



**ARTÍCULO DE REVISIÓN**  
*La participación del calcio y las proteínas  
en la inducción de aneugénesis (chromosome  
missegregation) por la exposición a  
compuestos volátiles*

Imagen proporcionada por los autores.

# **LA PARTICIPACIÓN DEL CALCIO Y LAS PROTEÍNAS EN LA INDUCCIÓN DE ANEUGÉNESIS (CHROMOSOME MISSEGREGATION) POR LA EXPOSICIÓN A COMPUESTOS VOLÁTILES**

**Elda María del Rocío Coutiño-Rodríguez\* (1, 2), Cristina Cortinas de Nava (3), Marvin Legator (4), Omar Arroyo-Helguera (1)**

(1) Instituto de Salud Pública, de la Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz;

(2) Facultad de Biología de la Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz; (3) Fundación Cristina Cortinas, México; (4) Centro Médico de la Universidad de Texas, Estados Unidos

\*Autor de correspondencia correo E: [coutinoe@gmail.com](mailto:coutinoe@gmail.com)

## **RESUMEN**

En la década de 1970 se incrementó la incidencia de cáncer y parte de su etiología se asoció con anomalías genéticas vinculadas con la exposición a compuestos químicos que son producto de la industrialización energética, química o agroquímica. Esto desencadenó el interés por estudiar las alteraciones genéticas de tipo cromosómicas o mutaciones en las que el ácido desoxirribonucleico (DNA) era el principal blanco de los mutágenos y agentes cancerígenos, tanto en los estudios de toxicología genética como ambiental. Sin embargo, compuestos no mutagénicos incapaces de inducir mutaciones en sistemas microbianos, como la prueba de Ames, aumentaban las anomalías anafásicas (AA) en eucariontes, en especial en los husos multipolares y cromosomas retardados, comportándose como compuestos de riesgo para la inducción de aneuploidías. Particularmente se trata de sustancias volátiles despolarizantes de membrana que causan movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  relacionados con la actividad estructural y funcional de las proteínas, entre ellas las del huso mitótico y las cromosomales, lo cual induce cambios en c-mitosis y micronúcleos. Por tanto, las proteínas involucradas en la formación del huso mitótico desde la membrana plasmática juegan un papel muy importante en la inducción genotóxica asociada con la aneugénesis. El objetivo de esta revisión es recopilar datos que corroboran la participación de las proteínas, la membrana y el  $\text{Ca}^{2+}$  en la inducción de las AA y cómo se vinculan con los husos multipolares, el peso molecular, y el punto de fusión de muchos compuestos químicos volátiles (pesticidas, plaguicidas) genotóxicos, aneugénicos, inductores del cáncer y de la carcinogénesis ambiental.

## **PALABRAS CLAVE**

aneugénesis,  
calcio,  
proteínas,  
grupos tioles y  
disulfuro,  
compuestos  
volátiles

## ABSTRACT

In the 1970s, the incidence of cancer increased and part of its etiology was associated with genetic anomalies linked to exposure to chemical compounds that are a product of energy, chemical, or agrochemical industrialization. This triggered interest in studying genetic alterations of chromosomal type or mutations in which deoxyribonucleic acid (DNA) was the main target of mutagens and carcinogens, both in genetic and environmental toxicology studies. However, non-mutagenic compounds incapable of inducing mutations in microbial systems, like the Ames test, increased anaphase anomalies (AA) in eukaryotes, especially multipolar spindles and delayed chromosomes behaving as risk compounds for the induction of aneuploidies. Particularly, this refers to membrane-depolarizing volatile substances that cause  $\text{Ca}^{2+}$  movements related to the structural and functional activity of proteins, including those of the mitotic spindle and chromosomal proteins, which induce c-mitosis and micronuclei. Therefore, the proteins involved in the formation of the mitotic spindle from the plasma membrane play a very important role in the genotoxic induction of genetic alterations associated with aneugenesis. The objective of this review is to gather data that corroborates the involvement of proteins, the membrane, and  $\text{Ca}^{2+}$  in the induction of AA, and how they are linked to multipolar spindles, the molecular weight, and melting point of many volatile chemical compounds (pesticides) which are genotoxic, aneuploidogenic, cancer-inducing, and are associated with environmental carcinogenesis.

## KEYWORDS

aneugenesis,  
calcium,  
proteins,  
thiol and  
disulfide  
groups,  
volatile  
compounds

## Antecedentes históricos

**Mirada retrospectiva.** A finales de los años sesenta y durante la década de los setenta, se incrementó en México y el mundo el interés por estudiar las alteraciones genéticas asociadas a aneuploidías, que hoy en día se conocen como aneugénesis, y se relacionan con la incidencia de cáncer, abortos espontáneos y malformaciones congénitas, entre otros padecimientos. El origen de estas alteraciones se encuentra vinculado a la exposición de poblaciones a sustancias químicas que invaden el medioambiente; productos que provienen de la industrialización energética, química y agroquímica, principalmente.

Las alteraciones genéticas que se relacionan frecuentemente con las aneuploidías en la patología humana son el síndrome de Turner, el síndrome de Klinefelter, la trisomía 21, la trisomía 18, y la trisomía 13, además de las causadas por exceso o deficiencia de cromosomas sexuales o autosómicos; después se encuentran los abortos espontáneos, de los cuales más del 40 % son por aneuploidías o poliploidías, y los procesos neoplásicos malignos asociados especialmente con alteraciones numéricas del complemento y fragilidad cromosómica, como en la infertilidad y pérdida del embarazo por afección del embrión (1).

Las aneuploidías se deben al fenómeno conocido como *nondisjunction* o *missegregation*, que es la distribución no equitativa de cromosomas en la anafase, durante la mitosis o meiosis. Es evidente que las proteínas participantes en la formación y función del huso mitótico para la segregación cromosómica adquirieron gran relevancia durante este proceso, ya que las aneuploidías pueden dar lugar a enfermedades genéticas de manera indirecta.

Hasta antes de los años setenta, se consideraba que la molécula de DNA era el blanco en la inducción de daño genético por contaminantes químicos ambientales, aunque en realidad los compuestos genotóxicos, inductores de mutaciones; los compuestos clastogénicos, inductores de alteraciones estructurales cromosómicas; y principalmente los compuestos aneugénicos producen las aneuploidías sin que necesariamente se afecte directamente al DNA. Gracias a los trabajos realizados en el laboratorio del Dr. Marvin Legator en la Rama Médica de la Universidad de Texas, (UTMB) (1976 y 1978) y de la Dra. Cristina Cortinas Nava en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en la UNAM, México (1979) se logró reafirmar el papel de las proteínas como blancos accesibles en la inducción de daño genético a nivel cromosómico estructural y/o numérico, y que el calcio también participa en este daño. Para esto se utilizó el sistema de análisis de anafases

en células en cultivo de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) en la detección de mutágenos y carcinógenos (2,3).

El sistema de análisis de anafases en células CHO permitió corroborar la actividad mutagénica de un gran número de compuestos químicos alquilantes como la trietilen melamina (TEM), el etilmelanosulfonato (EMS), y la hicantona, entre otros; así como intercalantes como el acetoacetilaminofluoreno (AMMF), que son inductores de mutaciones puntuales y de corrimiento de fase, respectivamente. Además, se corroboró la actividad clastogénica provocada por sus efectos cromosómicos estructurales, básicamente asociados a la inducción de los fragmentos cromosómicos, puentes cromosómicos (cromosomas dicéntricos) y cromosomas pegajosos, que se dan en las fases G1, S, y G2 del ciclo celular, respectivamente, pero principalmente en la mitosis. Esto se debe en especial a que en anafase podemos distinguir e identificar compuestos capaces de inducir aneuploidías, como cromosomas retardados, husos multipolares, y disaggregaciones del huso que se asocian con la presencia de c-mitosis y micronúcleos en células en interfase (4,5).

Algunos compuestos aneugénicos son incapaces de inducir mutaciones en sistemas de prueba microbianos como en el descrito y desarrollado por Ames y colaboradores en *Salmonella typhimurium* para detectar mutaciones puntuales y de corrimiento de base (6). El método fue adaptado y mejorado en 1975 con la presencia del sistema microsomal S9 (que contiene la actividad metabolizadora del CY p450), proveniente de homogenados hepáticos de rata, el cual se encarga del metabolismo de compuestos liposolubles. Los metabolitos de algunos compuestos son más reactivos o mutagénicos, como en el caso de la ciclofosfamida (Cytoxan); o por lo contrario pierden su actividad y son eliminados por la orina (2,7,8).

Algunos de los compuestos estudiados, incapaces de causar mutaciones en el sistema de anafases, aumentaban considerablemente la formación de husos multipolares, la disagregación del huso y la presencia de cromosomas retardados (2), lo que representa un alto riesgo como inductores de aneuploidías. Entre los compuestos estudiados estaban la metadona, la naltrexona, el dimetilsulfóxido (DMSO), la hicantona, tetrakis (hidroximetil) sulfato de fosfonio (THPS), y el tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), que aumentan considerablemente los husos multipolares y cromosomas retardados, aunado a que están relacionados con el aumento de c-mitosis, de polinúcleos y micronúcleos en células en interfase e inducen cambios en la morfología de las células (Fig. 1) (2). Actualmente se utiliza la presencia de micronúcleos en

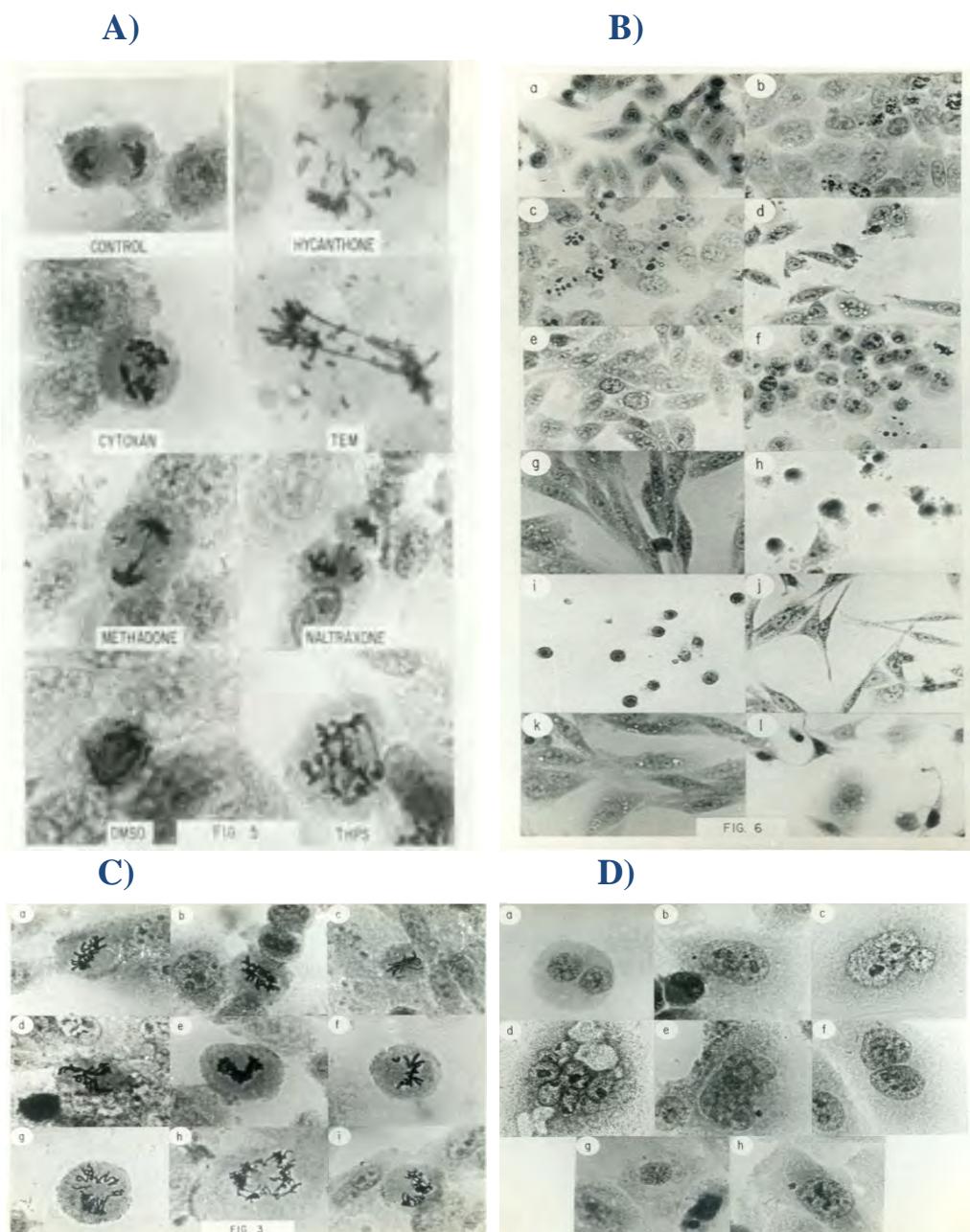
sangre o en células epiteliales hepáticas o gastrointestinales como parámetro indicativo de aneugénesis en modelos *in vivo* (9).

Entre las propiedades relevantes de los compuestos que inducen disaggregaciones del huso mitótico y husos multipolares se encuentran su liposolubilidad y volatilidad, a semejanza de anestésicos como el halotano, el éter, y el cloroformo, que son compuestos volátiles causantes de diversos tipos de cánceres: de piel, hígado, riñón, y angiosarcoma, entre otros. Entre los factores de riesgo están la exposición laboral, ocupacional y experimental; en este último caso ocurre por la exposición *in vitro* a dioxinas, al tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) y derivados del benceno que son potentes inductores carcinogénicos (10,11).

Estudios epidemiológicos han mostrado que la exposición humana a compuestos de naturaleza anestésica, gases y vapores como el halotano, el cloruro de vinilo y el óxido nitroso, representan un riesgo, ya que inducen alteraciones en los espermatozoides, infertilidad, abortos espontáneos y cáncer (12, 13). Por ello, los compuestos volátiles, como los vapores de desechos industriales, fueron prioridad para los estudios de la toxicología y genética ambiental. Una de las razones de la peligrosidad de estos compuestos es su rápida absorción por todas las vías de exposición, principalmente la inhalatoria y la dérmica, ya que pueden absorberse fácilmente y causar daño genético indirectamente a través de la afectación a las proteínas, e inducir anomalías anafásicas que conllevarían a aneuploidías y carcinogénesis (2).

Por lo anterior, se puede establecer una mejor asociación causal entre el aumento del cáncer y la aceleración en la industria química y agroquímica, ya que estas industrias son las que incrementan la contaminación ambiental y, con ello, la exposición a compuestos químicos liposolubles orgánicos volátiles, disruptores hormonales, residuos persistentes, pesticidas, anestésicos inhalatorios, y gases y vapores industriales, todos los cuales comparten la característica de ser volátiles. Dadas sus características fisicoquímicas, estos compuestos químicos prácticamente interactúan con la fase lipídica de la membrana, lo que causa su despolarización y la apertura de canales de Ca<sup>2+</sup>. Esto es importante para el adecuado funcionamiento de los microtúbulos, del huso mitótico, y de la segregación cromosómica; por lo tanto, puede relacionarse con aneuploidías. Este riesgo se encuentra en función del grado de volatilidad, tamaño y peso del compuesto, además del tiempo de exposición.

Levan y Östergren (1943) establecieron la teoría de que la concentración en fase líquida del compuesto



**Figura 1. Alteraciones anafásicas inducidas por hicantona, Cytoxan, TEM, metadona, naltraxone, DMSO y THPS.** Células CHO en cultivo expuestas por 24 h con TEM = trietilen melamina (0.002, 0.02, y 2  $\mu$ gr/ml); DMSO = dimetilsulfóxido (1, 2, 5, y 10  $\mu$ l/ml); THPS = tetrakis (hidroxilemitil) sulfato de fosfonio (9, 34 y 68  $\mu$ gr/ml), hicantona (0.5, 2.5, 5  $\mu$ gr/ml), naltraxeno y metadona (6.25, 25, 50, y 100  $\mu$ gr/ml). En las imágenes se observan: **A)** alteraciones anafásicas, que contienen el control y demás tratamientos; **B)** cambios en la morfología: a) células normales, b) orina de ratones expuestos a citoxan, c) dosis altas de hicantona, d) orina de ratones expuestos a hicantona, e) y f) dosis baja y alta de metadona, g) dosis bajas de naltraxeno, h) dosis bajas de THPS, i) dosis tóxicas de THPS, j) orina de ratones expuestos a THPS, k) y l) dosis bajas y altas de DMSO; **C)** alteraciones metafásicas: a) y b) normales; c), d), e), y f) alteraciones comúnmente detectadas, g), h), e) i) alteraciones generalmente detectadas por exposición a naltraxeno, metadona, hicantona, por DMSO, THPS, también en células tratadas con  $CCl_4$  (la diferencia entre ellas es la frecuencia y el grado de alteración que se presenta en cada tratamiento); **D)** presencia de polinúcleos y micronúcleos: a) metadona, b) lo que se detecta en todas las dosis de TEM, c) orina de ratones expuestos a citoxan, d) expuestos a DMSO, e) a todas las dosis de hicantona, f) orina de ratones expuestos a hicantona, g) células expuestas a naltraxeno y h) a THPS. Tomado de Coutiño (3).

rencia entre ellas es la frecuencia y el grado de alteración que se presenta en cada tratamiento); **D)** presencia de polinúcleos y micronúcleos: a) metadona, b) lo que se detecta en todas las dosis de TEM, c) orina de ratones expuestos a citoxan, d) expuestos a DMSO, e) a todas las dosis de hicantona, f) orina de ratones expuestos a hicantona, g) células expuestas a naltraxeno y h) a THPS. Tomado de Coutiño (3).

y la interacción con los lípidos de la membrana determinan su actividad C-mitótica, y demostraron que derivados del nafteno y benceno, entre otros, causaban un estado de narcosis al ingresar a las células más rápido que las sustancias solubles en agua; y su penetración y actividad dependía de su coeficiente de partición. Luego, al modificar sus grupos funcionales para hacerlos más solubles en agua, disminuía la inducción de c-mitosis, de modo que las sustancias solubles en lípidos están asociadas con la inducción de poliploidías. Esto se debe a alte-

raciones del huso mitótico, a la contracción de los cromosomas o alteraciones en la condensación de las proteínas cromosomales, entre otras causas (14). Al estudiar el efecto de la colchicina en la inducción de la c-mitosis, Levan consideró que ésta se debía al arresto de la mitosis en la metafase provocado por la pérdida de la estructura del huso mitótico (15).

Por tanto, compuestos con características comunes de volatilidad y solubilidad en lípidos son capaces de inducir la c-mitosis y micronúcleos. Aunque la

colchicina no es volátil, actúa en el reclutamiento de los residuos tioles de la tubulina, como lo hace el  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibiendo su polimerización durante la formación de los microtúbulos en el citoesqueleto y el huso mitótico; este efecto es semejante al de anti-mitóticos como la vincristina y vinblastina, además del propio  $\text{Ca}^{2+}$ .

Seeman (16) consideraba que la gran mayoría de los compuestos químicos liposolubles con propiedades anestésicas (locales o inhalatorias) tienen la capacidad de despolarizar la membrana y, por tanto, causan la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  externo al interior de la célula, facilitando igualmente la movilización de los reservorios internos como el retículo endoplásmico (RE) y mitocondrias, principales secuestradores y reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  (17).

La teoría de los lípidos de la membrana fundamentó el concepto de la despolarización de la membrana por compuestos liposolubles, relacionada con la excitabilidad muscular y nerviosa debido al intercambio de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , lo que genera flujos y corrientes químicas y eléctricas, además de la apertura de iones vinculados con la disminución del valor absoluto del potencial de membrana y diferencia de carga o iones dentro y fuera de la célula, controlada mediante canales, principalmente los de  $\text{Ca}^{2+}$ , abiertos constitutivamente o inducibles por mensajeros químicos.

Por lo tanto, compuestos químicos de naturaleza liposoluble, volátiles o aquellos que actúan como mensajeros químicos sobre receptores celulares inducen la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , por despolarización y por la apertura de canales. Así, el  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como segundo mensajero en la comunicación celular a través de vías de señalización de la fosfolipasa A y C y de la activación de cinasas, con la liberación interna de diacilglicerol y fosfatidilinositol IP<sub>3</sub>. Esto movilizará más  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, activando mensajeros involucrados en la regulación celular, genética y metabólica, al activar o inhibir eventos como la división, morfogénesis, diferenciación, toxicidad, muerte celular y expresión genética (18,19).

**Antecedentes del  $\text{Ca}^{2+}$  en la actividad estructural de las proteínas y su asociación con las uniones disulfuro y tioles libres.** Los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  modifican la actividad estructural y funcional de las proteínas por su efecto sobre los residuos de los aminoácidos. Esto ocurre particularmente en las cisteínas, cuyo grupo funcional es el sulfhidrilo o tiol (SH), y en la cistina en su unión disulfuro S-S. Debido al efecto reductor del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las uniones disulfuro, se modifica la relación de SH y S-S (20, 21) alterando el funcionamiento y el plegamiento de las proteínas (17), cuyas manifestaciones van desde la permeabilidad celular, morfología celular, con-

tracción muscular, secreción y formación del huso mitótico hasta la expresión genética, como en el caso de la tubulina del huso mitótico, de las histonas en anomalías asociadas a la segregación cromosómica y de la muerte celular por la activación de caspasas.

En 1954, Mazia y Prescott (22) reportaron que la segregación de los cromosomas se debía a cambios en la fina relación entre los grupos sulfhidrilo y disulfuro. Estos cambios ocurren en el huso mitótico durante la segregación y el movimiento de los cromosomas en la mitosis, cuyo componente principal son los microtúbulos, los cuales tienen a la tubulina como la principal proteína encargada de su formación y del funcionamiento del huso mitótico. La tubulina posee un alto contenido de grupos tioles (SH), de los que depende su función en la formación de uniones disulfuro para el ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos, evento que es regulado por el  $\text{Ca}^{2+}$  y las proteínas reguladoras de éste, como la calmodulina, entre otras (23,24).

La segregación cromosómica obedece a un proceso activo de polimerización y despolimerización de microtúbulos mediados por tubulina, la cual es una proteína clave en la formación del citoesqueleto y huso mitótico en donde los cambios en la morfología celular relacionados con el citoesqueleto también están asociados con la transformación celular (25-27).

Por otra parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  es el mensajero más importante en las vías de señalización interna, particularmente en la regulación y activación de cinasas en el ciclo celular, en la mitosis (28-30) y en las vías que llevan a la activación de genes, por cinasas que fosforilan factores de transcripción. Además, las cinasas participan en una gran cantidad de eventos celulares, entre ellos la exocitosis, con un remodelamiento de los microfilamentos, también lo hacen en el proceso de mitosis. Las cinasas interactúan con las proteínas de adhesión, como las selectinas, integrinas y cadherinas que son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una característica importante de las células tumorales es la pérdida de adhesión; estas proteínas también participan en la reorganización mediada por contacto del citoesqueleto de actinomiosina mediante la señalización del complejo de adhesión de cadherina, aunque otros procesos independientes de la cadherina podrían igualmente controlar la organización del citoesqueleto de actinomiosina y activar vías de señalización.

Asimismo, el  $\text{Ca}^{2+}$  y el estado oxidativo de los grupos tioles (SH) regulan una gran cantidad de procesos celulares, entre ellos, el reconocimiento y funcionamiento de receptores plasmáticos y nuclea-

res, la permeabilidad y adhesividad celular, el metabolismo de compuestos químicos, el transporte de electrones en citocromos y la actividad enzimática (tiolasas); la polimerización de microtúbulos afecta el funcionamiento del huso mitótico, la conjugación con glutatión y la protección ante los metabolitos reactivos de carcinógenos, causando la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO), la condensación de la cromatina y la reparación y recombinación del DNA. Muchos de estos procesos están involucrados en aneugénesis. Lo que constituye que los compuestos químicos oxidantes o reductores, según su estado de óxido reducción, puedan alterar el estado redox interno de las células, mediante la regulación del  $Ca^{2+}$ , los grupos tioles y puentes disulfuro en el retículo endoplásmico (RE) (17). Al respecto, se conoce que los incrementos de  $Ca^{2+}$  inhiben o alteran la actividad estructural, catalítica y funcional de las proteínas, debido al rompimiento de los puentes disulfuro, lo cual afecta su plegamiento.

El RE es precursor de las membranas plasmáticas, además de ser un centro de almacenamiento de  $Ca^{2+}$  y de las enzimas disulfuro isomerasas y oxidasa 1, enzimas que participan en el plegamiento de las proteínas; por tanto, proporciona un entorno oxidante para facilitar la formación de enlaces disulfuro. De esta forma, el RE contribuye hasta con el 25 % del total de las especies reactivas de oxígeno generadas, las cuales participan en el daño genético, citotoxicidad, carcinogénesis y en el envejecimiento. Además, el RE actúa como sensor de estrés oxidativo, del estado nutricio, y de la sobrevivencia celular; así regula muchos procesos vitales celulares (17).

Un gran número de compuestos químicos mutagénicos y carcinogénicos ambientales con propiedades oxidantes o reductoras, como los metales pesados, epóxidos esteres y el propio  $Ca^{2+}$ , interfieren en la fina relación del contenido de grupos tioles libres (SH) y de las uniones disulfuro (S-S). Esto ocurre por mecanismos directos o indirectos, al inducirse la liberación del  $Ca^{2+}$  de las membranas y beneficiar su entrada por canales o movilizarlo y alterar el estado redox de las células y modificar actividad o plegamiento de proteínas que favorezcan la genotoxicidad, inmunotoxicidad, disruptión hormonal y la neurotoxicidad (31).

Diversos receptores membranales, como los acoplados a proteínas G, las integrinas y los receptores con actividad de cinasas de tirosinas, abren canales de  $Ca^{2+}$  y/o pueden transmitir señales vía el citoesqueleto de actina, para provocar diversos efectos sobre la actividad celular (32). Entre estos efectos se incluyen cambios en la forma de la célula, la motilidad, la proliferación, la secreción y la sobreviven-

cia, que están implicados en procesos anormales como la metástasis tumoral, la inflamación crónica y la degeneración tisular, y conducen a enfermedades asociadas con daño genético, por ejemplo, el cáncer.

Datos epidemiológicos han mostrado un aumento en el número de enfermos de cáncer entre agricultores que usan pesticidas. En este sentido, la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) indica que el 25% de los pesticidas son oncogénicos (33), lo cual representa un alto riesgo. Además, para regular y controlar estos productos de forma efectiva se deben concretar los límites permisibles de exposición, lo cual es difícil debido a que la mayoría de los pesticidas son compuestos liposolubles, volátiles y de fácil absorción. Asimismo, algunos pesticidas de hidrocarburos halogenados causan esterilidad y presentan una actividad carcinogénica marginal, mientras otros organofosforados son solo mutagénicos o carcinogénicos y, por su parte, la tetraclorodibenzodioxina y la hidracina maleica también son carcinogénicas en modelos animales. Los organofosforados mutagénicos comprometen la descendencia, pues dañan el DNA que se transmite; en cambio, cuando los carcinogénicos no inducen mutaciones se sugiere que su efecto es epigenético e indirecto sobre proteínas afectadas. La molécula del DNA es considerada como un blanco crítico para la carcinogenidad; sin embargo, no todos los carcinógenos son mutagénicos ni todos los compuestos mutagénicos son carcinogénicos (34); entre los mecanismos de carcinogenidad están la promoción, la citotoxicidad y el estrés oxidativo (35).

En los años setenta se propuso una relación entre mutagénesis y carcinogénesis, pero actualmente se sabe que solo el 30% de los carcinógenos hepáticos en ratón son detectados con la prueba de Ames, y que existe un 90% de correlación entre la estructura química y su positividad con la prueba que detecta el daño al DNA (36,37).

También se ha comparado la carcinogenidad de los compuestos mutagénicos en los órganos blanco de modelos de ratas y ratones, y se ha encontrado que una gran cantidad de compuestos mutagénicos (81%) inducen tumores en múltiples órganos, mientras que solo el 41% de los carcinógenos que lo hacen en un solo órgano son mutágenos (38). Por ello, con el transcurso del tiempo se ha modificado y reclasificado la genotoxicidad por compuestos ambientales, la que actualmente conforma tres grupos. El primer grupo es el de los mutagénicos, que son los compuestos que inducen mutaciones y daño directo en la secuencia del DNA. Los mutagénicos se detectan mediante el sistema de Ames y actualmente se utilizan en mutaciones diri-

gidas y estudios de polimorfismos con la secuenciación masiva de genes. El segundo grupo son los clastogénicos, los cuales inducen aberraciones cromosómicas estructurales y se detectan con estudios citogenéticos cromosómicos. Finalmente, el tercer grupo son los aneugénicos, que se detectan mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos y en células gastrointestinales, y con el estudio de análisis de anafases. En suma, el *DNA test* (usado para detectar daño al DNA y para identificar compuestos químicos que podrían causar cáncer y otros defectos genéticos) también se emplea para identificar los compuestos que inducen alteraciones cromosómicas numéricas; sin embargo, es aquí donde las proteínas del huso mitótico, centrómero y centriolos, entre otras alteraciones, juegan un papel primordial, donde un gran número de carcinógenos son aneugénicos, como los pesticidas (1).

**Proteínas involucradas en los procesos de mutación y en las aneuploidías.** En los años setenta, las proteínas que se estudiaban como blanco para la carcinogenicidad estaban involucradas con alteraciones genéticas provocadas por agentes físicos y químicos ambientales, relacionados con alteraciones del complemento cromosómico, proteínas que se resumen en la tabla 1. Estas proteínas contienen, en su mayoría, un alto contenido de cisteínas, participan en el metabolismo del DNA, en la recombinación, replicación y reparación del material genético, en el reparto equitativo de los cromosomas durante la división celular, en la constitución de la cromatina y en la formación del complejo sinaptonémico (que favorece el apareamiento cromosómico durante la meiosis), del complejo actinomiosina y de los componentes de la membrana y enzimas, como la enzima aril hidroxilasa de hidrocarburos (CYP1A1), responsables de la actividad metabólica de los compuestos químicos, entre otras.

Sin embargo, en las pruebas para la detección de aneugénicos recientemente se han incorporado alteraciones que incluyen a los centrómeros, telómeros, cinetocoros, proteínas implicadas en la unión y separación de las cromátidas, la tubulina y proteínas asociadas a los microtúbulos, como la calmodulina, las proteínas de la membrana celular o nuclear, los centriolos y otros componentes del huso mitótico. Entre estos componentes se encuentran el complejo promotor de anafases y proteínas propias del ciclo celular, como la proteína p53 y cinasas dependientes de ciclinas (CDK): el factor promotor de la mitosis (MPF) y el compuesto de ciclina b y cinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1). Como se sabe, este compuesto fosforila más de 70 proteínas que participan en el proceso de segregación cromosómica durante la mitosis, además actúa en la separación de

Proteínas	Procesos en los que participan
Nucleasas (exonucleasas, endonucleasas, ligasas, polimerasas)	Reparación, replicación, recombinación, transcripción del DNA.
Tubulina	Formación de microtúbulos del huso mitótico, segregación equitativa de cromosomas durante la división celular
Centriolos y centrómeros	Centros organizadores de microtúbulos.
Histonas y protaminas	Estructura y funciones regulatorias de la cromatina. Empaquetamiento de cromosomas.
Sinaptenemales	Apareamiento de cromosomas homólogos en la meiosis.
Proteínas de membrana (ATPasas, etc.)	Permeabilidad, regulación de la entrada del calcio, receptores, canales.
Arilhidroxilasas, citocromo P450, etc.	Metabolismo de drogas.
Glutatión, metalotioninas	Conjugación de drogas, secreción y su inactivación.
Complejo de actinomiosina	Vías de señalización asociadas a receptores y matriz extracelular.
CHK1	Vías de señalización asociadas a receptores y matriz extracelular.
Condensación y compactación de histonas	Fosforila más de 70 proteínas involucradas en segregación cromosómica, su deficiencia induce células binucleadas.
H2Z, H3.3, H2AX	Fragilidad y estabilidad cromosómica.
Telomerasas	Estabilidad y fragilidad cromosómica.

**Tabla 1.** Proteínas y estructuras involucradas en la producción de mutaciones y alteraciones genéticas asociadas a missegregaciones. Nota: con información de Coutiño (20), Pacchierotti y col. (1), Rodríguez y col. (29) y Skelding y col. (30).

los centrosomas, en la regulación de la fosforilación de las histonas para la condensación de los cromosomas, en la fosforilación de la histona H1, en la fos-

forilación de la lamina, en la ruptura de la membrana nuclear y en el rearreglo del citoesqueleto, de los microtúbulos y microfilamentos (29,39).

También se han estudiado algunas de las modificaciones en la expresión de histonas involucradas en la condensación y compactación del DNA, particularmente el aumento de H3.3 y la disminución de H2.Z, las cuales están relacionadas con algunos cánceres y quizás participan en la fragilidad e inestabilidad cromosómicas. Asimismo, se estudiaron las deficiencias de la cinasa CHK1, que fosforila la histona H2AX. Estas deficiencias pueden tener consecuencias en la segregación cromosómica, con alteraciones de la citocinesis y en la formación de células binucleadas, ya que H2AX permite el reclutamiento de proteínas reparadoras del daño al DNA, posiblemente a ello se deba la dependencia G2 de muchos mutágenos.

**Importancia de los grupos nucleofílicos en la actividad y daño de las proteínas.** La actividad enzimática depende de los centros nucleofílicos funcionales existentes en algunos de sus aminoácidos. Este es el caso del radical tiol de la cisteína, del hidroxilo de la serina y la tirosina, y del imidazol de la histidina, todos ellos sensibles a ataques electrofílicos, a la glicosidación, fosforilación y, además, a la participación en el estado redox celular, por sus características de disociación. Todos estos centros nucleofílicos tienen una capacidad similar a la de la molécula del DNA para reaccionar con los agentes electrofílicos o radicales libres (alquilantes, o metabolitos de los intercalantes) e iones pesados, ampliamente estudiados en toxicología genética, donde la actividad electrofílica de los compuestos químicos y su configuración estérica juegan un papel importante en la producción de mutaciones puntuales (daño directo al DNA) y en la alteración de la actividad de diversas proteínas (40).

Ahora bien, los centros nucleofílicos tienen una conducta de ácido o de base, dependiendo del pH al que se encuentren y juegan un papel importante en el estado redox. En el caso de las proteínas, el grupo imidazol de la histidina es el más ionizable en pH fisiológico, ya que su pKa es de 6, por lo que en esas condiciones se comporta como base. Le siguen el tiol de la cisteína pKa 8.3 y de la serina pKa 10.1 que, al mismo pH, se ionizan en un 8% y 0.8%, respectivamente, por lo que la cisteína a pH fisiológico tiene un papel regulador importante. La característica ácido-base de los centros nucleofílicos en las proteínas no solo les confiere la capacidad de participar en el estado redox celular sino también reaccionar con agentes alquilantes, oxidantes y reductores, iones divalentes, compuestos electrone-

gativos, entre otros. Por tanto, las proteínas resultan ser uno de los principales blancos para los compuestos químicos, que indirectamente pueden causar daño genético, como es el caso de los grupos tioles libres; estos últimos juegan un papel importante en los eventos o funciones de las proteínas que los contienen, como ocurre con los microtúbulos, microfilamentos, etcétera, involucrados en la segregación cromosómica (22,41).

Por otra parte, la participación de los grupos tioles en los procesos mutagénicos se constituye en el hecho de que la potenciación de ciertos carcinógenos, como nitrosaminas y uretano, requiere de la presencia de estos radicales o grupos tioles libres, además de la interacción de agentes mutagénicos o carcinogénicos con compuestos de bajo peso molecular, como cisteína, metalotioneínas y glutatión, que presentan grupos tioles activos y ejercen un efecto protector destoxicificante con una actividad antimutagénica. La actividad nucleofílica de los grupos tioles o sulfhidrilos (SH) de la cisteína depende de una serie de factores entre los que se encuentran la conformación estérica, la densidad electrónica y la polaridad de cada proteína. De ahí que los -SH puedan ser bloqueados en diferente grado por agentes alquilantes, arilantes, epóxidos, iones divalentes, esteres oxidantes, etcétera, mediante mecanismos de naturaleza electrofílica, electrostática, oxidaciones o disociaciones. Dicha actividad se ve afectada por el pH, temperatura, presión osmótica o condiciones oxidantes y reductoras, ya que la cisteína se puede oxidar a cistina, dependiendo de las condiciones redox, lo cual altera proteínas participantes de muchos procesos biológicos vitales (22,40,41).

Igualmente, en el caso de la cistina, agentes reductores como diacetil, mercaptoetanol, ion mono y divalentes ( $Li^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ), por acciones nucleofílicas o de reducción por cambio de pH, modificarán la relación de S-S de las proteínas afectando su plegamiento modificando así la estructura secundaria y tridimensional de las proteínas, entre ellas: del citoesqueleto, el potencial redox de la célula y el mantenimiento del RE. También se sabe que el azufre de la cisteína puede metilarse para obtener un homólogo de la metionina llamado S-metilcisteína, que juega un papel importante como donador de metilos, los cuales participan en la metilación del DNA y de proteínas como las histonas relacionadas con la expresión de genes. Así como la cisteína participa en numerosas modificaciones postraducionales, ya que el grupo nucleofílico tiol permite conjugar otros grupos, a las proteínas como la prenilación, ligación y ubiquitinación para la degradación de proteínas, o mediante la activación de

caspasas efectoras que participan en el ciclo apotótico y causan la degradación de proteínas (22, 40,41).

Se ha visto que las inteínas (intrones de proteínas) actúan ayudando a la cisteína catalítica. Esta actividad es típica en el medio intracelular, donde el medio está reducido y la cisteína no se encuentra oxidada en cistina; además, los residuos de cisteína tienen un papel muy importante en el valor en proteínas reticuladas, lo que incrementa en las proteínas la rigidez y la resistencia proteolítica. Se conoce que el producto de descarboxilación de la cisteína es la cisteamina, componente fundamental de la coenzima A precursora de la acetil-CoA, que juega un papel preponderante en la modificación de histonas y en la expresión genética, y es el metabolito clave en las vías metabólicas catabólicas y anabólicas (42).

**Mecanismos de mutación mediadas por la modificación de proteínas.** Se analizaron las alteraciones genéticas estudiadas para la inducción de mutaciones o para la estructura de los cromosomas desde el contexto de las fases del ciclo celular. Los estudios mostraron que las alteraciones directas en el DNA cursaban intercalación, alquilación y desaminación de bases, entrecruzamientos de DNA y de proteínas que eran dependientes de la síntesis de DNA, es decir, que eran consideradas S dependientes y que generalmente eran reparadas, mientras que otras producían alteraciones G2 cromatídicas. No obstante, una gran cantidad de mutágenos intercalantes eran G2 dependientes, como el acetooacetilaminofluoreno, que es inductor de cáncer, y producían mutaciones y cromosomas pegajosos. Esto nos habla de la participación de las proteínas cromosomales en su inducción, principalmente teloméricas, de otras como las histonas involucradas en el empaquetamiento genético (formación de cromosomas) y de la tubulina en el caso de las *chromosome missegregation* (43,44).

En el caso de las radiaciones ionizantes, éstas inducían uniones dobles del DNA y eran S independientes; las aberraciones inducidas en G0 a S eran cromosómicas, donde alteraciones S cromosómicas y cromatídicas y G2 cromatídicas no provocaban intercambio de cromátidas hermanas como sucedía con los compuestos químicos que causaban rompimiento al DNA y producían anillos y fragmentos cromosómicos. En estudios que analizan los mecanismos de acción de los venenos mitóticos, como la vinblastina, vincristina, y colchicina, que son inducidores de aneuploidías y poliploidías de los cromosomas, se ha reportado la participación indirecta de las proteínas en el daño genético, principalmente en

la fase de mitosis. Otra evidencia importante la constituyen los experimentos que indican que los iones divalentes, como el arsénico, cromo, cadmio, plomo, mercurio,  $\text{Ca}^{2+}$ , etcétera, por su gran afinidad por -SH libres pueden ser capaces de bloquear enzimas y procesos en los que se requieran estos grupos en forma libre, tales como inhibir la polimerización de tubulina, alterar la replicación y reparación del DNA. Esto no solo conlleva la inhibición de la síntesis de DNA, de mutaciones, sino también a la inducción de una susceptibilidad a rompimientos cromosómicos o a la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas. Estas actividades dependen de la concentración molar, del pH y la electronegatividad de cada elemento químico, siendo más reactivos los metales pesados que juegan un papel muy importante en la inmunotoxicidad (45).

Por otra parte, la desaminación de proteínas cromosomales (histonas y protaminas) por compuestos como el ácido nitroso produce inter e intracruzamientos en los cromosomas y causa translocaciones, intercambios entre las cromátidas hermanas y más apareamientos causantes de mutaciones, mientras que la alquilación de protaminas durante la formación de los espermas en ratón causa mutaciones genéticas y efectos en uno de los sistemas más estudiados para la detección de mutágenos o genotóxicos: el sistema de dominantes letales, en el cual las aberraciones cromosómicas están involucradas. Hemos señalado que los agentes despolarizantes aumentan el  $\text{Ca}^{2+}$  ocasionando cambios en la permeabilidad de la membrana con el desenmascaramiento de los grupos tioles libres, donde su concentración intracelular parece estar igualmente elevada tanto en el citoplasma como en el núcleo, y algunas de las más vitales e importantes proteínas son ricas en  $\text{SH}^-$  libres, como es el caso del aparato mitótico, de los receptores de membrana plasmática y nuclear, entre otras (43,44).

Por ello, los compuestos con propiedades anestésicas y compuestos volátiles, incapaces de inducir mutaciones y capaces de inducir alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales a causa de la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$ , provocan cambios en la molaridad de estos tioles libres en la membrana aumentando la actividad de las cinasas, la permeabilidad de la membrana, y facilitando la entrada de más compuestos mutagénicos, así como del aumento intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  por su movilización del RE, repercutirán en los procesos celulares como la división. Por lo tanto, células en constante división, como las células embrionarias, sanguíneas y germinales, son más susceptibles a la inducción de lesiones al DNA, aneuploidías asociadas a la segre-

gación de anomalías congénitas, abortos espontáneos, infertilidad, cáncer y más. Por ello, la exposición crónica en actividades laborales, aun en dosis bajas, es la que más induce cáncer. Esto ocurre, por ejemplo, en espacios de trabajo, y actualmente se ha reportado que partículas ambientales de 2.5 pm son un riesgo para enfermedades cardiovasculares y pulmonares, así como de sensibilidad para enfermedades infecciosas como covid-19 (46). Por ello, analizaremos algunos estudios de interés que ponen en evidencia la participación del  $Ca^{2+}$  en las anomalías anafásicas por compuestos volátiles liposolubles despolarizantes de membrana (43,44).

Se utilizó el sistema de análisis de anafases en fibroblastos de hámster chino (CHO) en cultivo y células meristemáticas de *Vicia faba* (47,48) para analizar el papel que tiene el  $Ca^{2+}$ , de forma directa o indirecta, en la inducción de daño genético, principalmente su efecto en la inducción de *chromosome missegregation* (husos multipolares y cromosomas retardados) por la exposición a compuestos volátiles:  $CCl_4$  y DMSO, y por la presencia de agentes quelantes: ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoethyl éter)-*N,N,N',N'*-tetra acético (EGTA) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se encontró que  $CCl_4$  y DMSO, en función de la concentración, incrementaron notablemente los husos multipolares y los cromosomas retardados en relación con el control.

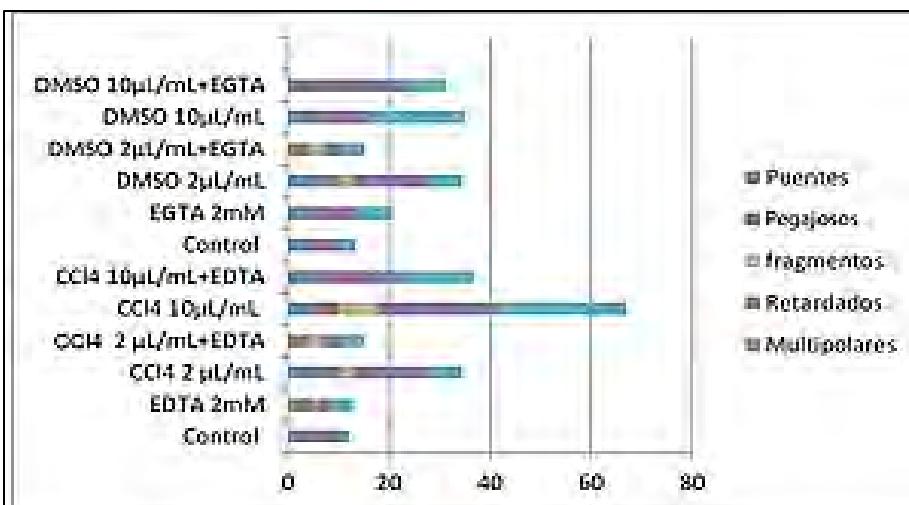
Estos resultados fueron muy semejantes a los reportados con anterioridad (2,3), mientras que el  $Ca^{2+}$ , el EDTA y EGTA incrementaron levemente los husos multipolares y cromosomas retardados. Sin embargo, cuando se expusieron  $CCl_4$  y DMSO en presencia del EDTA y EGTA estas alteraciones disminuyeron en un 50 % y 30 %, respectivamente, corroborando así la participación del  $Ca^{2+}$  en su inducción, como se observa en la figura 2.

En la figura 3 se pueden observar alteraciones que involucran la estructura de los cromosomas, como

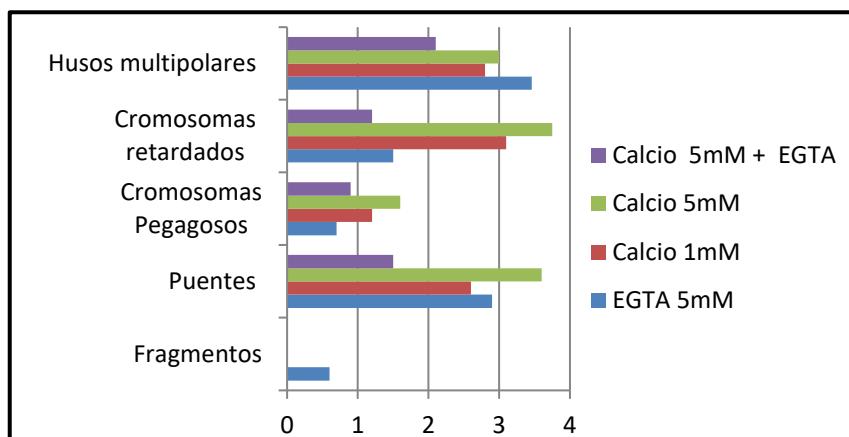
son los puentes cromáticos en G1 y los cromosomas pegajosos en G2, asociados con los compuestos alquilantes e intercalantes, respectivamente, y husos multipolares y cromosomas retardados a la etapa de la mitosis por compuestos volátiles, detectándose también fragmentos cromosómicos con una distribución errática.

Al asociar las anomalías anafásicas de la figura 2 con los tratamientos únicos de la tabla 2, se observa que los husos multipolares mostraron una asociación positiva con la exposición con el  $CCl_4$  (0.682\*\*  $p=0.0001$ ), al igual que con los cromosomas retardados 0.674\*\* ( $p=0.001$ ). Además, al asociar las anomalías con las características fisicoquímicas de los compuestos de la tabla 3, se encontró una asociación negativa de los husos multipolares con el peso molecular (-0.417  $p=0.067$ ), punto de fusión (-0.462\*  $p=0.04$ ) y de ebullición (-0.417\*  $p=0.067$ ), mientras que los cromosomas retardados se asociaron negativamente con el peso molecular (-0.491  $p=0.028$ ), compuestos con bajo peso molecular inducen cromosomas retardados y tendencia a husos multipolares.

Respecto al EGTA y EDTA, como se esperaría, tendieron a asociarse negativamente con los cromosomas retardados mas no con los husos multipolares. Sobre esto, se sabe que debido al peso molecular y a su naturaleza polar, muchos compuestos penetran por pinocitosis, por lo que quizás éste sea el caso del EDTA y EGTA, afectando a las proteínas desde la membrana. Esto conlleva cambios en la permeabilidad de la membrana al aumentar su entrada y modificar las vías de señalización, con cambios en las proteínas internas, los cuales participan en la modificación del ciclo celular, particularmente en la activación de las cinasas responsables del paso de G2 a mitosis, periodo determinante en la inducción de los cromosomas pegajosos. Este hecho se ha observado con la exposición a la plata coloidal



**Figura 2. Efecto del EGTA y EDTA en la frecuencia de anomalías anafásicas por DMSO y  $CCl_4$ .** Se muestran los  $CCl_4$  en células CHO; se analizaron alrededor de 250 anafases de triplicados. DMSO = dimetilsulfóxido; EGTA = ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoethyl éter)-*N,N,N',N'*-tetra acético;  $CCl_4$  = tetracloruro de carbono; EDTA = ácido etilendiaminotetraacético. Adaptada de Coutiño (47).



**Figura 3. Efecto del Ca<sup>2+</sup> y el EGTA en la inducción de anomalías anafásicas.** Exposición con Ca<sup>2+</sup> y EGTA en células meristemáticas de *Vicia faba* expuestas durante 90 min; se analizaron alrededor de 100 anafases de triplicados. Adaptada de (47).

que induce cinasa dependiente de ciclina CDK25 y que regula el paso G2 a M y procesos citotóxicos, ya que igualmente se asoció de forma inversa con la inducción de caspasa-3 (49).

No obstante, en el caso del DMSO y CCl<sub>4</sub> el incremento de los husos multipolares y sus disgregaciones se deben al efecto despolarizante y al Ca<sup>2+</sup>, los cuales se redujeron significativamente en presencia de los agentes quelantes, principalmente de las disgregaciones del huso mitótico provocadas por los compuestos volátiles. Esto sugiere que atrapar o quelar el Ca<sup>2+</sup> impide su efecto sobre el huso y la inducción de estas anomalías.

En los estudios de la figura 1 y lo reportado en las figuras 4 y 5, se muestra que a concentraciones bajas de DMSO y CCl<sub>4</sub> aumentan la mitosis, el número de vacuolas cercanas al núcleo, las células multinucleadas, y los micronúcleos, además se provocan cambios en la morfología de los núcleos (2,3).

Igualmente, al analizar los datos obtenidos por Coutiño en 1979 que se relacionan con los compuestos volátiles, se observó una mayor frecuencia de anomalías, mismas que se reportan en la tabla 4 (3). Con la prueba de asociación de Pearson, se corrobora que, efectivamente, los compuestos alquilantes inducen puentes cromosómicos como el EMS,

		Husos multipolares	Cromosomas retardados	Puentes cromosómicos	Cromosomas pegajosos
CCl <sub>4</sub>	Correlación de Pearson	<b>0.682***</b>	<b>0.674***</b>	0.315	<b>0.471**</b>
	Sig. (bilateral)	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.079	<b>0.006</b>
	N	32	32	32	32
DMSO	Correlación de Pearson	0.259	0.116	0.208	-0.186
	Sig. (bilateral)	0.152	0.526	0.253	0.308
	N	32	32	32	32
EGTA	Correlación de Pearson	-0.216	-0.270	0.083	-0.202
	Sig. (bilateral)	0.235	0.134	0.651	0.268
	N	32	32	32	32
EDTA	Correlación de Pearson	-0.036	-0.236	-0.249	0.193
	Sig. (bilateral)	0.846	0.194	0.170	0.290
	N	32	32	32	32

**Tabla 2. Análisis del efecto de los compuestos en función de las anomalías anafásicas estudiadas.** Nota: análisis de la asociación entre el efecto de los compuestos EDTA y CCl<sub>4</sub> con las anomalías anafásicas (Fig. 2). Se elaboró una base de datos en SPSS versión 18, la asociación entre las variables se realizó con la prueba de Pearson (P). \* = una P igual o menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativa; \*\* = muy significativa; \*\*\* = altamente significativa. Adaptada de Coutiño (48).

		Husos multipolares	Cromosomas retardados	Puentes cromosómicos	Cromosomas pegajosos
Punto de fusión	Correlación de Pearson	-0.462*	-0.406	-0.059	-0.287
	Sig. (bilateral)	0.04	0.076	0.804	0.219
	N	20	20	20	20
Densidad	Correlación de Pearson	-0.019	0.271	0.326	0.132
	Sig. (bilateral)	0.948	0.329	0.236	0.639
	N	15	15	15	15
Peso molecular	Correlación de Pearson	-0.417	-0.491*	-0.370	0.029
	Sig. (bilateral)	0.067	0.028	0.108	0.902
	N	20	20	20	20
Punto de ebullición	Correlación de Pearson	-0.417	-0.298	-0.070	0.021
	Sig. (bilateral)	0.067	0.281	0.804	0.927
	N	20	20	20	20

**Tabla 3. Análisis de correlación entre las variables fisicoquímicas y anomalías anafásicas por la exposición a CCl<sub>4</sub>, DMSO, EGTA y EDTA.** Nota: tabla asociada con las características fisicoquímicas. \* = una P igual o menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativa. Adaptada de Coutiño (48).

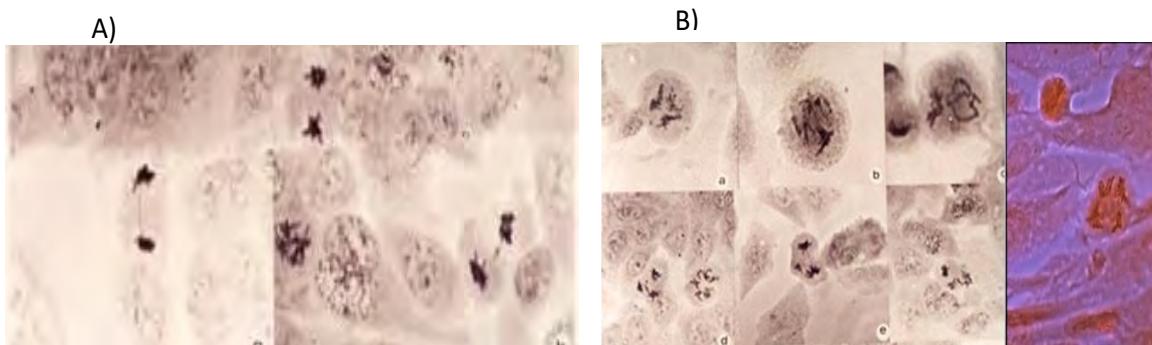
TEM e hicantona, que es un tioxanten, metabolito de lucantone que se utiliza en la stichosomiasis, ya que correlacionaron significativamente, como se observa en la tabla 4. En cambio, el acetoacetilaminofloureno (AMMF), que es intercalante por naturaleza, solo se asoció significativamente con los cromosomas pegajosos, como era de esperarse, al igual que el EMS, del cual no se ha reportado que sea intercalante. Quizá su efecto se deba a otros mecanismos que induzcan cromosomas pegajosos a través de su efecto sobre las proteínas de los cromosomas o sobre los telómeros, participando en la inestabilidad de los cromosomas o activando una sulfatasa.

Mientras que THPS mostró en el análisis de anafases una correlación significativa con los cromosomas retardados, el Ca<sup>2+</sup> podría estar aumentando por despolarización o en las proteínas del huso mitótico, como la tubulina, ya que modificó completamente la estructura celular, tal como se observa en la figura 1, inciso B (3). En cambio, la exposición con el CCl<sub>4</sub> mostró una correlación significativa con los husos multipolares, mientras que en la exposi-

ción del DMSO la correlación fue menor. Por su parte, EDTA y EGTA también tendieron a correlacionar negativamente con la inducción de cromosomas retardados, pero no de modo significativo. Estos resultados son muy semejantes a los descritos anteriormente.

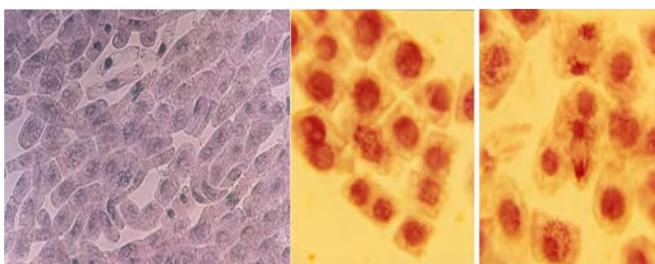
Por último, en la tabla 4, se correlacionan las alteraciones cromosómicas con las características fisicoquímicas de los compuestos volátiles, encontrando que los husos multipolares correlacionaron negativamente con el peso molecular (-0.502 p.009) y punto de fusión (-0.632 p.002). Lo que indica que la inducción de husos multipolares se asocia con el menor peso molecular y punto de fusión de los compuestos.

Estos datos, en conjunto, nos permiten determinar la participación del Ca<sup>2+</sup> por sí mismo o durante la despolarización de la membrana en la inducción de alteraciones genéticas, tanto las involucradas con aneuploidías, como era el propósito del trabajo, como también las relacionadas con daño cromosómico estructural. Además, con ellos sabemos que los compuestos con más bajo peso molecular y punto de fusión son los que más inducen aneuploidías,



**Figura 4. Frecuencia de anomalías anafásicas en células CHO.** **A)** Se observan anomalías anafásicas tratadas por EDTA (véase los puentes del lado izquierdo y EGTA (véase derecha). **B)** Se muestran células CHO expuestas a CCl<sub>4</sub> y DMSO sin y con EDTA y EGTA, teñidas con aceto orceina y naranja de mercurio. DMSO = dimetilsulfóxido; EGTA = Ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetra acético; CCl<sub>4</sub> = tetracloruro de carbono; EDTA = ácido etilendiaminotetraacético. Estas imágenes son representativas de los resultados que se muestran en la figura 2. Tomada de Coutiño (48).

lo que representa un riesgo a la salud en exposiciones crónicas, por su volatilidad, ya que se difunden a través de la membrana lipídica para activar vías de señalización y movilizar el Ca<sup>2+</sup> del RE, de modo que el Ca<sup>2+</sup> afecte la condensación de cromosomas. Existen datos sobre la movilización del Ca<sup>2+</sup> al núcleo y durante la mitosis que nos indican su participación en la compactación de los cromosomas. Posiblemente el Ca<sup>2+</sup> sea crucial en la inducción de cromosomas peggiosos y puentes isocromáticos, los cuales se dan en la fase G2 del ciclo celular.



**Figura 5. Anomalías anafásicas en meristemos de *Vicia faba*.** En la imagen se observa el efecto del Ca<sup>2+</sup> y del EGTA en el incremento de las anomalías anafásicas. Se observan células meristemáticas expuestas a Ca<sup>2+</sup> y EGTA teñidas con aceto orceina y verde Janus a 40x y 100X. EGTA = Ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetra acético. Tomada de Coutiño (48).

Igualmente, al despolarizar la membrana ocurren cambios en la permeabilidad que pueden permitir la entrada de más compuesto y, por tanto, más movimiento del Ca<sup>2+</sup> interno, lo cual afecta muchas actividades celulares que dependen de la relación entre cisteína libre y unión disulfuro de las proteínas, que regula el Ca<sup>2+</sup>. Este es el caso del citoesqueleto, de las histonas, del retículo endoplásmico, las mito- que regula el Ca<sup>2+</sup>. Este es el caso del citoesqueleto, de las histonas, del retículo endoplásmico, las mito-

condrias y el sistema endosomal, que tienen que ver con la compactación o contracción de los cromosomas, como demostró (14), y cuya consecuencia es que se afecte la distribución equitativa del material genético en los cromosomas, induciendo alteraciones genéticas, principalmente las conocidas como aneugénesis (2), lo cual lleva a la autofagia o muerte celular por apoptosis (17).

Los efectos de los compuestos volátiles en la aneugénesis son resultado del Ca<sup>2+</sup> por la despolarización de la membrana, como se demuestra en estos análisis, cuyo poder reductor actúa principalmente en las uniones disulfuro rompiéndolas y liberando energía; por tanto, se modifica la relación de tioles libres de las proteínas. Entre estas últimas se encuentran cinasas como CDK1 o CHK1, dependientes de Ca<sup>2+</sup>, el cual, al romper uniones disulfuro, libera energía suficiente para llevar a cabo procesos de fosforilación.

El papel del Ca<sup>2+</sup> en daños genéticos, como los aneugénicos, es de suma importancia porque su incremento depende de la actividad de muchos compuestos liposolubles ambientales, los cuales son persistentes y se van bioacumulando en cadenas tróficas. Además, dadas sus características fisicoquímicas y su carácter liposoluble, estos compuestos también actúan como disruptores hormonales e inmunotóxicos, tal como se ha demostrado con la gran mayoría de los xenobióticos (Xb) ambientales persistentes. Por otra parte, si son inmunotóxicos actuarán como xenohormona o disruptor endocrino (EDC, por sus siglas en inglés) capaces de modificar la respuesta hormonal; y de acumularse principalmente en tejidos ricos en lípidos, como la médula adrenal, la glándula mamaria, los ovarios y el cerebro, asociándose en este último con problemas cognitivos; por tanto, los compuestos liposolubles ambientales tendrán repercue-

A	B	Husos multipolares	Cromosomas retardados	Puentes cromosómicos	Cromosomas pegajosos
EMS $4 \times 10^{-4} M$	Correlación de Pearson			<b>0.409*</b>	<b>0.757***</b>
	Sig. (bilateral)			<b>0.042</b>	<b>0.000</b>
TEM $1 \times 10^{-6} M$	Correlación de Pearson		<b>0.398*</b>	0.375	
	Sig. (bilateral)		<b>0.042</b>	0.06	
<i>Hicantona</i> $1.9 \times 10^{-5} M$	Correlación de Pearson		0.398	<b>0.513**</b>	
	Sig. (bilateral)		0.09	<b>0.009</b>	
Ciclofosfamida $2.9 \times 10^{-4} M$	Correlación de Pearson			0.375*	
	Sig. (bilateral)			0.06	
AAMF $6.3 \times 10^{-6} M$	Correlación de Pearson				<b>0.550**</b>
	Sig. (bilateral)				<b>0.004</b>
$CCl_4$ $5.2 \times 10^{-5} M$	Correlación de Pearson	<b>0.637**</b>			
	Sig. (bilateral)	<b>0.001</b>			
DMSO $3.6 \times 10^{-5} M$	Correlación de Pearson	0.375			
	Sig. (bilateral)	0.091		.	
THPS $2.4 \times 10^{-4} M$	Correlación de Pearson		<b>0.528**</b> <b>0.007</b>		
	Sig. (bilateral)			.	
EGTA $1 \times 10^{-4} M$	Correlación de Pearson	-0.321	-0.333		
	Sig. (bilateral)	0.130	0.104	.	.
EDTA $2 \times 10^{-4} M$	Correlación de Pearson		-0.356		
	Sig. (bilateral)		0.081	.	
Peso molecular	Correlación de Pearson	<b>-0.502**</b>		.	
	Sig. (bilateral)	<b>0.009</b>		.	
Punto de fusión	Correlación de Pearson	<b>-0.632**</b>			
	Sig. (bilateral)	<b>0.001</b>			
N=24					

**Tabla 4. Asociación del efecto de los compuestos volátiles y sus características fisicoquímicas en función de las aneuploidías. Nota.** EMS = metanosulfonato de etilo o etilmetasulfonato; TEM = trietilen melamina; AAMF = acetoacetilaminofluoreno;  $CCl_4$  = tetracloruro de carbono; DMSO = dimetilsulfóxido; THPS = sulfato de tetrakis (hidroximetil) fosfonio; EGTA = Ácido etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetra acético; EDTA = ácido etilendiaminotetraacético. Adaptada de análisis de Coutiño (2,3).

siones al nivel de los mecanismos de defensa química e inmune, a nivel hormonal, conductual, neuronal y de los genotóxicos, por sus efectos mediante el  $\text{Ca}^{2+}$ , por acción de sus metabolitos o de ellos mismos.

Básicamente, el efecto de cualquier compuesto químico empieza a través de la membrana plasmática, y dependiendo de la forma de entrada de estos compuestos, se pueden activar vías comunes de señalización para la expresión de genes, tal como ocurre con la entrada de virus y bacterias. De ahí que las vías de señalización se parezcan, y por ello incrementan las respuestas celulares fisiológicamente normales, como la proliferación e inducción de mitosis, la diferenciación, la citotoxicidad, la necrosis o apoptosis y la respuesta inmune (50).

Los mecanismos de entrada de los compuestos en la célula están en función del tamaño de la molécula, el peso, la polaridad, la carga, el coeficiente de partición, la volatilidad y la densidad (31). Como se demostró, estos mecanismos están asociados con su efecto, ya que la inducción de husos multipolares se relaciona con el peso molecular y punto de fusión; estas variables, además, se vinculan con su volatilidad por lo que representan un riesgo a la salud, debido a la facilidad de dispersarse, difundirse y de afectar a los organismos expuestos, principalmente por exposiciones crónicas.

Desde los años 70, estudios epidemiológicos realizados a individuos varones expuestos a halotano, cloropreno y cloruro de vinilo mostraron una elevada incidencia de abortos espontáneos en sus parejas, inducción de malformaciones congénitas y cáncer. Estas alteraciones se caracterizan por modificaciones del complemento cromosómico e inestabilidad cromosómica, de ahí que compuestos como el halotano, cloropreno, cloruro de vinilo, además de plaguicidas como el DDT, lindano, pentaclorofenol, paratión, entre otros; pesticidas como paraquat, diclorobenceno, malatión y organoclorados; vapores de deshecho industrial como dioxinas (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD); bifenilos policlorados (Aroclor 1254); compuestos como el benceno, tetracloruro de carbono cloroformo, entre otros con una alta volatilidad; al igual que metales como el arsénico, plomo, mercurio y cadmio, que vienen en formulaciones de plaguicidas, representen un gran riesgo a la salud, ya

que la mayoría son carcinogénicos, disruptores hormonales, neurotóxicos e inmunotóxicos.

Estos efectos obedecerían, independientemente de su acción, mutagénica o no, a su actividad al polarizar membranas, movilizar el  $\text{Ca}^{2+}$  y romper las uniones disulfuro de proteínas, lo cual afecta su plegamiento y altera los procesos biológicos; esto se encuentra vinculado a muchas enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas y genéticas de interés. Así, el  $\text{Ca}^{2+}$  favorece el estado redox del RE y su descontrol altera su homeostasis, debido a que el plegamiento oxidativo de proteínas y la producción de las ERO están estrechamente relacionados con el estado redox (Cao *et al.*, 2014), el cual puede verse alterado por los reactivos reductores, el propio  $\text{Ca}^{2+}$ , así como oxidantes (ERO), interrumpiendo la homeostasis o induciendo el estrés del RE.

## Conclusión

La exposición a compuestos volátiles se asocia con la inducción de anomalías anafásicas principalmente aneuploidías, vinculadas con los husos multipolares en células en cultivos. Se determina que ante la presencia de agentes quelantes de calcio, el peso molecular, el punto de fusión y ebullición están relacionados con la inducción de husos multipolares, lo que nos permite determinar la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la despolarización de la membrana y en la inducción de alteraciones genéticas de tipo aneuploidías y poliploidías; confirmando el papel de las proteínas y la participación del calcio en la peligrosidad y riesgo de la exposición a compuestos volátiles y no volátiles ambientales que actúan como aneugenos, difícilmente controlables.

Por otro lado, la asociación entre los compuestos volátiles y el calcio es de gran relevancia debido a la activación de vías de señalización que participan en alteraciones a nivel de la proliferación celular e inducción de mitosis, en procesos de diferenciación celular, citotoxicidad, necrosis, apoptosis, o en la respuesta inmune. Esto se relaciona con enfermedades asociadas al plegamiento de proteínas ya que la desregulación del calcio afecta principalmente el balance redox del RE y con ello al plegamiento de proteínas, alterando diversos procesos biológicos y causando enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas y genéticas de interés en salud pública.



## Referencias

1. Pacchierotti F, Masumura K, Eastmond DA, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, et al.

Chemically induced aneuploidy in germ cells. Part II of the report of the 2017 IWGT workgroup on

- assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2019 Dec 1;848:403023.
- 2.** Coutiño E. Analysis of anaphase in cell culture: an adequate test system for the distinction between compounds which selectively alter the chromosome structure or the mitotic apparatus. *Environ Health Perspect [Internet]*. 1979 Aug [cited 2025 May 30];31:131. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1637635/>
- 3.** Coutiño E. Análisis de anafases en células en cultivo: un sistema adecuado para la distinción de compuestos que alteran selectivamente la estructura cromosómica o el aparato mitótico [Tesis de maestría]. UNAM; 1979.
- 4.** Von Ledebur M, Schmid W. The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1973 Jul 1;19(1):109–17.
- 5.** Nichols W, Moorhead P, Brewer G, Adler I, Conger A, German J, et al. Chromosome methodologies in mutation testing. Report of the Ad Hoc Committee of The Environmental Mutagen Society and The Institute for Medical Research. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1972;22(269).
- 6.** Ames BN, Lee FD, Durston WE. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]*. 1973 Mar 1 [cited 2025 May 30];70(3):782–6. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.70.3.782>
- 7.** Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 1975 Dec 1;31(6):347–63
- 8.** Legator M, Pullin T, Connor T. The isolation and detection of mutagenic substances in body fluid and tissues of animals and body fluid of human subjects. In: Kilbey B, Legator M, Nichols W, Ramal C, editors. *Handbook of mutagenicity test procedures*. Elsevier Scientific Publishing Co.; 1977. p. 149–59.
- 9.** More SJ, Bampidis V, Bragard C, Halldorsson TI, Hernández-Jerez AF, Hougaard Bennekou S, et al. Guidance on aneugenicity assessment. *EFSA Journal*. 2021 Aug 1;19(8).
- 10.** Coulston F, Henry Wills J. Mutagenic, carcinogenic and teratogenic effects of pollutants in respect to man. *Pure and Applied Chemistry [Internet]*. 1975 Jan 1 [cited 2025 May 30];42(1–2):209–22. Available from: <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1351/pac197542010209/html>
- 11.** Hay A. Identifying carcinogens. *Nature [Internet]*. 1977 Oct 1 [cited 2025 May 30];269(5628):468–70. Available from: <https://www.nature.com/articles/269468a0>
- 12.** Buffler P, M. Aase J. Genetic risks and environmental surveillance: epidemiological aspects of monitoring industrial populations for environmental mutag. *Journal of Occupational Medicine [Internet]*. 1982 [cited 2025 May 30];24(4):305–14. Available from: <https://www.jstor.org/stable/45014196>
- 13.** Infante P. Epidemiological studies in occupational exposure to waste anesthetics, gases and vapors. In: *Métodos para la detección de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales*. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; 1979.
- 14.** Östergren G. Colchicine mitosis, chromosome concentration, narcosis and protein chain folding. *Hereditas [Internet]*. 1944 Mar 1 [cited 2025 May 30];30(3):429–67. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1601-5223.1944.tb02739.x>
- 15.** Levan A. The effect of colchicine on root mitoses in Allium. *Hereditas*. 1938;(24):471–86.
- 16.** Seeman P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol Rev [Internet]*. 1972 Dec 1 [cited 2025 May 30];24(4):583–655. Available from: <https://pharmrev.aspetjournals.org/action/showFullText?pii=S0031699725069315>
- 17.** Almanza A, Carlesso A, Chintha C, Creedican S, Doultsinos D, Leuzzi B, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling—from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J [Internet]*. 2018 Jan 1 [cited 2025 May 30];286(2):241. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7379631/>
- 18.** Mayati A, Levoine N, Paris H, N'Diaye M, Courtois A, Uriac P, et al. Induction of intracellular calcium concentration by environmental benzo(a)pyrene involves a  $\beta$ 2-adrenergic receptor/adenylyl cyclase/Epac-1/inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in endothelial cells. *J Biol Chem [Internet]*. 2012 Feb 3 [cited 2025 May 30];287(6):4041–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22167199/>
- 19.** Ghibelli L, Cerella C, Diederich M. The dual role of calcium as messenger and stressor in cell

- damage, death, and survival. *Int J Cell Biol* [Internet]. 2010 [cited 2025 May 30];2010. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20300548/>
- 20.** Coutiño E. Sulfhidrilos como centros nucleofílicos y su participación en los procesos mutagénicos. *Curso Internacional sobre Mutágenos y Carcinógenos Ambientales y Métodos para su detección*. 1979.
- 21.** Coutiño E. Participación del Ca<sup>2+</sup> en la relación de cisteína disulfuro de las proteínas en la producción de daño genético. Xalapa, Veracruz: VII Jornadas de la Asociación de Médicos de Mexicana A.C.; 1994.
- 22.** Mazia D, Prescott DM. Nuclear function and mitosis. *Science* (1979) [Internet]. 1954 [cited 2025 May 30];120(3108):120–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13178668/>
- 23.** Kuriyama R, Sakai H. Role of tubulin-SH groups in polymerization to microtubules. Functional-SH groups in tubulin for polymerization. *J Biochem* [Internet]. 1974 [cited 2025 May 30];76(3):651–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4474165/>
- 24.** Marcum JM, Dedman JR, Brinkley BR, Means AR. Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(8):3771–5.
- 25.** Brinkley BR, Fuller GM, Highfield DP. Cytoplasmic microtubules in normal and transformed cells in culture: analysis by tubulin antibody immunofluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 1975 Dec 1 [cited 2025 May 30];72(12):4981–5. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.72.12.4981>
- 26.** Rifkin DB. Cross-talk among proteases and matrix in the control of growth factor action. *Fibrinolysis and Proteolysis*. 1997 Jan 1;11(1):3–9.
- 27.** Rifkin DB, Mazzieri R, Munger JS, Noguera I, Sung J. Proteolytic control of growth factor availability. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* [Internet]. 1999 Mar 1 [cited 2025 May 30];107(1):80–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1699-0463.1999.tb01529.x>
- 28.** Brzozowski JS, Skelding KA. The multi-functional calcium/calmodulin stimulated protein kinase (CaMK) family: Emerging targets for anti-cancer therapeutic intervention. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2025 May 30];12(1):8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6469190/>
- 29.** Rodríguez-Gómez A de J, Frias-Vázquez S. La mitosis y su regulación. *Acta Pediátrica de México* [Internet]. 2014 [cited 2025 May 30];35(1):55–86. Available from: [www.actapediatricademexico.org](http://www.actapediatricademexico.org)
- 30.** Skelding KA, Rostas JAP, Verrills NM. Controlling the cell cycle: The role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. *Cell Cycle* [Internet]. 2011 Feb 15 [cited 2025 May 30];10(4):631–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.10.4.14798>
- 31.** Coutiño E, Ávila L, Arroyo O. Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica* [Internet]. 2017 [cited 2024 Apr 4];36(2):39–54. Available from: [https://www.medicographic.com/pdfs/revedubio/reb\\_2017/reb172b.pdf](https://www.medicographic.com/pdfs/revedubio/reb_2017/reb172b.pdf)
- 32.** Rojas-Espinosa O, Arce-Paredes P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Primera parte. *Bioquímica*. 2003;35:55–86.
- 33.** Kornuta N, Bagley E, Nedopitanskaya N. Genotoxic effects of pesticides. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1996;15(2–4):75–8.
- 34.** Saleh MA. Mutagenic and carcinogenic effects of pesticides. *Journal of Environmental Science & Health Part B* [Internet]. 1980 Jan 1 [cited 2025 May 30];15(6):907–27. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601238009372222>
- 35.** Rakitsky VN, Turusov VS. The mutagenic and carcinogenic activity of chemical compounds. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2005;(3):7–9.
- 36.** Ashby J, Tennant RW. Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1988 Jan 1;204(1):17–115.
- 37.** Verheyen GR, Van Deun K, Van Miert S. Testing the mutagenicity potential of chemicals. *J Genet Genome Res*. 2017 Dec 31;4(1).
- 38.** Gold LS, Slone TH, Stern BR, Bernstein L. Comparison of target organs of carcinogenicity for mutagenic and non-mutagenic chemicals. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1993 Mar 1;286(1):75–100.
- 39.** Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, et al. Report

- from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):167–72.
- 40.** Uceda AB, Mariño L, Casasnovas R, Adrover M. An overview on glycation: molecular mechanisms, impact on proteins, pathogenesis, and inhibition. *Biophys Rev* [Internet]. 2024 Apr 12 [cited 2025 May 30];16(2):189–218. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12551-024-01188-4>
- 41.** Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2025 May 30];58(5):235–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28485537/>
- 42.** Galdieri L, Zhang T, Rogerson D, Lleshi R, Vancura A. Protein acetylation and acetyl coenzyme a metabolism in budding yeast. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2025 May 30];13(12):1472–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25326522/>
- 43.** Wang Z, Zhu WG, Xu X. Ubiquitin-like modifications in the DNA damage response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2017 Oct 1;803–805:56–75.
- 44.** Petsalaki E, Zachos G. DNA damage response proteins regulating mitotic cell division: double agents preserving genome stability. *FEBS J* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2025 May 30];287(9):1700–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.15240>
- 45.** Puerta-Ortiz JA, Morales-Aramburo J. Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes. *Revista Colombiana de Cardiología* [Internet]. 2020 [cited 2025 May 30];27(S1):61–71. Available from: [www.elsevier.es/revcolcar](http://www.elsevier.es/revcolcar)
- 46.** Wu X, Nethery RC, Sabath B, Braun D, Dominici F, James C. Exposure to air pollution and COVID-19 mortality in the United States: A nationwide cross-sectional study. *MedRxiv* [Internet]. 2020 Apr 27 [cited 2025 May 30];2020.04.05.20054502. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.05.20054502v2>
- 47.** Coutiño E. Papel de la membrana en las aneuploidías. 11o Congreso Latinoamérica de Genética y 3.er Congreso de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis, Ambiental. Puerto Vallarta, Guadalajara; 1994.
- 48.** Coutiño E. Despolarizantes de membrana y la participación del calcio en la inducción de anomalías anafásicas [Sesión de congreso]. In: Congreso Nacional de Biotecnología y Salud Ambiental. Zacatecas; 2019.
- 49.** Coutiño E. Plata coloidal sus repercusiones a la salud. In: XXVII Congreso de Bioquímica. Mérida; 2008.
- 50.** Ávila L, Coutiño E, Arroyo O. Hemoxygenase-1, iron, and bilirubin levels as oxidative stress indicators of colloidal silver exposure in human lymphocytes. *Int J Adv Res (Indore)*. 2023 Feb 28;11(02):398–405.