

20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

"ESTUDIO DEL EFECTO GENOTOXICO DEL METOTREXATO CON EL ENSAYO COMETA EN LINFOCITOS HUMANOS".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

SUSANA ENCISO SOSA

BAJO LA DIRECCION DE: M. en C. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO  
DRA. GILDA FLORES ROSALES.

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO. MARZO, 2000

280270



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

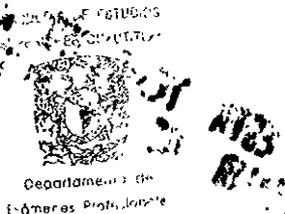


UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
P R E S E N T E



ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

" Estudio del efecto genotóxico del metotrexato con el ensayo cometa  
en linfocitos humanos "

que presenta la pasante Susana Enciso Sosa  
con numero de cuenta 9009032-3 para obtener el TITULO de  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo de Méx., a 3 de Marzo del 2000.

PRESIDENTE QFL Leticia Zúñiga Ramírez

VOCAL M. En C, Sandra Díaz Barriga Arceo

SECRETARIO QFB. Virginia oliva Arellano

PRIMER SUPLENTE QFB. Rosalba Bonilla Sánchez

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Norma Laura Delgado Buenrostro

La presente investigación formó parte del proyecto PAPIIT **IN502197** *Detección temprana de toxicidad en un modelo celular in vitro*. Realizado en el laboratorio anexo L-521 de la F.E.S. Cuautitlán.

Parte de éste trabajo fue presentado en el *V Congreso Conjunto de las Sociedades Mexicanas de Genética y Toxicología Genética*, en la modalidad de cartel bajo el título "Detección temprana de la genotoxicidad del Metotrexato en linfocitos humanos" el día 30 de Septiembre de 1998 en Acapulco, Gro. México.

Con la presente investigación se participó en el XXXII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas de la Asociación Farmacéutica Mexicana en la modalidad de presentación oral con el título "Estudio *in vitro* del daño del Metotrexato a concentraciones clínicas sobre linfocitos humanos" los días 24 a 28 de Octubre de 1999, en Pto. Vallarta, Jal. México.

## AGRADECIMIENTOS.

Doy gracias a DIOS, por el entorno y fuerza que hasta hoy me ha dado para lograr uno de los objetivos más importantes en mi vida.

### GRACIAS...

A mis PADRES, ROSITA y NASARIO, por el apoyo que de ellos recibí durante toda mi educación.

A mi MADRE, porque nunca dudaste de mí, y en los momentos críticos me diste ánimo para continuar. No olvides que te quiero mucho.

A QUIQUE, por tu incondicional donación de sangre para la realización de ésta Tesis, porque cuando te tomaba las muestras, aunque te doliera no te quejabas; por estar a mi lado, por apoyarme en buenos y malos momentos, y por opinar respetando mis decisiones.

¡Ahora... sólo faltas TÚ!

(TE AMO)

A mis tíos, ADRIÁN y TERE,  
por disfrutar vernos crecer a Erika y a mí,  
por su apoyo a nuestra familia  
y por sus sabias frases a manera de consejo:

“El presente es de lucha, y el futuro es nuestro”

“Nuestra garantía, es nuestra preparación”

Agradezco a la institución que formó  
mi estructura académica, la U.N.A.M.,  
pero muy especialmente a la F.E.S. CUAUTITLÁN.

Por otra parte, agradezco a todas (os) mis  
PROFESORAS (ES) la parte que de ellas (os)  
me ofrecieron y tomé;  
no sólo académicamente, sino también  
personal y afectivamente, lo cual  
de alguna manera es parte de lo que soy.

Especialmente, quiero agradecer a la  
DRA. GILDA FLORES y a la M. SANDRA DÍAZ,  
por su paciencia, sus aportaciones, su guía  
y sus consideraciones, durante el desarrollo  
de ésta investigación.



## CONTENIDO

<b>Índice de tablas y figuras</b>	<b>i</b>
<b>Índice de abreviaturas</b>	<b>ii</b>
<b>Resumen</b>	<b>iii</b>
<b>Introducción</b>	<b>v</b>

## **Capítulo I. ANTECEDENTES**

### **1.- El linfocito humano y la toxicología genética**

Ontogenia del linfocito humano	1
Funciones biológicas de los linfocitos	4
Morfología de los linfocitos humanos	7
Toxicología genética	
Surgimiento	10
Ensayos citogenéticos que utilizan al linfocito humano como modelo celular para evaluar la genotoxicidad de los xenobióticos	
Análisis de metafase	12
Intercambio de cromátidas hermanas	14
Características de los donadores	16

### **2.- Ensayo Cometa**

El ensayo Cometa	18
Principios de detección	
Detección de rupturas en el ADN	19
Sistemas de evaluación	21
Usos y posibles aplicaciones	25



### 3.- El Metotrexato

#### Generalidades

Descripción general	27
Usos y aplicaciones	30
Toxicidad general	31
Absorción, biotransformación, destino y excreción	32
Mecanismo de acción	36
Relación estructura – actividad	38
Resistencia al metotrexato	39

## Capítulo II. OBJETIVOS

Objetivos	41
-----------	----

## Capítulo III. HIPÓTESIS

Hipótesis	42
-----------	----

## Capítulo IV. PARTE EXPERIMENTAL

### 1.- Material

Material diverso	43
Material biológico	43
Equipo	44
Reactivos	45

### 2.- Métodos

Preparación de la solución de metotrexato	46
Toma de muestra	46
Aislamiento de linfocitos	46
Viabilidad celular	47
Ensayo Cometa	47



Grupo experimental adicional	49
Análisis estadístico	50

## **Capítulo V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### Resultados

Viabilidad celular	51
Análisis estadístico de la relación longitud/diámetro	52
Distribución porcentual celular de la relación longitud/diámetro	53

Discusión	57
-----------	----

## **Capítulo VI. CONCLUSIONES**

Conclusiones	61
--------------	----

## **Capítulo VII. BIBLIOGRAFÍA**

Bibliografía	62
Direcciones electrónicas	69
Referencia de programa estadístico	69



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## TABLAS

Tabla 1	Principales actividades de los linfocitos humanos.	5
Tabla 2	Resultados de viabilidad celular en el aislamiento de los linfocitos humanos por gradiente con Ficoll-Hypaque antes y después de la exposición a las diferentes concentraciones de MTX	51
Tabla 3	Análisis estadístico de los valores obtenidos en la relación longitud/diámetro de los linfocitos expuestos a las diferentes concentraciones de MTX	52
Tabla 4	Distribución porcentual de la relación longitud/diámetro celular	55

## FIGURAS

Figura 1	Microfotografía de linfocitos humanos	5
Figura 2	Desarrollo inmunológico temprano en el humano	6
Figura 3	Morfología de los linfocitos humanos.	9
Figura 4	Observación microscópica de un análisis de metafase con bandeó G.	14
Figura 5	Imágenes obtenidas después de la electroforesis y tinción en el ensayo cometa	23
Figura 6	Imágenes digitalizadas del análisis de una célula en cometa, utilizando el sistema de analizador de imágenes.	24
Figura 7	Estructura química del MTX y el ácido fólico	29
Figura 8	Estructura básica de los poliglutamatos de MTX, resultantes de la biotransformación celular	35
Figura 9	Bloqueo del MTX en la regeneración del tetrahidrofolato	37
Figura 10	Diagrama de flujo de la fase experimental de la presente investigación	50
Figura 11	Comparación del promedio de la relación longitud/diámetro entre las concentraciones de MTX, controles positivo y negativo, y 5µg/ml de MTX + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	54
Figura 12	Distribución porcentual en áreas de la relación longitud/diámetro celular, comparando los diferentes grupos experimentales	56



INDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AP	Apurínico/apirimidínico
ARN	Acido ribonucleico
BCR	Receptor del linfocito B
BrdU	Bromo desoxiuridina
dUMP	Desoxiuridilato
DH <sub>2</sub>	Dihidrofolato
DH <sub>4</sub>	Tetrahidrofolato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
MTX	Metotrexato
NADPH	Nicotinamidadenindinucleótido fosfato reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleótido fosfato oxidado
PHA	Fito hemaglutinina
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TCR	Receptor del linfocito T
CD	Marcadores de membrana o antígenos de diferenciación



## RESUMEN

En la actualidad, la contaminación ambiental por agentes químicos potencialmente tóxicos es una preocupación a nivel mundial debido a los riesgos y efectos que conlleva para la salud humana y los ecosistemas en general; en el campo de la salud, la incertidumbre con respecto a la probabilidad de ocurrencia de un efecto tóxico particular derivado de la exposición a los agentes químicos y medicamentos, es hoy extremadamente alta

El interés de realizar un estudio de genotoxicidad del metotrexato (mtx) surge de la observación de los severos efectos adversos comúnmente presentes en los pacientes que padecen algún tipo de cáncer y que reciben un tratamiento con este fármaco a dosis inicialmente terapéuticas y posteriormente elevadas de forma frecuente

El material biológico empleado fue sangre periférica tomada por punción venosa de un donador masculino clínicamente sano, de 24 años de edad, sin hábitos de beber y fumar, y que durante al menos 15 días previos al estudio no tomó medicamentos. En este estudio se probaron cuatro diferentes concentraciones de metotrexato (5, 10, 15, y 20µg/ml) que se encuentran entre la concentración plasmática terapéutica, la concentración tóxica y concentraciones por arriba de ésta, utilizando un control negativo y un control positivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> simultáneamente

El modelo celular utilizado fueron los linfocitos humanos que se obtuvieron a partir de la muestra de sangre por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque, de aquí, se preparó una suspensión celular de 350000 céls/ml y éstas se expusieron al metotrexato durante 1 hora. Se realizó también un grupo experimental adicional en el que después de la exposición de los



linfocitos a  $5\mu\text{g/ml}$  de metotrexato (MTX) durante 15 minutos, éstos mismos se expusieron a  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 45 minutos. Posteriormente se procedió, en todos los casos, a la realización del Ensayo Cometa

Debido a que el Ensayo Cometa es una técnica de diagnóstico sensible, rápida, reproducible y confiable, se eligió como prueba de monitoreo para estudiar el comportamiento genotóxico del metotrexato (MTX) sobre linfocitos humanos. El presente estudio se llevó a cabo *in vitro*, sin la adición de fracción microsomal hepática

Los resultados en las células sometidas a las concentraciones de MTX probadas en éste experimento, mostraron tener una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo en las concentraciones de 10, 15, y  $20\mu\text{g/ml}$ ; y con respecto al control positivo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultaron tener diferencia estadísticamente significativa las concentraciones de 5, 10 y  $15\mu\text{g/ml}$ . Los datos obtenidos en el grupo experimental adicional ( $5\mu\text{g/ml}$  de MTX +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), señalan que existe una diferencia estadísticamente significativa respecto a todas las concentraciones de MTX probadas e incluso a los controles positivo y negativo. Lo anterior, indica que el MTX presenta un efecto genotóxico sobre los linfocitos humanos en concentraciones de 10, 15 y  $20\mu\text{g/ml}$ . Además, de esto se deriva que aun en concentraciones más pequeñas el MTX induce lesiones al ADN que representan un alto riesgo cuando van seguidas por la exposición a otro agente que interactúa directa o indirectamente con el material genético.

Se espera que este trabajo aporte datos importantes en el diseño de estrategias terapéuticas en los pacientes con algún tipo de cáncer, que reciben metotrexato en su tratamiento.



## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha demostrado que los linfocitos y el sistema linfóide ocupan una posición importante en el esquema de los mecanismos específicos de defensa del organismo, tanto humoral como celular, aunque no pertenecen a los mecanismos de reparación (Male, 1985).

El hecho de que los linfocitos se encuentren en circulación interactuando con el fármaco, que también se mantiene en circulación, sugiere que si el Metotrexato (MTX) es un agente genotóxico, los linfocitos serán representativos e indicativos de sus efectos tóxicos; además, éstas células son de fácil obtención y representan un sistema biológico cerrado en el que los resultados se aplican directamente al humano, ya que el fármaco se emplea en él. La característica de permanecer nucleados puede verse como una ventaja, debido a que esto es esencial para ser utilizados como modelo celular en el Ensayo Cometa.

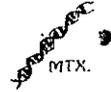
El Ensayo Cometa nos es útil porque reúne sensibilidad, rapidez, reproducibilidad y confiabilidad siendo una técnica microelectroforética para la visualización directa de daño al DNA ( Ostling, 1984 ), utilizando solo una pequeña cantidad de muestra para proporcionar los datos del daño al DNA y de reparación por célula individual (Singh y Tice, 1991), por lo que en esta ocasión se ha elegido como prueba de monitoreo para la detección del efecto genotóxico del MTX en linfocitos humanos.

Aunque las células humanas más comúnmente utilizadas en genotoxicología son los linfocitos (Fairbairn, 1995), algunos parámetros pueden afectar la respuesta de éstos en los



ensayos en cultivo para detectar el daño, pues se ha reportado una considerable variabilidad de la formación del cometa usando la electroforesis unicelular (De Méo, 1991); Sin embargo, se sabe que esta variabilidad se debe a diferentes factores como edad del donador (Singh, 1989; Singh, 1990) y actividad física (Hartmann, 1994), así como hábitos de fumar (Betti, 1993), lo cual se ha considerado seriamente en este estudio para poder mostrar resultados verdaderamente útiles.

## Capítulo I. ANTECEDENTES



## ANTECEDENTES

### I.- El linfocito humano y la Toxicología Genética

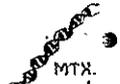
#### Ontogenia del linfocito humano

Las principales células del sistema inmune son los linfocitos (fig. 1), los cuales pueden ser T y B. Los primeros derivan de la médula ósea, pero maduran en el Timo; los segundos también derivan de la médula ósea de los huesos largos y maduran en los ganglios.

Lo mismo que las demás células de la sangre, los linfocitos T y B abandonan el tejido hematopoyético de la médula ósea de los huesos largos, pasan a la sangre, circulan por los vasos sanguíneos y se distribuyen por todo el cuerpo. Se localizan principalmente en órganos linfoides como el Timo o los ganglios, pero también pueden infiltrar todos los demás tejidos que pertenecen a otros sistemas y pueden encontrarse dispersos en las áreas intersticiales del hígado, piel, pulmón, etc (Tamayo, 1997)

La ontogenia de los linfocitos consiste en la serie de cambios fenotípicos y funcionales que les ocurren, desde que se originan en los tejidos hematopoyéticos hasta que maduran en los órganos linfoides y adquieren todas las funciones que los caracterizan.

El desarrollo del sistema inmunológico se inicia durante las primeras etapas de la vida embrionaria (fig 2), a partir de las células pluripotenciales del tejido hematopoyético. Las primeras células precursoras del tejido hematopoyético aparecen en el saco vitelino; A medida que avanza el desarrollo embrionario, esas células pluripotentes migran hacia varios órganos y

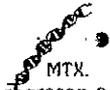


colonizan principalmente la médula ósea de los huesos largos y el hígado, en donde forman los primeros focos del tejido hematopoyético, en los cuales se generan los precursores de los linfocitos (Tamayo, 1997).

En los centros de tejido hematopoyético, las células progenitoras del tejido linfoide (linfoblastos) ya tienen definida la orientación de su maduración hacia una de las dos poblaciones de linfocitos, T o B, éstas células pueden ser identificadas como linfocitos pro-T o pro-B. Para que los linfocitos progenitores maduren, es necesario que se encuentren en los órganos que les proporcionan un micro ambiente adecuado que inicialmente se encuentra en la misma médula ósea. Las células precursoras todavía no pueden expresar las funciones de los linfocitos T y B maduros, y tampoco tienen sobre su membrana todas las moléculas que los caracterizan.

Una vez que han abandonado la médula y que han pasado a la circulación, las células tienen un destino diferente según expresen marcadores de los linfocitos pre-T o pre-B.

Las células pre-T migran al Timo siendo aún inmaduras. En el Timo no solamente ocurre la maduración, sino también su selección, de acuerdo a la especificidad del TCR para reconocer antígenos propios o extraños. La selección negativa implica la muerte de todos aquellos linfocitos T, cuyos receptores pueden reconocer antígenos propios. La selección intratímica es positiva cuando quedan vivos los linfocitos T que no tienen un TCR autorreactivo. Una vez que han madurado las células pre-T, bajo un micro ambiente tímico que contiene hormonas, citocinas y neurotransmisores que influyen activamente para que



experimenten división mitótica e inicien su proceso de diferenciación, los linfocitos regresan a la sangre como células T maduras inmunocompetentes y forman aproximadamente el 75% del total de los linfocitos circulantes.

En cuanto a las células pre-B, su maduración es más lenta, ya que éstas demoran más tiempo en la médula ósea. Al igual que los linfocitos pre-T, los precursores de los linfocitos B adquieren gradualmente su maduración. Cuando pasan a circulación, los linfocitos pre-B se dirigen a los folículos de los ganglios linfáticos. En ésta etapa, las células pre-B todavía no pueden reordenar por completo el gen funcional que codifica para la síntesis de las regiones variables de las cadenas que forman sus inmunoglobulinas (mIg) de membrana o el BCR, ya que la formación del gen funcional definitivo para la síntesis del sitio activo de los BCR implica una serie de cambios genéticos que ocurren en las etapas finales de su maduración cuando las células pre-B se encuentran localizadas en los ganglios, siendo entonces la maduración de tipo multifocal. El desarrollo de los linfocitos B que han llegado a los ganglios se caracteriza por una adquisición gradual de su capacidad para sintetizar inmunoglobulinas y expresar en la superficie de su membrana los monómeros de IgM e IgD que actúan como BCR para reconocer antígenos.



## Funciones biológicas de los linfocitos

Los linfocitos juegan un papel importante en la adquisición y conservación de la inmunidad en el organismo, ya que son encargados de reconocer a los antígenos del ambiente que penetran al cuerpo. Además inician, dirigen y mantienen las respuestas del sistema inmunológico (Tabla 1), cada una de las cuales está dirigida específicamente contra los antígenos que lo estimularon.

Los linfocitos que se localizan en los órganos linfoides mantienen un equilibrio constante con los que infiltran otros tejidos y con los que circulan por la sangre. Diariamente de la médula ósea salen hacia la sangre casi mil millones de linfocitos que van a sustituir a los que mueren o se pierden en las secreciones. El número de linfocitos que contiene el cuerpo de una persona, es tan elevado que todos ellos representan aproximadamente el 1% del peso total de un adulto sano (Tamayo, 1997).

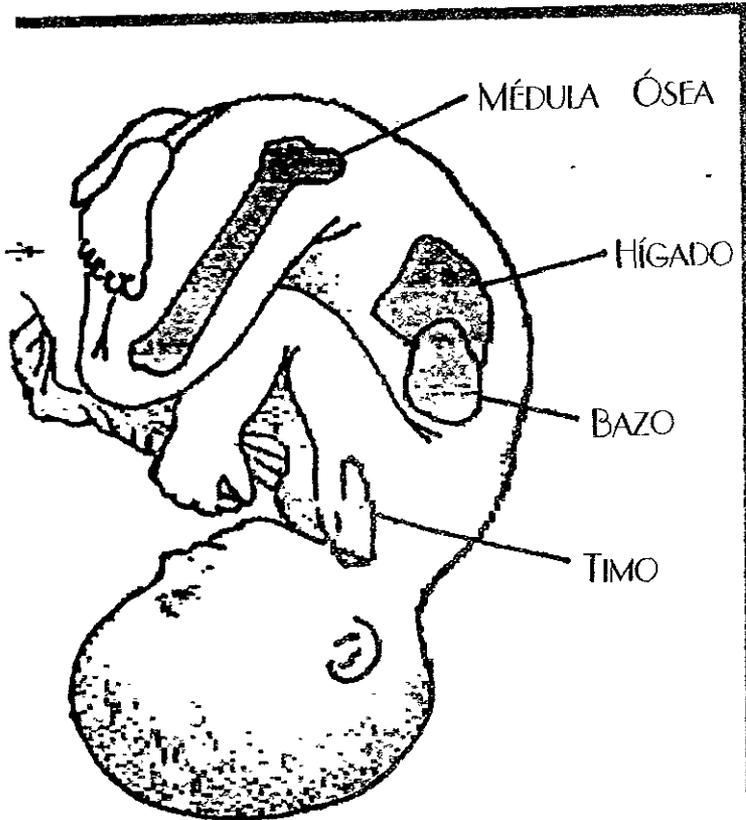


Figura 2. Desarrollo inmunológico temprano en el humano (Cooper y Lauton, 1987). Se observan los principales órganos que participan en ésta etapa, tal es el caso del timo, bazo, hígado y médula ósea.



## 2.1. Morfología de los linfocitos

Bajo la microscopía de luz, los linfocitos T y B tienen una apariencia similar que no permite distinguirlos cuando se tiñen con los colorantes convencionales como Azul de metileno, Giemsa, etc.

Independientemente de su origen, todos ellos pueden mostrar un tamaño y morfología diferente. Por esa razón, hace años los linfocitos se clasificaron en células grandes y pequeñas. Los linfocitos tienen un núcleo grande y un citoplasma escaso que se tiñe de azul pálido cuando se emplea la coloración de Giemsa. De acuerdo a su grado de actividad, en su citoplasma pueden o no ser visibles granulaciones que corresponden al retículo endoplásmico (Tamayo, 1997).

Actualmente se identifican a los linfocitos T y B revelando la existencia de los marcadores de membrana o antígenos de diferenciación (CD) que son característicos de cada población. Este procedimiento implica el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra algunas moléculas que se encuentran presentes en tan sólo una de las dos poblaciones de linfocitos.

En las diferentes etapas de maduración, los linfocitos presentan las siguientes variaciones morfológicas:

### Linfoblasto

Normalmente puede estar presente en la médula ósea, pero no en sangre periférica. Su tamaño es de aproximadamente 10 a 18 $\mu$  de diámetro. El núcleo ocupa la mayor parte de la



célula, es redondo u oval (fig.3.C) La cromatina forma agregados a lo largo de la membrana nuclear El citoplasma presenta granulaciones y el cociente nucleocitoplasmático es 6/1 (Vélez, 1992)

### Linfocito pre-T o pre-B

Su tamaño varía entre 9 y 17 $\mu$  de diámetro. El núcleo es ovoide y la cromatina es más densa que en el linfoblasto (fig 3.B). El cociente nucleocitoplasmático es 4.5/1, lo que indica que el citoplasma es mayor que en el linfoblasto (Vélez, 1992).

### Linfocitos B y T maduros

El tamaño es más variable, pues se aprecian en las extensiones sanguíneas linfocitos grandes y pequeños. Los linfocitos más grandes tienen de 8 a 16 $\mu$  de diámetro y los más pequeños de 7 a 9 $\mu$  El núcleo tiene forma esférica y con localización excéntrica, la cromatina es muy densa y la membrana nuclear está muy bien definida (fig 3.A). El cociente nucleocitoplasmático es 1.5 a 1.25/1, presentando un citoplasma mayor que en las demás etapas de maduración (Vélez, 1992)

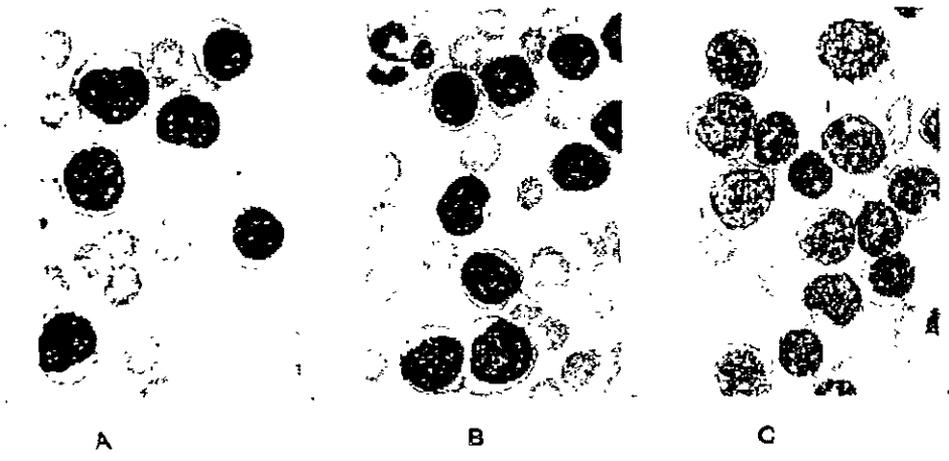


Figura 3. Morfología de los linfocitos humanos. En orden, A linfocitos maduros, B linfocitos pre-T o pre-B, y C linfoblastos (Williams, 1984)



La Toxicología Genética fue reconocida formalmente como una disciplina en Mayo de 1969 cuando la Sociedad de Mutagénesis Ambiental fue fundada en Estados Unidos bajo la dirección del Dr. Alexander Hollaender con un grupo de genetistas interesados en el tema (Wassom, 1989).

Un factor importante en la historia de la Toxicología Genética fue el desarrollo de cepas de microorganismos genéticamente definidas, portando mutaciones en genes particulares que codificaban aminoácidos en la biosíntesis de enzimas. Cuando esto se unió con un sistema de activación metabólica derivada de hígado de roedor, proporcionó una poderosa y rápida herramienta para estimar la mutagenicidad de nuevos compuestos.

El campo de la Toxicología Genética es un camino con nuevos avances en el horizonte, con promesas de nuevos sistemas derivados de los recientes desarrollos en la tecnología del ADN recombinante, que promete hacer aún más impacto en la siguiente década.



induce la transformación de los linfocitos a linfoblastos, estimulando la síntesis de ARN una hora después de su adición al medio de cultivo y de ADN 24 horas después (Salamanca, 1990) La actividad mitótica alcanza un máximo en aproximadamente 3 días (Evans y O'Riordan, 1975). El tratamiento de las células con el xenobiótico podría comenzarse a las 44 horas después de iniciado el cultivo. En este momento es cuando las células están proliferando activamente y se encuentran todos los estados del ciclo celular (Morimoto, 1983)

Los ensayos de aberraciones cromosómicas se usan para detectar la inducción de rompimientos en el cromosoma (clastogénesis) por observación directa de daño en un análisis de metafase. En éste ensayo, las células o los cultivos son tratados con el xenobiótico y después de un intervalo de tiempo en exposición, las células pueden sobrevivir y evidenciar la actividad genotóxica del agente de prueba (Ballantyne, 1993), entonces, las células son detenidas en la metafase cuando se les adiciona colchicina. Las preparaciones que se obtienen después de realizar un choque hipotónico y la correspondiente tinción, son examinadas microscópicamente (fig 4) para detectar alteraciones numéricas (aneuploidias y poliploidias), y alteraciones estructurales (translocaciones recíprocas, fusiones céntricas, deleciones, inversiones e isocromosomas)

El análisis de metafases puede auxiliarse de diferentes técnicas y procedimientos de tinción, tales como Wright, Giemsa, Acetocarmin, Acetorceína, técnicas de bandeado como Bando C, Bando G (fig 4), Bando Q, Bando R y algunas técnicas de marcaje para poder detectar de manera rápida y fácil alteraciones específicas en los cromosomas.

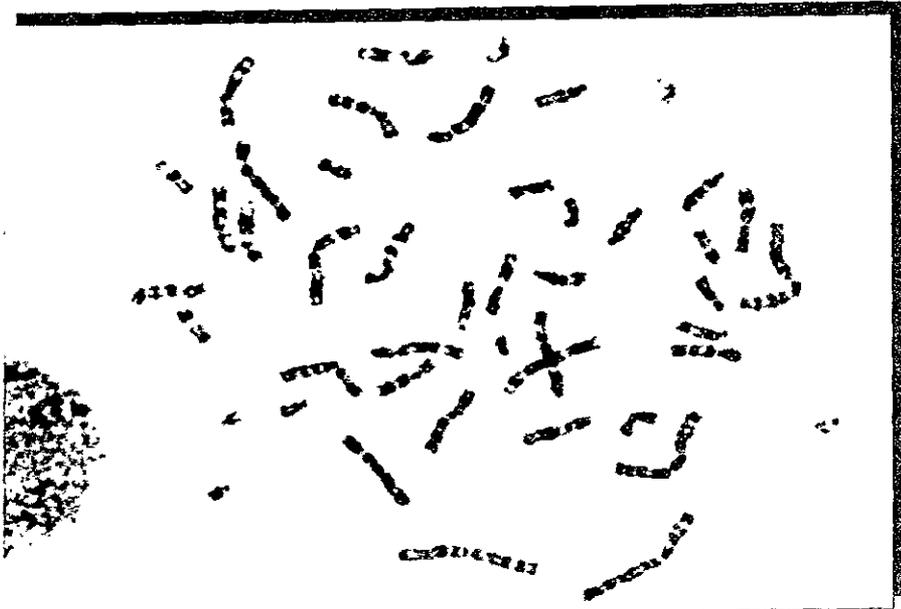


Figura 4. Observación microscópica de un análisis de metafase con Bando G.  
([http://www.lim.ez/paa/text/karyo details.html](http://www.lim.ez/paa/text/karyo%20details.html)).

### Intercambio de Cromátidas Hermanas

Los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) son, como su nombre lo indica, intercambios de segmentos de material genético homólogos o casi homólogos, simétricos y equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma (Morales, 1988).

Se ha demostrado que los ICH están relacionados con eventos de genotoxicidad, desde aquellos producidos por potentes clastógenos, hasta la radiación ionizante (Perry y Evans, 1975). Este ensayo de ICH se basa en la incorporación en el ADN de bromo (Br) en forma de un análogo de timidina como la 5-Bromodeoxiuridina (BrdU) dentro del ADN replicado.



Para el bioensayo de ICH *in vitro*, puede hacerse uso de cualquier tipo de célula que se pueda replicar o pueda ser estimulada para dividirse, como los linfocitos humanos, con la finalidad de que simultáneamente incorporen la BrdU en su ADN. La incorporación de BrdU en las células de un sistema *in vivo*, permite la observación de diferentes tipos de tejido (Latt, 1980)

Los cultivos de sangre periférica son establecidos en un medio que contiene BrdU y PHA, se debe procurar que las células se encuentren en la fase exponencial de crecimiento antes de adicionar la BrdU o el xenobiótico; después de la adición de la BrdU a las células, se permiten dos ciclos celulares antes de la cosecha.

Generalmente, de 1 a 2 horas antes de la cosecha se adiciona la colchicina, donde el cultivo permanece entre 60 a 70 horas post-estimulación con PHA. Posteriormente, las células son cosechadas y tratadas de acuerdo a los métodos citogenéticos de rutina para obtener las preparaciones cromosómicas.

En ausencia de activación metabólica, la BrdU y el xenobiótico pueden ser adicionados al cultivo simultáneamente. También pueden ser usados tratamientos cortos en presencia de activación metabólica para evitar efectos sinérgicos con la BrdU, donde las células pueden ser tratadas con el xenobiótico, por ejemplo, 1 hora antes de la adición de la BrdU (Edwards, 1993).

La detección citológica del ICH se logra con una tinción diferencial con Giemsa y Hoechst33258 en las preparaciones cromosómicas obtenidas. La calidad de dicha tinción



determina, hasta cierto punto, la facilidad y exactitud del conteo de ICH, así como la eliminación de la variación en los resultados obtenidos por diferentes observadores (Ballantyne, 1993).

Las muestras de sangre heparinizada pueden ser guardadas a 4°C hasta por 48 horas sin afectar la respuesta en el ICH (Lambert, 1982). Si se conoce que el agente de prueba reacciona con el suero o los eritrocitos, los linfocitos pueden ser aislados por el uso de gradiente con Ficoll-Hypaque (Boyum, 1968)

El ensayo de ICH es particularmente sensible para agentes alquilantes, análogos de base y agentes que causan rupturas en el ADN, así como aquellos compuestos que actúan uniéndose directamente al ADN (Latt, 1981), se utiliza para determinar el potencial mutagénico de nuevos compuestos químicos, comparando la frecuencia de ICH inducida por el agente, pues ésta frecuencia es un parámetro que provee información importante con relación a los efectos citogenéticos de mutagénesis.

### **Características de los donadores**

Las muestras de sangre deben ser tomadas de donadores sanos, que no cursen alguna infección viral o reciban un tratamiento con medicamentos (Anderson, 1989). Si se trata de un estudio en el que se tomarán muestras en diferentes días, la toma de muestra debe realizarse a la misma hora y bajo condiciones semejantes, conservando la menor cantidad de variaciones o variables posibles.



El personal que manipula sangre, debe estar inmunizada contra hepatitis B y los donadores deben resultar negativos al antígeno de hepatitis B. Los donadores y el personal deben tener conocimiento de las implicaciones del SIDA (Ballantyne, 1993).

## 2.- Ensayo Cometa

### El ensayo cometa

El ensayo cometa es también conocido como “Ensayo en gel unicelular” (SCG), “Electroforesis unicelular”, o “Electroforesis en microgel (MGE)”, fue utilizado por primera vez por Ostling y Johanson en 1984 como una técnica microelectroforetica para la observación directa del daño al ADN en células individuales (Ostling y Johanson, 1984)

Originalmente, estos dos investigadores suspendieron un pequeño número de células irradiadas en un delgado gel de agarosa colocado sobre un portaobjetos, a ésta preparación se le hacía un corrimiento electroforetico que posteriormente sería teñida con un colorante fluorescente de unión al ADN, el resultado fueron imágenes que por su apariencia fueron nombradas “cometas”, los cuales fueron medidos para determinar la extensión del daño al material genético, pues ellos observaron que la extensión del ADN liberado de la cabeza del cometa durante la electroforesis estaba en función de la dosis de irradiación. Años después, su siguiente publicación presentó una evaluación de daño al ADN en células recuperadas de biopsias de pacientes que recibían terapia de radiación, lo que pudo permitir la predicción de la respuesta del tumor a tratamientos de radio y quimioterapia

El método inicial neutro de Östling y Johanson parecía ser sensible para evidenciar rupturas de cadena sencilla en ADN super enrollado, pero las condiciones utilizadas no eran efectivas para remover las proteínas. Después se hicieron adaptaciones en las condiciones de lisis para eliminar las proteínas hasta en más del 95% y esto fue la base para el actual método neutro que detecta solamente rupturas de doble cadena



Posteriormente, al variar las condiciones bajo las que se llevaba a cabo el ensayo, Rydberg y Johanson describieron por primera vez, un ensayo alcalino a pH (>12.3) en el que se facilitada la desnaturalización y el desenrollamiento del ADN, con lo que es posible la detección de rupturas de ADN en cadena sencilla y sitios álcali lábiles (Olive, 1989 y Singh, 1988), por tanto, más sensible.

## Principios de detección

### Detección de rupturas en el ADN

Los procedimientos para medir rupturas en las cadenas de ADN se basan generalmente en el principio de que los agentes que cortan dichas cadenas reducen la medida de la longitud del ADN (Ahnstrom, 1988, Olive, 1989 y Withaker, 1991)

Los ensayos que miden rupturas en cadena doble o sencilla de ADN comúnmente requieren el desenrollamiento de la doble cadena de ADN para la detección sensible. Generalmente se utiliza un pH alto (>12.3) para facilitar la desnaturalización, desenrollando y expresando las rupturas en cadena sencilla, así como aquellos rompimientos en el ADN que solo llegan a visualizarse después de la exposición a un álcali, también llamados lesiones o sitios álcali lábiles

Entre los métodos de detección de rupturas en el ADN se encuentran la sedimentación alcalina con sacarosa, que se basa en la suposición de que segmentos largos de ADN sedimentan en un gradiente de sacarosa como fragmentos pequeños (McGrath y Williams,



1996); la sedimentación nucleóide que utiliza el grado de enrollado o desenrollado del ADN, reflejando los niveles de ruptura de las cadenas que puede ser medido por la velocidad de sedimentación (Cook y Brazell, 1975) y la electroforesis en gel que se hace bajo condiciones de desnaturalización usando un campo eléctrico constante o pulsado abarcando los principios de la migración del ADN bajo condiciones electroforéticas de una forma convencional ((Freeman, 1986, Lehman y Ormerod, 1970, Schwartz y Cantor, 1984 y Nordén, 1991).

El desenrollamiento alcalino (Ahnström, 1988 y Rydberg y Johanson, 1978), la elución en filtro alcalino (Kohn, 1981) y los ensayos de precipitación alcalina de ADN (Olive, 1988), también toman la característica de reducción del tamaño del ADN y la detectabilidad de rupturas de cadena sencilla bajo condiciones de desnaturalización. Éstas técnicas están relacionadas en metodología a sus contra partes neutras, las cuales proporcionan un promedio de la medida de los rompimientos en doble cadena de ADN (Ager y Dewen, 1990, Bradley y Kohn, 1979, Lehman y Ormerod, 1970; McMillan, 1990 y Olive, 1988) Sin embargo, muchas de éstas técnicas requieren radiomarcaje del ADN para la detección sensible de rupturas y poder proporcionar solamente una indicación del número promedio de rupturas por célula.

Por otro lado, en el ensayo cometa o electroforesis unicelular, los cometas se forman por rupturas terminales en el ADN cargado negativamente quedando libre para migrar en el campo eléctrico hacia el ánodo. La habilidad del ADN para migrar, está en función de la longitud del ADN y del número de rompimientos terminales, los cuales pueden ser unidos a segmentos largos de ADN pero migrar una distancia corta separados de la cabeza del cometa

La longitud de la cola inicialmente se incrementa con el daño, pero alcanza un máximo cuando es definida por las condiciones de electroforesis, y no por la medida de los fragmentos.

A bajos niveles de daño, se extienden las cadenas unidas de ADN, aún mejor que cuando migran en piezas individuales. Con el incremento de rupturas, los segmentos de ADN migran libremente dentro de la cola del cometa. La intensidad de la fluorescencia en la cola con relación a la cabeza proporciona información acerca de la cantidad de rupturas en la cadena de ADN. Estos dos conceptos: extensión y migración, son aceptados para explicar el patrón de migración observado en el ensayo cometa (Fairbairn, 1995)

Por tanto, el ensayo cometa facilita sensiblemente la detección de ambos tipos de rupturas en cadena doble y en cadena sencilla de ADN

### Sistemas de evaluación

El ensayo cometa consiste en un proceso de electroforesis que hace que el núcleo celular migre de forma diferencial poniendo de manifiesto el daño al ADN, de manera que el núcleo con su ADN intacto migra íntegro (fig.5.A), mientras que el núcleo con ADN dañado o fragmentado migra de forma diferencial mostrando una cola de cometa (fig.5.B), y la extensión del ese ADN liberado de la cabeza del cometa se encuentra en función del grado de daño

Teóricamente, cualquier tejido de células eucariontes que sea posible disgregarlo, puede ser procesado para llevar a cabo un análisis de daño al ADN utilizando el ensayo

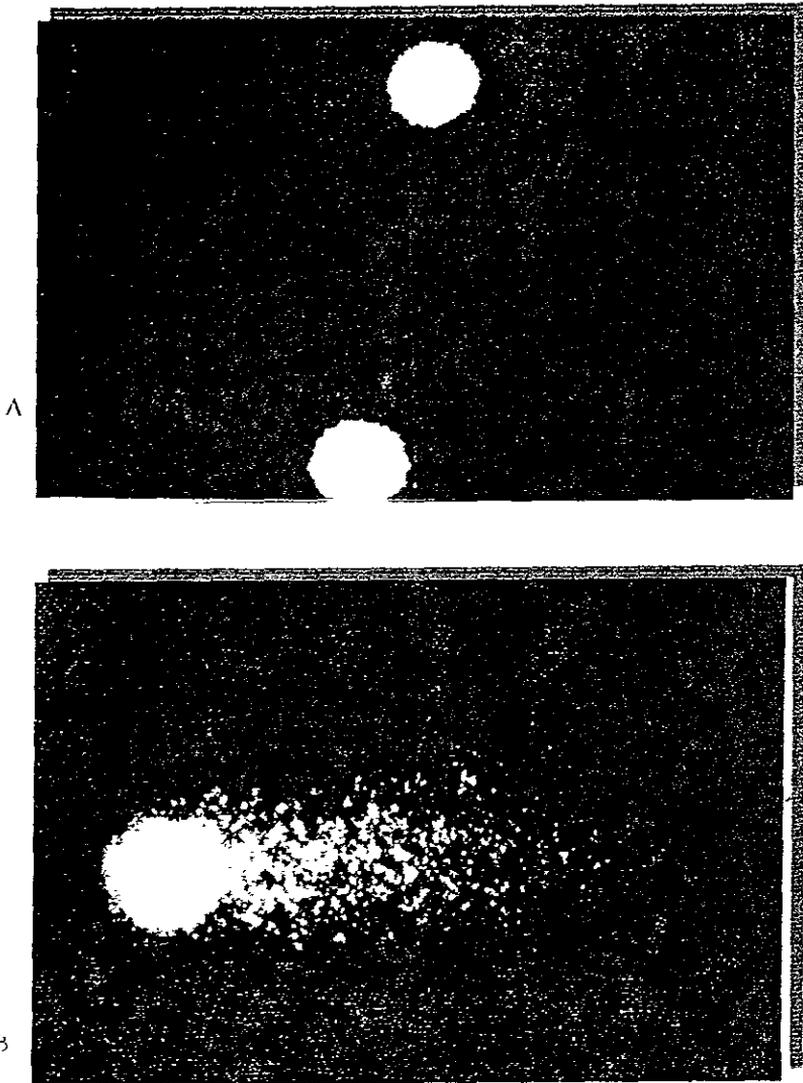
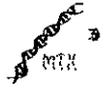


Figura 5 Imágenes obtenidas después de la electroforesis y tinción en el ensayo cometa. Aquí, se observa en A un control negativo (células sin daño al ADN) y en B un control positivo (célula dañada).



## Usos y posibles aplicaciones

Entre las aplicaciones que se le han dado a esta técnica podemos encontrar los aspectos clínicos, en los que se realizan estudios en pacientes con alguna enfermedad de tipo genético (Gedik, 1992 y Green., 1992) y en pacientes con otro tipo de enfermedades que requieren de algún tratamiento físico o químico

Cuando en un paciente existen tumores malignos, una de las opciones es el tratamiento con radiaciones, y entonces, el ensayo cometa puede emplearse para el estudio del comportamiento de dichos tumores antes y después del tratamiento, lo cual puede ser muy útil, sin embargo, esta técnica solo estudia el daño en algunos cientos de células del tumor (Olive y Durand, 1992a; Olive, 1993d; Olive, 1994c). Además el ensayo cometa se aplica en estudios de apoptosis que es el proceso de muerte celular fisiológica activa programada, y las investigaciones se encaminan al manejo y tratamiento de tumores en radio y quimioterapia ya que muchos de ellos pueden ser eliminados induciendo la apoptosis (Dive, 1992 y Hickman, 1992).

Otra de las aplicaciones interesantes, es el monitoreo humano de poblaciones expuestas de forma accidental o habitual a determinados compuestos químicos, así como el monitoreo ambiental, siendo esto novedoso en el campo de la Genotoxicología (Pool-Zobel, 1992a).

Los primeros ensayos de electroforesis unicelular fueron creados principalmente para detectar el daño producido por las radiaciones, pero esta técnica además de detectar el daño al ADN, permite evaluar la capacidad de reparación de las células (Collins, 1992 y Gedik, 1992), así como la respuesta en diferentes fases del ciclo celular.

La radiación UV es otro agente que produce lesiones al ADN de un tipo diferente al de las rupturas de cadenas, y estas lesiones tienden a ser reparadas por la célula, por lo que es posible detectar tanto lesiones al ADN, como el funcionamiento adecuado o deficiente de los mecanismos de reparación, tal es el caso del síndrome Xeroderma pigmentosum en el que se tiene deficiencias en los mecanismos de reparación (Gedik, 1992 y Green, 1992)

Se sabe también que los radicales activos de oxígeno inducen daño a los cromosomas (Cerutti, 1985), y existen evidencias de que el ataque oxidativo al ADN por estos radicales se encuentra estrechamente relacionado con la mutagénesis y carcinogénesis (Imlay, 1988; Imlay y Linn, 1988). El peróxido de hidrógeno es un intermediario en muchas de las reacciones de estrés oxidativo y el radical OH<sup>-</sup> producido es la especie reactiva de oxígeno responsable del daño y ruptura en las cadenas del ADN. Dicha característica ha resultado de utilidad, de tal manera que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se usa como control positivo en los ensayos de electroforesis celular en todo el mundo

De todas las aplicaciones del ensayo cómete, en el campo de la Genotoxicología es donde ha tenido mayor desarrollo, empleo y explotación, ya que muchos de los efectos mutagénicos y carcinogénicos son el resultado del daño directo al DNA, por lo que actualmente se utiliza para probar medicamentos a dosis terapéuticas y aditivos en alimentos (Pool-Zobel, 1992), debido a que la electroforesis unicelular es una técnica sensible, sencilla, reproducible, y confiable.



## El Metotrexato

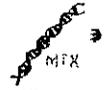
### Generalidades

#### Descripción general

El desarrollo de medicamentos con acción sobre el metabolismo intermediario de las células ha sido de gran importancia clínica, pues las propiedades bioquímicas exclusivas de las células cancerosas están aún por descubrirse y la mayor parte de estos agentes han sido diseñados y sintetizados en base al conocimiento de los procesos celulares. El prototipo para inhibir el crecimiento de células cancerosas o malignas es el metotrexato (MTX), antagonista del ácido fólico, el cual actúa directamente como sustituto del metabolito normal.

El MTX es conocido por ser un antimetabolito derivado del ácido fólico con acción citotóxica. Actúa principalmente durante la fase S de la división celular, por inhibición competitiva de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), impidiendo la reducción del dihidrofolato ( $FH_2$ ) a tetrahidrofolato ( $FH_4$ ), paso necesario en la síntesis de *ново* de ADN y replicación celular. La falta del cofactor  $FH_4$ , interrumpe la síntesis de timidilato, nucleótidos de purina y los aminoácidos serina y metionina (Bertram, 1987)

El efecto selectivo sobre las células neoplásicas puede obtenerse parcialmente con el MTX, mostrándose mucho más efectivo cuando la población celular se encuentra en la etapa logarítmica de crecimiento que cuando se encuentra en la fase estacionaria. Además, es capaz de inhibir la síntesis de ARN y de proteínas, pero se dice que su acción citotóxica es autolimitante (Skipper y Schabel, 1982).



Químicamente el MTX es el ácido N-{4-[(2,4-diamino-6-pteridinil) metil] metil amino}benzoil- L - glutámico, o también puede nombrarse como ácido 2,4-diamino, N<sup>10</sup>-metilpteroil glutámico (Jolivet, 1982); y su estructura es muy semejante a la del ácido fólico (fig 7) por lo que éste antineoplásico resulta ser análogo del folato.

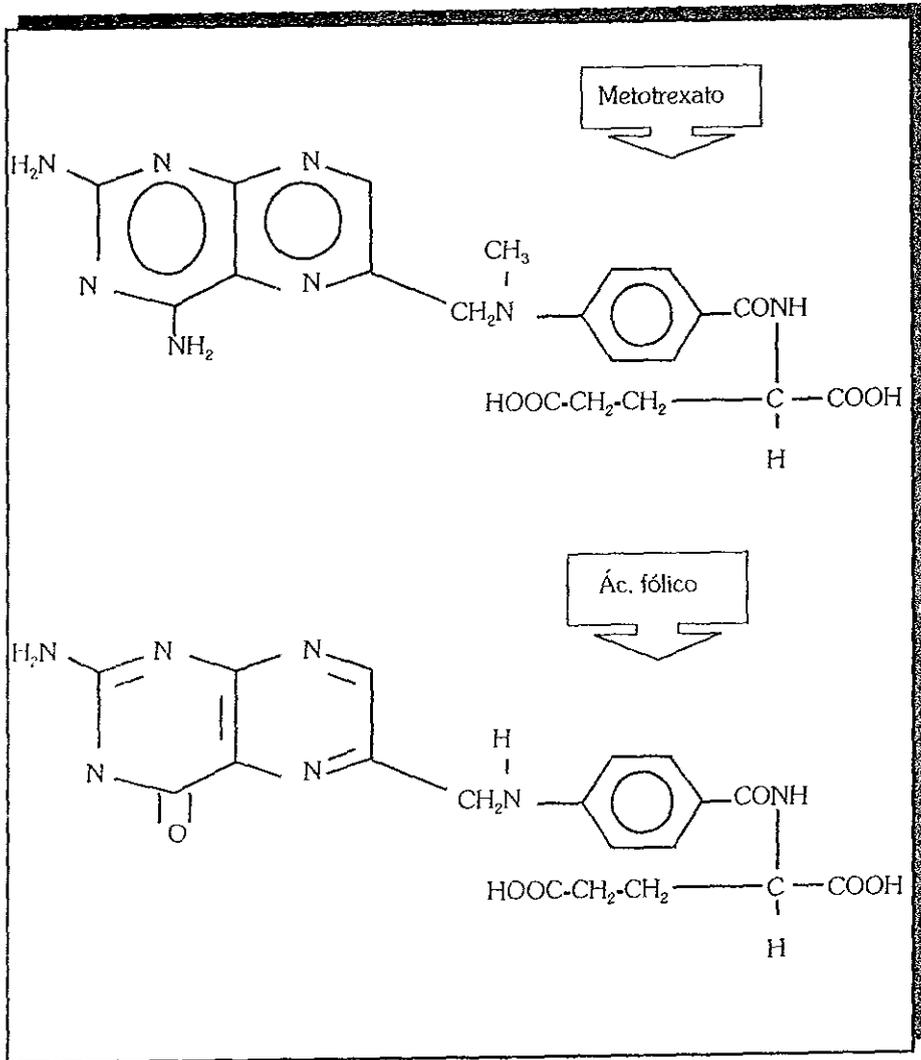


Figura 7. Estructura química del Metotrexato y el Ácido fólico (McKee y McKee, 1996).



## Usos y aplicaciones

El MTX es uno de los pocos medicamentos anticancerosos que puede administrarse sin peligro por vía intravenénea, su uso sistemático como terapia intratecal profiláctica en la leucemia linfoblástica aguda ha disminuido considerablemente la frecuencia de recidivas en el SNC y ha contribuido a la curación de ésta enfermedad, aunque se sabe que el MTX induce neurotoxicidad (Bernini, 1995).

También el MTX es el agente citostático más empleado para tratar la psoriasis grave (McDonald, 1981; Chabner, 1982 y Jackson, 1984), es útil en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda infantil (Farber, 1948) y tiene aplicación comprobada en coriocarcinoma (Hertz, 1963), tumores y enfermedades trofoblásticas afines femeninas como mola hidatiforme y corioadenoma destruens, además se han obtenido resultados favorables en pacientes con micosis fungoide, linfomas de Burkitt, carcinoma de mama, lengua, vejiga, faringe y testículo (Calabresi, Schein y Rosenberg, 1985). Además, por ser un efectivo agente inmunosupresor, el MTX se ha usado en la prevención de reacciones de rechazo que resultan del trasplante de médula ósea (Chabner, 1982 y Jackson, 1984).

En pacientes con artritis reumatoide grave, activa, clásica o definitiva se ha aplicado el MTX como tratamiento cuando éstos no han respondido satisfactoriamente a un plan terapéutico de primera elección (Hoffmeister, 1983). Actualmente, el MTX se administra junto con prostaglandinas para inducir exitosamente el aborto terapéutico no quirúrgico (Potts, 1995). Sin embargo, únicamente médicos con experiencia en la quimioterapia de antimetabolitos deben utilizar al MTX (Weinstein, 1977), ya que se han producido muertes,



incluso en pacientes psoriáticos tratados con éste fármaco (Craig y Stitzel, 1984), donde la causa y mecanismo específico aún son desconocidos.

### **Toxicidad general**

Los rasgos principales de una intoxicación fatal con MTX son anorexia, diarrea sanguinolenta, leucopenia, depresión y coma. Las lesiones más serias se producen en el tracto gastrointestinal y en la médula ósea; la degeneración de la médula se produce rápidamente y a las 24 horas hay disturbios evidentes en la maduración de eritrocitos y una rápida alteración patológica de la mielopoyesis (Goodman, 1991), mientras que la toxicidad en el aparato digestivo puede manifestarse como mucositis ulcerosa y diarrea (Craig y Stitzel, 1984).

El mayor peligro de un tratamiento con elevadas dosis de MTX es la toxicidad renal, que se presenta cuando el fármaco precipita en los túbulos renales o cuando existe disfunción renal, ya que las concentraciones altas y prolongadas en plasma pueden ocasionar toxicidad mortal.

La toxicidad más frecuentemente observada es la toxicidad hepática acompañada de alteraciones del funcionamiento hepático (Craig y Stitzel, 1984), por lo tanto, es posible detectar la hepatotoxicidad mediante la alteración de pruebas clínicas de laboratorio como bromo sulfoftaleína (BSP), floculación de cefalina, colesterol, enzimas transaminasas (TGO y TGP), turbidez al timol, bilirrubina y fosfatasa alcalina (Bevan, 1982).

Además, se sabe que el MTX es un poderoso teratógeno y abortivo (Potts, 1995) por su especial acción sobre tejidos en franca proliferación celular como en la embriogénesis (Craig y Stitzel, 1984).



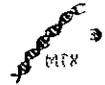
## Absorción, distribución, biotransformación, y excreción

El MTX puede ingresar al organismo por vía bucal o por vía parenteral de inyección; la vía bucal es la más común debido a que prácticamente no representa ningún riesgo en la administración y se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal, aunque en adultos la absorción depende de la dosis. Se sabe que los alimentos retrasan la absorción y disminuyen los valores plasmáticos máximos de MTX, en cambio, cuando es aplicado por vía parenteral, el fármaco se absorbe completamente.

Después de la administración de dosis usuales de 0.025 a 0.1 g/m<sup>2</sup> se obtienen concentraciones plasmáticas máximas de 1 a 10 µM (0.45 a 4.54 µg/ml), y después de la infusión de altas dosis, de 1.5 g/m<sup>2</sup> o mayores, se logran concentraciones plasmáticas máximas de 100 a 1000 µM (Chabner, 1982 y Allegra, 1990), es decir, de 45.44 a 454.4 µg/ml

La distribución del MTX puede darse en los espacios corporales como las cavidades pleurales o peritoneales y si esos espacios están expandidos pueden actuar como sitio de almacenamiento y liberación del fármaco con la consiguiente elevación prolongada de concentraciones plasmáticas pudiendo presentarse toxicidad severa.

Por otro lado, se ha visto que el MTX no cruza la barrera hematoencefálica en cantidades terapéuticas cuando se administra por vía bucal o parenteral, por lo que para alcanzar concentraciones terapéuticas del fármaco en el líquido cefalorraquídeo, debe llevarse a cabo la administración por vía intratecal (Bleyer, 1978).



En el organismo, el MTX se une a proteínas plasmáticas aproximadamente en un 35%, pero se ha visto que el fármaco puede ser desplazado de la albúmina por otros compuestos como sulfonamidas, salicilatos, tetraciclinas, cloramfenicol y fenitoína (Goodman, 1991)

En la captación celular el MTX compete con folatos reducidos por el transporte activo a través de las membranas, en un proceso mediado por un solo portador, y en ocasiones, la difusión pasiva es la vía principal por la que se alcanzan concentraciones intracelulares efectivas

Después de su absorción y distribución, el MTX es objeto de biotransformación hepática e intracelular que lo transforma en sus formas poliglutamadas (Malgorzata, 1981) (Fig 8), que pueden ser reconvertidas en MTX por acción de hidrolasas. Estos poliglutamatos actúan como inhibidores de la enzima dihidrofolato reductasa y de la timidilato sintetasa (Chabner, 1985), la retención y acción farmacológica prolongada de estos metabolitos activos varían en los diferentes tejidos, células y tipos de tumores (Jolivet, 1982)

Con las dosis comúnmente prescritas, es factible la biotransformación catalizada por la enzima folilpoliglutamil-sintetasa de pequeñas cantidades de MTX a 7-hidroxi metotrexato el cual es potencialmente nefrotóxico (Chabner, 1982) y a ácido 2,4-diamino-N-10-metilptericoico (Craig y Stitzel, 1984). El MTX también es metabolizado parcialmente por la flora intestinal después de su administración oral.

La vida media terminal del MTX es de aproximadamente 3 a 10 horas en pacientes sometidos a tratamiento de psoriasis, artritis reumatoide o cáncer, y se incrementa hasta 8 a 15



horas en pacientes que reciben dosis altas del fármaco y presentan insuficiencia renal (Goodman, 1991).

La vía principal de eliminación es la excreción renal, que depende tanto de la dosis como de la vía de administración; después de la administración intravenosa, el 80-90% de la dosis administrada se excreta sin cambios por la orina a las 24 horas (Wan, 1974), y una pequeña cantidad de MTX se excreta también en las heces por tracto biliar.

La excreción renal ocurre por filtración glomerular y secreción tubular activa, por lo tanto, el uso simultáneo de otros fármacos que también experimentan secreción tubular, que reducen el flujo sanguíneo renal, que son nefrotóxicos, o aquellos que son ácidos orgánicos débiles, así como el deterioro de la función renal, pueden retardar la excreción del MTX produciendo altas concentraciones plasmáticas del fármaco con probable mielosupresión grave (Iven y Brash, 1988).



## Mecanismo de acción

El MTX es un inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa (DHFR), y esto tiene por consecuencia que desaparezca la capacidad de la célula para transferir unidades de un solo carbono necesarias para la síntesis de novo de ADN.

Para funcionar como un cofactor en reacciones de transferencia monocarboxilica, el folato debe ser reducido por la DHFR a tetrahidrofolato (FH4), y a su vez el FH4 es convertido en N5,N10-metilentetrahidrofolato, siendo éste, un cofactor esencial para la síntesis de timidilato, purinas, metionina y glicina.

Los fragmentos de un solo carbono se agregan enzimáticamente al FH4 en distintas configuraciones y entonces pueden ser transferidos en reacciones específicas de síntesis. Un proceso metabólico clave, es el catalizado por la timidilato sintetasa, que involucra la conversión de 2' desoxiuridilato (dUMP) a timidilato, un componente esencial del ADN. El grupo metilo transferido a la porción uracilo del dUMP es donado por el N5,N10-metilentetrahidrofolato, y posteriormente, este átomo de carbono es transferido al anillo de pirimidina a nivel de oxidación del formaldehído y reducido a metilo por los átomos de hidrógeno donados por el anillo pteridina de la coenzima de folato; en el proceso, el cofactor folato reducido (FH4) es convertido en dihidrofolato (FH2). Para poder funcionar nuevamente como cofactor, el FH2 debe ser primero reducido a FH4 por la DHFR, la cual es bloqueada por el MTX (fig 9).

Los inhibidores del folato con una alta afinidad por la DHFR, como el MTX, requieren la participación de NADPH como cofactor obligatorio en el complejo ternario (Kamen, 1983), impidiendo la formación de FH4, provocando una deficiencia intracelular aguda de coenzimas



de folato y una gran acumulación de políglutamatos de FH2; entonces, se detienen las reacciones de transferencia monocarboxílicas necesarias para la síntesis de novo de los nucleótidos de purina y timidilatos, causando la posterior interrupción de la síntesis de ADN y ARN.

Se sabe que el MTX sólo es parcialmente selectivo para las células tumorales y resulta tóxico para las células normales que están en proceso de división continua, como las del epitelio intestinal y las de médula ósea, este fármaco produce la muerte de las células casi específicamente durante la fase S del ciclo celular y existe evidencia de que el MTX es mucho más efectivo cuando la población celular se encuentra en la fase logarítmica de crecimiento.

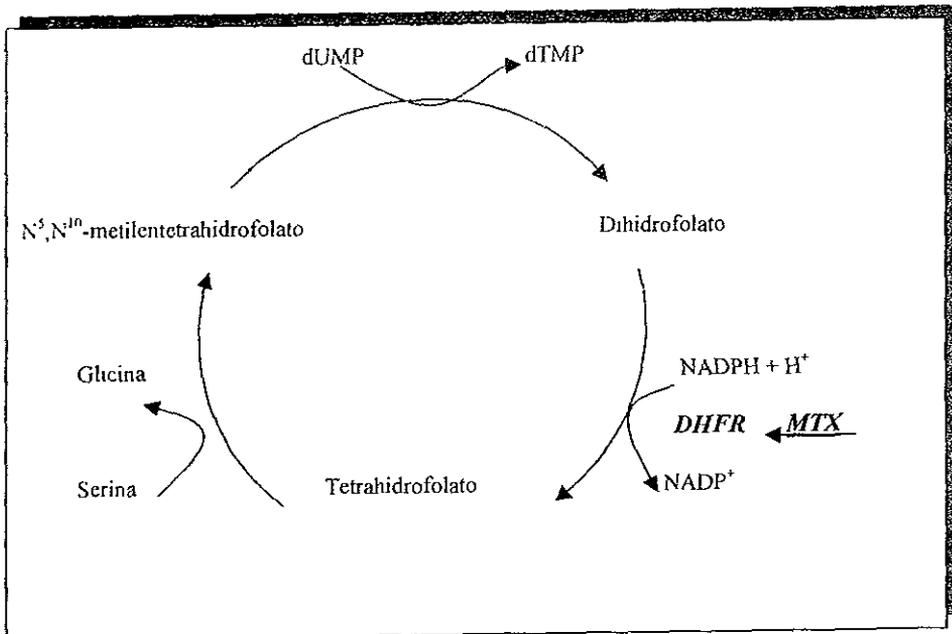


Figura 9. Bloqueo del MTX en la regeneración del tetrahidrofolato (Stryer, 1995). En éste esquema se muestra el mecanismo de acción del MTX.



## Relación Estructura - actividad

El ácido fólico es un factor esencial de la dieta, del cual derivan una serie de cofactores tetrahidrofolato, que proporcionan los grupos monocarboxílicos para la síntesis de los precursores del ADN (timidilato y purinas) y del ARN (purinas).

El sitio primario de acción del MTX es la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), este sitio de acción se basa esencialmente en la aguda analogía estructural del MTX con el ácido fólico (fig 7), donde la estructura química es diferente por tener el MTX un grupo amino unido al carbono en la posición 4 y un metilo en el nitrógeno del grupo amino que une al anillo de pteridina con el ácido p-aminobenzoico, mientras que el ácido fólico en la posición 4 posee un grupo carbonilo y carece del metilo en el nitrógeno antes mencionado. El MTX se comporta como un inhibidor, impidiendo la reducción del dihidrofolato (ácido fólico) a tetrahidrofolato, por tanto, la inhibición de la DHFR conduce a un agotamiento parcial de los cofactores tetrahidrofolatos necesarios para la síntesis de las purinas y el timidilato (Chabner, 1985)

El MTX en su forma poliglutamada (Fig. 8), es un inhibidor efectivo de la DHFR, y los estudios cristalográficos han revelado las bases atómicas que explican la alta afinidad del MTX por la DHFR (Kraut y Matthews, 1987) así como las diferencias en la secuencia de aminoácidos de los centros activos de la DHFR.

A causa de la alta polaridad del ácido fólico y de sus análogos, como el MTX, atraviesan escasamente y con dificultad la barrera hematoencefálica, para penetrar en las células de mamíferos requieren mecanismos de transporte específicos (Elwood, 1989). Una



Desde hace años, se sabe que elementos sanguíneos con marcado aumento de la actividad de DHFR aparecen días después del tratamiento de pacientes con leucemia con dosis únicas de MTX. Esto puede reflejar la inducción de síntesis de enzima, eliminación temporaria de la médula ósea de células susceptibles al fármaco debido a baja actividad enzimática, o bien, protección de la DHFR contra la degradación por proteasas intracelulares. Actualmente, se ha establecido que la DHFR en el complejo que forma con el MTX, sufre cambios conformacionales que la hacen resistente a la proteólisis.

En periodos prolongados de tratamiento, las poblaciones de células tumorales parecen contener niveles notablemente mayores de DHFR. Se ha descubierto que estas células han amplificado su única copia del gen DHFR original y en consecuencia contienen copias múltiples de dicho gen, ya sea en cromosomas pequeños dobles, mitóticamente inestables o en regiones estables de los cromosomas de células tumorales. La amplificación de genes ha sido implicada en la resistencia a muchos agentes antineoplásicos, incluyendo el fluorouracilo y la pentostatina (Stark y Wahl, 1984), pues existe evidencia de que la amplificación del gen se presenta debido al incremento de ARNm específico para la enzima, lo cual es clínicamente significativo (Curt, 1983).

Para evitar la resistencia, se han recomendado distintas tácticas terapéuticas para evitar la selectividad celular a los antifólicos, tales como el tratamiento con MTX combinado con otros agentes terapéuticos activos que funcionan por mecanismos diferentes, o bien, alternar su empleo con dichos agentes.

## Capítulo II. OBJETIVOS



## OBJETIVOS

### Objetivo general

Realizar un estudio *in vitro* de la actividad genotóxica del metotrexato (mtx) a concentraciones terapéuticas en linfocitos humanos, con la finalidad de aportar nuevos datos en el diseño de estrategias terapéuticas en los pacientes con algún tipo de cáncer que reciben éste fármaco en su tratamiento

### Objetivos particulares

- ✓ Emplear el Ensayo Cometa como una técnica altamente sensible para determinar de forma oportuna y anticipada el daño al ADN que pudiera producir sobre linfocitos humanos un antineoplásico ampliamente utilizado como el metotrexato.
- ✓ Probar *in vitro* cuatro diferentes concentraciones de metotrexato que se encuentren entre la concentración plasmática terapéutica (4-54 µg/ml) y la concentración tóxica (mayores a 10 µg/ml), para monitorear su efecto genotóxico sobre los linfocitos humanos
- ✓ Realizar un estudio *in vitro*, en el que se muestre el riesgo de efecto genotóxico del metotrexato a concentraciones terapéuticas.

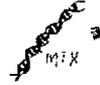
### Capítulo III. HIPÓTESIS



## Hipótesis

Después de la administración de MTX al paciente que padece cáncer, existe una interacción entre el fármaco y las células neoplásicas a las que está dirigido. Sin embargo, durante su trayectoria por circulación también afecta a los linfocitos que se encuentran a su paso. Por ello, si los linfocitos expuestos a diferentes concentraciones de metotrexato presentan migración diferencial del núcleo en forma de cometa bajo electroforesis unicelular, entonces consideraremos a este fármaco como un agente genotóxico.

Capítulo IV. PARTE EXPERIMENTAL



## PARTE EXPERIMENTAL

### 1.- Material

#### Material diverso

- Ligadura
- Algodón
- Guantes
- Gasas
- Jeringas de plástico desechables con aguja (21x32 mm) de 3ml
- Pipetas graduadas estériles (1,5 y 10 ml)
- Micropipeta de 5 – 50  $\mu$ l
- Micropipeta de 10 - 200  $\mu$ l
- Puntas para micropipeta
- Tubos eppendorff
- Vasos Kopplin opacos
- Portaobjetos completamente esmerilados
- Cubreobjetos 24 x 50mm
- Pipetas Pasteur
- Cámara húmeda
- Tubos de ensayo de 5, 12 y 15 ml
- Espátula fina
- Cubrebocas
- Pisseta con agua desionizada
- Barra magnética
- Vasos de pp. de 100, 250, y 4000 ml
- Gradilla para tubos de ensayo
- Gradilla para tubos eppendorff
- Paquetes refrigerantes

#### Material Biológico

Muestras de sangre periférica heparinizada, tomadas por la mañana en condiciones de ayunas, de un donador masculino clínicamente sano, de 24 años de edad, sin hábito de fumar y beber, y no habiendo consumido ningún fármaco al menos durante 15 días previos a la toma de muestras.



## Equipo

- Balanza de 2 platos
- Balanza analítica
- Centrífuga clínica con camisas
- Cámara de Newbauer (hemocitómetro)
- Estufa bacteriológica
- Autoclave
- Refrigerador
- Horno de microondas
- Ultracentrífuga
- Potenciómetro
- Microscopio óptico
- Cámara horizontal de electroforesis
- Fuente de poder (100/120 Volts)
- Campana de flujo laminar
- Microscopio de fluorescencia con.
  - Filtro de excitación (515 nm)
  - Filtro de barrera (590 nm)
  - Micrómetro ocular



## Reactivos

- Etanol 70%
- Cloruro de benzalconio
- Heparina acuosa (1000 U)
- Medio de cultivo RPMI 1640 (Ultralab)
- Suero fetal bovino (SFB)
- Ficoll – Hypaque (Sigma Chemical Co.)
- Metotrexato (Amethopterine Methotrexate, Sigma Chemical Co.)
- Agarosa de bajo punto de fusión (Sigma Chemical Co.), (0.5%)
- Agarosa normal (Sigma Chemical Co.), (0.5 al 0.75%)
- Buffer de calibración pH 7.0 y pH 10.0
- Azul tripano al 0.5% en SSF
- NaCl (Sigma Chemical Co.), 2.5M
- Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma Chemical Co.), 200mM y 100mM
- PBS (Sigma Chemical Co.), pH 7.4
- Trizma Base (Sigma Chemical Co.), 10mM
- Tris (Buffer) 0.4M pH 7.5
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co.), 10%
- Tritón X-100 (Sigma Chemical Co.), 1%
- Sarcocinato de Sodio (Sigma Chemical Co.), 1%
- Solución de lisis madre : 2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Sarcocinato, ajustada a pH 10
- NaOH (Sigma Chemical Co.), 10N
- Buffer de NaOH pH 13
- Ioduro de propidio (Sigma Chemical Co.), 5µg/ml
- Agua destilada
- Agua desionizada
- Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comercial en agua desionizada 200µM



## 2.- Métodos

### • Preparación de la solución de metotrexato

- Se preparó una solución madre de MTX a una concentración de 200 $\mu$ g/ml Para ello se pesaron 5mg del polvo de metotrexato (Amethopterine Methotrexate, Sigma Chemical Co ) y se disolvieron en 25ml de agua desionizada
- Para lograr las concentraciones de 5, 10, 15, y 20 $\mu$ g/ml, se tomó de la solución madre 25, 50, 75, y 100 $\mu$ l respectivamente, colocándose cada volumen en tubos eppendorff para la posterior adición de suspensión de linfocitos humanos en RPMI 1640 con 10% de SFB hasta completar un volumen total de 1ml

### • Toma de muestra

- Se tomó en una jeringa de plástico de 3ml, 0.1ml de heparina en solución acuosa
- Con la misma jeringa se tomaron mediante punción venosa 3ml de sangre
- Se mezcló suavemente la sangre con la heparina para evitar la coagulación

### • Aislamiento de linfocitos humanos

- Se realizó el aislamiento de linfocitos por gradiente de Ficoll–Hypaque en proporción 1:1 (sangre. Ficoll), centrifugando 30min a 2000rpm
- Se realizaron 2 lavados con RPMI 1640 sin suero fetal, centrifugando en cada lavado 10min a 1000rpm



- **Viabilidad celular**

- Una vez obtenida una pequeña suspensión, se realizó la cuenta viable (% de viabilidad celular), colocando 0.1ml de la suspensión celular en un tubo de ensayo que contenía 0.9ml de azul tripano, se mezcló y se cargó el hemocitómetro
- Se ajustó la suspensión a 350 000 céls/ml en cada microtubo de prueba
- Se destinaron 3 microtubos de prueba para cada concentración de MTX, así como para el control positivo y el control negativo, de los cuales 2 fueron utilizados para preparar las laminillas en las que posteriormente se evaluaría el efecto genotóxico y 1 microtubo se empleó para monitorear la viabilidad celular en cada concentración de prueba

- **Ensayo Cometa**

A. Preparación de laminillas

1. Se colocó la suspensión celular en un tubo eppendorff y se adicionó la cantidad adecuada para tener la concentración de 200 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en RPMI 1640 con 10% de SFB (control positivo) en un volumen total de 1ml ( el control negativo no contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ) Para las pruebas del MTX se realizó el mismo procedimiento, sustituyendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el MTX en sus diferentes concentraciones
2. Se colocaron las muestras en incubación a 37C durante 60min
3. Se preparó una cámara con solución de lisis pH 10 ( NaCl, EDTA, Tris, NaOH, Sarcocinato de Sodio, Tritón X-100 y DMSO) y se colocó en refrigeración
4. Se marcó o etiquetó un lado del portaobjetos y se colocó una capa de 150 $\mu$ l de agarosa regular, por la parte completamente esmerilada y se colocaron las laminillas sobre paquetes congelantes



- 5 Después de la exposición, se centrifugaron los tubos durante 1min
6. Se decantó lo mayor posible el sobrenadante, y se resuspendió la pastilla de cada tubo en 75µl de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA) 0.5% a 37°C y se colocaron como capa sobre cada laminilla previamente preparada (núm.4)
7. Se dejó solidificar la agarosa y después se removieron los cubreobjetos con cuidado y se colocaron las laminillas verticalmente en la solución de lisis fría; colocando los vasos Kopplin en el refrigerador durante 24 – 48hrs.

#### B. Corrimiento de la electroforesis

- Se retiraron suavemente los portaobjetos de la solución de lisis y se colocaron en la cámara de electroforesis
- Se llenó la cámara con el buffer de electroforesis pH 13, recientemente preparado hasta que cubrió los portaobjetos (evitando la formación de burbujas sobre la agarosa) y se dejaron en estas condiciones durante 25 min
- Se corrió la electroforesis durante 25min a 25 V y 300 mA ajustando con el incremento o disminución del nivel de buffer de electroforesis
- Una vez terminada la electroforesis se levantaron suavemente los portaobjetos de la cámara y se gotearon hasta cubrirlos con buffer de neutralización por al menos 5 min., repitiendo este procedimiento dos veces más
- Se conservaron los portaobjetos en cámara húmeda hasta 72hrs a 4°C

#### C. Tinción de las preparaciones

- Se adicionaron 20-30 µl del colorante yoduro de propidio y se montaron con un cubreobjetos



#### D. Evaluación del daño al ADN

- Las observaciones se realizaron usando un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515 – 560nm y un filtro de barrera de 590nm, usando un micrómetro en el ocular y el objetivo de 25X
- Las evaluaciones se realizaron en 50 células por cada concentración de Metotrexato, así como en el control positivo y el control negativo; dichas evaluaciones fueron:
  - ✓ Medida del diámetro del núcleo celular
  - ✓ Medida de la longitud del núcleo celular

#### • Grupo experimental adicional

En este grupo de 5µg/ml de Metotrexato + Control positivo ( $H_2O_2$  200µM), el procedimiento fue similar a todas las concentraciones de MTX y a los controles, así como también se aplicaron las mismas condiciones de trabajo, la diferencia se encuentra en que se expusieron los linfocitos durante 15 min. a 5µg/ml de MTX, después se lavaron las células con RPMI 1640 con 10 % de SFB y estas células fueron expuestas posteriormente durante 45 min. a  $H_2O_2$  200µM. Estas células fueron utilizadas para preparar laminillas que se evaluaron y trataron de igual forma que los controles y las diferentes concentraciones de MTX

#### • Análisis estadístico

En el análisis celular microscópico se midió la longitud y el diámetro de cada una de 50 células en cada concentración de MTX probada, así como en el control negativo y el control positivo al igual que en el experimento adicional de MTX +  $H_2O_2$ .

Los 7 grupos de 50 células medidas en cada uno de ellos, fueron tratados estadísticamente bajo la prueba de Tuckey Kramer, en la que se realizó un análisis de varianza y la posterior comparación múltiple con  $\alpha = 0.05$  entre los promedios de los grupos experimentales, por tanto, la diferencia entre los promedios debe considerarse significativa.

El programa estadístico que se utilizó para el tratamiento de los datos es INSTAT PAD. Versión 203, que es una herramienta comúnmente utilizada en el área de Genotoxicología.

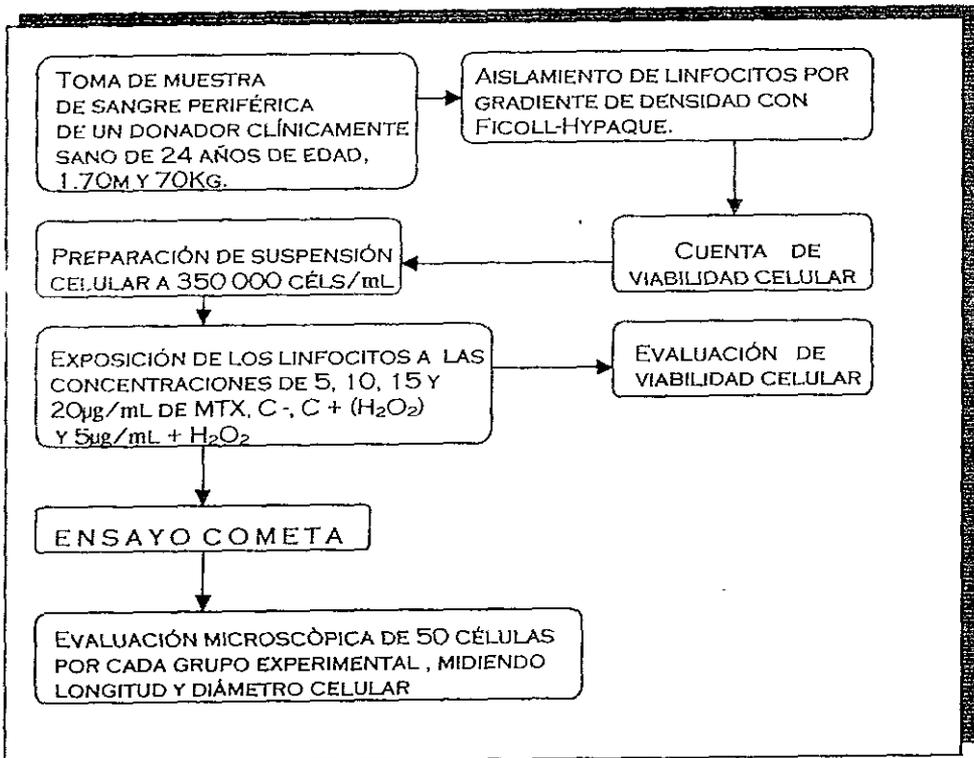


Figura 10. Diagrama de flujo de la fase experimental de la presente investigación.

## Capítulo V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## RESULTADOS y DISCUSIÓN

### Viabilidad celular

En el aislamiento de linfocitos por gradiente con Ficoll-Hypaque se obtuvo una viabilidad celular aceptable (mayor del 98%). Y de igual manera sucedió con la viabilidad celular al terminar el tiempo de exposición a las diferentes concentraciones de MTX, disminuyendo solamente en un 6.8%.

Los resultados se muestran en la tabla 2, donde la viabilidad celular se estimó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad celular} = (\text{células vivas} / \text{células muertas}) 100$$

Tabla 2. Resultados de viabilidad celular en el aislamiento de linfocitos humanos por gradiente con Ficoll-Hypaque antes y después de exposición a las diferentes concentraciones de MTX

% de viabilidad celular inicial	% de viabilidad celular final
98.19	92.68
99.04	92.85
98.79	90.90
98.43	91.30
97.85	92.59
99.29	86.60
99.36	96.42

Promedio = 98.70 %

Promedio = 91.9 %



### Análisis estadístico de la relación longitud / diámetro

Los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 3, donde se observa que los datos de  $5\mu\text{g/ml}$  de MTX +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , presentaron diferencia estadísticamente significativa respecto a todas las concentraciones de MTX probadas y a los controles negativo y positivo; además de presentar el mayor promedio (Fig. 11) de la relación longitud / diámetro.

Tabla 3 Análisis estadístico de los valores obtenidos en la relación longitud / diámetro de los linfocitos humanos a diferentes concentraciones de MTX

Concentración	Promedio relación longitud / diámetro	$\pm$ Desviación estándar	Diferencia estadísticamente significativa respecto al Control Negativo (N) y al Control Positivo (P).
(A) Control negativo	1.10	0.09	P
(B) $5\mu\text{g/ml}$	1.21	0.10	P
(C) $10\mu\text{g/ml}$	1.30	0.17	N, P
(D) $15\mu\text{g/ml}$	1.39	0.13	N, P
(E) $20\mu\text{g/ml}$	1.45	0.22	N
(F) Control positivo	1.58	0.09	N
(G) $5\mu\text{g/ml} + \text{H}_2\text{O}_2$	2.31	0.45	N, P



### Distribución porcentual celular de la relación longitud/diámetro

En la distribución porcentual celular obtenida en éste estudio (Tabla 4), la concentración de  $5\mu\text{g/ml}$  de MTX +  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $200\mu\text{M}$ ) es la que resultó más alejada del valor de 1.0 (Fig. 12) y con una mayor cantidad de células que presentaron valores de la relación longitud/diámetro en el intervalo de 2.4 a 2.5

Por otro lado, las concentraciones de 5 y  $10\mu\text{g/ml}$  de MTX presentaron un comportamiento en la distribución porcentual de la relación longitud/diámetro celular, muy semejante a la del control negativo (Fig. 12)

Además, se observa que a partir de la concentración de  $15\mu\text{g/ml}$  la formación de cometas es más frecuente de manera creciente conforme aumenta la concentración, y el mayor porcentaje de las células presenta valores de la relación longitud/diámetro, cada vez más alejados del valor de 1.0 (Fig. 12)

~~XXXXXXXXXX~~  
MTX

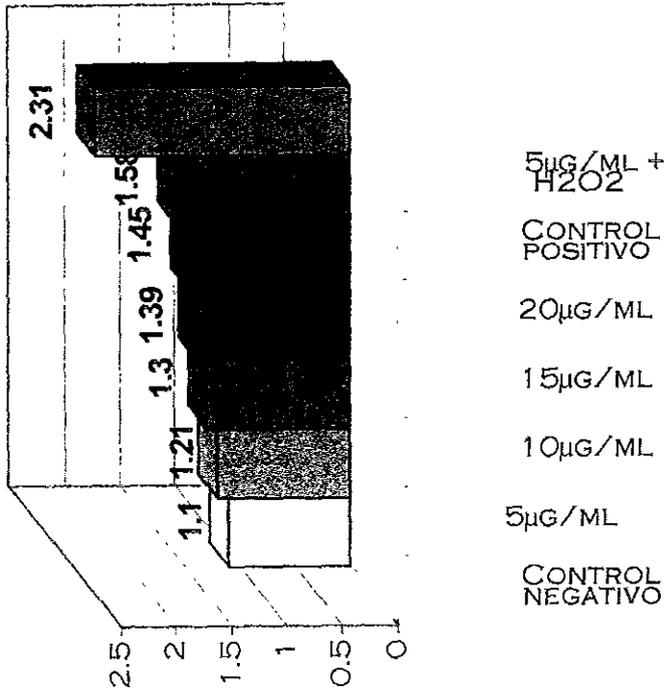


Figura 11. Comparación del promedio de la relación longitud / diámetro entre las concentraciones de metotrexato, controles positivo, negativo, y 5µg/ml + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tabla 4. Distribución porcentual de la relación longitud / diámetro celular

Rango	1 0-1.1	1.2-1.3	1.4-1.5	1 6-1.7	1 8-1.9	2 0-2.1	2 2-2.3	2.4-2.5	2.6-2.7	2 8-2.9	3-3.1	3 2-3.3	3.4-3.5
Control negativo	90%	8%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Conc. 5 µg/ml	16%	74%	10%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Conc. 10 µg/ml	8%	74%	18%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Conc. 15 µg/ml	8%	36%	32%	24%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Conc. 20 µg/ml	0%	24%	58%	18%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Control positivo	0%	18%	22%	24%	30%	6%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
5µg/ml + H2O2	0%	0%	4%	10%	8%	10%	14%	24%	10%	10%	10%	0%	0%

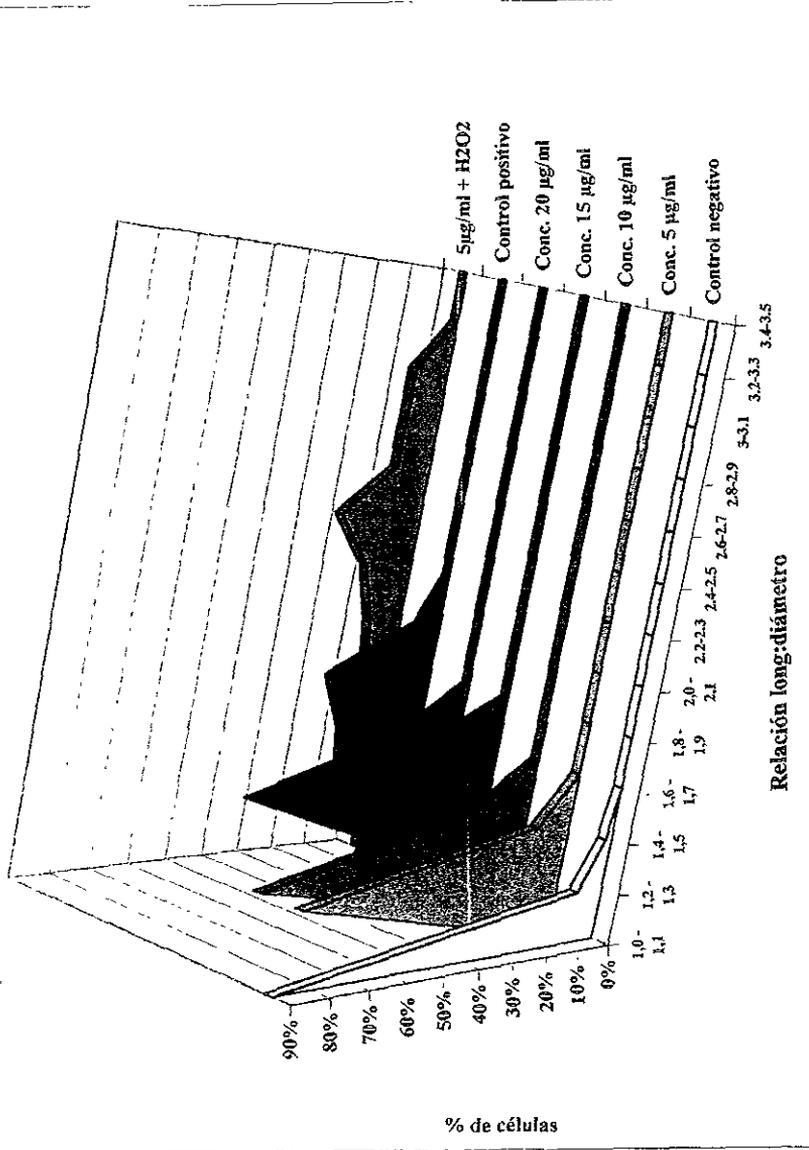
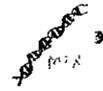


Figura 12. Distribución porcentual en áreas de la relación longitud / diámetro celular, comparando los diferentes grupos experimentales



## Discusión

En los resultados obtenidos de la viabilidad celular al inicio del experimento, se observó que el promedio es  $\geq$  al 98%, lo cual indica que los linfocitos se obtuvieron adecuadamente y que tenían las condiciones suficientes para entrar al ensayo cometa (Andreoli, 1999). Al final del tiempo de exposición, se determinó que la viabilidad celular disminuyó solamente un 6.8% respecto a la obtenida inicialmente, pero esto no se consideró importante ya que se tuvo un valor muy por arriba del 80% que es el mínimo requerido para el ensayo cometa según Andreoli (1999). Por ello, se deduce que el efecto que presentaron los linfocitos se debe al tratamiento con las diferentes concentraciones de MTX, por mecanismos de genotoxicidad y no de citotoxicidad.

Según Kasamatsu (1996), el MTX requiere activación enzimática, es decir, conversión a poliglutamatos para inducir rupturas en el ADN. Se ha dicho también, que el MTX necesita 10hrs para inducir la degradación del ADN en células tratadas con este fármaco (Yoshioka, 1987 y Barry, 1990) y que 1hr de tratamiento puede ser un tiempo demasiado corto para inducir nucleasas que intervengan en el rompimiento del ADN en el ensayo cometa (Kasamatsu, 1996). Además, se sabe que el MTX causa un desequilibrio en la mezcla de nucleótidos para la síntesis de *novo* de ADN, por lo que la biosíntesis de ADN programada se ve bloqueada. Dicha mezcla de nucleótidos desequilibrada, según Li y Kaminskas (1984), y Yoshioka (1987), parece ser un iniciador de la inducción de endonucleasa que causa los rompimientos en cadena doble de ADN.



Bajo las condiciones de prueba del presente trabajo (1hr de exposición a 37C, medio RPMI 1640 con 10% de SFB, sin la adición de fracción microsomal), se encontró que a partir de la concentración tóxica de 10 $\mu$ g/ml (Goodman, 1987) existe una diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo, lo que indica la presencia de un efecto genotóxico en donde probablemente haya ruptura en el ADN, ya que visualmente se obtuvieron núcleos celulares en cometa con diferentes longitudes de extensión en la cola, de forma creciente en las concentraciones de 10, 15 y 20 $\mu$ g/ml, a diferencia del control negativo en el que se observó el 90% de núcleos íntegros. Esto corresponde a la distribución de la relación longitud/diámetro celular (Tabla 4 y Fig. 12), donde debe interpretarse que el valor de 1.0 o muy cercano a éste, representa células con núcleo íntegro o casi íntegro, completamente circular. Por el contrario, cuando el valor de la relación longitud/diámetro celular se aleja de 1.0, refleja que las células han experimentado un efecto genotóxico, como es el caso de las concentraciones de 10, 15 y 20 $\mu$ g/ml de MTX, así como el control positivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 200 $\mu$ M y el grupo experimental de 5 $\mu$ g/ml de MTX + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 11).

Lo anterior, indica que 1hr de exposición de los linfocitos a las diferentes concentraciones de MTX utilizadas en ésta investigación, es tiempo suficiente para inducir un mecanismo de efecto genotóxico que intervenga en el daño al ADN en el bioensayo cometa. El trabajo de Kasamatsu (1996), señala que las células de leucemia murina L1210 tratadas con MTX en cultivo, bajo condiciones semejantes a las utilizadas en ésta investigación, no presentan diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo en el ensayo cometa, sin embargo, su resultado puede atribuirse a la concentración de MTX que Kasamatsu emplea, siendo ésta de 50nM, o bien, 0.022 $\mu$ g/ml. En cambio, en éste trabajo se utilizaron



concentraciones de MTX mayores, que obedecen al objetivo de llevar éste estudio hacia situaciones clínicas probando concentraciones con valores que se alcanzan en el plasma de pacientes que reciben al fármaco en su tratamiento.

Es necesario puntualizar que en el presente trabajo no se provocó la formación de poliglutamatos a partir del MTX, ya que no se adicionó, como se ha mencionado, fracción microsomal, por lo que muy probablemente se mostró la capacidad intrínseca del mismo para inducir el mecanismo responsable del daño al ADN por ruptura de cadenas.

A partir del presente estudio, se obtiene que 1hr de tratamiento de los linfocitos con las diferentes concentraciones de MTX es tiempo suficiente para inducir un mecanismo de daño al ADN en el ensayo cometa, y que el MTX no requiere estrictamente biotransformación para inducir un daño genotóxico. Aún cuando el objetivo del presente trabajo no fue dilucidar el mecanismo de genotoxicidad del MTX y debido a que el ensayo cometa puede detectar rupturas en cadena doble o sencilla de ADN, así como sitios álcali-lábiles (Sing, 1988), se probó un grupo experimental adicional ( $5\mu\text{g/ml}$  MTX +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) donde  $5\mu\text{g/ml}$  de MTX no había presentado diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo. El resultado de esto (Tabla 4 y Fig 11 y 12) refleja que hubo cometas con colas de mayor longitud y núcleos más pequeños, seguramente por efecto sinérgico del MTX y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que hace posible proponer como mecanismo de genotoxicidad del MTX la inducción de sitios álcali-lábiles, que son sitios apurínicos/apirimidínicos (AP), resultantes del mecanismo de reparación glicosilítico que induce, posteriormente, una AP endonucleasa que deja un sitio 3'-OH para la subsecuente síntesis y ligación que restaura la integridad de la información genética en el ADN (Ross y Moon-Shong, 1985). Esta propuesta no se contrapone en

absoluto a la hipótesis de Li y Kaminskas (1984), así como la de Yoshioka (1987), en la que mencionan la inducción de la endonucleasa por la mezcla desequilibrada de nucleótidos; y si se puede suponer que aporta una alternativa para el estudio del mecanismo de genotoxicidad del MTX

De éste trabajo se desprende también que el MTX no provoca el efecto de genotoxicidad por interacción directa con el ADN o intercalándose en él, sino que lo hace por inducción de mecanismos que de forma natural pueden alterar al mismo, afectando la integridad de la información genética

En lo futuro, podría considerarse el presente estudio en la planeación del tratamiento de aquellos pacientes que presentan eliminación inicial lenta y que alcanzan valores plasmáticos de 50 a 100 $\mu$ M (Chabner, 1988, Allegra, 1990), siendo aproximadamente 22.7 a 45.4 $\mu$ g/ml de MTX, por lo que deben ser dosificados cuidadosamente, ya que, como se muestra en la presente investigación, el MTX se comporta como agente genotóxico a partir de la concentración de 10 $\mu$ g/ml.

## Capítulo VI. CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- ✓ El ensayo cometa es una técnica altamente sensible que permitió detectar el daño al ADN que produjo el MTX sobre los linfocitos humanos.
  
- ✓ A partir de  $10\mu\text{g/ml}$ , el MTX se comporta como un agente genotóxico, actuando de forma indirecta y no requiere biotransformación
  
- ✓ Se sugiere la existencia de un riesgo de efecto genotóxico, tanto en aquellos pacientes que alcanzan concentraciones plasmáticas iguales o mayores a  $10\mu\text{g/ml}$ , como en los que reciben al MTX simultáneamente con otros agentes genotóxicos conocidos durante su tratamiento

Capítulo VII. BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

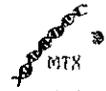
- Ager, D D y Dewey, W C (1990) Calibration of pulsed-field gel electrophoresis for measurement of DNA double strand breaks *Int.J.Radiat Biol* 58: 249-258
- Ahnstrom, G y Evarðsson, K.A (1974) Radiation-induced single strand breaks in DNA determined by rate of alkaline strand separation and hidroxapatite chromatography. an alternative to velocity sedimentation *Int J Radiat.Biol* 26 493-497
- Ahnstrom, G (1988) Techniques to measure single-strand breaks in cells A review *Int.J.Radiat Biol* 54 695-707
- Allegra, C J (1990) Cancer Chemotherapy Principles and Practice JB Lippincot Co Philadelphia USA pp 314-340
- Anderson, D, Jenkinson, P C, Dewdney, R S, Francis, A T., Godbert, P y Butterworth, K R (1989) Chromosome aberrations, mitogen induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral from 106 control individuals in the U.K. population *Mut Res* 204 407-420
- Anderson D (1990) Male mediated F1 abnormalities. Special issue *Mut Res* 90 261-272
- Andreoli, C, Rossi, S, Leopardi, P Y Crebelli, R (1999). DNA damage by hidroquinone in human white blood cells: analysis by alkaline single-cell gel electrophoresis *Mut Res.* 438 57-65
- Assaraf Y G y Schimke, R T (1987) Identification of methotrexate transport deficiency in mammalian cells using fluorescinated methotrexate and flow cytometry. *Proct Natl Acad Sci* 84 7154-7157
- Ballantyne, B, Marrs, T y Turner, P (1993) General and Applied Toxicology 1ª ed Vol 2 M Stockton Press USA pp 893-955
- Barry, M, Behnke C y Eastman A (1990) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia *Biochem Pharmacol* 40: 2353-2362
- Bernini, J C, Fort, W D, Griener, C J, Kane, J.B, Chappell, B W y Kamen, A B (1995) Aminophylline for methotrexate-induced neurotoxicity. *The Lancet* 345 544-547
- Bertram, G K (1987) Farmacología básica y clínica. 3ª ed, Ed El manual moderno, México pp. 693-695
- Betti, C, Davini, T, Giannesi, L, Loprieno, N. Y Barale, R (1994). Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects *Mut Res* 307 232-233
- Blever, W A (1978) The clinical pharmacology of methotrexate *Cancer* 41 36-51



- Bose, D S., Thompson, A S., Smellie, M., Bernardini, M D., Hartley, J A., Jenkins, T C., Nerdle, S Y Thurston, D E (1992). Effect of linker length on DNA binding affinity, cross-linking efficiency and cytotoxicity of C8-linked pyrrolobenzodiazepine dimers. *J.Chem Soc.Chem.Commun* **20** 1518-1520
- Boyum, A. (1968). Separation of lymphocytes and erthrocytes by centrifugation *Scand J.Clin.Invest.* **21** 77-85
- Bradley, M O y Kohn, K W (1979) X-ray induced DNA double-strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution *Nucleic Acids Res* **7** 793-804
- Calabresi, P., Schem, P S y Rosenberg, S.A (eds) (1985) Medical Oncology McMillan Publishing Co New York pp 920-932
- Carthy P S, Sweetman S F S, McKenna, P G y McKelvey, V J (1997) Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay *Mutagenesis* **250** 209-214
- Cerami, P A (1985) Prooxidant states and tumor promotion *Science* **227** 375-381
- Cichwicz D J y Shane, B (1987). Mammalian folyl- $\gamma$ -poliglutamate synthetase Purification and general properties of the hog liver enzyme *Biochemistry* **26** 504-512
- Cook, P R y Brazell I A (1975) Supercoils in human DNA *J Cell Sci* **19** 261-275
- Cooper D y Louton, R (1987) El desarrollo del sistema inmunitario *Inmunología Libros de Investigación Científica* Scientific American España pp 90
- Craig R Ch y Sittzel, E R (1984) Farmacología médica Nueva Editonal Interamericana México, pp 804-1021
- Curt, G A., Carney, D N., Cowan, K H., Kao-Shan, C S., Minna, J D y Chabner B A (1983) Unstable methotrexate resistance in human small-cell carcinoma associated with double minute chromosomes *New Eng J Med* **308** 199-202
- Curt, G A Jolivet, J., Carney, D.N., Bailey, B.D., Drake, J C., Clendeninn, N J y Chabner B A (1985) Determinants of the sensitivity of human small-cells lung cancer cell lines to methotrexate *J.Clin Invest* **76** 1323-1329
- Chabner, B A (1982) Pharmacologic Principles of Cancer Treatment W B.Saunders Co Philadelphia, USA pp 340-362



- Chabner, B.A., Allegra, C.J., Curt, G.A., Clendennin, N.J., Baram, J., Koizumi, S., Drake, J.C. y Jolivet, J (1985) Polyglutamation of methotrexate. Is a methotrexate pro drug? *J.Clin Invest.* 76 907-912.
- DeMéo, M., Laget, M., Castegnaro, M. y Duménil, G. (1991). Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mut. Res.* 260 295-306
- Dive, C., Evans, C.A. y Whetton, A.D. (1992) Induction of apoptosis-new targets for cancer chemotherapy *Sem Cancer Biol* 3 417-427
- Edwards, A.J., Moon, E.J., Anderson, D. y McGregor, D.B. (1993) The effect of simultaneous exposure to bromodeoxyuridine and methyl methan-sulphonate on sister chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes and its mutation research (in press) *Mut. Res.*
- Elwood, P.C. (1989) Molecular cloning and characterization of the human folate binding protein cDNA from placenta and malignant tissue culture (KB) cells. *J Biol.Chem* 264 14893-14901
- Evans, H.J. y O'Riordan, M.L. (1975) Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test *Mut Res* 31 135-148.
- Farber, S., Diamond, L.K., Mercer, R.D., Silvester, R.F. y Wolff, V.A. (1948) Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic antagonist 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin) *New Eng J Med* 238 787-793
- Felsenfeld, G. (1992) Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism *Nature* 355 219-224
- Freeman, S.E., Blackett, A.D., Monteleone, D.C., Setlow, R.B., Sutherland, B.M. y Sutherland, J.C. (1986) Quantitation of radiation-chemical-or enzyme-induced single-strand breaks in nonradiative DNA by alkaline gel electrophoresis: applications to pyrimidine dimers. *Anal Biochem.* 158. 119-129.
- Gedik, C.M., Ewen, S.W. y Collins, A.R. (1992) Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells *Int J.Radiat.Biol.* 62 313-320
- Goodman, G., Goodman, S., Rall, W. y Murad, F. (1991). Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª ed, Ed. Medica-Panamericana, Argentina pp. 1184-1222
- Green, M.H., Lowe, J.E., Harcourt, S.A., Akinluyi, P., Rowe, T., Cole, J., Anstey, A.V. y Arlett, C.F. (1992) UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and Xeroderma pigmentosum donors in the comet assay. A potential diagnostic technique. *Mut Res.* 273 137-144



- Hartmann, A., Plappert, U., Raddatz, K., Grünert-Fuchs, M. y Speit, G (1994) Does physical activity induce DNA damage?. *Mutatgenesis* 9: 269-272
- Hertz, R (1963) Folic acid antagonists effects on the cell and the patient. Clinical staff conference at N.H.I *Ann Intern. Med.* 59 931-956
- Hickman, J A (1992) Apoptosis induced by anticancer drugs *Cancer Metast Rev* 11: 121-139
- Hoffmeister, R T (1983) Methotrexate therapy in rheumatoid arthritis: 15 years experience *Am J.Med.* 30 69-73
- Huffman, D H, Wan, S H, Azarnoff, D L y Hoogstraten, B. (1973) Pharmacokinetics of methotrexate *Clin Pharmacol Ther* 14: 572-579
- Inlay J A, Chin, S M y Linn, S (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240. 640-642
- Inlay J A y Linn, S (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity *Science* 240 1302- 1309
- Ishidate, M Jr y Harnois, M.C (1987) The clastogenicity of chemicals in mammalian cells Letter to the editor *Mutatgenesis* 2 240-243
- Iven, H y Brash, H (1988) The effects of antibiotics and uricosuric drugs on the renal elimination of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in rabbits *Cancer Chemother Pharmacol* 21 337-342
- Jackson, R C (1984) Biological effects of folic acid antagonists with antineoplastic activity *Pharmacol Ther.* 25. 61-82
- Joliva, J, Schilsky, L R, Bailey, D B., Drake, C J y Chabner, B.A (1982) Synthesis, Retention, and biological activity of methotrexate polyglutamates in cultured human breast cancer cells *J.Clin.Invest.* 70 351-360
- Kasamatsu, T, Yutaka, K y Kohfuku, K (1996) Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay *Mut. Res* 369: 1-6
- Kirkland, D J y Garner, R C (1987) Testing for genotoxicity-chromosomal aberrations in *in vitro*- CHO cells or human lymphocytes?. *Mut. Res.* 189 186-187
- Kohn, K W, Ewig, R A, Erickson, L C y Zwelling, L A. (1981) DNA Repair, a Laboratory Manual of Research Procedures. Vol 1 New York, USA. pp. 379-401



- Kraut, J y Matthews, D A (1987) Biological Macromolecules and Assemblies Vol 3. John Wiley & Sons, New York, USA pp. 1-21
- Lambert, B , Lindblad, A , Holmberg, K y Francesconi, D (1982) Sister chromatid exchange Wiley. New York, USA pp 149-182
- Latt, S A., Schreck, R R , Loveday, K S , Dougherty, C.P y Shuler, C F (1980) Sister chromatid exchanges *Adv Human Genetic* 10. 267-331
- Latt, S.A , Allen, J W , Bloom, S.E, Carrano, A , Falke, E , Kram, D , Schneider, E , Schreck, R , Tice, R , Whitfield, B Y Wolff, S (1981) Sister chromatid exchanges a report of the gene-tox program *Mut. Res* 87 17-62
- Lehman, A R y Ormerod, M.G. (1970) Double strand-breaks in the DNA of mammalian cell after X-irradiation *Biochem Biophys Acta* 217. 268-277
- Li, J y Kaminskas, E (1984). Accumulation of DNA strand breaks and methotrexate cytotoxicity *Proc Nat Acad Sci U.S.A* 81, 5694.
- Martins, F.A , Chubatsu, L S y Meneghini, R (1991) Role of antioxidants in protecting cellular DNA damage by oxidative stress *Mut Res* 250. 95-101
- Matthews, D A (1985). Refined crystal structures of *E.coli* and chicken liver dihydrofolate reductase containing bound trimethoprim *J.Biol Chem* 260. 381-391
- McDonald, C J (1981) The uses of systemic chemotherapeutic agent in psoriasis *Pharmacol Ther.* 14 1-24
- McGrath, R A y Williams, R W (1966) Reconstruction *in vivo* of irradiated *E.coli* deoxyribonucleic acid, the rejoining of broken pieces *Nature* 212 534-535.
- McKee, T Y McKee, J (1996). Biochemistry An Introduction Wm C Brown Publishers U S A
- McMillan, T J, O'Neill, P , Peacock, J.H y Prise, K (1990) First LH Gray workshop Measurement of radiation-induced DNA damage *Int.J.Radiat Biol* 58 391-396
- Morales, R (1988) El daño a la información genética y los intercambios de cromátidas hermanas *Ciencia y Desarrollo* 14 65-72
- Milteny Biotec Instruments and reagents for magnetic cell sorting 97 Uniparts



- Newton, M F y Lilly, L J. (1986) Tissue specific clastogenic effects of chromium and selenium salts *in vivo Mut Res* 169. 61-69
- Nordén, B, Elvingsson, C., Johnsson, M y Åkerman, B. (1991) Microscopic behaviour of DNA electrophoretic orientation *O Rev. Biophys* 24. 103-164
- Nose, K y Okamoto H (1983) Detection of carcinogen-induced by DNA breaks by nick translation in permeable cells *Biochem. Biophys Res. Commun.* 111. 383-389.
- Olive, P.L., Chan, A.P.S y Cu, C.S. (1988). Comparison between the DNA precipitation and alkali unwinding assays for detecting DNA strand breaks and cross-links *Cancer Res.* 48 6444-6449
- Olive, P.L (1989) Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids, *Radiat Res.* 117 79-92.
- Olive, P.L. (1992). DNA organization affects cellular radiosensitivity and detection of initial DNA strand breaks *Int J Radiat Biol* 62 389-396
- Olive, P.L y Durand, R.E (1992). Detection of hypoxic cells in a murine tumor with the use of the comet assay *J Natl Cancer Inst* 84 707-711
- Olive, P.L. y Banáth, J.P (1993) Detection of DNA double strand-breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and <sup>125</sup>I-Urd *Int J. Radiat Biol* 64. 349-358
- Olive, P.L., Jackson, S.M y Durand, R.E (1993) Predicting tumor response to radiotherapy using the comet assay. Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Time, Dose and Fractionation en Paliwal, B.R., Kinsella, T.J., Herbert, D y Fowler, J (eds). Radiation Oncology, The American Institute of physics, Woodbury N.Y USA pp 65-76
- Olive, P.L (1994) Radiation-induced reoxygenation in the SCCVII murine tumor evidence for a decrease in oxygen consumption and an increase in tumor perfusion (*in press*) *Radiother. Oncol.*
- Olive, P.L., Vikse, C.M y Durand, R.E (1994) Hypoxic fractions measured in murine tumors and normal tissues using the comet assay. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol Phys.* 29 487-491.
- Ostling, O. y Johanson, K.J (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells *Biochem. Biophys Res Commun.* 123: 291-298
- Perry, P.E y Evans, H.J (1975) Cytological detection of mutagen/carcinogen exposure by sister chromatid exchange *Nature* 258 121-125



- Potts, M (1995) Non-surgical abortion: who's for methotrexate *The Lancet* **346** 655-656
- Reyes, C P (1995) Bioestadística aplicada agronomía, biología, química. 2ª ed, Editorial Trillas, México pp 104-113
- Ross, J. y Moon-Shong T. (1985) Differentiation of Apurinic/Apyrimidinic sites and single-strand breaks in DNA by formamide- and alkaline-sucrose gradient sedimentation *Anal. Biochem.* **144** 212-217.
- Rydberg, B y Johanson, K J (1978) Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells en Hanawalt, P.C, Friedberg, E C. y Fox, C.F (eds) DNA Repair Mechanisms Academic press, N.Y. USA. pp. 465-468
- Rydberg, B (1984) Detction of DNA damage in single cells using flow cytometry *Int J.Radiat.Biol.* **46**: 521-527
- Salamanca, G F (1990) Citogenética humana. Fundamento y aplicaciones clínicas. Ed Médica Panamericana, México. pp 49-52
- Schimke, R T, Kaufman, R J., Alt, F W y Kellems, R F (1978) Gene amplification and drug resistance in cultured murine cells *Science* **202**: 1051-1055
- Schwartz, D.C y Cantor, C R (1984) Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37** 67-75.
- Singh, N P, McCoy, M T., Tice, R.R y Schneider, E L (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells *Exp. Cell Res* **175**: 184-191
- Singh, N P, Danner, D B, Tice, R R, McCoy, M T, Collins, G.D y Schneider, E L (1989) Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm *Exp.Cell Res* **184**: 461-470.
- Singh, N P, Danner, D B, Tice, R.R, Brandt, L. y Schneider, E L (1990) DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mut Res* **237**. 123-130
- Singh, N.P, Danner, D B, Tice, R R, Pearson, J D, Brandt, L J, Morell, C H y Schneider, E L (1991) Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age *Mut.Res.* **256**: 1-6.
- Skipper, H T y Schabel, F M Jr (1982) Quantitative and cytokinetic studies in experimental tumor models en *Cancer Medicine*, 2nd ed (Holland, J.F. y Frei E., eds ) Lea & Febiger. Philadelphia USA pp. 663
- Smith, P J y Sykes, H R (1992). Simultaneous measurement of cell cycle phase position and ionizing radiation-induced DNA strand brakage in single human tumor cells using laser scanning confocal imaging. *Int J Radiat.Biol.* **61**: 553-560



- Stark, G.R. y Wahl, G.M. (1984). Gene amplification *Annu Rev.Biochem.* **53**: 447-491.
  - Tamayo, G.F. (1997). Fundamentos de Inmunobiología Dirección General de Publicaciones UNAM, México. pp. 544
  - Thillet, J., Absil, J., Stone, S.R. y Pictet, R. (1988). Site-directed mutagenesis of mouse dihydrofolate reductase: mutants with increased resistance to methotrexate and trimethoprim *J.Biol.Chem.* **263**: 12500-12508
  - Vogelstein, B., Pardoll, D.M. y Coffey, D.S. (1980). Supercoil loops and eukariotic DNA replication *Cell* **22** 79-85.
  - Wachsmann, T.J. (1997) DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes relation to carcinogenesis *Mut.Res.* **375**: 1-8.
  - Wassom, J.S. (1980) Mutagenicity research in the United States *Mutagens Toxicol.* **9** 4-15.
  - Wassom, J.S. (1989). Origins of genetic toxicology and the environmental mutagen society *Environ Molec Mutagen.* **14**: 1-6.
  - Weinstein, G.D. (1977) Methotrexate *Ann Intern.Med.* **86**: 199-204.
  - Wickmann, M.C. y Calabresi, P. (1985). Pharmacology of Antineoplastic Agents. Medical Oncology Calabresi, P., Schein, P.S. y Rosenberg, S.A. (eds) McMillan Publishing Co. New York, USA pp 292-362.
  - Williams, J., Beutler, E., Erslev, J. y Wayne, R. (1984) Hematology. 2ª ed McGraw-Hill N York USA pp 546
  - Whitaker, S.J., Powell, S.N. y McMillan, T.J. (1991) Molecular assays of radiation- induced DNA damage *Env J Cancer* **27**. 922-928
  - Yoshitaka, A., Tanaka, O., Hiraoka, Y., Koyama, Y., Hirota, D., Ayusawa, T., Seno, C. y Watawa, Y. (1987) Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance 5-fluorodeoxyuridine- induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanisms of cell death *J Biol.Chem.* **262**. 8235-8241.
- <http://www.lim.ez/paz/text/karyo/details.html>
- INSTAT-TM Graphpad software. Versión 2.03 Jorge Aceves No. serie 931613 Copyright 1990-1993