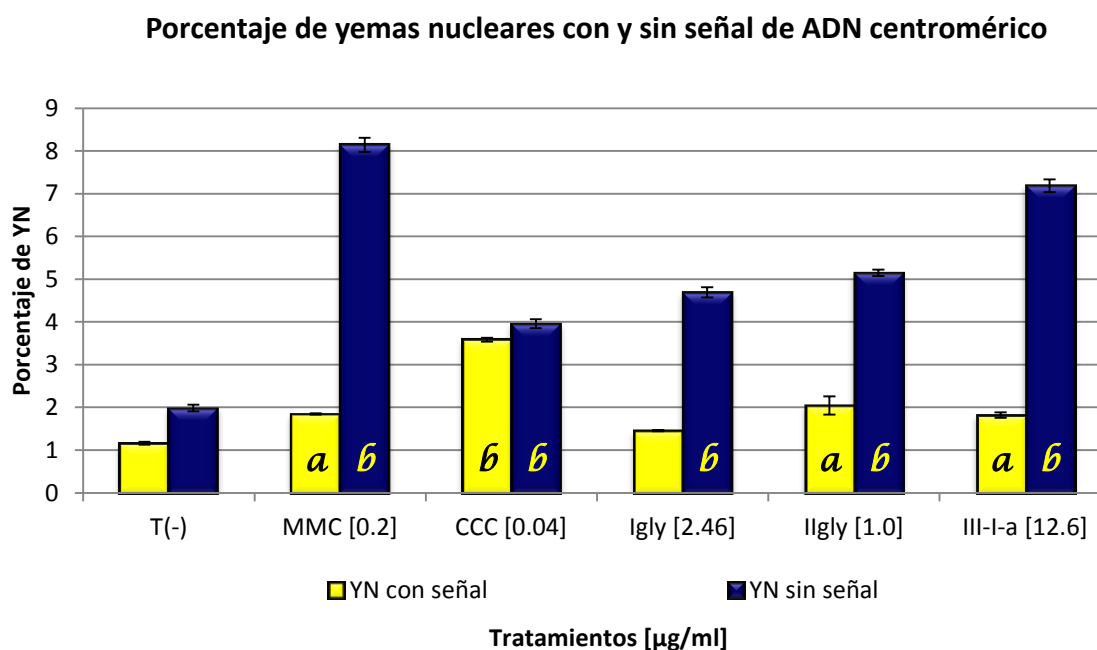
<sup>a</sup>  $p < 0.01$ , <sup>b</sup>  $p < 0.0005$ , Ji cuadrada.



**Figura 21.** Microfotografías de células BN con YN en microscopía de campo claro, 100X, tratadas con Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a. (a) Célula BN con morfología nuclear normal, (b; Igly) Célula BN con YN, (c; IIgly) célula BN con una YN en cada núcleo, (d; III-I-a) célula BN con YN y PN.

La técnica de FISH fue utilizada para determinar el contenido de ADN centromérico en YN, al observar la presencia o ausencia de señal para la sonda pancentromérica empleada respectivamente. En 2000 células binucleadas, por tratamiento mediante microscopía de fluorescencia, fue evaluada la frecuencia de YN y a su vez si estas contienen o no señal para centrómero. En la **figura 23** son mostradas imágenes representativas de YN con y sin señal centromérica en los tratamientos ya mencionados.

En la **figura 22** y **tabla 4** se muestra el porcentaje de YN con y sin señal para ADN centromérico, donde puede observarse que las Casiopeínas Igly y III-I-a inducen significativamente tanto YN que presentan señal de ADN centromérico como YN que no presentan señal. La Casiopeína Igly solo indujo significativamente YN que no presentan señal de ADN centromérico. Es notable que en todos los casos siempre predomina el porcentaje de YN sin señal de centrómero.

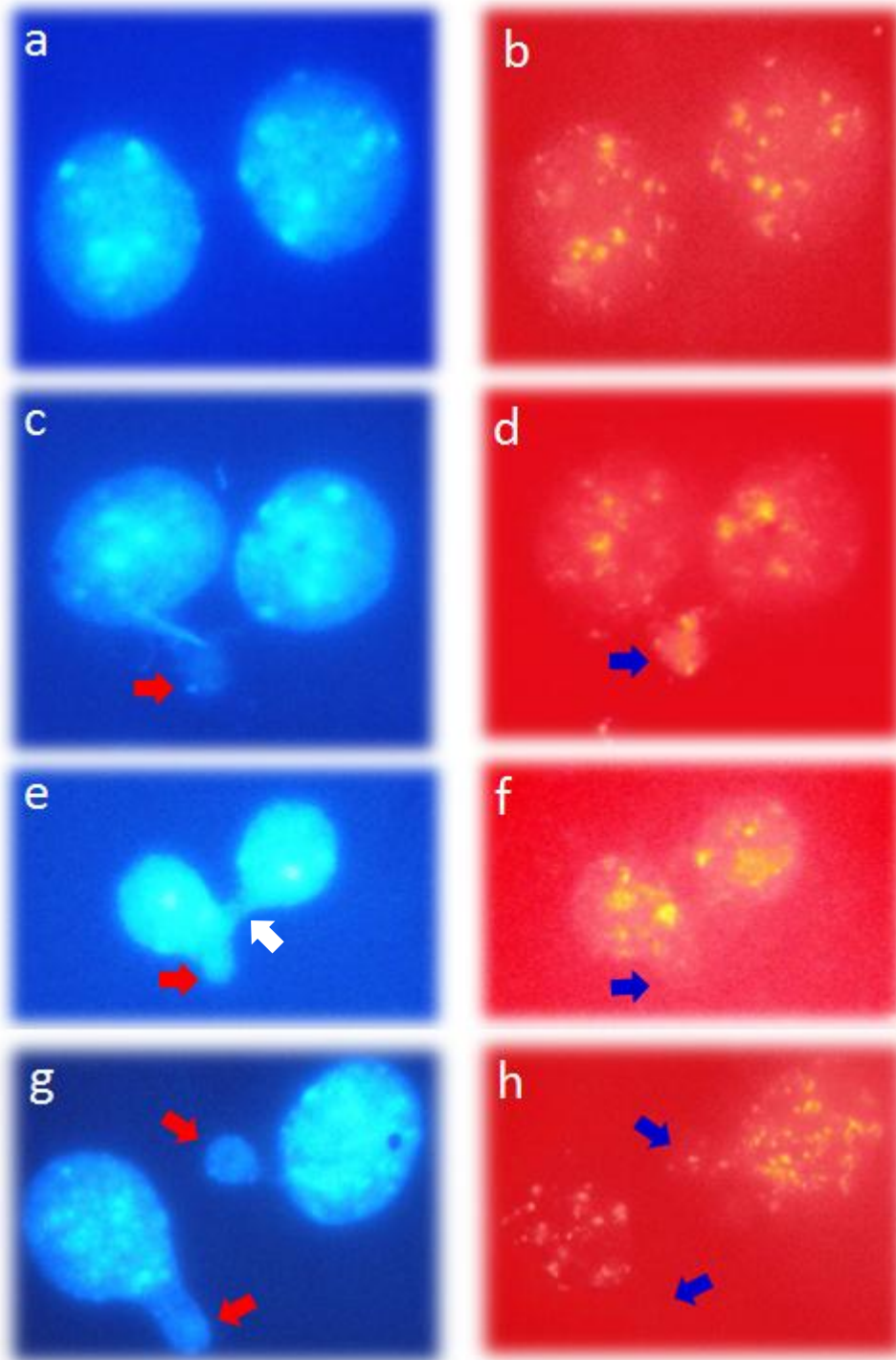


**Figura 22.** Porcentaje de YN con y sin señal centromérica en linfocitos humanos *in vitro* tratados con las Casiopeínas Igly, Igly y III-I-a. T(-) y testigos positivos, MMC y CCC. *a*  $p < 0.05$ , *b*  $p < 0.002$ , Z para proporciones.

**Tabla 4.** Porcentaje de YN con y sin señal centromérica en linfocitos humanos binucleados *in vitro* tratados con las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a.

Tratamientos [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Porcentaje de YN con señal $\pm$ E.E.	Porcentaje de YN sin señal $\pm$ E.E.	Total de células Evaluadas (N)
T(-)	1.16 $\pm$ 0.03	1.98 $\pm$ 0.07	2065
MMC [0.2]	1.84 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	8.14 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	2222
CCC [0.04]	3.58 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	3.95 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	2147
Igly [2.46]	1.45 $\pm$ 0.01	4.69 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	2131
IIgly [1.0]	2.04 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	5.15 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	2155
III-I-a [12.6]	1.81 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	7.18 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	2198

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ , <sup>b</sup>  $p < 0.002$ , Z para proporciones.

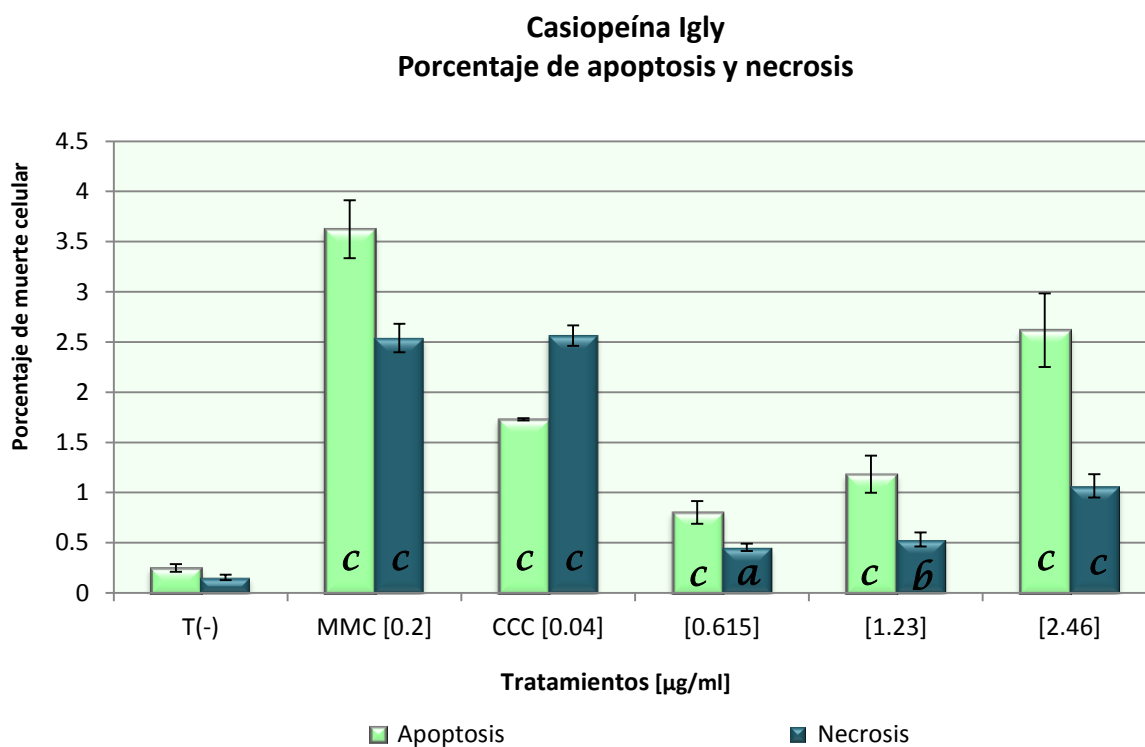


**Figura 23.** Microfotografías de células BN con YN en microscopía de fluorescencia, vistas con filtro para DAPI y rodamina a 100X, tratadas con Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a. (a, b) Célula BN con morfología nuclear normal. (c, d) Célula BN con YN, la cual presenta señal para ADN centromérico. (e, f) Célula BN con PN (flecha blanca) y YN, se aprecia que la YN no posee señal para ADN centromérico. (g, h) Célula BN con una YN en cada núcleo donde una YN presenta señal para ADN centromérico y la otra no.

## 7.2. Citotoxicidad

Se evaluó la frecuencia de células apoptóticas y necróticas (**figura 27**) en más de 3000 células polinucleadas, en microscopía de campo claro, por tratamiento.

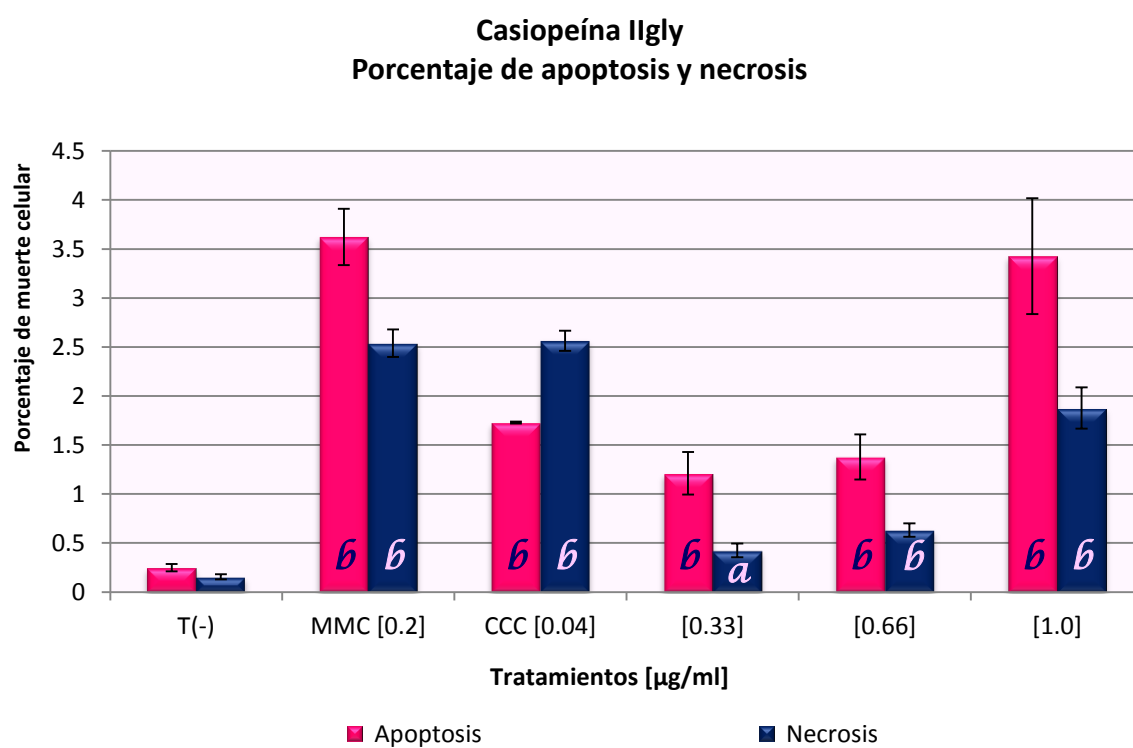
En los cultivos tratados con la Casiopeína Igly incrementaron significativamente los porcentajes tanto de apoptosis ( $p < 0.002$ ) como de necrosis ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$  y  $p < 0.002$ ) en comparación con el testigo negativo, siempre predominando apoptosis sobre necrosis en todas las concentraciones trabajadas donde es notable un aumento de manera dosis dependiente en este tipo de muerte celular (**figura 24** y **tabla 5**).



**Figura 24.** Porcentaje de apoptosis y necrosis en cultivos de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de la Casiopeína Igly. T(-) y testigos positivos, MMC y CCC. *a*  $p < 0.05$ , *b*  $p < 0.005$ , *c*  $p < 0.002$ , Z para proporciones.

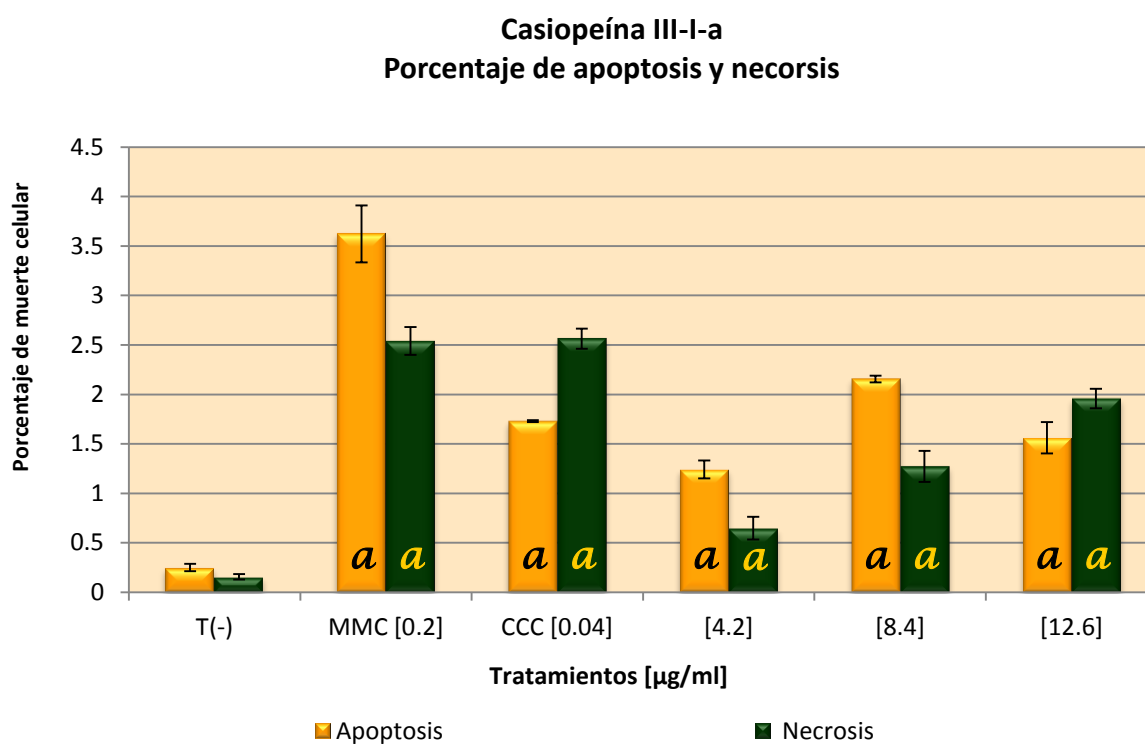


En los cultivos tratados con la Casiopeína Igly incrementaron significativamente los porcentajes de apoptosis ( $p < 0.002$ ) y necrosis ( $p < 0.05$  y  $p < 0.002$ ) en todas las concentraciones utilizadas con un aumento de manera dosis dependiente para ambos tipos de muerte celular; predominando siempre apoptosis sobre necrosis (**figura 25 y tabla 5**).



**Figura 25.** Porcentaje de apoptosis y necrosis en cultivos de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de la Casiopeína Igly. T(-) y testigos positivos, MMC y CCC.  
*a*  $p < 0.05$ , *b*  $p < 0.002$ , Z para proporciones.

En todas las concentraciones utilizadas de Casiopeína III-I-a incrementaron los porcentajes de apoptosis y necrosis significativamente ( $p < 0.002$ ), aunque solo la necrosis aumentó de manera dosis dependiente. En las concentraciones menores (4.2 y 8.4  $\mu\text{g/ml}$ ) es superior el porcentaje de apoptosis sobre necrosis, no resultando así para la concentración mayor (12.6  $\mu\text{g/ml}$ ) (figura 26 y tabla 5).

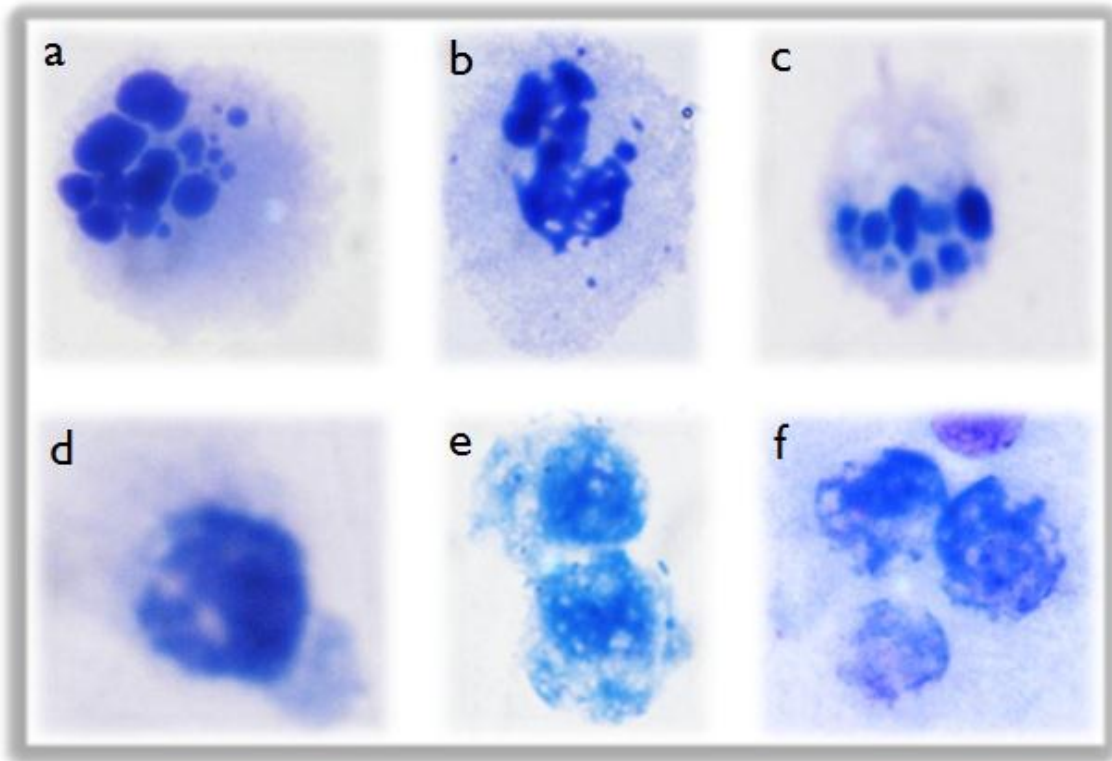


**Figura 26.** Porcentaje de apoptosis y necrosis en cultivos de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de la Casiopeína III-I-a. T(-) y testigos positivos, MMC y CCC.  
*a*  $p < 0.002$ , Z para proporciones.

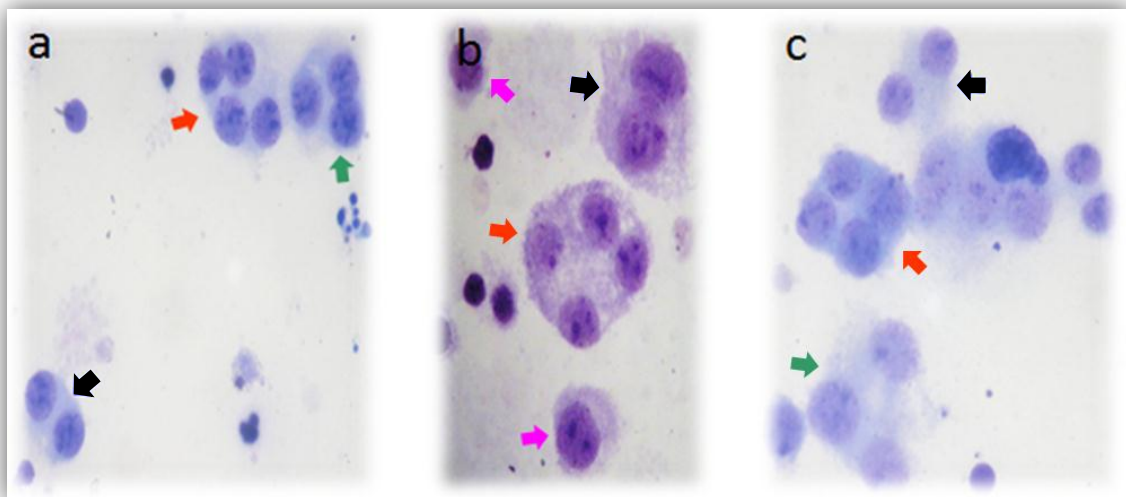
**Tabla 5.** Porcentaje de apoptosis y necrosis en cultivos de linfocitos humanos tratados con las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a.

Tratamientos [µg/ml]	Porcentaje		Total de células evaluadas
	Apoptosis ± E.E.	Necrosis ± E.E.	
T(-)	0.24 ± 0.03	0.15 ± 0.02	3216
MMC [0.2]	3.62 ± 0.28 <sup>c</sup>	2.53 ± 0.14 <sup>c</sup>	3505
CCC [0.04]	1.72 ± 0.01 <sup>c</sup>	2.56* ± 0.10 <sup>c</sup>	3238
<b>Casiopeína Igly</b>			
[0.615]	0.80 ± 0.11 <sup>c</sup>	0.45 ± 0.03 <sup>a</sup>	3740
[1.23]	1.18 ± 0.18 <sup>c</sup>	0.53 ± 0.06 <sup>b</sup>	3380
[2.46]	2.61 ± 0.36 <sup>c</sup>	1.06 ± 0.11 <sup>c</sup>	3285
<b>Casiopeína IIgly</b>			
[0.33]	1.21 ± 0.21 <sup>c</sup>	0.42 ± 0.07 <sup>a</sup>	3302
[0.66]	1.37 ± 0.22 <sup>c</sup>	0.63 ± 0.06 <sup>c</sup>	3483
[1.0]	3.42 ± 0.59 <sup>c</sup>	1.87 ± 0.20 <sup>c</sup>	3357
<b>Casiopeína III-I-a</b>			
[4.2]	1.24 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.64 ± 0.11 <sup>c</sup>	3709
[8.4]	2.15 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.27 ± 0.15 <sup>c</sup>	3850
[12.6]	1.56 ± 0.15 <sup>c</sup>	1.95 ± 0.09 <sup>c</sup>	3778

*a* p< 0.05, *b* p<0.005, *c* p<0.002, Z para proporciones.



**Figura 27.** Microfotografías de células apoptóticas y necróticas tratadas previamente con Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a, 100X. (a-c) Células apoptóticas, presentan cromatina condensada en el núcleo y presencia de citoplasma. (d-f) Células necróticas, muestran núcleo y citoplasma vacuolizados.

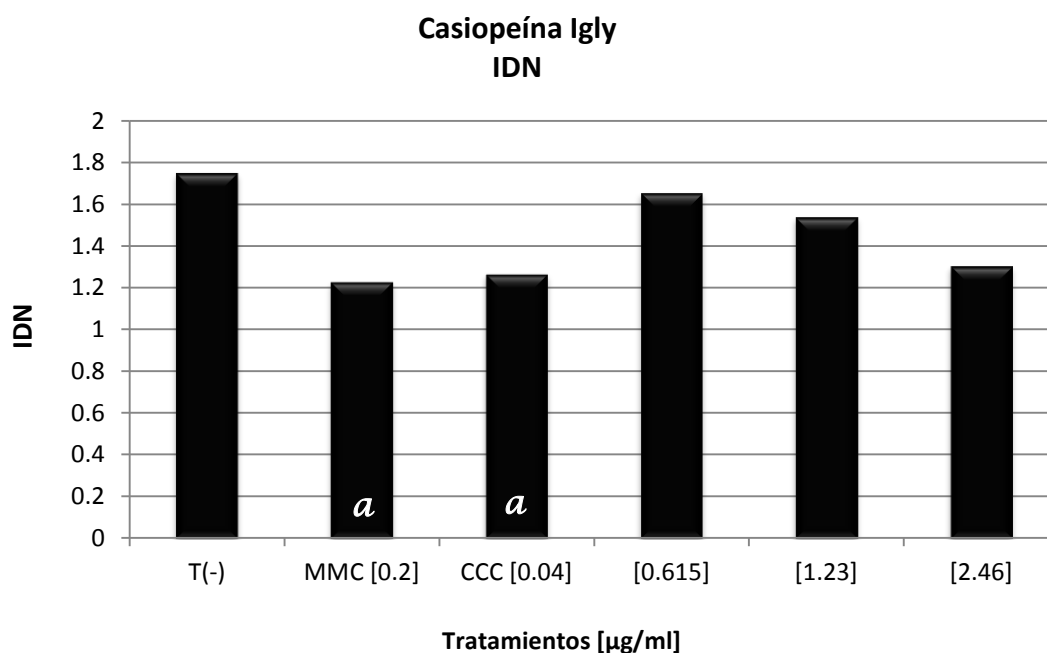


**Figura 28.** Microfotografías de células polinucleadas previamente tratadas con Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a, 40X. (a-c) Muestran células mononucleadas (flecha rosa) binucleadas (flecha negra), trinucleadas (flecha verde) y tetranucleadas (flecha roja).

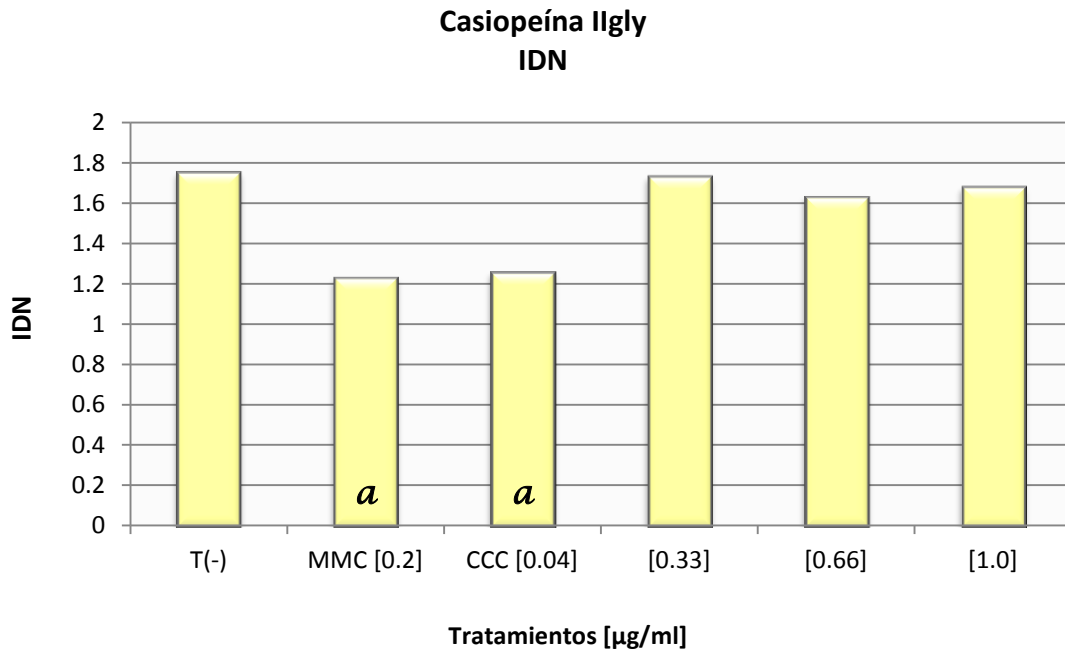
### 7.3. Citostaticidad

Fue analizada la frecuencia de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas (**figura 28**) en más de 3000 células por tratamiento, observadas mediante microscopía de campo claro.

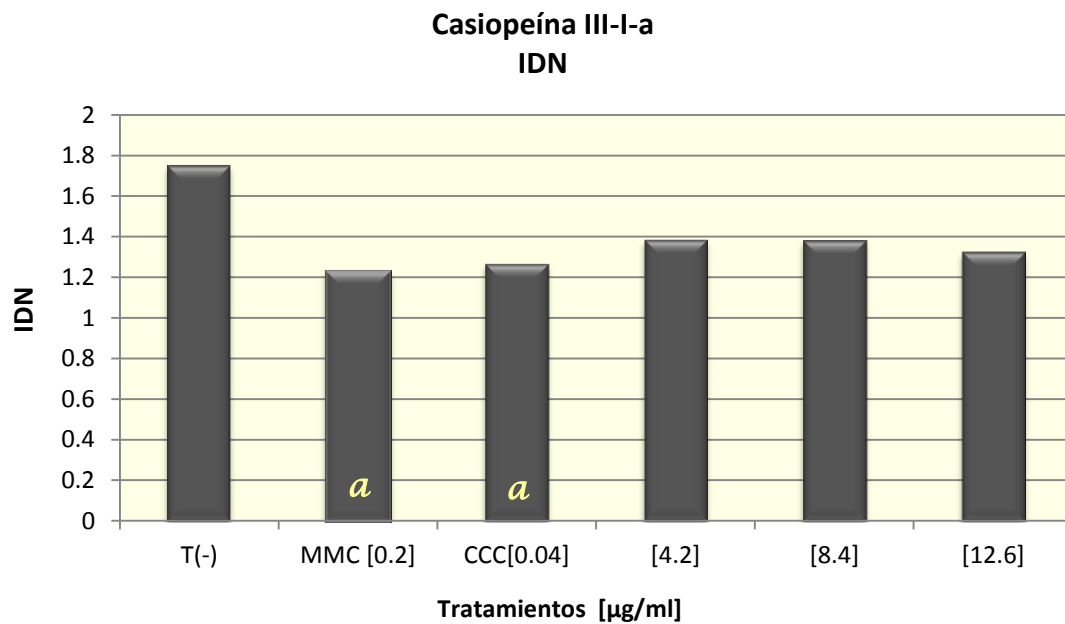
Las **figuras 29, 30 y 31** muestran el IDN (índice de división nuclear) obtenido al evaluar las células polinucleadas en los tratamientos con Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a respectivamente. Puede apreciarse que el IDN disminuye en todos los tratamientos al incrementar la concentración, pero no resulta ser estadísticamente significativo.



**Figura 29.** Índice de división nuclear (IDN) de linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína Igly. T(-) y testigos positivos, MMC y CCC.  
*a*  $p < 0.05$ , Z para proporciones.

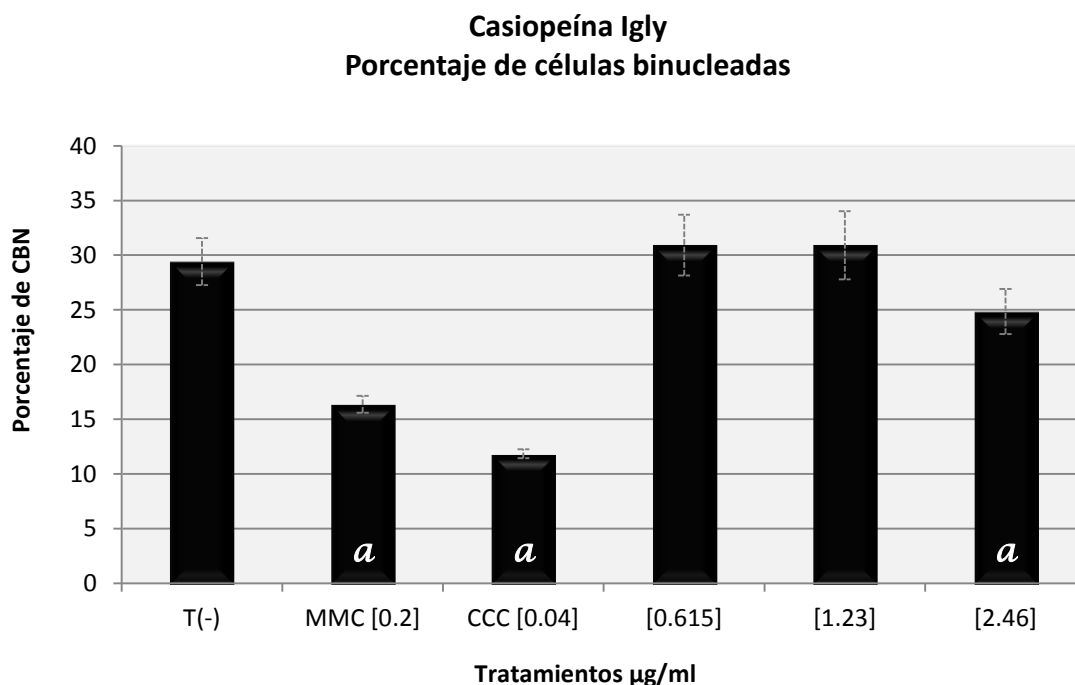


**Figura 30.** IDN de linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína IIgly. T(-) y testigos positivos, MMC y CCC.  
*a*  $p < 0.05$ , Z para proporciones.



**Figura 31.** IDN de linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína III-I-a. T(-) y testigos positivos, MMC y CCC.  
*a*  $p < 0.05$ , Z para proporciones.

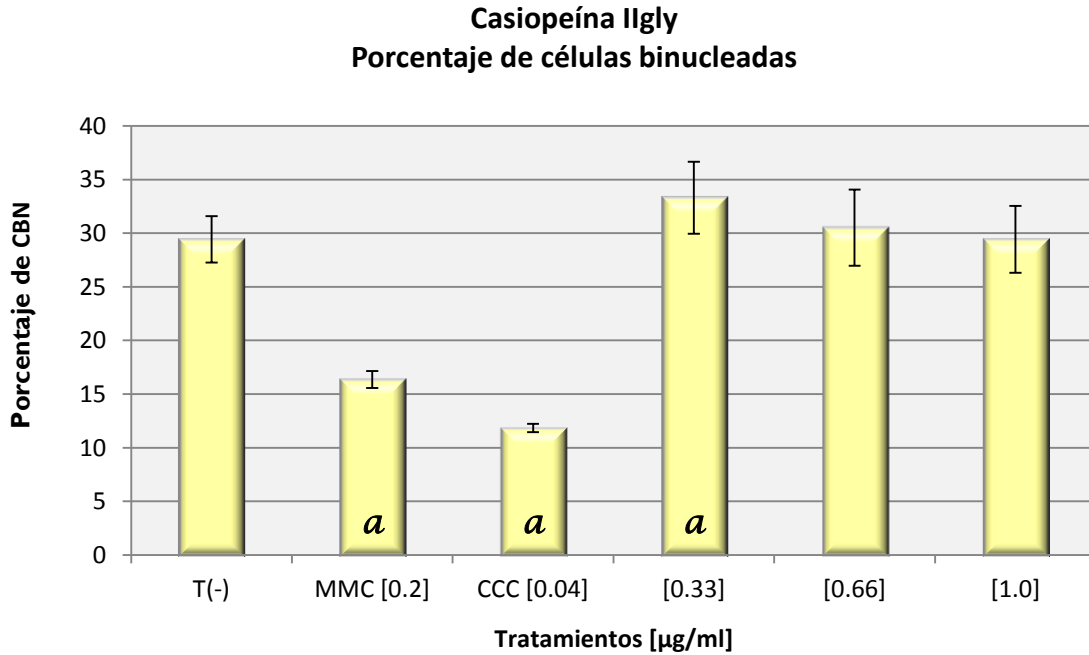
El porcentaje de células binucleadas (CBN) de los cultivos tratados con la Casiopeína Igly disminuyó significativamente, solo en la concentración mayor (2.46  $\mu\text{g/ml}$ ), en comparación con el testigo negativo (**figura 32 y tabla 6**).



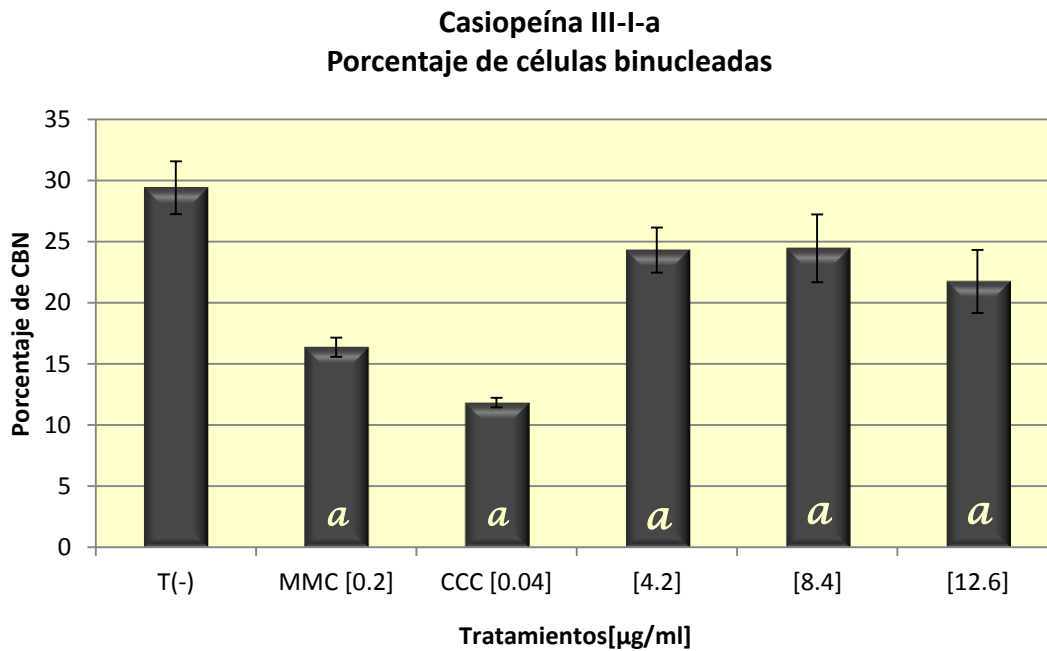
**Figura 32.** Porcentaje de células binucleadas (CBN) en cultivos tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína Igly. T(-) y testigos positivos, MMC y CCC.  
*a*  $p < 0.002$ , Z para proporciones.

Con respecto a los cultivos tratados con la Casiopeína IIgly, el porcentaje de CBN incrementó significativamente en la concentración menor (0.33  $\mu\text{g/ml}$ ), pero en la concentración mayor (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) el porcentaje de CBN es muy similar al del testigo negativo (**figura 33 y tabla 6**).

El porcentaje de CBN en los cultivos tratados con la Casiopeína III-I-a disminuyó significativamente en todos los tratamientos (**figura 34 y tabla 6**).



**Figura 33.** Porcentaje de CBN en cultivos tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína IIgly. T(-) y testigos positivos, MMC y CCC.  
*a*  $p < 0.002$ , Z para proporciones.



**Figura 34.** Porcentaje de CBN en cultivos tratados con tres concentraciones diferentes de Casiopeína III-I-a. T(-) y testigos positivos, MMC y CCC.  
*a*  $p < 0.002$ , Z para proporciones.



La **tabla 6** muestra el porcentaje de células polinucleadas. El porcentaje de células mononucleadas incrementó significativamente en todos los tratamientos, excepto por la concentración menor de la Casiopeína Igly (0.33 µg/ml). Respecto al porcentaje de células tri y tetranucleadas, estos disminuyeron significativamente en la mayoría de los tratamientos, salvo para las concentraciones menor (0.33 µg/ml) y mayor (1.0 µg/ml) de la Casiopeínas Igly respectivamente.

**Tabla 6.** Porcentajes de células polinucleadas en cultivos tratados con las Casiopeínas Igly, Igly y III-I-a.

Tratamientos [µg/ml]	Porcentaje de células polinucleadas				Total de células evaluadas (N)
	Mono ± E.E.	Bi ± E.E.	Tri ± E.E.	Tetra ± E.E.	
T(-)	53.23 ± 2.02	29.40 ± 2.16	6.36 ± 0.48	10.98 ± 0.79	3203
MMC [0.2]	80.72 ± 0.83 <sup>c</sup>	16.35 ± 0.78 <sup>c</sup>	2.15 ± 0.37 <sup>c</sup>	0.76 ± 0.11 <sup>c</sup>	3289
CCC[0.04]	81.99 ± 0.47 <sup>c</sup>	11.84 ± 0.39 <sup>c</sup>	3.64 ± 0.16 <sup>c</sup>	2.51 ± 0.19 <sup>c</sup>	3099
<b>Casiopeína Igly</b>					
[0.615]	55.83 ± 4.83 <sup>a</sup>	30.92 ± 2.77	4.98 ± 0.43 <sup>b</sup>	8.25 ± 0.55 <sup>c</sup>	3693
[1.23]	60.41 ± 1.18 <sup>c</sup>	30.91 ± 3.11	2.91 ± 0.38 <sup>c</sup>	5.74 ± 0.49 <sup>c</sup>	3322
[2.46]	72.88 ± 2.52 <sup>c</sup>	24.84 ± 2.06 <sup>c</sup>	1.16 ± 0.24 <sup>c</sup>	1.10 ± 0.10 <sup>c</sup>	3164
<b>Casiopeína Igly</b>					
[0.33]	51.53 ± 3.58	33.3 ± 3.35 <sup>c</sup>	5.78 ± 0.24	9.35 ± 0.45 <sup>a</sup>	3248
[0.66]	57.04 ± 2.15 <sup>c</sup>	30.50 ± 3.54	4.92 ± 0.41 <sup>b</sup>	7.53 ± 0.66 <sup>c</sup>	3413
[1.0]	56.36 ± 2.68 <sup>b</sup>	29.41 ± 3.11	4.30 ± 0.28 <sup>c</sup>	9.90 ± 0.23	3179
<b>Casiopeína III-I-a</b>					
[4.2]	69.99 ± 2.55 <sup>c</sup>	24.31 ± 1.84 <sup>c</sup>	2.88 ± 0.14 <sup>c</sup>	2.80 ± 0.34 <sup>c</sup>	3639
[8.4]	70.33 ± 0.43 <sup>c</sup>	24.44 ± 2.77 <sup>c</sup>	1.90 ± 0.16 <sup>c</sup>	3.30 ± 0.58 <sup>c</sup>	3718
[12.6]	74.37 ± 3.95 <sup>c</sup>	21.75 ± 2.57 <sup>c</sup>	0.96 ± 0.07 <sup>c</sup>	2.90 ± 0.48 <sup>c</sup>	3645

*a* p<0.05, *b* p<0.01, *c* p<0.002, Z para proporciones.

## 8. DISCUSIONES

### 8.1. Genotoxicidad

Las sustancias genotóxicas afectan a los ácidos nucleicos y alteran sus funciones, pueden dañar al ADN ya sea directamente, al unirse con él, o indirectamente, al afectar enzimas involucradas en su replicación u otros participantes involucrados como el huso mitótico, cinetocoros, centrómeros y/o centriolos (**University, 2008, citado por Uribe, 2010**).

Se analizó mediante el ensayo de MNBC *in vitro* la capacidad de las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a de inducir la formación de YN en linfocitos humanos sanos. Los resultados muestran que, con excepción de la concentración menor utilizada de la Casiopeína Ilgly (0.33 µg/ml), en todos los tratamientos el porcentaje de YN incrementó significativamente. Lo anterior indica que las Casiopeínas mencionadas son genotóxicas.

El incremento del porcentaje de YN en los tratamientos con Casiopeínas Ilgly y III-I-a presentó la tendencia dosis dependiente, por lo que el comportamiento de estas Casiopeínas es más regular que el de la Casiopeína Igly, esto puede hacer más fácil la selección de la dosis en tratamientos clínicos.

La técnica de FISH fue utilizada para determinar si las YN inducidas por las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a presentan o no señal para sonda pancetromérica, esto a su vez puede indicar si el ADN corresponde a fragmentos cromosómicos o cromosomas completos. Los resultados muestran el incremento significativo de YN con señal centromérica como sin señal, en los cultivos tratados con las concentraciones mayores de las Casiopeínas Ilgly y III-I-a, mientras que los cultivos tratados con Casiopeína Igly solo fue significativo el incremento de YN sin señal centromérica. Es notable que las YN sin señal centromérica fueron predominantes en cada tratamiento. Puede interpretarse que las YN sin señal de ADN centromérico contienen fragmentos cromosómicos intersticiales o terminales, mientras que las YN positivas para la señal de ADN centromérico presentan cromosomas completos o fragmentos cromosómicos con centrómero.

Para poder determinar más específicamente el contenido de las YN ocasionadas por los tratamientos con las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a es necesario incluir en el estudio una sonda pantelomérica que ayude a identificar si se trata de cromosomas completos o fragmentos de cromosomas. Aunque los resultados obtenidos con FISH muestran que el efecto genotóxico de estas Casiopeínas es principalmente por clastogénesis, que se puede observar como YN.

El daño genotóxico ocasionado por las Casiopeínas parece ser de manera directa debido a su estructura química, en parte por la gran afinidad conferida por los ligandos diimina (fenantrolina y biperidina) al ADN y al Cu (II), el cual a su vez, bajo ciertas circunstancias, favorece la generación de EROs, entre estos el ion  $\text{OH}^\bullet$ , que es capaz de romper al ADN (**Bravo et al., 2009**). Por otra parte, el cobre (como desechos de la minería) ha sido relacionado con rupturas de cromosomas y formación de puentes en células de meristemas de raíz de *Allium cepa* (**Morais y Marin, 2009**). En particular para las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a, se ha reportado que son capaces de fragmentar al ADN (**Florin, 2005; Alemón et al., 2007; Cermeño, 2007; Alemón et al., 2008**) e incluso se les atribuye actividad parecida a la de las nucleasas (**Rivero et al., 2007**).

La capacidad de los componentes de las Casiopeínas para dañar al ADN debe estar relacionado con la formación de YN mostradas en el presente trabajo.

Los PN son originados, en forma general, por rupturas y uniones, ha sido observado y establecido que la fragmentación de puentes cromatínicos en anafase origina MN (**Hoffelder et al., 2004; Fenech, 2006**), sin embargo, recientemente también se ha visto que la fragmentación de puentes en anafase genera YN, esto depende del número de rupturas que ocurren en los puentes, ya que si solo se presenta una serán formadas YN o si ocurren dos o más se originaran MN, lo que puede deberse al tipo de anomalías cromosómicas generadas (**Pampalona et al., 2010**). Se ha reportado la inducción de PN en linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis por las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a (**Pérez, 2008; Uribe, 2010; Cordero, 2010; Cruz, 2011b; Tello, 2011**), además estadísticamente hay una correlación positiva entre PN y YN (**Guevara, 2011**). Por lo tanto

las YN evaluadas en este trabajo, principalmente, pueden ser originadas por la ruptura de puentes cromatínicos en anafase.

Se ha reportado la inducción, por parte de las mismas Casiopeínas, de MN sin señal centromérica, bajo las mismas condiciones (**Guevara, 2011**), lo cual coincide con los resultados del presente estudio. Por lo que la ruptura de puentes cromatínicos en anafase también puede contribuir en la formación de MN, aunque en este estudio resultó ser mayor la cantidad de YN que MN inducidos por estos compuestos. Sin embargo, no puede asegurarse que existe preferencia para la formación de YN ya que el bloqueo de la citocinesis con cit-B ocasiona la reducción de la distancia entre los polos de la célula en anafase, disminuyendo así la tensión física e interfiere en el proceso de fragmentación de los puentes (**Minissi et al., 1999; Lindberg et al., 2007**). La evaluación de resolución de puentes cromatínicos en anafase por microscopía confocal (en lapso de tiempo) (**Pampalona et al., 2010; Utani et al., 2010**) ayudaría a corroborar y evaluar la frecuencia en que son formados YN y MN, en linfocitos tratados con las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a.

Ha sido propuesto que cromosomas multicéntricos o multiradiales pueden estar relacionados con la formación de YN inducidas por clastógenos, si estos cromosomas tienen dificultad en llegar a un polo en anafase y en telofase son descondensados y se forma la envoltura nuclear antes de integrarse completamente al núcleo (**Serrano y Montero, 2001**). Lo anterior puede explicar en parte las YN que son positivas para la señal de centrómero, en los cultivos tratados con la Casiopeína III-I-a, dado que el porcentaje de estas YN es menor con respecto a las que no presentan señal centromérica y se ha reportado una mínima inducción de aberraciones cromatídicas tales como trirradios y tetraradios por esta Casiopeína en linfocitos humanos (**Sánchez, 2010; Tello, 2011**).

La afinidad de las Casiopeínas con el ADN, y su probable acción intercalante, pueden ocasionar interferencias con la transcripción y errores en la replicación. Estos eventos también podrían contribuir a gemación nuclear (YN) y subsecuente micronucleación como ha sido propuesto por **Haaf y colaboradores (1999)** y **Yankiowsky y colaboradores (2000)**. Ellos sugieren que proteínas, como Rad 51, pueden dirigir fragmentos de ADN no

reparados o con defectos en la replicación a la periferia nuclear ocasionando la formación de YN que subsecuentemente originarán MN donde posiblemente el ADN que contienen es degradado en el citoplasma. Si los fragmentos de ADN no reparados, causado por los tratamientos con Casiopeínas, son eliminados del núcleo celular, en lugar de ser reparados por recombinación homóloga (evento donde se encuentra involucrada la proteína Rad 51), entonces este suceso podría explicar los bajos índices de recombinación reportados por **Arnaudeau y colaboradores (2000)** de las Casiopeínas Igly y III-I-a, lo que resulta importante para los tratamientos en clínica ya que el riesgo de inducir tumores secundarios sería menor.

## **8.2. Citotoxicidad**

Se entiende por citotóxico a aquel agente o proceso que suprime las funciones de las células o provoca su muerte (**Rienger et al., 1982**). En este estudio, para verificar los efectos citotóxicos de las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a, fueron evaluadas células apoptóticas y necróticas inducidas por estos compuestos de cobre (II) en linfocitos humanos.

Para el caso de las Casiopeínas Igly y IIgly los porcentajes de apoptosis y necrosis incrementaron significativamente en todas las concentraciones utilizadas, notándose un aumento de manera dosis dependiente de las células apoptóticas y su predominante incremento sobre las células necróticas. Esto puede representar una ventaja para los compuestos debido a que la apoptosis es considerada la mejor vía de muerte celular dado que ocurre de forma ordenada.

Con respecto a los cultivos tratados con Casiopeína III-I-a los porcentajes de apoptosis y necrosis incrementan significativamente en todas las concentraciones, pero a diferencia de las Casiopeínas Igly y IIgly, las células necróticas superan a las apoptóticas en la concentración mayor. Esto puede estar relacionado con la estructura química del compuesto, ya que a diferencia de las Casiopeínas Igly y IIgly la Casiopeína III-I-a está constituida con el ligando acetilacetato, el cual puede ser más citotóxico que la glicina posiblemente porque no se encuentra en las células de manera natural (**Alemón et al.,**

**2007).** Aunado a que las concentraciones de esta Casiopeína ( $9.43 \times 10^{-6}$ ,  $1.88 \times 10^{-5}$ ,  $2.83 \times 10^{-5}$   $\mu\text{M/ml}$ ) son mayores a las de las Casiopeínas Igly ( $1.08 \times 10^{-6}$ ,  $2.16 \times 10^{-6}$ ,  $4.32 \times 10^{-6}$   $\mu\text{M/ml}$ ) y IIgly ( $7.7 \times 10^{-7}$ ,  $1.54 \times 10^{-6}$ ,  $2.34 \times 10^{-6}$   $\mu\text{M/ml}$ ), esta concentración resulta ser muy tóxica para la célula induciendo principalmente necrosis. Finalmente, la Casiopeína III-I-a resulta ser citotóxica, por lo tanto es capaz de eliminar a las células y aunado a que parte de las características generales de las Casiopeínas es que son drogas catiónicas y lipofílicas, **Marín y colaboradores (2003)** proponen que podrían presentar mayor selectividad hacia las células tumorales y sus mitocondrias, debido a que presentan mayor potencial de membrana mitocondrial lo que favorecería su acumulación en la membrana interna de la mitocondria y la liberación del citocromo c promoviendo así la apoptosis.

**Alemón y colaboradores (2007)** proponen que la muerte celular sucede después del daño genotóxico en células tratadas con la Casiopeína Igly. Por lo que el daño al ADN ocasionado por las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a, puede ser responsable de los eventos de apoptosis que se muestran en este estudio. **Guevara (2011)** muestra que existe correlación positiva entre los efectos genotóxicos (MN, PN y YN) y citotóxicos (con relación a apoptosis) causados por estas Casiopeínas en las mismas concentraciones. Aunque en este estudio la concentración menor de la Casiopeína IIgly difiere de esta observación, porque el porcentaje de YN no fue significativo, pero los porcentajes de apoptosis y necrosis si lo fueron, esto puede ser debido a que las Casiopeínas tiene mas de un mecanismo de acción en la célula.

Algunos reportes sugieren que el centro metálico de cobre está involucrado en la toxicidad de las Casiopeínas (**Bravo et al., 2009**), en general la citotoxicidad ocasionada por el cobre ha sido relacionada con la tendencia de sus iones a participar en la formación de EROs.

La generación de EROs ha sido relacionado con la actividad citotóxica de las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a, en particular para las Casiopeínas IIgly y III-I-a con la inducción de apoptosis y solo por parte de la Casiopeína IIgly con la muerte celular independiente de caspasas (**Trejo et al., 2005; Carvalho, 2007**). En este estudio se observa que la Casiopeína

Igly también es capaz de inducir apoptosis, lo que seguramente está relacionado con la generación de EROs, aunque también debería corroborarse si las Casiopeínas Igly y III-I-a son capaces de inducir muerte celular dependiente de caspasas.

Aunque los tratamientos en este trabajo no fueron realizados en concentraciones equimolares, el menor porcentaje de muerte celular, tanto de apoptosis como de necrosis, observado para la Casiopeína Igly en comparación con la Casiopeína IIgly, en concentraciones menores por parte de la Casiopeína IIgly coincide con lo reportado por **Alemón y colaboradores (2007)** donde muestra que las Casiopeínas del grupo II son más citotóxicas que las Casiopeínas del grupo I. La causa se relaciona con los grupos sustituyentes de la fenantrolina, alquil y aril respectivamente, ya que los efectos electrónicos de estos influyen en el potencial redox del par Cu(II)/Cu(I) (**Bravo et al., 2009**).

### 8.3. Citostaticidad

Se considera citostático a cualquier agente físico o químico capaz de inhibir el crecimiento y la multiplicación celular (**Rienger et al., 1982**). El ensayo de MNBC permite evaluar el efecto citostático de los agentes examinados mediante el índice de división nuclear (IDN) y la proporción de células binucleadas (CBN) (**Fenech, 2000**).

Los resultados del presente trabajo muestran que el IDN de los tratamientos con las tres Casiopeínas (Igly, IIgly y III-I-a), no disminuyó significativamente, por lo que podría asumirse que estas Casiopeínas no presentan actividad citostática en linfocitos humanos *in vitro*.

Por otra parte, el porcentaje de CBN en los tratamientos con Casiopeína Igly disminuye significativamente solo en la concentración mayor. Con respecto a la Casiopeína IIgly el porcentaje de CBN no disminuyó en ninguna concentración. No así en los tratamientos con Casiopeína III-I-a, donde el porcentaje de CBN disminuyó significativamente en todas las concentraciones utilizadas. De acuerdo con estos resultados, las Casiopeínas Igly y III-I-

a, son citostáticas para linfocitos humanos *in vitro*; sin embargo, no aplica para la Casiopeína Igly.

Los resultados de citostaticidad de la Casiopeína Igly concuerdan con los de **Atilano (2007)**, por lo que al parecer los linfocitos humanos son poco susceptibles al efecto citostático de esta Casiopeína. Además **Alemón y colaboradores (2007)** indican que los linfocitos humanos son menos sensibles que las células HeLa (células transformadas), a varias Casiopeínas entre ellas la Igly.

En la concentración menor de la Casiopeína Igly (0.33 µg/ml) el porcentaje de las CBN incrementó significativamente, pero conforme aumentaba la concentración, el porcentaje de CBN tendió a disminuir.

El fenómeno de **Hormesis** se define como una respuesta adaptativa (a bajos niveles de estrés o daño) con una relación bifásica dosis-respuesta, es decir, exhibe en bajas dosis la estimulación y en altas dosis la inhibición del crecimiento celular, es resultado de un proceso biológico compensatorio ocasionado por una disrupción en la homeostasis (**Calabrese y Baldwin 2002**). El daño genotóxico, citotóxico, el incremento significativo del porcentaje de CBN en la concentración menor y la disminución de este al aumentar la dosis, por parte de la Casiopeína Igly, puede ser explicado por este fenómeno, por lo que probablemente si se incrementara la concentración de esta Casiopeína, podría presentarse efecto citostático en linfocitos humanos *in vitro*. Pero el efecto hormético debe de tomarse en cuenta en la clínica, ya que en bajas dosis podría estimular la proliferación celular y por lo tanto el crecimiento del tumor.

Quizá el incremento de CBN en la concentración menor de la Casiopeína Igly esta relacionado con la ausencia de YN en la misma concentración. Ya que esta Casiopeína puede generar daño al ADN pero las células se dividen como respuesta adaptativa para sobre recompensar este daño (**Calabrese y Baldwin 2002**).



La diferencia entre los resultados del IDN y del porcentaje de CBN podría deberse a que el porcentaje de CBN puede ser más sensible para evaluar la respuesta mitogénica de los linfocitos a los agentes probados.

Los porcentajes de las células polinucleadas reafirman el efecto citostático de las Casiopeínas Igly y III-I-a, porque las células mononucleadas incrementan, mientras que las células tri y tetranucleadas disminuyen de manera significativa en comparación con el testigo negativo.

## 9. CONCLUSIONES

- Las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a tienen la capacidad de inducir la formación de yemas nucleares (YN), en linfocitos humanos *in vitro*, por lo tanto son genotóxicas.
- La mayoría de las YN no presentaron señal para ADN centromérico, por lo tanto se verificó que son genotóxicas mediante un mecanismo de acción clastogénico.
- Las Casiopeína Igly y IIgly inducen muerte celular preferencialmente por apoptosis.
- La Casiopeína III-I-a induce muerte celular, principalmente por apoptosis en concentraciones bajas (4.2 y 8.4 µg/ml) y necrosis en concentraciones altas (12.6 µg/ml).
- El efecto genotóxico de las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a debe estar relacionado con la inducción de apoptosis en linfocitos humanos *in vitro*.
- El incremento de muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis en linfocitos humanos *in vitro*, reafirma el efecto citotóxico de las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a.
- La disminución significativa del porcentaje de células binucleadas en los tratamientos con las Casiopeínas Igly y III-I-a muestra el efecto citostático de estas sobre linfocitos humanos *in vitro*.
- La Casiopeína IIgly no presenta efecto citostático bajo las condiciones anteriormente descritas.

## **10. PERSPECTIVAS**

- Evaluar por microscopía confocal (de lapso de tiempo) los puentes cromatínicos inducidos por las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a en anafase para confirmar si la ruptura de estos origina YN y MN y en que frecuencia. Porque esto puede iniciar el ciclo rompimiento-fusión-puente y por lo tanto se sigue generando más aberraciones cromosómicas o también se pueden inducir amplificaciones génicas.
- Analizar células sincronizadas en fase S y por microscopía confocal (de lapso de tiempo) averiguar si las YN inducidas bajo estos tratamientos (Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a) pueden ser generadas en fase S.
- Identificar por la técnica FISH con painting, que cromosomas son más susceptibles al daño ocasionado por las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a en metafase y en interfase establecer si hay relación con la formación de YN, MN y PN (anormalidades nucleares).
- Realizar de nuevo el ensayo de MNBC en combinación de la técnica de FISH con sonda pancentromérica más sonda pantelomérica para diferenciar si el contenido de YN positivas para señal de centrómero observadas en este estudio pertenecen cromosomas completos o a fragmentos cromatínicos.
- Corroborar la inducción de apoptosis utilizando otras técnicas como la de TUNEL, citometría de flujo y análisis de Western blot (proteínas proapoptóticas).

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P.** (2003) *Biología molecular de la célula*. 4<sup>ta</sup> edición. Ediciones Omega. Barcelona. Pág. 669-670, 676- 677.

**Alemón R., Breña M., Muñoz J., Gracia M. y Ruiz L.** (2007) Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®). *Cancer Chemother Pharmacol*, 60: 219-228.

**Alemón R., Muñoz J., Ruiz L. y Gracia I.** (2008) Casiopeína IIgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicology*, 22: 710-715.

**Arnaudeau C., Tenorio E., Jensen D. y Helleday T.** (2000) Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research*, 461: 221-228.

**Atilano A.** (2007) Evaluación de daño genotóxico, citotóxico y citostático inducido por Casiopeína IIgly en cultivos de linfocitos humanos. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México D. F.

**Barron L.** (2006) Influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa y apoptótica del quelato mixto de cobre Casiopeína III-ia en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México D. F.

**Bravo M., Tovar A., Ruiz M., Ruiz L. y Moreno R.** (2002) Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas. Historia química de un proyecto exitoso. *Primer congreso en Casiopeínas*. UNAM. México D. F. 1-8.

**Bravo M., García J., Gracia I. y Ruiz L.** (2009) Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)] NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glycinato)] NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopeínas®). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103: 299-309.

**Calabrese E. y Baldwin L.** (2002) Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, 21: 91-97.

**Cancino D.** (2008) Evaluación de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas inducidos por un compuesto de cobre (Casiopeína III-ia) en linfocitos humanos in vitro. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México D. F.

**Carvallo F.** (2007) Efectos antiproliferativos y apoptóticos de las Casiopeínas® IIgly y III-ia en líneas tumorales humanas. Tesis de Doctorado. Ciencias de la Reproducción y de la Salud Animal. UNAM. México D. F.

**Carvalho F., Trejo C., Gómez C., Rodríguez E., Macías L., Cortés E., Cedillo C., Gracia I., Ruiz L., Madrid V. y Constantito F.** (2008) Casiopeína III-ia induce apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals*, 21: 17-28.

**Cermeño J.** (2007) Estudio del efecto genotóxico inducido *in vivo* por la Casiopeína IIgly y por la Casiopeína III-ia. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México D. F.

**Chen D., Milacic V., Frezza M. y Ping Dou Q.** (2009) Metal Complexes, their Cellular Targets and Potential for Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 15: 777-791.

**Cordero N.** (2010) Evaluación de los efectos toxicológicos inducidos por un compuesto de Cu (Casiopeína IIgly) durante las fases G1-S y G2-M mediante el ensayo de micronúcleos *in vitro*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México D. F.

**Cooper G. y Housman R.** (2002) La célula. 2<sup>da</sup> edición. Editorial Marbán. España. Pág. 435-452.

**Crisponi G., Nurchi V., Fanni D., Gerosa C., Nemolato S. y Faa G.** (2010) Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. *Coordination Chemistry Reviews*, 254: 876-889.

**Cruz M.** (2011a) Antología de toxicología molecular II. Reporte de servicio social, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México D. F.

**Cruz M.** (2011b) Evaluación de la genotoxicidad, citotoxicidad y citostaticidad inducidas por un compuesto de cobre (Casiopeína Igly) en linfocitos humanos durante la fase G1/S. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México D. F.

**Diamantis A., Magiorkinis E., Sakorafas G. y Androutsos G.** (2008) A Brief History of Apoptosis: From Ancient to Modern Times. *Onkologie*, 31: 702-706.

**Edinger A. y Thompson C.** (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinión in Cell Biology*, 16: 663-669.

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

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

**Fenech M., Chang W., Kirsch M., Holland N., Bonassi S. y 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., Kirsch M., Natarajan A., Surralles J., Crott J., Parry J., Norppa H., Eastmond D., Tucker J. y Thomas P.** (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26: 125-132.

**Fernandes T., Mazzeo D. y Marin M.** (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 88: 252-259.

**Florín D.** (2005) Estimación de los rompimientos de cadena sencilla inducidos en el DNA de leucocitos humanos de sangre periférica expuestos a Casiopeína IIgly. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México D. F.

**Gaetke L. y Chow C.** (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189: 147-163.

**Gisselsson D., Björk J., Höglund M., Mertens F., Dal Cin P., Akerman M. y Mandahl N.** (2001) Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *American Journal of Pathology*, 158: 199-206.

**Gracia I., Ruiz L., Gomez C., Tinoco M., Márquez A., Romero, L. Marin A., Madas L. y Bravo E.** (2001) Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeínas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel. *Metal Based Drugs*, 8: 19-28

**González E.** (2004) Efecto teratogénico de la Casiopeína II. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores. UNAM. México D. F.

**Guevara S.** (2008) Efectos de la Casiopeína IIgly en el material genético de linfocitos humanos *in vitro* de sangre periférica. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México D. F.

**Guevara S.** (2011) Estudio del origen de los micronúcleos, inducidos por compuestos de cobre II (Casiopeínas<sup>®</sup>) en linfocitos humanos *in vitro*, mediante citogenética molecular (FISH). Tesis de Maestría. Ciencias Biológicas Experimentales. Facultad de Superiores Zaragoza. UNAM. México D. F.

**Haaf T., Raderschall E., Reddy G., Ward D., Radding C. y Golub E.** (1999) Sequestration of Mammalian Rad51-Recombination Protein into Micronuclei. *The Journal of Cell Biology*, 144: 11-20.

**Hoffelder D., Luo L., Burke N., Watkins S., Gollin S. y Saunders W.** (2004) Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma*, 112: 389-397.

**Hozák P., Josée A., Raymond Y. y Cook P.** (1995) Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *Journal of Cell Science*, 108: 635-644.

**Itoh N. y Shimizu N.** (1998) DNA replication-dependent intranuclear relocation of double minute chromatin. *Journal of Cell Science*, 111: 3275-3285.

**Kachadourian R., Brechbuhl H., Ruiz L., Gracia I. y Day B.** (2010) Casiopeína II-gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*, 268: 176-183.

**Kehrer J.** (2000) The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149: 43–50.

**Lindberg H., Wang X., Järventaus H., Falck G., Norppa H. y Fenech M.** (2007) Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research*, 617: 33-45.

**Lehninger A., Nelson D. y Cox M.** (2009) Principios de bioquímica. Ediciones Omega, 5<sup>ta</sup> edición. Barcelona. Pág. 882-891.

**Marín A., Gracia I., Ruiz L. y Moreno R.** (2003) Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology*, 65: 1979-1989.

**Mejía C. y Ruiz L.** (2008) Casiopeinas II-gly and III-ia Induce Apoptosis in Medulloblastoma Cells. *Pathology & Oncology Research*, 14: 467-472.

**Miller O. y Therman E.** (2001) Human chromosomes. 4<sup>ta</sup> edición. Editorial Springer-Verlag. New York U.S.A. Pág. 369-379.

**Minissi S., Gustavino B., Degrassi F., Tanzarella C. y Rizzoni M.** (1999) Effect of cytochalasin B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 14: 43-49.

**Morais D. y Marin M.** (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682: 71-81.

**Morriso R. y Boynd R.** (1996) Química Orgánica. 5<sup>ta</sup> edición. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana. U.S.A. Pág. 730-732.

**Murray R. y Spiegel.** (1969) Estadística. Teoría y problemas. Editorial McGraw-Hill. Panamá. Pág. 168-171.

**Pampalona J., Soler D., Genescà A. y Tusell L.** (2010) Telomere dysfunction and chromosome structure modulate the contribution of individual chromosomes in abnormal nuclear morphologies. *Mutation Research*, 683: 16-22.

**Pérez A.** (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. UNAM. México D. F.

**Plant N.** (2003) *Molecular Toxicology*. Editorial BIOS Scientific Publisher. U.S.A. Pág. 149.

**Rivero A., Vizcaya A., Plant N., Ruiz L. y Dobrota M.** (2007) Mixed chelate copper complex, Casiopeína Igly®, binds and degrades nucleic acid: A mechanism of cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 165: 189-199.

**Rieger R., Michaelis A. y Green M.** (1982) Diccionario de genética y citogenética. Editorial Alhambra. España. Pág. 79.

**Roldán E. y Gómez A.** (2008) Evaluación de aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly. 2<sup>do</sup> Congreso Nacional de Química Médica.

**Sadler P. y Guo Z.** (1998) Metal complexes in medicine: Design and mechanism of action. *Pure and Applied Chemistry*, 70: 863-871.

**Sánchez C.** (2010) Evaluación de aberraciones cromosómicas por efecto de la Casiopeína III-IA en cultivos de linfocitos humano. Reporte de servicio social, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México D. F.

**Santiago Y.** (2004) Efecto genotóxico de los tratamientos agudo y subcrónico de la Casiopeína Igly en machos, hembras, hembras preñadas y fetos de ratón CD-1. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México D. F.

**Serrano L. y Montero R.** (2001) Micronuclei and Chromatid Buds are the Result of Related Genotoxic Events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38: 38-45.

**Shimizu N., Itoh N., Utiyama H. y Wahl G.** (1998) Selective Entrapment of Extrachromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation during S Phase. *The Journal of Cell Biology*, 140: 1307-13020.

**Shimizu N., Shimura T. y Tanaka T.** (2000) Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research*, 448: 81-90.

**Shimizu N.** (2011) Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements. *Mutagenesis*, 26: 119-123.

**Stephen T. y Douglas G.** (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews*, 11: 621-632.

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



- Tanaka T. y Shimizu N.** (2000) Induced detachment of acentric chromatin from mitotic chromosomes leads to their cytoplasmic localization at G1 and the micronucleation by lamin reorganization at S phase. *Journal of Cell Science*, 113: 697-707.
- Tello M.** (2011) Evaluación de micronúcleos y aberraciones cromosómicas inducidos por un nuevo compuesto de coordinación de cobre (Casiopeína III-I-a) en linfocitos humanos *in vitro* durante G1/S. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México D. F.
- Thompson K. y Orvig C.** (2006) Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. *The Royal Society of Chemistry*, 761–764.
- Todd R. y Lippard S.** (2009) Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *The Royal Society of Chemistry*, 1; 280-291.
- Tovar A., Ruiz L. y Campero A.** (2002) Interacción entre Casiopeínas y adenina. *Primer congreso en Casiopeínas*. UNAM. México D. F. 121-128.
- Trejo C., Palencia G., Zúñiga S., Rodríguez A., Osorio L., Sanchez L., Gracia I., Marquez L., Sánchez A., Moreno M., Cruz A., Bravo M., Ruiz L., Rodríguez S. y Sotelo J.** (2005) Cas II gly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells *In Vitro* and *In Vivo* through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Neoplasia*, 7; 563-574.
- Uribe P.** (2010). Estudio de la muerte celular y daño genotóxico inducidos *in vitro* por un nuevo compuesto de cobre Casiopeína Igly. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México D. F.
- Utani K., Kohno Y., Okamoto A. y Shimizu N.** (2010) Emergence of Micronuclei and Their Effects on the Fate of Cells under Replication Stress. *PLoS ONE*, 5: 1-12.
- Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M. y Mazur M.** (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40.
- Vizcaya A., Rivero A., Riuz L., Kass G., Kelland L., Orr R. y Dobrota M.** (2000) Induction of Apoptosis by Novel Copper-based Anticancer Compound, Casiopeina II, in L1210 Murine Leukaemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells. *Toxicology*, 14: 1-5.
- Wang X., Thomas P., Xue J. y Fenech M.** (2004) Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutation Research*, 551: 167-180.
- Wang T. y Guo Z.** (2006) Copper in Medicine: Homeostasis, Chelation Therapy and Antitumor Drug Desing. *Current Medicinal Chemistry*, 13: 525-537.
- Williams D.** (1972) Metals, ligands, and cancer. *Chemical Reviews*, 72: 208-213.

**Yankiwsky V., Marciniak R., Guarente L. y Neff N.** (2000) Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells. *Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A.*, 97: 5214-5219.

## 12. ANEXOS

### 12.1. Preparación de reactivos para ensayo de MNBC

**Casiopeína Igly (Facultad de química, UNAM):** pesar 6.15 g de Casiopeína Igly y disolver en 10 ml de agua estéril, posteriormente adicionar 10  $\mu$ l de dimetil sulfoxido al 1% y agitar. Para administrar las diferentes concentraciones de Casiopeína Igly; 0.615, 1.23 y 2.46  $\mu$ g/ml, se adiciona a 5 ml de medio de cultivo 5, 10 y 20  $\mu$ l, respectivamente. Debe almacenarse en refrigeración y obscuridad (tiene una vida media de una semana).

**Casiopeína IIgly (Facultad de química, UNAM):** pesar 2 mg de Casiopeína IIgly y disolver en 4 ml de agua inyectable (Stock 1), de aquí tomar 100  $\mu$ l y agregar a 900  $\mu$ l de agua inyectable (Stock 2). Para administrar las diferentes concentraciones de Casiopeína IIgly; 0.33, 0.66 y 1.00  $\mu$ g/ml, se adiciona a 5 ml de medio de cultivo 0.33, 0.66 y 100  $\mu$ l del stock 2, respectivamente. Debe almacenarse en refrigeración y obscuridad (tiene una vida media de una semana).

**Casiopeína III-I-a (Facultad de química, UNAM):** pesar 1.05 mg de Casiopeína III-I-a y disolver en 5 ml de agua estéril. Para administrar las diferentes concentraciones de Casiopeína III-I-a; 4.2, 8.4 y 12.6  $\mu$ g/ml, se adiciona a 5 ml de medio de cultivo, 100, 200 y 300  $\mu$ l, respectivamente. Debe almacenarse en refrigeración y obscuridad (tiene una vida media de una semana).

**Mitomicina C (SIGMA U.S.A.):** el vial con 2 mg se diluyen con 4 ml de agua inyectable para obtener una concentración de 0.5  $\mu$ g/ml. Extraer del vial 100  $\mu$ l y diluir en 900  $\mu$ l de agua inyectable (stock 1). Tomar 200  $\mu$ l del stock 1 y agregar 800  $\mu$ l de agua inyectable (stock 2). Del stock 2 extraer 100  $\mu$ l y adicionarlos a 5 ml de medio de cultivo, para tener una concentración final de 0.2  $\mu$ g/ml. Almacenar en refrigeración.

**Colchicina (SIGMA U.S.A.):** disolver 2 mg de colchicina en 10 ml de agua estéril y agitar. Tomar una alícuota de 100  $\mu$ l de la solución anterior y llevar a un mililitro, con 900  $\mu$ l de agua inyectable (stock 1). Del stock 1 tomar 100  $\mu$ l y nuevamente llevar a un mililitro con

900 µl de agua inyectable (stock 2). Del stock 2 se toma una alícuota de 100 µl y se adiciona a 5 ml de medio de cultivo para tener una concentración final de 0.04 µg/ml. Esterilizar con un filtro con poro de 0.02 µm y mantener en refrigeración.

**Citocalasina-B (SIGMA U.S.A.):** disolver el contenido del vial (5 mg) en 1.6 ml de dimetilsulfóxido (stock 1), extraer 100 µl del stock 1 y se le agrega 900 µl de agua inyectable (stock 2). Del stock 2, extraer 100 µl y adicionarlos a 5 ml de medio de cultivo, para tener una concentración final de 6 µg/ml. Esterilizar con un filtro con poro de 0.02 µm y tanto el stock 1 como el stock 2 se almacenan en congelación.

**Lectina PHA-M (SIGMA U.S.A.):** disolver el contenido del vial (5 mg) en 10 ml de agua inyectable y almacenar en refrigeración. Se adiciona 0.25 ml por cada 5 ml de medio de cultivo.

**Metanol: ácido acético (3:1) (J. T. Baker, México):** se divide el total de mililitros a preparar, entre 4, para obtener la proporción del ácido acético, el resto es la proporción del metanol.

**Metanol: ácido acético (85:15) (J. T. Baker, México):** para 100 ml de fijador son 85 ml de metanol y 15 ml de ácido acético.

**May-Grünwald (2:1) (SIGMA U.S.A.):** por cada dos mililitros de de May-Grünwald, se agrega uno de agua destilada. Se divide el total de mililitros a prepara entre 3, para obtener la proporción de agua destilada, y el restante es el colorante.

**Giemsa (1:10) (SIGMA U.S.A.):** por cada mililitro de Giemsa se agregan 10 ml de agua desionizada.

## **12.2. Preparación de reactivos para la técnica de FISH**

**Solución 20xSCC (para un litro) (J. T. Baker, México):** pesar 175.3 g de cloruro de sodio (NaCl), 88.2 g de citrato de sodio (NaCOH5O7) en 800 ml de agua destilada ajustando el pH a 5.3 con ácido clorhídrico al 1% (HCL) y aforar hasta llegar al volumen deseado.

**Solución 0.3% de Igepal (KREATECH, POSEIDON, Ámsterdam) en 0.4xSCC (para 500 mL) (J. T. Baker, México):** en 488.5 ml de agua destilada agregar 10 ml de la solución 20xSCC, y 1.5 ml del detergente igeal. La solución debe presentar un pH de 7 a 7.5, ajustando con hidróxido de sodio (NaOH) al 1N.

**Solución 0.1 % de Igepal en 2xSCC (para 500 ml):** en 449.5 ml de agua destilada se adicionan 50 ml de 20xSCC y 0.5 ml de igeal, ajustando el pH de 7 a 7.5 con NaOH al 1N.

**Solución Citrato Salina 2xCSS (para 500 ml):** pesar 4.410 g de citrato de sodio (NaCOH5O7), 8.7663 g de cloruro de sodio (NaCl) y aforar a 500 ml.

**Metanol: ácido acético (70:30) (J. T. Baker, México):** para preparar 100 ml, 70 ml son de metanol y 30 ml son de ácido acético.

### 12.3. Participación académica

- **VI CONGRESO DE INVESTIGACIÓN EN LA FES ZARAGOZA, septiembre de 2010.**  
Presentación del trabajo libre (oral): YEMAS NUCLEARES Y MUERTE CELULAR EN LINFOCITOS HUMANOS *in vitro* TRATADOS CON CASIOPEÍNAS Igly, Ilgly y III-I-a.
- **VII FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA, febrero de 2011.**  
Presentación del trabajo: EVALUACIÓN DE YEMAS NUCLEARES EN LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO TRATADOS CON COMPUESTOS DE COBRE II.
- **XXXVI CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA HUMANA, noviembre de 2011.**  
Presentación de trabajo libre (cartel): INDUCCIÓN DE YEMAS NUCLEARES EN LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO POR COMPUESTOS DE COBRE II (Casiopeínas® Igly, Ilgly y III-I-a).



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



## CONSTANCIA

Que se otorga a:

**MARTÍNEZ CALDERÓN ANA LAURA, GUEVARA CHÁVEZ  
SOLEDAD, ROLDÁN REYES ELIA.**

POR SU PARTICIPACIÓN CON LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO LIBRE: **YEMAS NUCLEARES Y MUERTE CELULAR EN LINFOCITOS HUMANOS *in vitro* TRATADOS CON CASIOPEÍNAS Igly, IIgly Y III-I-a.** EN EL MARCO DEL VI CONGRESO DE INVESTIGACIÓN EN LA FES ZARAGOZA.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D.F. a 7 de Septiembre de 2010

CD. Alfredo S. Sánchez Figueroa  
Director

Ana Laura Martínez Calderón



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**



### **VII FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA**

VIII FORO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA, XXXVI FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR, XL FORO DE SALIDAS TERMINALES

**Otorgan la presente constancia a:**

Martínez Calderón Ana Laura<sup>1</sup>, Guevara Chávez Soldad<sup>1</sup>, Roldán Reyes Elia<sup>2</sup>

**por la presentación del trabajo:**

**EVALUACIÓN DE YEMAS NUCLEARES EN LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO  
TRATADOS CON COMPUESTOS DE COBRE II**

M en C. ELISEO CANTELLANO DE ROSAS  
Jefe de la División de Ciencias Químico Biológica

ATENTAMENTE  
"Por mi raza hablará el espíritu"  
4 de febrero de 2011

1 Alumno 2 Docente

DR. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ  
Jefe de la Carrera de Biología

Ana Laura Martínez Calderón



ASOCIACIÓN MEXICANA DE  
GENÉTICA HUMANA A.C.



**UADY**  
UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

# XXXVI CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA HUMANA

Otorga el presente

*Reconocimiento*

a


Ana Laura Martínez Calderón


por la presentación de Trabajo Libre CARTEL

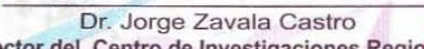
**INDUCCIÓN DE YEMAS NUCLEARES EN LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO POR  
COMPUESTOS DE COBRE II (Casiopeínas® Igly, IIgly y III-I-a)**

de los autores

Ana Laura Martínez Calderón, Soledad Guevara Chávez, Elia Roldán Reyes

  
Dr. José de Jesús Williams  
Director General de Desarrollo  
Académico de la UADY

  
M. en C. Alicia B. Cervantes Peredo  
Presidente AMGH

  
Dr. Jorge Zavala Castro  
Director del Centro de Investigaciones Regionales  
Dr. Hideyo Noguchi de la UADY

Mérida, Yucatán, 16 al 19 de noviembre del 2011

Ana Laura Martínez Calderón