



## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Estudio del origen de los micronúcleos,  
inducidos por compuestos de cobre II (Casiopeínas®)  
en linfocitos humanos *in vitro*, mediante citogenética molecular (FISH).

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A:

Biól. SOLEDAD GUEVARA CHÁVEZ

Tutora principal de tesis: Dra. Elia Roldán Reyes

Comité tutorial: Dra. Sandra L. Gómez Arroyo

Dra. Regina D. Montero Montoya



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de Abril de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA EXPERIMENTAL)** del alumna **GUEVARA CHÁVEZ SOLEDAD** con número de cuenta **403014789** con la tesis titulada **«Estudio del origen de los micronúcleos, inducidos por compuestos de cobre II (Casiopéinas®) en linfocitos humanos *in vitro*, mediante citogenética molecular (FISH)»**, realizada bajo la dirección de (la) **DRA. ELIA ROLDÁN REYES**

Presidente: «DRA. SARA FRIAS VÁZQUEZ  
Vocal: «DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA  
Secretario: «DRA. RAQUEL RETANA UGALDE  
Suplente: «DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA  
Suplente: «DRA SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de mayo de 2011.

*M. del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arraiga  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## *Agradecimientos*

---

Le agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas**, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el privilegio otorgado, de ser reconocida como parte de su comunidad investigadora.

Se agradece también, el apoyo económico brindado por el **Programa de Apoyo a Proyectos de investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IN221808-3)**, y a las becas de Maestría otorgadas por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, SEP)**, así como al **Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP, UNAM)**.

### *Miembros del Comité Tutoral*

**Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo**

**Dra. Regina Dorinda Montero Montoya**

**Dra. Elia Roldán Reyes**

Por sus atenciones, observaciones y sugerencias para mejorar este trabajo que me hizo crecer como profesionalista y como persona.

Agradezco a los

*Miembros del Jurado*

**Presidente:** Dra. Sara Frías Vázquez

**Vocal:** Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

**Dra.** Raquel Retana Ugalde

**Dra.** Regina Montero Montoya

**Dra.** Sandra Luz Gómez Arroyo

*Por su atención, interés y comentarios para que este trabajo pudiera concretarse satisfactoriamente.*

*Al **Niño Jesús** por darme la fuerza necesaria y permitirme disfrutar de este momento con las personas que más quiero.*

*A mi casa de estudios, la **UNAM** y especialmente a la **FES-Zaragoza** por todo lo que me brindaron en este periodo escolar.*

*Al **Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis**, por enseñarme que echando ha perder también se aprende y quien diga lo contrario significa que no aprendió de sus tropiezos.*

*A la **M. en C. Bertha Molina**, por su disposición y aportaciones, para llevar acabo la parte experimental de FISH, ya que sin su colaboración no se hubiera podido cubrir uno de los objetivos medulares del presente trabajo.*

*A la **M. en C. María José Marques Dos Santos**, por todo el apoyo brindado para realizar la parte estadística, la cual es una pieza clave y fundamental de este trabajo.*

*A la **Dra. Raquel Retana Ugalde**, por la confianza que me inspiró y me brindó, para solicitar su ayuda cuando era necesario, obteniendo siempre una respuesta favorable y sincera.*

*Al **Dr. José Luis Trejo** por su disponibilidad, atención, sentido del humor y su apoyo logístico, ya que con ello se logró mejorar la calidad de aprendizaje y por lo tanto, un mayor crecimiento personal.*

*A la **Dra. Elia Roldán Reyes**, por creer en mí, por afianzar mis débiles pasos en el camino de la investigación, recordando que desde que la conocí se convirtió en mi maestra no sólo de aula sino también de vida, gracias por los jalones de oreja que me ayudaron a ser más disciplinada.*

*A los integrantes del **laboratorio 5**, que son parte de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) en especial a la **Dra. Lucila Alvares** y al **Dr. Juan J. Mercado**, por compartir conmigo su equipo y espacio de trabajo, con ello, me facilitaron el empinado camino de ser estudiante.*

*A **Cristóbal, Pame, Mary, Pati, Nancy y Anibal**, por su amistad y apoyo. Por hacer de cada día el más ameno, ya que con su colaboración el trabajo fue más sencillo y agradable.*

*Debo de agradecer de forma muy especial a **Any**, por compartir conmigo las buenas y malas experiencias, de la parte experimental de este proyecto. Por todo tu apoyo invaluable.*

*A todos mis donadores **Sansininea, Jaime, Cristóbal, Anibal, Uriel, Daniel, Eliseo y Antonio**. Que aunque pudieron haber dicho que no, dijeron sí, gracias a su respuesta favorable, por fin se ve culminado lo que en principio era sólo un proyecto.*

*Por último y no por eso menos importante, mi hija **Yaretzi Abigail**, que con todo el dolor de mi corazón por las circunstancias tuvimos que separarnos y sacrificar muchos momentos de estar juntas, te amo, mi amor, siempre intenté que valiera la pena...*

*A mi papá **Raúl** y a mi mamá **Amparo**, por querer tanto a mi hija y a mí, por todo su apoyo, en especial, por cuidar de Abi mientras yo me ausentaba... estoy infinitamente agradecida...*

*A mi esposo **Uriel**, por tu colaboración, disponibilidad, paciencia, amor, amistad, y sentido del humor que siempre me hace sentir muy comfortable.*

*Gracias a todas aquellas personas que de alguna u otra manera participaron en el desarrollo de este trabajo y por quienes comprendí que lo que verdaderamente cuenta en la vida, son las personas que realmente te apoyan, creen y te impulsan a alcanzar los sueños, sueños como éste. Los cuales se hacen realidad con su apoyo y mi esfuerzo.*



## *Este trabajo se lo dedico...*

---

*A mi familia:*

A mi hija **Yaretzi Abigail**,  
por venir a inyectarle vida a mi vida y  
permitirme sentir la clase de amor  
por el que se muere sin dudarlo.

A **Uriel** por el tiempo que hemos compartido.

A mi **Papá**, por toda la admiración que siempre te tendré.

A mi **mamá**, de la cual me siento muy orgullosa.





*...Querer es una cosa,  
por que la actividad y el trabajo  
son consecuencia generalmente de la voluntad,  
y casi siempre el trabajo va acompañado del éxito.  
trabajo, voluntad y éxito  
llenar la vida de un hombre.  
La voluntad abre las puertas del  
éxito con brillantez y felicidad;  
el trabajo hace pasar a través de estas puertas,  
y al final del viaje el  
éxito corona de los esfuerzos realizados”...*

*Luis Pasteur (1842).*

*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.*

## CONTENIDO

<b>1. Abreviaturas</b> .....	<b>I</b>
<b>2. Resumen</b> .....	<b>IV</b>
<b>3. Abstract</b> .....	<b>VI</b>
<b>4. Marco teórico</b> .....	<b>1</b>
<b>4.1. Cáncer</b> .....	<b>1</b>
<b>4.2. Quimioterapia</b> .....	<b>3</b>
<b>4.3. Casiopeínas</b> .....	<b>4</b>
<b>4.4. Antecedentes de Casiopeínas</b> .....	<b>7</b>
<b>4.4.1. Antecedentes de genotoxicidad</b> .....	<b>8</b>
<b>4.4.2. Antecedentes de citotoxicidad</b> .....	<b>16</b>
<b>4.4.3. Antecedentes de citostaticidad</b> .....	<b>19</b>
<b>4.4.4. Metodologías de estudio de daño genotóxico, citotóxico y citostático</b> .....	<b>21</b>
<b>5. Justificación</b> .....	<b>31</b>
<b>6. Hipótesis</b> .....	<b>32</b>
<b>7. Objetivos</b> .....	<b>33</b>
<b>8. Método</b> .....	<b>34</b>
<b>8.1. Micronúcleos <i>in vitro</i> con Bloqueo de la Citocinesis (MNBC)</b> .....	<b>34</b>
<b>8.2. Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH)</b> .....	<b>46</b>
<b>9. Evaluación Estadística</b> .....	<b>38</b>
<b>10. Resultados</b> .....	<b>39</b>
<b>10.1. Resultados de genotoxicidad</b> .....	<b>41</b>
<b>10.2. Resultados de citotoxicidad</b> .....	<b>54</b>
<b>10.3. Resultados de citostaticidad</b> .....	<b>58</b>
<b>11. Análisis de resultados</b> .....	<b>63</b>
<b>11.1. Análisis de resultados de genotoxicidad</b> .....	<b>63</b>
<b>11.2. Análisis de resultados de citotoxicidad</b> .....	<b>67</b>
<b>11.3. Análisis de resultados de citostaticidad</b> .....	<b>71</b>
<b>12. Conclusiones</b> .....	<b>74</b>
<b>13. Perspectivas</b> .....	<b>76</b>
<b>14. Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>77</b>
<b>15. Anexo I (Preparación de reactivos para el análisis en el ensayo de MNBC)</b> .....	<b>85</b>
<b>16. Anexo II (Preparación de reactivos para el análisis en FISH)</b> .....	<b>88</b>
<b>17. Anexo III (Participación académica)</b> .....	<b>90</b>

## 1. ABREVIATURAS

0.4XSCC:	Solución 0.4 salina.
2XSCC:	Solución doblemente salina.
ACE:	Aberraciones cromosómicas estructurales.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
AP:	Apoptosis.
Apapf-1:	Factor activador de la proteasa apoptótica-1 (por sus siglas en inglés).
AS:	Asociaciones de satélite.
BAK:	Activador de muerte.
Bax:	Proteína BCL-2 asociada al cromosoma X (por sus siglas en inglés).
BCL-2:	B-cell lymphoma 2.
BH3:	Dominio de homología Bcl-2 (proteína pro-apoptótica).
BN:	Célula binucleada.
C+:	ADN centromérico con señal fluorescente positiva.
C-:	ADN centromérico con señal fluorescente negativa.
Cas Igly:	Casiopeína Igly.
Cas IIgly:	Casiopeína IIgly.
Cas III-I-a:	Casiopeína III-I-a.
CCC:	Colchicina.
CICD:	Muerte celular independiente de caspasas (por sus siglas en inglés).
Cit-B:	Citocalasina-B.
Cit-C:	Citocromo C.
CP:	Células polinucleadas.

Cu <sup>1+</sup> :	Cobre I.
Cu <sup>2+</sup> :	Cobre II.
DAPI:	4´6-diamidino-2-phenylindole.
DM:	Cromosomas de doble minuta (por sus siglas en inglés).
DMSO:	Dimetil sulfóxido.
DIABLO:	Ver SMAC.
DSM:	Diferencia significativa mínima.
EUAG:	Electroforesis unicelular alcalina en gel.
FADD:	Proteína con dominio de muerte asociado a Fas, (por sus siglas en inglés).
FISH:	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (por sus siglas en inglés).
HTRA2:	Ver OMI.
ICH:	Intercambio de cromátidas hermanas.
IDN:	Índice de división nuclear.
IMS:	Espacio intermembrana mitocondrial (por sus siglas en inglés).
LD50:	Dosis letal 50.
M1-M4:	Células viables de 1 hasta 4 núcleos.
Min:	Minutos.
MMC:	Mitomicina-C.
MNBC:	Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.
MN:	Micronúcleos.
MNC-:	Micronúcleo sin señal de ADN centromérica.
MNC+:	Micronúcleo con señal de ADN centromérica.
MOMP:	Permeabilidad de la membrana exterior de la mitocondria (por sus siglas en inglés).
N:	Número total de células.

NBUD:	nuclear buds.
NC:	Necrosis.
NPB:	Nucleoplasmic bridges.
OH-:	Radical hidroxilo.
OMI:	Activador de caspasas derivado de la mitocondria (también conocido como HTRA2).
p53:	Gen supresor de tumor, conocido como guardián del genoma.
pRb:	Proteína del retinoblastoma o supresora de tumor.
PN:	Puentes nucleoplásmicos.
r:	Correlación.
RCS:	Rompimiento de cadena sencilla.
RE:	Retículo endoplásmico.
R-F-P	Rompimiento fusión puente
ROS:	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés).
RPM:	Revoluciones por minuto.
SMAC:	Activador de caspasas derivado de la mitocondria (también conocido como DIABLO; es inhibidor de los inhibidores de caspasas).
YN:	Yemas nucleares.
XIAP:	X-linked inhibitor of apoptosis protein; también conocido como inhibitor of apoptosis protein 3 (IAP3).
SOD	Dismutasa superoxidasa.
T+:	ADN telomérico con señal fluorescente positiva.
T-:	ADN telomérico con señal fluorescente negativa.
Zn:	Zinc.

## 2. RESUMEN

Una serie de complejos de quelatos mixtos con cobre II de fórmula general [Cu (N-N) (N-O)] NO<sub>3</sub> o [Cu (N-N) (O-O)] NO<sub>3</sub>, son registrados bajo el nombre de **Casiopeínas** y patentadas por La Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El centro metálico les proporciona ciertas ventajas, como baja toxicidad, bajos costos y una destoxificación más sencilla mediante los procesos homeostáticos. Se consideran como una alternativa para el tratamiento del cáncer.

Las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a son de las más prometedoras (de una familia de más de 100), ya que han demostrado gran actividad antineoplásica y baja toxicidad, en los ensayos exigidos por el “National Cancer Institute y el Cancer Chemotherapy National Service Center”, de los Estados Unidos.

El **objetivo** de este trabajo consistió en evaluar los efectos genotóxico (clastogénico y/o aneugénico), citotóxico y citostático de las Casiopeínas en células humanas *in vitro* mediante el ensayo de **micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC) en combinación con la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)**.

El **método** empleado es el propuesto por Fenech (2000), los tratamientos de linfocitos humanos *in vitro* estimulados con fitohemaglutinina, se hicieron a las 44 h con: **Cas Igly** [0.615, 1.23, 2.46 µg/mL], **IIgly** [0.33, 0.66, 1 µg/mL] y **III-I-a** e[4.2, 8.4 12.6 µg/mL], y como **testigos positivos (T+) Mitomicina C** (MMC clastogénico) [0.2 µg/mL] y **Colchicina** (CCC aneugénico) [0.04 µg/mL]. Los criterios de evaluación se basaron en Fenech *et al.* (2003). Brevemente, se analizaron 4000 células binucleadas al azar y se registró la presencia de micronúcleos (**MN**), puentes nucleoplásmicos (**PN**), yemas nucleares (**YN**), los cuales indican efecto genotóxico; en 2000 células se cuantifican apoptosis (**AP**) y necrosis (**NC**) que señalan citotoxicidad, asimismo se observan 2000 células polinucleadas (**CP**) para determinar citostaticidad mediante el **índice de división**

**nuclear (IDN)**. Con las preparaciones obtenidas mediante el ensayo de MNBC, se procedió a la realización de la técnica de **FISH**, en resumen consiste en: 1. Pretratamiento de las células, 2. Co-desnaturalización de la sonda y el ADN blanco, 3. Hibridación con **sonda pancentromérica** (*Poseidon, Kreatechs*), y 4. Contraintinción con **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole). Con la técnica de FISH se evaluó el número de MN con señal de ADN centromérica positiva (**MNC+**) y negativa (**MNC-**), obtenidos de 2000 células binucleadas (BN) analizadas. Se comparó contra el **testigo negativo (VS T- , sin tratamiento)**.

Se encontró que las tres Casiopeínas tienen la capacidad de inducir **efectos genotóxico y citotóxico** respectivamente, en todas las concentraciones evaluadas, con incremento significativo ( $p < 0.0005$ ) de MN, PN y YN, así como de ( $p < 0.005$ ,  $p < 0.002$ ) AP y NC, lo cual es una manifestación de alteración en el material genético. Mediante el ensayo de **MNBC** se encontró incremento significativo ( $p < 0.0005$ ) de PN y YN, y con la técnica de **FISH** se encontró incremento significativo ( $p < 0.000$ ) en el porcentaje de **MNC-** en las concentraciones más altas de las Casiopeínas Igly (4.2%), IIgly (5.3%) y III-I-a (4.35%) comparando todos estos datos con el testigo negativo (1.4%), sugiere que las Casiopeínas inducen daño al **ADN** de forma directa, es decir, son **genotóxicas mediante clastogénesis**. Por último, se presenta decremento significativo ( $p < 0.05$ ) del IDN en relación con el testigo negativo en dos de las Casiopeínas analizadas (Igly y III-I-a), lo que confirma la capacidad de inducir **efecto citostático**. Estos eventos probablemente se deban a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por el centro metálico cobre de los compuestos estudiados, o por la interacción de las Casiopeínas con la adenina, distorsionando la estructura tridimensional de la molécula del ADN de acuerdo con investigaciones publicadas.



### 3. ABSTRACT

A serie of mixed chelated copper (II) complexes of general formula [Cu (N-N) (N-O)] NO<sub>3</sub> o [Cu (N-N) (O-O)] NO<sub>3</sub>, have been registered under the name of **Casiopeínas** and are patented by La Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The metal center gives them certain advantages, as low toxicity and low cost, and can be easily removed by homeostatic processes. Considered as an alternative for the treatment of cancer.

The Casiopeínas Igly, IIgly and III-I-a are the most promising (of a family of more than 100), as they have demonstrated great antitumor activity and low toxicity in the tests required by “National Cancer Institute and the Cancer Chemotherapy National Service Center”, in the United States.

The **aim** of this study was to evaluate the genotoxic effects (clastogenic and / or aneugenic), cytotoxic and cytostatic of Casiopeínas in human cells in vitro, by a combination of the cytokinesis blocking micronucleus assay (**CBMN**) and fluorescence in situ hybridization (**FISH**) technique.

The **method** used is that proposed by Fenech (2000), the treatment of human lymphocytes in vitro, stimulated with phytohemagglutinin, were at 44h: **Cas Igly** [0.615, 1.23, 2.46 µg/mL], **IIgly** [0.33, 0.66, 1 µg/mL] and **III-I-a** [4.2, 8.4 12.6 µg/mL], as positive controls (T +) mitomycin C (MMC clastogenic), [0.2 µg/mL] and colchicine (CCC aneugenic) [0.04 µg/mL]. The evaluation criteria were based on **Fenech et al. (2003)**. Briefly, 4000 binucleated cells were analyzed randomly and recorded the presence of micronuclei (**MN**), nucleoplasmic bridges (**NPB**), nuclear buds (**NBUD**), which indicate genotoxic effect; 2000 cells were analyzed apoptosis (**AP**) and necrosis (**NC**) indicating cytotoxicity and 2000 were analyzed multinucleated cells (**CM**) to determine cytostatic through the nuclear division index (**NDI**). With the preparations obtained by testing BCNM, we proceed to the

implementation of the FISH technique, in short is: 1. Pretreatment of cells. 2. Co-denaturation of probe and target DNA, 3. Hybridization with a pancentromeric probe (*Poseidon, Kreatechs*) and 4. Counterstaining with **DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole). With FISH technique the number of MN with centromeric DNA positive signal (MNC +) and negative (MNC-), were evaluated in 2000 binucleated cells (BN) and compared with the negative control (VS T-, no treatment).

It was found that the three Casiopeínas have the ability to induce genotoxic and cytotoxic effects, respectively, at all concentrations tested, with a significant increase ( $p < 0.0005$ ) of MN, NPB and NBUD as well as ( $p < 0.005$ ,  $p < 0.002$ ) PA and NC, which is a manifestation of abnormal genetic material. By testing BCNM we found a significant increase ( $p < 0.0005$ ) of NPB and NBUD and FISH a significant increase ( $p < 0.000$ ) in the percentage of MNC-, higher concentrations of Casiopeínas Igly (4.2%), IIgly (5.3%) y III-I-a (4.35%), compared against the negative control (1.4%). We suggest that Casiopeínas induces DNA damage directly, ie, are **genotoxic by clastogénesis**. Finally, we found a significant decrease ( $p < 0.05$ ) of the NDI in relation to the negative control in two of the Casiopeínas analyzed (Igly and III-I-a), this confirms the ability to induce cytostatic effect. These events are probably due to the formation of reactive oxygen species (ROS) induced by the copper metal center of the compounds studied in this work or by the interaction of Casiopeínas with adenine, distorting tri-dimensional structure of the DNA molecule according to published research.

## 4. Marco Teórico

### 4.1. CÁNCER

La proliferación celular está cuidadosamente regulada y responde a las necesidades específicas del organismo, por lo que la regulación del ciclo celular es decisiva para el desarrollo normal de los organismos multicelulares; la pérdida de ésta lleva en última instancia al cáncer (**Lodish et al., 2002, Barron, 2006**).

El término “**cáncer**”, a menudo se consideró como una sola enfermedad, sin embargo se refiere a una serie compleja de más de 100 formas que afecta a un amplio rango de órganos y tejidos, volviéndose más y más agresivas conforme transcurre el tiempo hasta hacerse letales (**Weinberg, 1996**).

El cáncer se considera como una anomalía genética en el ámbito celular. Las alteraciones genómicas asociadas con el cáncer pueden implicar cambios a pequeña escala, a nivel de un sólo nucleótido, o a gran escala como reordenaciones cromosómicas, ganancia o pérdida de cromosomas o incluso la integración de genomas virales en el cromosoma. Las alteraciones genómicas a gran escala son un rasgo común del cáncer; la mayoría de los tumores en la especie humana se caracterizan por cambios cromosómicos visibles (**Cummings y Klug, 1999**).

Las células cancerosas tienen que sufrir múltiples mutaciones y cada mutación ocurre inicialmente en una simple célula y se divide varias veces antes de que pueda transformarse en una amplia población premaligna (**Lodish et al., 2000**).

Existen dos características que diferencian el cáncer de otras enfermedades genéticas. La primera es que las mutaciones que se observan en el cáncer se producen sobre todo en células somáticas, mientras que otras enfermedades genéticas sólo son causadas por mutaciones en las células germinales. Sin

embargo, algunos individuos han heredado mutaciones genéticas que los predispone a desarrollar tipos específicos de cáncer. La segunda es que el cáncer no es consecuencia de una mutación aislada, sino más bien de la acumulación de entre 3 y 20 mutaciones según el tipo de cáncer en genes que regulan la multiplicación celular normal (**Lodish et al., 2000**).

Las células cancerosas se caracterizan por dos propiedades hereditarias comunes: 1) se reproducen a pesar de sus restricciones normales, 2) invaden y colonizan territorios normalmente reservados a otras células. La combinación de estas dos características es lo que hace que el cáncer sea especialmente peligroso. Una célula anormal que no prolifera, más que sus vecinas normales, no produce daño significativo, sean cual sean las otras propiedades que pueda tener; pero si una proliferación está fuera de control, producirá un tumor o neoplasia. Mientras las células permanezcan agrupadas en una masa única, se dice que el tumor es benigno. En este estadio generalmente se puede conseguir la cura completa extrayendo la masa quirúrgicamente. Un tumor se considera maligno, si sus células pueden invadir el tejido circundante. La capacidad invasora implica generalmente la habilidad de entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos, y formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo (**Alberts et al., 2004**).

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad, se le atribuyen 7.9 millones de defunciones ocurridas en 2007. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015. En México, durante 2007 se registraron 514 420 defunciones, 55.4% fueron hombres y 44.6% de mujeres; de las cuales los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de muerte del país con 68 815 casos (13.4%), por debajo de los decesos por las enfermedades del sistema circulatorio y las enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas. De 1998 a 2007 se observa que las defunciones por tumores malignos tienden a incrementarse, siendo las mujeres las que presentan

los porcentajes más altos en el periodo (**Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2009**).

Ante la gran incidencia de esta enfermedad, a lo largo del tiempo se han desarrollado distintas formas de tratamiento entre las más sobresalientes se encuentra la extirpación quirúrgica si es una malignidad definida, radioterapia y la quimioterapia que es utilizada para las neoplasias diseminadas (**De Vita et al., 1993; Murphy et al., 1996**). Estas tres modalidades terapéuticas han llegado a ser básicas, ya que han incrementado la posibilidad de supervivencia de los pacientes además de reducir los efectos secundarios del tratamiento (**Murphy et al., 1996**).

#### 4.2. QUIMIOTERAPIA

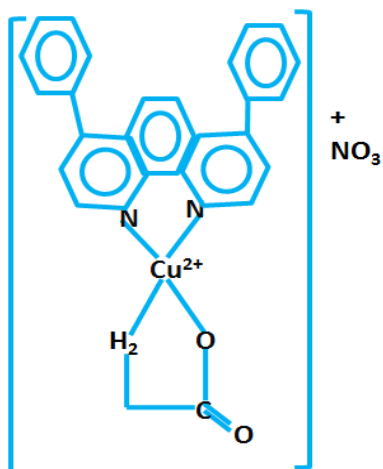
La **quimioterapia** contra el cáncer, es el uso de fármacos de composición conocida para tratar a los tumores diseminados y está dirigida a tumores que se han extendido desde un inicio o que tienen una alta capacidad de metástasis. El índice terapéutico de la quimioterapia para el cáncer varía marcadamente de un tumor a otro y de fármaco a fármaco, según su actividad bioquímica y su origen (**Magrath, 1989; Murphy et al., 1996**). De cualquier manera ninguno de los agentes anticancerígenos existentes es ideal, debido a la falta de eficacia, selectividad y a los efectos tóxicos producidos.

Dentro de la quimioterapia hay gran variedad de fármacos antineoplásicos tanto de origen orgánico como inorgánico, sin embargo, la existencia de tumores refractarios a estos tratamientos, su toxicidad y costos elevados, estimulan la búsqueda de nuevas moléculas (**Bravo et al., 2002**).

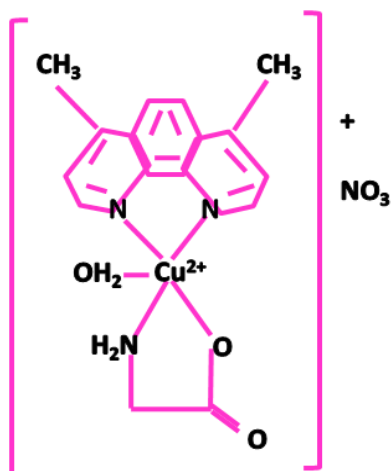
### 4.3. CASIOPEÍNAS

Actualmente la Dra. Lena Ruiz Azuara, con su grupo de trabajo, se centran en la investigación de las **Casiopeínas** con fórmula general  $[\text{Cu} (\text{N-N}) (\text{N-O})] \text{NO}_3$  o  $[\text{Cu} (\text{N-N}) (\text{O-O})] \text{NO}_3$ . En su esfera de coordinación presenta un sustituyente aromático diimina (N-N; ligando bidentado donador de nitrógeno) que puede ser 1,10 fenantrolina o 2,2 bipyridina, que representan la parte inorgánica. También presenta otro ligando, puede ser aminoácido (N-O) como la glicina, representando la parte orgánica de la molécula o un donador de electrones (O-O) como el acetilacetato o salicilaldehído. El  $\text{NO}_3$  representa el nitrato de la molécula, y el  $\text{Cu}^{2+}$  el centrometalico (**Márquez et al., 2000; Gracia et al., 2001; Bravo et al., 2009**), fueron patentadas en 1992 por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (**Ruiz et al., 1992**) como un tratamiento alternativo del cáncer, tomando como base la estructura molecular del Cis-platino. Por lo que el centro metálico cobre (II), proporciona a las Casiopeínas ciertas ventajas como: ser económicas (por lo menos más que el Cis-platino), debido a que el cobre es un metal abundante en la naturaleza; así también presenta menor toxicidad ya que éste elemento es esencial en los organismos vivos y puede ser eliminado fácilmente por medio de procesos homeostáticos, en comparación con los complejos de platino, que no es un elemento esencial del organismo (**Bravo et al., 2002; Marín et al., 2003; Santiago, 2004; Atilano, 2007**).

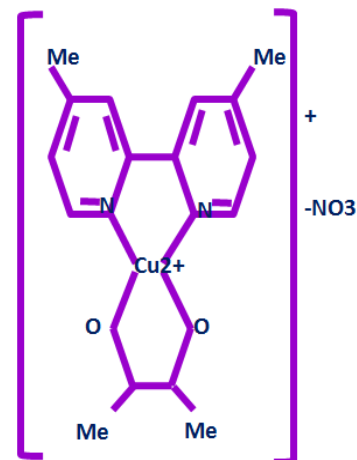
Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a (**figuras 4.1, 4.2, y 4.3**) son de las más prometedoras, ya que han demostrado tener actividad antineoplásica en los ensayos exigidos por el “National Cancer Institute y el Cancer Chemotherapy National Service Center”, de los Estados Unidos de América (**Ruiz et al., 1995; Müller et al., 1999**).



**Figura 4.1. Casiopeína Igly:** [Acua (4,7-difenil-1-10-fenantrolina) (glicina) Cobre (II)] Nitrato (Ruiz *et al.*, 1994; Márquez *et al.*, 2000; Tovar *et al.*, 2004).



**Figura 4.2. Casiopeína IIgly:** [Acua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre (II)] nitrato (Reyes *et al.*, 2003; Tovar *et al.*, 2004).



**Figura 4.3. Casiopeína III-I-a:** [(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetonato) cobre (II) nitrato] (Fuentes *et al.*, 2002; Marín *et al.*, 2003; Tovar *et al.*, 2004)

Particularmente la **Casiopeína Igly**, cuya fórmula química es [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) (glicina)] NO<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O se puede abreviar como Cas Igly, tiene un peso molecular de 568.05 g/mol, es estable en estado sólido, se disuelve en etanol o dimetilsulfóxido (DMSO) o en etanol/agua (3:100), poco soluble en glicerol y tarda varios días en descomponerse (figura 4.1) (Ruiz *et al.*, 1994; Márquez *et al.*, 2000; Tovar, 2004).

La **Casiopeína IIgly**, tiene la fórmula Aqua (4,7-diimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre (II) nitrato, se puede abreviar con la siguiente clave Cas IIgly, tiene un peso molecular de 425.89 g/mol y 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, se degrada fácilmente cuando se expone a la luz (Ruiz, 1992). Es un polvo fino color azul intenso, con una densidad aparente de 0.425 g/mL, con un tamaño de partícula >40 y <50 micrómetros (Fuentes *et al.*, 2004), no se puede administrar vía oral, pues el pH del estómago es de 1 y en esas condiciones se

disocia por lo que no presentaría actividad farmacológica. Es soluble en agua, etanol y metanol (**figura 4.2**) (**Ferrer et al., 1995**).

La **Casiopeína III-I-a** cuya fórmula general es [(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetato) cobre (II) nitrato], se puede abreviar como Cas III-I-a, tiene un peso molecular de 444.93 g/mol. Es soluble en agua, etanol y metanol. No es estable por debajo de pH 6. Estable en solución acuosa por 7 días. También es un polvo fino de color azul (**figura 4.3**) (**Carvallo, 2007**).

Este grupo de compuestos fue diseñado pensando en que la planaridad en la geometría de la molécula y el ligante diimina, con carácter hidrofóbico, le conferirían la posibilidad de actuar como intercalante a través de interacciones con las bases púricas y pirimídicas del ADN y el ligando cargado le conferiría una polaridad necesaria para el transporte de la molécula. La naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el ligando diimina son responsables de la variación en la actividad biológica. El centro metálico por su parte puede participar en ciclos redox, para liberar ROS (especies reactivas de oxígeno) que oxiden el ácido desoxiribonucleico (ADN) dando como resultado daños irreparables en su estructura (**Bravo et al., 2002, 2009; Tovar et al., 2004**).

Se propone, que los complejos mixtos de cobre denominados Casiopeínas se intercalan con el ADN, interactuando preferentemente con la adenina, mecanismo de acción que se lleva a cabo mediante el apilamiento de los sustituyentes bipiridina o fenantrolina del complejo mixto con el anillo de la base (**Cirigo et al., 2002; Tovar et al., 2004; Bravo, 2009**). Otro mecanismo de acción sugerido esta relacionado con la formación ROS, después de que el átomo de cobre II se convierte en cobre (I) a través del sistema de Haber-Weiss y Fenton causando daño oxidante al ADN, lípidos, proteínas y carbohidratos (**Alemón et al., 2007; Rivero et al., 2007; Carvallo et al., 2008**).



Se considera a estos compuestos como una alternativa para el tratamiento del cáncer. Las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a son las más prometedoras por su actividad antineoplásica *in vivo* e *in vitro*, e inducen apoptosis en líneas transformadas, son capaces de reducir el tamaño y volumen de tumores implantados y cultivados, además de presentar baja toxicidad en células sanas **(Marín et al., 2003; Tovar et al., 2004; Alemón et al., 2007; Rivero et al., 2007)**.

#### 4.4. ANTECEDENTES DE LAS CASIOPEÍNAS

Entre los esfuerzos por desarrollar un agente antineoplásico, se ha seleccionado particularmente a un grupo de compuestos con centro metálico de Cu, por sus propiedades estructurales que les confieren ciertas características como agentes antineoplásicos. A la fecha se han sintetizado alrededor de 100 compuestos que actualmente reciben el nombre de Casiopeínas.

Con base en el supuesto de que las Casiopeínas puedan tener actividad antineoplásica y en el afán de descubrir su mecanismo de acción, a partir de 1980 se inician las investigaciones de constatación biológica *in vitro*, pasando posteriormente a la fase *in vivo* **(Ruiz, 2004)**.

Actualmente estos compuestos de quelatos mixtos se consideran como una alternativa quimioterapéutica para el tratamiento contra el cáncer. De acuerdo con algunos experimentos, algunas de ellas han mostrado actividad antineoplásica y baja toxicidad *in vivo* e *in vitro*, especialmente las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a mediante la interacción con el ADN **(Bravo et al., 2002; Marín et al., 2003; Alemón et al., 2007; Rivero et al., 2007; Carvallo et al., 2007; Bravo et al., 2009)**.

#### 4.4.1 ANTECEDENTES DE GENOTOXICIDAD

Existe una serie de antecedentes que revelan la importancia del diseño de las Casiopeínas, ya que contempla la posibilidad de interactuar con la molécula del ADN (**Gerrero, 1993**). Recordando a la estructura química del grupo de las Casiopeínas, contienen un centro metálico de cobre, el cual es un elemento traza esencial, que funciona en el organismo como un cofactor y es requerido por varias e importantes enzimas incluyendo el citocromo c, oxidasa, tirosinasa, p-hidroxifenil piruvato hidroxilasa, beta dopamina hidroxilasa, lisis oxidasa y Cu-Zinc superoxidasa dismutasa (Cu, Zn SOD); las cuales están relacionadas con los procesos biológicos vitales, por lo tanto se espera que estos compuestos sean metabolizados rápidamente por el organismo. Sin embargo, se reporta que cuando se incrementa la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  este metal puede tener la capacidad de inducir rompimientos y causar cambios conformacionales en la estructura del ADN (**Gaetke y Kuang 2003**).

Aunado a esto, el sustituyente aromático diimina (N-N) (fenantrolina o bipyridina), también es parte esencial de la molécula de las Casiopeínas. Este ligando tiene gran afinidad por el cobre, y su anillo aromático extendido le confiere la capacidad de unirse al ADN por interacciones mediante intercalación o no intercalación, lo cual puede ser llevado a cabo como un ligando libre o como parte de un complejo metálico. También, se reporta que el ligando acetilacetato (que es parte de la Casiopeína III-I-a) tiene buena afinidad con el complejo de cobre-fenantrolina, y puede modular las propiedades redox del metal central (**Bravo et al., 2009**). Todo esto indica que cada uno de los componentes de la estructura química de las Casiopeínas tienen afinidad por la molécula de ADN, por lo tanto, la molécula de las Casiopeína como tal tiene la capacidad de interactuar con el material genético.

Además la 1-10 fenantrolina (componente de las Casiopeínas Igly y Ilgly), tiene antecedentes de que puede inhibir una variedad de enzimas nucleotídicas, por ejemplo, ADN polimerasa y ARN polimerasa (**Downey et al., 1980**). También el complejo cobre II-fenantrolina o glicina, aunado a la molécula de oxígeno ( $O_2$ ), tiene la habilidad de romper las dos hebras del ADN, esto hace que el diseño estructural de las Casiopeínas las haga actuar como nucleasa donde los rompimientos del ADN por Cu-fenantrolina parece que se originan en sitios específicos del genoma en donde la densidad de las proteínas es baja (**Sigman et al., 1979; Downey et al., 1980; Kuwabara y Sigma, 1987; Dizdaroglu et al., 1990; Rivero et al., 2007; Cai et al., 2007; Bravo et al., 2009**).

De forma más particular **Rivero et al. (2007)**, indicó que los perfiles de degradación del ADN de las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a exhiben actividad nucleasa cuando se mezclan con ascorbato y que ahora se considera que la actividad nucleasa del complejo de cobre hace una contribución significativa rumbo a su acción quimioterapéutica. Estos antecedentes reafirman el hecho de que de acuerdo a su estructura química, las Casiopeínas tienen afinidad por la molécula del ADN, lo que puede estar propiciando los rompimientos en las hebras del ADN.

Una posible vía por la cual las Casiopeínas interactúan con el ADN es la propuesta por **Alemón et al, (2007)**, consiste en que las Casiopeínas cruzan la barrera de la célula sin disociarse ni dañar aparentemente la membrana lipídica, en el citosol estos compuestos se reducen ( $Cu^{2+}$  a  $Cu^{1+}$ ) cuando interactúan con agentes reductores como el glutatión, por lo que entra eventualmente al núcleo. Debido a su estructura plana les permite intercalarse con la doble hélice del ADN y a través de la reacción de Fenton ( $Cu^{2+}+H_2O_2 \rightarrow Cu^++OH^-+OH\cdot$ ) (**Kehrer, 2000**) puede generar ROS e inducir rompimientos de las hélices del ADN (**Gaetke y Kuang, 2003; Bravo et al., 2009**).

La investigación de **Ruiz (1992, 1993)** hace notar la relación existente entre las Casiopeínas y la molécula del ADN, ya que encuentra mutaciones puntuales en las moscas *Drosophila melanogaster* tratadas con las tres Casiopeínas, señalando que este hecho implica una interacción de los tres compuestos con el ADN.

De forma particular para **Casiopeína Igly**, se ha reportado que es genotóxica, de acuerdo con varias investigaciones como la de **Alemon et al. (2007)** quien encontró que este compuesto genera diferentes grados de daño al material genético, manifestado como fragmentación de ADN en células HeLa y linfocitos humanos. Asimismo, **Pérez (2008)**, señaló que conforme incrementa la concentración de la Casiopeína Igly se incrementa el porcentaje de MN. También **Uribe (2010)**, en linfocitos *in vitro* aislados observó un incremento del porcentaje de MN y frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

Con respecto a la **Casiopeínas Ilgly** se evidencia su interacción con el ADN, ya que al evaluar con EUAG se observó que el compuesto es capaz de producir rompimientos de cadena sencilla (RCS) (**Florin, 2005**). De igual forma, **Atilano (2007)** encontró evidencia del efecto genotóxico de la Casiopeína Ilgly en cultivos de linfocitos humanos de sangre completa tratados a las 44 h, ya que se manifiesta un incremento de la frecuencia de MN, aberraciones comosómicas estructurales (ACE) y asociaciones de satélite (AS) comparando con el testigo negativo.

Por otro lado, **Rivero et al. (2007)** mostraron que la Casiopeína Ilgly se une al ADN con gran afinidad y es capaz de degradar ARN y ADN genómico en presencia de un agente reductor como el ácido ascórbico, indicando que el mecanismo de acción de los compuestos puede estar relacionado directamente con daño al ADN. Otro estudio evaluó el daño al ADN de la Casiopeína Ilgly mediante la prueba de EUAG en distintos órganos de ratones de la cepa CD-1, concluyendo que es genotóxica debido al aumento de células con daño y al

incremento de la longitud de los cometas en los tejidos y órganos analizados **(Cermeño, 2007)**.

**Guevara (2008)**, encontró que la Casiopeína Igly es genotóxica ya que en las tres concentraciones 0.33, 0.66 y 1.00 µg/mL en cultivos de linfocitos humanos, induce un aumento estadísticamente significativo de los ICH. Así mismo, **Cordero (2010)** demostró que en cultivos de linfocitos aislados tratados con Casiopeína Igly a las 44 h se incrementó de forma significativa y de una manera dosis-dependiente el porcentaje de micronúcleos.

Para la **Casiopeína III-I-a**, **Guerrero (1993)** confirmó el efecto genotóxico observando fragmentación en el genoma. Además, **Tovar et al. (2004)** reportó que la distancia que hay entre el cobre y el átomo de nitrógeno de la adenina es de aproximadamente 4Å, lo cual hace referencia al acercamiento o interacción mediante apilamiento del compuesto con la molécula del ADN. **Cermeño (2007)** encontró genotoxicidad de la Casiopeína III-I-a, en diferentes órganos de ratones machos de la cepa CD-1, expuestos durante 3, 6, 12 y 24 horas con 7.3 mg/kg de Casiopeína III-I-a.

También se ha observado aumento significativo de la frecuencia de MN así como de la frecuencia de ICH, observándose tendencia dosis-dependiente para ambos parámetros, concluyendo que la **Casiopeína III-I-a** es genotóxica en linfocitos humanos *in vitro* **(Cancino, 2008)**.

Respecto a los puentes nucleoplásmicos (PN) y yemas nucleares (YN) al igual que los MN, son un biomarcador de daño al ADN **(Serrano y Montero, 2001; Fenech y Crott, 2002; Fenech, 2006)**.

Actualmente los trabajos de **Pérez (2008)** y **Uribe (2010)** son los únicos que reportaron presencia de PN en la **Casiopeína Igly**, indicaron que tienden a incrementar su porcentaje conforme se aumenta la concentración. El trabajo de

**Cordero (2010)** reportó para la **Casiopeína Ilgly** que los cultivos de linfocitos aislados y tratados por separado a las 20 y 44 h con 1.00 µg/mL induce un aumento en el porcentaje de PN de forma significativa comparando con el testigo negativo.

Con respecto a las YN, no hay ningún antecedente que haga referencia de ellas en cultivos de linfocitos tratados *in vitro* con las Casiopeínas. Sin embargo, existen amplias investigaciones de la formación de las YN en otros sistemas de prueba, tal es el caso de la revisión de **Longwell y Yerganian (1965)** quienes describió la gemación del material nuclear de líneas celulares *in vivo*, donde ocurrieron cambios en el número de cromosomas, y la formación espontánea de estas estructuras (YN) se observó como un posible mecanismo para la pérdida de cromosomas y la generación de MN. En células vivas en cultivo, ellos fueron capaces de ver mediante el microscopio de contraste de fases y microscopía de interferencia, la inducción de yemas nucleares en las mismas líneas celulares tratadas con colchicina he incluso describieron gemación micronuclear. Se determino una relación clara de la formación de MN con YN, aunque, también pudieron establecer que no todas las protuberancias nucleares pueden formar MN, ya que se observa que algunas YN se reintegran en los núcleos durante la siguiente profase.

Por su parte, **Mitchell y Norman (1987)** evidenciaron la relación YN-MN cuando irradiaron linfocitos normales y observaron un incremento de la frecuencia de los MN de forma tiempo-dependiente, se atribuyó a un retraso de la segregación del material genético después de la división. Propusieron que los MN permanecen unidos a los núcleos principales y se desprenden sólo durante la próxima fase S, siempre y cuando las células continúen proliferando.

Posteriormente **Tolber et al. (1992)** en su estudio de anomalías nucleares en células bucales, señalaron que las YN representan un proceso por el cual los MN son producidos. Este fenómeno se analizó con más detalle en la investigación

realizada por **Shimizu et al. (1998)** quienes identificaron, con la técnica de FISH, el oncogen *c-myc* característico de las dobles minutas (DMs) obtenidas de la línea celular de cáncer de colon de origen neuroendocrino COLO 320DM. Con los resultados que obtuvieron reportaron que las DMs podían ser removidas por el núcleo, a través de un novedoso mecanismo de *micronucleación* que es iniciado con la formación de una protuberancia de la membrana nuclear durante la fase S.

Para darle continuidad a este trabajo **Tanaka y Shimizu (2000)**, examinaron el comportamiento de las DMs durante la progresión del ciclo celular con respecto a la localización de la proteína lamina, mediante inmunofluorescencia. Mostrando que las DMs presentan una reubicación intracelular y son envueltas por lamina un vez que la célula entra a la fase S, dando como resultado una yema nuclear. Señalando que las YN pueden ser las precursoras de los MN, donde la naturaleza acéntrica de las DMs es crucial para que se incorpore de forma específica en estos MN. Considerando que este mecanismo pudiera ser universal, para que los fragmentos extracromosómicos acéntricos sean eliminados de la célula.

Posteriormente se sugirió que el modelo de **Tanaka y Shimizu (2000)** se puede ampliar e incluir el ADN amplificado, ADN que falló en su replicación o que tuvo una condensación inapropiada, los retrasos en la anafase (incluyendo fragmentos terminales con telómero, cromosomas completos y otros elementos céntricos como los que describe la **figura 4.4.**) así como los rompimientos de los puentes nucleoplásmicos. Este modelo podría combinar las diferentes teorías de la formación de las yemas nucleares y su relación con los micronúcleos, sugiriendo un mecanismo general para el origen de YN en el ciclo celular (**Lindberg et al., 2007**).

Otro trabajo, señaló que las YN fueron inducidas por el clastógeno mitomicina C (MMC), así como por el aneugénico colcemida, e incrementaron en una proporción similar a los MN en ambos casos. Asimismo, señalan que la frecuencia de YN y MN es semejante, al analizar los linfocitos de personas fumadoras. También

reportan que el incremento de la frecuencia de YN y MN en los linfocitos de cerdos infectados de *Taenia solium*, son muy parecidas. Se observó que las YN aparecían en respuesta de los mismos tratamientos en los que se encontraban los MN, sugiriendo también que es posible que las YN correspondan a PN observados en anafases anormales o reordenamientos cromosómicos que podrían impedir la adecuada reorganización de la cromatina en el núcleo interfásico **(Serrano y Montero, 2001)**.

**Fenech (2006)**, reveló una fuerte correlación entre la formación de MN, YN y PN ( $r = 0.75-0.77$ ,  $p < 0.001$ ) en linfocitos, inducida por la deficiencia del ácido fólico y/o la radiación ionizante que causa inestabilidad genómica y amplificación de genes por la iniciación del ciclo rompimiento-fusión-puente (R-F-P).

También **Lindberg et al., (2007)**, estudiaron el origen de las yemas nucleares y los micronúcleos mediante FISH (usando sondas de ADN pantelomérica y pancentromérica) en cultivos de linfocitos humanos restringidos durante 9 h a folatos, y encontraron que tanto las YN como los MN, albergan ADN sin centrómero y con telómero (C-, T+) 43.5% y 62.2% respectivamente; ADN con centrómero y telómeros (C+, 2T+) 10.2% y 22.0% respectivamente y ADN intersticial (T-, C-) 42.7% y 12.9% respectivamente. Concluyeron que la privación de folatos incrementa a los MN y a las YN con fragmentos terminales, fragmentos intersticiales y con cromosomas completos. Propusieron, que el ADN que queda en el citoplasma durante la mitosis es encapsulado por la membrana nuclear para formar directamente un micronúcleo o es encapsulado más tarde en la fase S durante la reconstitución de la envoltura nuclear formando una yema nuclear. Las yemas pueden despegarse del núcleo para convertirse en micronúcleo **(figura 4.4)**.

El hecho de que las YN contengan un mayor porcentaje de fragmentos intersticiales (C-, T-) a diferencia de los micronúcleos, llevó a sugerir que las YN y los MN son parcialmente diferentes en el origen de su mecanismo de formación.



Debido a que los micronúcleos tienen una prevalencia baja de ADN sin señales positivas (C-, T-), sugiere que las yemas no necesariamente formarán a los micronúcleos en células binucleadas (**Lindberg et al., 2007**).

Sin embargo, es necesario destacar que tanto YN como MN tienen la capacidad de albergar el mismo material genético. Pero los resultados en cuanto a la frecuencia en que persista uno u otro tipo de ADN puede diferir cuando se cambian las condiciones de los cultivos, los donadores o el tipo de célula (**Lindberg et al., 2007**).

**Morais y Marin (2009)**, mencionaron que las YN son el resultado de la eliminación de material genético excedido derivado del proceso de poliploidización en células de *Allium cepa*.

Además, aún no es tan claro cómo se desarrollan las yemas nucleares o cómo un micronúcleo es formado por una yema nuclear (**Lindberg et al., 2007**). Para despejar éstas y otras incógnitas es necesario promover y continuar con este tipo de líneas de investigación.

#### 4.4.2. ANTECEDENTES DE CITOTOXICIDAD

Se reconoce a la apoptosis como la vía celular intrínseca para inhibir el desarrollo del cáncer (**Vizcaya et al., 2000; Sedivy, 2007**), sin embargo las células cancerosas se resisten a la inducción apoptótica mediada por drogas, generalmente por que se encuentra dañado el p53 (**Carvallo et al., 2008**), y debido a que actualmente no existe ningún antineoplásico que sea selectivo, es necesario determinar el efecto citotóxico de las Casiopeínas, discerniendo el tipo de muerte celular que están induciendo. Es así que algunos investigadores se han dado a la tarea de evidenciar el posible daño citotóxico de estos compuestos.

**Gaetke y Kuang (2003)** reportaron que el cobre por si sólo en concentraciones altas tiene la capacidad de inducir necrosis en el hígado, dicho dato adquiere importancia al recordar que este metal es parte medular de la molécula de las Casiopeínas. También **Uribe (2010)**, reportó un aumento estadísticamente significativo de apoptosis y necrosis en las concentraciones de 0.615, 1.23, 2.46 µg/mL de la **Casiopeína Igly**, siendo la apoptosis la muerte celular que predomina. **Rodríguez et al. (2004)**, al evaluar el incremento de la tasa de apoptosis y de necrosis en células HeLa tratadas con Casiopeína Igly por medio de citometría de flujo, indicó que este compuesto muestra un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células apoptóticas.

Existen antecedentes de que la **Casiopeína Igly** es tóxica en líneas celulares de leucemia murina L1210 y carcinoma de ovario humano CH1, la cual fue capaz de producir muerte celular por apoptosis y necrosis de acuerdo con **Vizcaya et al. (2000)**. También **Rodríguez et al. (2004)**, reportó incremento de apoptosis y necrosis en células HeLa tratadas con Casiopeína Igly.

En el **2005, Trejo et al.** descubrió que la Casiopeína Igly puede generar apoptosis de forma dependiente e independiente de caspasas. Por otra parte, se ha descrito que las células de CH1 y L1210 son más sensibles a la Casiopeína que al Cis platino. Con grandes concentraciones de **Casiopeína Igly** se causan

perforaciones en la membrana celular, las células se hinchan y consecuentemente revientan, induciendo necrosis, sin embargo, a bajas concentraciones no se observa citotoxicidad, permitiendo la señalización para realizar preferentemente apoptosis. Se propone para la Casiopeína IIgly, que ROS están relacionadas con su efecto citotóxico (principalmente  $\cdot\text{OH}$ ) tanto *in vivo* como *in vitro* (**Rivero et al., 2007**) y que la unión de cobre II a fenantrolina, induce apoptosis, lo cual revela la importancia de la composición del compuesto, para inducir citotoxicidad (**Cai et al., 2007**).

Otro trabajo que reafirmó la actividad citotóxica de este compuesto es el de **Cermeño (2007)**, cuando cuantificó la viabilidad celular de ratones machos de la cepa CD-1 con dos colorantes fluorocromados, donde se mostró que la Casiopeína IIgly es capaz de disminuir significativamente la viabilidad en células de sangre, corazón, hígado y bazo durante 12 h y en el tratamiento de 24 h en corazón, hígado, bazo y testículo.

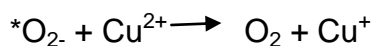
En cultivos de linfocitos aislados tratados a las 20 h con 0.33, 0.66, 1.00  $\mu\text{g/mL}$  de Casiopeína IIgly, se observó un incremento de células apoptóticas y necróticas, siendo la apoptosis la más frecuente con un comportamiento dosis-dependiente. Por otro lado, al aplicar tratamiento a las 44 h con las mismas concentraciones se observó nuevamente un incremento de forma dosis-dependiente de la apoptosis (**Cordero, 2010**).

Con respecto a la **Casiopeína III-I-a** hay antecedentes que señalan que es capaz de generar muerte celular por necrosis (**Rodríguez et al., 2004; Rivero et al., 2007**). Asimismo, **Barron (2006)**, encontró la expresión de caspasa 3 (proteína ejecutora de la apoptosis) en tres líneas tumorales humanas HeLa, MCF7, SKLU-1 y en linfocitos aislados humanos tratados con Casiopeína III-I-a y actividad metabólica, señaló que los linfocitos son células que presentan menor susceptibilidad a la muerte que a las células transformadas.

Por su parte **Cermeño (2007)**, encontró en células de ratones machos de la cepa CD-1 tratadas durante 3, 6, 12 y 24 h con **Casiopéina III-I-a** ( $\frac{1}{2}$  de la LD50 que corresponden a 4.4 mg/kg) que la viabilidad disminuyó significativamente a las 12 h en las células de bazo y a las 24 h en bazo y riñón, concluyó que este compuesto es citotóxico.

Así también **Carvallo et al. (2008)**, al determinar el efecto de la Casiopéina III-I-a *in vivo* e *in vitro* en la línea celular de cáncer de colon HCT-15 con p53-/-, encontró que *in vitro* reduce la viabilidad e induce necrosis y apoptosis de manera dosis dependiente. La apoptosis fue relacionada con los niveles del incremento de Bax, fragmentación del ADN internucleosomal, exposición externa de fosfatidilserina en la membrana de la célula y la morfología de las células. Mientras que *in vivo* el compuesto también ejerce efecto citotóxico por apoptosis en HCT-15.

Uno de los mecanismos más aceptados para explicar la toxicidad celular de las Casiopéinas se atribuye al ion Cu, que participa en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El ion de cobre en sus dos formas, cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) o cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ) puede participar en la reacción de oxido reducción. En presencia de superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) o de agentes reductores tales como ácido ascórbico o glutatión, el  $\text{Cu}^{2+}$  puede ser reducido a  $\text{Cu}^{1+}$ , el cual es capaz de catalizar la formación de radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) desde el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) mediante la reacción de Haber Weiss (**Gaetke y Kuang, 2003**).



Dichos radicales pueden reaccionar con diferentes macromoléculas, oxidando ácidos nucleicos, proteínas y lípidos de la membrana causando daño oxidante en la célula (**Gaetke y Kuang, 2003; Vizcaya et al., 2003; Trejo et al., 2005; Alemón et al., 2007; Cai et al., 2007**). La formación de ROS mitocondrial y la oxidación de lipoproteínas están relacionados con el disparo de apoptosis (**Gaetke y Kuang, 2003**).

#### 4.4.3. ANTECEDENTES DE CITOSTATICIDAD

Se ha reportado que algunos miembros de la familia de las Casiopeínas muestran un 50% de inhibición de la proliferación de epitelios humanos transformados como las células de cáncer de colon, CaLo, HeLa y en células cancerosas de leucemia murina L1210 con dosis de 10-100 veces menores que el Cisplatino (**Ruiz, 1992, 1993; Vizcaya et al., 2003**)

Al trabajar de forma particular con la **Casiopeína IIgly**, en células de glioma C6 de ratas se observó una reducción del volumen del tumor, de la proliferación celular y del índice mitótico, además al tratar cultivos de fibroblastos normales con dosis de 1 a 2.5 µg/mL de este compuesto, la viabilidad celular es del 100%, cuando la dosis se incrementa a 5 µg/mL la viabilidad es del 85% en 10 µg/mL es del 50%, siendo las concentraciones de 1, 2.5 y 5 µg/mL son específicas contra células de glioma. De esta manera **Trejo et al. (2005)** apoya el uso de la Casiopeína IIgly como tratamiento contra gliomas malignos.

Asimismo **Alemón et al. (2007)**, al evaluar varios compuestos de la familia de las Casiopeínas (de los grupos I, II y III) en células transformadas y células sanas, observó que las células HeLa son más susceptibles a estos compuestos que los linfocitos. Por otro lado, **Barron (2006)** encontró que la Casiopeína III-I-a (con y sin actividad metabólica) disminuye la viabilidad en las tres líneas celulares humanas (HeLa, MCF7, SKLU-1) aun más que el Cisplatino.

**Arnaudeau et al. (2000)**, reportó que las Casiopeínas IIgly y III-I-a son citostáticas. Dicha característica llevo a una investigación más profunda sobre la capacidad de inducir recombinación intracromosómica homóloga en células de mamíferos, con el fin de obtener información adicional acerca del posible riesgo para inducir tumores secundarios durante el tratamiento anticancerígeno. Con el fin de abordar esta cuestión, se estudió el gen *hprt*, en un modelo experimental

único de investigación para recombinación homóloga intracromosómica, procedente de células V79 de hámster chino, empleándolo como el único marcador endógeno para la recombinación homóloga. Los resultados demostraron que las Casiopeínas tienen baja probabilidad de provocar inestabilidad genómica a través de la recombinación lo cual es ventajoso para estos compuestos en el ámbito terapéutico, ya que no propicia la inducción de tumores secundarios como los compuestos que si inducen recombinación (**Arnaudeau et al., 2000**).

El efecto citostático presente en las Casiopeínas en estudio, es una característica que se busca en los agentes anticancerígenos, el hecho de que toda esta evidencia indique que las Casiopeínas presentan este efecto sobre todo en células transformadas les confiere ventajas como agentes antineoplásicos.

Como se puede ver, es mucha la investigación que se ha venido realizado sobre las Casiopeínas, con el afán de que puedan ser candidatas a entrar en la lista de agentes antineoplásicos y así aminorar la dependencia absoluta de la industria farmacéutica extranjera. Sin embargo falta profundizar en algunos aspectos, como en su mecanismo de acción sobre el ADN, identificando si actúan de forma directa o indirecta sobre el material genético. De aquí la importancia de obtener más conocimiento sobre este hecho, lo que lleva a plantear nuevos proyectos para dilucidar dichas interrogantes.

#### 4.5. METODOLOGÍAS DE ESTUDIO DE DAÑO GENOTÓXICO, CITOTÓXICO Y CITOSTÁTICO

Cuando un fármaco es prometedor como las Casiopeínas, se somete a una serie de evaluaciones preclínicas para identificar sus propiedades farmacológicas, farmacocinéticas, toxicológicas y genotóxicas. Para evaluar la genotoxicidad se cuenta con una batería de pruebas dentro de las cuales destaca el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC), por que se puede identificar el daño producido al material genético en células sanas de forma sencilla, rápida y confiable (**Fenech, 2000; Kirsch-Volder *et al.*, 2000; Chi-Jen, 2003; Norppa y Falck, 2003**). Este daño cromosómico se manifiesta como **micronúcleos (MN), yemas nucleares (YN) y puentes nucleoplásmicos (PN)**.

Los **micronúcleos** se definen como pequeños cuerpos extranucleares que pueden contener fragmentos céntricos o acéntricos, cromatídicos o cromosómicos, cromátidas o cromosomas completos, que se retrasan en la anafase y no se integran a los núcleos de las células hijas en telofase (**figura 4.4**) por lo que son una manifestación de daño en el genoma a nivel cromosómico (**Tucker y Preston, 1996; Albertini, 2000; Fenech, 2000; Won *et al.*, 2002; Norppa y Falck, 2003; Bajpayee *et al.*, 2005; Kirsch-Volder *et al.*, 2003; Lindberg *et al.*, 2007**). Los micronúcleos formados por cromosomas completos se deben principalmente a defectos en el huso mitótico, centrómero, cinetocoro u otras partes del aparato mitótico o por daño de sub-estructuras cromosómicas, alteraciones en la fisiología celular y distribución mecánica (**Tucker y Preston, 1996; Norppa y Falck, 2003**).

Es así que los MN pueden reflejar el modo de acción de diferentes agentes, determinando si son clastogénicos (inducción de rompimientos de cromosomas creando fragmentos céntricos o acéntricos que pueden ser fácilmente incluidos dentro de un MN) o aneugénicos (mala segregación cromosómica o retrasos en anafase, generando que los cromosomas completos puedan ser rodeados por un

fragmento de envoltura nuclear formando el MN) (**Tucker y Preston, 1996; Norppa y Falck, 2003; Terradas et al., 2010**). El ensayo de MNBC en combinación con la Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) usando sondas pan-centroméricas y/o pan-teloméricas puede discernir entre estos dos eventos (**Kirsh-Volders et al., 1997**). Convirtiéndose los centrómeros marcados en una valiosa información para detectar MN formados por daño aneugénico o clastogénico en las evaluaciones *in vitro* (**Won et al., 2002; Fenech et al., 2003**).

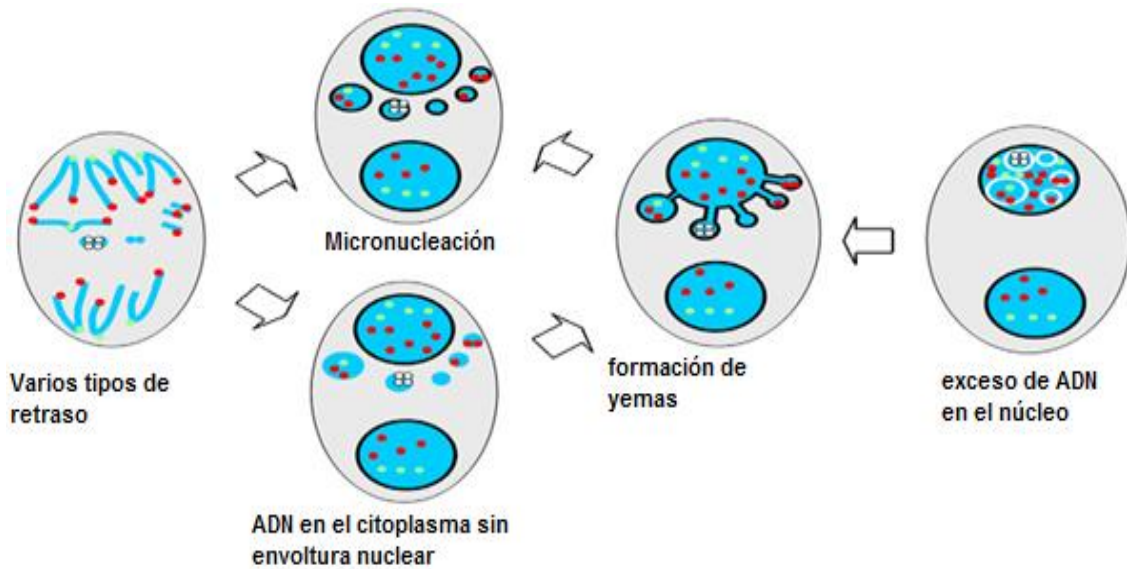
Se denomina **hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)** al conjunto de técnicas que permiten estudiar el número y la localización de una secuencia genómica determinada, mediante el uso de una sonda fluorescente. Fue descrita por primera vez por Rudkin y Stollar en 1977 y desde entonces se ha convertido en una herramienta muy utilizada para múltiples aplicaciones. Es una técnica de alta sensibilidad y especificidad con una resolución de 100 kb usando núcleos en interfase (**Choo, 1994; Segura et al., 1997; Koji, 2000**), permite localizar secuencias específicas de ADN de preparaciones citológicas (**Takehiko, 2000**) de manera muy rápida (**Montuenga et al., 2009**).

El principio de la técnica consiste básicamente en el uso de un fragmento de ADN marcado específicamente *in vitro* con un fluorocromo (**la “sonda”**)<sup>1</sup> la cual será introducida a las células para reaccionar y unirse con la cadena complementaria de ADN (**Segura et al., 1997; Montuenga et al., 2009**) (**figura 4.5**), de acuerdo a la propiedad de apareamiento de las bases Adenina-Timina y Guanina-Citocina para localizar un fragmento de ADN blanco (**Choo, 1994; Wilkinson, 1994; Segura et al., 1997; Koji, 2000; Guizar, 2001**). Con esta técnica también es posible localizar aneuploidías u otras anomalías cromosómicas en células en interfase (**Jackson, 2002; Fenech et al., 2003; Vargas, 2006**).

---

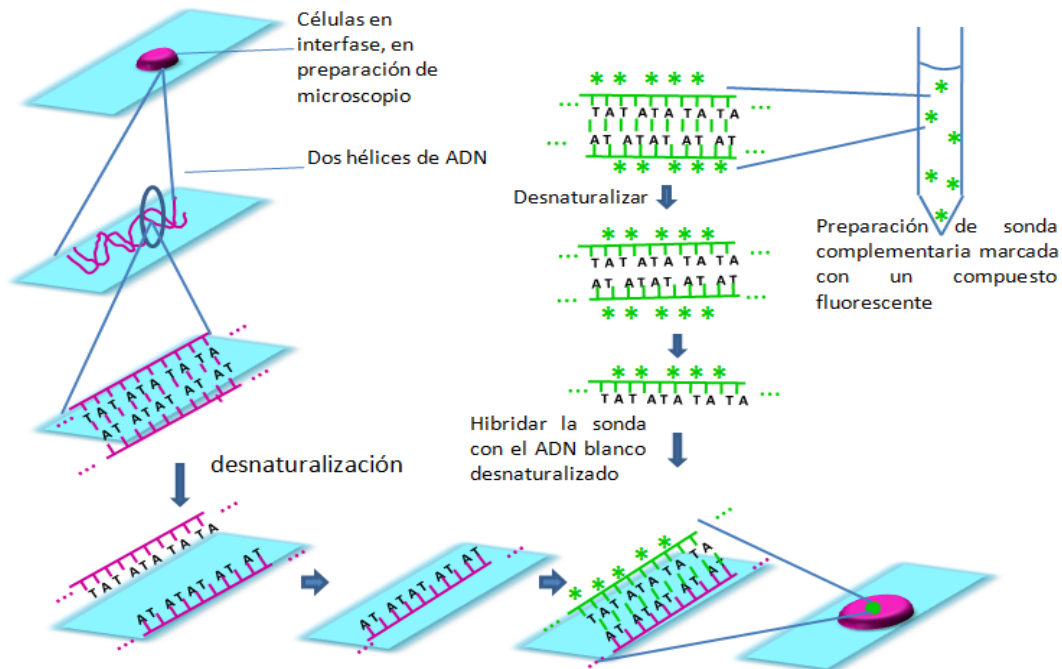
<sup>1</sup> Cualquier forma de ácido nucleico puede ser usado como “sondas” para hibridación, por ejemplo: fragmentos de ADN y ARN, así como oligonucleicos (**Segura et al., 1997**).





**Figura 4.4.** Modelo de formación de micronúcleos y yemas nucleares en células binucleadas de linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis. Se manejan únicamente cuatro cromosomas para simplificar. Los puntos verdes indican ADN centromérico (C+), los puntos rojos ADN telomérico (T+), los puntos blancos ampliaciones de ADN u otro ADN promiscuo como fallo en la replicación y/o condensación inapropiada. La envoltura nuclear se observa con una línea más oscura. Los tipos de retrasos formados incluyen cromosomas completos (C+, 2T+), ampliaciones de ADN u otro ADN promiscuo (C-T-), como ADN que falló en su replicación o que tuvo una condensación inapropiada o fragmentos intersticiales o dobles minutas<sup>2</sup> (C-T-), fragmentos acéntricos de tipo cromosómico (C- 2T+), fragmento acéntrico de tipo cromatídico (C- 1T+). Retrasos de fragmentos originados por el rompimiento de un puente en anafase (**figura 4.7**). En telofase, los retrasos crean MN (esquema superior); esto es considerado como el mecanismo primario que da origen a los micronúcleos. Los retrasos que no se encapsularon en una envoltura nuclear en telofase (esquema inferior), pueden ser atrapados más tarde por la proteína lamina nuclear B en la fase S, cuando es reorganizada durante la reconstitución de la envoltura nuclear y constituye una yema nuclear. Las yemas nucleares pueden ser subsecuentemente micronucleadas. A la derecha en la parte superior, el núcleo contiene varias formas de exceso de ADN (delineado por una línea blanca; se etiqueta igual que lo anterior con C y T): una cromátida extra, ADN amplificado u otro ADN promiscuo y fragmentos acéntricos extra (intersticial, terminal de tipo cromosómico, terminal de tipo cromatídico). El exceso de ADN induce a las yemas nucleares y estas pueden subsecuentemente micronuclearse (**Lindberg et al., 2007**).

<sup>2</sup> La Dobles Minutas (DM), son fragmentos extracromosómicos, ácenticos de tamaño pequeño, los cuales se originaron por lesiones intersticiales dando una apariencia característica de un par de esferas cromatínicas, se replican de forma autónoma, no se segregan con los mismos mecanismos que usan los cromosomas y son frecuentemente generadas por las células cancerosas. Estas estructuras codifican proteínas que proveen la ventaja de supervivencia *in vitro*, o resistencia a una variedad de agentes quimioterapéuticos *in vitro*.



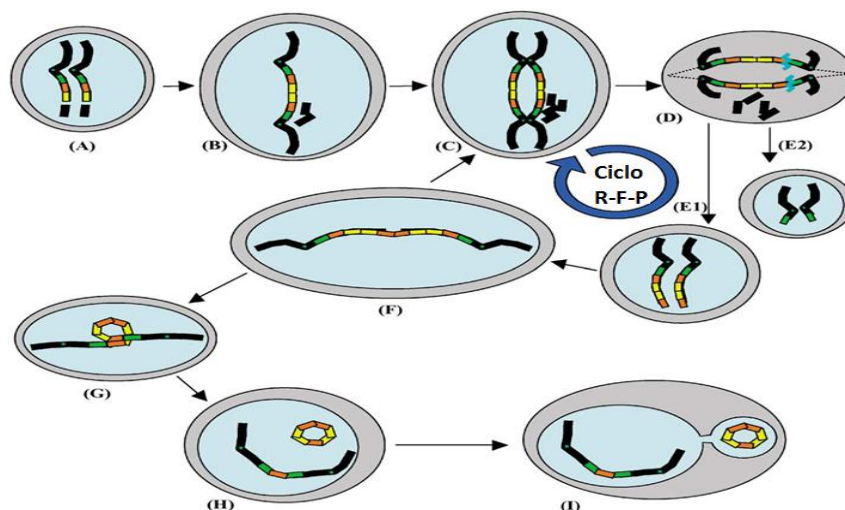
**Figura 4.5.** Esquema de la incorporación de una sonda fluorescente al material genético.

En suma, la combinación del ensayo de MNBC y la técnica de FISH usando sondas centroméricas y/o teloméricas pueden ser empleadas para obtener información sobre el origen de los micronúcleos que ocurren de manera espontánea o por la exposición de uno o varios agentes físicos, químicos y biológicos. Por tanto, es muy útil para poder establecer los mecanismos de daño genotóxico.

Las **yemas nucleares** son una manifestación de inestabilidad cromosómica, están localizadas selectivamente en sitios específicos de la periferia nuclear. Se caracterizan por presentar morfología, estructura y tamaño semejante a la de un MN pero unido al núcleo principal de la célula. Tienen la capacidad de albergar el mismo material genético que los micronúcleos y se pueden observar en numerosos tipos de células (**figura 4.4**) (**Fenech, 2000, 2006; Serrano y Montero, 2001; Fenech y Crott, 2002; Bajpayee *at al.*, 2005; Lindberg *et al.*, 2007**).

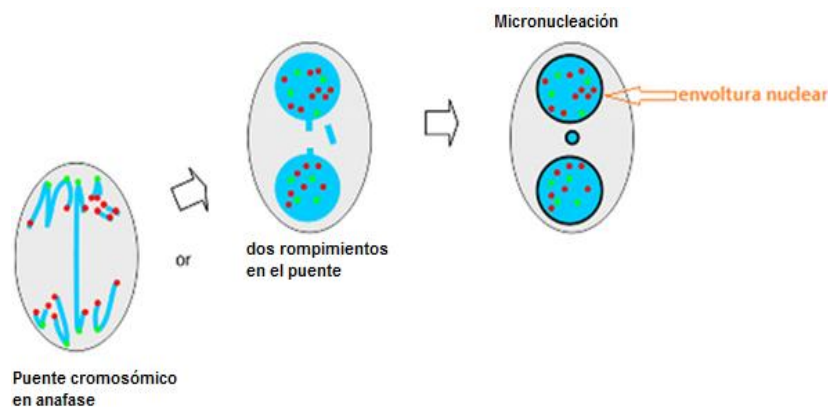
Existe otra alternativa para la formación de yemas nucleares, siguiendo el ciclo **rompimiento/fusión/puente (RFP) (figura 4.6.)**, el cual se puede dar por la pérdida de la función de los telómeros, lo que da origen a la fusión de cromátidas hermanas, conduciendo al origen de PN, amplificaciones de ADN y deleciones terminales (**Bailey y Murnane, 2006; Trkova et al., 2007**), tras la eliminación intersticial del material amplificado, el fragmento resultante puede encontrarse en la periferia de los núcleo celular dando origen a una YN.

De esta manera se han propuesto cuatro modelos para la generación de yemas nucleares. Dos de ellos asumen que las yemas nucleares son generadas en la división celular, ya sea por los retrasos en anafase (**figura 4.4**) o por rompimientos de puentes en anafase (**figura 4.7**). Los otros dos postulan que las yemas nucleares son formadas en la fase S, representando extrusiones de los núcleos de cada ADN amplificado (**figura 4.6**) o cromatina cuya replicación ha fallado (**figura 4.4**) (**Lindberg et al., 2007**).



**Figura 4.6.** Amplificaciones génicas vía ciclo rompimiento-fusión-puente. (A) rompimiento de cromátidas hermanas. (B) Fusión de los extremos pegajosos que forman un cromosoma dicéntrico. (C) El cromosoma dicéntrico es replicado en la fase S. (D) Y son jalados hacia los polos opuestos de la célula durante la anafase (formando un puente). (E1) En este ejemplo, el rompimiento del cromosoma dicéntrico no ocurre en una región central y una célula hija recibe el cromosoma que tiene dos copias del gen amarillo y rojo. (E2) La otra célula hija recibe el cromosoma con una deleción en estos genes. (F) El cromosoma con un número de múltiples copias del gen, puede fusionarse nuevamente. Se repite el ciclo de amplificación repitiendo el paso C. (G) alternativamente, puede ocurrir recombinación entre las secuencias homólogas. (H) y da como resultado un "loop", que dará origen a un fragmento de ADN acéntrico circular o doble minuta. (I) La cual es subsecuentemente extruida por el núcleo mediante la formación de una yema nuclear (**Fenech, 2006**).

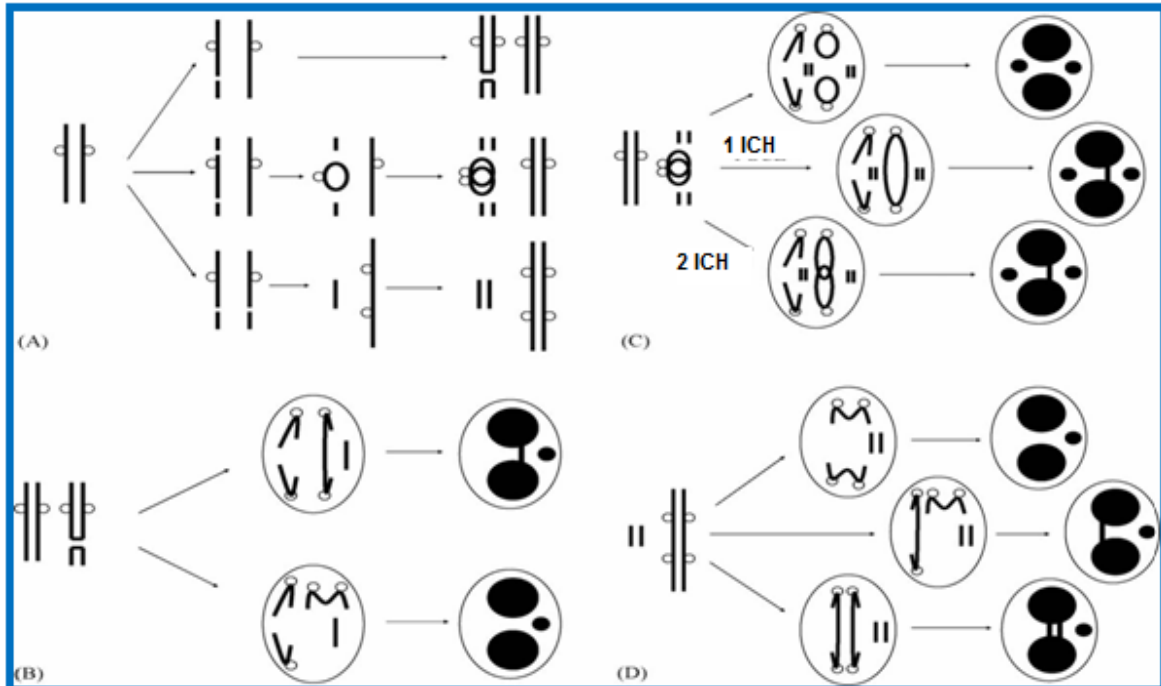
Los **puentes nucleoplásmicos** se definen como cromosomas dicéntricos y se forman cuando los dos centrómeros son jalados por los husos mitóticos hacia los polos opuestos de las células (**Fenech, 2000; Norppa y Falck, 2003; Bajpayee et al., 2005**). Si un PN se rompe pueden dar origen a un micronúcleo (**figura 4.7**) (**Lindberg et al., 2007**). Estas estructuras se pueden originar por varias vías como consecuencia de rearrreglos cromosómicos (**figura 4.8**) (**Fenech, 2000; Norppa y Falck, 2003; Bajpayee et al., 2005**).



**Figura 4.7.** Modelo de formación de micronúcleo debido al rompimiento de un puente cromosómico durante la telofase. Para su simplicidad se manejan cuatro cromosomas. Los puntos verdes indican el ADN centromérico y los puntos rojos el ADN telomérico. La envoltura nuclear se distingue por una línea negra más intensa. El PN en este ejemplo está formado por una cromátida dicéntrica (**Lindberg et al., 2007**).

Además el ensayo de MNBC provee información simultánea sobre citotoxicidad, identificando a la muerte celular de acuerdo con las características morfológicas de las células apoptóticas y necróticas, y sobre la división nuclear, considerando a las células polinucleadas (**Kirsh-Volders et al., 1997**).

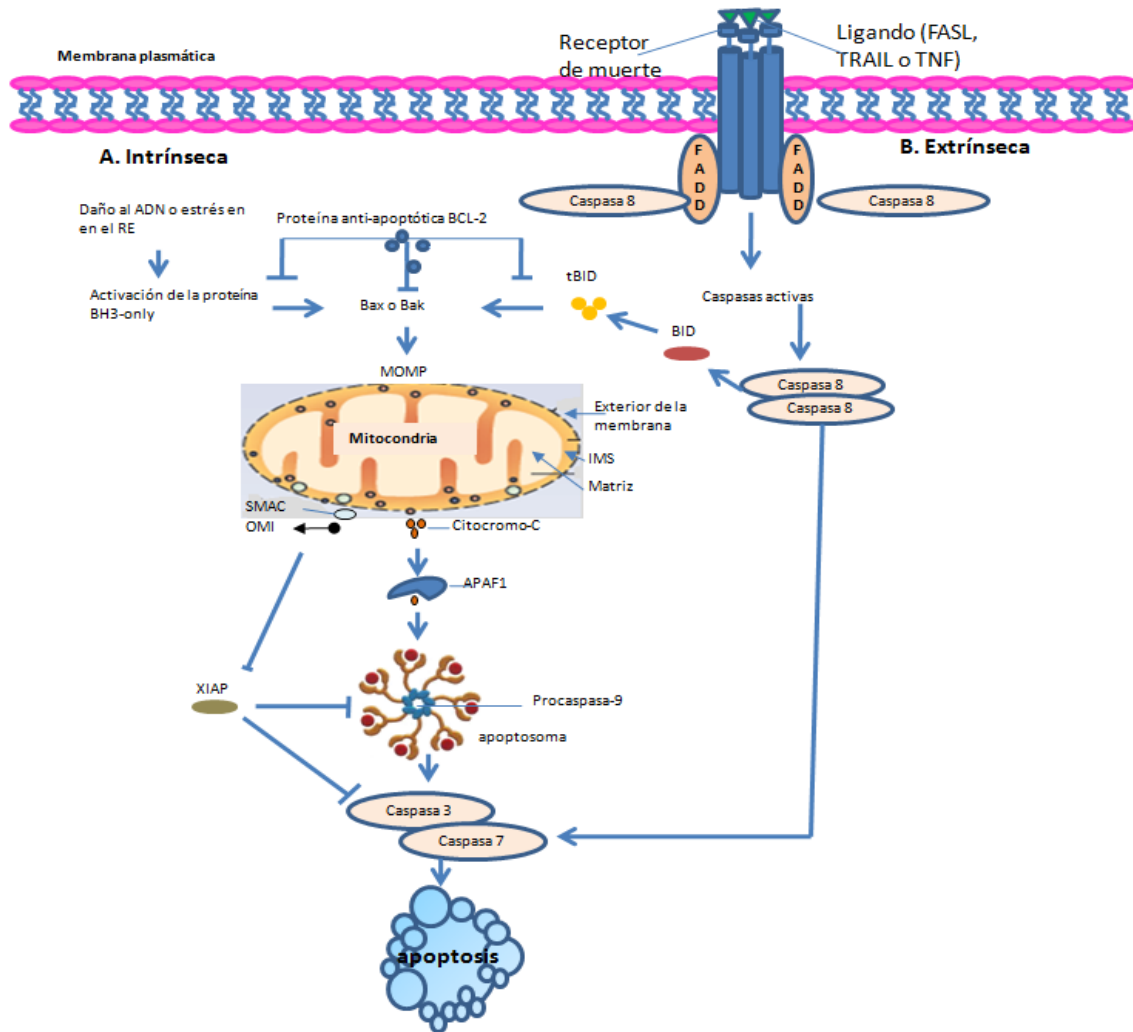
La apoptosis es una muerte celular programada y codificada genéticamente para eliminar células que ya no son necesarias, este proceso está involucrado en el desarrollo normal y la homeostasis de todo el reino animal, se caracteriza por la activación de una o dos cascadas de señalización conocidas como **vía extrínseca** e **intrínseca** para conducir las a la muerte (**figura 4.9**) (**Alberts et al., 2004; Goldsby et al., 2004; Stephen et al., 2010**).



**Figura 4.8** (A) Se representan los eventos de formación de los PN. Donde en el *panel superior* se señala un rompimiento de cadena doble (RCD) inducidos en un cromosoma que permanece sin reparar después de la replicación. Hay una mala unión de los extremos rotos después de la replicación conduciendo a la formación de una cromátida dicéntrica y un fragmento acéntrico. En el *panel intermedio*, se induce dos RCD en cada lado del centrómero de un cromosoma. Los rompimientos terminales son mal reparados y se produce una cromátida circular y dos fragmentos acéntricos, los cuales son subsecuentemente replicados. En el *panel inferior* los RCD son inducidos en dos cromosomas homólogos o no homólogos. La mala unión de los rompimientos terminales conduce al origen de una cromátida dicéntrica y fragmentos acéntricos que se replican posteriormente. (B) *Panel superior*, los centrómeros de una cromátida dicéntrica son jalados por los husos mitóticos opuestos de la célula conduciendo a la creación de un PN y un fragmento cromatídico acéntrico, que se retrasan para producir un micronúcleo. En el *panel inferior*, los centrómeros de una cromátida dicéntrica son jalados por el mismo huso mitótico de la célula y no forma PN. El retraso de los fragmentos cromatídicos acéntricos en ambos casos, resulta en promover un MN. (C) *Panel superior* las cromátidas circulares o en anillo se segregan normalmente, pero los fragmentos acéntricos retrasados en anafase crean dos MN. *Panel intermedio*, las dos cromátidas circulares después de completar un intercambio de cromátidas hermanas (ICH), se transforman en una gran cromátida circular dicéntrica la cual conduce al establecimiento de un PN, cuando los centrómeros son jalados hacia los polos opuestos en la célula en anafase. Los fragmentos acéntricos retrasados en anafase constituyen dos MN. *Panel inferior*, las dos cromátidas hermanas, después de completar dos ICH, se vuelven concatenadas y conducen a la formación del PN cuando los centrómeros son jalados hacia los polos opuestos de las células en anafase. Los fragmentos acéntricos retrasados que lo acompañan en la anafase originan a dos MN. (D) *Panel superior*, los centrómeros de la cromátida dicéntrica viajan hacia el mismo polo de la célula y no generan PN. *Panel intermedio*, los centrómeros de una de las cromátidas hermanas es jalado hacia los polos opuestos de la célula conduciendo al inicio de un PN. *Panel inferior*, los centrómeros de las dos cromátidas dicéntricas son jalados por los husos mitóticos hacia los polos opuestos de la célula conduciendo a la formación de dos PN. En cada uno de los casos los MN son producidos por el retraso de fragmentos acéntricos cromosómicos que acompañan a los cromosomas dicéntricos (Fenech, 2006).

En ambas vías, la activación de las caspasas efectoras amplifican la señal apoptótica que asegura la muerte celular en una vía irreversible. Las caspasas son las responsables de los cambios morfológicos por que ellas interactúan con los microfilamentos del citoesqueleto (**Carvallo et al., 2008; Stephen et al., 2010**) y de ellas dependen los mecanismo y cinética de la muerte celular (**Stephen et al., 2010**). Sin embargo en ausencia de la actividad de caspasas las células experimentan **muerte celular independiente de caspasas** (CICD; por sus siglas en inglés).

Las células apoptóticas muestran características morfológicas típicas, por ejemplo, condensación de la cromatina en el núcleo, decrecimiento en el volumen celular, condensación del citoplasma, fragmentación de la membrana nuclear, fragmentación del ADN y modificación del citoesqueleto, cuyo efecto se manifiesta en las vesículas de la membrana que forma los cuerpos apoptóticos, que contienen organelos intactos, que posteriormente serán fagocitados, sin dañar a las células vecinas, asegurando que no se libere hacia el tejido circundante su contenido intracelular, de esta forma la apoptosis no induce una respuesta inflamatoria local (**Kirsh-Volders et al., 1997; Alberts, et al., 2004; Goldsby et al., 2004; Barron, 2006; Stephen et al., 2010**). A la apoptosis se le considera una de las mejores vías intrínsecas para la supresión de tumores (**Feldser y Greider, 2007**).



**Figura 4.9. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.** **A:** estimulación de la apoptosis **intrínseca**, tal como daño en el ADN o estrés en el retículo endoplásmico (RE). Activa a las proteínas BH3-only conduciendo a la activación de BAX o BAK y a la permeabilización de la membrana exterior de la mitocondria (MOMP). Después MOMP, libera a varias proteínas del espacio intermembranal mitocondrial (IMS) promoviendo la actividad de caspasas y apoptosis. El citocromo C se une a Apaf-1, induciendo su oligomerización de tal modo que forma una estructura denominada apoptosoma que recluta y activa una caspasa iniciadora, la caspasa 9. La caspasa 9 se une y activa a las caspasas ejecutoras, la caspasa 3 y 7, conduciendo a la apoptosis. La liberación mitocondrial de SMAC (también conocidos como DIABLO) y OMI (también conocida como HTRA2), neutralizan a las caspasas, cuando se inhiben la función de XIAP (proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma-X). **B:** La vía **apoptótica extrínseca** se inicia por la unión de los receptores de muerte con sus ligandos afines, conduciendo al reclutamiento de moléculas adaptadoras tales como FADD y luego la caspasa 8. Esto da lugar a la dimerización y activación de la caspasa 8. La cual puede unirse directamente y activar a la caspasa 3 y 7, conduciendo a la apoptosis. La intersección entre las vías extrínsecas e intrínsecas se produce a través de la caspasa 8, que se une y activa a BID.

En la Necrosis, las células mueren accidentalmente cuando son lesionadas por agresión mecánica o tóxica. En este tipo de muerte se detecta una serie de cambios característicos: las células y los orgánulos se hinchan por que se altera la capacidad de la membrana plasmática para controlar el paso de los iones y el agua, la degradación del ADN es al azar. Las células se rompen y su contenido se vierte en el espacio intercelular, dando lugar a una respuesta inflamatoria potencialmente perjudicial **(Cascale, 2003; Alberts et al., 2004; Goldsby et al., 2004)**.

La necrosis es considerada generalmente como un proceso pasivo por que no requiere la síntesis de nuevas proteínas, sólo necesita el mínimo de energía y no es regulado por ningún mecanismo homeostático. La muerte celular por necrosis ocurre en el ser humano generalmente en respuesta a varios cambios de las condiciones fisiológicas, incluyendo la hipoxia, isquemia, hipoglucemia, exposición a toxinas, especies reactivas de oxígeno, cambios de temperatura extrema y privación de nutrientes. Varias enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con la necrosis tales como Alzheimer's, Huntington's, Parkinson's y epilepsia **(Syntichaki y Tevernarakis, 2002)**.



## 5. JUSTIFICACIÓN

El Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, ha sido pionero en el estudio de las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a, obteniendo resultados que demuestran su actividad genotóxica, citotóxica y citostática. Sin embargo no hay estudios que profundicen en el mecanismo de acción de estos compuestos sobre el ADN combinando el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis y la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia. Por lo que resultó importante discernir si el efecto genotóxico expresado como micronúcleos, se debe a un mecanismo clastogénico y/o aneugénico.

De esta manera se contribuye con información toxicológica, para el avance de compuestos químicos mexicanos, con aspiraciones de uso como medicamentos para el tratamiento del cáncer y al mismo tiempo, se estandariza la técnica de FISH en el Laboratorio, para su aprovechamiento ya que como se mencionó antes es una herramienta muy útil que permite profundizar en la búsqueda de mecanismos de acción genotóxicos.

## 6. HIPÓTESIS

Si la estructura química le confiere a las Casiopeínas su actividad biológica, debido a que la fenantrolina o biperidina tienen la habilidad de unirse al ADN, y éstas presentan afinidad con el  $\text{Cu}^{2+}$  que a su vez puede reducirse a  $\text{Cu}^{1+}$ , mediante su actividad redox, ocasionando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y el hecho de que la unión de fenantrolina, cobre y un agente reductor, adquieran la capacidad de actuar como nucleasas. Entonces se espera que los micronúcleos formados por estos compuestos químicos sean consecuencia del efecto clastogénico más que aneugénico.

## 7. OBJETIVOS

### General

A través del ensayo de MNBC en combinación con la técnica de FISH determinar el origen (aneugénico y/o clastogénico), de la micronucleación inducida por las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a en cultivos de linfocitos humanos.

### Particulares

- Examinar el efecto genotóxico de las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a por medio del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis *in vitro*, evaluando micronúcleos (MN), puentes nucleares (PN) y yemas nucleares (YN).
- Establecer con la técnica de FISH, si los micronúcleos encontrados tienen la señal de ADN centromérica o carecen de ella, para así determinar el mecanismo de acción genotóxico que inducen las Casiopeínas.
- Analizar el efecto citotóxico de la Casiopeína Igly, Ilgly y III-I-a, usando como parámetro la muerte celular ya sea por apoptosis y/o necrosis.
- Evaluar la citostaticidad de la Casiopeína Igly, Ilgly y III-I-a, mediante el índice de división nuclear (IDN).

## 8. MÉTODO

### 8.1. MICRONÚCLEOS *IN VITRO* CON BLOQUEO DE CITOCINESIS (MNBC)

A partir de donadores hombres, jóvenes (20 a 30 años de edad), no fumadores, clínicamente sanos, se extrajo por punción venosa 5 ml de sange periférica con una jeringa heparinizada (PiSA), posteriormente se cultivó en 5 ml de medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 0.25 ml de lectina (Sigma), y se incubaron durante 96 h a 37°C.

#### Tratamientos

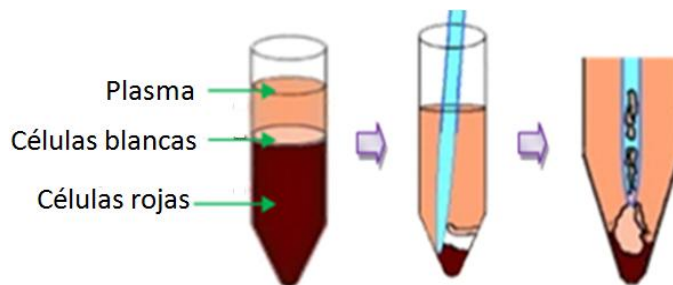
Los cultivos de sangre completa se trataron a las 44 h de iniciada la incubación, con **0.615, 1.23 y 2.46 µg/mL** (o  $1.08 \times 10^{-6}$ ,  $2.16 \times 10^{-6}$ ,  $4.32 \times 10^{-6}$  M) de **Casiopeína Igly**, **0.33, 0.66 y 1.00 µg/mL** (o  $7.7 \times 10^{-7}$ ,  $1.54 \times 10^{-6}$ ,  $2.34 \times 10^{-6}$  M) de **Casiopeína IIgly** y **4.2, 8.4 y 12.6 µg/mL** (o  $9.43 \times 10^{-6}$ ,  $1.88 \times 10^{-5}$  y  $2.83 \times 10^{-5}$  M) de **Casiopeína III-I-a**, respectivamente. Se empleó como **testigo positivo clastogénico 0.2 µg/mL** ( $5.98 \times 10^{-7}$  M) de **mitomicina C** (MMC; Sigma), de igual manera se utilizó como **testigo positivo aneugénico 0.04 µg/mL** ( $1 \times 10^{-7}$  M) de **colchicina** (CCC; Sigma). En el testigo negativo, las células cultivadas no se sometieron a ningún tratamiento. A todos los cultivos se les adicionó **6 µg/mL** ( $1.25 \times 10^{-5}$  M) de **Citocalasina B** (Cit-B; Sigma) a las 48 h.

#### Separación de linfocitos

Una vez cumplidas las 96 h, a los cultivos se les hizo la separación de linfocitos que consiste en centrifugar las muestras a 3600 rpm durante 25 min. Una vez que pasó este tiempo se sacaron los tubos teniendo cuidado de no resuspender las fases.

La fase que contenía a los linfocitos presentaba la apariencia de una capa delgada blanquecina que se encontraba en la superficie de la fase oscura (células rojas)

**(Figura, 8.1).** Después con ayuda de una micropipeta se extrajo cuidadosamente la capa de células blancas.



**Figura 8.1.** Esquema de la separación de células blancas por gradiente de densidad.

Nota.- en caso de re-suspenderse por accidente la fase de células blancas, se agitó (en un vortex; Thermolyne y super-Mixe) el tubo y, se volvió a centrifugar a 3600 rpm por 10 min más y se repitió lo anterior.

### Cosecha

Posteriormente se realizó la fijación con 5 ml de solución de metanol-ácido acético (Baker) en una proporción 3:1 frío. A continuación se centrifugó a 1000 rpm por 10 min, pasado el tiempo, se eliminó el sobrenadante (esto se realizó por duplicado). Luego se llevó a cabo un lavado del paquete celular con una solución fijadora de metanol-ácido acético (Baker) en una proporción 3:1 y los lavados necesarios con metanol-ácido acético 85:15, hasta que el paquete celular quedó limpio. En seguida, se resuspendió el paquete en 0.5 µg/mL de la misma solución y se procedió al goteo de la muestra en los portaobjetos (el goteo se hace a una distancia no mayor a 5 cm), se dejó secar al aire. Finalmente, se realizó una doble tinción, primero con el colorante May-Grünwald (Sigma) en una relación 2:1 por 6 min, después se lavó al chorro del agua corriente. Seguidamente se tiñó con Giemsa (Sigma) al 10% durante 15 min, se lavó de la forma anteriormente explicada para quitar el exceso de colorante y se dejaron secar al aire.

## 8.2. 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. Luego se descongelan a temperatura ambiente y en seguida se sumergieron las laminillas en la solución ácido acético 70%: metanol 30% (Baker), a temperatura ambiente por 5 min. Luego se pasaron a una solución 2XSSC con pH 7.4 durante 2 min a temperatura ambiente. Después se deshidrataron en etanol al 70%, 85% y 100 % (Baker) durante 2 min a temperatura ambiente, respectivamente.

### Maduración

Las laminillas se colocaron en una solución 2XSSC con pH 7.4 a 37°C durante 15 min. Luego se pasaron a etanol al 70%, 85% y 100% (Baker) a temperatura ambiente por 2 min, respectivamente.

### Preparación de sonda

La sonda (Kreatech, Poseidon) identifica el ADN centromérico y se encuentra lista para su uso.

### Cohibridación

Se tomó una alícuota de 8 µl de sonda y se colocó en un cubreobjetos de 22X22 mm, que posteriormente se colocó sobre el área previamente marcada que contenía la muestra. Después se llevó a cabo la desnaturalización del ADN blanco y la sonda, en una plancha caliente (Boekel) a 75°C por 6 min. Se dejó 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 0.4XSSC / 0.3% Igepal (Sigma) con pH 7.4, por 2 min a 73°C ± 1°C. Luego las laminillas se colocaron en la solución 2XSSC / 0.1% Igepal (Sigma) a temperatura ambiente por 1 min. Por último se dejó escurrir y secar.

### Contratinción

Se aplicaron 8 µL de DAPI II (4',6-diamino-2-fenilindol; Kreatech) en un portaobjetos marcado en el área que contenía la muestra hibridada, posteriormente se colocó un cubreobjetos en esta área. Las laminillas se almacenaron a -20 °C en condiciones de oscuridad, para su análisis posterior.

## 9. EVALUACIÓN Y ESTADÍSTICA

	EVALUACIÓN <sup>3</sup>	MICROSCOPIO	CÉLULAS EVALUADAS	FÓRMULA	PRUEBA ESTADÍSTICA
GENOTOXICIDAD	Micronúcleos (MN)				<b>Ji cuadrada con corrección de Yates (<math>\chi^2 Y</math>).</b> Para estimar las diferencias del efecto genotóxico entre el testigo negativo y el tratamiento. (Márques, 1987).
	Puentes nucleoplásmicos (PN)	Campo claro a 100X. (Nikon eclipse E200 y 80i)	1000 BN al azar	-----	Para la comparación entre Casiopeínas se utilizó un análisis de <b>varianza con diseño anidado</b> , con el programa estadístico statgraphics v 5.0 plus. (Cervantes y Marques, 2007)
	Yemas nucleares (YN)				Para la relación entre MN, PN, YN y AP, se empleó un análisis de <b>regresión lineal</b> .
	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH)	Epifluorescencia (Nikon eclipse 80i), equipado con una lámpara de mercurio.(Nikon); para filtros de DAPI y Rodamina a 100X.	2000 BN al azar		<b>Ji (<math>\chi^2</math>) de Pearson.</b> Para determinar una dependencia entre las células tratadas y el testigo negativo. Se utilizó el programa estadístico SPSS V. 11.5 (Cervantes et al., 2006).
CITOTOXICIDAD	Índice de división nuclear (IDN)	Campo claro a 100X (Nikon eclipse E200 y 80i).	500 células viables	IDN = ((M1 + (2xM2) + (3(M3)) + 4(M4)) / NV	Z para proporciones. Para determinar las diferencias significativas entre el control y los tratamientos (Márques, 1987).
CITOSTATICIDAD	Apoptosis (AP) y Necrosis (NC)	Campo claro a 100X (Nikon eclipse E200 y 80i).	500 células viables y no viables.	-----	Z para proporciones. Para determinar las diferencias significativas entre el control y los tratamientos (Márques, 1987).

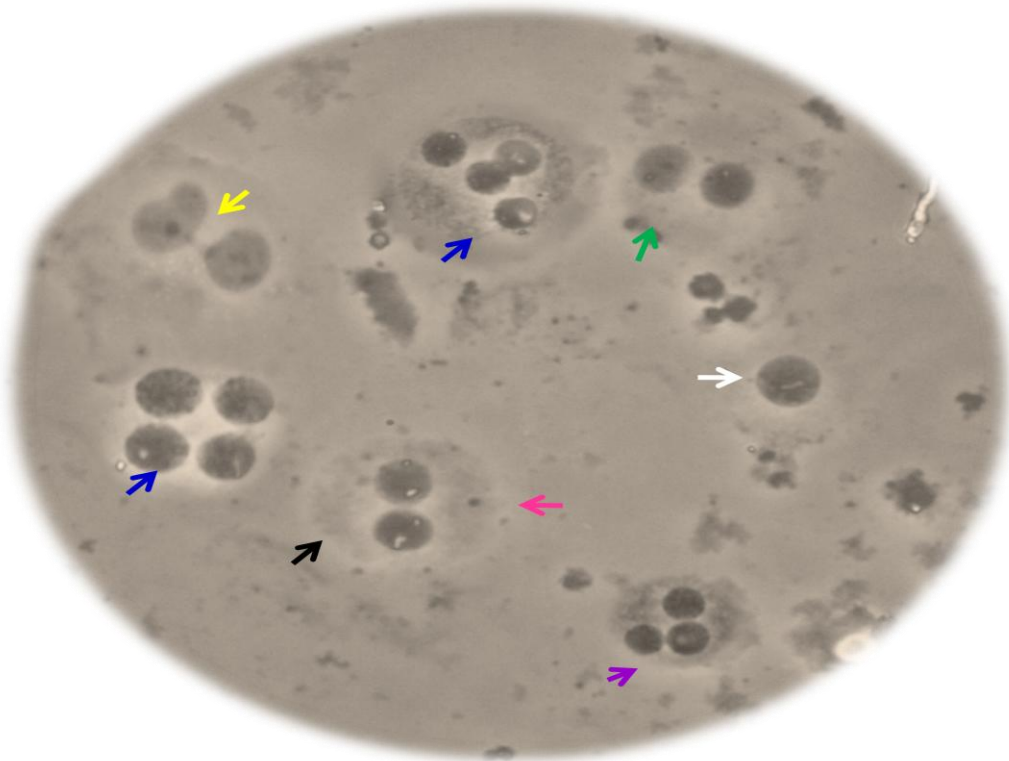
**Cuadro 9.1.** Donde: **BN:** células binucleadas, **NV:** número total de células viables contadas. **N:** número total de células contadas (viables y no viables). **M1-M4:** células viables con 1 a 4 núcleos. Los experimentos se realizaron de forma independiente y cada uno se realizó por duplicado.

<sup>3</sup> Siguiendo los criterios de Fenech et al, (2003).



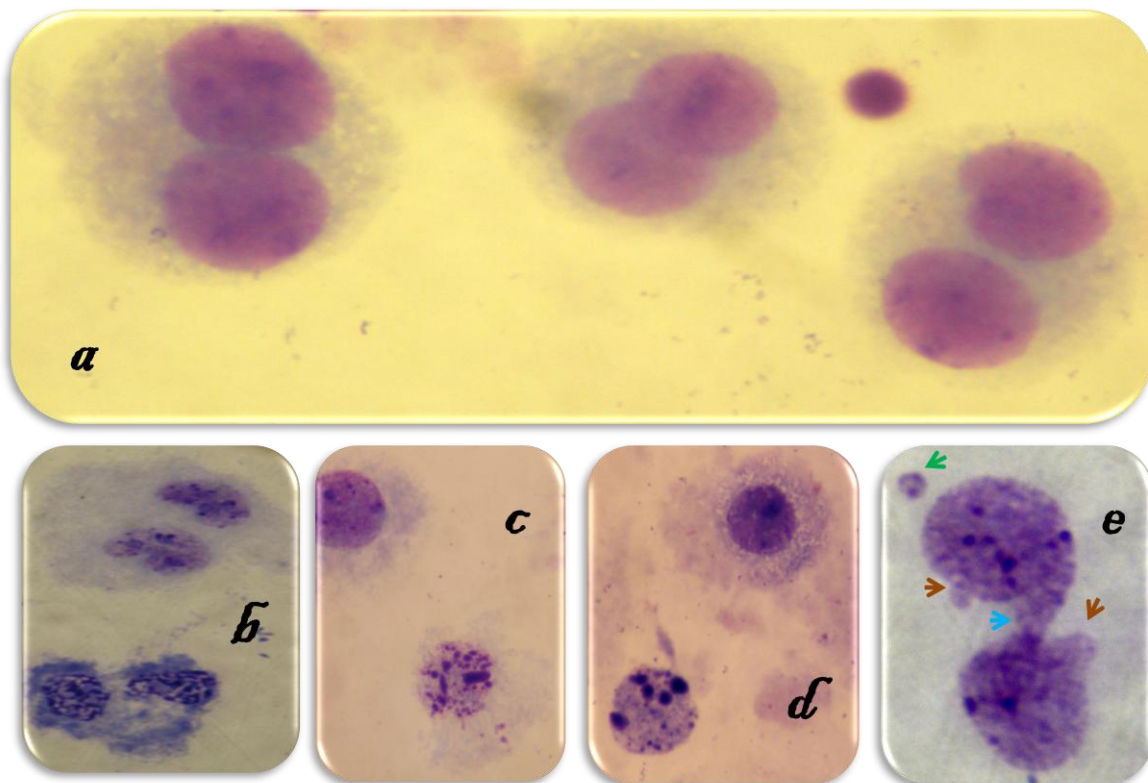
## 10. RESULTADOS

Para cumplir con los objetivos planteados de citogenética clásica y molecular, primeramente, fue necesario identificar el material biológico (células de linfocitos humanos) en contraste de fases como se muestra en la **figura 10.1**.



**Figura 10.1.** Campo de células en contraste de fases. La flecha negra señala una célula mononucleada; las verdes indican células binucleadas; la morada revela una célula trinucleada; las azules muestran a las células tetranucleadas; la rosa, muestra una célula binucleada con un micronúcleo; la flecha amarilla indica un puente nucleoplásmico en una célula binucleada. (40X).

Una vez teñidas las células con May-Grünwald y Giemsa, fue necesario diferenciar las células binucleadas sanas de células binucleadas con daño genotóxico o de algún otro tipo, como muerte celular (apoptosis o necrosis), en las siguientes imágenes (**figura 10.2**) se aprecia el contraste de células sanas con células que tienen daño de tipo genotóxico y citotóxico inducido por la mitomicina C (testigo positivo).

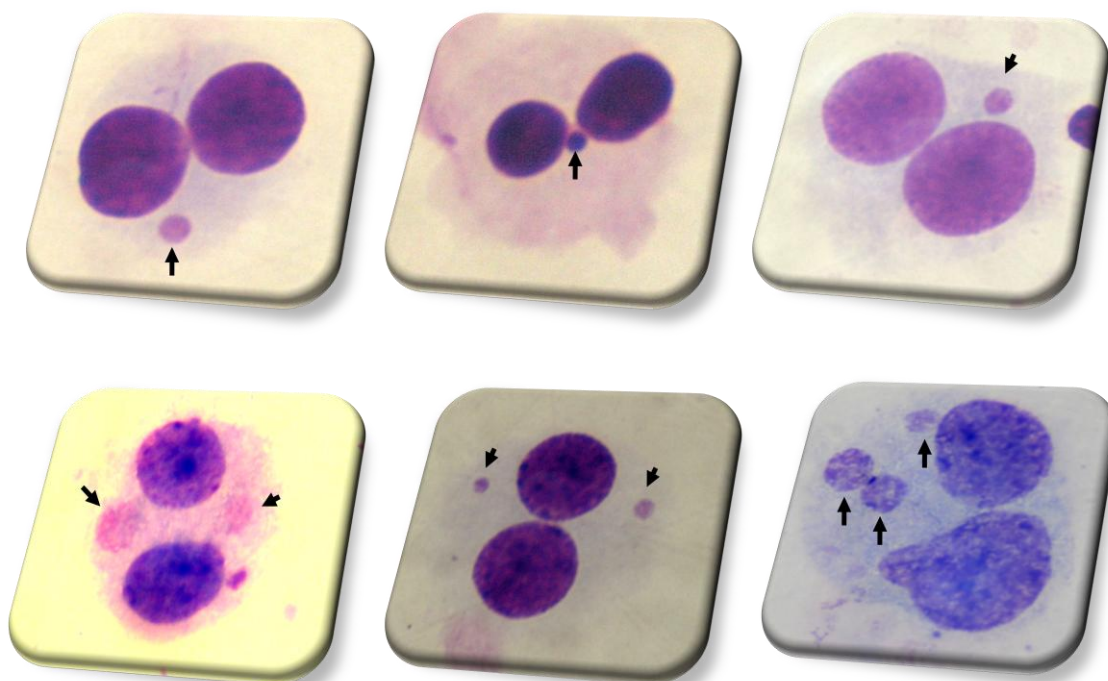


**Figura 10.2.** Fotomicrografías **a)** Tres células binucleadas sin ningún daño, de un cultivo de linfocitos humanos sin tratamiento. **b)** contraste de una célula binucleada sana (arriba) con una célula binucleada necrótica (abajo) en el mismo campo. **c)** contraste de una célula mononucleada sana (arriba) de una célula mononucleada apoptótica (abajo), en el mismo campo. **d)** contraste de una célula necrótica (arriba) con una célula apoptótica (abajo) en el mismo campo. **e)** una célula que presenta tres tipos de alteraciones genotóxicas: un micronúcleo (flecha verde), un puente nucleoplásmico (flecha azul) y dos yemas nucleares (flecha café). Las fotomicrografías de la b-e son de cultivos de linfocitos tratados con MMC C (testigo positivo). (100X).

### 10.1. RESULTADOS DE GENOTOXICIDAD

Son tres los parámetros genotóxicos evaluados en este trabajo, MN, PN y YN, mediante el ensayo de MNBC con linfocitos humanos *in vitro* tratados con tres Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a, respectivamente.

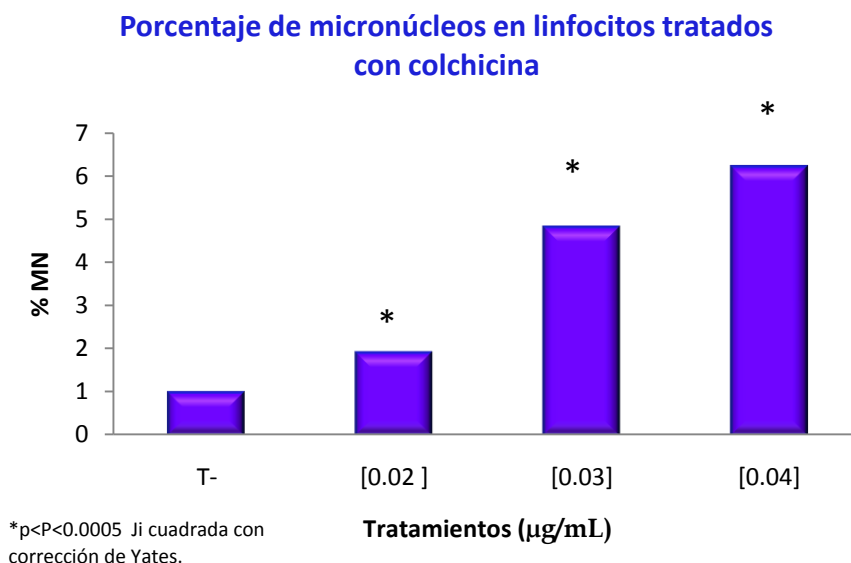
A continuación se muestra una serie de imágenes (capturadas con una cámara Nikon) de micronúcleos en células binucleadas de linfocitos humanos (**figura 10.3**).



**Figura 10.3.** (a-f) Fotomicrografías de células binucleadas con **micronúcleos (MN)** tratadas *in vitro* con Casiopeínas. (Las flechas indican la ubicación de los MN). (a-c) presencia de un MN. (d-e) presencia de dos MN. (f) presencia de tres micronúcleos y una yema nuclear en el núcleo inferior. (100X).

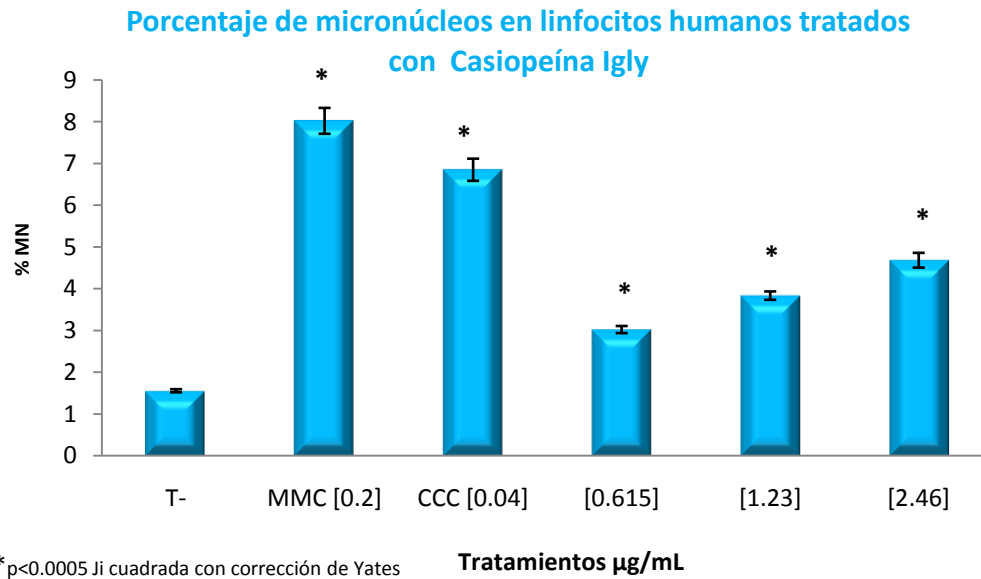
La **figura 10.4**, representa los valores positivos de la curva dosis dependiente de la colchicina, mostrando que es buena inductora de MN siendo en las tres concentraciones significativas ( $P < 0.0005$ ) respecto al testigo positivo sin embargo,

se utilizó la concentración más alta para emplearla como testigo positivo aneugénico en los tratamientos de Casiopeína de linfocitos humanos *in vitro*.

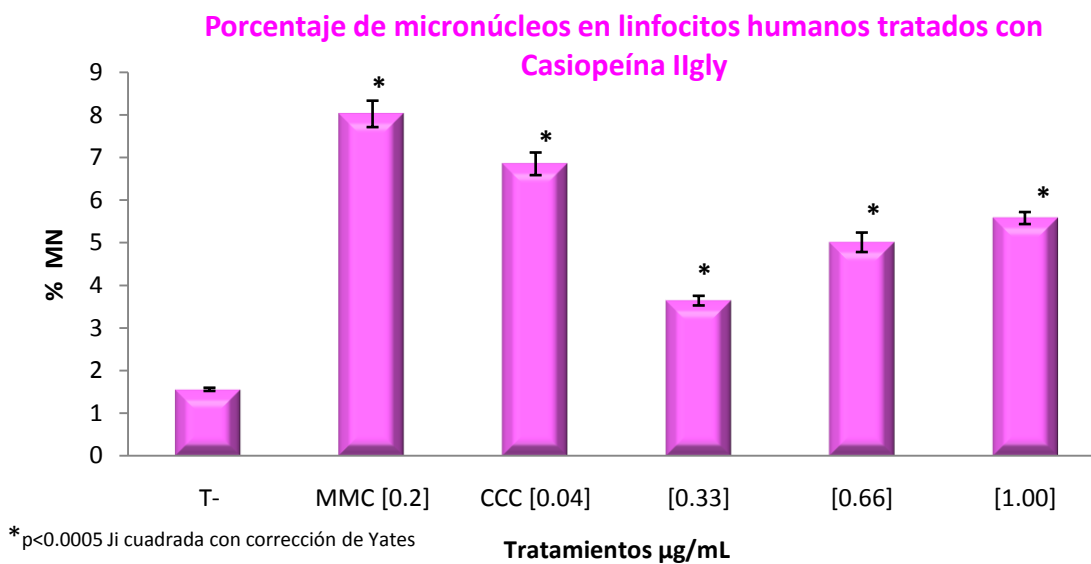


**Figura 10.4.** Porcentaje de **micronúcleos** (MN) de cultivos de linfocitos humanos tratados a las 44 h con tres concentraciones diferentes de **colchicina** y cosechados a las 72 h. Evaluación de 2000 células binucleadas en total.

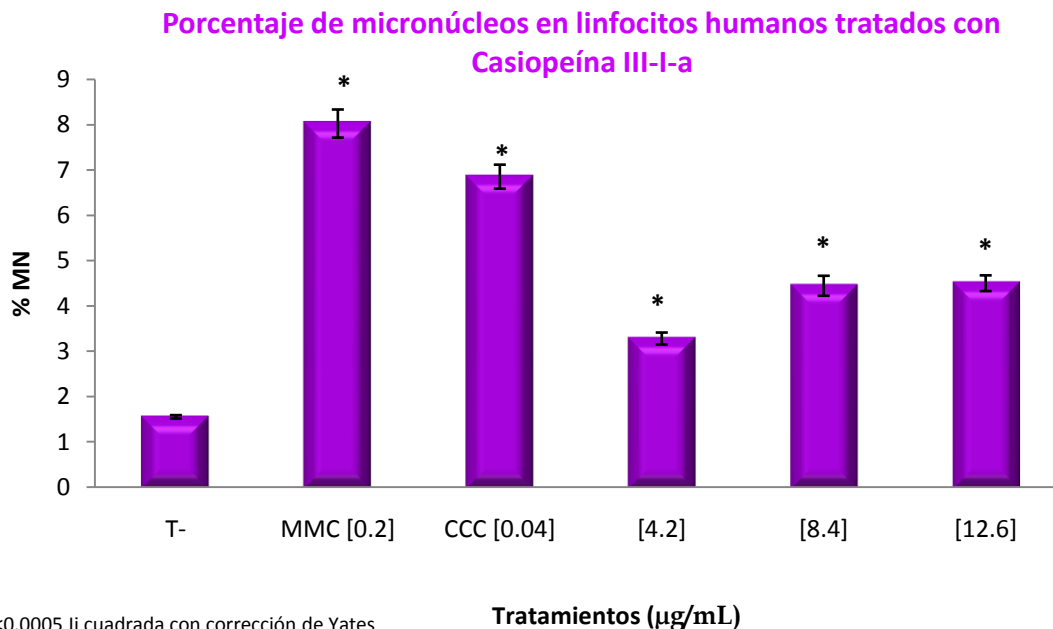
A continuación se muestran los resultados de MN del promedio de dos experimentos independientes con su respectivo duplicado, haciendo una evaluación de 4000 células binucleadas en total, en cultivos de linfocitos aislados, tratados con Casiopeína Igly (0.615, 1.23, 2.46  $\mu\text{g/mL}$ ), IIgly (0.33, 0.66 y 1.00  $\mu\text{g/mL}$ ) y III-I-a (4.2, 8.4, 12.6  $\mu\text{g/mL}$ ), respectivamente. En estos resultados se observa que los tres compuestos indujeron incremento significativo ( $p < 0.0005$ ) del porcentaje de MN en todas las concentraciones comparando con el testigo negativo. Se observó comportamiento dosis-dependiente únicamente en la Casiopeína Igly (**figuras 10.5, 10.6 y 10.7, tabla 10.2**).



**Figura 10.5.** Porcentaje de **micronúcleos (MN)** de linfocitos binucleados *in vitro*, tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína Igly**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados, por concentración. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).



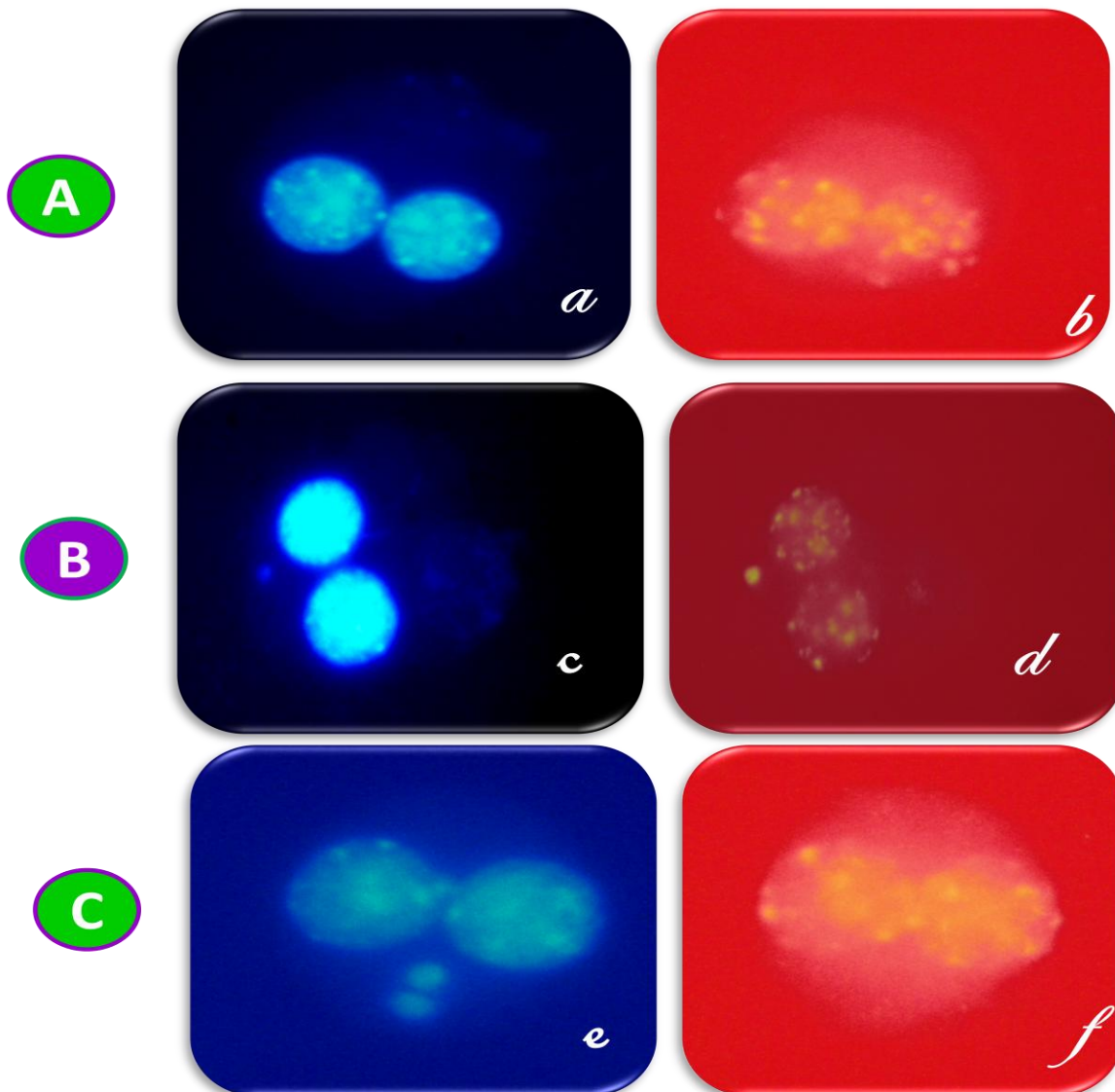
**Figura 10.6.** Porcentaje de **micronúcleos (MN)** de linfocitos binucleados *in vitro*, tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína Igly**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados, por concentración. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).



**Figura 10.7.** Porcentaje de **micronúcleos (MN)** de linfocitos binucleados *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína III-I-a**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados, por concentración. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).

Con la finalidad de comparar el efecto de las tres Casiopeínas con respecto a los micronúcleos se realizó un análisis de varianza con un diseño anidado. Obteniendo que el valor de  $p$  es de 0.1809 no significativo para los compuestos, mientras que para las concentraciones  $p$  es de 0.0184 por lo tanto es significativo, ya que el valor de  $p$  es menor a 0.05.

A continuación se muestra una imagen representativa de cómo se evaluaron los micronúcleos con y sin señal de ADN centromérica mediante la combinación del ensayo de MNBC y la técnica FISH (**figura 10.8**). En la **tabla 10.1** y **figura 10.9** se muestran los resultados de MN con y sin señal de ADN centromérica.



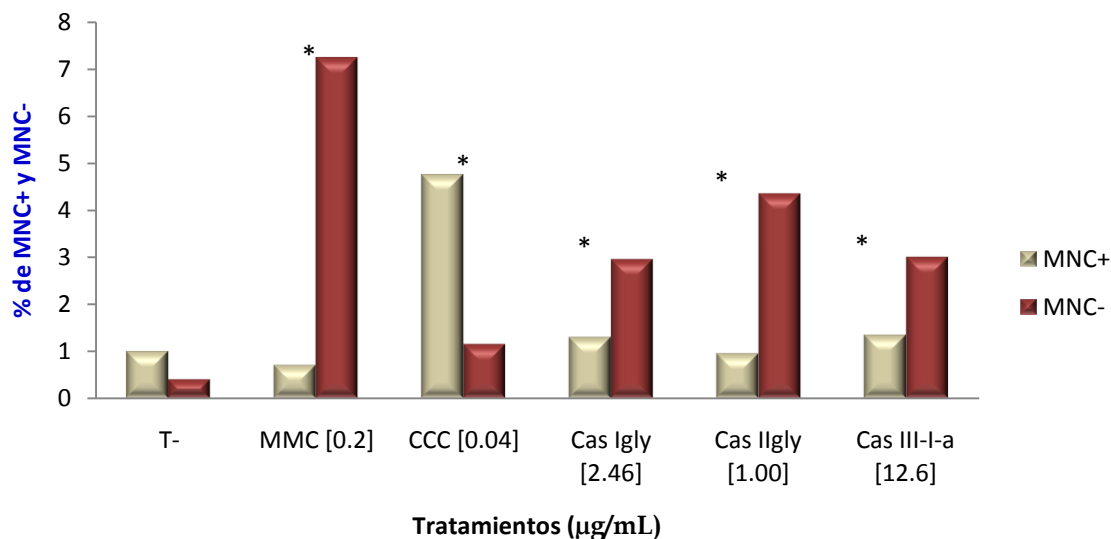
**Figura 10.8.** (a-f) La imagen muestra células hibridadas usando la técnica de FISH, empleando sonda pancentromérica en rojo (Kreatech, Poseidon). Que se aprecia de color amarillo con el filtro de rodamina. **A)** linfocito BN sano, sin micronúcleo **a)** imagen obtenida con el filtro de DAPI y **b)** filtro de rodamina (en los núcleos principales se aprecian varias señales centroméricas). **B)** linfocito binucleado con un micronúcleo que presenta señal centromérica (MNC+), **c)** imagen tomada con filtro de DAPI y **d)** filtro de rodamina donde se observan varias señales centroméricas en los núcleos principales y una sola señal en el micronúcleo. **C)** linfocito binucleado con dos micronúcleos sin señal centromérica (MNC-), **e)** filtro de DAPI **f)** filtro de rodamina, el mismo linfocito binucleado sin señal centromérica en los micronúcleos.

**Tabla 10.1. Frecuencia de micronúcleos con señal centromérica positiva (MNC+) y negativa (MNC-) determinada por la técnica de FISH en 2000 linfocitos binucleados del grupo tratado (con la concentración más alta de las Casiopeínas Igly, Ilgly, III-I-a respectivamente, así como MMC y CCC) y el testigo negativo.**

Tratamientos [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Número de MN/ 2000 BN		
	MNC+ (%)	MNC- (%)	Total de BN con MN
Testigo negativo	20 (1)	8 (0.4)	28 (1.4)
Testigo positivo MMC [0.2]	14* (0.71)	142* (7.24)	156* (7.95)
Testigo positivo CCC [0.04]	9.5* (4.75)	23* (1.15)	118* (5.9)
Casiopeína Igly [2.46]	26* (1.3)	59* (2.95)	85* (4.25)
Casiopeína Ilgly [1.00]	19* (0.95)	87* (4.35)	106* (5.3)
Casiopeína III-I-a [12.6]	27* (1.35)	60* (3)	87* (4.35)

**MMC:** mitomicina C. **CCC:** colchicina. **BN:** células binucleadas. **MN:** micronúcleos. **MNC+:** presencias de ADN centromérico. **MNC-:** ausencia de ADN centromérico. \* $p < 0.000$  Ji ( $X^2$ ) de Pearson. Se encontró que existe dependencia o asociación entre el tipo de señal y los tratamientos.

#### Porcentaje de MN con y sin señal de ADN centromérico

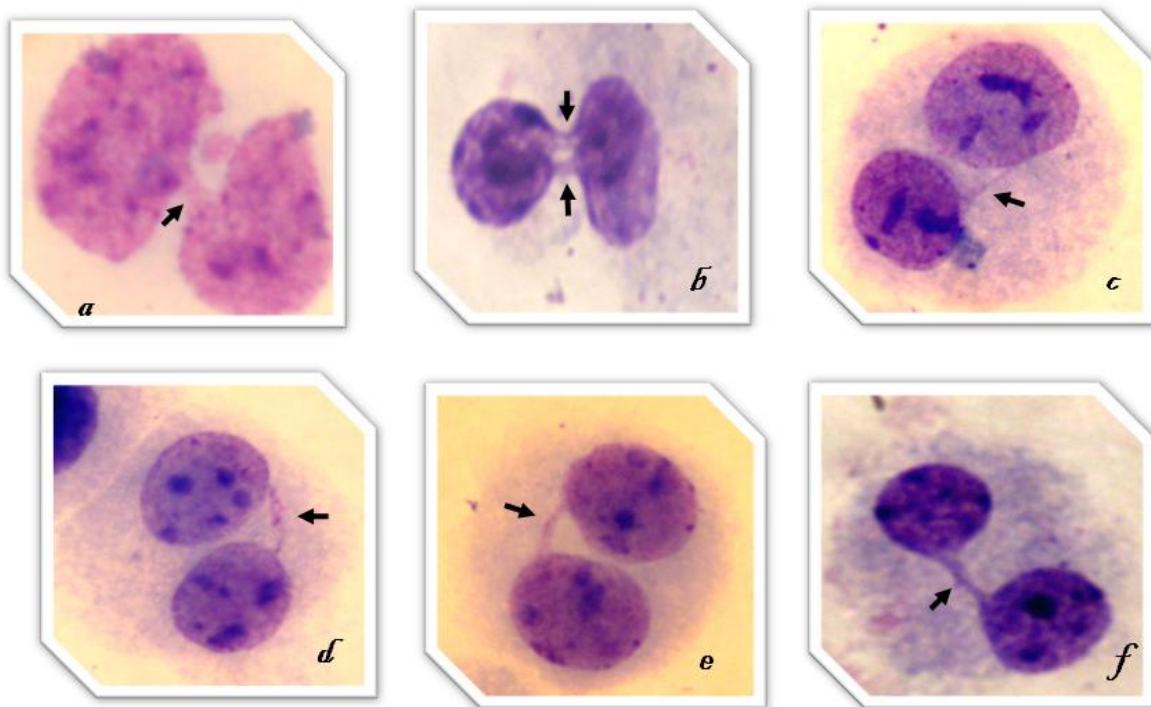


\* $p < 0.000$  Ji ( $X^2$ ) de Pearson.

**Figura 10.9.** \* $p < 0.000$  Ji ( $X^2$ ) de Pearson. Se encontró que existe dependencia o asociación entre el tipo de señal y los tratamientos. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC). Casiopeína Igly (Cas Igly), Casiopeína Ilgly (Cas Ilgly) y Casiopeína III-I-a (Cas III-I-a).

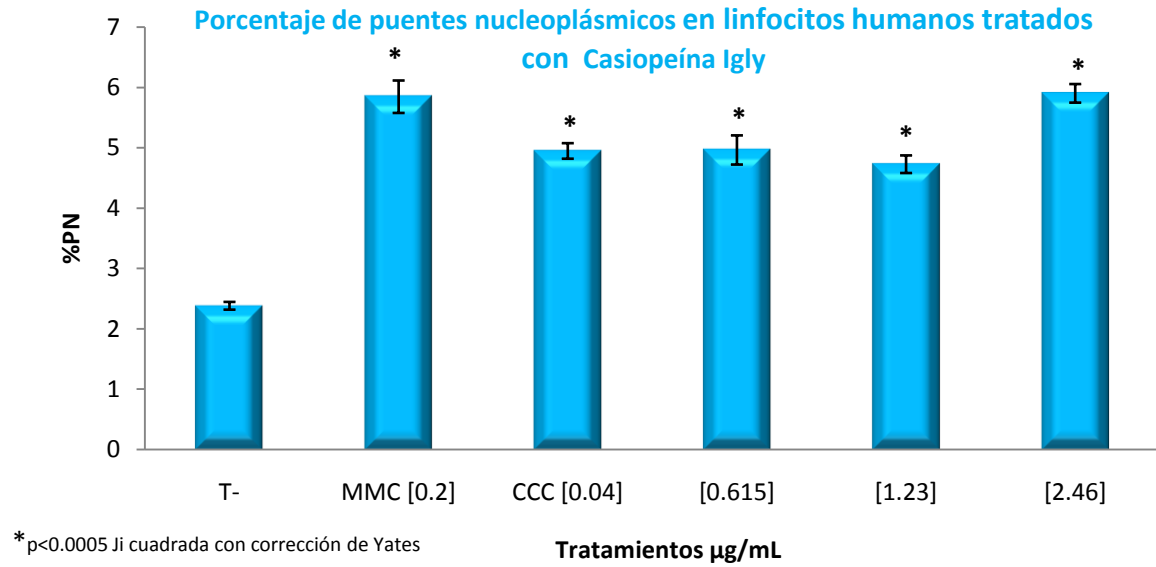


En la **figura 10.10** se muestran, los puentes nucleoplásmicos, en linfocitos humanos tratados con las tres Casiopeínas.

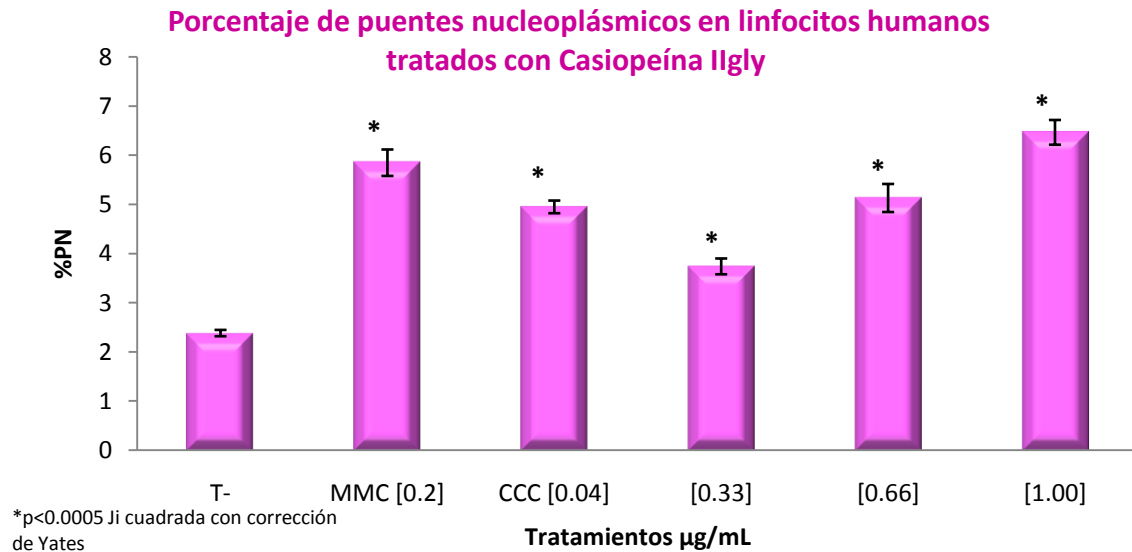


**Figura 10.10.** (a-f) Fotomicrografías de células binucleadas con **puentes nucleoplásmicos (PN)** tratadas *in vitro* con Casiopeínas. (Las flechas indican la ubicación de los PN). (b) presencia de dos PN. (a, c-f) presencia de un puente nucleoplásmico (100X).

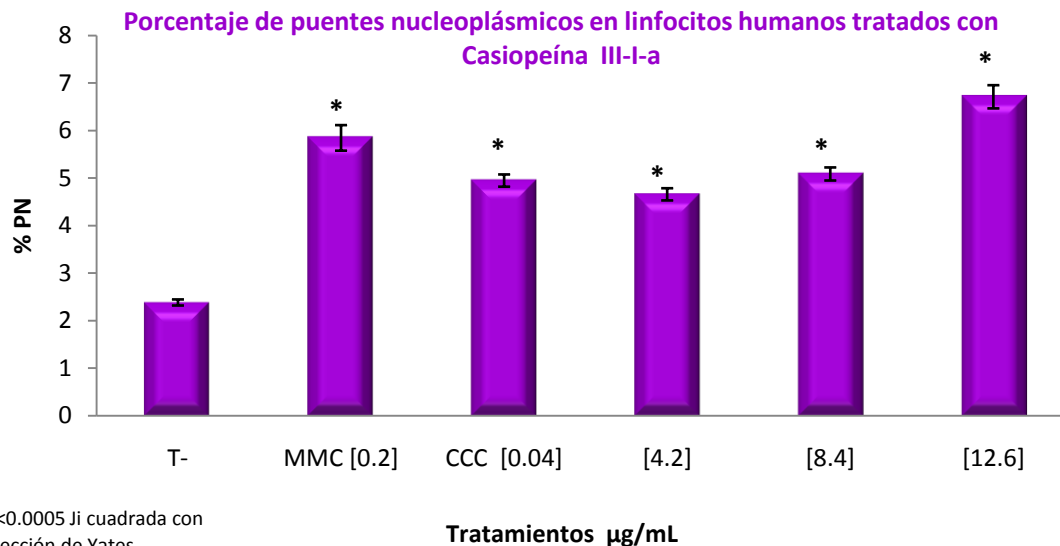
En las **figuras 10.11, 10.12, y 10.13**, se muestra los resultados de PN inducidos por la Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a, obtenidos del promedio de dos experimentos independientes con su respectivo duplicado, analizando un total de 4000 células. Todas incrementan el porcentaje de forma significativa ( $p < 0.0005$ ), comparando con el testigo negativo. La Casiopeína IIgly, tiene una tendencia dosis-dependiente, ya que al incrementar la concentración se elevan los PN, a diferencia de la Casiopeína Igly y III-I-a, en las dos primeras concentraciones (0.615, 1.2 y 4.2, 8.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente) el número de PN es semejante y en la tercera concentración (2.46 y 12.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente) aumenta de forma notable.



**Figura 10.11.** Porcentaje de **puentes nucleoplásmicos (PN)** de linfocitos binucleados *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína Igly**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).



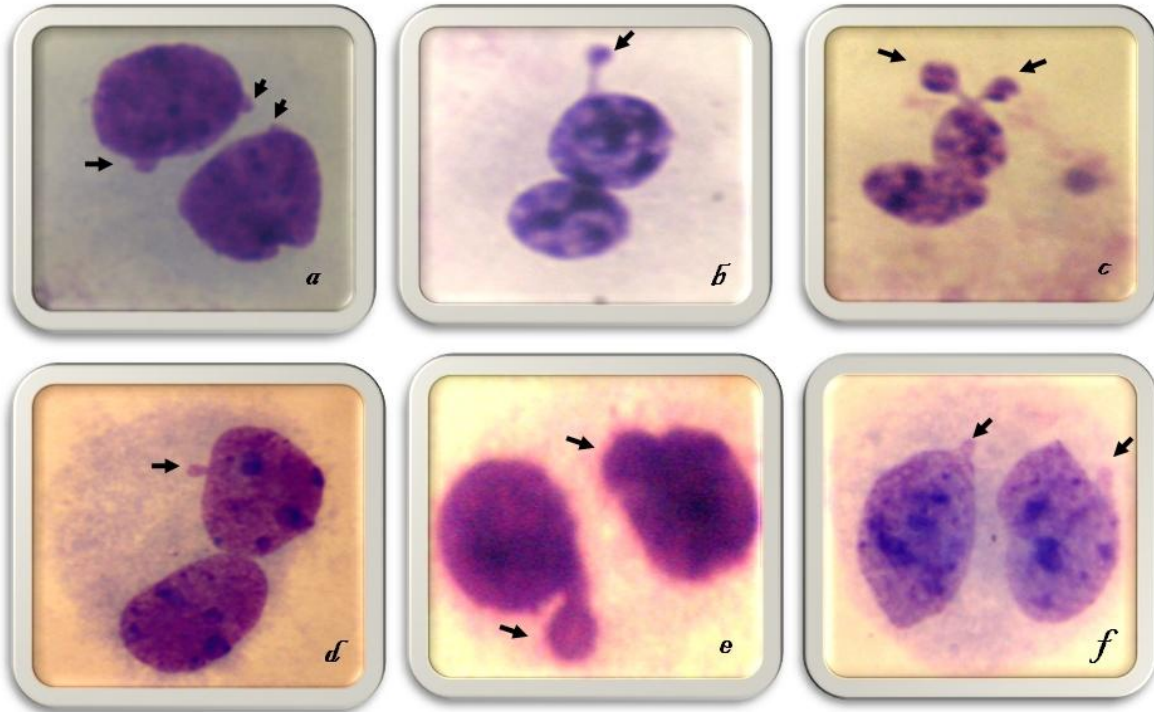
**Figura 10.12.** Porcentaje de **puentes nucleoplásmicos (PN)** de linfocitos binucleados *in vitro* tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína Igly**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).



**Figura 10.13.** Porcentaje de **puentes nucleoplásmicos (PN)** de linfocitos binucleados *in vitro*, tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína III-I-a**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).

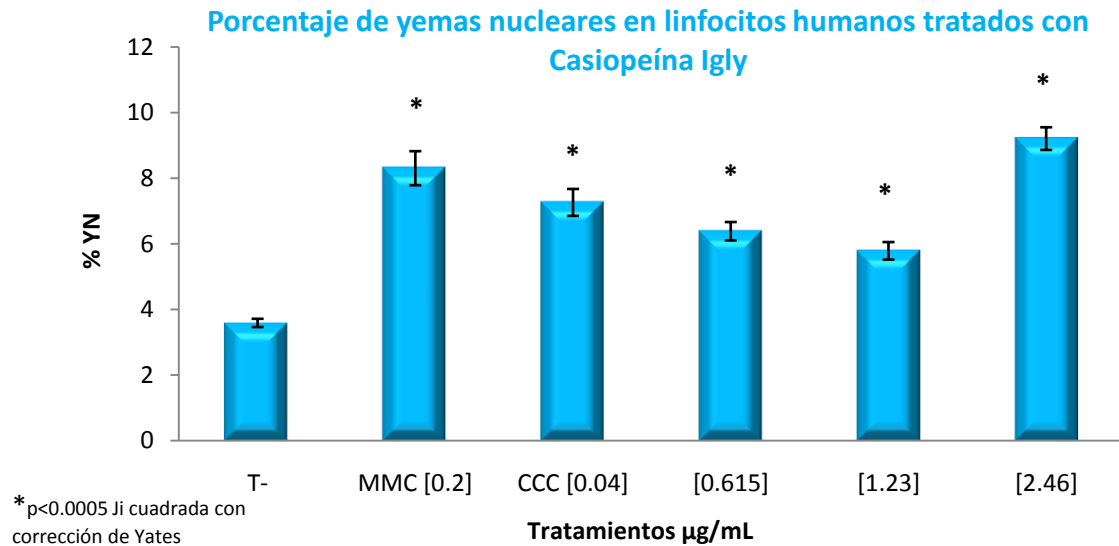
De igual manera que con los resultados de micronúcleos se hizo una comparación del efecto de las tres Casiopeínas con respecto a los puentes nucleoplásmicos, mediante el análisis de varianza con diseño anidado, por las razones ya mencionadas, obteniendo una  $p$  de 0.0170 para las concentraciones y  $p$  de 0.3510 para los compuestos. Lo que indica influencia de las concentraciones para la obtención de PN.

La serie de fotomicrografías que enseguida se muestran representan a las yemas nucleares, que se evaluaron en los cultivos de linfocitos mediante el ensayo de MNBC, tratados con tres compuestos de Casiopeínas en las condiciones ya mencionadas (**figura 10.14**).

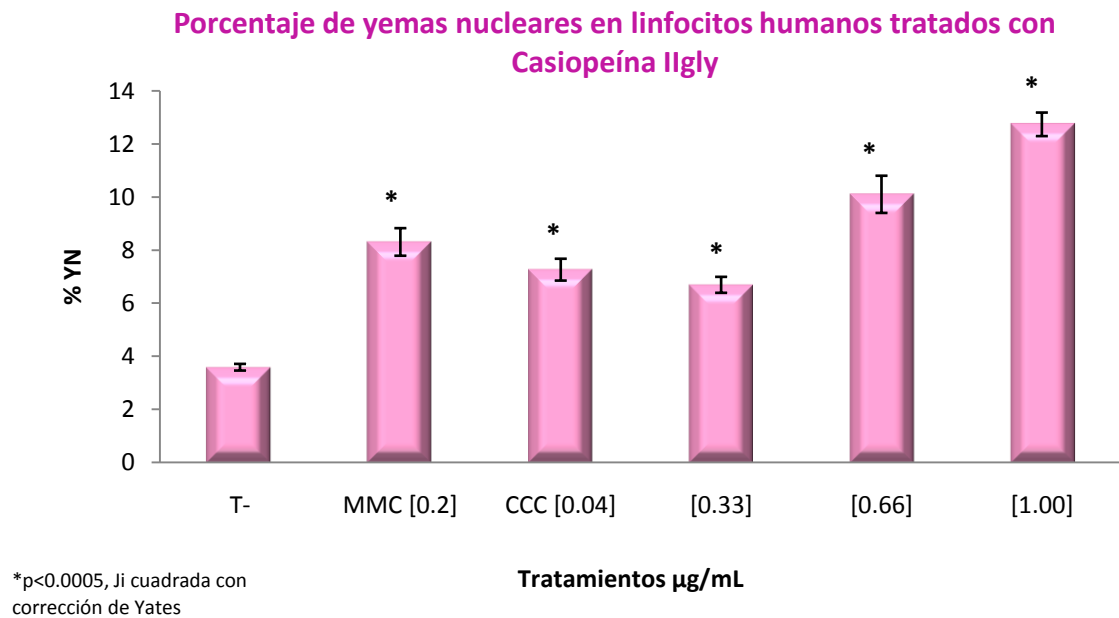


**Figura 10.14.** (a-f) Fotomicrografías de células binucleadas con **yemas nucleares (YN)** tratadas *in vitro* con Casiopeínas. (Las flechas indican la ubicación de las YN) (a, d y f) YN con una conexión nucleoplásmica con el núcleo principal. (b, c) YN con extensión nucleoplásmica angosta con el núcleo principal. (e) célula BN, donde el núcleo izquierdo tiene una yema con conexión nucleoplásmica angosta con el núcleo principal; núcleo derecho, presenta una conexión nucleoplásmica obvia (100X).

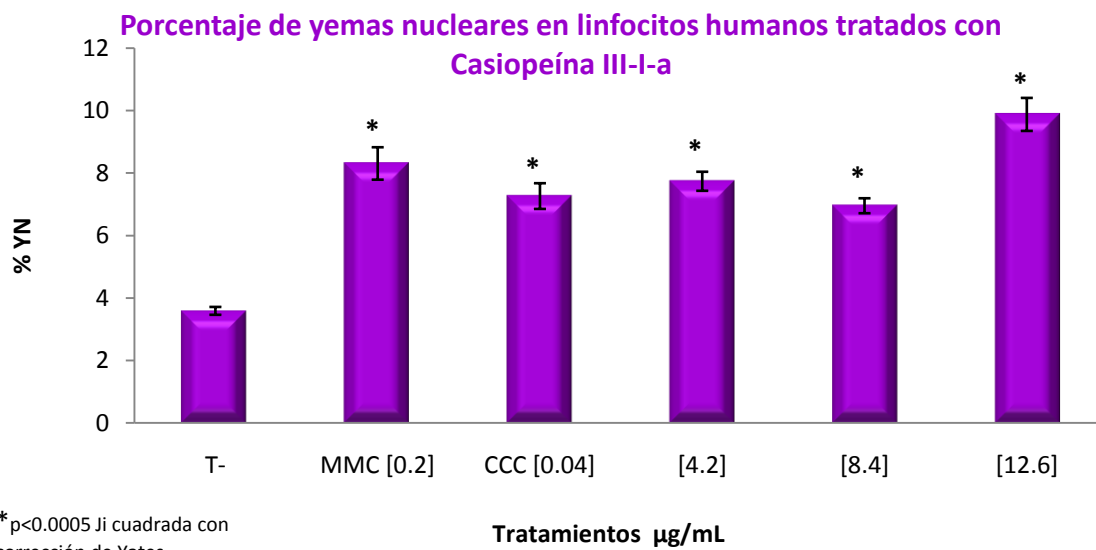
En las **figuras 10.15, 10.16, y 10.17** se observan los resultados del porcentaje de **yemas nucleares**, inducidos por las **Casiopeínas Igly** (0.615, 1.23, 2.46  $\mu\text{g/mL}$ ) **Ilgly** (0.33, 0.66, 1.00  $\mu\text{g/mL}$ ) y **III-I-a** (4.2, 8.4, 12.6  $\mu\text{g/mL}$ ), de una evaluación de 4000 células analizadas en cultivo de linfocitos aislados de dos experimentos independientes con su respectiva réplica. Se observó incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.0005$ ) en todas las concentraciones evaluadas de los tres compuestos. Donde la Casiopeína Igly, es la única que presenta una tendencia dosis-dependiente de este parámetro.



**Figura 10.15.** Porcentaje de **yemas nucleares (YN)** de linfocitos binucleados *in vitro*, tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína Igly**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).



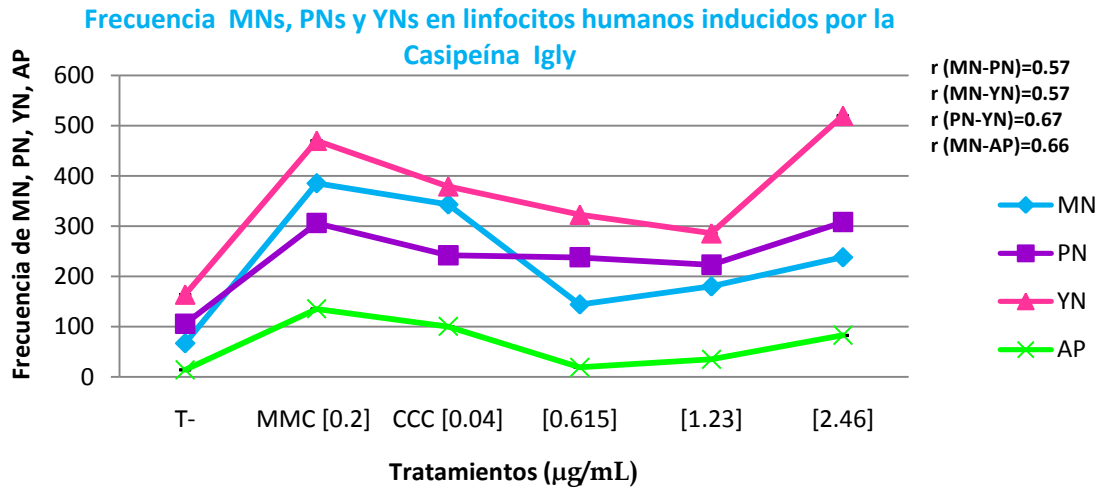
**Figura 10.16.** Porcentaje de **yemas nucleares (YN)** de linfocitos binucleados *in vitro*, tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína IIgly**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).



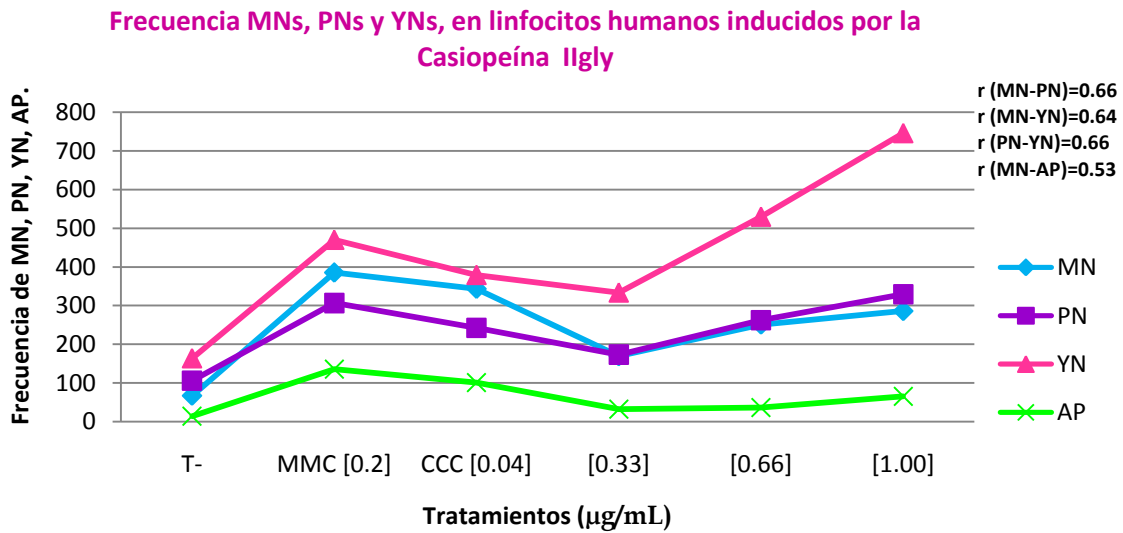
**Figura 10.17.** Porcentaje de **yemas nucleares (YN)** de linfocitos binucleados *in vitro*, con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína III-I-a**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados, por concentración. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).

También se hizo comparación entre las tres Casiopeínas sobre la inducción de yemas nucleares, mediante un análisis de varianza anidado, obteniendo una  $p$  de 0.1163 para los compuestos y de 0.0011 para las concentraciones. Nuevamente se muestran diferencias significativas en las concentraciones de acuerdo al valor de  $p$ .

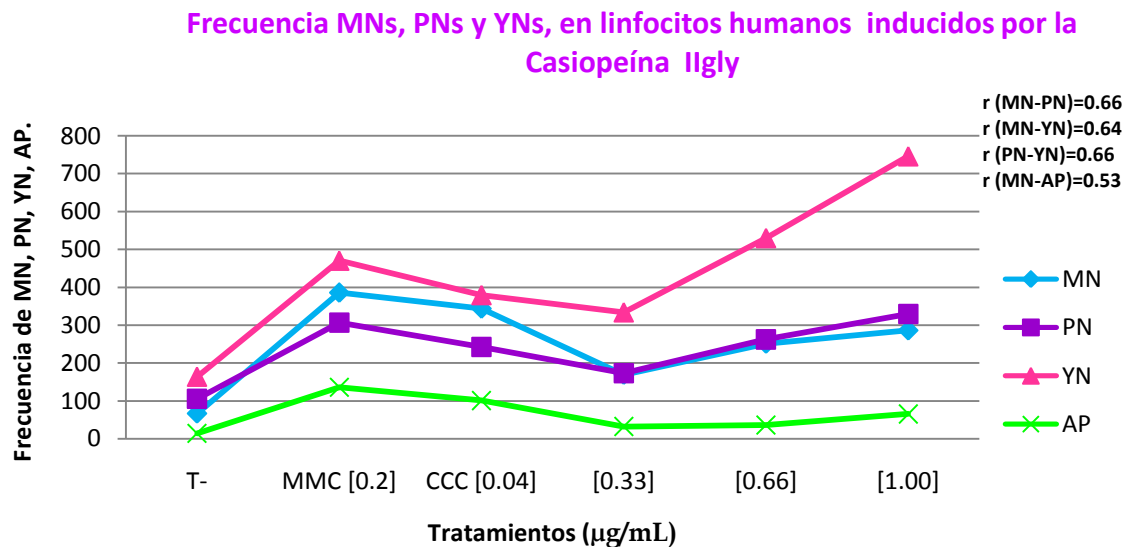
A continuación se muestra el comportamiento o distribución que existe entre micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN), yemas nucleares (YN) y apoptosis (AP), de los tratamientos de Casiopeína Igly, IIgly y III-I-a, respectivamente (**figuras 10.18, 10.19 y 10.20**).



**Figura 10.18.** Distribución de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN), yemas nucleares (YN) y apoptosis (AP), de la **Casiopeína Igly**. (r= regresión lineal). Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).



**Figura 10.19.** Distribución de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN), yemas nucleares (YN) y apoptosis (AP), de la **Casiopeína IIgly**. (r= regresión lineal). Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).

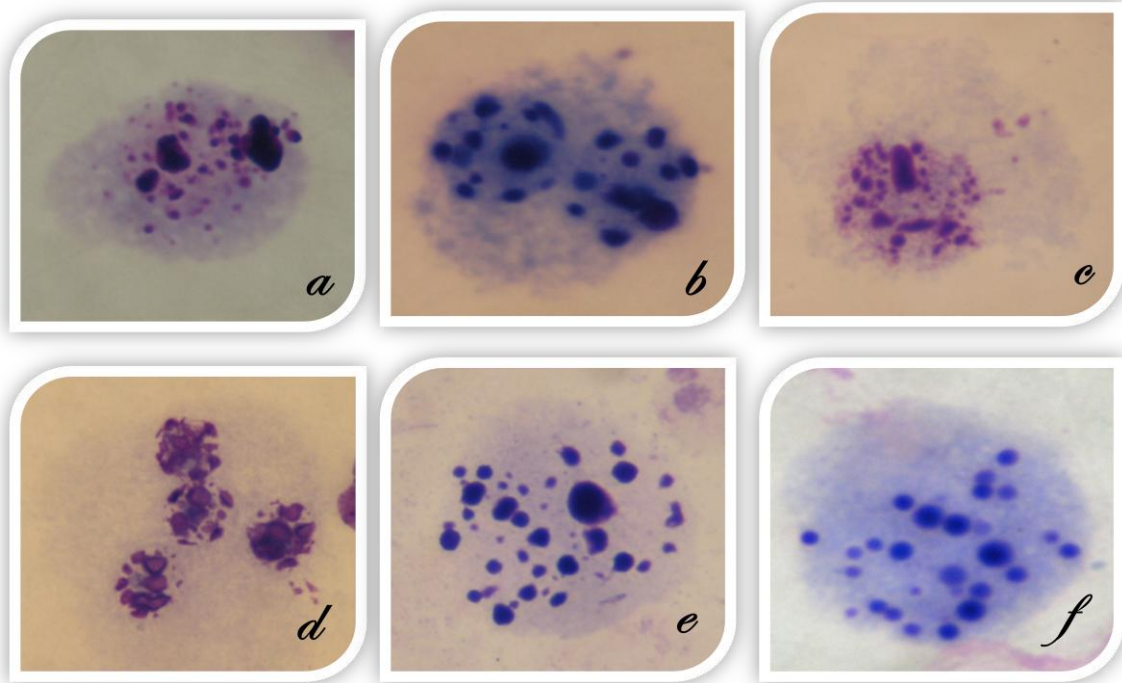


**Figura 10.20.** Distribución de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN), yemas nucleares (YN) y apoptosis (AP), de la **Casiopeína III-I-a**. ( $r$ = regresión lineal). Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).

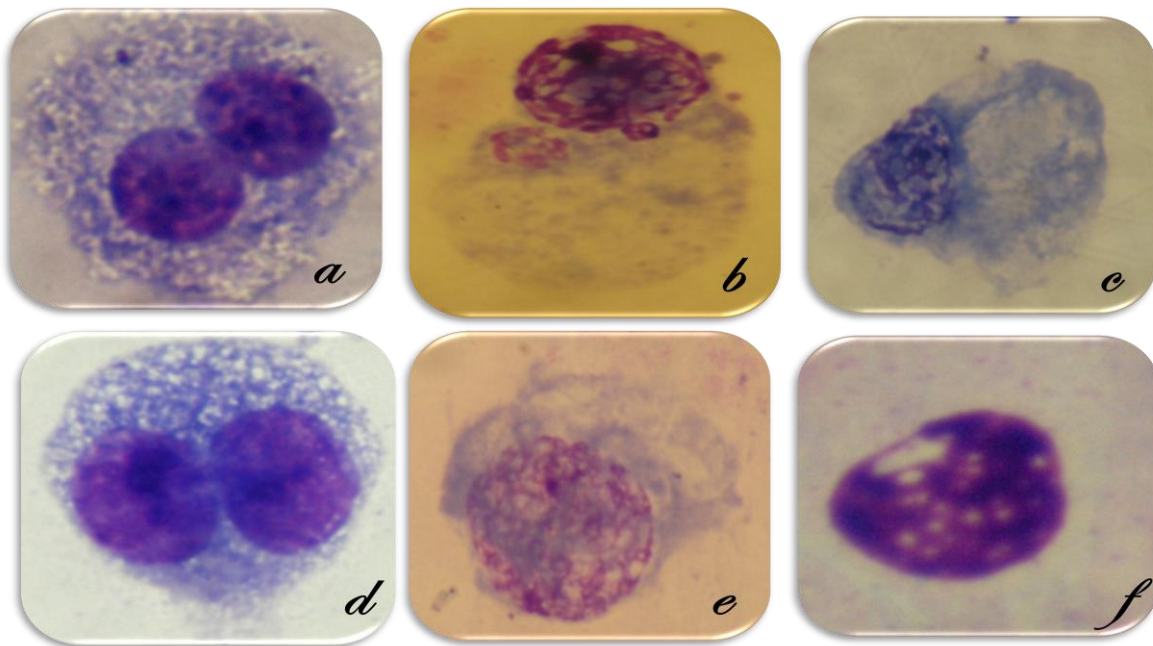
## 10.2. RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD

Otro de los parámetros que se puede determinar con el ensayo de MNBC mediante linfocitos aislados, es la muerte celular. Las siguientes imágenes ilustran las características y diferencias morfológicas entre apoptosis (**figura 10.21**) y necrosis (**figura 10.22**). Para esta evaluación se analizaron 2000 células (viables y no viables), obtenidas de dos experimentos independientes con su respectivo duplicado. En las **figuras 10.23, 10.24 y 10.25**, se muestran que los tres compuestos son capaces de incrementar significativamente ( $p < 0.002$ ) la apoptosis y la necrosis.



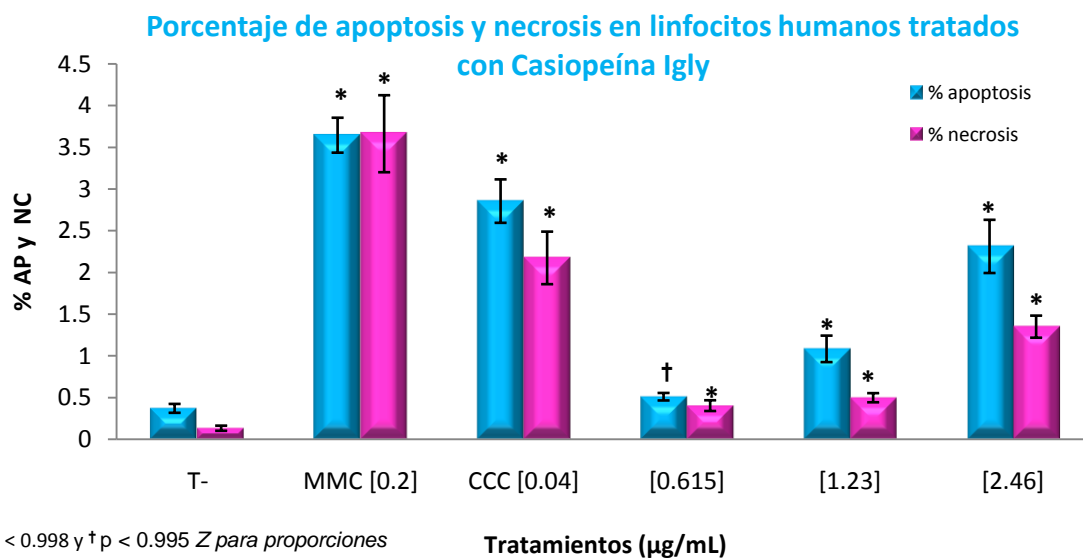


**Figura 10.21.** (a-f) Fotomicrografías de células **apoptóticas**, tratadas *in vitro* con Casiopeínas. Las cuales presentan condensación de cromatina en el núcleo y presencia de citoplasma (100X).

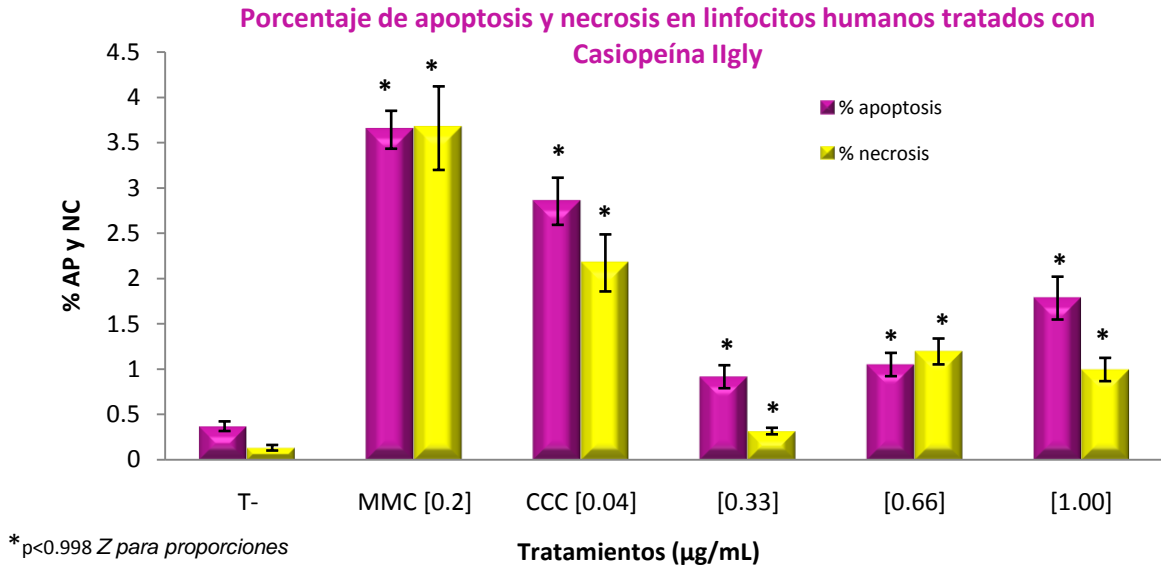


**Figura 10.22.** (a-f) Fotomicrografía de **células necróticas** tratadas con Casiopeínas. (a y d) células BN con núcleos marginalmente intactos, pero citoplasmas vacuolizados. (b, c y e) núcleos y citoplasma con presencia de vacuolas. (f) núcleo vacuolizado con pérdida de citoplasma. (100X).

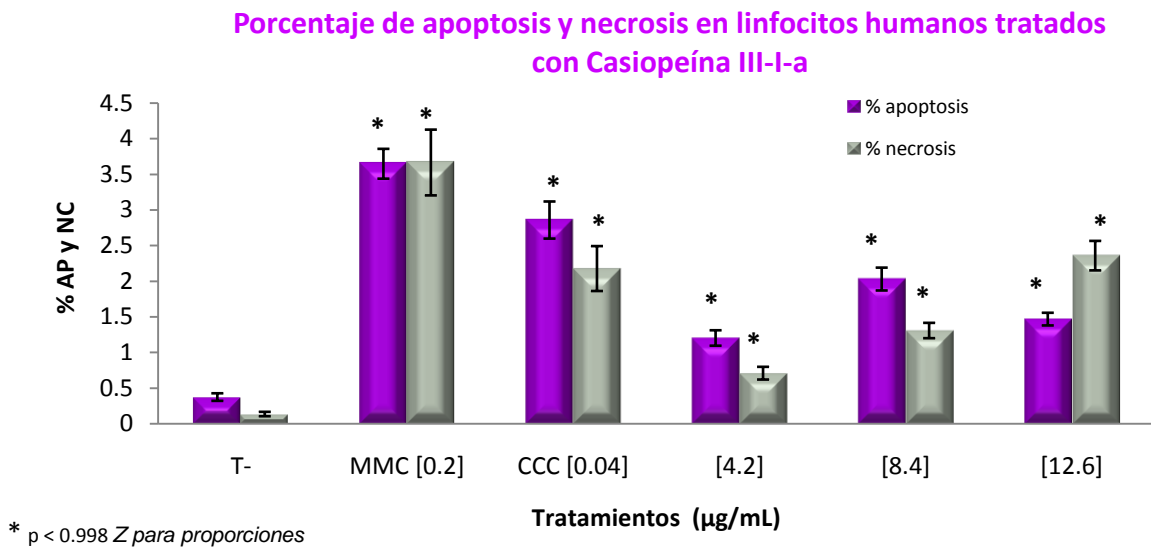
Con respecto a la **Casiopeína Igly**, tanto la apoptosis como la necrosis tienden a elevarse cuando se incrementa la concentración, siendo la apoptosis la más representativa. En el caso de la **Casiopeína IIgly**, el porcentaje de apoptosis es proporcional a las concentraciones del compuesto, no así para la necrosis, ya que en la concentración mayor (1.00  $\mu\text{g/mL}$ ) disminuye; en todas las concentraciones, el porcentaje de apoptosis es más alto que el de necrosis. Para la **Casiopeína III-I-a**, el incremento tanto de apoptosis como de necrosis es significativo para las tres concentraciones evaluadas, sin embargo, en la concentración más alta (12.6  $\mu\text{g/mL}$ ) la necrosis es mayor que la apoptosis.



**Figura 10.23.** Porcentaje de **apoptosis y necrosis** en cultivos con linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína Igly**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).



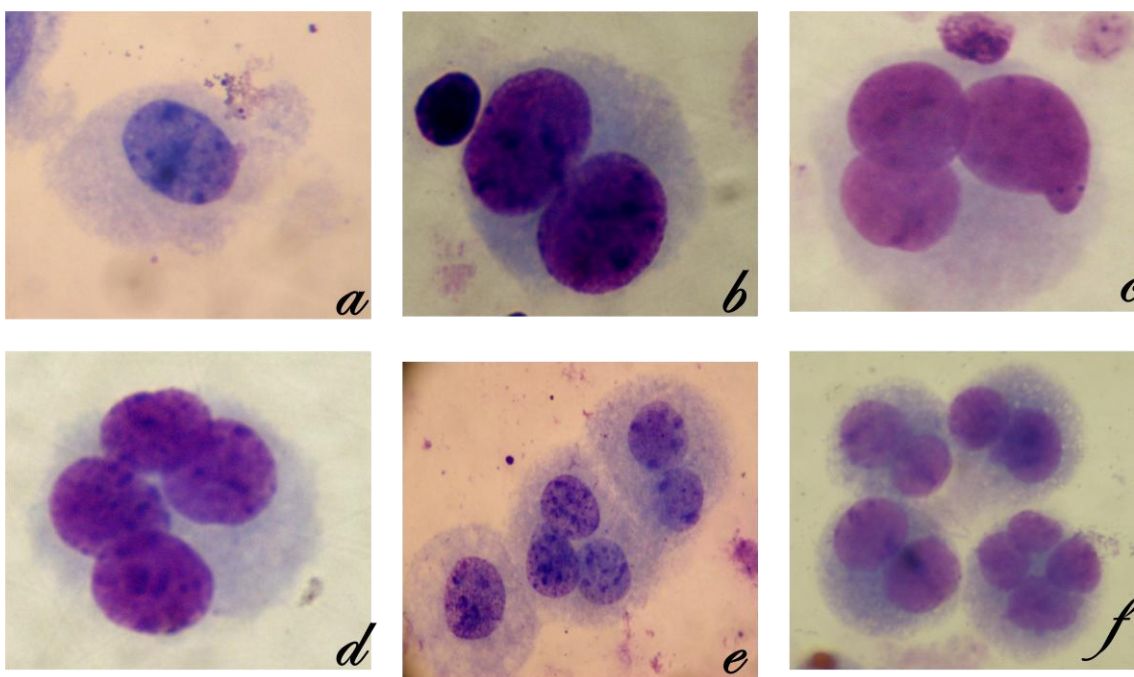
**Figura 10.24.** Porcentaje de **apoptosis y necrosis** en cultivos de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína IIgly**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).



**Figura 10.25.** Porcentaje de **apoptosis y necrosis** en cultivos de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína III-I-a**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).

### 10.3. RESULTADOS DE CITOSTATICIDAD

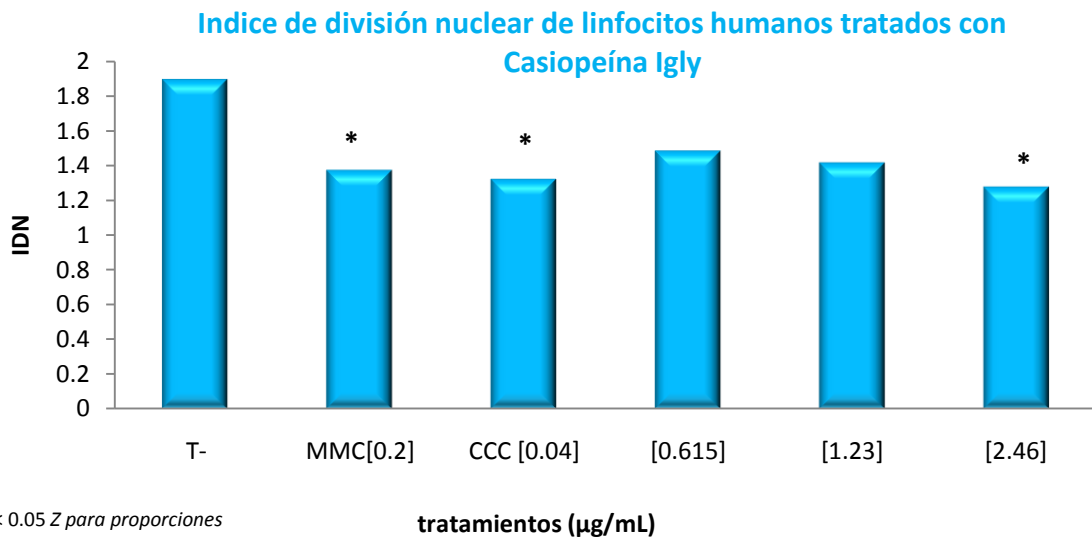
Por último, se evaluó la división nuclear inducida por estos quelatos mixtos, calculando el índice de división nuclear mediante el estadígrafo de prueba  $IDN = ((M1 + (2 \times M2) + (3 \times M3)) + 4(M4)) / NV$ , donde M1-M4 son células viables con uno a cuatro núcleos y NV es el número total de células viables; analizando 2000 células polinucleadas viables en total, de dos experimentos independientes con su respectiva réplica de linfocitos aislados tratados *in vitro* con Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a, respectivamente. La **figura 10.26.** muestra células mono-, bi-, tri- y tetranucleadas que fueron observadas, para evaluar este parámetro de citostaticidad.



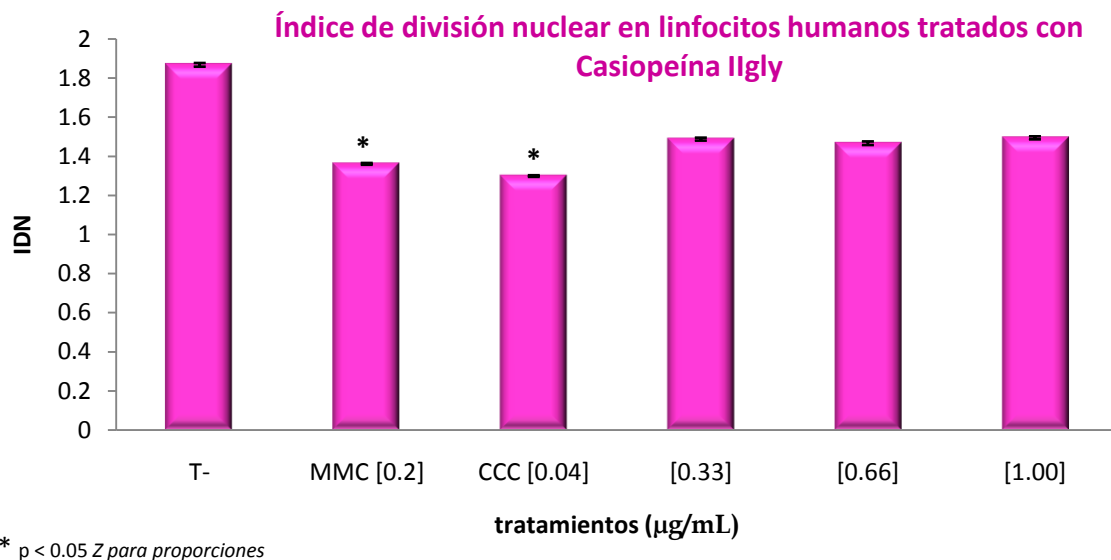
**Figura 10.26.** (a-f) Fotomicrografía de **Células polinucleadas** sanas de cultivos de linfocitos humanos. tratadas con Casiopeínas (a) célula mononucleada, (b) célula binucleada, (c) célula trinucleada, (d) célula tetranucleada (e) campo con una célula mono- bi- y trinucleada, (f) campo con tres células binucleadas y una tetranucleada. (100X).

En las **figuras 10.27, 10.28 y 10.29,** se observan los datos del índice de división nuclear (IDN), el cual disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en la concentración más alta (2.46  $\mu\text{g/mL}$ ) de la **Casiopeína Igly,** mientras que en la **Casiopeína Ilgly**

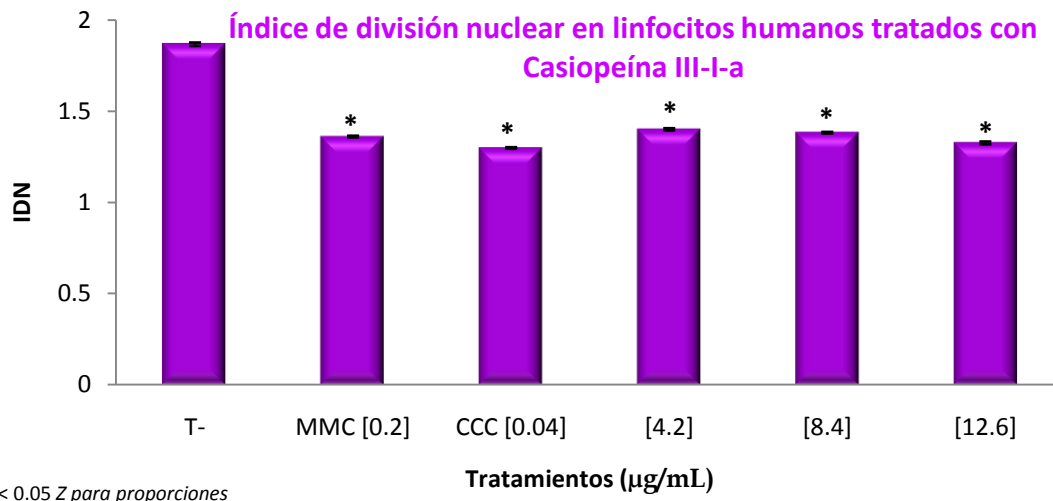
no se ve ningún cambio de este parámetro; no así con la **Casiopéina III-I-a**, ya que en las tres concentraciones evaluadas se presenta decremento significativo del IDN.



**Figura 10.27.** Índice de división nuclear (IDN) de cultivos de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopéina Igly**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).

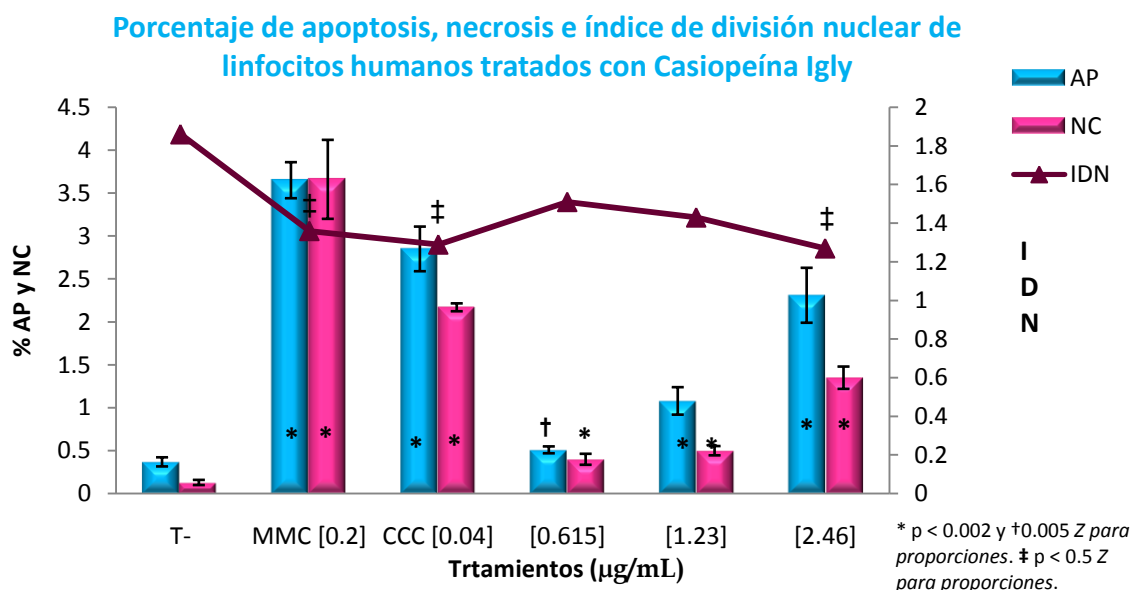


**Figura 10.28.** Índice de división nuclear (IDN) de cultivos de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopéina IIgly**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).

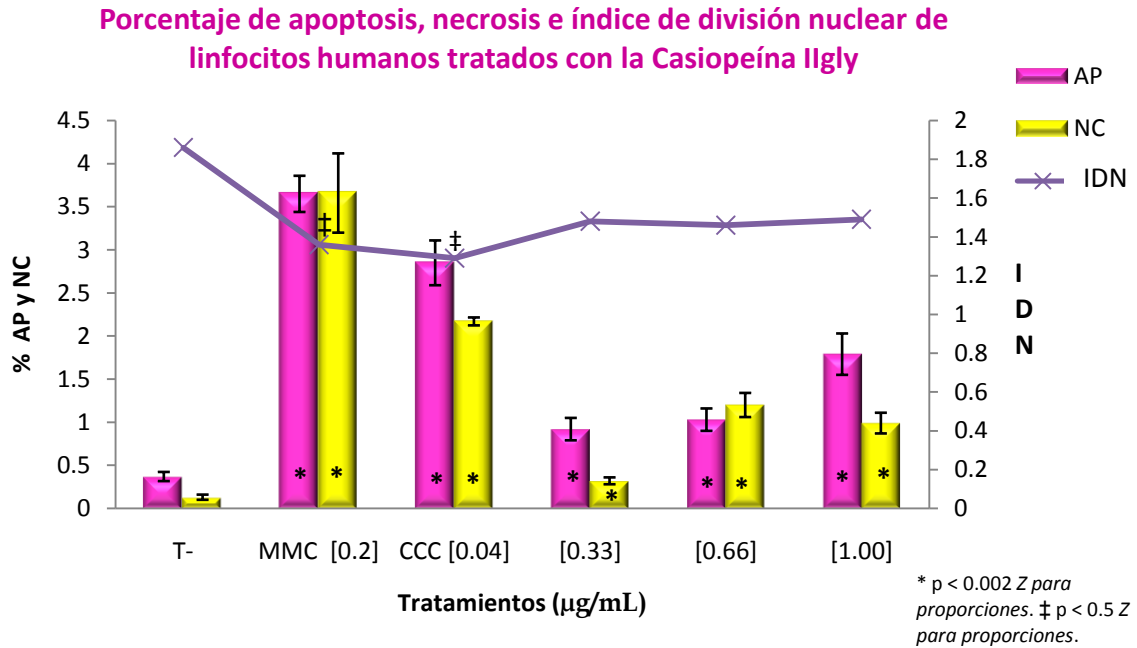


**Figura 10.29.** Índice de división nuclear en cultivos de linfocitos humanos tratados con tres concentraciones diferentes de **Casiopeína III-I-a**. Promedio de dos experimentos con sus respectivos duplicados. Mitomicina C (MMC) y colchicina (CCC).

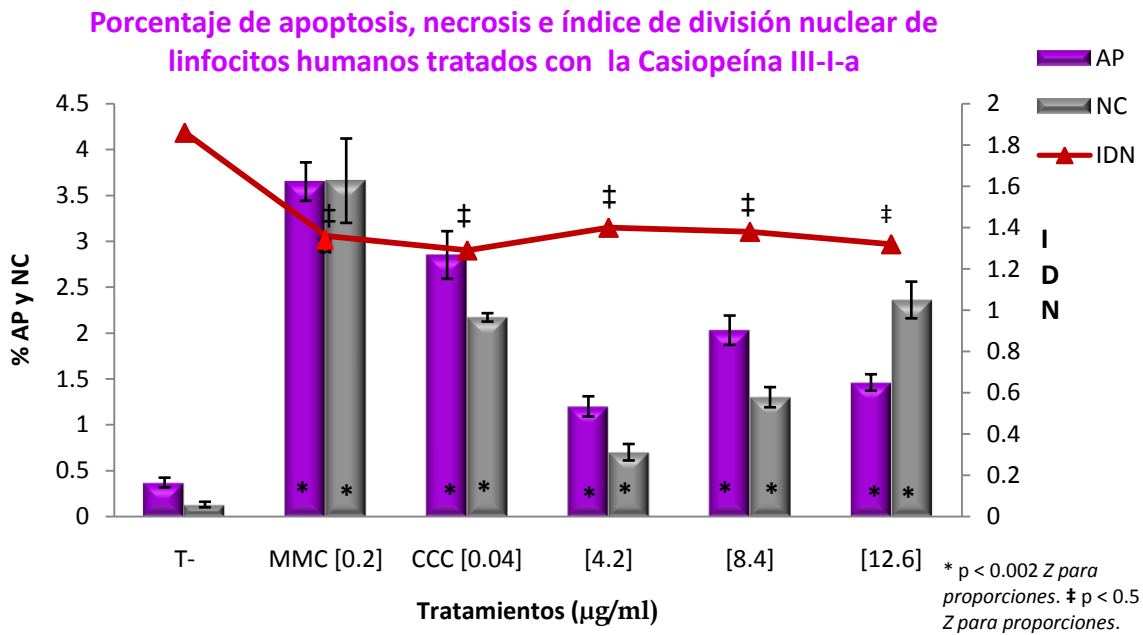
A continuación se representa el IDN, la apoptosis y necrosis de las respectivas Casiopeínas, para que puedan ser observados de forma simultánea tanto el efecto citostático como citotóxico (**figuras 10.30, 10.31, 10.32. y tabla 10.2**).



**Figura 10.30.** Efectos citotóxico y citostático de la **Casiopeína Igly** en cultivo de linfocitos humanos, obtenido de dos experimentos con sus respectivos duplicados. **AP:** apoptosis, **NC:** necrosis, **MMC:** mitomicina C y **CCC:** colchicina. **IDN:** índice de división nuclear.



**Figura 10.31.** Efectos citotóxico y citostático de la **Casiopeína IIgly** en cultivo de linfocitos humanos, obtenido de dos experimentos con sus respectivos duplicados. **AP:** apoptosis, **NC:** necrosis, **MMC:** mitomicina C y **CCC:** colchicina. **IDN:** índice de división nuclear.



**Figura 10.32.** Efectos citotóxico y citostático de la **Casiopeína III-I-a** en cultivo de linfocitos humanos, obtenido de dos experimentos con sus respectivos duplicados. **AP:** apoptosis, **NC:** necrosis, **MMC:** mitomicina C y **CCC:** colchicina. **IDN:** índice de división nuclear.

**Tabla 10.2.** Porcentaje de MN, PN, YN, AP y NC; e IDN en linfocitos humanos *in vitro* tratados con Casiopeína Igly, Ilgly y III-I-a, respectivamente.

Tratamientos ( $\mu\text{g/mL}$ )	MN (% $\pm$ EE)	PN (% $\pm$ EE)	YN (% $\pm$ EE)	AP (% $\pm$ EE)	NC (% $\pm$ EE)	IDN (% $\pm$ EE)
<b>Testigo Negativo</b>	1.56 $\pm$ 0.03	2.38 $\pm$ 0.06	3.59 $\pm$ 0.12	0.37 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.03	1.86 $\pm$ 0.009
<b>Testigo positivo MMC [0.2]</b>	8.03* $\pm$ 0.31	5.85* $\pm$ 0.26	8.31* $\pm$ 0.51	3.65 <sup>†</sup> $\pm$ 0.20	3.66 <sup>†</sup> $\pm$ 0.46	1.36 <sup>a</sup> $\pm$ 0.004
<b>Testigo Positivo CCC [0.04]</b>	6.8* $\pm$ 0.26	4.95* $\pm$ 0.84	7.27* $\pm$ 0.40	2.85 <sup>†</sup> $\pm$ 0.26	2.17 <sup>†</sup> $\pm$ 0.31	1.29 <sup>a</sup> $\pm$ 0.004
<b>Casiopeína Igly</b>						
<b>[0.615]</b>	3.02* $\pm$ 0.08	4.96* $\pm$ 0.24	6.39* $\pm$ 0.28	0.51 <sup>†</sup> $\pm$ 0.04	0.40 <sup>†</sup> $\pm$ 0.06	1.51 $\pm$ 0.009
<b>[1.23]</b>	3.84* $\pm$ 0.09	4.72* $\pm$ 0.14	5.79* $\pm$ 0.26	1.08 <sup>†</sup> $\pm$ 0.15	0.5 <sup>†</sup> $\pm$ 0.05	1.43 $\pm$ 0.008
<b>[2.46]</b>	4.68* $\pm$ 0.17	5.90* $\pm$ 0.15	9.21* $\pm$ 0.34	2.31 <sup>†</sup> $\pm$ 0.31	1.35 <sup>†</sup> $\pm$ 0.13	1.27 <sup>a</sup> $\pm$ 0.003
<b>Casiopeína Ilgly</b>						
<b>[0.33]</b>	3.64* $\pm$ 0.11	3.74* $\pm$ 0.16	6.7* $\pm$ 0.30	0.92 <sup>†</sup> $\pm$ 0.12	0.32 <sup>†</sup> $\pm$ 0.03	1.48 $\pm$ 0.007
<b>[0.66]</b>	5.01* $\pm$ 0.22	5.13* $\pm$ 0.28	10.10* $\pm$ 0.70	1.05 <sup>†</sup> $\pm$ 0.12	1.2 <sup>†</sup> $\pm$ 0.14	1.46 $\pm$ 0.009
<b>[1.00]</b>	5.58* $\pm$ 0.14	6.46* $\pm$ 0.25	12.74* $\pm$ 0.44	1.79 <sup>†</sup> $\pm$ 0.23	0.99 <sup>†</sup> $\pm$ 0.14	1.49 $\pm$ 0.007
<b>Casiopeína III-I-a</b>						
<b>[4.2]</b>	3.28* $\pm$ 0.13	4.66* $\pm$ 0.12	7.74* $\pm$ 0.30	1.2 <sup>†</sup> $\pm$ 0.10	0.70 <sup>†</sup> $\pm$ 0.08	1.40 <sup>a</sup> $\pm$ 0.006
<b>[8.4]</b>	4.45* $\pm$ 0.22	5.09* $\pm$ 0.13	6.95* $\pm$ 0.23	2.03 <sup>†</sup> $\pm$ 0.16	1.30 <sup>†</sup> $\pm$ 0.10	1.38 <sup>a</sup> $\pm$ 0.004
<b>[12.6]</b>	4.50* $\pm$ 0.17	6.71* $\pm$ 0.24	9.88* $\pm$ 0.52	1.46 <sup>†</sup> $\pm$ 0.08	2.36 <sup>†</sup> $\pm$ 0.20	1.32 <sup>a</sup> $\pm$ 0.007

**MN:** micronúcleos, **PN:** puentes nucleoplásmicos. **YN:** yemas nucleares se evaluaron 4000 células binucleadas; **AP:** apoptosis y **NC:** necrosis se evaluaron 2000 células viables y no viables; para el índice de división nuclear (**IDN**): se registraron 2000 células viables de dos experimentos independientes con su respectivo duplicado. **CCC:** colchicina. **MMC:** mitomicina C. **EE:** error estándar; **BN:** células binucleadas \* $p < 0.0005$  Ji cuadrada con corrección de Yates; <sup>†</sup> $p < 0.005$ , <sup>‡</sup> $p < 0.002$ , <sup>a</sup> $p < 0.05$  Z para proporciones. Los datos son obtenidos de dos experimentos y su respectiva réplica.



## 11. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 11.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE GENOTOXICIDAD

Varios trabajos realizados en células transformadas *in vitro* e *in vivo* han reportado que las Casiopeínas ejercen sus efectos mediante la interacción con el ADN, señalando que son genotóxicas, sin embargo, muchas de estas investigaciones se han realizado en células transformadas por lo que es necesario conocer los efectos inducidos en células sanas. De aquí la importancia de trabajar con linfocitos humanos.

De acuerdo con los objetivos del presente trabajo, se analizó mediante el ensayo de MNBC-*in vitro*, si las Casiopeínas tienen la capacidad de inducir MN, PN y YN en linfocitos humanos sanos para determinar el potencial genotóxico de los compuestos, posteriormente se evaluó la citotoxicidad mediante el análisis de apoptosis y necrosis, y para detectar si son citostáticas se analizaron las células polinucleadas utilizando la fórmula del IDN. Con la técnica de FISH se intentó discernir el origen de los MN, debido a que estos se pueden originar por dos eventos clastogénicos y/o aneugénicos.

Las tres Casiopeínas inducen un incremento significativo de MN en todos los tratamientos (**figura 10.5, 10.6, 10.7**). Estos resultados en primera instancia indican que los MN obtenidos en los linfocitos tratados con estos compuestos, son un reflejo de daño ocasionado en el material genético de forma directa o indirecta.

Los MN manifiestan una interacción indirecta del compuesto con el ADN, cuando están constituidos de cromosomas completos, ya que en realidad lo que se está afectando son estructuras secundarias como el huso mitótico y/o el centrómero. Los MN revelan una relación directa del compuesto con el ADN, cuando son originados por fragmentos cromosómicos ya que para que estos se originen se

necesita la ruptura específica de las cadenas del ADN. Sin embargo esto aun no se puede discernir con el ensayo de MNBC. Es así que hasta este momento con la evaluación de MN únicamente se puede corroborar que las tres Casiopeínas son genotóxicas en cultivos de linfocitos humanos tratados a las 44 h.

En los resultados obtenidos de la combinación del ensayo de MNBC con la técnica de FISH usando sonda pan-centromérica, para determinar el mecanismo de acción genotóxico que es generado por estos compuestos químicos. Se encontró que se inducen MN con y sin señal centromérica en las concentraciones mayores de cada una de las Casiopeínas (**figura 10.8 y 10.9 tabla 10.1**). Sin embargo, la mayor cantidad de MN encontrados son los que no tienen señal centromérica. Esto indica que dichos MN se originaron por fragmentos de ADN por otro lado, los datos de MN con señal centromérica pueden tener dos formas de interpretación, la primera, que los MN pueden contener cromosomas completos, y la segunda, que pueden almacenar fragmentos que contienen centrómero. Para diferenciar entre ambos MN es necesario incluir en el estudio una sonda pantelomérica que ayude a identificar si se trata de cromosomas completos (con C+, 2T+) o de fragmentos (C-, 2T+) de cromosomas. En general los resultados obtenidos con FISH mostraron que el efecto genotóxico que se manifestó como MN fue mayoritariamente por clastogénesis y no por aneugénesis.

Las Casiopeínas también producen incremento significativo del porcentaje de YN y PN (**figuras 10.11, 10.12, 10.13, 10.15, 10.16, 10.17 y tabla 10.2**) en todos los tratamientos, comparados con el testigo negativo. Estos datos nuevamente indican que las Casiopeínas tienen la habilidad de interactuar con el ADN pero además al parecer lo hacen de forma directa. Esto se revela al analizar los mecanismos de formación de las YN y los PN (**figuras 4.4, 4.6, 4.7 y 4.8**), los cuales de forma general consisten en rompimientos y subsecuentes uniones.

Los resultados obtenidos del presente trabajo coincide con los datos de la literatura, ya que se reporta que las Casiopeínas tienen la capacidad de inducir

fragmentación del ADN (**Guerrero, 1993; Florin, 2005; Alemón *et al.*, 2007; Cermeño, 2007**) por acción nucleasa o por la inducción de radicales libres; el hecho de encontrar en nuestros resultados una mayor cantidad de MN sin señal centromérica así como PN y YN, los cuales se originan por rompimientos y uniones, en las muestras analizadas, corrobora el hecho de que las Casiopeínas generan fragmentación cromosómica constatándose que son clastogénicas.

Desde que se crearon las Casiopeínas, se diseñaron contemplando la posibilidad de que ejercieran interacciones con la molécula de ADN ya que su centro metálico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) en ciertas circunstancias como concentraciones altas o al unirse a agentes reductores, genera radicales libres, ambas situaciones pueden conferirle el efecto genotóxico. Pero además, el hecho de que el  $\text{Cu}^{+2}$  tenga gran afinidad y esté unido al ligando diimina (N-N; fenantrolina o bipyridina) le otorga la capacidad de unirse al ADN por interacciones de intercalación o no intercalación. De esta manera las Casiopeínas tienen una alta selectividad hacia la molécula del ADN, si se comparan con otros compuestos, por lo que no sería raro encontrar este tipo de anomalías nucleares en los cultivos de linfocitos que se trataron con estos compuestos.

De forma particular al evaluar los MN, YN y PN, se puede decir que la Casiopeína Igly, tiene el comportamiento más regular (dosis-dependiente) comparado con las otras dos Casiopeínas, esto podría ser ventajoso en el momento de intentar seleccionar una dosis adecuada para pacientes con cáncer ya que sería más fácil de monitorear los efectos respecto a sus dosis.

Al hacer las evaluaciones de los parámetros de genotoxicidad en los linfocitos tratados con Casiopeínas mediante el ensayo de MNBC, se aprecia que aparecen de forma simultánea MN, PN y YN, esto podría indicar una relación de la formación entre estos tres eventos. Por lo que se hizo un análisis de regresión lineal para ver si existe alguna relación entre ellos, obteniendo una correlación positiva de MN-PN ( $r=0.57$ ), MN-YN ( $r=0.57$ ) en la Casiopeína Igly; MN-PN

( $r=0.66$ ) MN-YN ( $r=0.64$ ) para la Cas IIgly; MN-PN ( $r=0.55$ ) y MN-YN ( $r=0.42$ ) para la Cas III-I-a, observándose un comportamiento o tendencias semejantes en los tres parámetros en todos los tratamientos de los compuestos (**figuras 10.18, 10.19 y 10.20**). Actualmente, en cultivos de linfocitos tratados *in vitro* con Casiopeínas, sólo dos trabajos (**Cruz, 2011; Tello, 2011**) hacen referencia a dicha relación, encontrando también una correlación positiva entre estos eventos al ser evaluados con Casiopeína Igly y III-I-a en la fase G1-S. Existen amplias investigaciones en otros sistemas de prueba como linfocitos tratados con CCC, colcemida, MMC, infectados con *Taenia solium*, irradiados, privados de folatos y de personas fumadoras, que también apoyan esta correlación positiva.

En el año 2000 se propuso un modelo en líneas transformadas, el cual consiste en una reubicación intracelular de las DM que posteriormente son envueltas por lamina un vez que la célula entra a la fase S, dando como resultado yemas nucleares, las cuales pueden ser las precursoras de los MN (**Tanaka y Shimizu, 2000**). Asimismo hay quien reporta que este modelo se puede ampliar para incluir el ADN amplificado, ADN que falló en su replicación o que tuvo una condensación inapropiada, ADN que se retrasó en anafase incluyendo fragmentos terminales con telómero, cromosomas completos y otros elementos céntricos (**figura 4.4 y 4.6.**), y fragmentos de ADN que se originaron por los rompimientos de los PN (**figura 4.7**). Además este modelo podría combinar las diferentes teorías de la formación de las yemas nucleares y su relación con los micronúcleos, sugiriendo un mecanismo general para el origen de YN en el ciclo celular (**Lindberg et al., 2007**).

Con nuestros resultados de la correlación lineal entre MN-PN-YN y la información que existe sobre este tema, se propone que las Casiopeínas inducen fragmentación en el material genético (incluyendo los PN) para llevar a cabo su fin, este daño en la célula es detectado mediante los mecanismos de reparación, los cuales tienen que estar aptos para llevar a cabo sus funciones ya que se trata de

células sanas, las células que no logran revertir el daño, encapsulan el fragmento genético en una YN que posteriormente será eliminada como MN.

Sin embargo, pese a la evidencia que existe, se reporta que aún no es claro cómo se desarrollan las yemas nucleares o cómo un micronúcleo es formado por una yema nuclear (**Lindberg et al., 2007**). Para despejar estas y otras incógnitas es necesario promover y continuar con las investigaciones requeridas. En este caso particular se debe corroborar si efectivamente este evento de formación MN-PN-YN, es inducido por las Casiopeínas y cuál sería la finalidad.

El análisis de regresión lineal con un diseño anidado, indica que las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) empleadas tienen gran trascendencia en los efectos genotóxicos observados. Sin embargo, se considera que la actividad biológica del compuesto se debe principalmente a su estructura química.

## **11.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD**

Los resultados de citotoxicidad mostraron que las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a, causaron incremento significativo de apoptosis y necrosis en todos los tratamientos evaluados al comparar con el testigo negativo, apreciándose una respuesta dosis-dependiente en la Casiopeína Igly y III-I-a de la apoptosis. Esto revela el efecto citotóxico en los tres compuestos bioinorgánicos.

Cuando un compuesto químico se pretende utilizar para el tratamiento del cáncer como es el caso de las Casiopeínas, lo primero que se busca es que dicho compuesto sea capaz de deshacerse de las células transformadas haciendo el menor daño a las células sanas. Por lo que este primer rubro de eliminar a las células se cumple por las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a ya que induce muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis, con predominio de la primera lo cual resulta ventajoso para ambos compuestos, ya que se considera a la

apoptosis la mejor vía para eliminar a las células de acuerdo a sus características de muerte ordenada y controlada.

Por otra parte los resultados de apoptosis y necrosis de la Casiopeína III-I-a aunque tienen un incremento significativo en todos los tratamientos, en la concentración más alta (12.6  $\mu\text{g/mL}$ ) la necrosis rebasa a la apoptosis, esto puede tener varias explicaciones, una de ellas es que la actividad biológica depende de la estructura química del compuesto, y ya que la Casiopeína III-I-a está constituida de el ligando acetilacetato (O-O), a diferencia de los otros dos compuestos que tiene en su estructura química un ligando glicina. La importancia del ligando de la Casiopeína III-I-a para inducir necrosis se debe probablemente a que no es un integrante natural de la célula como lo es la glicina, y de acuerdo a sus características se puede convertir en un donador de electrones facilitando la formación de radicales libres cuando se reduce el centro metálico de la Casiopeína, generando diversos efectos en el interior de la célula como cambios en la estructura de la membrana, si se genera lipoperoxidación puede dañar a la mitocondria haciendo que se comprometan todos los eventos que tengan que ver con los procesos respiratorios.

Otra posibilidad del por qué en la concentración más alta la Casiopeína III-I-a induce necrosis, es que muy probablemente se acumula gran cantidad de ésta en la célula y de acuerdo a los antecedentes del cobre este es capaz de inducir necrosis cuando está en altas concentraciones, recordando que el cobre es el centro metálico de la Casiopeína. Resultando una concentración muy tóxica para las células si se combina el cobre con el acetilacetato, induciendo apoptosis que puede degenerar en necrosis o directamente inducir la necrosis.

Otra posibilidad es que se sabe que las caspasas son las encargadas de los cambios morfológicos característicos de la apoptosis, si se genera apoptosis de forma independiente de caspasas, existe la posibilidad de que las células muertas adquieran morfologías diversas entre ellas como las de la necrosis. Sin embargo,

actualmente se sabe que la Casiopeína III-I-a provoca muerte celular dependiente de caspasa, se tendría que corroborar si puede generar apoptosis de manera independiente de caspasas.

Nuestros resultados de apoptosis y necrosis (**figuras 10.23, 10.24, 10.25 y tabla 10.2**) y los resultados de otras investigaciones, confirman que las tres Casiopeínas tienen efecto citotóxico en linfocitos humanos *in vitro*, aunque hay autores que indican que los linfocitos humanos son más resistentes a este efecto que las células transformadas.

Es posible que las Casiopeínas lleven a cabo la vía MN-PN-YN para generar apoptosis; se hizo un análisis de regresión lineal entre los MN y la AP, en donde se obtuvo una correlación positiva de MN-AP ( $r=0.66$ ) de la Casiopeína Igly y de MN-AP ( $r=0.53$ ) de la Casiopeína IIgly y de MN-AP ( $r=0.40$ ) de la Casiopeína III-I-a que indica una correlación entre ambos eventos (**figura 10.18, 10.19 y 10.20**). De esta manera existe la posibilidad de que las células que no pueden revertir el daño inducido por las Casiopeínas, induzcan la vía apoptótica de una manera controlada y ordenada. Sin embargo es necesario ampliar la investigación al respecto, ya que no hay datos con Casiopeínas que demuestren la vía MN-YN-PN-AP, pero con otros diseños experimentales como el de **Haaf et al. (1999)** se hace referencia de este acontecimiento.

Debido a que p53 desempeña un papel importante para entrar en la apoptosis, hay evidencia con respecto a éste de una posible relación entre MN-AP. Ya que los eventos de YN y MN para remover ADN promiscuo (amplificaciones génicas, fallo de la replicación, condensación inapropiada) han sido considerados como parte de un mecanismo dependiente de p53<sup>4</sup>, proceso que en teoría puede

---

<sup>4</sup> **p53** es un gen supresor tumoral que desempeña un papel fundamental en la activación de la apoptosis, control del ciclo celular, es activador de enzimas de reparación de ADN y conduce a las células a la senescencia. p53 mutado puede permitir que las células anormales proliferen dando como resultado, el cáncer (**Efeyan y Serrano, 2007; Eischen y Lozano, 2009**).

funcionar mejor en células normales (como los linfocitos) que en células transformadas o células deficientes de p53 (**Lindberg et al., 2007**). Hay trabajos que señalan la existencia de altos niveles de la expresión de p53 en los MN, originados por la exposición a clastógenos u otros agentes (**Terradas et al., 2007**). Se ha reportado que cuando hay pérdida de la función o estructura de los telómeros, incluso acortamiento, se puede inducir inestabilidad genética mediante el ciclo rompimiento fusión puente (R-F-P) que origina a los PN, sin embargo, si hay presencia de p53 éste es capaz de modular los dos potentes mecanismos anticancerígenos: senescencia<sup>5</sup> y/o apoptosis (**Sharpless y DePinho, 2004; Ohali et al., 2006; Bailey y Murnane, 2006; Feldser y Greider, 2007; Trokova et al., 2007; Martínez et al., 2009**). También se ha observado que los MN inducidos por radiación contienen fragmentos de ADN de tamaño semejante a los descritos en apoptosis (**Terradas et al., 2010**).

En resumen, con lo que se encontró de AP y NC, podemos concluir que las tres Casiopeínas tienen la capacidad de inducir efecto citotóxico en todos los tratamientos analizados, dicho efecto probablemente sea consecuencia de la genotoxicidad del compuesto que se manifiesta como MN, YN y PN.

---

<sup>5</sup> Entendiéndose por **senescencia celular**, el arresto irreversible del ciclo celular, cambios profundos en las bases de la expresión de los genes y la habilidad de las células senescentes en permanecer así (**Sedivy, 2007**). En la gran mayoría de los casos senescentes proceden de estrés genotóxico. Conduciendo a la activación de las proteínas p53 y pRb, proteínas supresoras de tumores. La senescencia y la apoptosis son efectivas para reducir la incidencia del cáncer (**Sharpless y DePinho, 2004; Felder y Graid, 2007; Sedivy, 2007**).



## ANÁLISIS DE RESULTADOS DE CITOSTATICIDAD

En los resultados se puede apreciar que la Casiopeína Igly en la concentración más alta se presenta decremento significativo del IDN, mientras que la Casiopeína III-I-a en todas sus concentraciones evaluadas se observó este efecto, no así para la Casiopeína IIgly (**figuras 10.27, 10.28 y 10.29**).

El hecho de no observar decremento considerable de la proliferación celular en la Casiopeína IIgly, probablemente se deba a que los linfocitos contrarrestan el daño causado por los compuestos químicos analizados, mediante sus mecanismos de reparación. De hecho hay autores que indican que las células sanas tienen más posibilidades de reparar el daño que las células transformadas. Los resultados de citostaticidad de la Casiopeína IIgly, concuerdan con los de **Trejo et al. (2005)** y **Atilano (2007)**.

Los resultados de las Casiopeínas Igly y IIgly difieren respecto a la Casiopeína III-I-a ya que en todas sus concentraciones disminuyó el IDN de forma significativa. Las diferencias que se presentan en los tres compuestos como ya se mencionó quizás se deba a la naturaleza, número y posición de los sustituyentes ya que estos son responsables de las variaciones en su actividad biológica de cada una de ellas. La Casiopeína IIgly tiene dimetilfenantrolina como donador diimina, mientras que la Casiopeína Igly tiene difenilfenantrolina, pero además el efecto se relaciona con el volumen y tamaño del sustituyente arilo o alquilo, también los donadores O-O y O-N tienen influencia, por ejemplo el acetilacetato como donador O-O de la Casiopeína III-I-a es más citotóxico que el de la Casiopeína Igly con donador O-N (glicina). Como ya se mencionó la fracción acetilacetato es más agresiva que la glicina, posiblemente por que no se encuentra de forma natural en la célula.

Con base en nuestros resultados de manera particular para la Casiopeína IIgly, el no encontrar una respuesta citostática en células como los linfocitos, ante su

presencia, 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. Con respecto a la Casiopeína Igly y III-I-a, estas presentan dicho efecto, aunque lo ideal sería que no se manifestara en las células sanas (linfocitos), pero en la actualidad no hay un compuesto que sea 100% selectivo.

Aún no se ha confirmado si las Casiopeínas presentan especificidad hacia algún tipo de célula, pero si hay evidencia que indica que los linfocitos de sangre periférica *in vitro*, son poco susceptibles a su efecto citostático, como se puede ver en los resultados de Casiopeína Igly y IIgly (**figura 10.27, 10.28 y tabla 10.2**).

En la **figura 10.30 y tabla 10.2**, se puede ver que apoptosis y necrosis inducida por la **Casiopeína Igly** aumentan de manera significativa en todos los tratamientos mientras que el IDN disminuye significativamente sólo en la concentración mayor. Por lo que se puede decir que este compuesto en 2.26  $\mu\text{g/mL}$  es capaz de inducir al mismo tiempo citotoxicidad y citostaticidad en cultivos de linfocitos humanos *in vitro*. Es decir este compuesto manifiesta su citostaticidad sólo en concentraciones elevadas.

Con respecto a la **Casiopeína IIgly**, se puede observar en la **figura 10.31 y tabla 10.2**, que ambos tipos de muerte celular incrementan significativamente, sin embargo no es suficiente como para inducir decremento significativo del IDN. Por lo tanto, este compuesto genera citotoxicidad pero no citostaticidad en los cultivos de linfocitos humanos *in vitro*.

El aumento de apoptosis y necrosis es significativo como para inducir decremento considerable del IDN en todos los tratamientos de la **Casiopeína III-I-a (figura 10.32 y tabla 10.2)**. Por lo tanto esta es citostática y citotóxica en todos los tratamientos evaluados.

Con los datos hasta ahora obtenidos en este trabajo (**micronúcleos, puentes nucleoplásmicos, yemas nucleares, apoptosis, necrosis, índice de división nuclear, presencia o ausencia de señal centromérica**) y los antecedentes mostrados, se reafirma que los tres compuestos son buenos candidatos para pasar a la siguiente fase, dentro del proceso de evaluación de fármacos, y así poder entrar en la lista de tratamientos para el cáncer.

De acuerdo a los resultados obtenidos *in vitro*, se pueden hacer algunas sugerencias para continuar sus estudios en clínica, dependiendo del interés. Si se busca un agente agresivo para eliminar a las células transformadas, en primera instancia se recomienda a la Casiopeína III-I-a, por su actividad de muerte celular y porque es evidente que tienen la capacidad de reducir el IDN en todos los tratamientos, pero si se quiere por ejemplo monitorear los efectos secundarios con respecto a las dosis, al parecer es más fácil darle un seguimiento a la Casiopeínas Igly porque en la mayoría de los parámetros evaluados tienen un comportamiento regular. La Casiopeína Igly debido a que presenta efecto citostático en concentraciones altas y AP y NC en todos los tratamientos, por su comportamiento característico se recomienda para investigar qué dosis es ideal, para que se puedan eliminar las células dañadas sin causar mayor alteración a las células sanas.

## **12. CONCLUSIONES**

Debido a que los MN, PN y YN, se presentan en todos los tratamientos de las **Casiopeínas Igly, Ilgly y III-I-a**, aquí estudiadas; y éstos son considerados como una manifestación de la interacción de compuestos químicos con el ADN, se reafirma que **las tres Casiopeínas son genotóxicas**.

Los PN y YN de acuerdo con su mecanismo de formación indican que el origen de los **micronúcleos** pueda deberse al **efecto clastogénico** más que aneugénico.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de FISH, mostraron que la mayor cantidad de MN inducidos por las Casiopeínas fue sin señal de ADN centromérico (MNC-), lo cual indica que estos compuestos inducen **daño al ADN de forma directa**, es decir, son **genotóxicas mediante clastogénesis**. Por lo tanto, la mayoría de los MN encontrados en las tres Casiopeínas tienen origen clastogénico.

Asimismo, con base en nuestros resultados, la presencia de apoptosis y necrosis, indican que **las tres Casiopeínas son citotóxicas**. El hecho de que la apoptosis sea la muerte celular más representativa de la **Casiopeína Igly y Ilgly**, les da una ventaja respecto a la **Casiopeína III-I-a**, como agentes antineoplásicos, de acuerdo con los resultados obtenidos. El hecho de que se presente más apoptosis que necrosis puede estar relacionado con la actividad redox del ion  $\text{Cu}^{2+}$ .

Con los resultados del presente estudio y los trabajos citados previamente se puede inferir una relación en la formación de YN, PN, MN y AP; es así que probablemente la genotoxicidad del compuesto (observada como MN, YN y PN) sea uno de los primeros estímulos para inducir la apoptosis.

Por otra parte, se presenta decremento significativo ( $p < 0.05$ ) del IDN en relación con el testigo negativo, en dos de las Casiopeínas analizadas (Igly y III-I-a), lo que confirma la capacidad de inducir **efecto citostático**. Estas diferencias quizás se deban a la estructura y composición de cada una de ellas. Ya que la naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el ligando diimina son responsables de las variaciones en su actividad biológica.

Además, aun que las concentraciones de MMC C (0.2  $\mu\text{g/mL}$ ) y CCC (0.004  $\mu\text{g/mL}$ ) no son equimolares con respecto a los tratamientos, cabe resaltar que estos generan una mayor cantidad de alteraciones nucleares pese a que sus concentraciones son menores comparando con las concentraciones de las Casiopeínas. Con base en estos datos y a todos los antecedentes citados, se puede decir que las **Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a**, son buenas candidatas para pasar a la siguiente fase de análisis, dentro del proceso de evaluación de fármacos, para que posteriormente puedan entrar en la lista de tratamientos para el cáncer.

Por último, cabe señalar que con el desarrollo de este proyecto se logró implementar y estandarizar la técnica de FISH, en cultivos de linfocitos humanos *in vitro* con sonda centromérica, en el **Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis** de la FES-Zaragoza.

### **13. PERSPECTIVAS**

Es necesario realizar más experimentos combinando el ensayo de MNBC y la técnica de FISH con sonda pan-centromérica y pan-telomérica, para discernir si los MN con señal centromérica que se observaron en el presente, pertenecen a un cromosoma completo, o a un fragmento de cromosoma con señal centromérica positiva (MNC+).

También es indispensable, hacer una evaluación de la dinámica intracelular del contenido de los MN con inmunohistofluorescencia.

Identificar con FISH o painting, qué cromosomas son más susceptibles a la micronucleación cuando los cultivos de linfocitos han sido tratados con Casiopeínas. Ya que existen reportes que señalan que los cromosomas 1, 9, 16, X y Y, tienden más a micronuclearse como consecuencia a la exposición del agentes clastogénicos.

Corroborar la muerte celular apoptótica inducida por estos compuestos, con otras técnicas (citometría de Flujo, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-Bioting nick end labeling), ensayos colorimétricos y análisis de Western blot).

## **14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Albertini R. D., Anderson D., Douglas G. R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A. T., Norppa., Shuker D. E. G., Tice R., Waters M. D., Aitio A.** (2000) IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogen in human. *Mutación Research*. 463:111-172.

**Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** (2004) Biología molecular de la célula. 4ª ed. Ed. Ediciones Omega. México. p.1010-1011.

**Alemón M. R., Breña V. M., Muñoz S. J. L., Gracia M. M. I., Ruiz A. L.** (2007) Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drug (Casiopéinas®). *Cancer Chemother Pharmacol*. 60:219-228.

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

**Atilano A.** (2007) Evaluación de daño genotóxico, citotóxico y citostático inducido por Casiopéina IIgly en cultivo de linfocitos humanos. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México, México.D. F. pp.57.

**Bailey S. M., Murnane P. J.** (2006) Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Research*. 34:2408-2417.

**Bajpayee M., Pandey A. K., Parmar D., Dhawan A.** (2005) Current status of short-term tests for evaluation of genotoxicity, mutagenicity, and carcinogenicity of environmental chemicals and NCEs. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 15:155-180.

**Barron S. L. R.** (2006) Influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa y apoptótica del quelato mixto de cobre Casiopéina III-ia® en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. p.88

**Barron L. R., Gracia Mora I., Gómez R. C., Ruiz A. L.** (2006) Influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa y apoptótica del quelato mixto de cobre Casiopéina III—IA® en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos. 2º Congreso Nacional de Química Médica.

**Bravo G. E., Tovar A., Ruiz, M., Ruiz L., Moreno R.** (2002) Diseño síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopéinas. Primer Congreso de Casiopéinas, Universidad Nacional Autónoma de México. México. D. F.

**Bravo G. E. M., García R. J. C., Gracia M. I., Ruiz A. L.** (2009) Antiproliferative activity and QSAR study of cupper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu (N-N)(glycinato)]NO<sub>3</sub>

**Cancino M. A.** (2008) Evaluación de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas inducidos por un compuesto de Cobre (Casiopéina III-ia) en linfocitos humanos *in vitro*. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. pp. 50.

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

**Carvallo Ch. F.** (2007) Efectos antiproliferativos y apoptosis de la Casiopeína IIgly y IIIia en líneas tumorales humanas. Tesis doctoral. Ciencias de la reproducción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. p. 178.

**Carvallo C. F., Trejo S. C., Gómez C. R., Rodríguez A. C., Macías R. L., Cortés B. E., Cedillo P. C., Gracia M. I., Ruiz A. L., Madrid M. V., Constatino C. F.,** (2008) Casiopeína III-ia induce apoptosis in HCT-15 cell in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals.* 21:17-28.

**Cascales A. M.** (2003) Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia de Farmacia.* 69:43-70.

**Cervantes S. A., Marques D. S. M. J., Rivero G. P.** (2006) Análisis estadístico. Un enfoque práctico con Statgraphics. UNAM. División de ciencias químico biológicas academia de estadística y cómputo científico. Serie: Comunicación en estadística y cómputo científico. Manual. publicado con apoyo de los proyectos PAPIIME EN216403 y EN203503.

**Cervantes S. A., Marques D. S. M. J.** (2007) Diseño de experimentos curso práctico. UNAM. división de ciencias químico biológicas académicas de estadística y cómputo científico. Serie: comunicación en estadística y computo científico. Manual, publicado con el apoyo de PAPIIME EN216403 y EN203503.

**Cermeño G. J. R.** (2007) Estudio del efecto genotóxico inducido *in vivo* por la Casiopeína II-gly y por la Casiopeína III-ia. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 72.

**Chi-Jen L.** (2003) Development and evaluation of drug. From laboratory through Licensure to Market. USA; CRC Press, Inc. U. S. A. pp.1-140.

**Choo A. K. H.** (1994) In situ hybridization protocols. ED. Humana Press. New Jersey p.15-22

**Cirigo L. C., Moreno E. R., Ruiz R. L.** (2002) Interacción entre complejos ternarios del tipo [CU(N-N)(N-O)H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (Casiopeínas II) con el ADN y sus constituyentes. *Primer congreso en Casiopeínas.* Taxco Guerrero, México. p. 1-9.

**Cordero P., N. E.** (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. FES-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. pp.97.

**Cruz H. M.** (2011) 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. FES-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. pp. 67.

**Cummings M.R. y Klug W. S.** (1999) Genética. 4ª ed. ED. Prentice Hall. México. P.625-626



**De Vita V., Hellman S., Rosenberg S.** (1993) Cancer; principles & practice of oncology. Ed. J. B. Lippincott company , E. U. 4: 915.

**Dizdaroglu M., Okezie I., Barry H.** (1990) Modification of bases in DNA by copper Ion-1,10-phenanthroline complexes. *Biochemistry*. 29:8447-8451.

**Downey M. K., Que B. G., So A. G.** (1980) Degradation of DNA by 1,10 phenanthrolyne. *Biochemica and Biophysical Research Communications*. 93:264-270 16:663-669..

**Efeyan A., Serrano M.** (2007) p53: Guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*. 6:9. 1006-1010.

**Eischen C. M., Lozano G.** (2009) p53 and MDM2: antagonists or partners in crime? *Cancer Cell*. 15:161-162.

**Feldser D. M., Greider C. W.** (2007) Short telomeres limit tumor progression in vitro by inducing senescence. *Cancer Cell*. 11:461-469.

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

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

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

**Ferrer S., Gasque L., Moreno E., Ruiz A. L.** (1995). Equilibrio en disolución. 1ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.

**Florín D.** (2005) Estimación de los rompimientos de cadena sencilla inducidos en el ADN de leucocitos humanos de sangre periférica expuestos a Casiopeína II-gly. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

**Fuentes I., Jarquín A., Ruiz R. L.** (2002). Farmacocinética preclínica de Casiopeína III-ia en ratas, conejos y perros y su distribución en sangre total”. 1er Congreso en Casiopeínas y 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Facultad de. Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.

**Fuentes N. I., Rodríguez R. F., Ruiz R. L. y Portilla M.** (2004). Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica (Casiopeína IIIi). Memorias del Primer Congreso de Química Médica. Dedicado a la investigación en cáncer. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca. México.

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

**Gerrero J., Reyes P., E., Breña V. M., (1993)** Fragmentación del ADN por diferentes Casiopeínas. 2º Congreso Nacional de Química Médica. México. P.1-6.

**Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B. A. y Kuby J.** (2004) Inmunología. 5a ed. Ed. Mc Graw Hill. México, 29-30.

**Gracia M. I., Ruiz R. L., Gómez R. C., Tinoco M. M., Márquez Q. A., Romero D. L., Marín H. A., Macías R. L. y Bravo G. M.** (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*. 8:1-28.

**Guevara Ch. S.** (2008) Efectos de la Casiopeína IIgly en el material genético de linfocitos humanos *in vitro* de sangre periférica. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. pp.104.

**Grinkevich V. V., Nikulenkov F., Shi Y., Enge M., Bao W., Maljukova A., Gluch A., Kel A., Sangfelt O., y Selivanova G.** (2009) Ablation of key Oncogenic Pathways by RITA-Reactivated p53 is required for efficient apoptosis. *Cancer Cell*. 15:441-451.

**Guizar V. J. J.** (2001) Genética Clínica: diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. 3ª ed. Ed. Manual Moderno. México DF., 225-239.

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

**Jackson L.** (2002) Cytogenetic and Molecular Cytogenetic. *New Genetics For Clinical Practice*. 45:622-639.

**Kehrer J. P.** (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanism of toxicity. *Toxicology*. 149:43-50.

**Kirsch V. M., Elhajouji A., Cundari E. y Hummelen P. V.** (1997) The *In vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic loss and non-disjunction. *Mutation Research*. 392:19-30.

**Kirsch V M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M., Lorge E., Norppa H., Surralles J., Von derHude W., Wakata A.** (2000). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:167-172.

**Kirsch-Volder M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate Jr. M., Kirchner S., Lorge L., Morita T., Norppa H., Surrallés J., Vanhauwert A., Wakata A.** (2003) Report from the in vitro assay working group. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 540: 153-163.

**Koji T.** (2000) Molecular Histochemical Techniques. Ed. Springer. Tokyo. p. 49-99

**Kuwabara M. y Sigma D. S.** (1987) Food printing DNA-protein complexes *in situ* following gel retardation assays using 1, 10 phenantroline-copper ion: *Escherichia coli* RNA polymerase-lac promoter complexes. *Biochemistry*. 26:7234-7238.

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

**Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.** (2002) Biología celular y Molecular. 4ª ed. Ed. Panamericana. México. pg. 1055-1081.

**Longwell A. C., Yerganian G.** (1965) Some observations on nuclear budding and nuclear extrusions in a Chinese hamster cell culture. *Journal of the National Cancer Institute*. 34:53-63.

**Magrath I.** (1989) New direction in cancer treatment. Springer verlang. International Union Ag. pp.215.

**Marín H. A., Gracia M. I., Ruiz R. L., Moreno S. R.** (2003) Toxic effects of copper-based antineoplastic drug (Casiopéinas ®) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology*. 65: 1979-1989.

**Márquez A., Romero L., Marín A., Gómez C., Ruiz L., de la Rosa M. E., Gracia I., Mabel T., Macías L.** (2000) Evaluación antineoplásica *in vitro* de nuevos fármacos (Casiopéinas) empleando líneas tumorales humanas y murinas. 4ª Jornada de trabajo en Casiopéinas.

**Márques D. M. J.** (1987) Probabilidad y Estadística. Material didáctico. ENEP-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 649.

**Matínez P., Thanasoula M., Muños P., Chunyan L., Tejera A., McNees C., Flores J., Fernández C., Tarsounas M., Blasco M.** (2009) Increased telomere fragility and fusion resulting from TRF1 deficient lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes & Development*. 23:2060-2075.

**Mitchell J. C., Norman A.** (1987) The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. International. *Journal of Radiation. Biology and Related Studies in physics, chemistry, and medicine*. 52:527-535.

**Montuenga B. L., Esteban R. F. J., Calvo G. A.** (2009) Técnicas en histología y biología celular. ED. Elsevier Masson. España. P. 115-116.

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

**Müller L., Kikuchi Y., Probst G., Schechtman L., Shimada H., Sofuni T., Tweats D.** (1999) ICH-Hermonised guidance's on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Research*, 436; 195-225.

**Murphy G., Lawrence W. Jr., Lenhard R.** (1996) "Oncología clínica; manual de la american cancer society". 2ª ed. Ed. Publicaciones Científicas No. 559, Organización Panamericana de la Salud

**Norppa H. y Falck G. C.** (2003) What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*. 18:221-233.

**Ohali A., Avigad S., Ash S., Goshen Y., Luria D., Feinmesser M., Zaizov R., y Yaniv I.** (2006) Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer*. 107: 1391-1399.

**Pérez M. A.** (2008) Evaluación del daño ocasionado al ADN en cultivos de linfocitos humanos tratados con Casiopeína Igly (Nuevo compuesto de Cobre II). Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza Universidad Nacional Autónoma de México.. México.D. F. pp. 64.

**Reyes L., Fuente N. I., Ruiz R. L., Macías L.** (2003) Development and validation of a liquid chromatography method for Casiopeína Igly in rat plasma. *Journal of Chromatography*. 791; 111-116.

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

**Rodriguez A. E., Ruiz A. L., Gómez R. C., Macías R. L., Téllez A. L., Cortés B. E., Ortiz M. R., Gracia M. I.** (2004) Evaluación por citometría de flujo de la muerte celular inducida por Casiopeína. 1er Congreso de Química Médica.

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

**Ruiz R. L., García M. I., De la Rosa M. E., Sumano H., Gómez C., Arenas F., Gomez E., Pimentel E., y Cruces M.** (1992) Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeínas I, II, III. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 43:1-2.

**Ruiz R. L., de la Rosa M. E., Gracia M. I., Mendoza A., Pérez G., Ferrer-Sueta G., Tovar A., Breña M., Gutierrez P., Cruces M. M. P., Pimentel E., Natarajan A. T.** (1993) Casiopeínas, metal-based drugs a new class of antineoplastic and genotoxic compounds. *Journal. of Inorganic Biochemistry*. 51:1-2.

**Ruiz R. L., Moreno E. R., Gasque S. L., Quere A., Gadea L. R., Ferrer S. G., Rendón F. R., Ortega V, N.,** (1994). Estabilidad de las Casiopeínas. 1ª jornada de las Casiopeínas. Pág. 6-7.

**Ruiz A. L., Moreno E., Ferre 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 A. L.** (2004) Un salto de caballo en la tabla periódica. Primer Congreso Nacional de Química Médica. México D. F.

**Santiago M. Y.** (2004) Efecto genotóxico de los tratamientos agudos y subcrónicos de la Casiopeína IIgly en machos, hembras, hembras preñadas y fetos de ratón CD-1. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. pp. 64.

**Sedivy J. M.** (2007) Telomeres limit cancer growth by inducing senescence: long-sought in vivo evidence obtained. *Cancer Cell*. 11:389-391.

**Segura V. M. L., López V. G., Jiménez G. L. F.,** (1997) Hibridación in situ ultraestructural. Plaza y Valdés Editores, México D. F. p.28.

**Serrano G. L., Montero M. R.** (2001) micronuclei and chromatid buds are result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 38:38-45.

**Sharpless N. E., DePinho Ronald A.** (2004) Telomeres, stem cells, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*.113:160-168.

**Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G. M.** (1998) Selective entrapment of Extrachromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation during S Phase. *The Journal of Cell Biology*. 140: 1307-1320.

**Sigman D. S., Graham D. R., D'Aurora V., Stern A. M.** (1979) Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1, 10 phenantroline cuprous complex. Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Biochemistry*. 254:12269-12272.

**Stephen W. G., Tait G., Douglas R., Green (2010)** Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Molecular Cell Biology*.11:621-632.

**Syntichaki P., Tavernarakis N.** (2002) Death by necrosis. *EMBO reports*. 3:60-609.

**Takehiko K.** (2000) Molecular Histochemical Techniques. Ed. Springer. Tokyo, pp. 49-99.

**Tanaka T. y Shimizu N.** (2000) Induced detachment of acentric chromatin from mitotic chromosomes leads to their cytoplasmic localization at G<sub>1</sub> and the micronucleation by lamin reorganization at S phase. *Journal of Cell Science*. 113:697-707.

**Terradas M., Martín M., Tusell L., Genescá A.** (2010) Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?. *Mutation Research*. 705:60-67.

**Teyo M. M. P.** (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. FES-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. pp.65

**Tolbert P., Shy C. Allen J.** (1992) Micronuclei and other nuclear anomalies in bucal smears: methods development. *Mutation Research*. 271:69-77.

**Tovar T., Medica A., Ruiz A. L., Campero C. A.** (2004) Dos formas diferentes de interacción entre complejos mixtos de cobre (II) (Casiopeínas) y adenina, como una aproximación a su selectividad. Primer Congreso de Química Médica. P. 159-161.

**Trejo S. C., Palencia G., Zúniga S., Rodríguez R. A., Osorio R. L., Torres L. S., Gracia M. I., Márquez R. L., Sánchez A., Moreno G. M. E., Cruz A., Bravo G. M. E., Ruiz R. L., Rodríguez E.**

**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*. 7:563-574.

**Trkova M., Prochazkova K., Krutilkova V., Sumerauer D., Sedlacek Z.** (2007) Telomere length in peripheral blood of germline TP53 Mutation Carriers in shorter than of normal individuals of corresponding age. *Cancer*. 110:694-702.

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

**Uribe L. P.** (2010) Estudio de la Muerte celular y daño genotóxico inducido *in vitro* por un nuevo compuesto cobre Casiopeína Igly. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. pp.62.

**Vargas M. C.D.** (2006) Detección del gen SRY en pacientes con síndrome de Turner mediante Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.

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

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

**Weinberg R. A.** (1996) How Cancer Arises. *Scientific American*. 275: 62-70

**Wilkinson D. G.** (1994) *In situ* hybridization. Ed. Oxford University. New York. pp. 137-156.

**Won Ch. H., Jin K. S., Young K. S.** (2002) A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1, 2, 4,-benzenetriol. *Mutation Research*, 516: 49-56.

**15. ANEXO I (Preparación de reactivos para el análisis en el ensayo de MNBC).**

**Casiopeína Igly:** se pesan 6.15 g de casiopeína Igly y se disuelven en 10 ml de agua estéril, posteriormente se adiciona 10  $\mu$ L de dimetil sulfoxido (DMSO) al 1%. Se agita. Para obtener las siguientes concentraciones 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. Se debe almacenar en refrigeración y oscuridad. Su efectividad se perderá en 7 días, después de haber sido preparada.

**Casiopeína IIgly:** Se pesan 2 mg de Casiopeína y se disuelven en 4 mL de agua inyectable (Stock 1). de aquí se toman 100  $\mu$ L y se agregan a 900  $\mu$ L de agua inyectable (Stock 2). Para obtener la siguientes concentraciones 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 stok 2, respectivamente. Se debe almacenar en refrigeración y oscuridad. Su efectividad se perderá en 7 días después de haber sido preparada.

**Casiopeína III-I-a:** Se pesan 1.05 mg y se disuelven en 5 mL de agua estéril. Para obtener las concentraciones de 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. Se debe almacenar en refrigeración y oscuridad. Su efectividad se perderá en 7 días despues de haber sido preparada.

**Mitomicina-C:** Su presentación es de 2 mg, mismos que se diluyen con 4 mL de agua inyectable para obtener una concentración de 0.5  $\mu$ g/mL, de aquí se extraen 100  $\mu$ L y se diluyen con 900  $\mu$ l de agua inyectable éste será el stok 1. Se toman 200  $\mu$ L del stock 1 y se agregan 800  $\mu$ L de agua inyectable, stock 2. Del stock 2, se extraen 100  $\mu$ L mismos que se adicionan a 5 mL de medio de cultivo teniendo una concentración final de 0.2  $\mu$ g/mL. Se almacena en refrigeración.



**Colchicina (testigo positivo aneugénico):** 2 mg de colchicina se disuelven en 10 mL de agua estéril. Se toma una alícuota de 100  $\mu$ L de la solución anterior, esto se lleva a 1 mL, con 900  $\mu$ L de agua inyectable Stock 1. Se toman 100  $\mu$ L del stock 1, nuevamente se lleva a 1 mL con 900  $\mu$ L de agua inyectable stock 2. Del Stock 2 se toma una alícuota de 100  $\mu$ L y se adiciona a 5 mL de medio de cultivo para tener una concentración final de 0.04  $\mu$ g/mL. Se esteriliza con un filtro con poro de 0.02  $\mu$ m y se almacena en refrigeración.

**Citocalasina-B:** su presentación es de 5 mg, ésta se disuelve con 1.6 mL de DMSO (stock 1). Se extraen 100  $\mu$ L del stock 1 y se completa con 900  $\mu$ L de agua inyectable (stock 2). Del stock 2, se extraen 100  $\mu$ L y se adicionan a 5 ml de medio de cultivo, para tener una concentración final de 6  $\mu$ g/mL. Se esteriliza con un filtro con poro de 0.02  $\mu$ m y se almacena en congelación.

**Lectina:** su presentación es de 5 mg la cual se diluye en 10 mL de agua inyectable y se almacena en refrigeración. Se adiciona 0.25 mL por cada 5 mL de medio de cultivo.

**Metanol : ácido acético (3:1):** 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):** para 100 mL de fijador son 85 mL de metanol y 15 mL de ácido acético.

**May-Grünwald:** Se divide el total de mililitros, a prepara entre 3, para obtener la proporción de agua destilada, y el restante es el colorante.

**Giemsa (1:20):** Se diluye 1 mL de colorante en 20 mL de agua desionizada.

**16. ANEXO II (Preparación de reactivos para el análisis en FISH).**

**Solución 20XSCC (para un litro):** se pesan 175.3 g de cloruro de sodio (NaCl), 88.2 g de citrato de sodio ( $\text{NaCOH}_5\text{O}_7$ ) 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 en 0.4XSCC (para 500 mL):** en 488.5 mL de agua destilada se agregan 10 mL de la solución 20xSCC, y 1.5 del detergente igepal. La solución debe presentar un pH de 7 a 7.5, ajustando con hidroxido 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 igepal, 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 ( $\text{NaCOH}_5\text{O}_7$ ), 8.7663 g de cloruro de sodio (NaCl) y aforar a 500 mL.

**Metanol : ácido acético (70:30) (para 100mL):** 70 ml de metanol más 30 mL de ácido acético.

## **17. Anexo III (Participación Académica).**



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Coordinación de Estudios de Posgrado

El Primer Congreso de Alumnos de Posgrado otorga la presente constancia a:

**Soledad Guevara Chávez**

por su participación con el proyecto académico:

**Evaluación genotóxica de las Casiopeínas mediante la combinación del ensayo de micronúcleos y la técnica de FISH en células humanas in vitro.**

Ciudad Universitaria, mayo de 2011.

**Dr. Héctor Hiram  
Hernández Bringas**  
Coordinador de Estudios de Posgrado





# “Evaluación Genotóxica de las Casiopeínas mediante la combinación del Ensayo de Micronúcleos y la técnica de FISH en células humanas *in vitro*”



Soledad Guevara Ch<sup>1</sup>., Bertha Molina<sup>2</sup>., Ana L. Martínez<sup>1</sup>., Elia Roldán R<sup>1</sup>.

1. “Citogenética y Mutagénesis” de la UNIGEN, Lab.2 pa. UMIEZ, CII. FES-Zaragoza, UNAM. Av. 5 de Mayo, Esq. Fuente de Loreto, s/n. Col. Ejército de Oriente., Iztapalapa, C.P. 09230, Ciudad de México. 2. Lab. Citogenética INP, Insurgentes Sur 3700-C, CP 04530, Col. Insurgentes-Cuicuilco, México D.F., México. [soledadquevarach@hotmail.com](mailto:soledadquevarach@hotmail.com), [ellar@servidor.unam.mx](mailto:ellar@servidor.unam.mx)

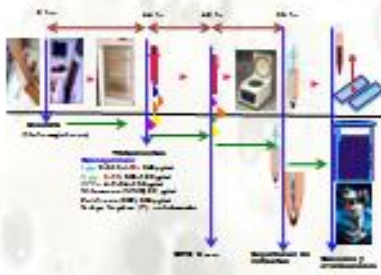
## INTRODUCCIÓN

Las **Casiopeínas** {Cu(N-N) (N-O)} NO<sub>3</sub> ó {Cu(N-N) (O - O)} son más de cien compuestos bioinorgánicos sintéticos, patentados por la UNAM; considerados una alternativa en la quimioterapia anticáncer. Las Casiopeínas Igly, IIgly y IIII-a, son de las más prometedoras, por que exhiben un gran potencial antineoplásico y baja toxicidad [1, 2, 3, 4].

## OBJETIVOS

A través del ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis (MNBC), evaluar los efectos: genotóxico, citotóxico y citostático; y en combinación con FISH establecer el origen (aneugénico y/o clastogénico), de los micronúcleos (MN) inducidos por las Casiopeínas.

## MÉTODOS

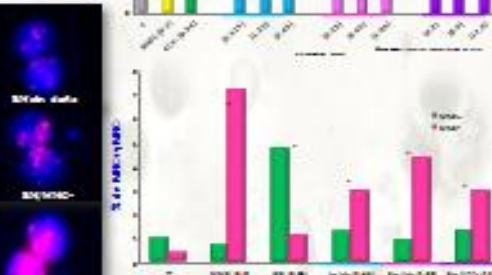
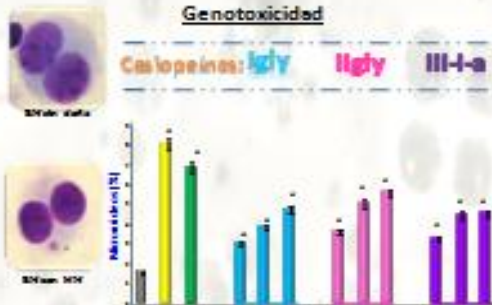


## ABSTRACTOS

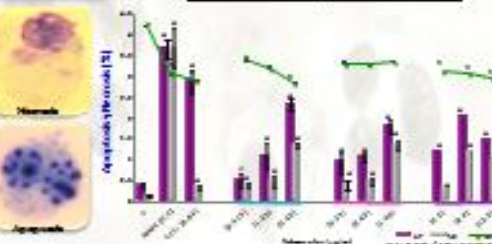
Publicado en Ciencias Biológicas (Materia de Biología Experimental), FOPYT (2011) UNAM, FOP (1º Simposio Congreso SCSB-Orla 2010), UNAM, CONACYT (Eneac), SEP

## RESULTADOS

### Genotoxicidad



### Citotoxicidad y citostaticidad



## CONCLUSIONES

El incremento significativo de: MNs, PNs y YNs, en todos los tratamientos, reafirma que las Casiopeínas Igly, IIgly y IIII-a son genotóxicas.

Los PNs y YNs indican que el origen de los micronúcleos se debe a un efecto clastogénico de las Casiopeínas en el ADN.

Los resultados de FISH, mostraron que estos compuestos, inducen daño al ADN de forma directa, es decir, son genotóxicas mediante clastogénesis.

La presencia de apoptosis y necrosis, señala que las tres Casiopeínas son citotóxicas. Donde la apoptosis es la muerte celular más frecuente.

Las Casiopeínas Igly y IIII-a inducen decremento significativo del IDN, lo que confirma su capacidad citostática.

Se implementó y estandarizó la técnica de FISH, en cultivos de linfocitos humanos *in vitro*, en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, de la FES-Zaragoza, UNAM.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Soledad Guevara Ch., Bertha Molina, Ana L. Martínez, Elia Roldán R. (2010) Evaluación genotóxica de las Casiopeínas Igly, IIgly y IIII-a mediante el ensayo de micronúcleos y la técnica de FISH en células humanas *in vitro*. *Ciencias Biológicas* (Materia de Biología Experimental), FOPYT (2011) UNAM, FOP (1º Simposio Congreso SCSB-Orla 2010), UNAM, CONACYT (Eneac), SEP.

2. Soledad Guevara Ch., Bertha Molina, Ana L. Martínez, Elia Roldán R. (2010) Evaluación genotóxica de las Casiopeínas Igly, IIgly y IIII-a mediante el ensayo de micronúcleos y la técnica de FISH en células humanas *in vitro*. *Ciencias Biológicas* (Materia de Biología Experimental), FOPYT (2011) UNAM, FOP (1º Simposio Congreso SCSB-Orla 2010), UNAM, CONACYT (Eneac), SEP.

3. Soledad Guevara Ch., Bertha Molina, Ana L. Martínez, Elia Roldán R. (2010) Evaluación genotóxica de las Casiopeínas Igly, IIgly y IIII-a mediante el ensayo de micronúcleos y la técnica de FISH en células humanas *in vitro*. *Ciencias Biológicas* (Materia de Biología Experimental), FOPYT (2011) UNAM, FOP (1º Simposio Congreso SCSB-Orla 2010), UNAM, CONACYT (Eneac), SEP.

4. Soledad Guevara Ch., Bertha Molina, Ana L. Martínez, Elia Roldán R. (2010) Evaluación genotóxica de las Casiopeínas Igly, IIgly y IIII-a mediante el ensayo de micronúcleos y la técnica de FISH en células humanas *in vitro*. *Ciencias Biológicas* (Materia de Biología Experimental), FOPYT (2011) UNAM, FOP (1º Simposio Congreso SCSB-Orla 2010), UNAM, CONACYT (Eneac), SEP.



**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:

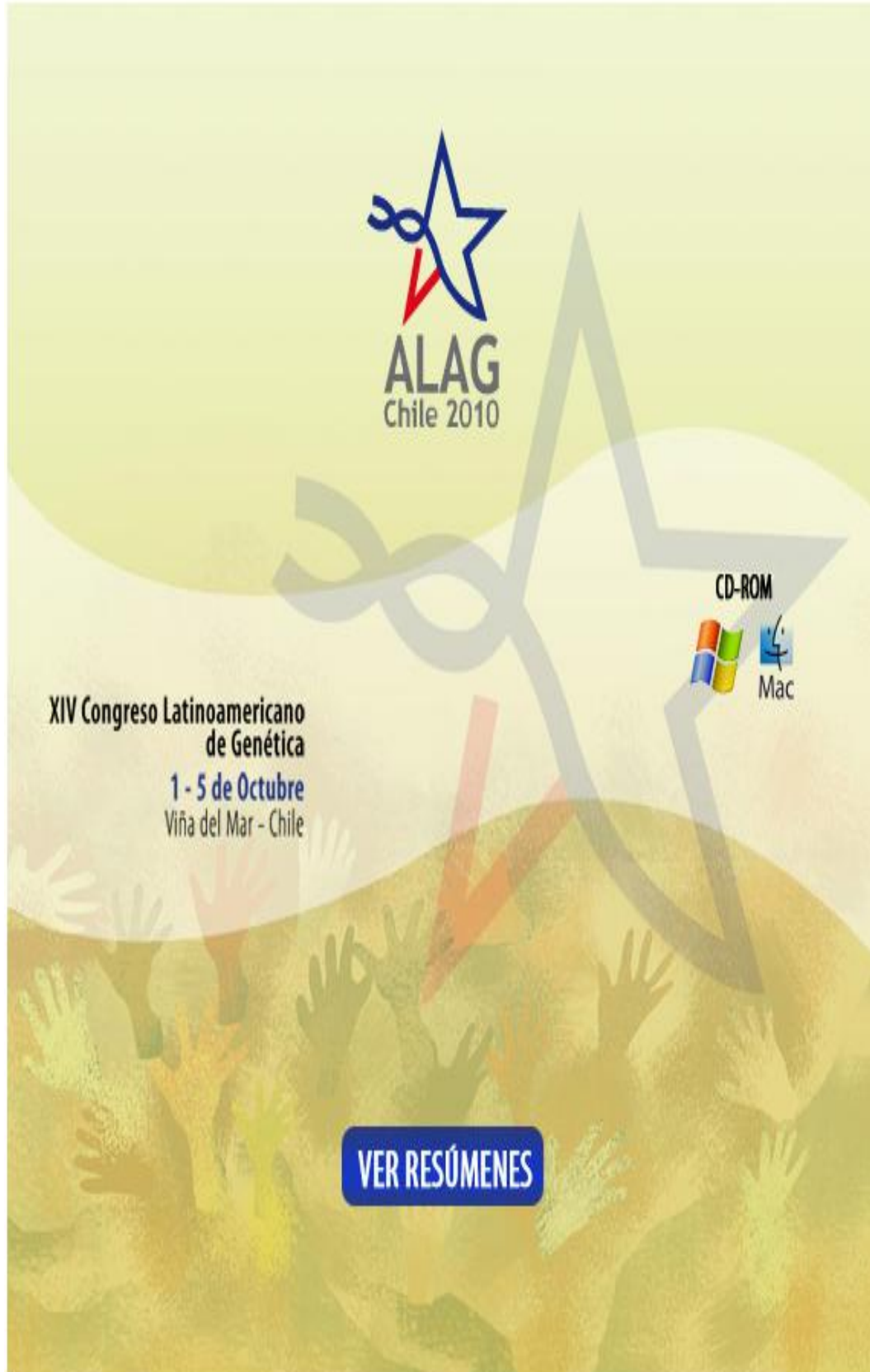
**EVALUACIÓN DE YEMAS NUCLEARES EN LÍFOCITOS HUMANOS IN VITRO**  
**TRATADOS CON COMPUESTOS DE COBRE II**

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

ATENTEMENTE  
 "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







XIV CONGRESO LATINOAMERICANO DE GENÉTICA (ALAG)  
VIII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE MUTAGÉNESIS,  
CARCINOGENESIS Y TERATOGENESIS AMBIENTAL (ALAMCTA)  
XLIII CONGRESO DE LA SOCIEDAD DE GENÉTICA DE CHILE (SOCHIGEN)  
XXXIX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE GENÉTICA (SAG)

**COMITÉ EJECUTIVO**

- Gonzalo Gajardo**  
Presidente ALAG
- Enrique Zamorano-Ponce**  
Presidente ALAMCTA
- Juan Carlos Marín**  
Presidente SOCHIGEN
- María Inés Oyarzabal**  
VicePresidenta SAG
- Patricia Pérez-Alzola**  
Secretaria ALAG-ALAMCTA
- Cristian Araneda**  
Tesorero SOCHIGEN-ALAG
- Claudio Martínez**  
ExPresidente SOCHIGEN

**CONSEJO HONORARIO**

- Dr. Francisco Salzano**  
BRASIL
- Dr. Ricardo Cruz-Coke**  
CHILE
- Dra. Catarina Takahashi**  
BRASIL
- Dra. Patricia Ostrosky**  
MEXICO
- Dr. Nestor O. Bianchi**  
ARGENTINA
- Dr. Máximo Drets**  
URUGUAY

**CONSEJO CONSULTIVO**

- Dr. Jan Drake**  
NIEHS/NIH, USA
- Dr. Juan Carlos Salerno**  
Presidente SAG  
ARGENTINA

**CERTIFICADO**

*Certificamos que el siguiente trabajo:*

*Título: GENOTOXICIDAD IN VITRO DE COMPUESTOS DE COBRE II (Casiopéinas®) EN LINFOCITOS HUMANOS*

*Autores: Guevara, S. y Roldán, E.*

*Fue presentado en la modalidad de Panel en el XIV Congreso Latinoamericano de Genética ALAG 2010, realizado en la ciudad de Viña del Mar – Chile, los días 01, 02, 03, 04 y 05 de Octubre del año 2010.*

*Gonzalo Gajardo*  
Presidente

*Patricia Pérez-Alzola*  
Secretaria

*Santiago, octubre de 2010*



## IN VITRO GENOTOXICITY OF COPPER II COMPOUNDS (Casiopéinas®) IN HUMAN LYMPHOCYTES



Guerrero, S. y Roldán, E.

FES-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. 5 de Mayo, Esq. Fuerte de Loreto, s/n Colonia Ejercito de Oriente, C.P. 09230, México D.F. soledadguerrarach@hotmail.com; eliar@servidor.unam.mx.

### Abstract

The genotoxic effects of the **Casiopéinas Igly, IIgly and III-I-a** were analysed by measuring micronucleus (MN), nucleoplasmic bridges (NPBs) and nuclear buds (NBUDs). The cytotoxic effects were analysed by measuring cell death (necrosis and apoptosis). The present results indicate that Casiopéinas are genotoxic and cytotoxic, to cultured isolated human lymphocytes, adding treatment after 44 h of cultures initiation, at all treatments compared with the negative control.

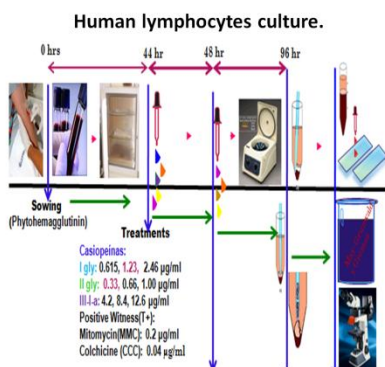
### Introduction

The family of bioinorganic compounds called "**Casiopéinas**" {Cu(N-N) (N-O)} NO<sub>3</sub> ó {Cu(N-N) (O - O)} of Mexican origin, have been considered as a chemotherapeutic alternative for treatment of cancer. The Casiopéinas Igly, IIgly and III-I-a are the most promising because have exhibited greater antineoplastic potency and low toxicity [1, 2, 3, 5].

### Objectives:

Establish the genotoxic damage and determine the origin of micronucleus of Casiopéina Igly, IIgly III-I-a, in the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay for isolated human lymphocyte.

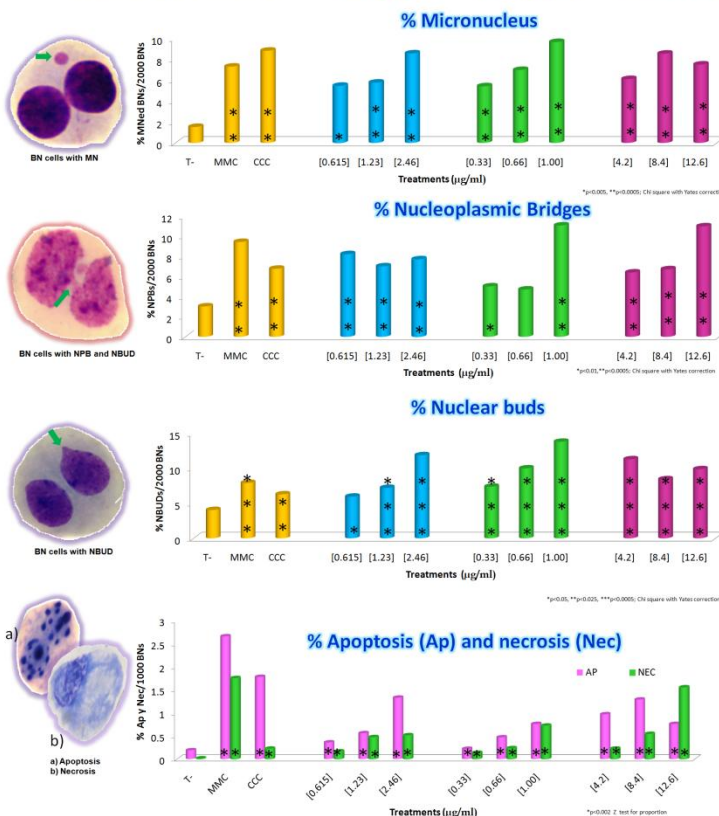
### Method:



### Results:

#### Casiopéinas:

Igly IIgly III-I-a



### Discussion

The Casiopéinas Igly, IIgly and III-I-a induced a significantly increased ( $p < 0.05$ ) in the percentage of MN, NPBs and NBUDs, which is a manifestation of alterations in the genetic material. Also was observed a significant increase ( $p < 0.05$ ) of apoptotic and necrotic cells.

Results of bridges and nuclear buds indicate that micronuclei induced by Casiopéinas may be the result of clastogenesis more than of aneuploidy.

These events are probably due to reactive oxygen species (ROS) formation induced by Casiopéinas, or to their interaction with DNA, specifically to adenine [6, 1, 4].

### Conclusion

According to the results the three compounds are **genotoxic, cytotoxic and clastogenic**.

They did not show cytostatic effect in these conditions (results not shown).

**Acknowledgements:** Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Tecnológica. UNAM (PAPIIT IN2219083). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP). Cristóbal Sánchez Sánchez.

**Referencias:**

1. Alonzo M, R. (2015) ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...



Dirección General de  
Divulgación de la Ciencia  
U N A M



M. en C. Soledad Guevara Chávez  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza  
Presente

El Programa *Jóvenes hacia la Investigación* organiza año con año la realización de Estancias Cortas, donde los alumnos interesados en las ciencias llevan a cabo proyectos de investigación bajo la asesoría y supervisión de investigadores que, como usted, nos hacen el favor de apoyarlos.


Quisiéramos por ello, externarle nuestro agradecimiento al haber recibido a la alumna Judith Itzel Crespo Estrella, durante el periodo establecido para tal evento, del 7 de junio al 2 de julio del presente.

Gracias por su dedicada y profesional participación, que reditúa en beneficio de los jóvenes participantes del Programa e incentiva de esta manera su interés en el ámbito de la ciencia.


Esperando seguir contando con su valiosa colaboración, reciba usted un cordial saludo.

Atentamente  
"Por mi Raza Hablará el Espíritu"  
Ciudad Universitaria, D.F. 19 de noviembre de 2010.

  
Biól. Guillermina de Francisco Salas  
Jefa de Programas al Exterior de la DGDC/UNAM



# Había una vez unos compuestos mexicanos llamados Casiopeínas®...




### Introducción:

Respondiendo a la constante necesidad de encontrar más y mejores agentes antineoplásicos, la Dra. Lena Ruiz Azuara, creó la familia de compuestos llamados **Casiopeínas®** [1] de fórmula general  $\{Cu(N-N) (N-O)\} NO_3$  ó  $\{Cu(N-N) (O - O)\} NO_3$ , las cuales son patentadas por la Universidad Nacional Autónoma de México. Algunos de estos compuestos como las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a han demostrado ser las más activas y menos tóxicas [1,2].

### Objetivo:

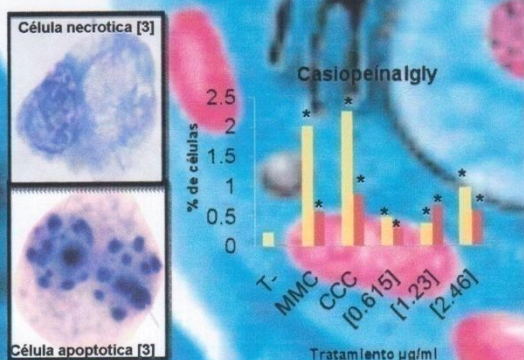
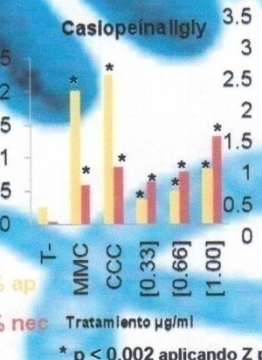

Evaluar el efecto citostático (mediante el conteo de células polinucleadas) y citotóxico (mediante el conteo de Apoptosis y Necrosis) de las Casiopeínas Igly, IIgly y III-I-a en linfocitos humanos *in vitro*.

### Método [4]:



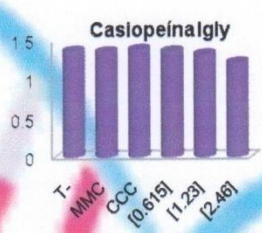
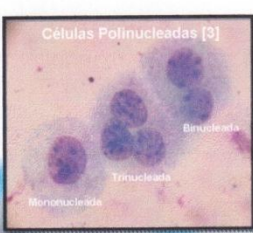
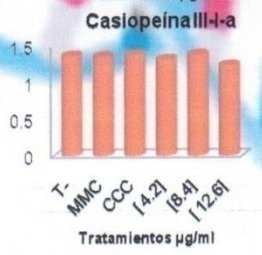
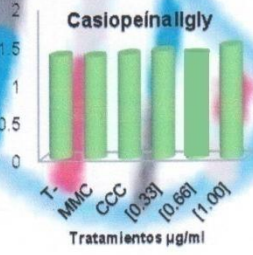
### Resultados:

### Porcentaje de Apoptosis y Necrosis

\* p < 0.002 aplicando Z para proporciones

### Índice de División Nuclear

### Discusión y Conclusiones

El IDN de las tres Casiopeínas no disminuyó significativamente respecto al testigo negativo (T-) por lo tanto no son citostáticas en linfocitos humanos *in vitro*.

Sin embargo son citotóxicas porque tanto necrosis como apoptosis incrementan de forma significativa respecto al testigo negativo (T-).

#### Referencia Bibliográfica

1. Atliano A. H., (2007). "Evaluación de daño Genotóxico, Citotóxico y Citostático inducido por Casiopeína Igly en cultivos de Linfocitos humanos" Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM, Pág. 5, 6.
2. Cordero P. N. E., (2010). "Evaluación de los efectos toxicológicos inducidos por un compuesto de Cu (Casiopeína Igly) durante las fases G1-S y G2-mediante el ensayo de micronúcleos *in vitro*" Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM, Pág. 11, 12, 15.
3. Guevara C. S. y Róldan R. E., (2010). Fotomicrografía de Células Polinucleadas, Apoptóticas y Necróticas tomadas a 100x. UNAM. FES-Zaragoza. Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis.
4. Guevara C. S. y Róldan R. E., (2010). Ilustración de la Metodología. UNAM. FES-Zaragoza. Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis.



Dirección General de  
Divulgación de la Ciencia  
U N A M



Dirección General de  
Divulgación de la Ciencia  
**XX Aniversario**

Biól. Soledad Guevara Chávez  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza  
Presente

El Programa *Jóvenes hacia la Investigación* organiza año con año la realización de Estancias Cortas, donde los alumnos interesados en las ciencias llevan a cabo proyectos de investigación bajo la asesoría y supervisión de investigadores que, como usted, nos hacen el favor de apoyarlos.

Quisiéramos por ello, externarle nuestro agradecimiento al haber recibido a la alumna Anahi Monserrat Vázquez Medina, durante el periodo establecido para tal evento, del 8 de junio al 3 de julio del presente.

Gracias por su dedicada y profesional participación que reditúa en beneficio de los jóvenes participantes del Programa e incentiva de esta manera su interés en el ámbito de la ciencia.

Esperando seguir contando con su valiosa colaboración, reciba usted un cordial saludo.

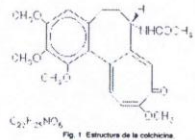
Atentamente  
"Por mi Raza Hablará el Espíritu"  
Ciudad Universitaria, D.F. 20 de noviembre de 2009.

Biól. Guillermina de Francisco Salas  
Jefa de Programas al Exterior de la DGDC/UNAM



# ¿Sabías que es y cómo actúa la Colchicina?

La excelencia a través de la Integración  
FES



## Introducción.

La colchicina es un alcaloide (Fig.1) derivado del azafrán silvestre (*COLQUICO*) y utilizado como planta medicinal para el tratamiento de la gota desde la época de los antiguos egipcios. [1]

**Especie:** *Colchicum autumnale*.

**Nombres:** Cólquico de otoño, Azafrán de los prados, Narcizo de otoño (Fig. 2)

**Familia:** Liliáceas

**Lugar de origen:** Prados, terrenos herbáceos, bosques abiertos. Centro y Este del Mediterráneo hasta Grecia, por el Norte hasta las Islas Británicas.

**Longevidad:** perenne

**Altura:** Hasta 15 cm

**Floración:** Finales de verano-principios de otoño.

La colchicina es un compuesto que inhibe el reparto de los cromátidas de un cromosoma durante la mitosis, evitando la poliploidía de la célula filial, ya que aunque no haya separación, sí hay duplicación del material genético. Por lo tanto, detiene o inhibe la división celular en metafase (Fig. 3) o en anafase. [2]

## Objetivo

Evaluar el daño genotóxico indirecto en linfocitos humanos *in vitro* tratados con **colchicina** en concentraciones de 0.02, 0.03 y 0.04 µg/ml mediante el ensayo de micronúcleos *in vitro* con bloqueo de la citocines (MNBC), para ser utilizada como testigo positivo de acción aneugénica en futuros protocolos de investigación.

## Hipótesis.

Se sabe que la colchicina es un alcaloide que causa alteraciones en el huso mitótico, presentando un efecto aneugénico; por lo tanto, si se aumenta la concentración de colchicina, se espera encontrar un incremento de daño genético indirecto, expresado como micronúcleos.



Fig. 2 Colchico

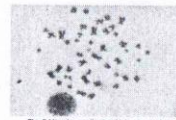


Fig. 3 Micrografía de célula en metafase



## Resultados.



Figura 4. Frecuencia de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos con bloqueo de la citocina, tratados in vitro con diferentes concentraciones de colchicina.

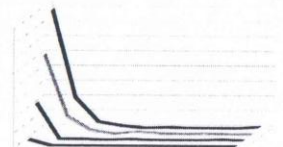


Figura 5. Distribución de micronúcleos por célula binucleada, en linfocitos humanos con bloqueo de la citocina, tratados in vitro con diferentes concentraciones de colchicina.



Fig. 6 Micrografía de célula binucleada con micronúcleos

## Discusión y conclusión.

Los datos en todas las concentraciones fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.0005$ ), comprobados a través de  $\chi^2$  (con corrección de Yates) por lo que podemos decir que la **colchicina** es genotóxica ya que induce una gran cantidad de MN, conforme aumenta su concentración.

Los resultados obtenidos (Fig. 4 y 5) nos muestran una tendencia clara de dosis-respuesta. confirman lo encontrado en la literatura que nos dice que la colchicina es un potente inductor de daño genético indirecto [4] como nos muestra [3] el efecto aneugénico será directamente proporcional a la dosis. (Fig. 6)

Se comprobó que la colchicina es un potente agente aneugénico en las concentraciones utilizadas respectivamente en este trabajo experimental y de esta forma se logra establecer la curva dosis-respuesta para ser utilizada como un testigo positivo (de efecto aneugénico) en los ensayos de MNBC del laboratorio de Citogenética y Mutagénesis de la FES-Zaragoza.

## Referencias bibliográficas.

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts Keith., Watson J.D. (2002). Biología molecular de la célula. 3ra ed. Editorial Omega S.A.
2. Ahern M.J., Reid C., Gordon T.P., McCredie M., Brooks P.M., Jones (1987). Does colchicine Works? The results of the first controlled study in acute gout. Aust NZ J Med. 17: 301-304
3. Azeidine Ethajouji, Monica Cunha, Micheline Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. Mutagenesis vol. 13 no. 2 pp. 153-159.
4. Gillian Clare M., Lorenzon Giocondo, Akhurst Leslie C., Marzin Daniel, Delft Joost van, Montero Regina, Botta Alain, Bertens Arma., Cinelli Serena, Thybaud V'ronique, Lorge Elisabeth (2006). SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test II. Using human lymphocytes. Mutation Research 607: 37-60

Vázquez Medina Anelis Monserrat.  
Grado escolar: Sexto año  
Escuela Nacional Preparatoria Plantel 6  
"Antonio Caso"  
Segura Gortares Ma. Josefina  
Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis de la  
UNIZEN (Lab. 2. UNIZEP x 1), FES-Zaragoza,  
UNAM  
Dr. Rodríguez Reyes Elsa.  
Biol. Guevara Chávez Soledad



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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN**

OFICIO FESZ/DEPI/317/09

ASUNTO: Respuesta a su Invitación a Taller



**DR. SERGIO M. ALCOCER MARTÍNEZ DE CASTRO**  
**SECRETARIO GENERAL DE LA UNAM**  
**Presente.**

En respuesta al atento oficio SGEN/113/09 de la Secretaría General de la UNAM, que en colaboración con *Scopus Elsevier*, está promoviendo el "Taller internacional para autores/as de artículos científicos" que se llevará a cabo en el auditorio "José Luis Sánchez Bribiesca" de la Torre de Ingeniería el 24 de septiembre del año en curso de 11:00 a 13:30 horas, la División de Estudios de Posgrado e Investigación propone a los siguientes académicos, para que asistan al mismo:

- Dra. Elia Roldán Reyes
- Biól. Soledad Guevara Chávez
- Dra. María del Carmen García Rodríguez
- Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
México, D. F., 21 de septiembre de 2009

**EL JEFE DE LA DIVISIÓN**

**DR. VICENTE J. HERNÁNDEZ ABAD**

VJHA/arr\*

tel 5616 1580 ext 111-112