



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**“EVALUACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO, CITOTÓXICO
Y CITOSTÁTICO INDUCIDO POR CASIOPEÍNA Ilgly EN
CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

ARTURO HUITZILIHUITL ATILANO ALVARADO

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Roldán Reyes Elia



MÉXICO, D. F.

JUNIO 2007



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.

A Elena

Por su inspiración sin medida.

A mi familia

Fieles guardianes de mi camino.

A mis compañeros

Que sin necesidad de cátedra me
enseñaron tanto.

A mi asesora

Por su paciencia infinita.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	
Cáncer	5
Quimioterapia	5
Producción de antineoplásicos	7
Casiopéinas	8
Casiopéina IIgly	12
Evaluaciones genotóxicas	13
Linfocitos	14
Alteraciones citogenéticas	15
Micronúcleos	17
Aberraciones cromosómicas	20
Asociaciones de Satélites	23
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	
Generales	26
Particulares	26
METODOLOGÍAS	
Micronúcleos <i>in vitro</i> con bloqueo de la citocinesis	27
Aberraciones cromosómicas	29
Asociación de satélites	31
RESULTADOS	32

	Página
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES Y COMENTARIOS	47
PERSPECTIVAS	48
BIBLIOGRAFÍA	49

ABREVIATURAS

AC	Aberración Cromosómica
ACE	Aberración Cromosómica Estructural
ACN	Aberración Cromosómica Numérica
AS	Asociación de Satélites
Cis PPT	Cis-Diaminodicloroplatino (II) (cisplatino)
DS	Desviación Estándar
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
IDN	Índice de División Nuclear
IM	Índice Mitótico
MMC	Mitomicina C
MN	Micronúcleos
RCD	Rompimiento de Cadena Doble
RCS	Rompimiento de Cadena Sencilla
X	Promedio

RESUMEN

Respondiendo a la constante necesidad de encontrar más y mejores agentes antineoplásicos, en la Facultad de Química de la UNAM, se sintetizaron toda una familia de compuestos del tipo quelatos mixtos de cobre (II), a los cuales se les denominó Casiopeínas.

De los cerca de cien compuestos patentados de esta familia, la Casiopeína IIgly- aqua (4,7- dimetil- 1, 10 fenantrolina) (glicina) cobre II Nitrato, ha mostrado un espectro de acción amplio contra tumores sólidos y contra líneas celulares como HeLa, CaLo, L1210, S180, B16 y LW1.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad citostática, citotóxica y genotóxica de la Casiopeína IIgly empleando como parámetros; el índice de división nuclear (IDN), el índice mitótico (IM), la frecuencia de Micronúcleos (MN), la presencia de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (ACN y ACE), así como la frecuencia de asociación de cromosomas satelizados o asociación de satélites (AS), en linfocitos de sangre periférica *in vitro*. Utilizando tres concentraciones diferentes del fármaco (1, 0.66 y 0.33 $\mu\text{g/ml}$).

Los resultados muestran que con la dosis y en el sistema de prueba utilizado:

- La Casiopeína IIgly no presenta un efecto citostático, es decir, no afecta la división de linfocitos de sangre periférica.
- La citotoxicidad expresada por el Índice Mitótico (IM), refleja una alta agresividad del fármaco a dosis elevadas y que se

observa aún en concentraciones en que el daño al ADN no resulta evidente.

- La presencia de Micronúcleos (MN) y Aberraciones Cromosómicas Estructurales (ACE), revelan actividad genotóxica, que no obstante, a dosis reducidas (0.33 $\mu\text{g/ml}$), no implica daño evidente al material genético.
- El incremento de las Asociaciones de Satélites (AS), por célula aumenta el riesgo de formación de anormalidades cromosómicas como traslocaciones y no disyunciones.
- La Casiopeína IIgly no produce ACN.

Los datos mostrados por esta investigación, pueden y deben ser complementados con los resultados adquiridos en otros estudios, realizados con alguno de los fármacos que conforman la familia de las Casiopeínas, para un mejor conocimiento de sus efectos y comprender sus mecanismos.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

El cáncer, enfermedad degenerativa y mortal que se ha convertido en el azote de nuestro tiempo. La contaminación del aire, del suelo y del agua por agentes xenobióticos, ha propiciado a que este mal se presente con mayor frecuencia. Los esfuerzos por combatirla son vastos, pero poco satisfactorios, pues solo un porcentaje muy bajo de pacientes tratados con las técnicas modernas, logran una recuperación total.

Hasta hace cincuenta años, la única estrategia con la que se contaba para la eliminación de tumores cancerosos, era la extirpación quirúrgica, por desgracia, la ubicación inconveniente y la capacidad invasiva de algunas de estas neoplasias, hicieron imposible el tratamiento eficaz de la enfermedad por esta vía, por otro lado, obligó a un sector muy amplio de la comunidad científica, a la búsqueda de nuevas alternativas. Es así, como durante la década de los 50', surgen la radioterapia y la quimioterapia, como una opción para hacer frente a tumores con carácter metastásico, (De Vita *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1996).

QUIMIOTERAPIA

Hoy en día, son muchos los agentes químicos que se utilizan en la terapia del cáncer, dentro de estos, podemos encontrar; agentes alquilantes, antibióticos, hormonas y misceláneos, (Rosenberg, 1999). El éxito en el uso de estos compuestos, depende del tipo de cáncer a tratar y de su grado de desarrollo. Así mismo, la creación y el empleo de cada uno de estos quimioterapéuticos, trata de aprovechar las

diferencias que existen entre las células sanas y las cancerosas, pues estas últimas presentan variaciones superficiales, metabólicas y un aumento en la velocidad de división, (Alberts *et al.*, 1994).

Por desgracia, aún no se ha podido obtener un fármaco enteramente selectivo, por lo que un gran número de células normales resultan afectadas por estos agentes. Los folículos pilosos, la médula ósea, y el epitelio intestinal y pulmonar, son algunos de los tejidos más afectados, debido a que estos presentan una capacidad de proliferación muy parecida a las células neoplásicas. Todos los fármacos usados dentro de la quimioterapia, tienen cierto grado de actividad teratogénica, mutagénica y carcinogénica, (Pratt y Ruddon, 1979), por lo que su uso debe ser moderado y bajo una supervisión médica estricta y constante.

De hecho, algunos de los antineoplásicos más efectivos, son también los más tóxicos, como el caso de la Mitomicina C, (MMC), el cuál es un antibiótico que se utiliza contra cáncer de ovario, pecho, pulmón, cerviz, y tracto gastrointestinal, leucemia mieloide crónica, linfomas y melanoma, (Clarisse, *et al.* 1976), y cuyos efectos colaterales para pacientes tratados con este medicamento son: depresión del sistema inmune, trombocitopenia, celulitis local, anorexia, náusea, vómito, estomatitis, diarrea y alopecia.

Otro de los quimioterapeúticos más usados, es el cis-Diaminodicloroplatino (II) (cisplatino), desarrollado en 1965 por Barnett Rosenberg. Este compuesto forma aductos con varias moléculas biológicas, principalmente con el ADN, por lo que este se fragmenta y genera rompimientos cromosómicos y Micronúcleos (MN), (Mazur, *et al.*, 2000); observándose así, una elevada actividad citotóxica, que es la razón de su relativo éxito en la eliminación de células cancerosas, pero que al mismo tiempo es la causa de reacciones adversas parecidas a las de la MMC, agregando a estas; daños severos al riñón e hígado, (Lippert, 1999).

Sin embargo el mayor mérito del cisplatino, fue sentar las bases estructurales en las que se apoya para la creación de nuevos quimioterapeúticos.

PRODUCCIÓN DE ANTINEOPLÁSICOS

Existen cuarenta y cuatro compuestos tanto de origen orgánico como inorgánico, que han sido aprobados para su uso contra el cáncer, no obstante, el surgimiento de tumores refractarios a estos tratamientos, los efectos tóxicos desagradables y los costos elevados de estos tratamientos, han promovido la búsqueda continua de moléculas que posean verdadera actividad antineoplásica, (Magrath, 1989; Boyd y Paull, 1995).

Así mismo, el camino para el desarrollo de un fármaco es verdaderamente complicado, largo y costoso. Al final, el resultado es impredecible y puede llegar a ser desfavorable. Cientos de compuestos químicos deben ser aislados o sintetizados y probados para encontrar el que resulte óptimo para lograr una actividad farmacológica

especifica, sin que esta involucre efectos colaterales de consideración, (Chi- Jen, 2000).

En el caso concreto de los agentes anticancerígenos, el desarrollo y empleo de nuevos quimioterapéuticos presenta dificultades particulares, pues la bioquímica de los diferentes tipos celulares que conforman los tumores difiere, al igual que la resistencia a los fármacos, así como la baja predictibilidad de los modelos animales, (Boyd, 2004; Pagé, 2004).

Afortunadamente, hoy en día, se cuenta con el conocimiento, las técnicas y la tecnología necesarias para modificar moléculas tanto de origen natural como sintético, a fin de mejorar su farmacocinética, (absorción, distribución y eliminación) y su farmacodinámica, (mecanismos de acción del fármaco, sitios de unión en la célula), permitiendo así, que su efectividad para destruir células cancerígenas se vea incrementado, (Chi- Jen, 2000).

CASIOPEÍNAS

Respondiendo a la constante necesidad de encontrar más y mejores agentes antineoplásicos, en la Facultad de Química de la UNAM, se sintetizaron toda una familia de compuestos del tipo quelatos mixtos de cobre (II), y a los cuales se les denominó Casiopeínas[®], (Ruiz-Azuara, 1992), y cuya fórmula general es:



Donde N-N .- Ligante diimina (fenantrolinas o bipyridinas substituidas

N-O .- Ligante aminoacidatos ó péptidos

O-O .- Ligante donador (acetilacetionato o salicilaldehido)

La Dra. Lena Ruiz Azuara, investigadora y catedrática de la Facultad de Química de la UNAM, inició el desarrollo de las Casiopeínas en 1976, partiendo de la observación de la estructura del cisplatino (figura 1), el cuál resultaba un anticancerígeno implacable, que por desgracia, también presentaba efectos adversos severos. Por tal motivo, la Dra. Ruiz prefirió trabajar con otros metales diferentes al platino, que a su vez resultaran por si mismos menos tóxicos y que pudieran ser eliminados fácilmente por medio de procesos homeostáticos. Los metales esenciales para procesos vitales como el hierro, el cobre y el zinc, fueron idóneos para realizar pruebas, y de estos, los compuestos formados con cobre en su nivel de oxidación II, resultaron los más parecidos geoméricamente a los compuestos de platino, (Ruiz- Azuara, 2000), pues al igual que este, el cobre forma estructuras cuyos átomos se encuentran en un mismo plano. Al mismo tiempo, la abundancia del cobre en la naturaleza, constituye una ventaja frente al platino, en cuanto a costos se refiere.

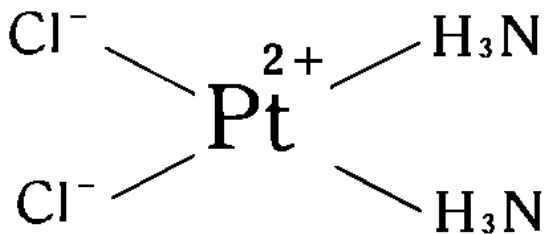


Figura 1. Estructura química del cisplatino¹.

¹ La Dra. Lena Ruiz se basó en la geometría de esta molécula para desarrollar las Casiopeínas, ambos fármacos comparten un centro metálico y una estructura plana.

Todas las Casiopeínas contienen un ligante diimina distinto, con características hidrofóbicas, que le permiten actuar como intercalante con las bases del ADN, por otro lado, el ligante hidrofílico le permite a la molécula ser transportada con facilidad. La variabilidad en el tipo, el número y la posición de los ligantes, son los responsables de generar selectividad preferencial sobre algunos tejidos tumorales específicos, (Ruiz-Azuara, 2000; Bravo *et al*, 2002).

De los cerca de cien compuestos patentados de la familia de las Casiopeínas®, se han seleccionado los más activos y menos tóxicos para realizar pruebas preclínicas en animales, como gatos con leucemia viral felina y en ratones “desnudos” o sin respuesta inmune a los cuales se les introdujo un tumor humano. Los resultados han sido exitosos. Del total de compuestos se eligieron 24, de los cuales se seleccionaron cinco y, finalmente, dos, los más prometedores por su solubilidad y su selectividad para leucemia y carcinomas. Estas dos moléculas llevan el nombre de Casiopeínas® II y III, ambas han demostrado tener la mayor actividad antineoplásica en los ensayos exigidos por el “Cancer Chemotherapy National Service Center del National Center Institute”, de los Estados Unidos, y de las cuales hasta el momento se tienen nueve subfamilias, unas más activas que otras ya sea *in vitro* o *in vivo*, (Ruiz-Azuara *et al*, 1995; González, 2004).

Debido a su citotoxicidad, las Casiopeínas® II y III han mostrado gran actividad antineoplásica al ser usados en las líneas tumorales L1210, S180, B16, S189, SiHa, CaSki, C33-A, CaLo y HeLa, sin embargo al realizar estudios toxicológicos *in vivo* con la LD₅₀, estas resultaron ser de una toxicidad reducida, (Ruiz- Ramírez *et al.*, 1991; Ruiz- Ramírez *et al.*, 1993; Gracia-Mora 2001). Mientras que al ser probados *in vitro*, la

inhibición del índice mitótico fue hasta cuatro veces menor en comparación con el cisplatino o la MMC, (Morales *et al.*, 1995).

Anteriormente, algunos estudios habían aportado evidencia de que las Casiopeínas® interaccionaban con el ADN, por ejemplo, se comprobó que inducen apoptosis en líneas celulares como L1210 y CH1, donde se observó condensación de cromatina y fragmentación nuclear; así mismo, se produjeron mutaciones en ojos y alas de *Drosophila melanogaster*, (Cruces *et al.*, 1994; Vizcaya Ruiz *et al.*, 2000), hoy en día, se sabe que las Casiopeínas® tienen una reacción de apilamiento entre los sustituyentes, (bipiridina o fenantrolina) de la Casiopeína y el anillo que conforma a la Adenina, lo cual sugiere que las Casiopeínas® actúan como intercalantes, (Tovar *et al.*, 2002; Cirigo *et al.*, 2002).

A la fecha, las Casiopeínas® se encuentran en la fase preclínica y se están realizando los estudios necesarios para obtener información sobre su farmacodinámica y sus propiedades toxicológicas, dentro de esta última, es necesario evaluar el daño producido al material genético. Cabe resaltar que también se están llevando a cabo trabajos en los que se trata de establecer los mecanismos de inducción de daño de las Casiopeínas®, mediante el análisis de apoptosis en células de carcinoma de colón; así como estudios de interacción de las Casiopeínas® con la molécula de ADN y la interacción con citocromo p-450, (Verdejo *et al.*, 1998; Carballo *et al.*, 2002; Santiago, 2004).

CASIOPEÍNA Ilgly

La Casiopeína Ilgly- aqua (4,7- dimetil- 1, 10 fenantrolina) (glicina) cobre II Nitrato (figura 2), tiene un peso molecular de 425 g/mol y un pKa de 5.4, es estable en estado sólido y una vez disuelta en agua hasta por 21 días en condiciones de oscuridad y refrigeración. La Casiopeína Ilgly, se disocia en pH ácido, por lo que no puede ser suministrada oralmente, (Reyes *et al.*, 2002; Ruíz- Azuara *et al.*, 1995; Ferrer *et al.*, 1995).

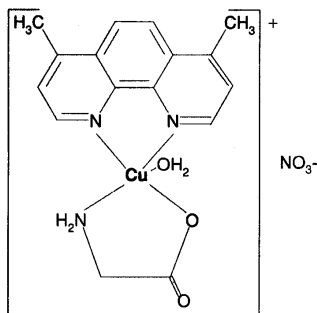


Figura 2. Estructura química de la Casiopeína Ilgly.²

En distintas pruebas, la Casiopeína Ilgly a mostrado una mayor reducción del índice mitótico en contraste con el cisplatino y la MMC; además tienen un espectro de acción amplio contra tumores sólidos y contra líneas celulares como HeLa, CaLo, L1210, S180, B16 y LW1; es citotóxica y también mata células por apoptosis; puede degradar ADN y realizar interacciones con la Adenina y con proteínas plasmáticas como la albúmina, además de ser embriotóxica y teratogena, (Huber *et al.*, 1987; Morales *et al.*, 1995; De Vizcaya *et al.*, 1996; Rivero, Müller *et al.*, 1998; Tovar *et al.*, 2002; González, 2004).

² Al igual que el resto de las casiopeínas; esta contiene un centro metálico de cobre II, además de un ligante fenantrolina y otro aminoácido.

Las características antes mencionadas hacen de la Casiopeína Ilgly una fuerte candidata a convertirse en un fármaco de uso común para combatir el cáncer. No obstante, aún se requieren la realización de varias pruebas para alcanzar este fin.

EVALUACIONES GENOTÓXICAS

Los estudios de genotoxicidad, se refieren al análisis sistemático de los efectos que diversos agentes físicos, químicos y biológicos presentes en el ambiente, puedan tener sobre el material genético de los organismos, (Roldán, 1992).

El hecho de que la composición y estructura del ADN, sea esencialmente la misma en todos los organismos ha permitido utilizar una serie de modelos biológicos de prueba para obtener información útil sobre el potencial de los agentes químicos que inducen cambios hereditarios (Roldán, 1992).

Con base en el nivel de detección del daño genético, los diferentes sistemas biológicos de prueba se pueden separar en cuatro grupos:

Grupo 1.- Son todas aquellas pruebas que detectan el posible daño al ADN a nivel molecular, dan información suficiente para clasificar a los agentes como mutágenos potenciales.

Grupo 2.- Incluye las pruebas que detectan mutaciones a nivel celular, ya sea de una manera directa o indirecta, mediante el empleo de microorganismo, plantas superiores, células en cultivo o mamíferos completos, lo que permite tener un mayor poder de resolución.

Grupo 3.- Son todos aquellos sistemas que permiten establecer los efectos directos de los agentes mutagénicos sobre los cromosomas.

Grupo 4.- Recopila una serie de ensayos a largo plazo, que hacen evidente el efecto de los agentes sobre la descendencia de los organismos tratados.

Dentro de los sistemas biológicos de prueba utilizados, el cultivo de células de mamífero se ha considerado como uno de los sistemas ideales para poder evaluar los efectos citogenéticos de una gran cantidad de agentes mutagénicos, donde el cultivo de linfocitos humanos es uno de los más usados para este fin (Natarajan y Obe, 1982).

LINFOCITOS

Para la realización de ensayos mutagénicos, el linfocito ofrece una serie de ventajas, como el hecho de presentar una vida media de dos a cuatro años, lo que permite que acumule lesiones en su ADN, además de encontrarse sincronizados en un estado definido del ciclo celular (G0), y mediante la adición de agentes mitogénicos como la fitohemaglutinina puede ser inducido a la división en condiciones controladas, y por último, estas células han demostrado poseer una baja actividad de reparación, por lo que durante mucho tiempo ha sido uno de los sistemas ideales para el estudio del efecto de la exposición crónica a bajas concentraciones de mutágenos, y realizar una gran variedad de análisis como: 1) Aberraciones cromosómicas en metafase. 2) Intercambio de cromátidas hermanas. 3) Asociaciones de satélites. 4) Cinética de la división celular. 5) Micronúcleos. 6) Mutaciones letales dominantes. 7) Infidelidad en la síntesis del ADN.

La accesibilidad de este tipo de material biológico, es un punto más a favor de los linfocitos, pues dependiendo de la edad, su concentración en la sangre varía de 2500 a 5500 células por ml. En los adultos el

70% de los linfocitos son del tipo T, mientras que el 30% restante corresponde a linfocitos B , (Evans y O'Riordan 1975; Natarajan y Obe, 1982; Roldán 1992).

Estudios realizados en individuos y células en cultivo, expuestas a diversos agentes, mostraron que los linfocitos de sangre periférica humana, son un indicador muy sensitivo de daño cromosómico estructural inducido. Estos cambios en la estructura, ofrecen evidencia morfológica de daño al material genético (Evans, 1984).

ALTERACIONES CITOGENÉTICAS

En mamíferos se han encontrado anomalías cromosómicas en virtualmente cualquier tipo celular o tejido que se ha examinado. Numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, muestran que las alteraciones citogenéticas pueden ser resultado de exposición a materiales químicos y radiación ionizante y no ionizante, (Tucker y Preston, 1996).

La asociación entre alteraciones citogenéticas específicas y tumorigénesis es fuerte, (Mitelman, 1994). Esta relación es usada como una justificación para incluir parametros citogenéticos en evaluaciones toxicológicas de la industria química y el desarrollo de nuevos fármacos y compuestos terapéuticos (Tucker y Preston, 1996).

La prueba de la relación causal entre mutaciones y carcinogenesis fue recavada entre 1980 y 1990, mediante las siguientes observaciones:

1. Presencia de cambios cromosómicos específicos en tumores humanos sanguíneos y en tumores sólidos.

2. Inducción de mutaciones *in vitro* e *in vivo* en animales, por conocidos carcinogénicos.
3. Inducción experimental de carcinogenesis *in vivo* caracterizada por varias mutaciones y cambios epigenéticos.
4. Demostración de que solo se requiere una mutación para provocar cáncer de colon y algunos otros tumores, (Klug y Cummings 2000).
5. Pre-disponibilidad al cáncer de individuos con deficiencias específicas en la reparación del ADN.
6. Activación de oncogenes por mutación genética, amplificación de genes y cambios cromosómicos estructurales, (Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

Mientras que existe un fuerte soporte para validar la relación entre alteraciones cromosómicas y tumorigénesis, aun hay mucho que aprender acerca de los mecanismos de formación de varias anomalías citogenéticas (Preston, 1995).

Dado el gran número de agentes xenobióticos y la complejidad con la cual ellos pueden interactuar con el ADN, las variadas rutas de exposición, las vías de reparación del ADN, la diversidad de tejidos y tipos celulares que pueden desarrollar tumores y los distintos tumores que pueden formarse, no es de sorprenderse que el riesgo asociado con cualquier tipo de exposición resulta extremadamente difícil de establecer y cuantificar (Tucker y Preston, 1996).

MICRONÚCLEOS

Los Micronúcleos (MN) fueron descritos en el citoplasma de los eritrocitos hace más de un siglo. Estos se encontraban consistentemente después de que las células eran expuestas a la radiación, por lo que se asumió que eran originados por fragmentos ácentricos, los cuales quedaban excluidos de los núcleos de las células hijas después de la mitosis. Recientemente se introdujo a los linfocitos, como otro sistema celular para la detección de daño cromosómico evaluado mediante la producción de MN y se recomendó el uso de MN como un biomarcador en esquemas de prueba, (Fenech 2000, Kirsch – Volders *et al*, 2000, Kirsch – Volders *et al.*, 2003). Los MN son el resultado del aducto / lesión del ADN, o bien, de las proteínas envueltas en la segregación cromosómica. La formación de MN a partir de fragmentos cromosómicos o cromosomas completos, requiere de al menos una división celular (Högstedt 1984) .

La simplicidad de medición y la gran aplicabilidad de la prueba de MN *in vitro*, en diferentes tipos celulares, la convierten en una atractiva herramienta para el estudio de alteraciones citogenéticas. Así mismo, la metodología para bloquear la citocinesis desarrollada por Fenech y Morley en 1984 (figura 3), mediante la adición de citocalasina B, permitieron la identificación de células que solo han sufrido una división celular, solventando el problema de la variación de la frecuencia de MN causada por alteraciones en la proporción de células en proliferación, la cual puede ocurrir debido a la exposición a agentes genotóxicos / citostáticos o bien, a condiciones de cultivo no óptimas, (Fenech y Morley 1985, Miller *et al*, 1997).

Junto con el hecho de que el ensayo de MN puede detectar actividad clastogénica, con la misma, e incluso con más sensibilidad y con la ventaja de poder encontrar actividad aneugénica, la prueba de MN tiene otras ventajas sobre el análisis común de Aberraciones Cromosómicas.

- La evaluación de MN es mucho más rápida que la de Aberraciones Cromosómicas, en particular porque el conteo es más sencillo que en AC.
- En MN, los efectos sobre el material genético solo son considerados en células que han sufrido una división celular, lo que indica que las células analizadas son viables.
- Los MN son estadísticamente más precisos debido a que se pueden analizar mucho más células.
- La automatización en el conteo de MN por citometría de flujo y análisis de imagen, lo hacen más fácil que en el caso de AC.
- Es menos propensa a falsos negativos, ya que los MN solo se observan en células en división, (Miller *et al.*, 1997).

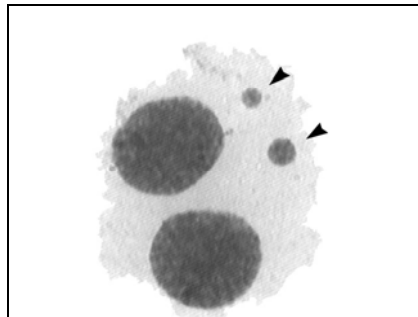


Figura 3. Microfotografía de linfocito binucleado con Micronúcleos³.

³Los Micronúcleos comprenden fragmentos cromosómicos o cromosomas completos que no fueron incluidos en los núcleos principales después de la mitosis. 100X

A pesar de las ventajas antes mencionadas, sería un error asumir que un ensayo de MN puede reemplazar el estudio detallado de aberraciones aportado por el análisis de cromosomas metafásicos, (Fenech 1997), de hecho, ninguna técnica puede satisfacer todos los requerimientos de evaluación, por lo que existe la necesidad de realizar varias metodologías que en combinación puedan proveer un efectivo sistema de análisis, (Fenech 1993, Kirsch – Volders *et al.*, 1997).

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

Las aberraciones cromosómicas (AC) son un importante biomarcador a la exposición de radiación ionizante y químicos genotóxicos, pues las aberraciones tanto numéricas como estructurales han sido asociadas con la salud, por ejemplo; anormalidades en neonatos y neoplasias. Varias enfermedades recesivas como ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi y síndrome de Bloom, son asociadas con el incremento en la inestabilidad cromosómica. Estas observaciones puntualizan la importancia del entendimiento de los mecanismos envueltos en el origen de la aberración cromosómica, (Natarajan, 2002).

Las alteraciones cromosómicas inducidas fueron analizadas por primera vez a principio del siglo usando tejidos de mamífero como testículo de rata, huevos de *Ascaris*, testículo de saltamontes, larvas de anfibio y células somáticas y meióticas de plantas. Sin embargo, debido a la pobreza de las técnicas citológicas disponibles en ese periodo, la naturaleza y secuencia del origen de varios tipos de aberraciones no pudieron ser correctamente interpretados, (Natarajan, 2002).

Para 1966, las aberraciones estructurales fueron consideradas como un parámetro para cuantificar exposición a radiación ionizante y para la evaluación de actividad clastogénica de compuestos químicos (Tucker y Preston, 1996).

El tipo de daños que pueden ser citológicamente distinguibles en metafase, se dividen en dos grupos:

1. Cromosómico: involucra las dos cromátidas de un cromosoma, se producen en G0 ó G1 del ciclo celular, (figura 4).

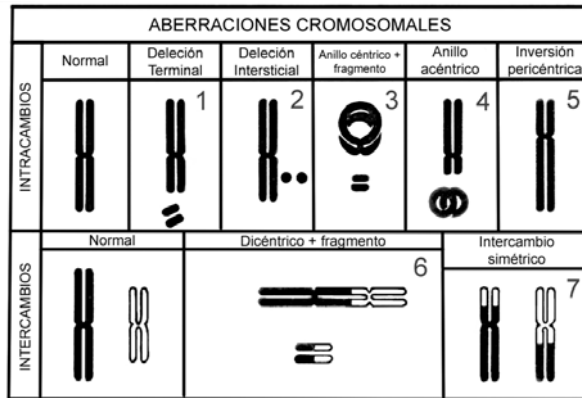


Figura 4. Aberraciones Cromosómicas Estructurales⁴.

2. Cromatídico.- cuando el daño se encuentra sólo en una de las cromátidas (figura 5). Este tipo de rompimientos, particularmente los gaps, son indicadores subjetivos de daño al material, pues estos pueden ser causados por artefactos, condiciones pobres de cultivo o proceso drástico de preparación. Normalmente se producen en S o G2 del ciclo, sin embargo, muchos agentes químicos y virus provocan solo daño cromatídico, aun cuando las células son expuestas en fase G1 (Evans 1984).

⁴ El estudio de células somáticas durante la metafase permite distinguir siete tipos de aberraciones cromosómicas. Las aberraciones 1 - 5 involucran un solo cromosoma y son conocidas como *intra-cambios*, mientras que la 6 y 7 se refieren al intercambio de material entre cromosomas y se clasifican como *inter-cambios*.

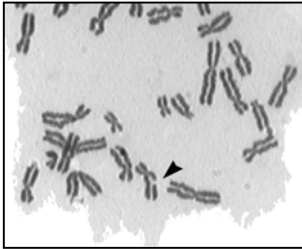


Figura 5. . Fotomicrografía en la que se muestra un Rompimiento cromatídico; sólo una de las cromátidas resulta implicada. 100X

ASOCIACIÓN DE SATELITES

En las preparaciones de células humanas en metafase, realizadas bajo condiciones estándar, a menudo los cromosomas se sitúan cercanos uno a otro al azar. Aunque en especial, los cromosomas acrocéntricos (grupos D y G), muestran una afinidad especial en donde se observa que una gran proporción de estos, están orientados por sus brazos pequeños, lo que se ha denominado “Asociación de Satélites” (AS). El fenómeno de asociación de satélites (AS), fue descrito por primera vez por Ferguson-Smith y Handmaker (1961), estableciendo que este fenómeno es importante en la producción de algunas alteraciones cromosómicas humanas, que pueden derivar en no disyunciones y traslocaciones, (Pérez, 1992).

Es conocida la tendencia a la asociación entre cromosomas acrocéntricos en la organización de los nucléolos. El sitio de los organizadores nucleolares (NORs) en el cariotipo humano, esta localizada en las constricciones secundarias de los cromosomas D y G. La asociación de cromosomas satelizados a menudo sugiere que los satélites poseen una especial propiedad de adhesión, probablemente esta cualidad esta directamente relacionada con la formación de material nucleolar en la región del satélite. La AS, es considerada un fenómeno de importancia, ya que es una posible causa del origen de varias translocaciones y no disyunciones cromosómicas, con las subsecuentes condiciones trisómicas o monosómicas de los cromosomas del grupo D y G, (Pérez, 1992).

El estudio de las AS en las células metafásicas humanas muestra diferencias en las frecuencias, siendo esto la razón de que algunos investigadores hayan reportado asociaciones al azar y otros autores, asociaciones no al azar. A nivel citogenético se ha comprobado que las

regiones satelizadas de los cromosomas presentan una mayor posibilidad de romper e intercambiar material, originando translocaciones balanceadas y Robertsonianas, además de producir no disyunciones, (Zang y Back, 1968).

JUSTIFICACIÓN

Un paso indispensable para el desarrollo de nuevos medicamentos son las pruebas toxicológicas; este tipo de ensayos que la industria farmacéutica tiene la responsabilidad de llevar a cabo, garantizan que los fármacos candidatos a ser comercializados cumplan con los requerimientos éticos y regulatorios que aseguren que su prescripción no estará acompañada de riesgo grave para la salud del paciente. Entre las pruebas toxicológicas se incluyen las de tipo genotóxico, las cuales nos ayudaran a descubrir si el compuesto analizado tiene efectos adversos sobre el material genético, y de ser así, que tan intenso puede ser este.

Dicho lo anterior y ya que se pretende que la Casiopeína Ilgly se convierta en un agente terapéutico para el tratamiento del cáncer, es necesario que a este compuesto se le practiquen una serie de pruebas para determinar su potencial genotóxico.

HIPÓTESIS

Si la Casiopeína Ilgly- aqua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre II nitrato es capaz de interactuar con el material genético interfiriendo con alguno de los mecanismos implicados en la reparación, duplicación o segregación de ADN, se espera la observación de daño expresado en forma de Aberraciones Cromosómicas Numéricas y Estructurales, así como Micronúcleos y Asociaciones de Cromosomas Satelitados.

OBJETIVOS GENERALES

1. Estudiar el efecto genotóxico, citotóxico y citostático de la Casiopeína Ilgly- aqua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre II nitrato en cultivos de linfocitos humanos.
2. Evaluar la relación entre la concentración de Casiopeína Ilgly y la respuesta genotóxica, citotóxica y citostática en cultivos de linfocitos humanos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la capacidad genotóxica inducida por diversas concentraciones de Casiopeína Ilgly mediante la cuantificación de:
 - A) Micronúcleos (MN), en cultivos de linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis.
 - B) Aberraciones Cromosómicas Numéricas y Estructurales (ACN y ACE), en cultivos de linfocitos humanos.
 - C) Figuras de Asociación (AS) entre los cromosomas acrocéntricos, e los grupos D y G, en cultivos de linfocitos humanos.
2. Analizar el efecto citostático de distintas concentraciones de Casiopeína Ilgly, utilizando como parámetro el índice de división nuclear (IDN), en cultivos de linfocitos con bloqueo de la citocinesis.
3. Determinar la relación entre la dosis de Casiopeína Ilgly y su actividad citotóxica, usando como parámetro el Índice Mitótico (IM), en cultivos de linfocitos humanos.

METODOLOGÍAS

MICRONÚCLEOS *In Vitro* CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS

CULTIVO DE LINFOCITOS:

Se extrajeron 5 ml de sangre periférica de donadores sanos con jeringa previamente heparinizada. La siembra de linfocitos se llevó a cabo en condiciones estériles colocando 5 ml de medio RPMI suplementado con 5 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina y 0.5 ml de sangre completa en tubos cónicos de 15 ml. Los cultivos fueron incubados a 37°C por 72 horas.

TRATAMIENTO:

Se aplicó tratamiento a las 44 horas de haber iniciado el cultivo. Los tratamientos consistieron en añadir 0.33, 0.66 y 1.0, $\mu\text{g/ml}$ de Casiopeína IIgly. Se utilizó un control negativo (sin tratamiento) y dos positivos con Mitomicina C (200 ng/ml), y Cisplatino (100ng/ml); cuatro horas después de haber aplicado tratamiento, se agregó a los cultivos 6 $\mu\text{g/ml}$ de Citocalasina B.

COSECHA:

Para colectar las células, los cultivos fueron centrifugados a 1 500 RPM, durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se sometió a choque hipotónico con 5ml de una solución de KCl (0.075 M), por 10 minutos a 37° C, después de lo cual se centrifugaron nuevamente las muestras. La fijación de las células se llevó a cabo con 5 ml de una solución Metanol-Ácido Acético (frío), en una proporción 3:1 efectuando dos cambios de la solución fijadora a los 15 y 10 minutos, centrifugando las muestras por 5 min. a 1500 RPM entre cada cambio. Al término de la última fijación, el sobrenadante fue retirado y al paquete celular le fueron agregados 5 ml de otra solución con 85 partes de Metanol absoluto por 15 de Ácido Acético. Los cultivos pueden ser "lavados" con esta solución las veces que sea necesario hasta que el

sobrenadante sea completamente transparente, después de lo cual el botón celular es resuspendido en 0.5 ml de la solución metanol-ácido acético (85-15%).

LAMINILLAS:

Las preparaciones (tres por tubo) se elaboraron por goteo. Finalmente se realizó una tinción convencional May Grünwald-Giemsa. Cada prueba para las diferentes concentraciones de Casiopeína y testigos, tanto positivos como negativos, se llevó a cabo por duplicado.

EVALUACIONES:

Las evaluaciones para determinar el IDN se realizaron a 20X en microscopio de campo claro. Se cuantificaron 500 células por ensayo contando las células polinucleadas (mono, bi, tri y tetranucleadas, etc.) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{IDN} = \frac{\text{MON} + 2(\text{BIN}) + 3(\text{TRN}) + 4(\text{TEN})}{\text{N}}$$

N

Donde: MON.- células mononucleadas

TEN.- células tetranucleadas

BIN.- células binucleadas

N.- células totales

TRN.- células trinucleadas

La frecuencia de MN se obtuvo mediante el análisis de 1000 células binucleadas a 100X en microscopio de campo claro, por tratamiento, tomando en cuenta los criterios de Fenech (1997).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para determinar la frecuencia de MN utilizamos χ^2 y para el IDN; Z para proporciones.

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

CULTIVO DE LINFOCITOS:

Se extrajeron 5 ml de sangre periférica de donadores sanos con jeringa previamente heparinizada. La siembra de linfocitos se llevó a cabo en condiciones estériles colocando 5 ml de medio RPMI suplementado con 5 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina y 0.5 ml de sangre completa en tubos cónicos de 15 ml. Los cultivos fueron incubados a 37°C por 48 horas.

TRATAMIENTO:

Se aplicó tratamiento a las 24 horas de haber iniciado el cultivo. Los tratamientos consistieron en añadir 0.33, 0.66 y 1.0, $\mu\text{g/ml}$ de Casiopeína IIgly. Se utilizó un control negativo (sin tratamiento) y dos positivos con Mitomicina C (200 ng/ml), y Cisplatino (100ng/ml).

COSECHA:

Se agregaron 20 $\mu\text{l/ml}$ de Colcemida 2 horas antes de concluir el tiempo de cultivo. Para colectar las células, los cultivos fueron centrifugados a 1500 RPM, durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el paquete celular fue sometido a choque hipotónico con 5ml de una solución de KCl (0.075 M) por 23 minutos a 37° C, después de lo cual se centrifugaron nuevamente las muestras. La fijación de las células se llevó a cabo con 5 ml de una solución Metanol-Ácido Acético (frío), en una proporción 3:1 efectuando tres cambios de la solución fijadora a los 15, 10 y 5 minutos, centrifugando las muestras por 5 min. a 1500 RPM entre cada cambio. Al término de la última fijación, se adicionaron 0.5 ml de la mezcla metanol-ácido acético para que el paquete celular permaneciera en solución.

LAMINILLAS:

Las preparaciones se elaboraron por goteo. Finalmente se hizo una tinción con una solución de Giemsa (7%) durante 20 min. Cada prueba para las diferentes concentraciones de Casiopeína y testigos tanto positivos como negativos se llevó a cabo por duplicado.

EVALUACIONES PARA ABERRACIONES CROMOSÓMICAS:

Para determinar el IM las evaluaciones se realizaron a 20X en microscopio de campo claro, en las preparaciones que previamente se codificaron para su análisis (al doble ciego). Se cuantificaron 1000 células por ensayo, contando las células en división y distinguiéndolas de las que se encontraban en interfase, y aplicando la siguiente fórmula:

$$IM = (\text{número de células en división} / \text{número total de células}) \times 100$$

La frecuencia de ACE y ACN se obtuvo mediante el análisis de 100 metafases a 100X en microscopio de campo claro, por tratamiento, tomando en cuenta los criterios de Evans (1984) y Brusick (1987). Se registró para el caso de las ACE tanto cromatídicas como cromosómicas y para las ACN, heteroploidías (aneuploidías como poliploidías).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA ABERRACIONES CROMOSÓMICAS:

Para el IM se aplicó la prueba de "Z" para proporciones. La frecuencia de ACN y ACE se analizó con una prueba de χ^2 con corrección de Yates.

EVALUACIONES PARA ASOCIACIONES DE SATÉLITES

Se analizaron 100 metafases por ensayo a 100X en microscopio de campo claro, determinando la frecuencia de AS de acuerdo con Zang y Back (1968), registrando la participación de los cromosomas acrocéntricos del grupo D y G, número de cromosomas acrocéntricos asociados por célula y células con AS.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA ASOCIACIONES DE SATÉLITES:

Para las AS se utilizó la prueba de t de Student y/o χ^2 .

Las pruebas estadísticas fueron consultadas en Márquez 1988.

RESULTADOS

Los resultados de todos los parámetros fueron analizados individualmente comparándose contra su propio testigo negativo. Los promedios (\bar{X}), de los datos obtenidos de esta manera se muestran en tablas, donde también se incluyen la desviación estándar (DS), y se señala la diferencia estadística (cuando esta existe), en cada caso particular.

El individuo A, no presentó una frecuencia de MN estadísticamente significativa en ninguno de los cultivos tratados con Casiopeína Ilgly. Al promediar conjuntamente a los tres donadores, se observa que únicamente la concentración más reducida del fármaco, no induce la aparición de MN, (tabla 1 y figura 7).

El IDN decrece ligeramente en todos los casos sin llegar a marcar una diferencia significativa con respecto al testigo negativo, (tabla 1 y figura 6).

No se presentaron anomalías en cuanto al número de cromosomas metafásicos, por lo que se omitió cualquier resultado al respecto y se puede concluir que con las dosis, y en el sistema de prueba utilizado, la Casiopeína Ilgly, no produce ACN.

La frecuencia de ACE se incrementa con la adición de Casiopeína Ilgly en el medio, sin embargo, para el individuo D, la cantidad de ACE solo es significativa en la concentración de Casiopeína Ilgly más alta, mientras que para el individuo E, no es significativa en ningún caso, (excepto cuando la presencia de gaps no es tomada en cuenta). Para el porcentaje de células con ACE, únicamente resulta significativa para la concentración más alta en el individuo D, (tabla 2 y figura 9).

En el caso del IM, éste se abatió proporcionalmente al aumento de Casiopeína empleada, por lo que, el IM obtenido para las dosis altas resultó mucho menor que el correspondiente a las dosis bajas, (tabla 2 y figura 8).

Cabe mencionar que en experimentos preliminares, se probaron dosis de Casiopeína menores a $0.33 \mu\text{g/ml}$, aunque el IM se abatió ligeramente, no se detecto la presencia de ACE. Por otro lado, si bien, con la dosis de $1.0 \mu\text{g/ml}$, si es posible la observación de daño a nivel cromosómico, el IM se encuentra tan disminuido que; probablemente una concentración mayor, dificulte la obtención de material suficiente para su análisis.

En la tabla 3 y las figuras 10 y 11 se observan la cantidad de células con AS, la proporción de AS por célula y el número de cromosomas por AS; en las muestras tratadas con Casiopeína, puede señalarse un moderado comportamiento dosis dependiente en la frecuencia de AS por célula, mientras que en el resto de las evaluaciones no se presenta un patrón definido.

El escaso material obtenido para MMC, explica la baja cantidad de células con AS obtenidas con este fármaco.

El promedio de cromosomas D y G implicados en AS no muestra diferencias estadísticas significativas en ningún caso (tabla 3).

En todos los parámetros los resultados muestran cierta variación entre donadores, la cual es producto de la sensibilidad individual.

TABLA 1. Micronúcleos (MN), e Índice de División Nuclear (IDN), evaluados en cultivos de linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis; tratados con Casiopeína Igly.

Donador	Tratamiento (µg/ml)	MN (X ± DS)	IDN (X ± DS)
A	T-	5.5 ± 0.7	1.57 ± 0.09
	MMC	47.5 ± 12.02**	1.16 ± 0.07
	Cis-DDP	14 ± 2.82**	1.29 ± 0.04
	0.33	4 ± 1.41	1.37 ± 0.02
	0.66	4.5 ± 0.7	1.37 ± 0.05
	1.0	8.5 ± 0.7	1.3 ± 0.08
	B	T-	2 ± 0
MMC		44 ± 7.07**	1.28 ± 0.004
Cis-DDP		11.5 ± 4.94**	1.3 ± 0.03
0.33		4 ± 1.41	1.342 ± 0.01
0.66		4.5 ± 2.12*	1.19 ± 0.02
1.0		8.5 ± 2.12**	1.16 ± 0.03
C		T-	4 ± 1.41
	MMC	35.5 ± 0.7**	1.079 ± 0.007
	Cis-DDP	17.5 ± 0.7**	1.08 ± 0.003
	0.33	7 ± 1.41	1.17 ± 0.03
	0.66	11 ± 1.41**	1.1 ± 0.007
	1.0	15.5 ± 0.7**	1.05 ± 0.001
	ABC	T-	3.8 ± 1.57
MMC		42.3 ± 7.6**	1.173 ± 0.082
Cis-DDP		14.3 ± 3.4**	1.22 ± 0.101
0.33		5 ± 1.7	1.29 ± 0.088
0.66		6.6 ± 3.25*	1.22 ± 0.112
1.0		10.8 ± 3.43**	1.17 ± 0.102

MN de 2000 linfocitos binucleados por concentración, por cada donador; prueba χ^2 .

** p < 0.0005, * p < 0.05

IDN de 1000 células por concentración, por cada donador; prueba de Z para proporciones.

TABLA 2. Índice Mitótico (IM), y Aberraciones Cromosómicas Estructurales (ACE), evaluados en cultivos de linfocitos humanos; tratados con Casiopeína Igly.

Donador	Tratamiento (µg/ml)	IM (X ± DS)	Cromatídicas		Cromosómicas		Total AC		% Células c/ACE
			R	G	R	G	C/G	S/G	
D	T-	6.13±0.23	1	0	0	0	1	1	0.46
	MMC	0.57±0.06 ^A	12	2	10	0	24 ^{***}	22 ^{***}	20.5 ^{***}
	Cis- DDP	2.15±0.11 ^A	6	0	4	0	10 ^{***}	10 ^{***}	5 ^{***}
	0.33	4.65±0.77 ^C	1	0	1	0	2	2	1
	0.66	2.27±0.07 ^A	1	0	1	0	2	2	1
	1.0	1.17±0.19 ^A	3	1	2	0	6 ^{***}	5 ^{***}	2.73 ^{**}
E	T-	3.96 ± 0.5	3	5	0	0	8	3	3.5
	MMC	0.08±0.12 ^A	32	7	27	2	68 ^{***}	59 ^{***}	59 ^{***}
	Cis- DDP	2.65 ± .05 ^B	14	6	5	1	26 ^{***}	19 ^{***}	11.5 ^{***}
	0.33	1.46±0.26 ^A	2	0	2	0	4	4	2
	0.66	1.21±0.79 ^A	4	1	1	0	6	5	3
	1.0	0.77±0.02 ^A	6	1	1	0	8	7 [*]	4
DE	T-	5.05±1.12	4	5	0	0	9	4	1.9
	MMC	0.33±0.25 ^A	44	9	37	2	92 ^{***}	81 ^{***}	31.8 ^{***}
	Cis- DDP	2.4±0.36 ^A	20	6	9	1	36 ^{***}	29 ^{***}	8.25 ^{***}
	0.33	3.05±1.64 ^A	3	0	3	0	6	6	1.5
	0.66	1.74±0.66 ^A	5	1	2	0	8	7	2
	1.0	0.97±0.22 ^A	9	2	3	0	14	12 ^{***}	3.34

IM de 2000 células por concentración, por cada donador; prueba de Z para proporciones.

^A p < 0.002, ^B p < 0.01, ^C p < 0.05

ACE de 200 metafases por concentración, por cada donador, (salvo los respectivos a MMC, donde el material fue escaso); prueba χ^2_y . Porcentaje de células con ACE, prueba χ^2_y .

^{***} p < 0.0005, ^{**} p < 0.001, ^{*} p < 0.05

R= rompimiento G= brecha o gap C/G= incluyendo brechas S/G= excluyendo brechas

TABLA 3. Asociaciones de Satelitales (AS), en linfocitos humanos; tratados con Casiopeína Ilgly. En cada caso se muestran el promedio y la desviación estándar de los parámetros mencionados.

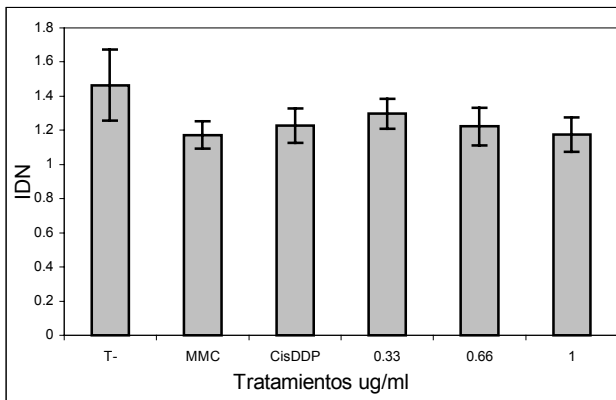
Donador	Tratamiento (µg/ml)	Células c/AS	AS por Célula	Cromosomas Por AS	D (%)	G (%)
D	T-	96.5±7.77	1.32±0.04	2.39±0.09	53.61	46.38
	MMC	51±18.38 ^A	1.43±0.02 ^A	2.2±0.03 ^A	52.79	47.2
	Cis- DDP	91.5±0.7 ^A	1.63±0.08 ^A	2.32±0.01 ^A	57.09	42.89
	0.33	87.5±14.84 ^A	1.37 ±0.12 ^A	2.41±0.01 ^D	56.01	43.98
	0.66	88±7.07 ^A	1.44±0.02 ^A	2.28±0.07 ^A	56.02	43.97
	1.0	102.5±4.94 ^A	1.52 ± 0 ^A	2.4 ± 0.05	56.13	43.86
E	T-	93±0	1.64±0.04	2.38 ± 0.01	54.68	45.31
	MMC	18± 8.48 ^A	1.1±0.43 ^A	2.26±0.19 ^A	49.95	50.05
	Cis- DDP	94±1.41 ^A	1.81±0 ^A	2.37±0.06	55.67	44.33
	0.33	94.5±2.12 ^A	1.76±0.01 ^A	2.43±0.14 ^A	52.4	47.6
	0.66	93.5±4.94	1.76±0.26 ^A	2.4±0.04 ^A	56.81	43.18
	1.0	93 ± 1.41	1.78±0.02 ^A	2.41±0.06 ^A	55.78	44.22
DE	T-	95±4.7	1.53±0.15	2.38±0.009	54.14	45.84
	MMC	34.5±19.36 ^A	1.21±0.29 ^A	2.24±0.11 ^A	51.37	48.62
	Cis- DDP	92.75±1.48 ^A	1.75±0.08 ^A	2.35±0.04 ^A	56.38	43.61
	0.33	91 ± 8.3 ^A	1.63±0.18 ^A	2.42±0.08 ^A	54.2	45.79
	0.66	90.5±5.5 ^A	1.65±0.21 ^A	2.36±0.06 ^A	56.41	43.57
	1.0	94.75±6.98	1.69±0.12 ^A	2.41±0.03 ^A	55.95	44.04

AS de 200 Células por concentración, por cada donador, (exceptuando para MMC, donde el material fue escaso); prueba de "T" de Student.

^Ap < 0.0005, ^Bp < 0.025, ^Cp < 0.05, ^Dp < 0.005

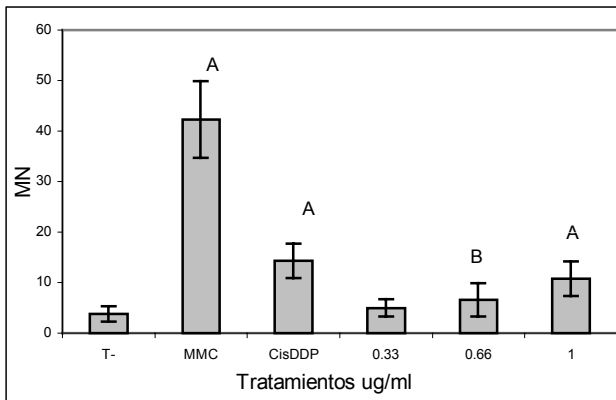
% de cromosomas D y G implicados en AS; prueba χ^2 .

Figura 6. Índice de División Nuclear en linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly.



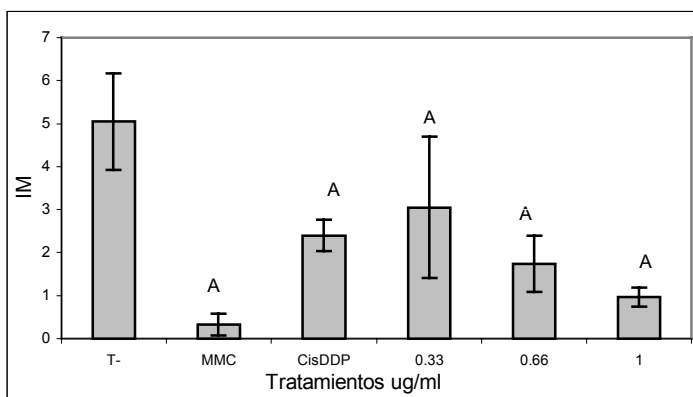
Datos promedio de los individuos A, B y C.

Figura 7. Frecuencia de Micronúcleos presentes en linfocitos humanos tratados con Casiopeína IIgly.



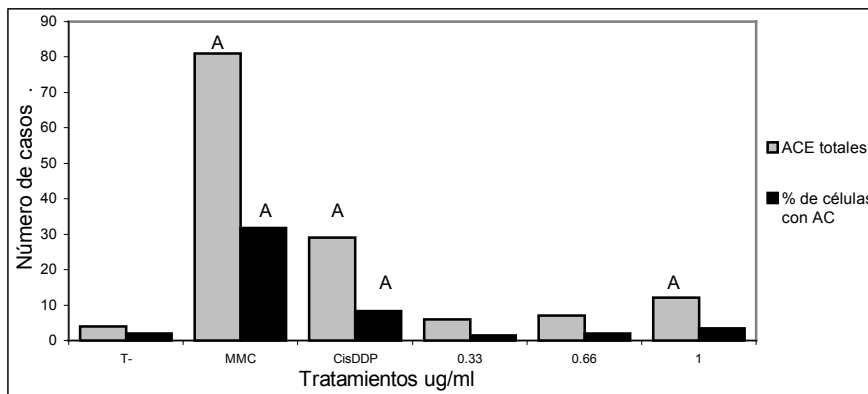
Datos promedio de donadores A, B y C. ^A $p < 0.0005$, ^B $p < 0.05$; prueba χ^2_y . Comparado contra su testigo (T-).

Figura 8. Índice Mitótico en linfocitos humanos tratados con Casiopeína Ilgly.



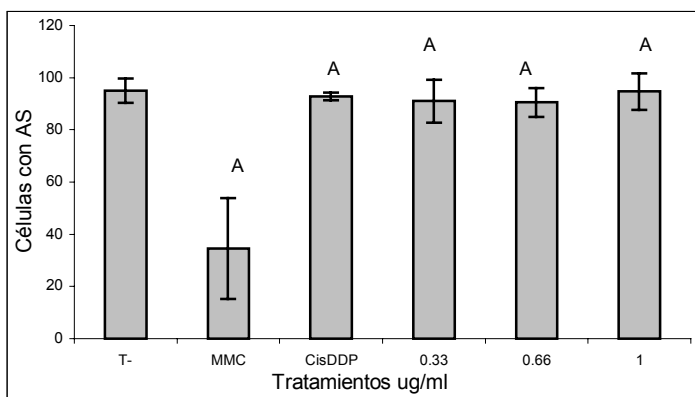
Datos promedio de los individuos D y E. ^A p < 0.002; prueba de Z para proporciones. Comparado contra su testigo (T-).

Figura 9. Aberraciones Cromosómicas Estructurales* y porcentaje de Células con Aberraciones, presentes en linfocitos humanos tratados con Casiopeína Ilgly.



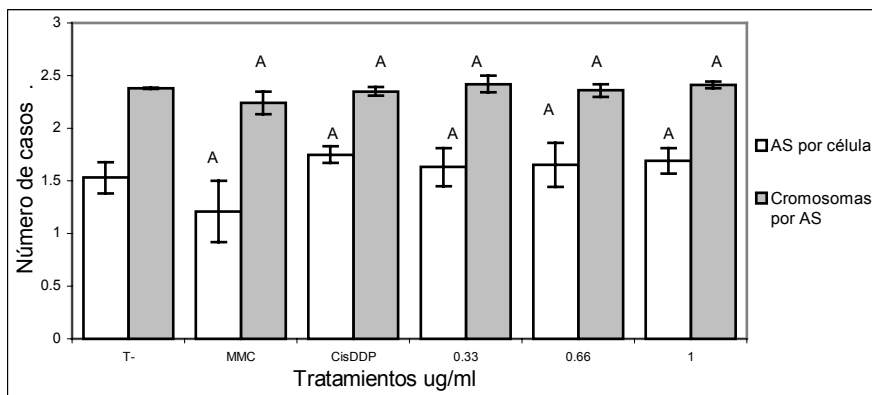
Datos promedio de los individuos D y E. *Excluyendo brechas
^A p < 0.0005; prueba χ^2 . Comparado contra su testigo (T-).

Figura 10. Promedio de Células con Asociaciones Satelitales, tratadas con Casiopeína Ilgly.



Datos promedio de los individuos D y E. ^A p < 0.0005; prueba de "T" de Student. Comparado contra su testigo (T-).

Figura 11. Promedio y desviación estándar de Asociaciones Satelitales por Célula y Cromosomas implicados en cada Asociación, en linfocitos tratados con Casiopeína Ilgly.



Datos promedio de los individuos D y E. ^A p < 0.0005; prueba de "T" de Student. Comparado contra su testigo (T-).

DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la capacidad de la Casiopeína IIgly, para inducir daño genotóxico expresado como AC, MN y AS, así como el efecto sobre el proceso de la división celular (IDN) y citotoxicidad (IM), en cultivos de linfocitos humanos expuestos a dicho fármaco.

GENOTOXICIDAD

MICRONÚCLEOS (MN) Y ABERRACIONES CROMOSÓMICAS (AC).

En términos generales, los resultados muestran que en el sistema de prueba utilizado, la Casiopeína IIgly es capaz de inducir la formación de MN. Aunque en la concentración más reducida (0.33 µg/ml), no se aprecia un número de Micronúcleos estadísticamente significativo, puede señalarse una tendencia de los mismos a incrementarse en relación con la dosis de Casiopeína utilizada.

Las diferencias basales, así como las variaciones de los resultados entre donadores, pueden ser causadas por factores genéticos, metabólicos y por la capacidad de reparación del ADN, que en su conjunto delimitan la susceptibilidad individual (Rojas *et al*, 1999, Rodríguez 2001).

Si bien se ha reportado que la presencia de MN puede tomarse como un indicativo de la existencia de AC (Carrano y Natarajan, 1988), esto no siempre resulta cierto, pues Miller *et al.* (1998), reportaron la existencia de varios compuestos químicos que inducían la aparición de MN pero no la de AC, y viceversa, estableciendo que estas diferencias podían ser aducidas a la presencia de aberraciones inestables, indetectables por la técnica de MN, una sensibilidad mayor de la

metodología de MN sobre la de AC, un poder estadístico superior de la técnica de MN (por el hecho de que su registro involucra una cifra mayor de células analizadas), y otras diferencia metodológicas.

En este caso, la Casiopeína Igly no indujo la formación de ACN, mientras que las aberraciones estructurales solo se aprecian en la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ y únicamente resultan significativas cuando las brechas (gaps), no son tomadas en cuenta.

La ausencia de ACE en dosis de Casiopeína Igly que si resultan citotóxicas (según lo expresado por el IM), sugiere que el daño a las células se produce por alguna vía distinta a la acción directa sobre el ADN. Sin embargo, Florín (2005), señala lo contrario, pues en su trabajo con linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly, sometidos a electroforesis alcalina unicelular en gel, encontró, que la Casiopeína Igly es capaz de producir rompimientos de cadena sencilla (RCS) en concentraciones que no afectan la viabilidad celular. Lo cual indica que el efecto genotóxico es ocasionado por el fármaco y no una consecuencia derivada de un efecto citotóxico.

La explicación de esta discrepancia se encuentra en las características metodológicas de la electroforesis alcalina unicelular en gel, pues esta no solo permite detectar RCS, sino también lesiones capaces de transformarse en RCS a pH alcalino y la reparación de tales lesiones, (Tice *et al*, 2000; Rodríguez, 2001).

Por otra parte, los rompimientos de cadena doble (RCD), son las principales lesiones en el proceso de formación de ACE (Obe *et al*, 2002), puesto que el daño causado por la Casiopeína Igly, se refiere, al menos, en su mayor parte a RCS, se dificulta la identificación del daño

por medio de la metodología de AC, siendo visible únicamente en concentraciones elevadas.

Así mismo, el abatimiento del IM, reflejaría la muerte celular de aquellas que no fueron capaces de superar el daño al ADN, aun cuando éste, estuviera reducido a RCS.

Con la información disponible y con los datos arrojados por esta investigación, podemos inferir que aunque la Casiopeína Ilgly induce principalmente la formación de RCS, **una alta concentración de este fármaco si contribuye a la aparición de RCD** y por lo tanto la aparición de ACE y MN, no obstante los mecanismos para que esto suceda aún deben ser dilucidados.

La carencia de ACN y la aparición de ACE a dosis elevadas, propicia la idea de que los MN obtenidos con Casiopeína Ilgly son consecuencia de fragmentos de cromosomas y no de cromosomas completos (Migliore *et al*, 1993; Rodríguez *et al*, 2003). Desafortunadamente este supuesto no puede verificarse con las metodologías realizadas en este trabajo, pero si podría comprobarse o desmentirse con la realización de otras pruebas citogenéticas que incluyan el uso de FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization), con sondas específicas para centrómero, (Migliore *et al*, 1993; Fenech, 1997; Kirsch – Volders *et al*, 1997).

La baja frecuencia de ACE, no refleja en toda su magnitud, los resultados obtenidos con la prueba de MN. No obstante, es evidente que la Casiopeína Ilgly presenta un efecto genotóxico detectable con la prueba de MN.

ASOCIACIÓN DE SATELITES (AS).

La relación entre el porcentaje de cromosomas acrocéntricos del grupo D y G implicados en AS se mantiene sin cambios significativos en todas las concentraciones de Casiopeína IIgly, mas no sucede lo mismo en cuanto al conjunto de células que contienen AS; para el individuo D, estas se disparan en la concentración de 1µg/ml, pero decaen considerablemente en las dosis menores. Lo contrario sucede con el individuo E, donde solo los tratamientos reducidos involucran una mayor cantidad de células con AS.

En cuanto a la relación de AS por célula, esta se incrementan con la adición de Casiopeína IIgly, observándose un moderado comportamiento dosis-dependiente.

La proporción de cromosomas implicados en asociaciones varia independientemente de la concentración del fármaco, llegando a ser mayor, igual o menor a lo observado en los controles. En todos los casos, sin embargo, la cantidad de cromosomas por AS se encuentra cercano a lo reportado por Dilernia *et al*, (1980), para individuos normales (2.178 ± 0.176).

La variabilidad y la falta de patrones definidos que se presentan incluso dentro de un mismo individuo, puede ocurrir por alteraciones en el metabolismo o por factores ambientales (Hansson, 1970; Kirsch- Volder *et al*. 1978; Rodríguez 2001), así como técnicas de cultivo, preparación de laminillas, edad y sexo de los individuos (Nankin, 1970).

Si bien no existe un comportamiento definido, la inestabilidad en los datos, demuestra que la Casiopeína IIgly interfiere con el número de células con AS, la cantidad de AS por célula y el número de

cromosomas acrocéntricos implicados en AS. Lo cual podría entorpecer el proceso de disyunción cromosómica y favorecer la aparición de traslocaciones.

CITOSTATICIDAD

ÍNDICE DE DIVISIÓN NUCLEAR (IDN).

El registro del IDN provee información importante acerca del efecto citostático de un agente químico en particular, ayuda a identificar moléculas que pueden estimular o entorpecer la división celular al alterar el ciclo de la célula (Fenech 1997); valores superiores al IDN observado para los controles indican una aceleración del ciclo celular, mientras que valores inferiores señalan un retraso del mismo, (Surrallés *et al*, 1995; Albertini *et al*, 2000).

En este caso encontramos una pequeña disminución del IDN en todos los individuos, sin embargo esta no llega a ser lo suficientemente baja como para marcar una diferencia significativa con respecto al testigo negativo. Por otro lado se sabe que la concentración más baja de Casiopeína IIgly empleada en este trabajo (0.33 µg/ml), no solo inhibe la proliferación celular, sino que también conlleva una toxicidad considerable en líneas tumorales como HeLa y CaLo, (Ruiz- Ramírez *et al*, 1991; Ruiz- Ramírez *et al*, 1995; Gracia – Mora *et al*, 2001). Por lo que el no encontrar una respuesta citostática severa, en células como los linfocitos, ante la presencia de la Casiopeína IIgly, implica ventajas evidentes, pues el descubrimiento de un antineoplásico que permita la división de células no transformadas, mientras entorpece el desarrollo de células cancerosas, resulta idóneo.

Desafortunadamente otros trabajos señalan a la Casiopeína Ilgly como altamente citostática en médula osea de ratón *in vivo*, (Morales *et al*, 1995), así como cardiotoxica en rata (Hernández, 2004), embriotóxica y teratogénica en ratón (González, 2004) e inhibidora de la respiración celular en riñón, hígado y corazón de ratas (Marín *et al*, 2003).

Debido a esto, no puede concluirse que la Casiopeína Ilgly presente especificidad hacia células cancerosas, pero si que los linfocitos de sangre periférica *in vitro*, son poco susceptibles a su efecto citostático.

CITOTOXICIDAD

ÍNDICE MITOTICO (IM).

Algunos metales y compuestos químicos en general, tienen la propiedad de modificar el proceso de división celular, el análisis del IM pone al descubierto la existencia de aquellas alteraciones que entorpecen la progresión del ciclo de la célula, puesto que una disminución en el IM, generalmente es consecuencia de una reducción en el promedio de células en división (Sharma y Talukder, 1987; Roldán y Altamirano, 1990; Rodríguez, 2001).

Sin embargo, esta disminución también puede ser ocasionada por la perdida permanente de la capacidad para proliferar que finalmente conduce a la muerte celular o citotoxicidad, (Rojas *et al*, 1992; Kirkland y Müller, 2000; Rodríguez, 2001).

En este caso, observamos una tendencia de IM, a disminuir conforme aumentamos la concentración de Casiopeína Ilgly. Al parecer esta disminución esta más relacionada con la citotóxicidad del fármaco, que con sus propiedades citostáticas, puesto que las laminillas donde se

evaluaron las dosis más elevadas presentaron no solo metafases, sino también interfases escasas; efecto similar al que se obtuvo con MMC.

La citotóxicidad de la Casiopeína IIgly, se pone de manifiesto al constatar que incluso la dosis más reducida abate de forma significativa al IM. Esta observación se ve reforzada con el trabajo de Trejo *et al*, (2005), donde la muerte celular inducida por la Casiopeína IIgly en células de glioma C6 de rata, viene acompañada por la disminución del IM y un incremento en la frecuencia de eventos apoptóticos.

CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

- Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden y pueden complementar los datos adquiridos en otros estudios realizados con alguno de los fármacos que conforman la familia de las Casiopeínas.
- Bajo las condiciones metodológicas anteriormente descritas y en el sistema de prueba utilizado, la Casiopeína IIgly:
 1. No presenta efecto citostático, es decir, no afecta la división de linfocitos de sangre periférica.
 2. Es citotóxica, situación reflejada por el decremento en el IM y que se presenta aun en concentraciones en que el daño al ADN no resulta evidente.
 3. Es genotóxica, pues provoca la aparición de Micronúcleos a partir de 0.66µg/ml, cuya frecuencia se incrementa con la concentración del fármaco, e induce la aparición de aberraciones estructurales (a dosis elevadas), tanto comatídicas como cromosómicas.
 4. No produce aberraciones cromosómicas de tipo numérico.
 5. Afecta el número de células con asociaciones satelitales, y el número de cromosomas por asociación de forma independiente a la concentración. Así mismo, aumenta la frecuencia de asociaciones por célula, contribuyendo a la posible aparición de traslocaciones y no disyunciones.

PERSPECTIVAS

- La evaluación de eventos apoptóticos y necróticos en cultivos de linfocitos aislados, aportaría información útil y complementaria respecto a la capacidad citotóxica de la Casiopeína IIgly.
- El ensayo de electroforesis unicelular en gel, en condiciones neutras, establecería si el daño causado por la Casiopeína IIgly se reduce a rompimientos de cadena sencilla, o bien, si también incluye rompimientos de cadena doble.
- El uso de concentraciones del fármaco y tiempos de exposición distintos, a los utilizados en este trabajo, permitiría establecer si la acción clastógena de la Casiopeína IIgly resulta dependiente o independiente de la fase de síntesis del ciclo celular.
- Las distintas pruebas de fluorescencia (FISH), demostrarían si los Micronúcleos obtenidos con Casiopeína IIgly son producto de cromosomas completos o fragmentos de cromosomas.

BIBLIOGRAFÍA

- Albertini R., Anderson D., Douglas G., Hagmar, Hemminki K., Merlo F., Natarajan A., Norppa H., Shuker D., Tice R., Waters M., Antero A., (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research* 463: 111– 172
- Alberts., Bray, D., Lewis, J., Roberts, K., y Watson, J. (1994). *Molecular Biology of the cell*. Garland Publishing Inc. N.Y. U.S.A. 3rd ed. p 1255 – 1294.
- Boyd, M. y Paull, K., (1995). Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute *in vitro* anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research* 34: 91 – 109.
- Boyd, M., (2004). The NCI Human Tumor Cell Line (60-cell) screen *in Anticancer Drug Development Guide*, second edition, edited by Teicher B. y Andrews P., Humana Press USA, p 41-61.
- Bravo, E., Tovar, A., Ruiz, M., Ruiz, L., Moreno, R. (2002). Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre casiopeínas. Primer Congreso en Casiopeínas, UNAM. p 19.
- Brusick, D., (1987). *Principles of Genetic Toxicology*. Plenum Press. NY. Cap 1-3.
- Carballo, F., Mejía, C., Gómez, C., Constantino, F., Roldán, E., Gracia, I. (2002). Determinación *in vitro* de las vías de inducción de apoptosis por Casiopeína III en células de carcinoma humano. Primer Congreso en Casiopeínas y 5^a Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM, Facultad de Química. p 74 – 77.
- Carrano A. V. y Natarajan A. T., (1988). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research* 204: 379 – 406.
- Chi- Jen, L., (2000). Development and evaluation of drugs. From Laboratory through licensure to Market. USA; CRC Press, Inc. U.S.A., p 1-16.
- Cirigo, C., Moreno, R., Ruiz, L. (2002). Interacciones entre complejos ternarios del tipo Casiopeína II con el ADN y sus constituyentes. Primer Congreso en Casiopeínas y 5^a Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM- Facultad de Química. p 135 – 140.

- Clarisse, A., Kenis, Y., Mathe, G., (1976), Cancer Chemotherapy, in Recent Results in Cancer Research. Vol. 53, Edit. Springer- Verlag, Berlin, Alemania. p 68, 104, 135.
- Cruces, M., De la Rosa, E., Pimentel, E., Gracia, I., Ruiz, L. (1994). Pruebas de genotoxicidad. Primera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM- Facultad de Química. Resumen .
- De Vita, V., Hellman, S. Rosenberg, S. (1993), Cancer: Principles and Practice of Oncology,. Volume 1. 4a ed J.B. Lippincott company, E.U. p 52-53.
- De Vizcaya, R., Paredes, P., Ruíz- Ramírez, L., Cancanosa, A., Mateos, T., Sumano, L. (1996). Farmacocinética básica y eficacia de la Casiopeína II en el tratamiento de perros con tumor venéreo transmisible. Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeína II. UNAM.
- Dileria R., Riva L., Dalpra L., Gimelli E. (1980). Satellite Associations and silver staining in a case of múltiple G and D variants. Hum. Genet. 53: 237 - 240.
- Evans, H. (1984). Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Test, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2a ed. Edited by Kilbey, B., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., Elsevier Science Publishers. p 405 – 416.
- Evans, H. y O’Riordan, M. (1975). Human Peripheral Blood Lymphocytes for the Analysis of Chromosome Aberrations in Mutagen Test. Mutation Research. 31: 135 – 148.
- Fenech, M. (1993). The cytokinesis – block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutation Research 285: 35 – 44.
- Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of the cytokinesis–block micronucleus method. Mutation Research 392: 11 – 18.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. Mutation Research 455: 81 – 95.

- Fenech, M. y Morley, A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* 147: 29 – 36.
- Ferguson – Smith A., y Handmaker D. (1961). Observations on the satellited human chromosomes. *Lancet*. 25: 638 – 640.
- Ferrer, S., Gasque, L., Moreno, E. y Ruiz- Azuara, L. (1995). Equilibrio en disolución. Primera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM.
- Florín D., (2005). Estimación de los rompimientos de cadena sencilla inducidos en el DNA de leucocitos humanos de sangre periférica expuestos a Casiopeína IIgly. FES. Zaragoza, UNAM. Tesis de licenciatura.
- González, E. (2004) Efecto Teratogénico de la Casiopeína II., FES Zaragoza, UNAM. Tesis de licenciatura.
- Gracia - Mora, I., Ruiz- Ramírez, L., Gómez, C., Tinoco, M., Márquez, A., Romero, L., Marín, A., Macías, L., Bravo, E. (2001). Knigh't's move in the periodic table, from Cooper to platinum, novel antitumor mixed chelate Koper compounds, casiopeínas, evaluated by an *in vitro* human an murine cancer cell line panel. *Metal Base Drugs*, 8(1). 1-28.
- Hansson A. (1970). Differences in the satellite association pattern in the human population. *Hereditas* 66: 21 – 30.
- Hernández E., (2004). Cardiotoxicidad de las Casiopeínas II y III. Memorias del Primer Congreso de Química Médica. UNAM y Universidad Autónoma de Oaxaca. p 33 – 34.
- Högstedt, B. (1984). Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm: A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutation Research* 130: 63 – 72.
- Huber, K., Sridhar, R., Griffith, E., Amma, E. y Roberts, J. (1987). Superoxide dismutase-like activities of copper (II) complexes tested in serum. *Biochimica Biophysica. Acta*. 915: 267 - 276.
- Kirkland D. y Müller L., (2000). Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutation Research* 464: 137 – 147.

- Kirsch – Volders M., Hens L., Verschaeve L., Alexander A., Driesen M., Poma K., Susann L. (1978). Modification of human acrocentric associations after *in vivo* exposure to environmental mutagens. *Acta Antropogenetica* 3: 1 – 16.
- Kirsch – Vorders, M., Elhajouji, A., Cundari, Enrico, Hummelen, P. (1997). The *in vitro* micronucleus test: a multi – endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non – disjunction. *Mutation Research* 392: 19 – 30.
- Kirsch – Vorders, M., Sofuni T., Aardema M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés J., Hude, W., Wakata A.,. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 167 – 172.
- Kirsch – Vorders, M., Sofuni T., Aardema M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés J., Vanhauwaert, A., Wakata A (2003). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Mutation Research* 540: 153 – 163.
- Kirsch – Vorders, M., Vanhauwaert, A., Decordier, I. Y Boeck, M. (2002). Importance of Detecting Numerical Versus Structural Chromosome Aberrations. *Mutation Research* 504: 137 – 148.
- Klug, W. y Cummings, M., (2000). *Conceptos de Genética*, quinta edición, Prentice Hall, México, p 629-636.
- Lippert, B. (1999). *Cisplatin: Chemistry and biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. Ed. Wiley- VCH, Germany. p 73 – 157.
- Marín A., Gracia I., Ruiz L., Moreno S. (2003). Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopéinas) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology* 65: p 1979 – 1989.
- Marquez, M. (1988). *Probabilidad y Estadística*. UNAM. México.
- Mazur, L., Czyzewsca, A., Augustynek, A., (2000). WR- 2721: Inhibitor of cisplatin- induced micronuclei. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 20: 349- 356.

- Migliore L., Bocciardi R., Macri L., Lo Jacono F., (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research* 319: 205 – 213.
- Miller, B., Albertini, S., Locher, F. y Thybaud, V. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research* 392: 45 – 59.
- Miller B., Pötter F., Seelbach A., Stopper H., Utesch D., Madle S., (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: Position of the GUN working group on the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research* 410: 81 – 116.
- Mitelman, F. (1994). *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer*. 5th Edn. New York. Wiley, U.S.A.
- Morales, P., Vallarino- Kally, K. y Rodríguez, R. (1995). Determinación del potencial citostático de drogas antineoplásicas en desarrollo mediante su efecto sobre el índice mitótico en células de la médula ósea de ratón *in vivo*. Primera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química de la UNAM. Resumen 5.
- Murphy, G., Lawrence. W. Jr., Lenhard, R. (1996), *Oncología Clínica; Manual de la American Cancer Society*. 2^a edición Publicaciones Científicas # 559, Organización Panamericana de la Salud. p 389.
- Nankin R. (1970). *In vitro* alteration of satellite association and nucleolar persistence in mitotic human lymphocytes. *Citogenetics* 9: 42 – 51.
- Natarajan, A. (2002). *Chromosome Aberrations: Past, Present and Future*. *Mutation Research* 504: 3 – 16.
- Natarajan, A. y Obe, G. (1982) *Mutagenic Testing With Cultured Mammalian Cells*. Mutagenicity. Adad. Pres. N.Y.
- Obe G., Pfeiffer P., Savage K., Johannes C., Goedeck W., Jeppesen P., Natarajan A., Martínez W., Folle A., Drets E., (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification, and distribution. *Mutation Research* 504: 17 – 36.

- Pagé, M., (2004). High-Volume Screening *in* Anticancer Drug Development Guide, second edition, edited by Teicher B. y Andrews P., Humana Press USA, p 3-21.
- Pérez, L. (1992). Evaluación de las frecuencias de asociaciones de satélites y su posible relación con síndrome Down regular y traslocado. FES Zaragoza, UNAM, México. Tesis de Licenciatura.
- Pratt, W. y Ruddon, R. (1979). The anticancer drugs. New York: Oxford University Press, U.S.A., p 273 – 313.
- Preston, R. (1995). Genetic Injury. In J.E. Craighead (Ed.) Pathology of Environmental and Occupational Disease, St. Louis, Mosby – YearBook Inc.
- Reyes, L., Fuentes, N., Ruiz- Ramírez, L. y Macias, L. (2002). Farmacocinética preclínica de la Casiopeína II, en Ratas. Primer Congreso de Casiopeínas. Facultad de Química.
- Rivero Müller, Plant, N., Ruíz- Ramírez, L., De Vizcaya, R. y Dobrota, M. (1998). Degradation of DNA by the copper- based anticancer agent Casiopeína II. Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. University of Surrey and UNAM.
- Rodríguez J., (2001). Evaluación de los efectos genotóxicos y citotóxicos inducidos en cultivos de células de sangre periférica expuestas a tetraóxido de Vanadio. FES Zaragoza, UNAM. Tesis de Maestría.
- Rodríguez J., Roldán E., Altamirano M., (2003). Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. Toxicology Letters 144: 359 – 369.
- Rojas E., Montero R., Herrera L., Sordo M., Gonseblatt M., Rodríguez R., Ostrosky P., (1992). Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? Mutation Research 282: 283 – 286.
- Rojas E., Herrera L., Poirier L., Ostrosky P., (1999). Are metals dietary carcinogens? Mutation Research 443: 157 – 181.

- Roldán E. y Altamirano M., (1990). Chromosomal aberrations, sisterchromatid exchanges, cell – cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research* 245: 61 – 65.
- Roldán, E. (1992). Efectos Mutagénico y Teratogénico del Pentóxido de Vanadio. FES Zaragoza, UNAM, México. 1992. Tesis de Maestría.
- Rosenberg, B. (1999): Platinum complexes for the Treatment of Cancer: Why the search Goes On. Ed. Wiley- VCH, Germany. p 3 – 27.
- Ruiz- Azuara, L., (1992). Casiopeínas: síntesis, caracterización y desarrollo de evaluación preclínica. Concurso para el apoyo a proyectos de investigación del CONACYT.
- Ruiz- Azuara, L., (1992). Dirección general de Invenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico (SECOFI), Registro Núm. 18801-120579 y 18802- 120580. U.S. Patents: Number Ap. 21 (1992) 5, 107, 005: Nov. 19 (1996), 5, 576, 326, Feb. 18, (1997).
- Ruiz- Azuara, L., Moreno, E., Ferrer, S. y Gasque, L. (1995). Diseño, síntesis y caracterización de las casiopeínas. Primera Jornada de Trabajo en Casiopeínas, Facultad de Química. UNAM. Resumen 1.
- Ruiz- Azuara, L., (2000). Casiopeínas: síntesis, caracterización y desarrollo de evaluación preclínica. Concurso para el apoyo a proyectos de investigación del CONACYT.
- Ruiz- Ramírez L., García, I., Moreno, R., Díaz, D., Gasque, L., Mayte, L., Ortiz, V. y Lomelí, C. (1991). The antitumor activity of several transition metal complex. *Journal of inorganic biochemistry*. 43(2-2). p 615.
- Ruiz- Ramírez L., García, I., de la Rosa M. E., Suman, H., Gómex, L., Arenas, F., Gómez E., Pimentel, E. and Cruces, M., (1993). Cytostatic, Mutagenic, Antineoplastic activities and preliminary toxicity of Copper (II) new drugs. Casiopeínas I, II and III. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 51(1-2). p 406.

- Ruiz- Ramírez L., García, I., de la Rosa M. E., Gracia- Mora I., Mendoza A., Pérez G., Ferrer- Sueta G., Tovar A., Breña M., Gutierrez P., Cruces M., Pimentel E., Natarajan A., (1995). Casiopeínas, Metal- Based drugs a new class of antineoplastic and genotoxic compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*. p 207.
- Santiago, Y. (2004). Efecto Genotóxico de los Tratamientos Agudo y Subcronico de la Casiopeína Ilgly en Machos, Hembras, Hembras Preñadas y Fetos de Ratón CD- 1. FES Zaragoza, UNAM. Tesis de Licenciatura.
- Sharma A. y Talukder G., (1987). Effects of metals on chromosomes of higher organisms. *Environ. Mutagen* 9: 191 – 226.
- Surrallés J., Xamena N., Creus A., Catalán J., Norppa H., Marcos R., (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 341:169 – 184.
- Tice R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Rojas E., Ryu C., Sasaki F., (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen*. 35: 206 – 221.
- Tovar, A., Ruiz, L., Campero, A. (2002). Interacciones entre casiopeínas y adenina. Primer congreso en Casiopeínas y 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM- Facultad de Química. 10 – 14.
- Trejo C., Palencia G., Zúñiga S., Rodríguez A., Osorio L., Sanches L., Gracia I., Marquez L., Sanchez A., Moreno E., Cruz A., Bravo E., Ruiz L., Rodríguez S., Sotelo J., (2005). Cas Ilgly induces apoptosis in Glioma C6 cells *in vitro* and *in vivo* through caspase – dependent and caspase – independent mechanisms. *Neoplasia* 6: 563 – 574.
- Tucker, J. y Preston, R. (1996). Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges, and Cancer Risk Assessment. *Mutation Research* 365: 147 – 159.
- Verdejo, A., Ruiz, L., Espinosa, J., Muñoz, R. (1998). Estudio de la interacción cyp-casiopeína. Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM, Facultad de Química, p 84 – 86.

- Vizcaya- Ruiz, A., Rivero- Müller, A., Ruiz- Ramírez, L., Kass, G., Kelland, R., Orr, M., Dobrota, M. (2000). Induction of apoptosis by novel copper-based anticancer compound, casiopeína II in L12110 murine leukaemia and CI Human ovarian carcinoma cells. *Toxicology In Vitro*, 14: 1-5.
- Zang, K. y Back, E. (1968). Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. *Cytogenetics* 7: 455 – 470.