



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO CITOGÉNÉTICO *in vitro* DEL CLORURO DE
COBRE SOBRE LINFOCITOS HUMANOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

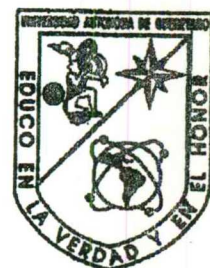
JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA

DIRIGIDA POR

Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2007

FACULTAD DE
QUÍMICA



BIBLOTECA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO CITOGÉNÉTICO *in vitro* DEL CLORURO DE
COBRE SOBRE LINFOCITOS HUMANOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA

DIRIGIDA POR

Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODAL

Biol. MARÍA DE LA CONCEPCIÓN ADRIANA

YERENA DE VEGA

SINODAL

Q.B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Propiedades del cobre y su efecto genético	2
II.2 Cromosomas homólogos, haploidía y diploidía	9
II.3 División celular y mitosis	11
II.4 Cariotipo	16
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
IV.1 General	20
IV.2 Específicos	20
V. METODOLOGÍA	21
V.1 Materiales	21
V.1.1 Equipo	21
V.1.2 Reactivos	21
V.2 Métodos	22
V.2.1 Toma de muestra	22
V.2.2 Siembra	22
V.2.3 Cosecha	23
V.3 Diseño Experimental	25
V.4 Método Estadístico	27

VI. RESULTADOS	30
VI.1 Grupo control negativo	30
VI.2 Grupo control positivo	31
VI.3 Tratamientos	32
VI.3.1 Grupo con 8 $\mu\text{g/ml}$ de cloruro de cobre	32
VI.3.2 Grupo con 16 $\mu\text{g/ml}$ de cloruro de cobre	34
VI.3.3 Grupo con 24 $\mu\text{g/ml}$ de cloruro de cobre	35
VII. DISCUSIÓN	38
VIII. CONCLUSIONES	44
IX. BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diseño Experimental	25
2	Concentración respuesta de MMC	26
3	Control negativo	30
4	Control positivo	31
5	Primera dosis de cloruro de cobre	33
6	Segunda dosis de cloruro de cobre	34
7	Tercera dosis de cloruro de cobre	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de los cromosomas	10
2	Partes de un cromosoma	16
3	Cariotipo con Bandas G	18
4	Análisis de Varianza	28
5	Metafase del grupo control negativo	30
6	Célula del control negativo	31
7	Célula del grupo con Mitomicina C	32
8	Célula del grupo tratado con 4 veces la concentración sanguínea humana de cloruro de cobre	33
9	Célula correspondiente al grupo tratado con 8 veces la concentración sanguínea humana de cloruro de cobre	34
10	Célula del grupo tratado con 12 veces la concentración sanguínea humana de cloruro de cobre	36
11	Gráfica de metafases con anomalías	37

RESUMEN

El cobre es un elemento traza esencial para la salud de los humanos ya que activa y desactiva numerosas enzimas e interviene en la formación del colágeno, la elastina y el pigmento melanina. Los efectos tóxicos de bajas concentraciones pueden provocar entre otros trastornos irritación y dolor. Las concentraciones altas de cobre han sido asociadas a daños en riñones e hígado, así como trastornos mentales que pueden llevar a la muerte, también se ha reportado daño al DNA por efecto de cobre que pueden tener consecuencias graves tanto para los individuos como su descendencia. En este trabajo se estudió los cambios citogenéticos ocasionados por el cloruro de cobre en linfocitos humanos durante su cultivo. Se utilizaron las concentraciones de 8, 16 y 24 $\mu\text{g/ml}$ de cloruro de cobre sobre los linfocitos en una aplicación única, incubándolos durante 72 horas, cosechándolos y posteriormente analizando las metafases al microscopio. Se cultivaron sus respectivos controles negativos y se utilizó como control positivo a la Mitomicina C en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados mostraron diferencias entre los controles negativos y los tratados observándose aberraciones cromosómicas como los Gaps en todas las concentraciones. La frecuencia de estas alteraciones aumentó conforme aumentó la concentración del cobre. Este estudio reveló que el cobre tiene un efecto clastogénico en todas las concentraciones utilizadas.

I. INTRODUCCIÓN

El cobre es un elemento traza considerado esencial para la salud de los humanos, su utilidad ha sido asociada a la combinación de sus propiedades químicas y físicas. Entre las aplicaciones de los compuestos de cobre se encuentra la agricultura, en especial como fungicidas e insecticidas por lo que puede ser encontrado en muchas clases de alimentos, en el agua potable y en el aire.

Exposiciones a bajas dosis de cobre pueden causar trastornos gastrointestinales leves así como cefaleas; sin embargo, en altas dosis ha sido asociado a daño en el material genético, en el hígado, en los riñones y el sistema nervioso, los cuales pueden llevar a la muerte.

Por lo anterior este proyecto de investigación se enfocó al análisis de células expuestas al cobre, observando los efectos citogenéticos incluyendo alteraciones cromosómicas en linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica, para posteriormente determinar que el cobre además de ser tóxico, es clastogénico (alteración en los cromosomas como la formación de Gaps que son muescas en los cromosomas).

II. ANTECEDENTES

II.1 Propiedades del cobre y su efecto genético

El cobre fue uno de los primeros metales usados por los humanos, su utilidad ha sido asociada a la combinación de sus propiedades químicas, físicas, eléctricas y mecánicas. La mayor parte del cobre del mundo se obtiene de los sulfuros minerales. Entre las aplicaciones de los compuestos de cobre está el uso en la agricultura. El cobre puede ser encontrado en muchas clases de comidas, en el agua potable y en el aire, por lo tanto absorbemos una cantidad eminente de cobre cada día. Parte del cobre absorbido es necesario para la salud humana como elemento traza, sin embargo a altas concentraciones puede causar problemas de salud. La gente que vive en casas que todavía tiene tuberías de cobre está expuesta a niveles más altos que la mayoría de la gente, porque es liberado en sus aguas a través de la corrosión de las tuberías. En el ambiente de trabajo el contacto con cobre puede llevar a gripe conocida como la fiebre del metal. Esta fiebre pasará después de dos días y es causada por una alta sensibilidad. Exposiciones de largo período al cobre pueden irritar la nariz, la boca y los ojos y causar dolor de cabeza, de estómago, mareos, vómitos y diarreas. Una toma grande de cobre puede ocasionar daño al hígado y los riñones e incluso la muerte. Algunas fuentes naturales de cobre son las tormentas de polvo, descomposición de la vegetación, incendios forestales y aerosoles marinos. Unos ejemplos de actividades humanas que contribuyen a la liberación del cobre son la minería, la producción de metal, la producción de madera y la producción de fertilizantes fosfatados (Emsley, 2001).

El cobre ocupa el tercer lugar entre los iones de metales de transición con importancia biológica en los seres humanos. Aunque generalmente excretamos cualquier exceso de cobre en la dieta, un defecto genético causa el mal de Wilson, una condición en la que se acumula Cu^{2+} en el hígado y el cerebro. Las proteínas que contienen cobre, por ejemplo confieren a la sangre de los cangrejos, langostas, caracoles su color azul (Moore y col., 2000).

El cobre en concentraciones traza es esencial para la vida pero en concentraciones grandes es tóxico, especialmente para las bacterias, algas y hongos. Entre los muchos compuestos del cobre utilizados como pesticidas están el acetato básico, carbonato, cloruro, hidróxido y sulfato. Además de sus aplicaciones en agricultura, el CuSO_4 se utiliza en baterías y depósitos electrolíticos para preparar otras sales de cobre y en muchos procesos industriales (Petrucci y Harwood, 1999).

El cobre se absorbe activamente en el intestino por una proteína transportadora y la deficiencia de este produce síndrome de Menke o del pelo crespo. En la sangre el cobre se encuentra unido a una globulina alfa 2, denominada ceruloplasmina y su concentración en la sangre es de 15 a 30 $\mu\text{mol/l}$ y la de ceruloplasmina es de 25 a 40 mg/dl. La concentración de cobre en suero o plasma es de 100 a 200 $\mu\text{g/dl}$ (Murray y Granner, 1994).

El cobre en forma iónica, activa numerosas enzimas, en especial las oxidasas como la tirosinasa, lisina-oxidasa, citocromo-oxidasa, delta-aminolevulina hidratasa, etc. Interviene en la formación del colágeno, la elastina y del pigmento melanina. El cobre es eliminado por la bilis. En la enfermedad de Wilson existe menor eliminación de este ión por la bilis, por lo tanto se acumula en el organismo y causa lesiones en el hígado, en donde produce degeneración adiposa y en el tejido nervioso origina trastornos mentales progresivos que pueden llegar a la muerte (Farias, 1993).

El cobre es un elemento esencial con muchas funciones fisiológicas. Los mecanismos de homeostasis existen para permitir al cobre actuar como cofactor en procesos enzimáticos y prevenir la acumulación de este metal a los niveles tóxicos. La esencialidad del cobre se puede atribuir a su papel como cofactor en un número de enzimas que estén implicadas en la defensa contra la tensión oxidativa. Este metal de transición, sin embargo puede ser un compuesto tóxico cuando se acumula en enfermedades hepáticas, neurodegenerativas y cardiovasculares. El

potencial destructivo del cobre se puede atribuir a sus características fisicoquímicas inherentes (Shumann y col., 2002).

Muchas de las enzimas que se han visto hasta ahora pueden activarse o desactivarse por iones de cobre, y se puede acelerar o reducir la velocidad de sus actividades enzimáticas. Los iones Cu^+ y Cu^{++} entre otros, son los principales responsables de la actividad de muchas enzimas que implica la reducción y oxidación dentro de las células. El cobre en una cantidad diminuta, es necesario para que el hierro pueda ser absorbido en el organismo. Este metal también se encuentra en la enzima tirosinasa que es la responsable de la producción del pigmento negro melanina que controla la coloración de la piel humana, la cual también actúa oscureciendo la cáscara de algunas frutas. La eritrocupreína es una proteína de nuestros eritrocitos que contiene cobre. En el calamar existe una proteína llamada hemocianina que sirve para transportar oxígeno, en la cual se encuentran hasta 20 átomos de cobre (Choppin y col., 1984).

La proteína de la enfermedad de Wilson (WNDP) es una ATPasa transportadora de cobre del tipo P(1) que desempeña un papel dominante en la distribución normal del cobre en un número de tejidos finos, particularmente en el hígado y el cerebro. El cobre tiene efectos numerosos sobre la proteína de la enfermedad de Wilson, alterando su estructura, actividad y localización intracelular (Lutsenko y col., 2003).

El efecto del cobre ha sido estudiado en 40 mujeres que usaban un anticonceptivo que contenía cobre, conocido como dispositivo intrauterino (DIU) y a 22 mujeres control. Los niveles del cobre y del zinc fueron medidos en el plasma de las usuarias del DIU y del grupo control. Los análisis cromosómicos fueron realizados en linfocitos de la sangre de los mismos grupos. Los resultados demostraron que el nivel de cobre del plasma era perceptiblemente más alto en las usuarias del DIU que en el de los controles ($1.25 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$ contra $0.89 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$) ($P < 0.05$). Las aberraciones cromosómicas y la alta frecuencia de los intercambios de cromátidas hermanas fueron evidentes en las mujeres que usaban el DIU,

especialmente en quienes lo usaban por más de 24 meses. La combinación del alto nivel de cobre del plasma, de aberraciones cromosómicas y de la frecuencia creciente del intercambio de cromátidas hermanas puede apoyar la existencia de una correlación positiva entre el uso a largo plazo del DIU y el daño del DNA en las células somáticas del anfitrión (Shubber y col., 1998).

Las células obtenidas en cultivos de linfocitos de personas inhaladoras de cobre y personas no inhaladoras, fueron expuestas a diferentes agentes de forma individual y combinados, como arsénico, plomo y selenio, buscando después aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas. El selenio mostró un efecto protector contra los otros agentes, mientras que el arsénico y plomo pueden causar daños genéticos menores que en personas inhaladoras de cobre (Beckman y Nordenson, 1986).

El ensayo de micronúcleos realizado *in vivo* en la ostra *Crassostrea gigas* tanto en especímenes adultos como en jóvenes, para evaluar el efecto genotóxico del medio ambiente marino, durante un examen preliminar en células de corazón de la larva de *C. Gigas*, mostró la acción clastogénica del benzopireno (0.05, 0.5, 1 y 500 $\mu\text{g/l}^{-1}$) y el efecto tóxico del sulfato cúprico (10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/l}^{-1}$) en el cultivo celular (Burgeot y col., 1995).

El efecto de las sales inorgánicas del cobre (CuSO_4) y del cadmio (CdCl_2) fue estudiado en células humanas en un cultivo a largo plazo (144 horas, modelo *in vitro* del envejecimiento) y en los individuos mayores (80-93 años de edad). El sulfato de cobre aumentó la incidencia de aberraciones cromosómicas en los individuos mayores (14.25 +/- 1.74%) y durante el envejecimiento *in vitro* (12.20 +/- 1.62%) y 3.94 +/- 1.96% y 5.25 +/- 1.10% en los controles respectivamente, mientras que el tratamiento con el cloruro del cadmio no indujo cambios (Dzhokhadze y Lezhava, 1994).

Durante un estudio realizado por Stich y colaboradores en 1979, se observó que el ascorbato recién preparado inhibe la mitosis e induce aberraciones cromosómicas en cultivo de células ováricas de hámsteres chinos y que el Cu^{2+} y el Mn^{2+} (de 10^{-4} o 10^{-5} M) incrementan ambas acciones. El 100% de todas las metafases examinadas tuvieron múltiples intercambios cromosómicos o rompimientos.

La deficiencia del cobre (hipocuprosis) en animales experimentales y domésticos tiene un impacto severo en el crecimiento así como en la reproducción. La ocurrencia de lesiones durante la hipocuprosis se correlaciona con el agotamiento de un grupo enzimático en donde el cobre participa. El objetivo de Abba y colaboradores en el 2000 fue el analizar las aberraciones cromosómicas en las vacas de *Aberdeen Angus* de la provincia de Buenos Aires en relación con los niveles del cobre plasmático. Los cultivos a corto plazo de linfocitos fueron hechos de las muestras obtenidas a partir de cuatro grupos de animales: dos grupos con los niveles normales de cobre en plasma y dos grupos con hipocupremia severa. Este análisis demostró un aumento significativo de la frecuencia de las aberraciones cromosómicas ($p < 0.001$) en los grupos hipocuprémicos en relación con los grupos control. El aumento de las frecuencias de las aberraciones cromosómicas encontradas en los grupos hipocuprémicos se podría explicar por la tensión oxidativa más alta sufrida por estos animales. Una actividad catalítica más baja de enzimas tales como la dismutasa del superóxido de Cu/Zn (Cu/Zn-SOD) y la oxidasa del citocromo-c-c podría aumentar la producción intracelular de la especie activa del oxígeno (O^{2-} y de H_2O_2 entre otros) con los efectos clastogénicos consiguientes (Abba y col., 2000).

Para determinar el efecto clastogénico de la deficiencia de cobre en ganado vacuno de *Aberdeen Angus* se analizó la relación entre el daño del DNA determinado por la concentración del ensayo Cometa y del cobre plasmático. Las muestras de sangre fueron obtenidas a partir de 28 vacas femeninas de *Aberdeen Angus* durante embarazo o inmediatamente después de dar a luz. Cada muestra fue dividida en dos partes para la determinación en el ensayo Cometa y del cobre en plasma,

respectivamente. De los 28 ganados muestreados, 17 eran normocuprémicos y 11 eran hipocuprémicos. Los resultados demostraron que mientras que el nivel medio del cobre del plasma en ganados normocuprémicos era 67.6 µg/dl, en ganados hipocuprémicos era 32.1 µg/dl. El aumento del daño del DNA fue evidenciado sobre todo por la disminución de las células del grado 1 del cometa y un aumento de las células del grado 2 del cometa. La inducción del daño del DNA fue apoyada claramente por el hecho que la disminución de los niveles del cobre en plasma fue correlacionada con el aumento del diámetro de la longitud-cabeza del cometa. Estos resultados mostraron que el daño al DNA y al cromosoma son una consecuencia de la tensión oxidativa más alta sufrida por los animales hipocuprémicos (Picco y col., 2001).

Las respuestas clastogénicas inducidas por agentes carcinógenos indirectos fueron comparadas en distintas especies de rata Long-Evans A (LEA), de Long-Evans C (LEC), de Wistar y de las ratas del SD. La frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) inducidas por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) o la aflatoxina B1 (AFB1), en ratas de LEC que se alimentaron con una dieta de Cu-libre, era más alta que en las ratas de LEC alimentadas con una dieta normal y más bajo en ratas de LEA, aunque la diferencia fue estadísticamente significativa solamente entre las ratas alimentadas con Cu-libre de LEC y las ratas de LEC tratadas con DMBA. Las concentraciones de cobre en los hígados de LEA, de las ratas masculinas de LEC alimentadas con Cu-libre y de LEC envejecidos 4 semanas tenían un peso neto de 5.0 +/- 0.4, 33 +/- 7.7 y 106 +/- 3.4 µg/g, respectivamente. Estos resultados sugieren que la sensibilidad más baja de las ratas de LEC a los efectos clastogénicos de agentes carcinógenos indirectos que actúan, pueda ser asociada al efecto de la gran cantidad de cobre acumulada en el hígado de la rata de LEC (Ito y col., 1994).

En un estudio al añadir Mn^{2+} y Cu^{2+} a las muestras de saliva de masticadores de la nuez de betel y de tabaco indio se observó el realce de la actividad clastogénica de la nuez de betel, mientras que el Fe^{3+} aumentó la clastogenicidad de la nuez de

betel pero disminuyó el efecto genotóxico en la saliva de los masticadores de tabaco indio. Después de retirar de la boca la nuez betel o sus componentes, la actividad clastogénica desapareció en un plazo de 5 minutos (Stich y Stich, 1982).

El sulfato de cobre administrado intraperitonealmente a ratones albinos suizos *in vivo* inducen un significativo incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células de médula espinal en todas las concentraciones usadas (1.1 – 6.6 mg/Kg de peso corporal) cuando se compararon con el control negativo. El análisis estadístico indicó que el nivel de clastogenicidad fue directamente proporcional a las concentraciones usadas (Agarwal y col., 1990).

En los estudios donde se aplicaron varias condiciones estresantes incluyendo la exposición a bajas dosis de radiación y concentraciones bajas de mutágenos químicos, se observó que estos agentes promueven una respuesta adaptante al daño cromosómico inducido por radiación. En este estudio, fue investigado el efecto del tratamiento previo de linfocitos de sangre periférica del conejo con las sales del zinc o del cobre sobre el daño inducido por radiación del cromosoma. El tratamiento previo de los linfocitos periféricos del conejo con el Zn (50 μM *in vitro* o 100 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal *in vivo*) dio lugar a resistencia a la radiación gamma (2.0 Gy) que inducía aberraciones cromosómicas. Por otra parte, el tratamiento previo con el cobre (50 μM *in vitro*) no demostró ningún efecto protector sobre el daño inducido por radiación del cromosoma en linfocitos de sangre periférica de conejo (Cai y Cherian, 1996).

Los resultados de un estudio de inducción de micronúcleos, realizados *in vitro* en linfocitos humanos, demostraron que la alfa-hederina, la clorofilina (sal cúprica de sodio de la clorofila) y el ácido ascórbico de forma individual tuvieron un efecto antimutagénico contra la doxorubicina (1.5×10^{-2} nmol/ml). Las concentraciones efectivas antimutagénicas de alfa-hederina (1.3×10^{-2} , 0.13, 1.3 y 13 nmol/ml), clorofilina (0.14, 1.4 y 14 nmol/ml) y el ácido ascórbico (10 nmol/ml) no fueron

clastogénicos o tuvieron efectos aneugénicos en linfocitos humanos (Amara-Mokrane y col., 1996).

Al tratar diferentes grupos de ratones con extracto acuoso crudo de hojas de espinaca de la india, a otro grupo extracto de clorofila de las hojas, a otro con clorofila purificada (comercial) y a un último grupo con clorofilina (sodio cúprico derivado de la clorofila) diariamente durante 7 días y en el séptimo día a un grupo de ratones de cada tratamiento se les fue administrando dicromato de potasio, un conocido clastógeno metálico, se observó en células de médula espinal, aberraciones cromosómicas y células dañadas pero solo en los grupos tratados con clorofila comercial y la extraída de las hojas. El extracto crudo de hojas de espinaca y la clorofilina fueron no clastogénicos y redujeron los efectos clastogénicos del dicromato de potasio (Sarkar y col., 1996).

Se ha observado que la neocuproína, un quelante eficiente del cobre, ofrece una ligera protección contra los rompimientos del DNA causados por la menadiona (vitamina K) en cultivo de fibroblastos de hámsteres chinos (Calderaro y col., 1993).

El cobre (II) en combinación con Montmorillonita (complejo de Sodio, Calcio, Aluminio y Magnesio) en una concentración mínima de 1024 y 2048 µg/ml, ha demostrado ser un antibacteriano sobre las bacterias patógenas *Escherichia coli* ATCC K88 y sobre la *Salmonella Cholerae* ATCC 50020 que se encuentran en la zona intestinal de cerdos destetados (Tong y col., 2005).

II.2 Cromosomas homólogos, haploidía y diploidía

Los cromosomas tienen un tamaño y una forma característicos, cada cromosoma tiene una región condensada o constreñida llamada centrómero, dependiendo de la posición del centrómero los brazos tienen longitudes relativas distintas. El brazo más corto es el que se encuentra por encima del centrómero y se denomina brazo

p, el brazo más largo se encuentra debajo y se denomina el brazo q. Los cromosomas se clasifican en metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos o telocéntricos de acuerdo con la localización del centrómero (Figura1) (Klug y Cummings, 1999) a) Si el centrómero está localizado en la parte media, el cromosoma se llama metacéntrico y los brazos son sensiblemente iguales, b) Si el centrómero está más cerca de uno de los extremos que del otro, determinándose claramente un brazo corto y otro brazo largo, el cromosoma es llamado submetacéntrico y c) Si el centrómero está situado muy próximo a uno de los extremos, quedando un brazo corto muy reducido, el cromosoma es acrocéntrico, además estos cromosomas en el brazo corto tienen unas formaciones parecidas a palillos de tambor denominadas satélites (Salamanca, 1990).

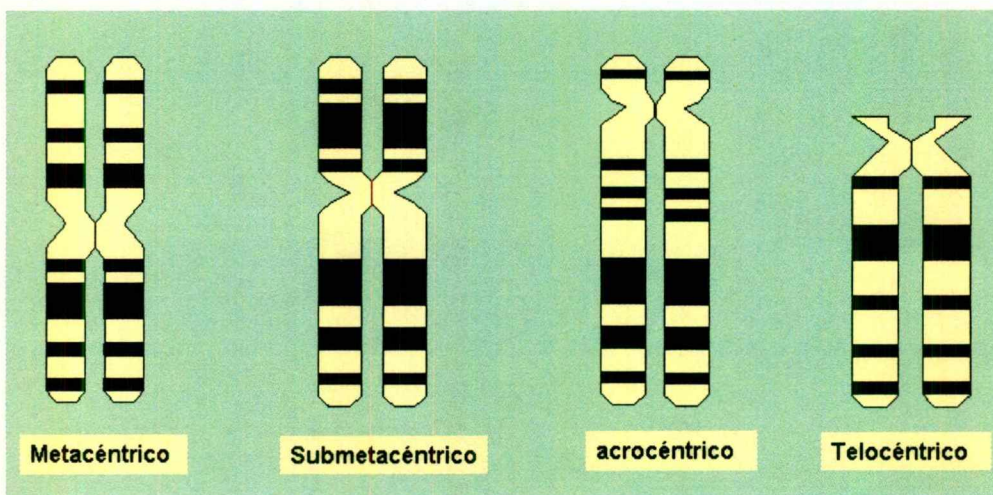


Figura 1. Clasificación de los cromosomas. Los cromosomas son clasificados en metacéntricos, submetacéntricos, acrocéntricos o telocéntricos, de acuerdo con la posición del centrómero (Sánchez, 2005).

Las células somáticas de los individuos de una misma especie tienen el mismo número de cromosomas, el llamado número diploide ($2n$). Casi todos los cromosomas se encuentran formando parejas los miembros de cada par se denominan cromosomas homólogos, para cada cromosoma con una longitud y una situación del centrómero específicas, existe otro cromosoma con rasgos idénticos (Klug y Cummings, 1999), mientras que los cromosomas de pares diferentes son no

homólogos. Un cromosoma puede diferir de otro en tamaño, en capacidad de tinción con diversos colorantes y en la posición del centrómero (Herskowitz, 1970).

La especie humana tiene un número $2n$ de cromosomas en un total de 46, con gran diversidad de tamaños y posición del centrómero, cada uno de ellos tiene una estructura doble, con dos cromátidas hermanas en paralelo unidas por un único centrómero. El número haploide (n) de cromosomas es igual a la mitad del número diploide. La totalidad de los genes que se encuentran en el conjunto formado por uno de los dos cromosomas homólogos de cada una de las parejas constituye el genoma haploide de la especie. Las parejas de cromosomas homólogos tienen genes idénticos, situados en los mismos lugares a lo largo del cromosoma que se denominan *locus*, por ello tienen idéntico potencial genético. En organismos con reproducción sexual como es el caso de la especie humana, uno de los miembros de cada pareja proviene de la madre (a través del óvulo) y el otro del padre (a través del espermatozoide), y como consecuencia de la herencia biparental, cada organismo diploide tiene dos copias de cada uno de los genes, aunque no son necesariamente idénticos, las formas alternativas del mismo gen se denominan alelos. Sin embargo los cromosomas que determinan el sexo, no tienen igual tamaño, igual situación del centrómero, la misma proporción entre los brazos o el mismo potencial genético. En la especie humana los varones tienen un cromosoma Y, además de un cromosoma X, mientras que las mujeres tienen dos cromosomas X homólogos (Klug y Cummings, 1999).

II.3 División celular y mitosis

Las células se reproducen mediante un proceso conocido como división celular, en el cual su material genético, el DNA, se reparte entre dos nuevas células hijas. Las nuevas células hijas son casi idénticas entre sí, como lo son a su progenitora, a nivel de estructura y función y es que cada nueva célula hereda un duplicado exacto de la información genética de la célula materna (Curtis y Barnes, 2000).

Después de la división celular, el tamaño inicial de las células hijas es aproximadamente la mitad del tamaño de la célula madre, sin embargo el núcleo de las nuevas células no es menor que el núcleo de la célula madre, por lo tanto hay cantidades equivalentes de material genético en las células hijas y en la célula madre. El proceso de división del citoplasma se denomina citocinesis y es el reparto del mismo en dos partes, seguido del confinamiento de las dos nuevas células dentro de membranas plasmáticas diferentes y los orgánulos citoplasmáticos se autoduplican. La mitosis es básica para todos los organismos eucariotas, los organismos pluricelulares diploides comienzan su ciclo biológico como óvulos fecundados unicelulares o cigotos. La actividad mitótica del cigoto y de las células hijas posteriores es la base para el crecimiento y desarrollo del organismo. En organismos adultos, la actividad mitótica asociada a la división celular es esencial en la cicatrización de las heridas y en otros tipos de sustitución de células en ciertos tejidos. En situaciones anormales, las células somáticas pueden presentar proceso de división celular incontrolada, originando un cáncer (Klug y Cummings, 1999).

En caso que no haya división celular, el crecimiento tiene lugar por medio de un incremento en volumen y por un aumento de la membrana superficial externa. En ausencia de división sobrevendría rápidamente la muerte a causa de las tensiones y de los accidentes físicos que podrían romper una membrana tan grande. Los productos químicos que constituyen los cromosomas recién sintetizados, así como las proteínas que pronto darán lugar al huso mitótico, se encuentran ya durante la interfase (Strickberger, 1974).

Muchas células presentan una alternancia continua entre división y no división. El intervalo entre cada división mitótica se denomina interfase y durante esta se produce la replicación del DNA de cada cromosoma. El periodo en el que se sintetiza el DNA se denomina fase S y tiene lugar cuando la célula se prepara para iniciar la división nuclear (mitosis). Existen dos periodos durante la interfase, antes y después de S, en los que no se sintetiza DNA. Estas fases se denominan G1 (gap1) y G2 (gap2) respectivamente. En ambas fases así como durante la fase S,

hay intensa actividad metabólica, crecimiento y diferenciación celular. Hacia el final del G2 el volumen celular prácticamente se ha duplicado, el DNA se ha replicado y se ha iniciado la mitosis (M). Después de la mitosis, las células que están continuamente dividiéndose repiten este ciclo (G1, S, G2, M) una y otra vez. La fase G1 tiene gran interés en el estudio de la proliferación celular y de su control. En un momento tardío de G1, todas las células siguen uno de estos dos caminos: abandonan el ciclo y entran en una fase de reposo, la llamada fase G0, o bien son obligadas a iniciar la síntesis de DNA y completar el ciclo. Las células en la fase G0 permanecen viables y activas metabólicamente, pero no se dividen, algunas células en esta fase nunca reinician su ciclo celular y otras pueden ser estimuladas para volver a G1 continuando con el ciclo celular. Citológicamente la interfase se caracteriza por la ausencia de cromosomas viables, es evidente que el núcleo está lleno de cromatina, que se ha formado a medida que los cromosomas se han desplegado y despiralizado después de la mitosis anterior (Klug y Cummings, 1999).

El proceso de la mitosis se divide convencionalmente en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase. El factor promotor de la mitosis induce la condensación de los cromosomas y la entrada en mitosis. Una vez comenzado el proceso, los cromosomas ya están suficientemente condensados y son visibles bajo el microscopio óptico. Cada cromosoma consiste en dos copias longitudinales, llamadas cromátidas hermanas, cada una de las cuales posee un área llamada centrómero, por la cual ambas cromátidas se unen. En cada centrómero se une un complejo proteico denominado cinetócoro, que forma una placa en la superficie del centrómero en donde se insertan los microtúbulos del huso (Curtis y Barnes, 2000).

Durante la profase, los constituyentes químicos que no se habían formado durante la interfase para los cromosomas nuevos son sintetizados (Strickberger, 1974). Al comienzo de la profase, los centriolos ya se habían replicado durante la fase G1, la célula se vuelve más esférica y el citoplasma más viscoso (Curtis y Barnes, 2000). Durante la profase ocurre la migración de dos pares de centriolos hacia extremos

opuestos de la célula, los centriolos son responsables de la organización de los microtúbulos citoplasmáticos, lo que da lugar a una serie de fibras del huso que van de polo a polo. A medida que los centriolos migran, la envoltura nuclear comienza a descomponerse y desaparece gradualmente, los nucléolos del interior empiezan a desintegrarse, la cromatina difusa (la forma desespiralizada característica del material genético en interfase) comienza a condensarse (Klug y Cummings, 1999). A medida que continúa la profase en cada cromosoma las cromátidas se vuelven más cortas y más gruesas y se desenrollan una de otra (Herskowitz, 1970).

Cuando finaliza esta fase queda claro que cada cromosoma es una estructura doble, escindida longitudinalmente excepto en una constricción puntual, el centrómero y todos los cromosomas se encuentran distribuidos aleatoriamente en la zona que anteriormente ocupaba el núcleo (Klug y Cummings, 1999). Después se da la separación del centrosoma y el movimiento de cada mitad hacia lados opuestos del núcleo, la desaparición del nucleolo por completo y el inicio de la rotura de la membrana nuclear (Strickberger, 1974), que se dispersa en fragmentos membranosos. Al final los cromosomas están completamente condensados y con la desaparición de la envoltura nuclear, quedan en contacto con el citoplasma. Los centrosomas han alcanzado los polos de la célula y los miembros de cada par de centriolos son del mismo tamaño. Las fibras polares del huso están completamente formadas y también se han formado las fibras del cinetócoro (Curtis y Barnes, 2000).

Durante la metafase se da la rotura total de la membrana nuclear, la adhesión de los cromosomas por el centrómero al huso. En las células animales el huso se forma por la separación de los centriolos. Al separarse los dos centriolos, a partir de cada uno de éstos parecen radiar líneas distintas (rayos del áster) formando una red de fibras del huso continuas entre las dos. Y por último se da la disposición de los cromosomas en una placa horizontal (placa metafásica) que se halla a mitad de camino entre los dos polos del huso (Strickberger, 1974), conducidos por las fibras cinetocóricas, como si fuesen atraídos primero por un polo y luego por el otro.

Finalmente los pares de cromátidas se disponen exactamente en el plano medial (ecuador) de la célula (Curtis y Barnes, 2000). Los miembros de un par de cromosomas toman su posición en la metafase mitótica independientemente uno del otro (Herskowitz, 1970).

En la anafase el centrómero de cada par de cromátidas empieza a funcionar como una estructura doble, en ese momento en la placa metafásica (Strickberger, 1974), los centrómeros se separan simultáneamente en todos los pares de cromátidas. Luego se separan las dos cromátidas de cada par siendo cada una atraída hacia los polos opuestos. Así cada cromátida se transforma en un cromosoma separado. Los centrómeros se mueven primero, mientras que los brazos de los cromosomas parecen quedar rezagados. A medida que continúa la anafase, los dos conjuntos idénticos de cromosomas recién separados se mueven hacia los polos opuestos del huso (Curtis y Barnes, 2000).

La telofase es la fase final de la mitosis, en sus comienzos hay dos dotaciones completas de cromosomas, una en cada polo pero el hecho más significativo es la citocinesis que es la división del citoplasma y esta es esencial para que a partir de una sola célula se produzcan dos. En cada nueva célula, los cromosomas comienzan a desespiralizarse y quedan de nuevo como cromatina difusa mientras se rehace la envoltura nuclear a su alrededor, los nucléolos se forman de nuevo gradualmente y quedan totalmente visibles en el núcleo en la interfase temprana (Klug y Cummings, 1999) y comienza a formarse un nuevo centríolo junto a cada uno de los núcleos. El huso comienza a desaparecer dispersándose en dímeros de tubulina (Curtis y Barnes, 2000). Durante la telofase los dos grupos de cromátidas polares que ya pueden llamarse cromosomas hijos, sufren una reversión a un estado interfásico más extendido e hinchado (Strickberger, 1974). En la telofase los cromosomas se vuelven más delgados y más largos y luego se puede ver que consisten en dos fibras delicadas (cromátidas) torcidas entre ellas, finalmente los cromosomas pierden su identidad visible y el núcleo entra en la interfase o estadio

intermitótico. El material genético rutinariamente retiene su individualidad o integridad independiente de la naturaleza del medio (Herskowitz, 1970).

La tinción con varios colorantes químicos pone de manifiesto con el microscopio óptico una red oscura llamada cromatina que durante la división celular se transforma en cromosomas. Algunas zonas de los cromosomas se tiñen muy intensamente (heterocromatina), mientras que otras se tiñen relativamente poco (eucromatina) (Strickberger, 1974).

II.4 Cariotipo.

Mediante el cultivo de linfocitos de sangre periférica es posible observar los cromosomas bajo el microscopio. Los cromosomas no solo tienen un número constante en cada especie, sino que también, presentan estructura y morfología definidas. Los cromosomas se analizan durante la metafase, en la cual cada cromosoma consta de dos cromátides unidas por un centrómero (Figura 2).

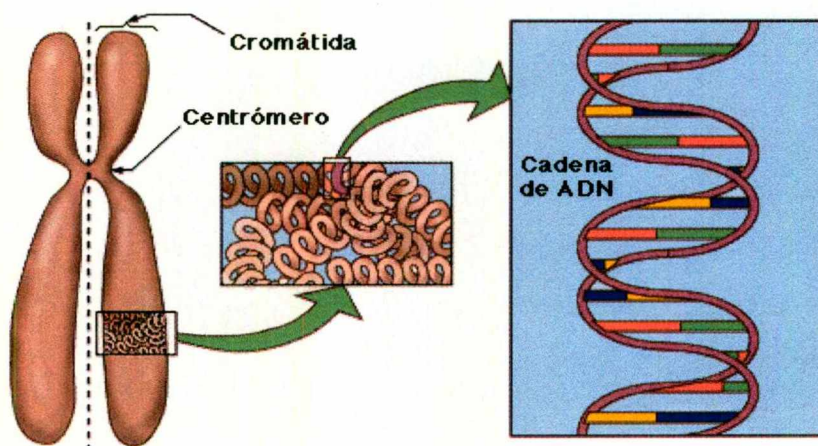


Figura 2. Partes de un cromosoma. El cromosoma está compuesto de ADN y consta de dos cromátides y un centrómero (Bort y col., 2004).

El cariotipo es la presentación de los cromosomas tal y como se observan al microscopio. El ordenamiento de los cromosomas de acuerdo con su tamaño y con la localización del centrómero se llama cariograma. Los cromosomas humanos se han ordenado en siete grupos que se designan por letras. El grupo A son los cromosomas más grandes del cariotipo e incluye a los pares 1, 2 y 3, el 1 y 3 son metacéntricos, mientras que el 2 es submetacéntrico. El grupo B comprende los pares 4 y 5 que son submetacéntricos y de morfología muy similar. En el grupo C se encuentran los pares cromosómicos autosómicos 6 al 12 que son submetacéntricos; por su tamaño se incluye en este grupo al gonosoma X. Al grupo D corresponden los pares 13, 14 y 15 los cuales son acrocéntricos y presentan satélites en sus brazos cortos. Al grupo E forman parte los pares 16, 17 y 18, submetacéntricos, pero el 16 presenta su centrómero un poco más hacia la parte media. En el grupo F están los pares cromosómicos 19 y 20 que son metacéntricos pequeños. El grupo G está integrado por los pares 21 y 22 que son los más pequeños del cariotipo, acrocéntricos y con satélites. Se incluye por su tamaño al gonosoma Y, que carece de satélites (Figura 3) (Salamanca, 1990).

Recientemente ha sido posible identificar con precisión cada uno de los pares cromosómicos que constituyen el cariotipo gracias a procedimientos conocidos como técnicas de bandeo. Los cromosomas aparecen constituidos por una secuencia de segmentos claros y oscuros o fluorescentes y no fluorescentes que forman las denominadas bandas. Estas técnicas han permitido establecer correlaciones más precisas entre los síndromes clínicos dismorfológicos y las alteraciones cromosómicas (Salamanca, 1990).

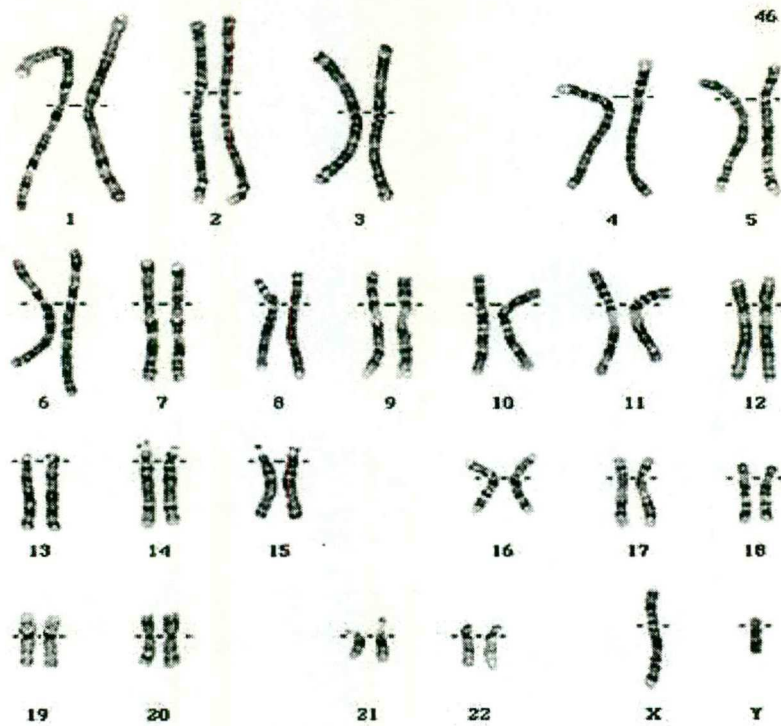


Figura 3. Cariotipo con Bandas G. Clasificación de los cromosomas de acuerdo a su tamaño y a la posición del centrómero. Los cromosomas están enumerados del 1 al 22 e independientemente son nombrados los cromosomas sexuales X y Y (Sánchez, 2004).

III. HIPÓTESIS

El cloruro de cobre induce cambios en los cromosomas de linfocitos humanos de sangre periférica.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Determinar el efecto clastogénico del cloruro de cobre en los cromosomas de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica.

IV.2 Específicos

- Implementar el cultivo de linfocitos humanos y la observación de metafases.
- Realizar una curva concentración-respuesta clastogénica para determinar la cantidad de cloruro de cobre que debe administrarse para obtener el mayor efecto.
- Comparar los efectos obtenidos con el cloruro de cobre con la Mitomicina C que es un clastógeno conocido.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

Gasas de algodón esterilizadas marca Curapak., Lámpara de alcohol marca Pirex, Guantes de látex marca Ambiderm confort, Cubre bocas marca VWR, Tubos de ensayo fondo cónico con tapa rosca de 15 ml marca Falcón, Pipetas serológicas de 5 ml y 10 ml desechables estériles marca Falcón, Vasos de precipitado de 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml marca Pirex y Kimax, Jeringas de insulina de 1ml estériles de marca B-D, Jeringas de 60 ml estériles de marca Terumo, Membrana millipore 0.20 μm Minisart marca Santorius, Pipetas Pasteur de vidrio longitud 9" marca Corning, Portaobjetos de 24 X75 mm marca Lauka, Eppendorf 0.5 ml y 1ml marca Physio Care, Pinzas marca Fontax.

V.1.1 Equipo

Campana de flujo laminar Labconco marca Delta Series, Incubadora de Hibridación marca Cole Parmer, Centrífuga Allegra 64-R marca Beckman Coulter, Microscopio óptico con sistemas de fase marca Zeiss.

V.1.2 Reactivos

Suero fetal de Ternera 100 ml marca Gibco, Antibiótico Penicilina-Streptomina, Fitohemaglutinina, Medio Ham F10 (Mezcla de nutrientes)+ L Glutamina, Karyo Max Giemsa R66 y Karyo Max Colcemid Solución 10 $\mu\text{g/ml}$ marca Gibco, Alcohol etílico absoluto anhidro, Ácido acético glacial 100%, KH_2PO_4 al 0.3 M solución preparada con Fosfato de potasio monobásico cristal (KH_2PO_4), Potasio cristales, Citrato de sodio cristales y Na_2HPO_4 al 0.3 M solución preparada con Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) marca J.T. Backer, Acetato de sodio anhidro grado reactivo (AS) marca USB; Metanol y Cloruro de sodio marca Fermont,

Mitomicina C (MMC) marca Sigma, Aceite de inmersión 7.4 cc marca Cargille, Cloruro de cobre marca Merck.

V.2 Métodos

V.2.1 Toma de muestra

Las muestras de sangre periférica se tomaron en condiciones asépticas y se colocaron en un tubo con heparina como anticoagulante y se etiqueta con los datos del paciente. Las muestras se obtuvieron tanto de hombres como de mujeres ya que el sexo no interfiere en nuestro estudio.

V.2.2 Siembra

Se encendió la campana de flujo laminar y se practicó la asepsia con gasas impregnadas de alcohol de 96°, se dejó encendida la campana por 30 minutos. Los reactivos que se utilizaron se pusieron a temperatura ambiente dentro de la campana.

En tubos para centrífuga se colocaron 9 ml de medio de cultivo HAM-F10 y se les adicionó 0.1 ml de antibiótico (preparado con 10,000 unidades/ml de penicilina G sódica y 10,000 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomicina en 0.85% de salina), a la mezcla obtenida se le adicionó una alícuota de 1 ml de Suero Fetal de Ternera quedando al 10%, 13 gotas equivalente a 500-600 μl de sangre periférica con una pipeta de 10 ml desechable estéril y una alícuota de 0.1 ml de fitohemaglutinina. Los tubos se homogenizaron cada vez que se adicionaba un reactivo. El blanco se preparó colocando todos los reactivos antes mencionados sin la muestra de sangre. En el tubo del control negativo se colocaron todos los reactivos sin el tratamiento. En el tubo del control positivo se colocaron todos los reactivos y el volumen necesario de Mitomicina C (se disolvieron 2 mg en 20 ml de agua estéril) para hacer la curva de

concentración respuesta. A los tubos problema se les adicionó 0.4, 0.8 ó 1.2 ml de solución de cloruro de cobre a una []= 200 µg/ml en lugar de la MMC. Los tubos se incubaron a 37°C durante 72 horas.

V.2.3 Cosecha

Una vez transcurridas las 72 horas de incubación, en la Campana de Flujo Laminar se le adicionaron 20 µl de colchicina a una concentración de 10 µg/ml, dejándola actuar por 20 minutos a 37° C. Al cabo de dicho tiempo se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 1200 RPM, a temperatura ambiente, con una pipeta Pasteur se eliminó el sobrenadante dejando la cantidad suficiente más o menos 1.5-2.0 ml de líquido para resuspender el botón.

Posteriormente se les adicionó la solución hipotónica la cual consistió en una mezcla de una solución de Citrato de Sodio al 0.4% y una solución de Cloruro de Potasio al 0.4% en una proporción 1:1 (se requirieron 6 ml de hipotónica para cada cultivo por lo que se colocaron 3 ml de cada solución), previamente calentada a 37°C.

Se resuspendió el botón celular suavemente, dejándose actuar por 8 minutos a 37°C. Al término de éste tiempo, inmediatamente se adicionó el fijador (metanol-ácido acético en proporción 3:1), hasta que la solución se tornó obscura, se homogenizó completamente con la pipeta Pasteur.

Los tubos se sacaron del baño maría y se centrifugaron por 10 minutos a 1200 RPM a temperatura ambiente. Al término de los 10 minutos, se eliminó el sobrenadante de cada tubo con una pipeta Pasteur dejando solo el botón celular. Se adicionó el fijador hasta la marca de 6 ml, el botón se dispersó en el fijador lentamente con la pipeta. Este paso se realizó las veces necesarias hasta obtener un botón y un sobrenadante transparente. Después de obtener el botón limpio se

eliminó el sobrenadante, dejando una mínima cantidad del mismo para homogenizar el botón celular.

Para la elaboración de las laminillas se utilizó un portaobjetos previamente lavado y desengrasado, dejándose caer una gota del botón a una distancia de 2 metros de altura. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizó una tinción homogénea, el colorante utilizado se preparó con 3 ml del colorante Giemsa, 1.5 ml de cada buffer A y B y 25 ml de agua destilada. El colorante Giemsa se compró ya preparado a los distribuidores autorizados. El buffer A se preparó para medio litro de agua estéril con 22.65 g de KH_2PO_4 al 0.3M y el buffer B para medio litro de agua estéril con 29.66 g de Na_2HPO_4 al 0.3 M.

El primer paso de la tinción fue sumergir las laminillas en una solución de cloruro de sodio al 0.9% durante 1 minuto (hidratar), después se sumergieron en el colorante recién preparado durante 3 minutos (tinción), se enjuagaron ligeramente con agua de la llave por un instante (quitar el colorante excedente) y se pusieron a secar al medio ambiente.

Una vez secas se observaron al microscopio para documentar los resultados, llevando a cabo una comparación de los cambios clastogénicos del tipo Gaps de las muestras problema con el control.

V.3 Diseño Experimental

Se trabajó con 5 grupos, cada grupo constó de dos tubos para su cultivo con linfocitos, dando un total de 10 tubos. Se preparó una solución de cloruro de cobre a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. La solución se realizó colocando 10 mg de cloruro de cobre en 50 ml de agua destilada estéril. De esta solución, se tomó la cantidad necesaria para colocar en cada tubo la cantidad correspondiente como se muestra a continuación.

Cuadro1. Diseño experimental. Se dan a conocer los volúmenes y las concentraciones de la solución de cloruro de cobre que se colocaron en cada grupo experimental.

Grupos	Volumen (ml) de Solución de CuCl_2 a $[\]= 200 \mu\text{g/ml}$	Concentración de CuCl_2 en el tubo de cultivo ($\mu\text{g/ml}$)
Control negativo	0	0
Control positivo	0	0
Tratamiento 1	0.4	8
Tratamiento 2	0.8	16
Tratamiento 3	1.2	24

Para el control positivo se hizo una curva de concentración-respuesta para determinar la concentración adecuada de Mitomicina C.

Cuadro 2. Concentración respuesta de MMC. Se muestran los volúmenes y las concentraciones de MMC utilizadas para encontrar la concentración adecuada para la observación de alteraciones cromosómicas.

Tratamientos de MMC	Volumen (ml) de MMC a una []= 100 µg/ml	Concentración de MMC en el tubo de cultivo (µg/ml)
Tratamiento 1	1	10
Tratamiento 2	0.5	5
Tratamiento 3	0.1	1
Tratamiento 4	0.05	0.5

Encontrándose que en las concentraciones de 10 y 5 µg/ml las metafases obtenidas eran no analizables. En las concentraciones de 1 y 0.5 µg/ml si había metafases analizables y se observaban daños cromosómicos, utilizándose la concentración de 1 µg/ml para nuestro estudio ya que esta mostraba una mayor cantidad de alteraciones siendo lo más adecuado para nuestro propósito.

V.4 Método Estadístico

La prueba estadística que se utilizó para comparar medias y determinar si hay diferencia significativa entre los grupos fue la de ANOVA de una vía (Análisis de Varianza) y la prueba de Dunnett que se obtiene a partir del ANOVA, realizadas ambas en el programa The Statistical Discovery Software (JMP).

La idea básica de un análisis de varianza (diseño completo al azar) consiste en expresar una medida de la variación total de un conjunto de datos como una suma de cuadrados total ($SCTotal$) de las diferencias entre cada valor obtenido de la aplicación del tratamiento y el promedio total $\bar{y}_{..}$, que se puede atribuir a fuentes o causas específicas de variación, como los tratamientos a los que se someten algunas unidades de experimentación $\bar{y}_{i.}$ y la variación debida a causas aleatorias (error) (Manning, 1989).

La siguiente ecuación representa el análisis de varianza:

$$SCTotal = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2 = n \sum_{i=1}^k (\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{..})^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_{i.})^2$$

Que se puede interpretar como la $SCTOTAL = SCTratamientos + SCError$. Para saber si hay diferencia entre las medias obtenidas de los distintos tratamientos aplicados, se considera probar la hipótesis nula de la igualdad de todas las medias $\mu_1, \mu_2, \mu_3, \dots, \mu_k$ obtenidas de k poblaciones que se distribuyen Normalmente, suponiendo que estamos interesados en una prueba tal que permita saber si alguna de las medias es diferente.

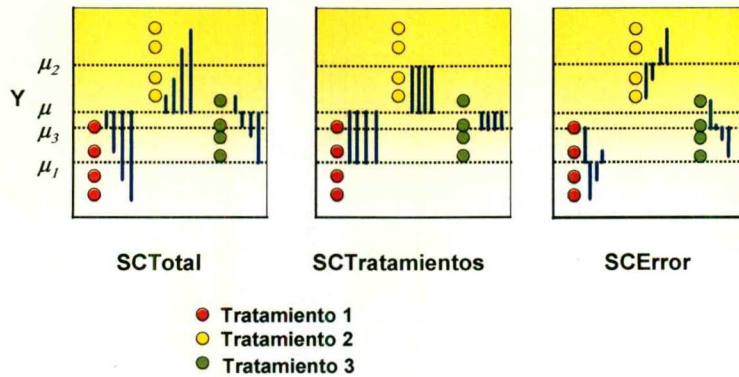


Figura 4. Análisis de Varianza. Ejemplo de caso de la partición de la suma de cuadrados total en un Análisis de Varianza completo al azar, donde se aplican tres tratamientos (Walpole y Myers, 1992).

La prueba estadística apropiada puede ser encontrada estimando la variación debida a los tratamientos aplicados de manera independiente; esto es la varianza entre los tratamientos y compararla contra la varianza obtenida dentro de cada tratamiento, suponiendo que estos tienen igual varianza, mediante una prueba F de Fisher con un nivel de significancia α preestablecido y los grados de libertad asociados al numerador y al denominador, respectivamente.

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots \mu_k$$

Ha : UNA O MÁS PARES DE MEDIAS SON DIFERENTES

$$SCTratamientos = n \sum_{i=1}^k (\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{..})^2$$

$$\hat{\sigma}_{Tratamiento}^2 = \frac{SCTratamiento}{(k-1)}$$

$$SCError = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_{i.})^2$$

$$\hat{\sigma}_{Error}^2 = \frac{SCError}{(n-k)}$$

$$F = \frac{\hat{\sigma}_{Tratamiento}^2}{\hat{\sigma}_{Error}^2}$$

La prueba de Dunnett es necesaria con frecuencia en el experimento para comparar simultáneamente cada tratamiento con un control, determinar las diferencias significativas entre cada media del tratamiento y el control, con un solo nivel de significancia α .

Para realizar la prueba de Dunnett es necesario que existan dos o más tratamientos, y se utiliza un tratamiento como control. En general lo que se desea probar en ésta prueba es:

$$\left. \begin{array}{l} H_0: \mu_0 = \mu_i \\ H_1: \mu_0 \neq \mu_i \end{array} \right\} i = 1, 2, \dots, k,$$

Donde μ_0 representa el rendimiento promedio para la población de mediciones en la cual se utiliza el control. Por lo que las suposiciones usuales del análisis de varianza tienen que ser válidas para probar la hipótesis nula especificada por H_0 contra la alternativa bilateral para una situación donde existen k tratamientos, sin incluir el control y n observaciones por tratamiento, primero se calculan los valores:

$$d_i = \frac{y_i - y_0}{\sqrt{\frac{2s^2}{n}}}$$

La varianza muestral s^2 se obtiene del cuadrado medio del error en el análisis de varianza. El régimen crítico para rechazar H_0 , a nivel de significancia α , se establece por la desigualdad:

$$|d_i| > d_{\alpha/2}(k, v),$$

Donde v es el número de grados de libertad para el cuadrado medio del error. Los valores de la cantidad $d_{\alpha/2}(k, v)$, para una prueba de dos colas se dan en tablas para $\alpha = 0.05$ como nivel conjunto de significancia (Walpole y Myers, 1992).

VI. RESULTADOS

Se estudiaron 5 grupos diferentes, control negativo, control positivo y grupos de 8 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$ y 24 $\mu\text{g/ml}$ de cloruro de cobre. En cada uno de los grupos se estudiaron 90 metafases.

VI.1 Grupo control negativo. Se estudiaron las alteraciones cromosómicas espontáneas de 90 metafases en total por los 3 experimentos. En las 90 metafases se encontraron 4 Gaps (1.33 ± 0.33 ee) (Cuadro 3). El resto de las metafases se observaron normales (figura 5 y 6).

Cuadro 3. Control negativo. Se muestran los daños espontáneos encontrados en el control negativo.

	1° Experimento	2° Experimento	3° Experimento	Total	Media \pm ee
Metafases analizadas	30	30	30	90	30 ± 0
Normales	28	29	29	86	28.66 ± 0.33
Anormales	2	1	1	4	1.33 ± 0.33
Gaps	2	1	1	4	1.33 ± 0.33

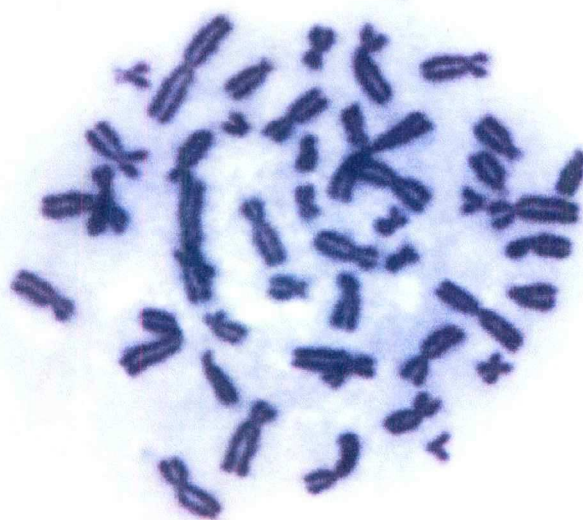


Figura 5. Metafase del grupo control negativo. En la cual los cromosomas están tal y como se observan al microscopio, esparcidos y sin ordenar.

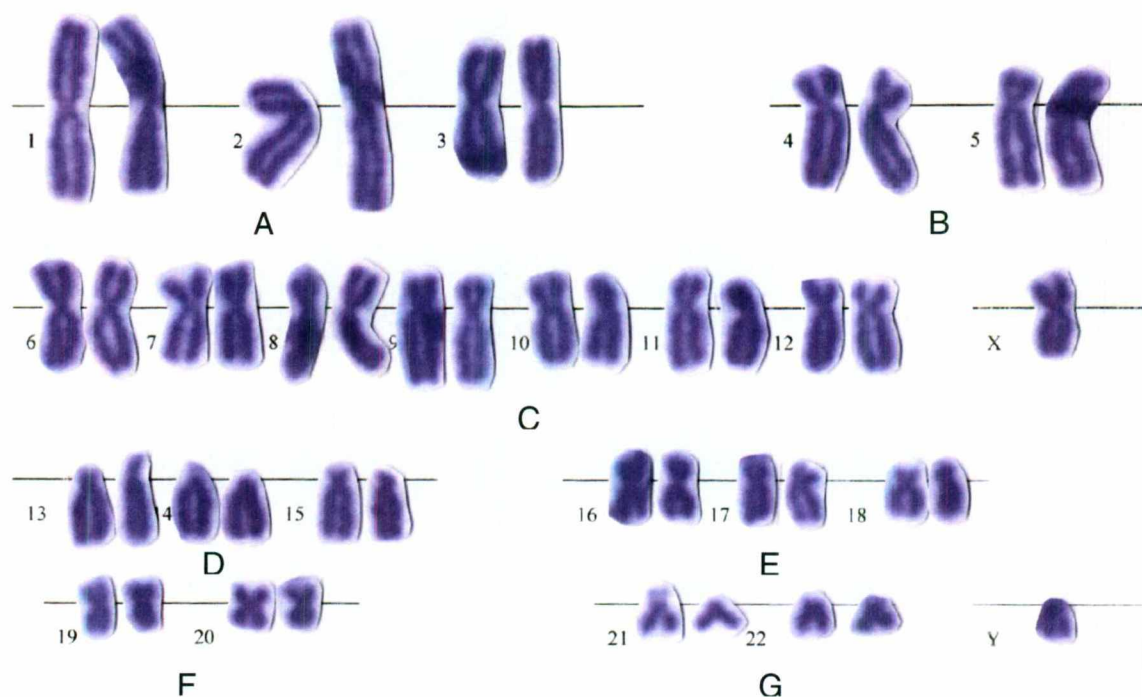


Figura 6. Célula del control negativo. Se observan todos los cromosomas normales clasificados por grupo.

VI.2 Grupo control positivo. Este grupo se estudió con la finalidad de observar los cambios inducidos por la Mitomicina C a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Se presentaron Gaps (6.33 ± 1.33 ee) en los cromosomas pertenecientes a los grupos A y C, y aneuploidías (4.66 ± 1.20 ee) en los cromosomas que pertenecen a los grupos A, C y D (Cuadro 4) (Figura 7).

Cuadro 4. Control positivo. Se observa el efecto clastogénico producido por la Mitomicina C.

	1° Experimento	2° Experimento	3° Experimento	Total	Media \pm ee
Metafases analizadas	16	16	16	48	16 ± 0
Normales	3	7	8	18	6 ± 1.52
Anormales (gaps y aneuploidías)	13	9	8	30	10 ± 1.52
Gaps	9	5	5	19	6.33 ± 1.33
Aneuploidías	7	4	3	14	4.66 ± 1.20

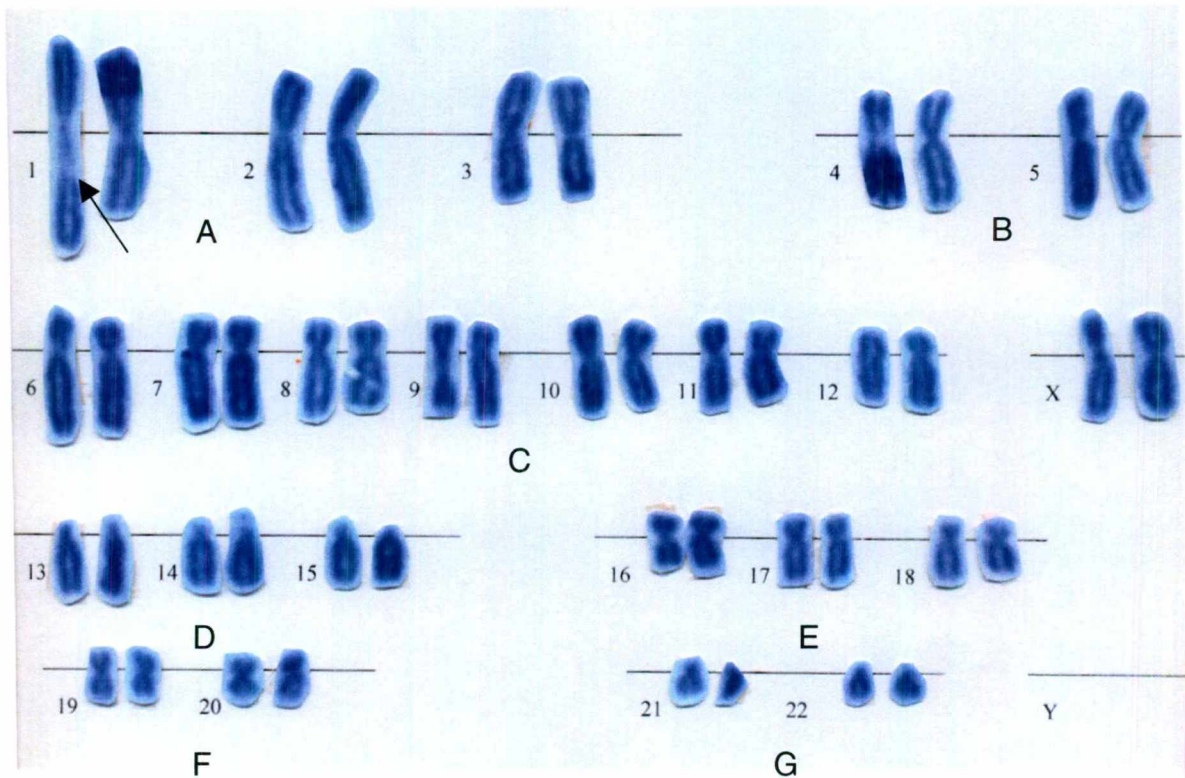


Figura 7. Célula del grupo con Mitomicina C. Se observa un Gap en un cromosoma del grupo A.

VI.3 Tratamientos

Para llegar a la concentración aplicada en los diferentes tratamientos se realizó una curva concentración respuesta en base a los niveles de cloruro de cobre sanguíneos reportados para humanos, las concentraciones utilizadas fueron 4X, 8X, 12X, donde número de veces X = 2 μg que es equivalente a la concentración sanguínea humana por ml (Murray y Granner, 1994). La última concentración que se usó para este trabajo es la máxima a la cual se conservaron las metafases para ser analizadas; las cantidades mas altas evitaron la observación de los cromosomas.

VI.3.1 Grupo con 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloruro de cobre. Esta concentración es equivalente a cuatro veces la concentración de cobre en sangre/ml en el ser humano. Las alteraciones cromosómicas observadas a esta dosis fueron Gaps (6.66 \pm 0.88 ee)

apareciendo en cromosomas de los grupos A y C y una deleción en un cromosoma del grupo E (0.33 ± 0.33) (Cuadro 5) (Figura 8). Esta dosis fue significativamente diferente ($P < 0.0001$) comparada con el control negativo.

Cuadro 5. Primera dosis de cloruro de cobre. Se muestra el daño producido por el cloruro de cobre en su dosis más baja.

	1° Experimento	2° Experimento	3° Experimento	Total	Media \pm ee
Metafases analizadas	30	30	30	90	30 ± 0
Normales	22	24	23	69	23.33 ± 0.88
Anormales	8	6	7	21	7 ± 0.57
Gaps	8	5	7	20	6.66 ± 0.88
Deleciones	0	1	0	1	0.33 ± 0.33

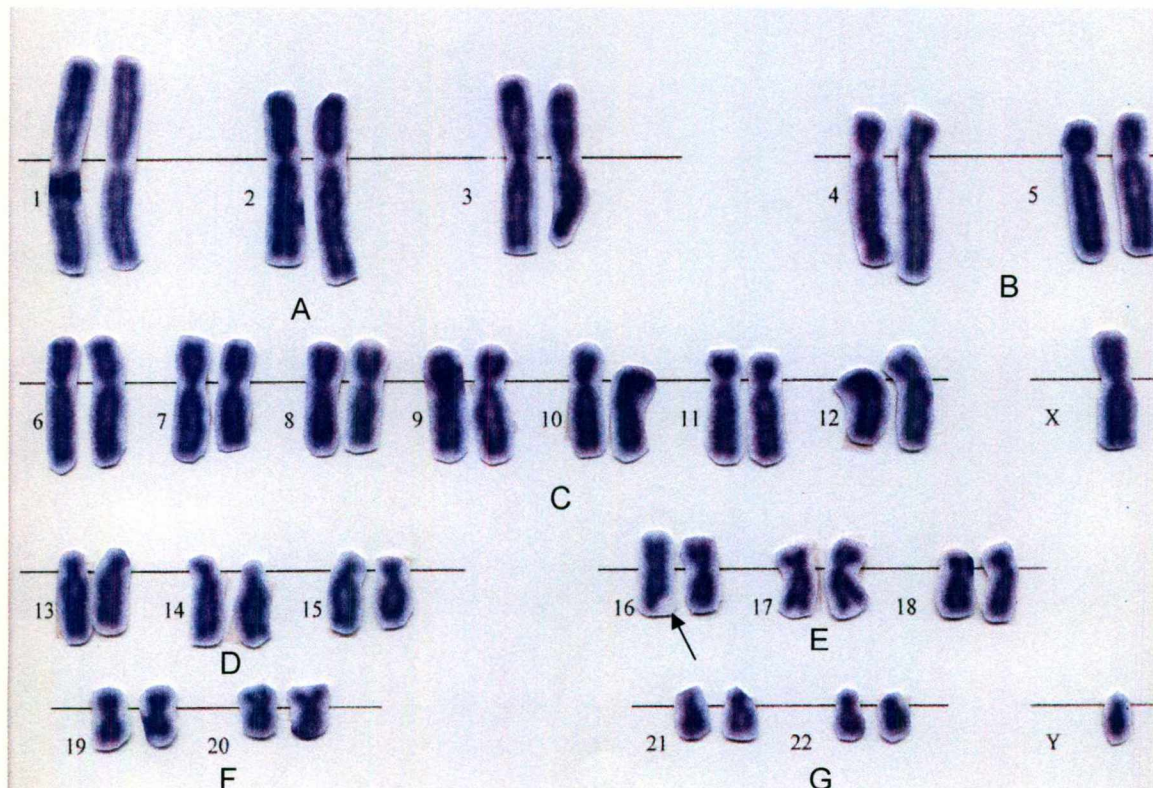


Figura 8. Célula del grupo tratado con 4 veces la concentración sanguínea humana de cloruro de cobre. Se observa una cromátide delectada de un cromosoma del grupo E.

VI.3.2 Grupo con 16 µg/ml de cloruro de cobre. Esta concentración es equivalente a ocho veces la concentración de cobre en sangre/ml en el ser humano. La alteración cromosómica encontrada en esta dosis fueron los Gaps (9.33 ± 0.66 ee) observándose en los cromosomas de los grupos A, B y C (Cuadro 6) (Figura 9). Los resultados de este tratamiento indican una diferencia significativa ($P < 0.0001$) en comparación con el control negativo, pero no con el tratamiento 1 que es el equivalente a 4 veces la concentración normal del cobre en sangre/ml.

Cuadro 6. Segunda dosis de cloruro de cobre. Se muestran el número de Gaps encontrados en las células de la segunda dosis de cloruro de cobre.

	1° Experimento	2° Experimento	3° Experimento	Total	Media \pm ee
Metafases analizadas	30	30	30	90	30 ± 0
Normales	20	22	20	62	20.66 ± 0.66
Anormales	10	8	10	28	9.33 ± 0.66
Gaps	10	8	10	28	9.33 ± 0.66

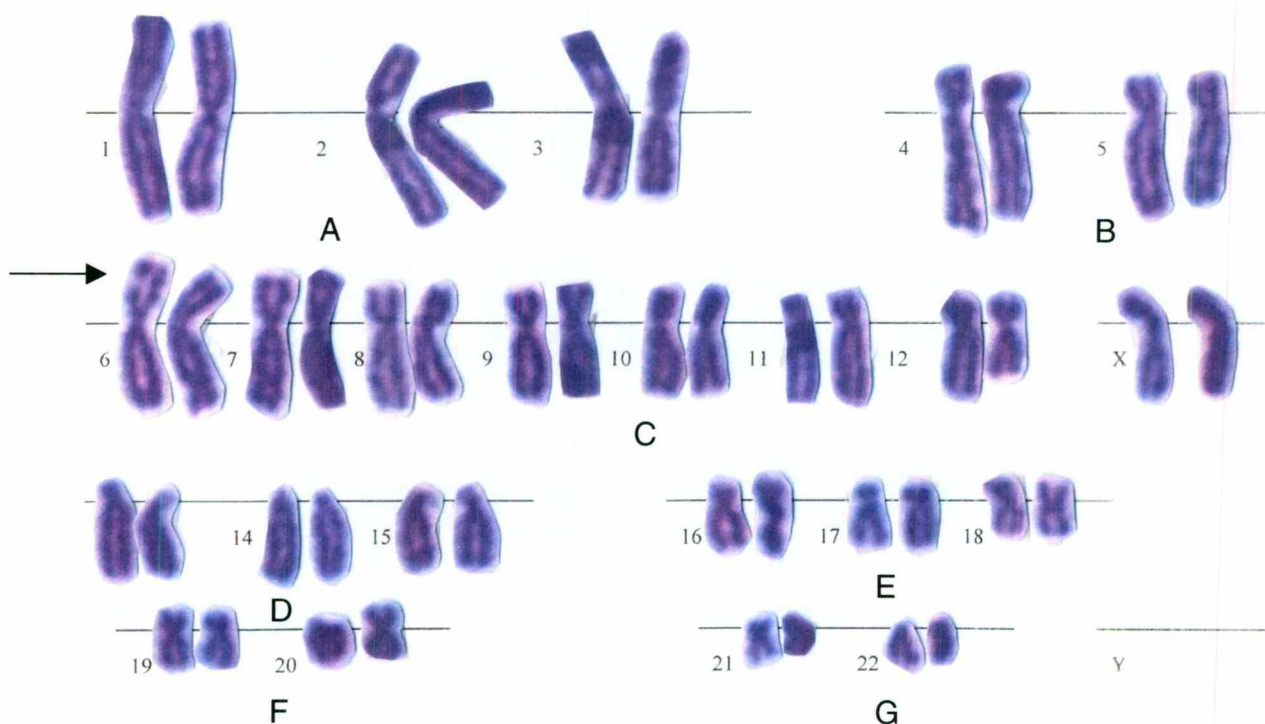


Figura 9. Célula correspondiente al grupo tratado con 8 veces la concentración sanguínea humana de cloruro de cobre. Se muestra un Gap en un cromosoma del grupo C.

VI.3.3 Grupo con 24 µg/ml de cloruro de cobre. Esta concentración es equivalente a doce veces la concentración de cobre en sangre/ml en el ser humano. Durante el análisis de las metafases en esta dosis se encontraron Gaps (13.33±0.88 ee) en los cromosomas de los grupos A y B; una posible translocación entre dos cromosomas del grupo C que forman un dicéntrico pero esta alteración se confirmaría con una tinción de bandeado (Cuadro 7) (Figura 10). Esta dosis muestra una diferencia significativa (P< 0.0001) en comparación con el control negativo, con el tratamiento con 8 µg/ml de cloruro de cobre que es el correspondiente a 4 veces la concentración de cobre en sangre/ ml, y en comparación con el tratamiento con 16 µg/ml de cloruro de cobre correspondiente a 8 veces la concentración de cobre en sangre/ ml.

Cuadro 7. Tercera dosis de cloruro de cobre. Se presenta el daño ocasionado por la dosis más alta de cloruro de cobre.

	1° Experimento	2° Experimento	3° Experimento	Total	Media ± ee
Metafases analizadas	30	30	30	90	30 ± 0
Normales	17	18	15	50	16.66±0.88
Anormales	13	12	15	40	13.33 ± 0.88
Gaps	13	12	15	40	13.33 ± 0.88

Los resultados obtenidos en los grupos tratados con cloruro de cobre muestran que son significativamente diferentes de el control negativo (P< 0.0001). El cloruro de cobre indujo significativamente aberraciones cromosómicas *in vitro* en linfocitos de sangre periférica en las diferentes dosis utilizadas.

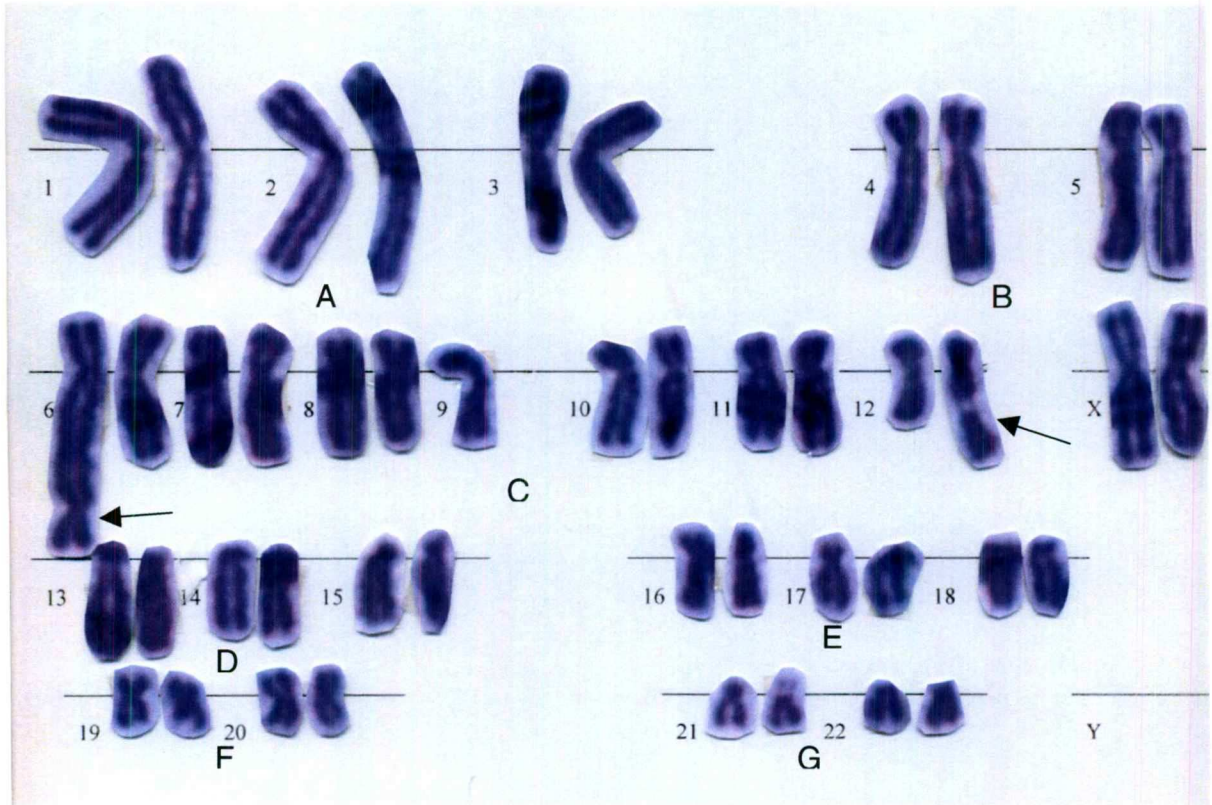


Figura 10. Célula del grupo tratado con 12 veces la concentración sanguínea humana de cloruro de cobre. En la cual se muestra un cromosoma dicéntrico formando por dos cromosomas del grupo C y un Gap en un cromosoma del mismo grupo.

Se realizó una comparación entre los promedios de las metafases donde se observaron anomalías en cada grupo (Figura 11).

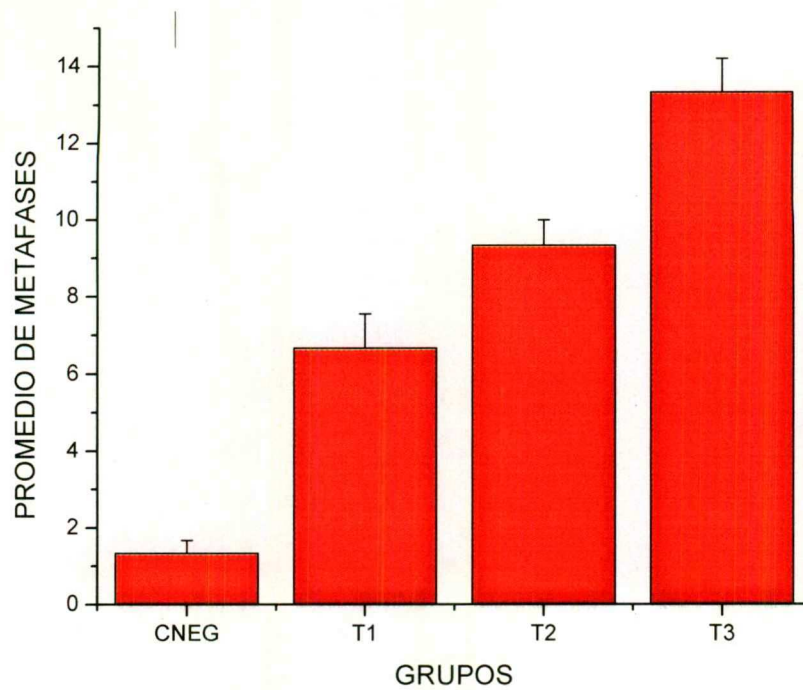


Figura 11. Gráfica de metafases con anomalías. Se muestra el promedio de las metafases donde se encontraron alteraciones en los cromosomas de cada grupo y sus respectivos errores estándar. Para el control negativo 1.33 ± 0.33 ee, tratamiento 1 ($8 \mu\text{g/ml}$) de CuCl_2 7 ± 0.57 ee, tratamiento 2 ($16 \mu\text{g/ml}$) de CuCl_2 9.33 ± 0.66 ee, tratamiento 3 ($24 \mu\text{g/ml}$) de CuCl_2 13.33 ± 0.88 ee.

VII. DISCUSIÓN

Las alteraciones encontradas en el control negativo pueden estar asociadas a que los cromosomas están expuestos a la acción de agentes ambientales mutagénicos que los dañan y ocasionan fracturas o rompimientos. Estos agentes pueden ser: a) de naturaleza física como las radiaciones UV b) químicos como los utilizados en quimioterapia o en armas nucleares o c) biológicos como los virus.

Los cambios cromosómicos pueden ser reparados por mecanismos celulares que tratan de subsanar el daño, como por ejemplo el mecanismo de prevención de errores, el cual neutraliza los compuestos dañinos antes de que reaccionen con el DNA, lo hace por medio de la detoxificación de los radicales libres superóxidos producidos en el DNA por daño oxidativo en el cual la dismutasa del superóxido cataliza la conversión de los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y la catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua. Otro mecanismo de reparación del daño es revirtiéndolo generando así la base original, aunque esto no siempre es posible debido a que algunos tipos de daños son irreversibles. Otra forma de reparar es por medio de las transferasas de grupo alquilo las cuales revierten directamente las lesiones retirando los grupos alquilo que se hayan añadido a las posiciones O-6 de la guanina, también existe un sistema de reparación por escisión el cual rompe un enlace fosfodiéster a cada lado de la lesión en la misma cadena produciendo la escisión de un oligonucleótido, generándose un hueco que se rellena por síntesis reparadora y queda sellado por una ligasa. Otra forma de reparar las lesiones es haciéndolo después de la replicación y a esto se le llama reparación postreplicativa en las cuales se reconocen las bases mal emparejadas, se determina cual de las dos bases es la incorrecta, se corta y se rellena el hueco por síntesis reparadora. Sin embargo las anomalías se presentan cuando dichos mecanismos de reparación son insuficientes (Salamanca, 1990; Griffiths y col., 1999; Alberts y col., 2005). Las alteraciones espontáneas encontradas se pudieron presentar por las condiciones

ambientales en las que se encontraban las células, por esto todos los cultivos se mantuvieron en condiciones iguales y óptimas para su desarrollo.

En el grupo control positivo se analizaron un total de 48 metafases tratadas con Mitomicina C (MMC), se hizo una curva concentración-respuesta de Mitomicina C para llegar a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ que fue la concentración donde se observaron daños cromosómicos como Gaps y aneuploidías, que nos servirían para compararlos con nuestros grupos tratados. Las concentraciones mayores a 1 $\mu\text{g/ml}$ no fueron tomadas en cuenta puesto que las metafases no eran analizables. La MMC está compuesta por un grupo quinónico unido a un grupo indólico y dos grupos laterales muy lábiles, un metoxiformamido y un anillo de aziridina. Los daños observados podrían ser originados por su mecanismo de acción en el organismo que es activado por reducción de la quinona o por la transferencia de productos reactivos intermedios con capacidad alquilante (Flórez, 2000), los cuales no se incorporan directamente al DNA sino que provocan alteraciones de las bases que inducen errores específicos de emparejamiento, donde forma puentes cruzados por asociación a la posición 6 del oxígeno de la guanina, pudiendo también actuar en la modificación de las bases de los nucleótidos que se incorporan durante la síntesis de DNA. Otra razón por la cual se observa un número considerable de lesiones en el DNA es que el mecanismo de reparación llevado a cabo por las transferasas de grupo alquilo no sea suficiente para reparar el daño ocasionado, ya que al tener un nivel alto de alquilación este sistema se satura esto ocurre cuando la enzima trasfiere el grupo metilo de la O-metil-guanina a un residuo cisteína de la proteína (Griffiths y col., 1999).

Los resultados obtenidos en este estudio con la MMC son consistentes con los obtenidos por Becerril y colaboradores en 1999 quienes utilizaron a la MMC como control positivo a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ obteniendo alteraciones cromosómicas. En nuestro estudio no se utilizó esta concentración puesto que no se observaban las alteraciones cromosómicas suficientes para poderlas comparar

con nuestros grupos tratados. También fueron consistentes nuestros resultados con los de Vijayalaxmi y colaboradores en 1996 donde obtuvieron alteraciones cromosómicas al tratar los linfocitos de sangre periférica con MMC a una concentración de 10^{-7} M. La clastogenicidad de la MMC encontrada en nuestro trabajo, también es observada por Milic y Kopjar en el 2004; por Zhang y colaboradores en el 2002 y por Fishman y Kelly en 1999, quienes mostraron que la MMC causa daño al material genético y que incluso en combinación con bleomicina, con radiaciones de microondas de baja intensidad (2450- MHZ) y con el estrés respectivamente, crea un sinergismo ocasionando un aumento del daño al DNA. Sin embargo también se ha encontrado que existen sustancias que disminuyen el efecto genotóxico de la MMC como lo son el ácido húmico leonardito y los isocianatos (Ferrara y col., 2006; Fimognari y col., 2005).

El Gap se presenta cuando hay una ausencia o discontinuidad en una o más bases nitrogenadas de alguna de las hebras del DNA duplicado, cuando se tiñe esta región tiene poca coloración y podría ser confundida con una fractura cromosómica, para que una lesión sea clasificada como Gap es necesario que toda la lesión tenga un menor grosor al de la cromátide, en algunas ocasiones cuando se da la lesión cromatídica se observa un delgado filamento de cromatina que conecta los segmentos proximal y distal al Gap. Un Gap se produce en los cromosomas ya replicados o sea que se encuentran en la fase G2 del ciclo celular que es el tiempo que hay entre la duplicación del DNA y el inicio de la mitosis (Martínez y Folle, 2006).

Los Gaps observados pudieron ser causados por la interferencia del cobre directamente sobre las bases nitrogenadas causando desestabilización de la estructura del DNA y posteriormente su rompimiento. Otra posibilidad puede asociarse a que los niveles altos del cobre provocaron un incremento en la formación de radicales libres (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) quienes causan daño al DNA (Saleha, 2004; Griffiths y col., 1999). Los cambios citogenéticos también pudieron deberse a que el cobre alteró la función de algunas enzimas que interfieren en la

síntesis y en el sistema de reparación del DNA como los son las ligasas, polimerasas de reparación y polimerasas antimutadoras (Salamanca, 1990) o bien que dañe la membrana celular ocasionando la fuga de enzimas importantes relacionadas con el DNA. Otra posibilidad para los cambios es que el cobre cause alguna alteración en la expresión de genes que codifican para la síntesis de enzimas específicas para la formación de DNA induciendo los Gaps.

Generalmente el cobre en las estructuras complejas metal-DNA-purinas, se une en N5 en el anillo de imidazol, en N7 y N9 y también en la posición N3 (en algunos complejos de la adenina) y en la N1 de la pirimidina. El daño en la estructura del DNA pudo ser ocasionado por la unión del cobre a la posición N7 perturbando las uniones del nitrógeno y los iones metálicos. Al reaccionar con estos sitios causaron un rompimiento de las uniones de los hidrógenos, desestabilizando la estructura del DNA ocasionando posteriormente su rompimiento (Saleha, 2004).

Los metales de transición como lo es el cobre, en concentraciones permisibles estabilizan la estructura de DNA a través de uniones de fosfatos, pero concentraciones altas desestabilizan la estructura, rompiendo base a base las uniones de hidrógeno (Saleha y col., 2004). Pudiendo ser este otro mecanismo de acción que causara los Gaps en las células observadas en nuestro estudio donde el cobre se utilizó en altas concentraciones.

El cobre une a las bases con los fosfatos en el DNA y exhibe una alta afinidad especialmente a las pares de bases G-C (guanina-citosina), cuando se presenta en exceso conduce al rompimiento del DNA (Saleha y col., 2004) y probablemente los Gaps observados en su mayoría en un mismo cromosoma, sean porque en ese cromosoma contiene una mayor cantidad de pares de bases G-C, siendo éstos puntos débiles y haciéndolos más propensos a la acción del cobre.

Nuestro estudio indica que todas las dosis de CuCl_2 inducen daño al DNA *in vitro* en linfocitos humanos, nuestros resultados son consistentes con los obtenidos por

Villela y colaboradores en el 2006 quienes observaron que el cobre a concentraciones de 3.75, 7.50, 15.00 y 20.00 $\mu\text{g/ml}$ causa daño al DNA en hemocitos de la especie *mussel de Limnoperna fortunei*. También coinciden con los resultados obtenidos por Shubber y colaboradores en 1998 quienes al medir el nivel de cobre en plasma en mujeres que usaron el anticonceptivo intrauterino (DIU) por más de 24 meses, observaron un nivel más alto de cobre que en el plasma de mujeres que no lo usaron, encontrando también aberraciones cromosómicas en los linfocitos de sangre periférica de las mujeres que usaban el DIU, siendo esto también consistente con Burgeot y colaboradores en 1995; con Bhunya y Jena en 1996; y con Dzhokhadze y Lezhava en 1994 quienes analizaron el sulfato de cobre en células de corazón de la ostra *Crassostrea gigas*; en células de sangre periférica y médula espinal de pollo; y en células humanas de un cultivo a largo plazo (*in vitro*, 144 horas) y de individuos mayores (*in vivo*, 80-93 años) respectivamente, encontrando todas alteraciones cromosómicas ocasionadas por el cobre.

Los daños al material genético se incrementan en un nivel alto de cobre, lo cual puede estar asociado a la lesión de metaloenzimas ligadas al cobre como la ceruloplasmina, la Cu/Zn superóxido dismutasa, la citocromo-c-oxidasa, la lisil oxidasa, etc.. Probablemente al haber un exceso de cobre, la función de las metaloenzimas halla sido alterada por el rompimiento de estas proteínas o bien inhibiéndolas al cambiar su estructura (Abba y col., 2000; Picco y col., 2001).

También se observó en nuestro estudio que a mayor dosis de cobre mayor frecuencia de aberraciones se encontraban, por lo cual se podría decir que la concentración de cobre es directamente proporcional a su genotoxicidad. Los estudios realizados por Saleha y colaboradores en el 2004; y por Agarwal y colaboradores en 1990 lo corroboran, ya que encontraron un aumento en el rompimiento del DNA determinándolo por el ensayo cometa y un aumento en la presencia de aberraciones cromosómicas en células de médula espinal, al aumentar la dosis de cobre en ratones de experimentación.

Sin embargo los resultados obtenidos por Amara-Mokrane y colaboradores en 1996; y Sarkar y colaboradores en 1996 difieren de nosotros al observar que el cobre presente en la sal sodio-cobre de la clorofila (clorofilina) tiene un efecto protector sobre la acción clastogénica de otros compuestos como la doxorubicina en células de linfocitos humanos y sobre el dicromato de potasio respectivamente. Esto es todo lo contrario a lo que el cobre causó en nuestras células, pero el efecto protector observado por este metal puede ser debido a que la clorofilina además de contener cobre también tiene otras sustancias que en combinación podrían dar lugar al efecto protector visto y por otro lado el dicromato de potasio podría ser inhibido al tener una interacción con el cobre o bien que este metal active enzimas que se encarguen de neutralizar los efectos del dicromato de potasio.

En todas las concentraciones utilizadas de CuCl_2 se observaron algunos cromosomas más largos que otros, esto podría ser a causa de la técnica al realizar las laminillas ya que se puede distorsionar el material genético o bien ser duplicaciones, pero esto último solo se podría asegurar realizando una tinción de bandas. Al igual las translocaciones solo podrían observarse con tinción de bandas que en un trabajo posterior podría realizarse utilizando las mismas concentraciones.

VIII. CONCLUSIONES

- Se implementó el cultivo de linfocitos de sangre periférica así como su análisis al microscopio.
- La MMC a una concentración de $1\mu\text{g/ml}$ causa daño al material genético.
- El cloruro de cobre a las concentraciones de 8, 16 y $24\mu\text{g/ml}$ causa alteraciones cromosómicas sobre los linfocitos de sangre periférica humana.
- La concentración del cloruro de cobre en sangre periférica humana es directamente proporcional a la frecuencia de alteraciones cromosómicas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abba, M., De Luca, C., Mattioli, G., Zaccardi, E., Dulout, F. N. 2000. Clastogenic effect of copper deficiency in cattle. *Mutation Research*. Vol. 466(1): 51-55.

Agarwal, K., Sharma, A., Talukder, G. 1990. Clastogenic effects of copper sulphate on the bone marrow chromosomes of mice *in vivo*. *Mutation Research*. Vol.243(1):1-6.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, L., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2005. *Introducción a la Biología Celular*. 2da. ed., Panamericana, España: 208-211.

Amara-Mokrane, Y. A., Lehucher-Michel, M. P., Balansard, G., Dumenil, G., Botta, A. 1996. Protective effects of alpha-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagénesis*. Vol. 11(2): 161-167.

Becerril, C., Ferrero, M., Sanz, F., Castano, A. 1999. Detection of mitomycin C-induced genetic damage in fish cells by use of RAPD. *Mutagenesis*. Vol. 14(5): 449-56.

Beckman, L., Nordenson, I. 1986. Interaction between some common genotoxic agents. *Human Heredity*. Vol. 36(6): 397-401.

Bort, F., Egea, P., Rubio, C. 2004. www.recursos.cnice.mec.es/.../images/Cromosoma.GIF.

Burgeot, T., His, E., Galgani, F. 1995. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Research*. Vol. 342(3-4): 125-140.

Bhunya, S. P., Jena, G. P. 1996. Clastogenic effects of copper sulphate in chick *in vivo* test system. *Mutation Research*. Vol. 367(2): 57- 63.

Cai, L., Cherian, M. G. 1996. Adaptive response to ionizing radiation-induced chromosome aberrations in rabbit lymphocytes: effect of pre-exposure to zinc, and copper salts. *Mutation Research*. Vol. 369(3-4): 233-241.

- Calderaro, M., Martins, E. A., Meneghini, R. 1993.** Oxidative stress by menadione affects cellular copper and iron homeostasis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 126(1): 17-23.
- Choppin, R. G., Summerlin, L., Jaffe, B., Jackson, L. 1984.** *Química*. 4a. ed., Publicaciones Cultural, México: 454, 456, 457.
- Curtis, H., Barnes, N. 2000.** *Biología*. 6a. ed., Panamericana, España: 271,278-281.
- Dzhokhadze, T. A., Lezhava, T. A. 1994.** Structural mutations of chromosome mutations induced by heavy metal salts during aging in vivo and in vitro. *Genética*. Vol. 30(12): 1630-1632.
- Emsley, J. 2001.** <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-periodica/Cu.htm>.
- Farias, G. 1993.** *Química Clínica*. 10a. ed. Manual Moderno, México: 52.
- Ferrara, G., Loffredo, E., Senesi, N., Marcos, R. 2006.** Humic acids reduce the genotoxicity of mitomycin C in the human lymphoblastoid cell line TK6. *Mutation Research*. Vol. 603(1): 27-32.
- Fimognari, C., Berti, F., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. 2005.** Effect of sulforaphane on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by four different mutagens. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Vol. 46(4): 260-7.
- Fischman, H. K., Kelly, D. D. 1999.** Chromosomes and stress. *The international Journal of neuroscience*. Vol. 99(1-4):201-19.
- Flórez, J. 2000.** *Farmacología humana*. 3a. ed. Masson, México: 1052.
- Griffiths, A. J. F., Gelbart, W. M., Miller, J. H., Lewontin, R. C. 1999.** *Genética Moderna*. 1a. ed. McGraw-Hill, España : 205-212, 215-218.
- Herskowitz, I. H. 1970.** *Genética*. 1a. ed. Continental, México: 18, 20, 22-24.
- Ito, Y., Fujie, K., Matsuda, S., Takahashi, R., Maeda, S. 1994.** Long-Evans A and C rat strains susceptible to clastogenic effects of chemicals in the bone marrow cells. *Cáncer Research*. Vol. 85(1): 26-31.
- Klug, W., Cummings, M. 1999.** *Conceptos de genética*. 5a. ed. Prentice Hall, Madrid: 23- 31, 256-258, 263, 264.

Lutsenko, S., Tsivkovskii, R., Walker, J. M. 2003. Functional properties of the human copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) and regulation by metallochaperone Atox1. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 986: 204-11.

Manning, S. R. 1989. Estadística. 4a. ed. Prentice Hall Hispanoamericana, México: 379, 380.

Martínez, W., Folle, G 2006. <http://genética.fcien.edu.uy/materiales/PRACTICOS/alteraciones%20cromosomicas/alteraciones%20cromosomicas.pdf>

Milic, M., Kopjar, N. 2004. Evaluation of in vitro genotoxic activity of bleomycin and mitomycin C in human lymphocytes using the alkaline comet assay. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*. Vol. 55(4):249-59.

Moore, J. W., Stanitski, C. L., Kotz, J. C., Joesten, M. D., Wood, J. L. 2000. El mundo de la Química, conceptos y aplicaciones. 2da. ed. Prentice Hall, México: 391.

Murray, R., Granner, D. 1994. Bioquímica de Harper. 13a. ed. Manual Moderno, México: 926.

Petrucci, R. H., Harwood, W. S. 1999. Química General, Principios y aplicaciones modernas. 1a. ed. Prentice Hall, Madrid, España: 851.

Picco, S. J., De Luca, J. C., Mattioli, G., Dulout, F. N. 2001. DNA damage induced by copper deficiency in cattle assessed by the Comet assay. *Mutation Research*. Vol. 498(1-2): 1-6.

Salamanca, G. F. 1990. Citogenética Humana. 1a. ed. Panamericana, México: 28, 43, 49, 50, 63, 83, 87, 88, 100.

Saleha, B. B., Mohad, I., Danadevi, K., Padmavathi, P., Ahuja, R. Y. 2004. DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulfate. *Food and chemical toxicology: an international Journal published from the Biological Research Association*. Vol. 42(12):1931-6.

Sánchez, G. J. 2005. http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2BCH/INDICES/index_informacion.htm.

Sánchez, M. 2004. www.biologia-en-internet.com/default.asp?id=4.

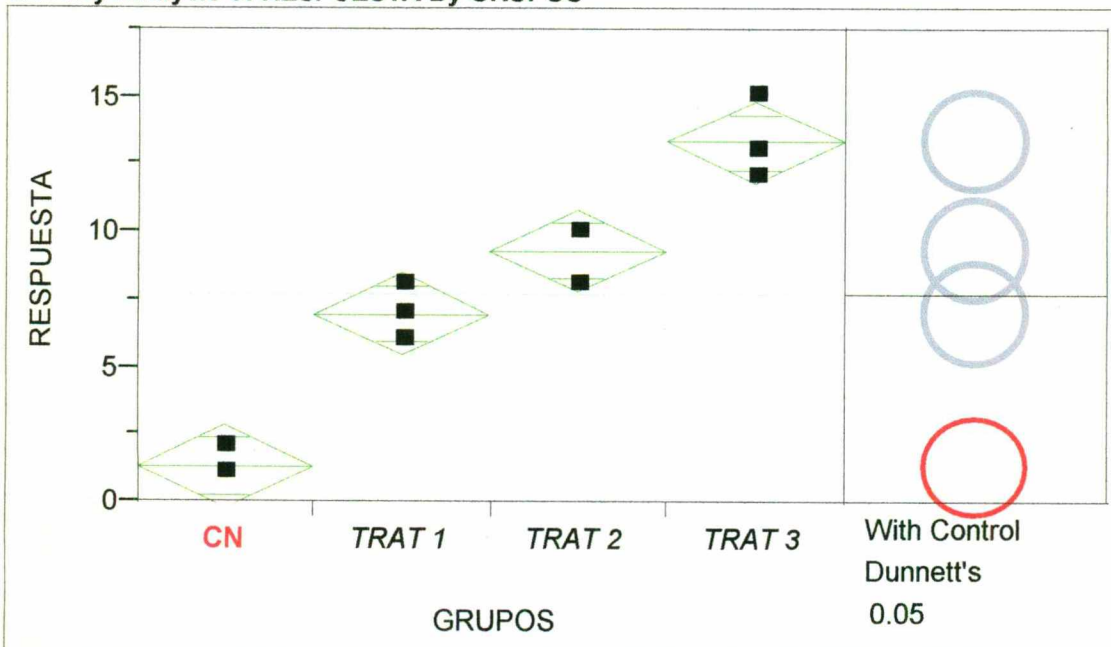
- Sarkar, D., Sharma, A., Talukder, G. 1996.** Clastogenic activity of pure chlorophyll and anticlastogenic effects of equivalent amounts of crude extract of Indian spinach leaf and chlorophyllin following dietary supplementation to mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Vol. 28(2): 121-6.
- Shubber, E., Amin, N. S., El-Adhami, B. H. 1998.** Cytogenetic effects of copper-containing intrauterine contraceptive device (IUCD) on blood lymphocytes. *Mutation Research*. Vol. 417(2-3): 57-63.
- Shumann, K., Classen, H. G., Dieter, H. H., Konig, J., Multhaupt, G., Rukgauer, M., Summer, K. H., Bernhardt, J., Biesalski, H. K. 2002.** Hohenheim consensus workshop: copper. *European Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 56(6): 469-83.
- Stich, H.F., Stich, W. 1982.** Chromosome-damaging activity of saliva of betel nut and tobacco chewers. *Cancer letters*. Vol. 15(3): 193-202.
- Stich, H.F., Wei, L., Whiting, R. F. 1979.** Enhancement of the chromosome-damaging action of ascorbate by transition metals. *Cáncer Research*. Vol. 39(10): 4145-51.
- Strickberger, M. 1974.** *Genética*. 1a. ed. Omega, Barcelona: 23,25,26 y 27.
- Tong, G., Yulong, M., Peng, G., Zirong, X. 2005.** Antibacterial effects of the Cu(II)-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88 and *Salmonella choleraesuis*. *Veterinary Microbiology*. Vol. 105(2): 113-22.
- Vijayalaxmi, J., Reiter, R. J., Leal, B. Z., Meltz, M. L. 1996.** Effect of melatonin on mitotic and proliferation indices, and sister chromatid exchange in human blood lymphocytes. *Mutation Research*. Vol. 351(2): 187-92.
- Villela, I. V., Marques de Oliveira, I., Da Silvia, J., Pegas, H. J. A. 2006.** DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research*. Vol. 605(1-2):78-86.
- Walpole, E. R., Myers H. R. 1992.** *Probabilidad y Estadística*. 4a. ed. Mc-Graw-Hill, México: 511,512.
- Zhang, M. B., He, J. L., Jin, L. F., Lu, D. Q. 2002.** Study of low-intensity 2450-MHz microwave exposure enhancing the genotoxic effects of mitomycin C using micronucleus test and comet assay in vitro. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*. Vol. 15(4):283-90.

ANEXO 1

Para ver si los resultados muestran una diferencia significativa se realiza el Análisis de Varianza de una vía y la prueba de Dunnett. En este análisis estadístico no se incluye el control positivo puesto que solo se utilizó para observar la diferencia física de los cromosomas normales de los alterados.

TRATAMIENTOS COMPARADOS CON EL CONTROL NEGATIVO

Oneway Analysis of RESPUESTA By GRUPOS



Oneway Anova Summary of Fit

Rsquare 0.957672
 Adj Rsquare 0.941799
 Root Mean Square Error 1.118034
 Mean of Response 7.75
 Observations (or Sum Wgts) 12

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
GRUPOS	3	226.25000	75.4167	60.3333	<.0001
Error	8	10.00000	1.2500		
C. Total	11	236.25000			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
CN	3	1.3333	0.64550	-0.16	2.822
TRAT 1	3	7.0000	0.64550	5.51	8.489
TRAT 2	3	9.3333	0.64550	7.84	10.822
TRAT 3	3	13.3333	0.64550	11.84	14.822

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Means Comparisons

Dif=Mean[i]-Mean[j]	TRAT 3	TRAT 2	TRAT 1	CN
TRAT 3	0.000	4.000	6.333	12.000
TRAT 2	-4.000	0.000	2.333	8.000
TRAT 1	-6.333	-2.333	0.000	5.667
CN	-12.000	-8.000	-5.667	0.000

Alpha=
0.05

Comparisons with a control using Dunnett's Method

Control Group =
CN

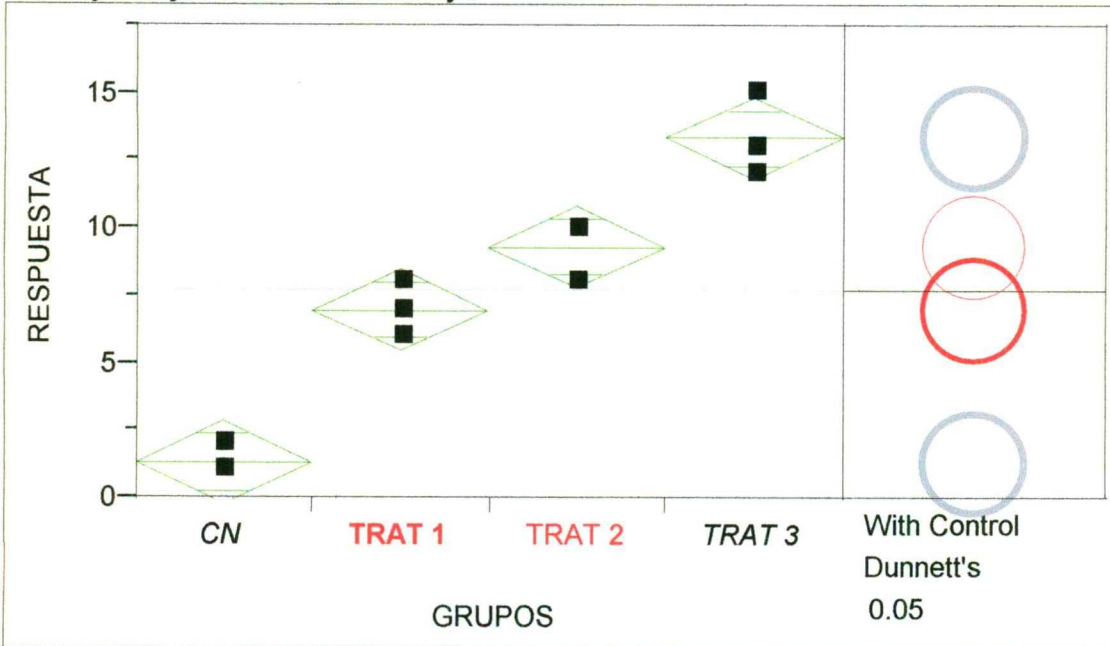
|d| Alpha
2.87973 0.05

Abs(Dif)-LSD	CN
TRAT 3	9.3712
TRAT 2	5.3712
TRAT 1	3.0378
CN	-2.6288

Positive values show pairs of means that are significantly different.

TRATAMIENTO 1 EN COMPARACIÓN CON LOS DEMÁS GRUPOS

Oneway Analysis of RESPUESTA By GRUPOS



Oneway Anova Summary of Fit

Rsquare	0.957672
Adj Rsquare	0.941799
Root Mean Square Error	1.118034
Mean of Response	7.75
Observations (or Sum Wgts)	12

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
GRUPOS	3	226.25000	75.4167	60.3333	<.0001
Error	8	10.00000	1.2500		
C. Total	11	236.25000			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
CN	3	1.3333	0.64550	-0.16	2.822

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
TRAT 1	3	7.0000	0.64550	5.51	8.489
TRAT 2	3	9.3333	0.64550	7.84	10.822
TRAT 3	3	13.3333	0.64550	11.84	14.822

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Means Comparisons

Dif=Mean[i]-Mean[j]	TRAT 3	TRAT 2	TRAT 1	CN
TRAT 3	0.000	4.000	6.333	12.000
TRAT 2	-4.000	0.000	2.333	8.000
TRAT 1	-6.333	-2.333	0.000	5.667
CN	-12.000	-8.000	-5.667	0.000

Alpha=
0.05

Comparisons with a control using Dunnett's Method

Control Group =
TRAT 1

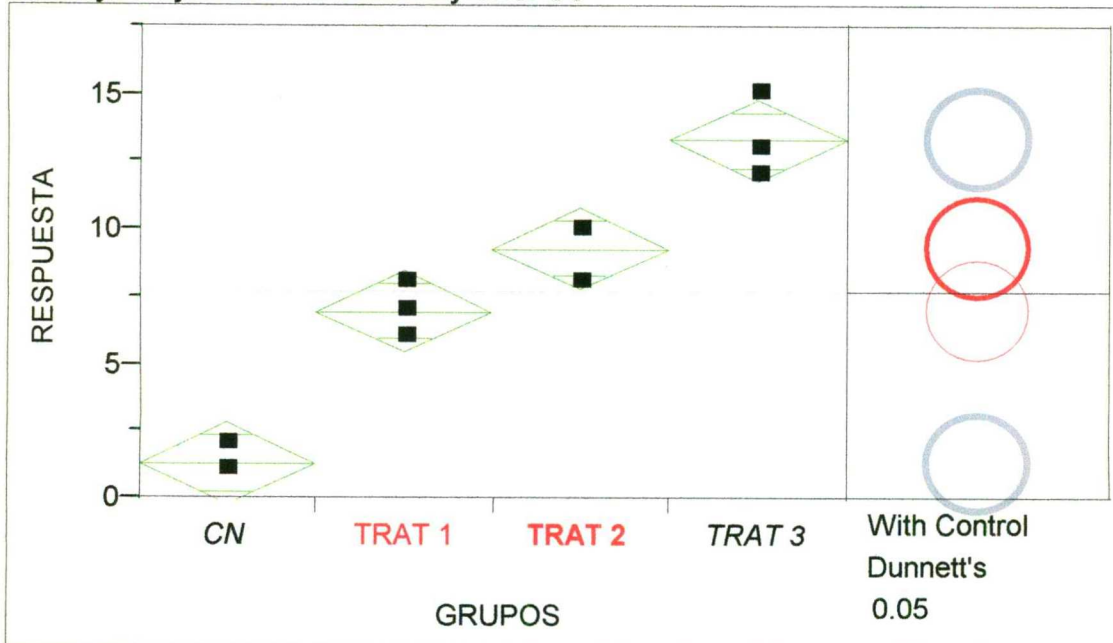
|d| Alpha
2.87973 0.05

Abs(Dif)-LSD	TRAT 1
TRAT 3	3.7045
TRAT 2	-0.2955
TRAT 1	-2.6288
CN	3.0378

Positive values show pairs of means that are significantly different.

TRATAMIENTO 2 EN COMPARACIÓN CON LOS DEMÁS GRUPOS

Oneway Analysis of RESPUESTA By GRUPOS



Oneway Anova Summary of Fit

Rsquare

0.957672

Adj Rsquare 0.941799
 Root Mean Square Error 1.118034
 Mean of Response 7.75
 Observations (or Sum Wgts) 12

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
GRUPOS	3	226.25000	75.4167	60.3333	<.0001
Error	8	10.00000	1.2500		
C. Total	11	236.25000			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
CN	3	1.3333	0.64550	-0.16	2.822
TRAT 1	3	7.0000	0.64550	5.51	8.489
TRAT 2	3	9.3333	0.64550	7.84	10.822
TRAT 3	3	13.3333	0.64550	11.84	14.822

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Means Comparisons

Dif=Mean[i]-Mean[j]	TRAT 3	TRAT 2	TRAT 1	CN
TRAT 3	0.000	4.000	6.333	12.000
TRAT 2	-4.000	0.000	2.333	8.000
TRAT 1	-6.333	-2.333	0.000	5.667
CN	-12.000	-8.000	-5.667	0.000

Alpha=
0.05

Comparisons with a control using Dunnett's Method

Control Group =
TRAT 2

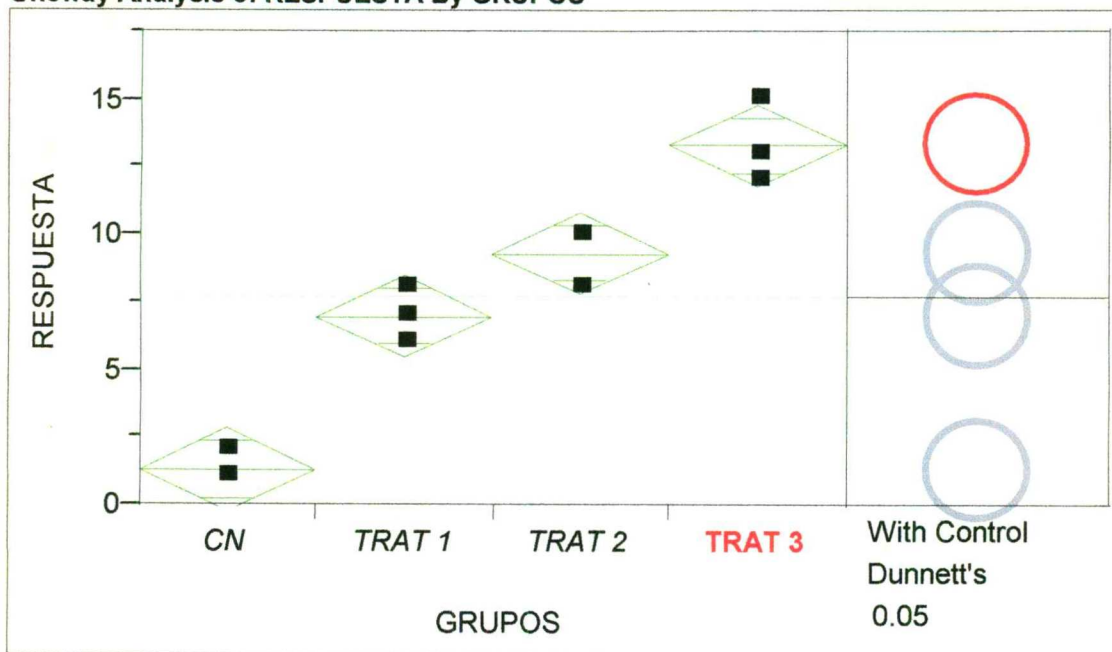
|d| 2.87973
Alpha 0.05

Abs(Dif)-LSD	TRAT 2
TRAT 3	1.3712
TRAT 2	-2.6288
TRAT 1	-0.2955
CN	5.3712

Positive values show pairs of means that are significantly different.

TRATAMIENTO 3 EN COMPARACIÓN CON LOS DEMÁS GRUPOS

Oneway Analysis of RESPUESTA By GRUPOS



Oneway Anova Summary of Fit

Rsquare	0.957672
Adj Rsquare	0.941799
Root Mean Square Error	1.118034
Mean of Response	7.75
Observations (or Sum Wgts)	12

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
GRUPOS	3	226.25000	75.4167	60.3333	<.0001
Error	8	10.00000	1.2500		
C. Total	11	236.25000			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
CN	3	1.3333	0.64550	-0.16	2.822
TRAT 1	3	7.0000	0.64550	5.51	8.489
TRAT 2	3	9.3333	0.64550	7.84	10.822
TRAT 3	3	13.3333	0.64550	11.84	14.822

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Means Comparisons

Dif=Mean[i]-Mean[j]	TRAT 3	TRAT 2	TRAT 1	CN
TRAT 3	0.000	4.000	6.333	12.000
TRAT 2	-4.000	0.000	2.333	8.000
TRAT 1	-6.333	-2.333	0.000	5.667
CN	-12.000	-8.000	-5.667	0.000

Alpha=
0.05

Comparisons with a control using Dunnett's Method

Control Group =
TRAT 3

d	Alpha
2.87973	0.05

Abs(Dif)-LSD	TRAT 3
TRAT 3	-2.6288
TRAT 2	1.3712
TRAT 1	3.7045
CN	9.3712

Positive values show pairs of means that are significantly different.