

00377
27



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS DE LA S-ADENOSIL-L-METIONINA
SOBRE LA GENOTOXICIDAD IN VITRO INDUCIDA
POR DIVERSOS XENOBIÓTICOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

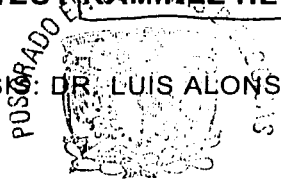
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

TZUTZUY RAMÍREZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO



MÉXICO, D.F.

COORDINACIÓN

MAYO, 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**OFICIO FCIE/DEP/0279/2003
ASUNTO:** Asignación de Jurado

**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**
Presente.

Comunico a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas ha asignado al(a) BIÓL. TZUTZUY RAMÍREZ HERNÁNDEZ, el jurado para presentar Examen de Grado de Maestro(a) en Ciencias Biológicas (Biología Experimental):

CARGO	GRADO,	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	: DR.	LUIS BENITEZ BRIBIESCA
VOCAL	: DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
SECRETARIO	: DR.	LUIS ALFONSO HERRERA MONTALVO
SUPLENTE	: DRA.	PATRICIA OSTROSKY SHEJET
SUPLENTE	: DRA.	MA. EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

El título de la tesis es:

EFFECTOS DE LA S-ADENOSIL-L-METIONINA SOBRE LA GENOTOXICIDAD IN VITRO INDUCIDA POR DIVERSOS XENOBIÓTICOS.

Bajo la dirección del(a): DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 23 de abril de 2003
COORDINADORA

Tila Maria Perez Ortiz
DRA. TILA MARIA PEREZ ORTIZ



TMPO/ASR/ippz

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Reconocimiento a los apoyos recibidos

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, así como a la **Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEPI)** el haberme otorgado las becas para realizar mis estudios de Maestría en la Facultad de Ciencias, UNAM.

También agradezco de manera muy especial a los **Miembros de mi comité Tutorial**; Dr. Luis A. Herrera Montalvo, Dra. Patricia Ostrosky y Dr. Luis Benitez, por haber dirigido mi proyecto de investigación, dándome siempre aportaciones invaluable en mi formación académica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos Especiales

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Muchas gracias por ser uno de los mejores maestros que he tenido y tratar de desenmarañar las esporádicas ideas brillantes de mi cerebro.

Dra. Patricia Ostrosky-Wegman

Por ser un gran apoyo, no sólo académico, sino también personal.

Dr. Luis Benitez Bribiesca

Por contribuir de manera substancial en la elaboración de esta tesis.

Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt

Por la revisión y aportaciones a esta tesis.

Dr. Luis Felipe Jimenez García

Por escucharme y siempre darme un poco de su tiempo para tratar de aterrizar ideas que quizá en el futuro puedan convertirse en proyectos, así como por revisar con gran premura la presente tesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta tesis está dedicada a:

Mis padres y hermanos
Gracias por apoyarme en todas mis locuras,
pero recuerden que esto es apenas el principio ☺

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos

Gracias a:

Mis Pas: Antonio Ramírez Medina y María de la Paz Hernández Sánchez.

Mis hermanitos: Halita y Ram

Los que siempre están y luego les va como en feria ☺: Tía Lila, mis tíos Luis, Jesús y José, a mi pequeño Baby Bernes y a Eviux.

Los que veo poco, pero que siempre los llevo en mi sangre y mi corazón: MamaBey, Tíos Herminio, Justa y Daniel, Elfego, Jaciel, Bertha, Nacho, Gwen, Hope, Romel, Ninfa, Ochi, Iran.

Todos mis amigos del lab y los del no lab.

Dr. Raymundo Cea y la Dra. Veronica Montalvo por hacer posible la realización de los ensayos de resonancia magnética nuclear.

La QFB Monserrat Sordo y la Biól. Ma. Carmen López por el apoyo técnico que me brindaron.

ÍNDICE

1. Resumen	5
2. Introducción	
Los xenobióticos y el daño al DNA.....	7
¿Qué es la S-adenosil-L-metionina?.....	7
El descubrimiento de SAM, un poco de historia.....	8
La estructura química de SAM.....	10
Síntesis y degradación.....	11
MAT y la síntesis de SAM.....	15
Inhibidores de SAM.....	16
Funciones biológicas:	
- Aminopropilación.....	18
- SAM en la generación de glutatión.....	19
- Transmetilación:	
a) Metilación de fosfolípidos.....	20
b) Metilación de proteínas.....	22
c) Metilación del DNA.....	24
Niveles intracelulares de SAM y su asociación con diversas patologías	27
Usos clínicos de SAM.....	29
SAM y cáncer.....	31
Farmacocinética.....	33
Interacción con otros medicamentos.....	35

Dosis.....	35
SAM como posible blanco para la acción de xenobióticos.....	36
3. Planteamiento del problema.....	39
4. Hipótesis.....	39
5. Objetivos general y particulares.....	40
6. Material y métodos	
Donadores.....	41
Evaluación de la cinética de proliferación y la frecuencia de micronúcleos en sangre entera.....	41
Frecuencia de MN en linfocitos aislados.....	42
Evaluación de las concentraciones intracelulares de SAM	43
Análisis por HPLC de 5-metilcitosinas (5-MDCs) en DNA de linfocitos aislados	44
Integridad de los microtúbulos.....	45
Resonancia Nuclear Magnética.....	46
Estadística.....	46
7. Resultados	47
8. Discusión.....	61
9. Conclusiones	73
10. Apéndices	
Apéndice 1.- Evaluación de MN in vitro.....	75
Apéndice 2.- Métodos para evaluar la metilación del DNA.....	78
Apéndice 3.- Resonancia Nuclear Magnética.....	81
Apéndice 4.- Proliferación celular.....	85
Apéndice 5.- Mecanismo de acción de agentes desmetilantes.....	89

11.Referencias.....91

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1- Estructura química de SAM11

Fig 2.- Biosíntesis de poliaminas.....13

Fig3.-Biosíntesis del glutatión.....14

Fig 4.- Efecto de SAM sobre la frecuencia de MN inducida por arsenito de sodio.....53

Fig. 5.- Efecto de SAM sobre la frecuencia de MN inducida por MMC, CIS y SOABZ....54

Fig. 6.- Efecto de SAM sobre la frecuencia de MN en linfocitos aislados inducida por arsenito de sodio y SOABZ.....55

Fig. 7.- Efecto de SAM sobre la frecuencia de MN en linfocitos aislados inducida por MMC y CIS.....56

Fig. 8.- Efecto de SAM sobre la frecuencia de MN inducida por Colcemid.....57

Fig. 9.- Efecto de agentes desmetilantes sobre la frecuencia de MN.....58

Fig. 10.- Efecto de SAM sobre la frecuencia de MN inducida por 5-azacitidina.....59

Fig. 11.- Efecto de SAM sobre la alteraciones en el citosqueleto inducidas por arsenito de sodio60

Fig. 12.- Espectro de RNM¹H de SAM.....83

Fig. 13. Espectro de RNM¹H de SAM+arsenito de sodio.....84

1. Resumen

Las deficiencias en ácido fólico y metionina, dos componentes fundamentales en el metabolismo de los grupos metilo, correlacionan con un incremento en los rompimientos cromosómicos y micronúcleos. Se ha propuesto que estos efectos se deben a la reducción de la S-adenosil-L-metionina (SAM), el donador universal de grupos metilo. Algunos xenobióticos, como el arsénico, reducen los niveles celulares de SAM, lo cual puede alterar algunos procesos de metilación (e.g. metilación del DNA). El objetivo del presente trabajo fue analizar los efectos de la administración de SAM sobre la frecuencia de micronúcleos (MN) inducida por el arsenito de sodio en linfocitos humanos tratados *in vitro* e investigar si estos efectos estaban relacionados con la metilación del DNA. Los resultados mostraron una reducción en la frecuencia de MN en los cultivos tratados con arsenito de sodio y SAM, comparado con la mostrada por aquellas células tratadas únicamente con arsenito de sodio. Para entender el mecanismo por el cual SAM redujo el número de células micronucleadas, se analizó su efecto sobre la frecuencia inducida por otros xenobióticos. Los resultados mostraron que SAM no alteró la frecuencia de MN causada por agentes alquilantes (mitomicina C o cisplatino) ni por compuestos desmetilantes (5-azacitidina, hidralacina, ctionina y procainamida). Sin embargo, SAM disminuyó el número de células micronucleadas en aquellos cultivos tratados con agentes que inhiben la polimerización de los microtúbulos (sulfóxido de albendazol y colcemid). Tampoco se observaron cambios significativos en el estado global de metilación del DNA. Considerando el hecho de que tanto el sulfóxido de albendazol como el colcemid inhiben la polimerización de los microtúbulos, se decidió evaluar el efecto de SAM en la integridad de los microtúbulos. Los resultados obtenidos sugieren que los efectos positivos de SAM pueden ser debidos a su capacidad de proteger los microtúbulos por un mecanismo aún poco conocido.

2. Introducción

Los xenobióticos y el daño al DNA

Los seres humanos estamos expuestos a diversos tipos de agentes que normalmente no se encuentran en nuestro cuerpo a los que se conoce como xenobióticos. La naturaleza de estos agentes puede ser química, física o biológica, y sus efectos en el organismo dependen del tipo de interacción que establezcan con las diferentes moléculas que componen al cuerpo humano. Existen algunos agentes xenobióticos que son capaces de inducir daño al DNA directa o indirectamente. Aquellos que interactúan directamente con el DNA, también llamados genotóxicos, establecen uniones covalentes con esta macromolécula provocando alteraciones estructurales en la doble hélice que pueden originar rompimientos o mutaciones (Gebhart y Arutyunyan, 1991). El etil-metano-sulfonato, la mitomicina-C, el psoraleno, y el cisplatino son algunos ejemplos de agentes genotóxicos (Gebhart y Arutyunyan, 1991). Sin embargo, otros compuestos como el taxol, el nocodazol y el dietilestilbestrol, a pesar de no interactuar directamente con el DNA pueden causar daño genético y cambios en la expresión génica a través de la producción de radicales libres o de alteraciones en otras estructuras celulares como el huso mitótico, proteínas que controlan la proliferación celular y la transducción de señales (Gebhart y Arutyunyan, 1991; Trouba et al., 2000). Otro mecanismo por el cual los xenobióticos pueden modificar la expresión génica, conocido desde hace más de 50 años pero que sólo ha adquirido interés recientemente, es la inducción de cambios en los patrones de metilación de diversas moléculas (Poirier, 1994).

La metilación es un proceso durante el cual se donan grupos metilo a moléculas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Lu, 2000). Un incremento en la metilación de la

citósina en los dinucleótidos CpG, particularmente en las regiones promotoras 5' de los genes de mamíferos, generalmente se asocia con una disminución en la expresión génica (Jones y Laird, 1999). Actualmente se sabe que las alteraciones en los patrones de metilación del DNA de las células de mamíferos juegan un papel central en la expresión génica específica de tejidos, así como en procesos fisiológicos como el envejecimiento y en la carcinogénesis (Poirier, 1994). Las modificaciones post-transcripcionales en las proteínas, como la metilación, pueden alterar la orientación estérica, la carga y la hidrofobicidad de la proteína (Ghosh et al., 1990). Estudios recientes acerca de la función de la metilación de las proteínas han mostrado que este proceso contribuye a la estabilización de estas macromoléculas cuando la célula enfrenta una situación de estrés (Ladino y O'Connor, 1992; Wang et al., 1992). Por otro lado, la metilación de los fosfolípidos de las membranas celulares es una vía alterna para la formación de fosfatidilcolina a partir de fosfatidil-N-monometil-etanolamina, además de ser un evento crucial para el mantenimiento de la fluidez de la membrana, y por lo tanto para la regulación de la traducción de señales, el transporte de calcio y la activación de otras moléculas (Turchetti et al., 2000). Las reacciones de metilación son catalizadas por enzimas transmetilasas específicas para cada tipo de molécula blanco, sin embargo, hasta el momento sólo se conoce un donador de grupos metilo: la S-adenosil-L-metionina (SAM).

¿Qué es la S-adenosil-L-metionina?

La S-adenosil-L-metionina es la molécula donadora de grupos metilo, descrita por primera vez en 1953 (Cantoni, 1953). Se le considera como el segundo cofactor más importante después del ATP, ya que participa en diversos procesos bioquímicos, como la transmetilación, la transulfuración y la aminopropilación. En mamíferos es producida en el

citoplasma de todas las células, pero son los hepatocitos los que generan más del 70 % del SAM en el organismo (Lu, 2000). La biosíntesis de SAM requiere del grupo adenosilo del ATP y de la metionina como molécula aceptora. Si bien SAM se utiliza en diversos procesos bioquímicos, son los de transmetilación en los que se consume la mayor proporción de esta molécula, por lo que se considera que SAM es de gran importancia en la regulación de la expresión génica, la estabilización de proteínas y la comunicación celular al donar su grupo metilo ya sea al DNA, proteínas histonas y no histonas y a ciertos fosfolípidos de membrana (Chiang et al, 1996; Lu, 2000). Dada la importancia de SAM en diversos procesos celulares, las deficiencias en esta molécula se han asociado al desarrollo de enfermedades neurológicas, hepáticas y cáncer, es por eso que se ha utilizado en el tratamiento de algunos de estos males. Al SAM se le han adjudicado propiedades como antidepressivo, anti-artrítico, además de ser utilizado como medicamento contra la colestasis, cirrosis hepática, migraña y fibromialgia (Chiang et al, 1996; Fetrow y Avila, 2001). En Europa se ha utilizado desde los años 60's para el tratamiento de la depresión. Además se le ha considerado como uno de los 25 suplementos alimenticios más importantes (Fetrow y Avila, 2001).

El descubrimiento de SAM, un poco de historia.

La S-adenosil-L-metionina fue descubierta hace 50 años (Cantoni, 1953). La historia comenzó en 1942 cuando se demostró que *in vivo* la nicotinamida era metilada y excretada como N'-metilnicotinamida (Handler y Dann, 1942) y años más tarde cuando se reportó que la síntesis de creatinina en homogenizados de hígado requería de ácido adinílico, oxígeno y de un sustrato oxidable (Borsook y Dubnoff, 1947). Sin embargo, no fue sino hasta 1949 cuando Guilio Cantoni, quien se encontraba realizando su estancia posdoctoral

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en Chicago, decidió demostrar que estos dos eventos, que hasta el momento parecían aislados, estaban en realidad relacionados, por lo que diseñó un experimento que demostró que el homogenizado de hígado suplementado con ATP y metionina era capaz de convertir a la nicotinamida en N'-metilnicotinamida. Pero sus experimentos no sólo demostraron este hecho, sino que además fueron decisivos para que poco tiempo después descubriera al donador universal de los grupos metilo, SAM. Como él mismo cita en la sexta reunión sobre S-adenosil-L-metionina: "... Afortunadamente, establecí en un muy corto tiempo que la metionina y el ATP reaccionaban para formar un compuesto al que le llamé metionina activa (active methionine, AMe), la cual era capaz de transferir su grupo metilo a la nicotinamida o al ácido guanidoacético y formar N'-metilnicotinamida o creatinina, en ausencia de ATP" (Cantoni, 1977).

Los primeros diez años (1951-1961) del estudio de AMe, más tarde conocido como SAM, se dedicaron básicamente al entendimiento de la bioquímica de su síntesis (Cantoni, 1956) y a los mecanismos y cinética enzimática de las reacciones de transmetilación en moléculas pequeñas (Cantoni, 1960). Además fue también durante este período cuando se descubrió la descarboxilación enzimática de SAM y su papel en la formación de poliaminas (Tabor et al., 1961). En los años 60's se abrió la posibilidad de que SAM se utilizara en una amplia gama de funciones celulares cuando se demostró que el grupo metilo de SAM también podía ser transferido al ácido graso ciclopropano, lo cual permitía pensar en la metilación de fosfolípidos, hecho que se corroboró con los experimentos de Bremner y Greenberg (1961), además se descubrió el papel fundamental de la metilación en las modificaciones post-transcripcionales del RNA y otros polinucleótidos (Borek y Srinivasa, 1965). También, durante este periodo se descubrió la metilación de proteínas (Paik et al, 1975) y

se concibió como una visión integral que el proceso de transulfuración va de la mano con el proceso de transmetilación, ya que la generación de glutatión a partir de la homocisteína (HC) necesita que SAM haya donado su grupo metilo durante la transmetilación, y así generar S-adenosil-homocisteína (SAH), para posteriormente convertirse en HC y finalmente esta en cisteína, uno de los tres aminoácidos que conforman la molécula de glutatión (Laster et al., 1964).

A lo largo de estos 10-15 años la mayoría de las investigaciones se ocupaban del descubrimiento de la gran variedad de reacciones de transmetilación en las cuales SAM estaba involucrada, dejando de lado la importancia biológica de estos eventos. Fue hasta 1971, que el trabajo de Axelrod abrió el camino para otras investigaciones en la correlación de los procesos biológicos, ya que demostró que ciertas catecolaminas requieren de la metilación para tener función biológica diferencial, como lo que sucede con la norepinefrina, la cual requiere de la metilación para poder convertirse en epinefrina (Axelrod, 1971; Hirata y Axelrod, 1980). Actualmente se ha elucidado la importancia biológica de varios procesos de metilación, siendo uno de los más relevantes la metilación del DNA, un mecanismo de control de la expresión génica como se verá más adelante. Además se ha observado que debido a la multiplicidad de eventos en los cuales SAM puede participar, las deficiencias o alteraciones en su metabolismo pueden asociarse al desarrollo de distintas enfermedades (Lu, 2000).

La estructura química de SAM

La participación de SAM, uno de los compuestos sulfonados naturales de los mamíferos, en los procesos de transmetilación, transulfuración y aminopropilación depende de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presencia del átomo de azufre de alta energía, el cual activa a cada uno de los átomos de carbono que lo circundan (Morana et al., 2000). La estructura química de SAM consiste básicamente de la metionina unida al adenosilo del ATP (Figura 1), reacción que se lleva a cabo por la metionina adenosil transferasa (MAT). El principal problema de esta molécula es su alta inestabilidad a temperatura ambiente o por arriba de esta, a pH neutro o alcalino, por lo cual se han creado las sales sulfatadas y cloradas, que son muy estables en estas condiciones, siendo la sal sulfatada la más estable y la que se utiliza en la clínica (Fiechi, 1976).

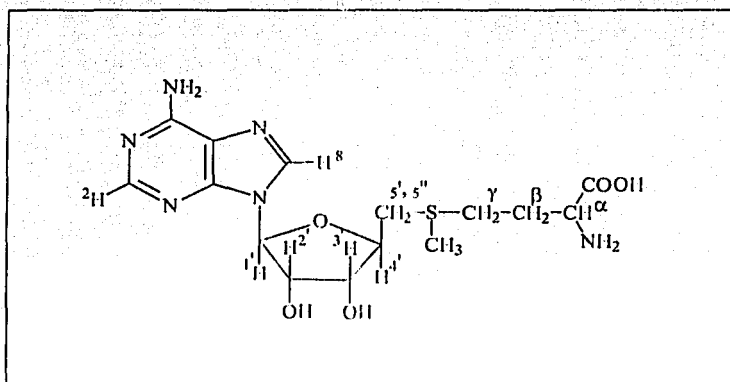


Figura 1- Estructura química de la S-adenosil-L-metionina.

Síntesis y degradación

SAM se sintetiza en el citoplasma de todas las células. En los mamíferos son los hepatocitos los que juegan el papel central en el mantenimiento de los niveles de SAM, siendo el hígado el órgano de mayor síntesis y degradación de esta molécula (Lu, 2000). En él, la síntesis de SAM representa la ruta metabólica preferencial de la metionina ya que más de la mitad de la metionina producida por el organismo es convertida en SAM. La enzima responsable de la formación de SAM es la MAT, la cual utiliza al ATP como donador y a la

metionina como sustrato. En esta reacción, el adenosilo del ATP es transferido a la metionina, formando un ión sulfonio de alta energía que fácilmente puede transferir el grupo metilo que posee. Esta reacción es poco común en el sentido de que el átomo de azufre nucleofílico de la metionina ataca el carbono 5' de la porción de la ribosa del ATP, liberando trifosfato, en lugar de atacar a uno de los átomos de fósforo, al tiempo que se forma SAM, el trifosfato se corta en Pi y PPI y posteriormente el PPI es escindido por la pirofosfato inorgánico hidrolasa. Una vez que se ha formado SAM, este puede participar en dos rutas metabólicas, la de descarboxilación o la de transmetilación que conlleva a la de transulfuración y a la regeneración de la metionina al entrar al ciclo de los grupos metilo (Lu, 2000).

En la ruta de la descarboxilación, SAM es una molécula esencial para la formación de las poliaminas, espermina y espermidina ya que es el único donador de grupos aminopropilo, los cuales son añadidos secuencialmente a la putresina, proceso que se lleva a cabo por la descarboxilación de SAM. En este tipo de reacciones, SAM es convertido a SAM descarboxilado que da lugar a la metiltionadenosina (Figura 2). Bajo condiciones normales, esta ruta metabólica gasta no más de 5% del SAM producido al día. Sin embargo, esta puede inducirse bajo condiciones en las cuales se incrementen los requerimientos en las poliaminas, como en la regeneración hepática y en los procesos de hepatocarcinogénesis temprana (Chiang et al, 1996; Lu, 2000).

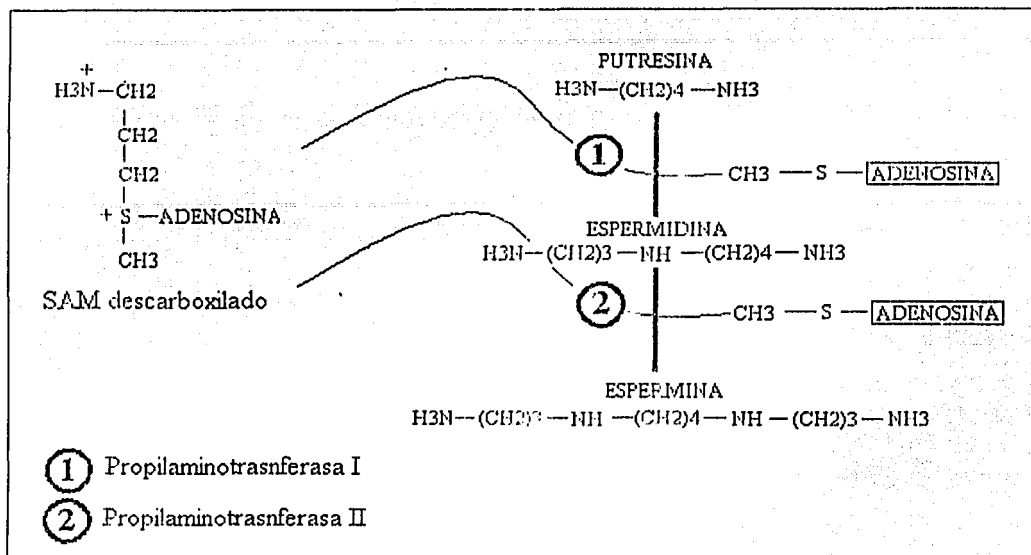


Figura 2- Formación de poliaminas a partir de SAM descarboxilado.

Por otra parte, SAM es utilizado casi en un 85% en los procesos de transmetilación (Finkelstein y Martín, 2000 y Mudd y Poole, 1975). En estas reacciones, SAM dona su grupo metilo a una gran variedad de aceptores, una vez que ha donado su grupo metilo, se forma SAH, la cual posteriormente es hidrolizada en HC y esta a su vez puede seguir dos rutas de degradación, una de ellas es la formación de cistatión y posteriormente de glutatión y así involucrar a SAM en los procesos de transulfuración. La otra ruta consiste en la regeneración de metionina y reiniciar el ciclo de los grupos metilo (Figura 3). Cuando las concentraciones de SAM son elevadas, la HC se utiliza en la vía de transulfuración. Por el contrario, cuando se tienen niveles bajos de metionina y por tanto concentraciones bajas de SAM, la HC en vez de seguir la ruta a la formación de cisteína, es dirigida al ciclo de metilación para regenerar la metionina por la acción de la metionina-sintetasa, siendo la

vitamina B₁₂ un cofactor de la reacción y el metiltetrahidrofolato (MTHF), la molécula donadora del grupo metilo (Boulander-Gouaille, 1999).

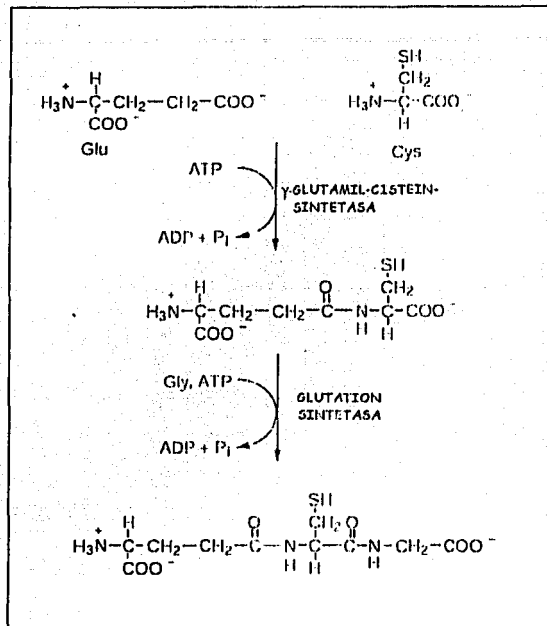


Figura 3- Formación de glutatión.

La conversión de HC en metionina puede estar bloqueada en algunas enfermedades raras, como defectos genéticos en metionina sintetasa (MS) y MTHF reductasa. Tales pacientes tienen niveles elevados de HC, niveles bajos en metionina, síntomas neurológicos y retraso mental, así como enfermedades cardiovasculares. Además de mostrar desmielinización de los nervios y reducción de los niveles de SAM en líquido cefalorraquídeo. Otra consecuencia de este bloqueo es la reducción del reciclado de MTHF dentro de la reserva de folatos activos, disminuyéndose así la formación de tetrahidrofolato, esencial para la

síntesis de purinas. Aunque el tetrahidrofolato puede transportar un grupo metilo en N⁵, el potencial de transferencia de su grupo metilo es insuficiente para la mayor parte de reacciones biosintéticas, además de que este grupo metilo es unas 1,000 veces menos reactivo que el grupo metilo de SAM, es por eso que SAM es utilizado con mayor frecuencia para la transferencia de los grupos metilo (Lu, 2000).

MAT y la síntesis de SAM

La enzima MAT cataliza la síntesis de SAM a partir de L-metionina y el ATP (Cantoni, 1977; Mudd, 1973), y se encuentra en todos los organismos vivos, incluyendo las arqueobacterias termófilas, plantas, levaduras y mamíferos (Tabor y Tabor, 1984; Kotb y Geller, 1993). En mamíferos hay dos genes homólogos que codifican para las distintas MATs del organismo. El gen MAT1A codifica para la subunidad α_1 que puede formar dos isoformas que se encuentran presentes únicamente en el hígado, una es un tetrámero (MAT I) y la otra un dímero (MAT III). El segundo gen, MAT2A, se expresa en la mayoría de los órganos, como cerebro, riñón, testículos, sangre (linfocitos), hígado fetal y en baja proporción en el hígado maduro, y codifica para la subunidad catalítica α_2 de la MAT II, ya que la subunidad reguladora β está codificada por un tercer gen. Esta es la MAT que ha sido estudiada en eritrocitos, linfocitos de humano, así como en cerebro de bovino. La nomenclatura para designarlas se basó en la hidrofobicidad creciente de las enzimas al ser eluidas en columnas de fenil-sefaroza. MAT I, II y III poseen distintas propiedades cinéticas para la metionina y el ATP y están reguladas diferencialmente por SAM. MAT III, que es la isoforma más abundante en el hígado, es activada por SAM. Tanto la actividad de MAT I y III están marcadamente reducidas por agentes sulfidrilos. La actividad de

MAT II no es inhibida por agentes sulfúridos. Los dos genes de la MAT humana (hMAT), hMAT1A y hMAT2A, y sus correspondientes cDNAs han sido aislados y caracterizados (Horikawa y Tsukada, 1991, 1992; Álvarez et al., 1993; Ubagai et al., 1995; Mato et al., 2002). El gen hMAT1A se expresa principalmente en el hígado, contiene 9 exones y se localiza en la región q22 del cromosoma 10. El gen de la hMAT2A que codifica la subunidad catalítica α_2 se localiza en la región p11.2 del cromosoma 2 (De la Rosa et al., 1995). Se ha predicho que las subunidades α_1 y α_2 de las hMAT1A y hMAT2A son polipéptidos de 395 aminoácidos (Horikawa y Tsudaka, 1991, 1992; Alvarez et al., 1993; Ubagai et al., 1995), con una identidad del 84%. Además de la expresión diferencial de ambas proteínas en los tejidos normales, esta se encuentra alterada en los tumores hepáticos, siendo α_1 marcadamente menos expresada (Abe y Tsukada, 1981; Cai et al., 1998). De la misma manera, la estimulación de linfocitos T induce la baja regulación de las subunidades α_2/α_2 y al mismo tiempo la represión de la subunidad β . Las variaciones en la expresión de MAT II afecta los niveles intracelulares de SAM (De la Rosa et al., 1992; German et al., 1983; Mato et al., 1994; Cai et al., 1996; Torres et al., 2000) y esto probablemente tiene un efecto en el número de reacciones biológicas que involucran a SAM (Hershfield y Kedrich, 1980).

Inhibidores de SAM

Existen inhibidores naturales y sintéticos de SAM, entre los cuales SAH es uno de los más potentes compitiendo con SAM por las reacciones de transmetilación. Tanto un incremento en los niveles de SAH como un decremento en los niveles de SAM o en la proporción SAM/SAH inhiben los procesos de transmetilación. Por esta razón, la biotransformación

rápida de SAH en el organismo es un paso determinante, no solo para los procesos de transmetilación, sino para la restauración del ciclo de los grupos metilo. La reacción que convierte el SAH a HC y adenosina es reversible y es catalizada por la SAH hidrolasa. *In vivo*, la reacción procede en la dirección de hidrólisis sólo si el producto, la adenosina y la HC son biotransformados rápidamente (Boulander-Gouaille, 1999; Finkelstein y Martín, 2000).

Otro de los inhibidores más importantes de SAM es el compuesto sintético, etionina. La etionina es un antimetabolito hepatocarcinogénico de la metionina (Hoover et al., 1986). Se ha reportado que produce hipometilación del DNA hepático en ratas alimentadas con dosis elevadas de este compuesto (Cox e Irving, 1977). La hipometilación al parecer resulta de la acumulación de s-adenosil-L-etionina (SAE) en el hígado, el producto de la etionina con el azufre activo, el cual es un inhibidor competitivo de la metilasa de DNA (Cox e Irving, 1977 y Brada et al., 1976). Sin embargo, al ser el antimetabolito de la metionina, se dice que es un potente inhibidor de todas las reacciones en las que participa SAM (Poirier et al., 2003).

Funciones biológicas

Las principales funciones biológicas de SAM están relacionadas con las tres rutas descritas anteriormente. La síntesis de poliaminas, la formación de glutatión y la generación de compuestos metilados. Aunque la reducción de SAM puede teóricamente afectar la síntesis de poliaminas, este no parece ser el caso desde que se inducen enzimas esenciales para la síntesis de poliaminas cuando los niveles de SAM son bajas, siendo este un mecanismo compensatorio para mantener la síntesis de poliaminas (Thomas y Thomas, 2001). En el caso de los procesos de transulfuración, la importancia de SAM es la de ser el precursor de

glutación, el principal antioxidante celular (Lu, 1999). Los procesos de transmetilación son los más importantes desde el punto de vista de gasto de SAM y de la gran variedad de sustratos aceptores, SAM está involucrado en un amplio espectro de procesos celulares, desde la destoxicación de metales, la fluidez de membrana hasta la regulación de la expresión génica (Bottiglieri, 2002).

Aminopropilación

S-adenosil-L-metionina es importante en la formación de poliaminas, proceso que se da mediante la descarboxilación de la molécula y la unión de ésta a una poliamina sustrato, en primer lugar se une a la putresina, para generar espermina, y de manera seriada de otra molécula de SAM se obtiene otro grupo aminopropilo para añadirlo a la espermina y generar la espermidina (Lu, 2000, Bottiglieri, 2002). Las poliaminas son cationes alifáticos con funciones múltiples esenciales para la vida ya que son moduladores del crecimiento celular tanto de células normales como de células cancerosas. Los mecanismos moleculares por los cuales las poliaminas participan en el control de la proliferación celular aún no han sido conocidos del todo (Thomas y Thomas, 2001). Sin embargo, se piensa que la unión directa de las poliaminas al DNA y su capacidad de modular las interacciones DNA-proteína, parecen ser eventos determinantes de este control. Actualmente se ha demostrado que las poliaminas tienen efectos bipolares sobre el control de la proliferación celular, ya que por un lado son facilitadores de la proliferación y por otro también son capaces de inducir apoptosis. Las bases de estos efectos tan diversos aún son desconocidas. Se piensa que la muerte celular debe estar mediada en parte por la producción de peróxido de hidrógeno durante el catabolismo de las poliaminas. Además, la capacidad de las poliaminas de alterar las interacciones DNA- proteína, proteína-proteína debe modificar las

funciones celulares, cuando de manera anormal se acumulan niveles altos debido al catabolismo de las poliaminas. Diversos estudios han sugerido que la biosíntesis de poliaminas puede ser un blanco molecular para la intervención terapéutica en varios tipos de cáncer (Thomas y Thomas, 2001).

SAM en la generación de glutatión.

La participación de SAM en el proceso de transulfuración va de la mano de los procesos de donación de grupos metilo, ya que es SAH, el producto de la transmetilación, quién va a funcionar como precursor de la HC y finalmente del glutatión durante la transulfuración (Lu, 1999). Siendo la HC la pieza clave o el vínculo de estos dos procesos, ya que a partir de ella se pueden seguir dos rutas, la formación de metionina o la generación de cistatión. Se ha visto que alrededor del 53% de la HC producida en los hepatocitos se convierte en cistatión y el resto en metionina, porcentaje que decrece a un 20% cuando el contenido de grupos metilo en la dieta es pobre (Mato et al., 2002). La SAH generada después del proceso de transmetilación es hidrolizada para formar HIC y adenosina a través de una reacción reversible catalizada por la SAH hidrolasa. La HC se condensa con la serina para formar cistatión en una reacción catalizada por la cistatión β -sintetasa, la cual requiere de vitamina B₆ como cofactor. Posteriormente esta molécula es escindida por la γ -cistationasa, liberando cisteína, que es la molécula precursora de taurina y de glutatión. En una reacción en la cual el grupo α -amino de la cisteína ataca al intermediario acilo formado por el glutamato y el ATP y lo transforma en otro acil-fosfato activo para poder reaccionar con la glicina y finalmente tener el glutatión (Boulanger-Gouaille, 1999).

En enfermedades hepáticas crónicas, en donde se pierde la regulación de la producción de SAM, se observa una caída de los niveles de glutatión. El glutatión es un péptido intracelular con funciones múltiples desde ser la defensa antioxidante hasta estar involucrado en la modulación de la proliferación celular. Dentro de sus funciones más importantes esta la de ser un destoxicador, mantener el grupo tiol de las proteínas, ser atrapador de radicales libres, ser el reservorio de las cisteínas, y modulador de procesos críticos como la síntesis del DNA (Lu, 1999).

Transmetilación

Se conoce como transmetilación al paso del grupo metilo de SAM a una gran variedad de moléculas aceptoras, esto se da mediante el ataque nucleofílico de las metiltransferasas sobre el átomo de azufre de SAM. De las primeras moléculas en las que se descubrió este proceso, están las catecolaminas, algunas de las cuales requieren de la metilación para poder realizar su función. A continuación, se describen algunos de los eventos de transmetilación que han sido estudiados con mayor énfasis:

a) Metilación de fosfolípidos

La conversión de fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina fue reportada por primera vez en microsomas de hígado de rata, por Bremer y Greenberg (1960). La reacción requiere tres metilaciones sucesivas, las cuales se llevan a cabo por la fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa, en sus dos isoformas (PEMT1 y PEMT2) y la fosfatidil-N-monoetil-etanolamin-metiltransferasa. La primera enzima utiliza fosfatidiletanolamina como substrato, requiere de Mg^{2+} , tiene gran afinidad por el grupo metilo de SAM, y se encuentra en el citoplasma, la segunda enzima metila la fosfatidil-N-monometil-etanolamina a

fosfatidilcolina, tiene una afinidad baja por SAM y se localiza en la cara externa de la membrana celular. El arreglo asimétrico de las dos enzimas permite la translocación de la molécula de fosfatidilcolina al exterior de la membrana (Hirata y Axelrod, 1980). Por un tiempo, la metilación de los fosfolípidos generó gran excitación entre los científicos, particularmente aquellos interesados en la activación de la adenilato ciclasa, la traducción de señales, el transporte de calcio y algunos otros procesos relacionados con las membranas biológicas (Walkey et al., 1998). Sin embargo, fue hasta años posteriores que se empezó a entender la función de la metilación de los fosfolípidos, primero se vio que el hígado era el órgano que metilaba en mayor proporción sus fosfolípidos, pero que no los usaba para la síntesis de fosfatidilcolina como se había pensado, además de que otros tipos celulares también presentaban metilación de los fosfolípidos (Vance y De Kruijff, 1980). Diversas investigaciones mostraron que la metilación era importante para todo tipo de transmisión de señales biológicas, cuando los neurotransmisores de catecolaminas, las inmunoglobulinas o los péptidos de quimiotaxis, estimulan a las metiltransferasas de la membrana y reducen la viscosidad de esta, lo cual está acoplado al influjo de Ca^{2+} y la liberación de ácido araquidónico, lisofosfatidilcolina y prostaglandinas. Estos cambios bioquímicos fuertemente asociados facilitan la transmisión de muchas señales a través de la membrana, lo que resulta en la generación de adenosina 3'-5' monofosfato en muchos tipos celulares, la liberación de histamina en basófilos, la mitogénesis en los linfocitos y la quimiotaxis en los neutrófilos (Hirata y Axelrod, 1980). Además, se sabe que la metilación de los fosfolípidos al generar fosfatidilcolina es una ruta alterna para la síntesis de colina. Recientemente, este hecho se ha reforzado al demostrarse que durante la lactancia o el embarazo, la hembra sufre un estrés de colina, el cual es seguido por un aumento repentino de esta molécula, acompañado de una reducción en los niveles de fosfatidilcolina, lo que indica que bajo condiciones en

las que el suministro de colina es insuficiente, la fosfatidil colina mantiene los niveles de colina, lo que implicaría una ventaja evolutiva de sobrevivencia tanto de la madre como del producto cuando las condiciones son adversas (Walkey et al., 1998).

b) Metilación de proteínas

La metilación del extremo amino o carboxilo de la proteína puede conducir la orientación estérica, la carga, hidrofobicidad y provocar un efecto global no sólo en la conformación proteica, sino también en su funcionalidad, es decir, esta modificación post-transcripcional sirve para modular la función de las proteínas, sin alterar su estructura primaria (Stallcup, 2001). La reacción de metilación de aminoácidos más estudiada es la N-metilación de los residuos de arginina, lisina e histidina y la O-metilación de los residuos glutamato e isoaspartato, la COOH- y S- metilación de la cisteína y metionina. Sin embargo, de todas estas reacciones, la más estudiada es la N-metilación de arginina, la cual ocurre en distintas proteínas, muchas de las cuales son de tipo estructural, como las proteínas básicas de la mielina, la nucleolina, fibrilarina, histonas, entre otras, aunque también ocurre en otro tipo de proteínas, como las de choque térmico (Kim et al., 1998). Esta reacción de metilación se lleva a cabo por la metilasa I, la cual metila el nitrógeno guanidino del residuo de arginina, la reacción genera tres derivados metilados; N^G-monometilarginina, N^G, N^G-dimetilarginina y la N^G-N^G-dimetilarginina con la subsiguiente liberación de SAH (Kim et al., 1998).

Existen diversos ejemplos de la importancia biológica de la metilación de proteínas, por mencionar algunas: las proteínas de choque térmico al encontrarse en un ambiente de estrés celular que propicia la desestabilización de las proteínas, ellas se encuentran metiladas, por otro lado, la metilación reversible de ciertas proteínas de membrana puede estar

involucrada en la traducción de señales, como Ras y proteínas relacionadas a las G. La metilación de proteínas también correlaciona con el crecimiento y la diferenciación, en *Escherichia coli*, la metilación del factor de elongación Tu correlaciona con la fase de crecimiento de la bacteria (Kim et al., 1998).

Por otra parte, la metilación de las histonas, que se conoce desde 1967 (Paik y Kim, 1967), es importante para mantener el alto grado de organización de la cromatina (Sewalt et al., 2002). Recientemente se ha identificado un nuevo gen en seres humanos, con su homólogo en ratón, el cual codifica para una nueva metil-transferasa de histona, la cual metila selectivamente a la lisina 9 de la H3, generando afinidad heterocromática por las proteínas HP1, y de esta forma creando subdominios cromosómicos. Este tipo de histonas metiladas se encuentra presente en las regiones de heterocromatina, haciendo una represión génica de tipo local y también formando parte de la heterocromatina, además de ser retenidas durante la mitosis, por lo que podrían proveer un imprinting epigenético para el mantenimiento de un estado inactivo (Sewalt et al., 2002).

Otras proteínas de las cuales también se ha reportado su metilación son las del citoesqueleto (Schinstine y Iacovitti, 1997; Moephuli et al., 1997). Se ha demostrado que durante la neurulación, tanto los filamentos de actina, como los microtúbulos y los neurofilamentos se encuentran metilados. En este caso, ha sido difícil definir la función de la metilación en estas proteínas, ya que si bien se ha demostrado que la metilación de la histidina 73 de la actina y la lisina 394 de la tubulina no alteran en su totalidad su capacidad de polimerización *in vitro*, no se descarta la posibilidad de que esto sea fundamental para que

se asocien con otras proteínas e inclusive para su correcta localización y funcionalidad (Moephuli et al., 1997)

c) Metilación del DNA

La metilación del DNA genómico en la posición C⁵ de las citosinas de las islas CpG (secuencias palindrómicas ricas en citosinas-guaninas que se encuentran en las regiones promotoras de los genes), es un proceso altamente regulado que opera de manera concertada con otros mecanismos reguladores de control de la expresión génica y es la forma predominante de modificación del DNA en plantas y vertebrados (Rizwana y Hahn, 1999; Jeltsch, 2002). La evidencia sugiere que la metilación del DNA está involucrada en un gran número de procesos biológicos, como son: la regulación de la expresión génica tejido específico, la diferenciación celular, el imprinting genómico, la inactivación del cromosoma X, la regulación de la estructura de la cromatina, la duplicación del DNA, la latencia viral, la carcinogénesis y el envejecimiento. Alrededor del 3-4% de todas las citosinas en el DNA de los mamíferos están metiladas, muchas de estas citosinas se encuentran en las secuencias de dinucleótidos CpG (Riggs y Jones, 1983; Bird, 1992; Jeltsch, 2002). En el estado de preimplantación ocurre una desmetilación del DNA, lo que trae como resultado un estado de hipometilación del blastocisto, el significado biológico de este fenómeno en las etapas tempranas del desarrollo es aún desconocido, se piensa que es un mecanismo por el cual se eliminan los patrones de metilación específica de los gametos, para la generación de células pluripotenciales en el estado de blastocisto. Poco tiempo después de la implantación, se da una onda de metilación de novo, incrementando rápidamente los niveles de metilación genómica durante el desarrollo post-implantación. En tejidos extraembrionarios derivados del trofoblasto o del endodermo primitivo los

patrones de metilación permanecen bajos durante la gastrulación como si la metilación de novo no se hubiera activado en estas células. La metilación de novo en ratón también ocurre durante la diferenciación y maduración de los gametos y probablemente juega un papel crítico en el establecimiento del imprinting genómico de los gametos. El cambio del estado de metilación de genes individuales no siempre sigue la onda de desmetilación o de metilación de novo global del DNA (Paulsen y Ferguson-Smith, 2001). Por ejemplo, la metilación diferencial de las islas CpG en las regiones críticas de algunos genes improntados son capaces de escapar el proceso de desmetilación durante el desarrollo de la pre-implantación. La función de la metilación del DNA en la regulación génica ha sido documentada por numerosos estudios. Por regla general se ha concluido que ésta correlaciona inversamente a la actividad génica, por ejemplo, la hipermetilación de regiones promotoras correlaciona con una disminución en la expresión génica, como en las islas CpG de los promotores de genes en el cromosoma X inactivo los cuales están altamente metilados; por otro lado la hipometilación de las regiones promotoras coincide con una activación de los genes, como las islas CpG de los mismos genes del cromosoma X, pero ahora del que está activo (Jeltsch, 2002). Este evento también puede ilustrarse con el genoma viral, el cual al ser incorporado al DNA humano generalmente es hipermetilado suprimiéndose su transcripción. Para muchos genes tejido específicos, las regiones reguladoras de la transcripción están usualmente poco metiladas en los tejidos en los cuales los genes están expresados si se comparan con los mismos pero en tejidos en donde no se expresan. La metilación de las islas CpG juega un papel crítico en la carcinogénesis, se han reportado ampliamente las alteraciones locales en la metilación del DNA en un gran número de tumores (Johanning et al., 2002; Feinberg, 2000). Sin embargo, el vínculo causal entre la metilación del DNA y la actividad génica no ha sido completamente

establecido. En ocasiones es poco claro si la metilación del DNA es la causa o la consecuencia del silenciamiento génico y si la metilación del DNA se requiere para el mantenimiento del estado inactivado o reprimido de los genes. Es claro, que la metilación de las citosinas juegan un papel determinante en la tumorigénesis, sin embargo, no sólo por un proceso meramente epigenético, en el cual se da una desregulación de la expresión génica, sino que también pueden tener un papel importante en la mutagénesis del tumor, ya que incrementa la desaminación espontánea de la 5-metilcitosina (Jones et al., 1992; Gonzalzo y Jones, 1997) e incrementa la afinidad de moléculas reactivas a los sitios metilados CpG (Pfeifer et al., 2000).

La metilación de las citosinas en el DNA de mamíferos están predominantemente contenidos en regiones simétricas de dinucleótidos CpG, mientras que en plantas pueden estar en las regiones CpG o CpNpG, este proceso se lleva a cabo por enzimas conocidas como DNA metil-transferasas (DNMTs), las cuales transfieren el grupo metilo de SAM a la posición 5 del residuo de citosina en el DNA. Para principios de 1997, sólo se había identificado una enzima capaz de dirigir la metilación del DNA, la DNA-metiltransferasa 1 (DNMT1) (Li et al., 1992; Lei et al., 1996), pero ya para mediados de 1998 el número de DNMTs se incrementó a cuatro (DNMT2, DNMT3 α y β) (Okano et al., 1998). Sin embargo, hasta el momento se dice que DNMT1 es la enzima responsable del mantenimiento de la metilación del DNA, alteraciones en esta enzima durante el estado embrionario resultan letales; in vitro se ha visto que inhibe la diferenciación de células madre, además de inducir un gran número de alteraciones en los patrones de imprinting. Más recientemente se ha demostrado que no sólo es capaz de mantener la metilación del

DNA, sino que además tiene la capacidad de dirigir la metilación de novo (Hendrich y Bird, 2000). Mucho se ha especulado acerca de la asociación entre la sobreexpresión del gen que codifica para esta enzima y la transformación maligna, no obstante ésta va de la mano con otro tipo de cambios críticos para la immortalización y transformación celular, por lo que no puede decirse que alteraciones en el funcionamiento de esta enzima sean un evento determinante en la carcinogénesis (Hendrich y Bird, 2000). Además es importante mencionar que aún no se sabe cual es la función específica e importancia biológica de las otras DNMTs, por lo que es probable que en ciertas situaciones las funciones de DNMT1 sean reemplazadas por alguna otra enzima (ver Tabla I). Por último, un factor adicional que actualmente ha tomado mucho auge son la existencia de enzimas desmetilantes, las cuales pueden contribuir en gran medida al desequilibrio en los patrones de metilación del DNA durante el desarrollo de un tumor (Bata-Charya et al., 1999; Cedar y Verdini, 1999).

Tabla I.- Propiedades conocidas de las distintas DNMTs de mamíferos.

Enzima	Metilación de mantenimiento	Metilación de novo	Requerida en células somáticas	Requerida en células madre embrionarias
DNMT1	+ ^a	+ ^b	+	-
DNMT2	-	-	?	-
DNMT3 ^a	-	+ ^b	?	?
DNMT3 ^b	-	+ ^b	?	?

^a Demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*; ^b Demostrado *in vitro* únicamente.

Niveles intracelulares de SAM y su asociación con diversas patologías.

Los niveles intracelulares de SAM pueden ser influenciados por la disponibilidad de metionina, por el uso de SAM para la síntesis de poliaminas, y por el tipo de MAT expresada (Lu, 2000). La dependencia de los niveles de SAM en la disponibilidad de metionina y en la tasa de síntesis de poliaminas es bien conocida. Recientemente Lu et al,

han demostrado la importancia sobre los niveles de SAM del tipo de MAT expresada (Cai J et al., 1998).

Tabla II.- Niveles de SAM en plasma de individuos control

No. individuos	Media \pm SD	Referencia
1	170 \pm 0.00 nmol/L	Wise et al., 1997
5	108 \pm 8.2 nmol/L	Struys et al., 2000
10	151.5 \pm 5.1 nmol/L	Melnik et al., 2000
10	127 \pm 0.21 nmol/L	Poirier et al., 2001

Los niveles intracelulares de SAM en eritrocitos, han mostrado diferencias en cuanto al sexo, ya que el nivel reportado para hombres es de $2.28 \pm 0.06 \mu\text{M}$ y para mujeres de $1.63 \pm 0.08 \mu\text{M}$ (Poirier et al., 2001). Los niveles de SAM en el líquido cefalorraquídeo han sido determinados en diversos estudios revisados por Bottiglieri et al, (1994), quienes han encontrado que los pacientes con depresión o Alzheimer presentan niveles reducidos de SAM (Tabla III).

Tabla III- Niveles de SAM en el líquido cefalorraquídeo de diversos pacientes neurológicos

Enfermedad	Fuente	n	Niveles de SAM
Depresión	Bottiglieri et al., 1990	35	↓
Alzheimer	Bottiglieri et al., 1990	10	↓
	Regland et al., 1990	22	-
	Morrison et al., 1996	11	↓
Parkinson	Pall et al., 1992	23	↓
	Baig et al., 1998	20	-
Deficiencia MTHFR	Hyland et al., 1988	4	↓
	Surtees et al., 1991	4	↓
Degeneración subcutánea de la columna debido a deficiencias en vitamina B ₁₂	Bottiglieri et al., 1990	5	↓
SIDA	Surtees et al., 1990	06	↓
	Keating et al., 1991	20	↓
	Castagna et al., 1995	16	↓

- No determinado

↓ Niveles reducidos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la actualidad diversos estudios indican que existe una correlación entre niveles bajos en las concentraciones de SAM y el incremento en el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer. El análisis clínico de los niveles de SAM, SAH y HC parecen ser una herramienta útil para la evaluación o el estudio de poblaciones con un riesgo elevado de desarrollar algún tipo de cáncer atribuible a alteraciones en la disponibilidad de grupos metilo (Poirier et al., 2001). Deficiencias debidas a la dieta o de tipo metabólico de los precursores de los grupos metilo en seres humanos se han asociado a un incremento en el riesgo de varios tipos de cáncer, como mieloma (Hsing. et al., 1993), carcinoma de colon (Giovannucci et al., 1993), mama (Wu et al, 1999), estómago (Hsing. et al., 1993), páncreas (Stolzenberg-Solomon et al., 1999), así como con la formación de lesiones preneoplásicas de pulmón y cérvix (Butterworth et al., 1982 y Heimburger et al., 1988).

Usos clínicos de SAM

La mayoría de las aplicaciones terapéuticas que tiene SAM se enfocan al tratamiento de enfermedades del hígado, ya sea las agudas o crónicas, basados en el hecho de que SAM es una pieza fundamental en el funcionamiento de este órgano (Lieber, 2002; Mato et al., 2002). En mamíferos, más del 80% de la metionina del hígado es convertida en SAM (Mudd y Pool, 1975), además se ha visto que la síntesis anormal de SAM se asocia con enfermedades hepáticas crónicas. Algunos estudios han mostrado que las enfermedades hepáticas están acompañadas por la incapacidad de los pacientes de metabolizar la metionina, incrementando sus concentraciones y reduciendo los niveles de SAM, lo cual también se asocia a defectos en MAT (Horowitz et al., 1981; Duce et al., 1988). Aunque los beneficios de SAM son bien aceptados, el mecanismo molecular por el cual ejerce su efecto protector aún no se ha elucidado. Más aún, han surgido controversias en cuanto a si SAM

puede o no ser transportado al interior de las células hepáticas (Bottiglieri et al., 1994). Sin embargo, tanto en modelos animales como en pacientes con enfermedades hepáticas, la administración exógena de SAM incrementa los niveles de GSH, lo cual es una prueba de que SAM es capaz de ingresar al citoplasma de las células y aumentar su concentración intracelularmente de manera transitoria, antes de participar en los procesos de metilación y contribuir en la formación de GSH. Pascale et al (2002) reportaron la capacidad de SAM de prevenir el desarrollo de cáncer hepático en un modelo de roedores, esto quizá se deba al incremento en la metilación del DNA y la subsecuente inhibición de genes relacionados con la proliferación, como c-Ha-ras, c-Ki-ras y c-myc. SAM disminuye la tasa de crecimiento de líneas celulares de cáncer de hígado (Cai et al., 1998). En las enfermedades hepáticas debidas al alcohol se ha demostrado que los niveles de SAM en el hígado se reducen, mientras que la actividad de la MAT sigue siendo normal. Esta reducción en los niveles de SAM correlaciona con el estrés oxidativo, decremento en GSH y además se asocia con daño mitocondrial (Lieber, 2002). Sin embargo, la administración de SAM corrige la reducción de los niveles de la misma molécula, además de reducir el estrés oxidativo generado por el alcohol. Por lo tanto, en enfermedades hepáticas debidas al alcohol hay una carencia de SAM no solo por el decremento en su producción sino también por el incremento en su uso.

Los estudios clínicos llevados a cabo a principios de 1973 indicaron que SAM tiene efectos antidepresivos (Fazio et al., 1973). En las dos décadas siguientes se confirmó la eficiencia de SAM para tratar la depresión por la aparición de más de 40 pruebas clínicas, varios artículos que resumen los estudios fueron publicados en distintos años (Friedel et al. 1989, Bressa et al. 1994; Brown et al. 2000), los resultados de estos análisis muestran que SAM

produce una respuesta significativamente mayor que el placebo, la cual es comparable a la de antidepresivos tricíclicos, además su efectividad puede ser equiparable con la de la imipramina, la clorimipramina, la nomifensina y la minaprina. Es importante resaltar que a diferencia de los otros antidepresivos, SAM produce pocos efectos adversos. Sin embargo, el mecanismo por el cual SAM ejerce su actividad como antidepresivo es poco claro, se ha visto que algunos pacientes con depresión presentan niveles bajos en ácido fólico, lo que puede reducir los niveles cerebrales de SAM y de metabolitos metilados de dopamina y serotonina en líquido cefalorraquídeo, niveles que se reestablecen después de la administración de SAM (Bottiglieri et al., 2000).

SAM y Cáncer

A principios de 1930, el grupo de Banting y Best mostró que la molécula de colina era la responsable de la prevención de hígado graso inducido en perros con pancreatectomía tratados con insulina (Poirier et al., 2002). Este fue el primer estudio que correlacionó el metabolismo anormal de los grupos metilo con alguna enfermedad. Desde entonces estas deficiencias se han asociado al incremento en el riesgo a desarrollar distintas enfermedades. Sin embargo, antes de 1990 numerosos estudios reportaron la metilación anormal del DNA en tumores y células transformadas y con menor frecuencia los reportes de agentes exógenos y endógenos que causaban estas anomalías. En 1990 se relacionaron dietas deficientes en grupos metilo con la insuficiencia de metilación *in vivo*, así como con la metilación anormal del DNA e inclusive de genes específicos (Poirier, 2002). Un número creciente de estudios tanto clínicos como experimentales han mostrado una asociación entre deficiencias en la disponibilidad fisiológica de grupos metilo y la generación de cáncer. El

intermediario metabólico crítico en la determinación del estado de metilación es el SAM, el donador primordial fisiológico de grupos metilo.

Se ha reportado que varios mecanismos epigenéticos como la síntesis elevada de poliaminas, la metilación aberrante del DNA y la producción de especies reactivas de oxígeno pueden favorecer este proceso por la estimulación del crecimiento celular y la inducción del daño al DNA. Diversos estudios han demostrado que durante el desarrollo preneoplásico del cáncer de hígado, inducido por dietil-nitrosamina, se observa un decremento en los niveles de SAM en el hígado, hecho que además está relacionado con la hipometilación del DNA de hígado de rata (Wilson et al., 1984; Garcea et al., 1989). El restablecimiento de los niveles de SAM por la administración exógena de esta molécula inhibe el crecimiento e induce la reversión fenotípica y la apoptosis de las células preneoplásicas. Sin embargo, aún no se sabe con certeza el mecanismo por el cual ocurre esto, se ha hipotetizado su relación con la metilación del DNA y la regulación de la expresión génica, también con la inhibición de la síntesis de poliaminas, ligada a la transformación parcial de SAM en 5'-metiltioadenosina y su actividad antioxidante y anti fibrogénica (Pascale et al., 2002).

Se ha demostrado que dietas deficientes en colina y metionina, generan carcinomas hepatocelulares en ratas, aún sin la presencia de un carcinógeno (Poirier, 2002). Dependiendo de la severidad de las deficiencias en la dieta de los grupos metilo y del modelo experimental, se ha visto que una dieta restringida en grupos metilo puede actuar como un promotor de tumores de hígado o como un co-carcinógeno (Hoover et al., 1984). Además de la formación de carcinomas hepatocelulares, la administración crónica de dietas

deficientes en grupos metilos también reduce los niveles hepáticos de SAM e incrementa los niveles hepáticos de SAH. Deficiencias crónicas en la disponibilidad de grupos metilo también resulta en la hipometilación del DNA y la expresión incrementada de oncogenes (Poirier, 2002; Ray et al., 1994; Counts et al., 1996; Watson y Goodman, 2002; Waifman et al., 1989).

En seres humanos se cuenta con evidencia que muestra una asociación significativa entre las deficiencias nutricionales, particularmente en la de grupos metilo y el incremento en el riesgo de cáncer de órganos específicos (Giovannucci et al 1993; Hsing et al., 1993; Wu et al., 1999). La metilación anormal del DNA parece ser un fenómeno generalizado de todos los cánceres (Robertson et al., 2000), a la fecha, pocos estudios clínicos proveen evidencia directa que relacione las deficiencias en los grupos metilo con el decremento en la metilación del DNA y la disponibilidad de SAM in vivo. Los limitados estudios con los que se cuenta indican que las condiciones de la dieta están asociadas con el incremento en el riesgo de cáncer, las deficiencias en ácido fólico y el consumo elevado de calorías se asocian con el decremento en la disponibilidad de SAM y el decremento en la metilación global del DNA in vivo (Jacob et al., 1998; Cravo et al., 1998; Poirier et al., 2001).

Farmacocinética

Se ha demostrado que SAM es capaz de cruzar la pared intestinal, permitiendo el incremento de sus concentraciones en plasma. Estudios preliminares en ratas, muestran que la absorción de SAM es mucho mejor por vía intraduodenal comparada con la vía oral (Stramentinoli et al., 1979). En un estudio fase I, la administración de cápsulas con protección entérica de 400, 600 y 1000 mg de SAM en cuatro sujetos, incrementó los

niveles plasmáticos de forma dosis-dependiente hasta 30 o 50 veces la concentración basal (Bottiglieri et al., 1988). Sin embargo, al proporcionar oralmente SAM [^{14}C del grupo metilo] a concentraciones de 200 mg (0.02 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) a tres voluntarios se vio que la excreción en orina de la radiactividad en las primeras 48 h fue de $15.5 \pm 1.5\%$ y las heces contenían $23.5 \pm 3.5\%$ de la radiactividad a las 72 h. Estos resultados muestran que alrededor del 60% de la radiactividad es incorporada en "reservas" estables. Un estudio en el cual se comparó la incorporación del metilo radiactivo de SAM después de la administración oral o por vía intravenosa mostró SAM oral es metabolizado activamente, ya que el grupo metilo marcado radiactivamente es incorporado en proteínas y fosfolípidos. Estos datos además están apoyados por otro estudio, en el cual se muestra que dosis únicas de 100 mg de SAM doblemente marcado (^3H del grupo metilo y ^{35}S de la molécula) que el 62% de ^3H y el 43.7% de ^{35}S permanecen en el organismo después de 5 días (Guilidori et al., 1998). Varios estudios indican que SAM, por vía oral o parenteral, incrementa las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo, en perros se demostró que esto sucede en un orden de magnitud de 20-40 veces del basal después de 6 h (Stramentinoli et al., 1979). En seres humanos se ha determinado que después de la inyección de 200 mg de SAM durante 14 días, SAM se incrementó en un 65 % a las 2 h de la última inyección y un 12% a las 24 h, lo que significa que SAM es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. De manera similar, la administración oral de SAM (400 mg tres veces al día/4-8 días) a pacientes con enfermedad de Alzheimer incremento las concentraciones tanto en el plasma como en el líquido cefalorraquídeo (Bottiglieri et al., 2002).

Interacción con otros compuestos

La información sobre la interacción de SAM con medicamentos o alimentos es muy limitada. Al menos un caso de síndrome de serotonina ha sido descrito en un paciente al cual se le administró SAM intramuscularmente al mismo tiempo que estaba ingiriendo clomipramina (Bottiglieri, 2002). Por lo que se cree que es prudente que los pacientes eviten tomar otros antidepresivos durante el tiempo que están consumiendo SAM. También se recomienda que hasta que no se aclare el efecto de SAM sobre los receptores monoamino oxidasa, los pacientes no deben consumir alimentos madurados, como quesos, vinos, o todos aquellos alimentos que contengan niveles elevados de tiramina, ya que existe la posibilidad de una interacción (Fetrow y Avila, 2001). El consumo de SAM es saturable y no está inhibido ni por metionina, adenosina, 5-metiltioadenosina, carnitina, colina, betaína, quinina o hemicolinium-3; sin embargo, es inhibido por sincfungina y SAIH (Bottiglieri 2002).

Dosis

Un punto que debe considerarse al respecto del uso clínico de SAM, es la carencia de dosis estandarizadas tanto en el uso clínico, como en los suplementos alimenticios, ya que las concentraciones que se pueden alcanzar pueden ser sub o supra-terapéuticas, lo cual puede tener una gran variedad de resultados (Fetrow y Avila, 2001). Las dosis más comúnmente empleadas en las pruebas clínicas se encuentran en el rango de 200 a 1600 mg/día. La administración de SAM al principio se hace por vía intravenosa y posteriormente se cambia a un esquema por vía oral con dosis reducidas, hasta la obtención de una respuesta. En el tratamiento de la depresión las dosis más comúnmente utilizadas son del orden de 1600 mg de SAM al día, si es por vía oral y de 400 mg al día si es por vía intravenosa (Delle Chiaie et al., 2002). Otros han iniciado una terapia con 200 mg/día vía oral y administrada

secuencialmente hasta alcanzar una dosis de 1600 mg/ día (2-4 dosis) (Fetrow y Avila, 2001).

SAM como un posible blanco para la acción de agentes xenobióticos

Además de las reacciones de metilación, durante las cuales se consume más del 80% del SAM intracelular, SAM juega un papel central en la formación de poliaminas así como en reacciones de transulfuración (Chiang et al., 1996; Guilidori et al., 1984; Lu, 2000). El grupo aminopropilo de SAM se puede transferir a moléculas como la putresina para formar poliaminas, mientras que en la transulfuración se utiliza el grupo sulfonio de SAM en la formación de taurina y glutatión, un destoxificador importante de radicales libres (Chiang et al., 1996; Evans et al., 1997; Lu, 2000). Por lo que se puede decir que SAM es una molécula esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular. Algunos reportes indican que el número de reacciones en las cuales participa SAM sólo es superado por aquellas que involucran al ATP (Chiang et al., 1996). De manera que es fácil entender que las alteraciones en el metabolismo de SAM pueden resultar en daño celular y por lo tanto en cambios patológicos en los organismos afectados. En los seres humanos se ha sugerido que niveles bajos de SAM pueden estar involucrados en algunas alteraciones hepáticas, como la hepatitis alcohólica aguda y la cirrosis, así como enfermedades cardiovasculares (Refsun et al., 1998) y psiquiátricas como la depresión unipolar (Bottiglieri et al., 1994). De hecho SAM ha sido utilizado como agente antidepresivo durante más de 20 años y más recientemente en el tratamiento de osteoartritis, (Barcelo et al., 1990; Cimino et al., 1984), desordenes hepáticos como colestasis, cirrosis alcohólica y hepatotoxicidad inducida por fármacos (Osman et al., 1993; Varela -Morciras et al., 1995).

En animales de experimentación se ha demostrado que SAM tiene un efecto protector contra la hepatocarcinogenicidad inducida por el ácido orótico, este efecto inhibitorio está asociado con un incremento en la apoptosis en los nódulos del carcinoma (Pascale et al., 1995). Por lo que respecta al daño al DNA, se ha reportado que SAM reduce la aparición de sitios frágiles en cromosomas de linfocitos de sangre periférica tratados con fluorodesoxiuridina (Zollino y Neri, 1987).

Existen algunos agentes xenobióticos que son capaces de modificar el estado general de metilación de moléculas que componen a las células eucariontes, en especial del DNA (Gebhart y Arutyunyan, 1991). Entre estos podemos mencionar a algunos agentes carcinogénicos como el benzo(α)pireno, el dimetilbenzantraceno, la aflatoxina B, la nitrosoetilurea, la 5-azacitidina, etc (Poirier, 1994; Poirier et al., 2003). También se ha sugerido que la acción carcinogénica de algunos metales, como el níquel y el arsénico, está mediada por las alteraciones que estos causan en la metilación del DNA (Mass y Wang, 1997). Los seres humanos expuestos a arsénico utilizan a SAM para metabolizar al arsénico inorgánico en compuestos metilados que son más fácilmente eliminados del organismo y por lo tanto ésta ha sido propuesta como la ruta de destoxificación del arsénico (Healy et al., 1998; Yamanaka et al., 1997). De manera que tratando de explicar la carcinogenicidad del arsénico, se piensa que las personas expuestas de manera crónica a este elemento utilizan una gran proporción de SAM durante su destoxificación disminuyendo la biodisponibilidad de SAM y por lo tanto alterando así otros procesos de metilación (Mass y Wang, 1997). De hecho se ha reportado que la exposición a arsénico induce un estado de hipometilación global del DNA que podría influenciar la sobre-expresión de oncogenes y

propiciar la transformación maligna de las células expuestas (Mass y Wang, 1997; Zhao et al., 1997). Si el arsénico disminuye la disponibilidad del SAM en los individuos expuestos crónicamente, un efecto que hasta el momento no ha sido probado, además de generar un estado de hipometilación del DNA afectaría otros procesos biológicos dependientes de la metilación de otras moléculas como fosfolípidos y proteínas. Si lo anterior es cierto, se podría plantear el uso preventivo de SAM exógeno en los individuos que han estado expuestos al arsénico durante períodos prolongados.

3. Planteamiento del problema

Diversos estudios han mostrado que alteraciones en las concentraciones de los componentes esenciales del metabolismo de los grupos metilo, como el ácido fólico y metionina, correlacionan con el incremento del daño al DNA, evaluado como aberraciones cromosómicas e incremento en la frecuencia de MN, después de haber inducido un estado de hipometilación del DNA. Sin embargo, aún no se sabe cual es el mecanismo involucrado y tampoco si la pieza clave de estos efectos es la disponibilidad de SAM, ya que los eventos de metilación dependen de esta molécula. Además, se ha visto que después de la administración de ácido fólico los niveles de daño genético se reducen substancialmente. Por otra parte, existen agentes capaces de alterar el metabolismo de los grupos metilo mediante la reducción en los niveles de SAM, un ejemplo de estos es el arsénico, un metaloide que es carcinogénico en seres humanos capaz de dañar al DNA mediante distintos mecanismos, como alteraciones en la reparación, la segregación cromosómica y la inducción de un estado de hipometilación al comprometer el SAM de las células en su propia metilación. En este trabajo se planteó el estudio de los posibles efectos de la administración de SAM en el daño al DNA, evaluado como MN, inducido por el arsenito de sodio, así como comparar los efectos de SAM sobre la frecuencia de MN inducida por agentes que no alteran el metabolismo de los grupos metilo, y determinar si dichos efectos en la frecuencia de MN estaban o no relacionados con alteraciones en la metilación del DNA.

4. Hipótesis

1) El arsenito de sodio es capaz de reducir las concentraciones intracelulares de SAM, así como de alterar el estado de metilación del DNA y de inducir daño genético, por lo que la

administración exógena de SAM a los cultivos tratados con arsenito de sodio reducirá el daño genético evaluado como micronúcleos. 2) La administración de SAM a cultivos tratados con agentes xenobióticos que no alteran la disponibilidad de SAM no tendrá ningún efecto sobre la frecuencia de MN inducida por estos compuestos.

5. Objetivo General

Evaluar los efectos de SAM sobre la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos tratados *in vitro* con arsenito de sodio y comparar estos efectos con los inducidos en células tratadas con xenobióticos que no alteran el metabolismo de los grupos metilo.

Objetivos particulares

- 1.- Analizar el posible efecto citostático y genotóxico de diferentes concentraciones de SAM en cultivos de linfocitos humanos tratados *in vitro*.
- 2.- Evaluar el efecto del arsenito de sodio, sulfóxido de albendazol, mitomicina-C y cisplatino en la proliferación celular y en la inducción de micronúcleos en cultivos de linfocitos humanos.
- 3.- Determinar el efecto *in vitro* de SAM sobre el daño inducido en linfocitos humanos por los agentes mencionados en el objetivo 2.
- 4.- Si el SAM reduce el daño inducido por alguno de los xenobióticos mencionados en el objetivo 2, se analizará si este efecto se produce por cambios en el estado general de metilación del DNA y en las concentraciones intracelulares de SAM y SAH de linfocitos tratados *in vitro*.
- 5.- De la misma manera se evaluará el efecto de los agentes mencionados en el objetivo 2 sobre los microtúbulos.

6. Material y Métodos

Donadores

Se extrajo sangre entera de 19 donadores sanos, con un rango de edad de 19 a 38, no fumadores y que no habían ingerido ningún tipo de medicamento al menos durante 15 días antes de la toma de la muestra.

Evaluación de la cinética de proliferación celular y la frecuencia de micronúcleos en sangre entera

Se sembró sangre entera (0.5 ml) de 6 donadores sanos (edad promedio de 27 años) en 6.3 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, EUA), suplementado al 1% con aminoácidos no esenciales (Gibco, USA) y con glutamina (Sigma, EUA), a cada tubo se agregaron 0.2 ml de fitohemaglutinina (PHA, Gibco, EUA). Los cultivos se realizaron por duplicado para cada donador y se mantuvieron a 37°C durante 72 h. Después de las primeras 48 h de cultivo se administraron distintos xenobióticos y al mismo tiempo se agregó citocalasina B (21 µl de un stock de 2 mg/ml) para inhibir la citocinesis, los cultivos se volvieron a incubar a 37°C durante 24 h. Las concentraciones de SAM reportadas en la literatura en el plasma de seres humanos es de 170 nM (Wise et al, 1997), con el fin de analizar si dosis menores podrían tener algún efecto, decidimos utilizar las dosis de 0.17, 1.7 y 17 nM. Las dosis que se utilizaron para el caso de los xenobióticos fueron equimolares a la utilizada de arsenito de sodio (NaAsO₂, 10 µM), esta concentración fue elegida en base a análisis previos de la frecuencia de MN. Se analizaron los efectos de SAM (Roche, Alemania) sobre la frecuencia de MN inducidos por NaAsO₂ comparados con aquellos cultivos tratados con cisplatino (CIS; 10 µM), mitomicina C (MMC; 10 µM) y sulfóxido de

albendazol (SOABZ; 10 μ M). Una vez transcurridas las 72 h de cultivo, las células se prefijaron con 600 μ l de metanol-acido acético (3:1) y se centrifugaron a 1200 rpm, 10 min, se elimino el sobrenadante y se agregaron 12 ml de fijador por tubo, posteriormente se guardaron 20 minutos a -70 °C, al término de este tiempo se realizaron los lavados con la misma solución fijadora hasta obtener un botón celular limpio. El botón celular se resuspendió en 200 μ l de fijador y se tomaron alícuotas para gotear en laminillas limpias, evitando la destrucción de los citoplasmas. Una vez realizadas las laminillas se tificaron con el colorante de Wright (eosina-azul de metileno). La proliferación de los linfocitos fue analizada en 100 células determinándose la frecuencia de mono-, bi- y polinucleadas. En tanto que la frecuencia de micronúcleos (MN) se evaluó en 1000 células binucleadas de acuerdo a criterios previamente establecidos (Fenech, 2000).

Frecuencia de micronúcleos en linfocitos aislados

Se aislaron linfocitos de 10 donadores (edad promedio de 29 años). La sangre se centrifugó en un gradiente de sacarosa a 1600 rpm, 30 min, se separaron los leucocitos con pipetas Pasteur estériles y se transfirieron a tubos cónicos (Corning, EUA) con medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, EUA). Los leucocitos se lavaron en repetidas ocasiones hasta eliminar las células rojas que pudieran estar contaminando el botón de células blancas. 5×10^6 células fueron sembradas en medio de cultivo RPMI-1640 (1×10^6 células/ml) suplementado con aminoácidos no esenciales y glutamina (ambos al 1%), suero fetal bovino al 15 % y PHA (0.03%). Los cultivos fueron incubados a 37°C durante 72 h. A las 48 h de cultivo las células fueron tratadas como se menciona anteriormente y nuevamente incubadas 24 h. Además, se analizó el efecto de colcemid (CLC; 10 μ M), y cuatro agentes desmetilantes del

DNA. Se determinó la capacidad de 5-azacitidina (5-AZA; 10 μ M), hidralacina (HIDRA; 10 μ M), etionina (ETIO; 10 μ M), y procainamida (PROC; 10 μ M) para inducir MN. El efecto de SAM sólo fue investigado en cultivos tratados con CLC o 5-AZA ya que este fue el único agente desmetilante que indujo MN. Al término de las 72 h totales del cultivo, las células fueron fijadas, lavadas y procesadas para el gotco de las laminillas y la posterior evaluación de los MN.

Evaluación de las concentraciones intracelulares de SAM

Se sembró sangre entera (0.5 ml) en medio de cultivo RPMI-1640 (6.3 ml) y se estimuló con PHA (0.03 %) durante 72 h. Se agregó el tratamiento, NaAsO₂ (10 μ M), SAM (17 nM) o la combinación de ambos, durante las últimas 24 de cultivo. Después del tratamiento, los cultivos fueron centrifugados a 1000 rpm, 10 min, el sobrenadante se eliminó y el botón celular se lavó con 2 ml de solución salina (0.9%). Las proteínas se precipitaron al adicionar un quinto del volumen original de sangre, de una solución de ácido tricloroacético al 40%. La muestras fueron mezcladas con un vortex hasta que estas adquirieron una coloración café oscuro, rápidamente los tubos fueron colocados en hielo durante 30 min. Al cabo de este tiempo, estos fueron centrifugados (3000 rpm), 10 min a 5°C para remover las proteínas precipitadas. El sobrenadante que contenía el SAM fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se agregó un volumen igual de éter dietílico frío (libre de peróxido). Los tubos fueron agitados 20 s y centrifugados (15000 rpm, 10 min) para separar las fases. Las muestras fueron pasadas por un filtro Ultrafree-MC (0.45 μ m, Millipore, Bedford, MA, EUA) y guardadas a 0° C hasta su análisis. El análisis de SAM se realizó por HPLC de acuerdo al método de Wise y Fullerton (1995).

Análisis de HPLC para 5-metilcitosina (5-MDC) en DNA de linfocitos aislados

Linfocitos aislados de tres donadores sanos, no fumadores y con una edad promedio de 44 años (rango: 32-52), fueron cultivados por duplicado durante 72 h, y tratados con 10 μM de NaAsO_2 , SOABZ, CIS, 5-AZA, SAM (17 nM), o la combinación de cada uno de los agentes y SAM, durante las últimas 24 h de cultivo. Al término del tratamiento se extrajo el DNA con el Nucleon Kit-BACC2/3, para lo cual se centrifugaron las células, el sobrenadante se desechó y el botón celular se lavó con PBS (pH= 7.3). Posteriormente se agregó la solución de lisis celular y nuclear para destruir tanto la membrana celular como la envoltura nuclear. Las proteínas fueron eliminadas con una solución de perclorato de sodio, después a cada muestra se le añadieron 2 ml de cloroformo, los tubos fueron mezclados hasta que aparecieran dos fases, se adicionaron 300 μl de la resina nucleon y se centrifugaron a 1300 g durante 3 min. Se extrajo la fase líquida que se encontraba por arriba de la resina y se transfirió a un tubo limpio, el DNA fue precipitado con 2 volúmenes de etanol absoluto frío, los tubos fueron agitados hasta que el DNA fuera visible. Los tubos fueron centrifugados a 1300 g, 30 min, el etanol absoluto se decantó y el botón de DNA se enjuagó en 100 μl de agua. Se determinó la concentración de DNA con un espectrofotómetro. Una vez conocida la cantidad de DNA, para la cuantificación del porcentaje de 5-MDC, se utilizó 1 mg/ml de DNA por cada muestra, el DNA fue hidrolizado según el método de Gehrke et al (1984). Las muestras de DNA hidrolizadas fueron inyectadas en un HPLC Hewlett-Packard 1090, equipado con una columna Beckman Ultraesfera ODS, 4.5 x 25 cm (el tamaño de la partícula era de 5 μl), la cromatografía se realizó a 30°C. La técnica de HPLC se llevó a cabo según el método reportado con anterioridad para 5-MDC (Wise and Hass, 1994), las muestras se corrieron en tres

ocasiones para cada donador y el porcentaje de 5-MDC se obtuvo del promedio de los datos de cada corrida.

Integridad de los microtúbulos

Fibroblastos normales fueron donados por el Dr. Erich Gebhart. Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado con 20% de suero fetal de ternero (HyClone, EUA), L-glutamina (Sigma, EUA), y aminoácidos no esenciales (Gibco, EUA), en cámaras acopladas a cubreobjetos durante 24 h. Al término de este tiempo, las células se trataron con 10 μM de NaAsO_2 , SOABZ, o CLC, con o sin SAM (17 nM) durante las últimas 2 h de cultivo. Los fibroblastos fueron fijados con metanol puro 3 min a -20°C y rehidratados en una solución al 0.1% de TBS-Tritón-X-100. Para la detección inmunocitoquímica de la tubulina se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón para β -tubulina (Zymed, EUA; 1:200 en una solución al 2% de albúmina), el anticuerpo se adicionó y las laminillas se colocaron en una cámara húmeda 30 min. Las células se lavaron en 4 ocasiones con una solución de TBS-Triton-X-100. Posteriormente se colocó el segundo anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con TRITC (Zymed, EUA; 1:200 en una solución de albúmina al 2%) el cual se incubó con las laminillas durante 30 min. Las células fueron contrateñidas con DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 1 min, se enjuagaron y se colocó una solución protectora contra la luz. Los microtúbulos de 100 células consecutivas fueron analizados en su morfología, orientación y distribución con un microscopio de fluorescencia Zeiss. Se realizaron tres experimentos independientes.

Resonancia Nuclear Magnética

Para investigar una posible interacción química extracelular entre SAM y NaAsO_2 que redujera la reactividad del xenobiótico, se realizó una Resonancia Nuclear Magnética, en colaboración con el laboratorio del Dr. Raymundo Cea del Instituto de Química de la UNAM. Se utilizó SAM solo y la mezcla de SAM con NaAsO_2 , para lo cual las muestras se diluyeron en agua deuterada (Sigma, EUA) y se analizaron en un espectrofotómetro Jeol Eclipse +300 (300 MHz) a temperatura ambiente, utilizando tetrametilsilano como referencia externa.

Estadística

Los análisis estadísticos se realizaron con una prueba de chi-cuadrada con corrección de Yates. Los valores de p (dos colas) menores o iguales a 0.05 fueron considerados como significativos en todos los experimentos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. Resultados

Cultivos de sangre entera

Efectos de SAM sobre la frecuencia de células con MN

Para evaluar los posibles efectos de SAM sobre la frecuencia de MN se utilizaron distintas concentraciones de esta sustancia (0.17, 1.7 y 17 nM). La figura 4 muestra la proporción de células binucleadas con MN (CBMN) y puede observarse que SAM no incrementó este parámetro en ninguna de las concentraciones utilizadas comparado con el control. En esta misma figura se muestra el efecto de la administración de distintas concentraciones de SAM en cultivos tratados con NaAsO_2 a una concentración de 10 μM . SAM redujo significativamente ($p < 0.05$) la frecuencia de CBMN inducida por NaAsO_2 en cualquiera de las concentraciones utilizadas. Por otro lado, SAM no cambió la frecuencia de CBMN en cultivos tratados con alguno de los dos agentes alquilantes (MMC o CIS, Fig. 5A-B). Aunque disminuyó casi un 50% la proporción de MN inducida por SOABZ, un inhibidor de la polimerización de tubulina (Fig. 5C; $p = 0.05$).

Efectos de SAM sobre la proliferación celular

La tabla IV muestra el efecto de distintos tratamientos en la proliferación celular evaluada por la frecuencia de células que se dividieron una vez en cultivo (células binucleadas). SAM no alteró la proliferación celular, mientras que el porcentaje de células binucleadas se redujo en cultivos tratados con NaAsO_2 , MMC, o CIS indicando un retraso en la proliferación celular. EL SOABZ no modificó este parámetro. La proliferación en los cultivos con SAM y NaAsO_2 se recuperó conforme la concentración de SAM se

incrementó. Sin embargo, SAM no protegió a las células del efecto citotóxico de MMC o CIS.

Tabla IV.- Efecto de S-adenosil-L-metionina (SAM) en el porcentaje de células binucleadas después de 24 h de tratamiento con diferentes agentes: Arsenito de sodio (NaAsO_2 , 10 μM); mitomicina C (MMC, 10 μM); cisplatino (CIS, 10 μM); y sulfóxido de albendazol (SOABZ, 10 μM).

Tratamiento	Linfocitos binucleados (%) *
Control	78 ± 5
SAM 0.17 nM	78 ± 4
SAM 1.7 nM	80 ± 1
SAM 17 nM	78 ± 4
NaAsO_2	43 ± 9 **
NaAsO_2 +SAM 0.17 nM	50 ± 10 **
NaAsO_2 +SAM 1.7 nM	67 ± 11
NaAsO_2 +SAM 17 nM	66 ± 5
MMC	26 ± 7
MMC+SAM 17 nM	32 ± 9 **
CIS	36 ± 6 **
CIS +SAM 17 nM	41 ± 7 **
ABZSO	75 ± 3
ABZSO+SAM 17 nM	75 ± 2

* Media y desviación estándar de 4 experimentos independientes; ** $p \leq 0.01$, χ^2 con corrección de Yates

Concentraciones intracelulares de SAM

Para analizar si la reducción en la frecuencia de MN por NaAsO_2 estaba relacionada con las alteraciones en los niveles intracelulares de SAM se evaluaron las concentraciones

intracelulares de esta molécula. Los resultados indican que ninguno de los compuestos probados redujo de manera significativa la concentración intracelular de SAM después de 24 h de tratamiento. Los cultivos tratados con NaAsO₂ y SAM mostraron un ligero incremento de SAM intracelular (0.2 ng/ml con NaAsO₂ y 0.3 ng/ml con NaAsO₂ y SAM), esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla V).

Tabla V.-Efecto de s-adenosil-L-metionina (SAM), arsenito de sodio (NaAsO₂) o SAM + NaAsO₂ en la concentración intracelular de SAM en linfocitos de sangre entera después de 24 h de tratamiento.

Tratamiento	Porcentaje	[SAM] ng/ml
CONTROL	100	0.23
SAM	104	0.24
NaAsO ₂	91	0.21
NaAsO ₂ + SAM	128	0.30

Cultivos de linfocitos aislados

Dado que algunas de las metodologías empleadas requerían del uso de linfocitos aislados, se realizaron experimentos para evaluar la frecuencia de MN inducida por SAM y los otros agentes xenobióticos en cultivos de linfocitos aislados. Las figuras 6 y 7 muestran la frecuencia de MN en linfocitos aislados tratados con NaAsO₂, SOABZ, MMC, o CIS. En general los resultados fueron similares, no obstante que las células tratadas con NaAsO₂ fueron más sensibles que los cultivos de sangre entera. Los linfocitos tratados con CIS, MMC y SOABZ tuvieron frecuencias muy similares a las que se encontraron en linfocitos de sangre entera. La administración de SAM redujo el número de células micronucleadas en los cultivos tratados con NaAsO₂ y SOABZ, no así en aquellos tratados con MMC y

CIS. El tratamiento con CLC, un inhibidor clásico de la polimerización de microtúbulos indujo una frecuencia elevada de MN en cultivos de linfocitos aislados, efecto que fue prevenido por la adición de SAM (Fig. 8). Mientras que de los cuatro agentes desmetilantes del DNA, sólo 5-AZA incrementó la frecuencia de MN (Fig. 9). Sin embargo, SAM no modificó significativamente la proporción de células con MN inducida por 5-AZA (Fig. 10).

Metilación global del DNA

La tabla VI muestra que ninguno de los agentes químicos alteró significativamente el porcentaje de citosinas metiladas, a excepción del control positivo, la 5-AZA, la cual redujo un 36% las citosinas metiladas con respecto al control, este evento fue contrarrestado con la adición de SAM, si bien no se recuperó hasta un 100%, sino sólo un 85% con respecto al control.

Alteraciones en la morfología y distribución de los microtúbulos

Se analizó el efecto de SAM sobre la integridad de los microtúbulos cuando estos fueron tratados con NaAsO₂, SOABZ y CLC. Como se muestra en la figura 11, las células tratadas con SAM mostraron una integridad y organización de los microtúbulos muy similar a la que presentaron las células control, por el contrario, las células tratadas con NaAsO₂, SOABZ o CLC cambiaron completamente la organización e inclusive la integridad de los microtúbulos (Figura 11). Sin embargo, tanto la integridad como la organización que se había perdido con el tratamiento se recuperó en aquellas células a las cuales se les administró al mismo tiempo el tratamiento de SAM (Figura 11). La tabla VII muestra el promedio de tres experimentos del efecto de SAM sobre la frecuencia de células con

alteraciones en el citoesqueleto de tubulina en un total de 100 células. Los tres agentes utilizados incrementaron significativamente el número de células con alteraciones en el citoesqueleto, siendo el CLC el agente que indujo la frecuencia más alta. SAM fue capaz de reducir el número de estas alteraciones en todos los casos, hasta un 69% el número de células con alteraciones en los cultivos tratados con NaAsO₂, en tanto que en aquellos tratados con SOABZ redujo un 46% y en los tratados con CLC la disminución fue de un 22%.

Tabla VI.- Efecto de s-adenosil-L-metionina en el porcentaje de 5-metildesoxicitidina en cultivos tratados con arsenito de sodio (NaAsO₂, 10 μM), sulfóxido de albendazol (SOABZ, 10 μM), cisplatino (CIS 10 μM) y 5-azacitidina (5-AZA, 10 μM).

Tratamiento	% 5-MDC	
	Media	DE
CONTROL	4.12	0.25
SAM	4.13	0.96
NaAsO ₂	3.96	0.37
NaAsO ₂ + SAM	4.23	0.52
SOABZ	4.01	0.49
SOABZ+SAM	4.11	0.18
CIS	4.06	0.21
CIS+SAM	4.5	0.5
5-AZA	2.61	0.28 ^a
5-AZA+SAM	3.49	0.11 ^{b, c}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

^a p<0.00001 vs. CONTROL; ^b p = 0.02 vs. SAM; ^c p = 0.0006 vs. 5-AZA.

Resonancia Nuclear Magnética

Los ensayos de RNM muestran que no existe ningún tipo de desplazamiento de las señales de los átomos de H de la molécula de SAM cuando se pone en solución con NaAsO_2 (Anexo 3), lo que indica que no existe ningún tipo de interacción química entre ambas moléculas en el medio extracelular capaz de restarle reactividad al NaAsO_2 para causar daño al DNA.

Tabla VII. Efectos of S-adenosil-L-metionina (SAM; 17 nM) en la frecuencia de alteraciones en los microtúbulos (MT) y células con micronúcleos (MN) en fibroblastos tratados con distintos compuestos.

Tratamiento	Alteraciones de MT (media% \pm DE)	Células con MN (en 500 células)
Control	3.0 \pm 1.0	4.0 \pm 1.0
SAM	4.0 \pm 1.7	4.0 \pm 2.0
Arsenito de sodio (10 μM)	22.3 \pm 2.1 ^{A, B}	15.7 \pm 1.5 ^A
Arsenito de sodio + SAM	6.7 \pm 1.5 ^C	5.3 \pm 1.5 ^C
Colcemid (10 μM)	61.3 \pm 3.5 ^{A, B}	8.0 \pm 1.7
Colcemid + SAM	47.7 \pm 2.5 ^{A, B}	6.0 \pm 1.7
Sulfóxido de albendazol (10 μM)	27.7 \pm 2.5 ^{A, B, C}	6.3 \pm 0.6
Sulfóxido de albendazol + SAM	15.0 \pm 1.7 ^{A, B, C}	4.0 \pm 0.0

DE: Desviación estándar de 3 experimentos; ^A $p \leq 0.01$ vs control; ^B $p \leq 0.02$ vs SAM; ^C $p \leq 0.05$ vs tratamiento sin SAM; p de dos colas. χ^2 con corrección de Yates

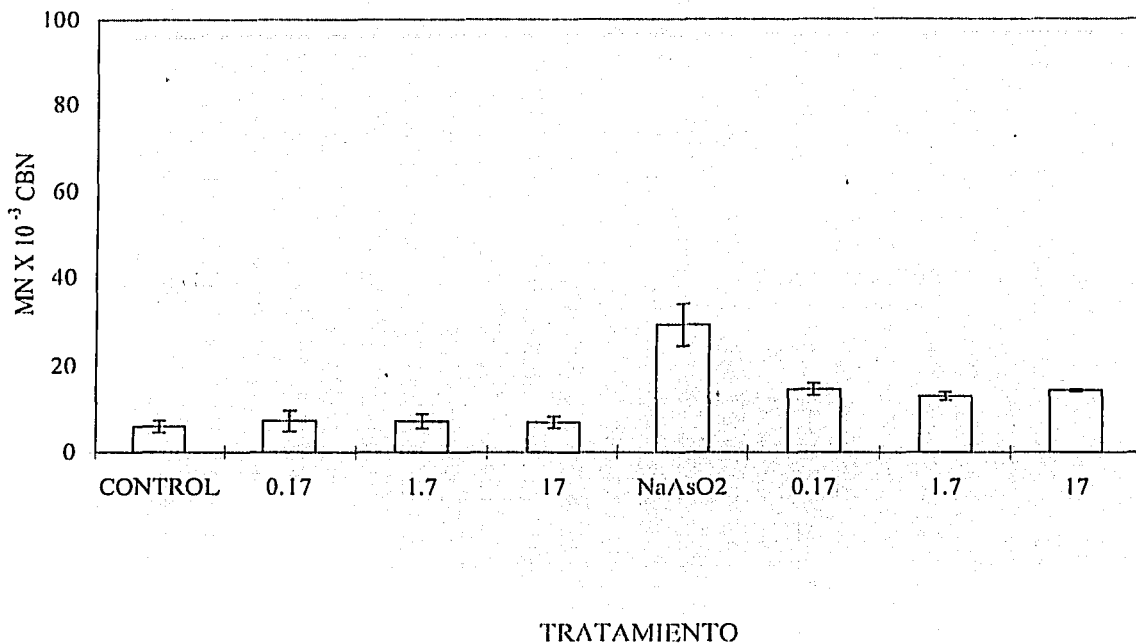


Figura 4- Efecto de varias concentraciones de s-adenosil-L-metionina (SAM, 0.17, 1.7 y 17 nM) en la frecuencia de micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre entera después del tratamiento por 24 h con y sin arsenito de sodio (NaAsO₂; 10 μM). Las barras representan la media de seis experimentos y sus desviaciones estándar, las que se encuentran a la izquierda de NaAsO₂ son los cultivos con SAM solamente y las que están a la derecha tiene distintas concentraciones de SAM más el NaAsO₂.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

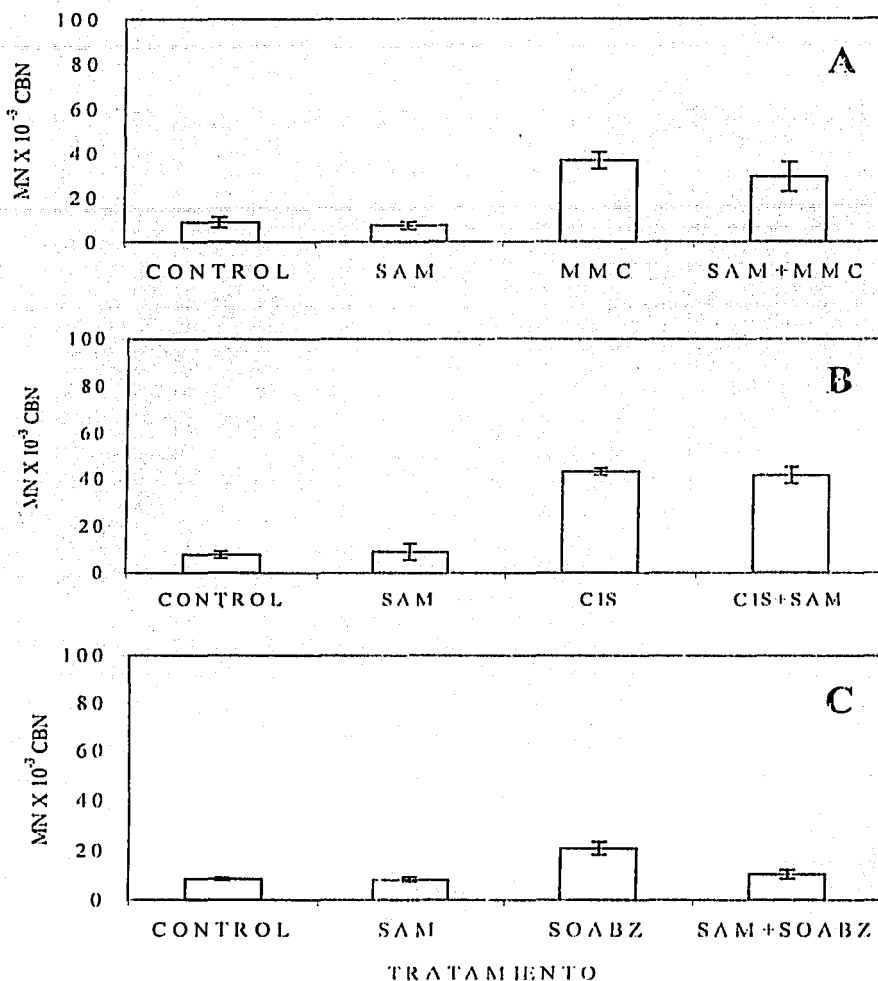


Figura 5- Efecto de la s-adenosil-L-metionina (SAM, 17 nM) sobre la frecuencia de micronúcleos (MN) inducida en linfocitos de sangre entera por A) mitomicina C (MMC; 10 μ M), B) cisplatino (CIS; 10 μ M) y C) sulfoxido de albendazol (SOABZ; 10 μ M). Las barras representan la media de seis experimentos independientes y sus desviaciones estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

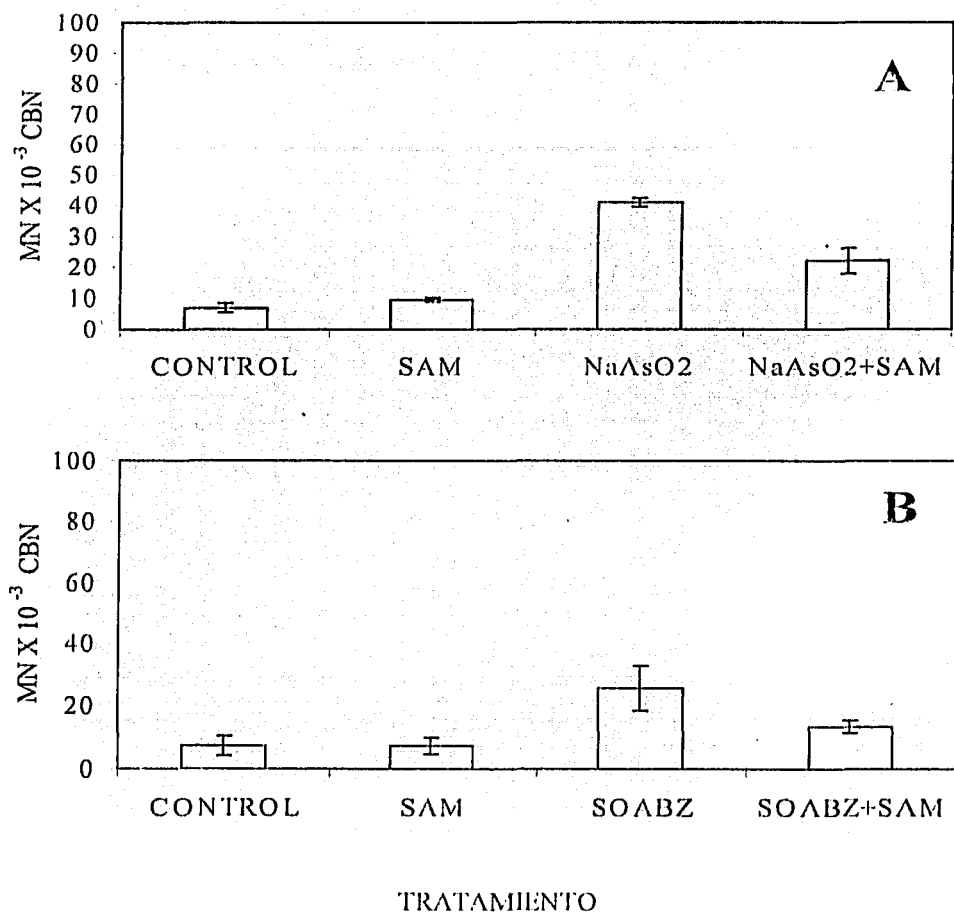


Figura 6- Efecto de la s-adenosil-L-metionina (SAM, 17 nM) sobre la frecuencia de micronúcleos (MN) inducida en linfocitos aislados por: A) arsenito de sodio (NaAsO₂; 10 μM) y B) sulfóxido de albendazol (SOABZ; 10 μM). Las barras representan la media de al menos cuatro experimentos independientes y sus desviaciones estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

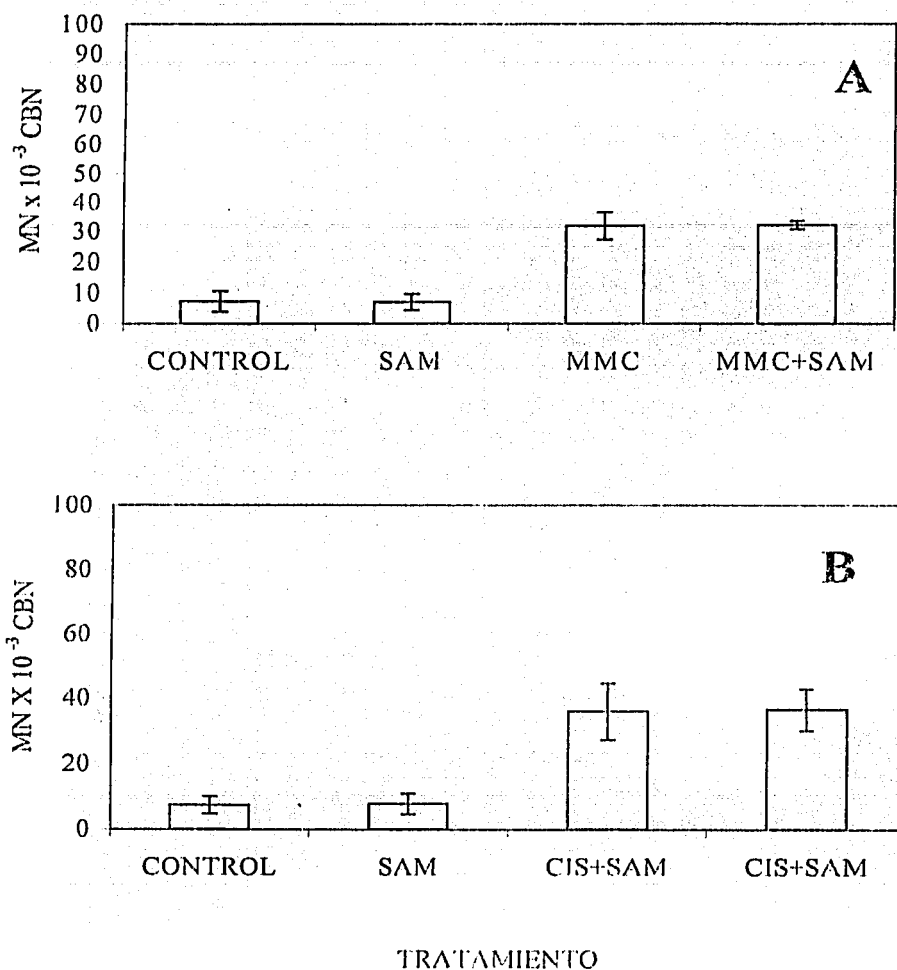


Figura 7- Efecto de la s-adenosil-L-metionina (SAM, 17 nM) sobre la frecuencia de micronúcleos (MN) inducida en linfocitos aislados por: A) mitomicina C (MMC; 10 μ M) y B) cisplatino (CIS; 10 μ M). Las barras representan la media de al menos cuatro experimentos independientes y sus desviaciones estándar.

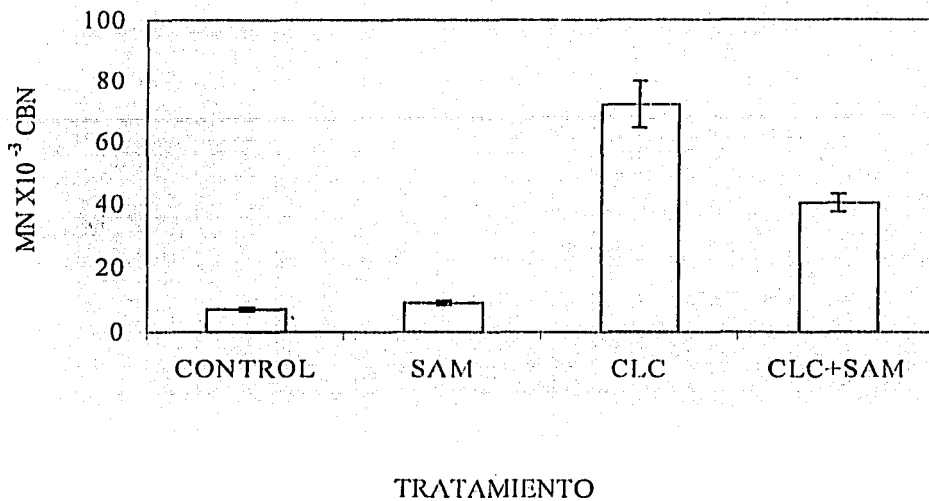


Figura 8- Efecto de la s-adenosil-L-metionina (SAM, 17 nM) sobre la frecuencia de micronúcleos (MN) inducida en linfocitos aislados por colcemid (CLC; 10 μ M).

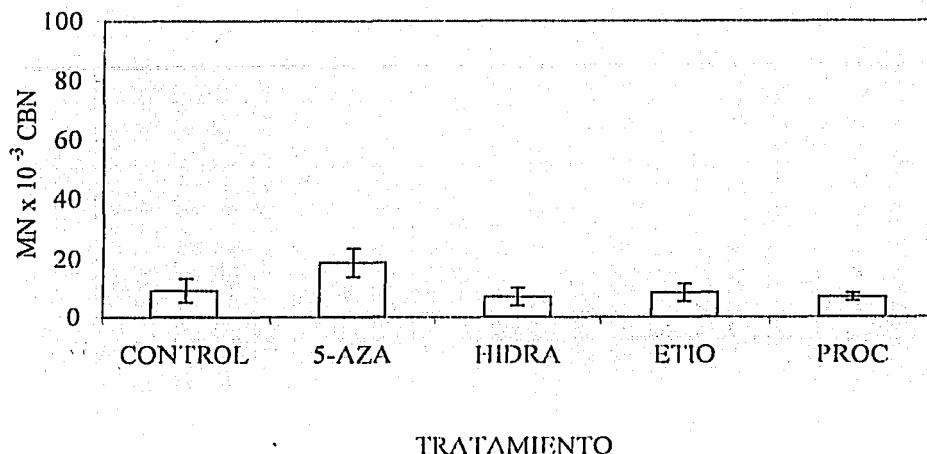


Figura 9- Efecto de varios agentes desmetilantes: 5-azacitidina (5-AZA; 10 μ M), hidralacina (HIDRA; 10 μ M), etionina (ETIO; 10 μ M) y procainamida (PROC; 10 μ M) sobre la frecuencia de micronúcleos (MN) inducida en linfocitos aislados. Las barras representan la media de al menos cuatro experimentos independientes y sus desviaciones estándar.

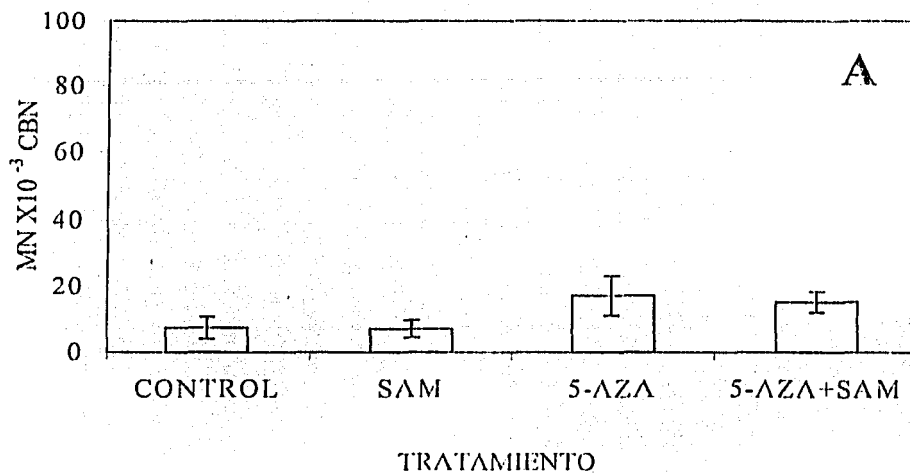
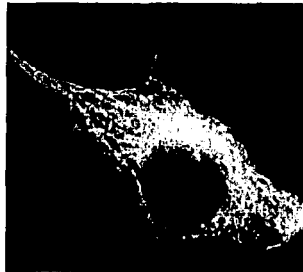
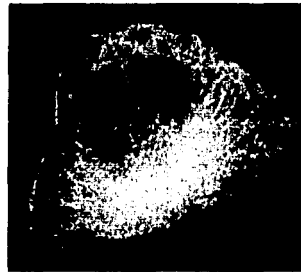


Figura 10- Efecto de la s-adenosil-L-metionina (SAM, 17 nM) sobre la frecuencia de micronúcleos (MN) inducida en linfocitos aislados por 5-azacitidina (5-AZA; 10 μ M).

CONTROL



SAM



ARSENITO DE SODIO



SAM + ARSENITO DE SODIO



Figura 11- Ejemplo de los tipos de morfología del citoesqueleto presentadas por las células ante los el tratamiento con arsenito de sodio, s-adenosil-L-metionina (SAM) y SAM más arsenito de sodio.

8. Discusión

El metabolismo de los grupos metilo es una pieza clave para el mantenimiento y control de una gran variedad de funciones celulares. Una de las moléculas principales que se forman durante este ciclo es SAM (Lu, 2000; Poirier et al., 2003). La importancia de SAM radica en ser prácticamente el único donador de grupos metilo disponible tanto en procariontes como en eucariontes, además este compuesto es indispensable para la transulfuración y aminopropilación de otras moléculas, lo cual hace que el número de reacciones químico-biológicas en las cuales está involucrado sea sólo superado por el ATP (Chiang et al., 1996; Lu, 2000). Cuando hay alteraciones en el metabolismo de los grupos metilo se induce una deficiencia en la biodisponibilidad de SAM cuyas consecuencias pueden llegar a ser tan graves como el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y neurológicas así como el cáncer y la diabetes (Paulsen y Ferguson-Smith, 2001). Las fallas en el metabolismo de los grupos metilo pueden ser originadas por defectos en las enzimas que participan en este proceso, por deficiencias nutricionales, o bien por la exposición a agentes químicos. Compuestos halogenados, anticonvulsivos, antimetabolitos como el metotrexate, la 5-AZA, la etionina, y metales como el zinc, el arsénico y el cadmio, son algunos de los agentes químicos que pueden modificar la disponibilidad de grupos metilo y de esta manera inducir algunas enfermedades relacionadas con deficiencias en grupos metilo (Poirier et al., 2003). Los mecanismos mediante los cuales estos agentes químicos inducen dichos efectos aún no están aclarados completamente, pero existen evidencias que indican que las deficiencias en componentes del metabolismo del grupos metilo causan cambios epigenéticos, como alteraciones en el estado de metilación del DNA, así como también un incremento en la frecuencia de daño estructural y numérico en el DNA, como rompimientos cromosómicos y MN, que pueden asociarse a enfermedades como el cáncer (Esteller y Herman, 2002). Por

ejemplo, el arsénico es un carcinógeno humano que utiliza al grupo metilo de SAM en su metabolismo, por lo que es capaz de reducir la biodisponibilidad de esta molécula para otros procesos biológicos y de inducir daño al DNA (Zhao et al., 1997). Otro ejemplo son los compuestos polihalogenados como el tetracloruro de carbono y las dioxinas, compuestos que son carcinogénicos y que causan alteraciones en la disponibilidad de SAM (Poirier et al., 2003).

Basados en lo anterior, el objetivo del trabajo fue analizar los efectos de la administración exógena de SAM en la frecuencia de MN inducida por NaAsO_2 y otros compuestos en linfocitos humanos tratados *in vitro* y determinar si tales cambios estaban o no relacionados con las alteraciones en las concentraciones intracelulares de SAM y la metilación del DNA. Además del NaAsO_2 se analizó el efecto del SOABZ, un benzimidazol carbamatado que altera el citoesqueleto de tubulina, la MMC y el CIS que son agentes alquilantes que producen rompimientos cromosómicos. Estos compuestos fueron probados tanto en cultivos de sangre entera como en linfocitos aislados. En los cultivos de linfocitos aislados también se analizó el efecto de CLC, un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos, y varios agentes desmetilantes como la 5-AZA, la etionina, la hidralazina y la procainamida.

Los resultados en cultivos de sangre completa mostraron que SAM redujo de manera significativa la frecuencia de MN en las células tratadas con NaAsO_2 , a diferencia de lo observado en aquellas tratadas con agentes alquilantes como la MMC y el CIS en las cuales SAM no fue capaz de reducir la frecuencia de MN. De manera interesante, los cultivos tratados con el SOABZ, inhibidor de la polimerización de tubulina, mostraron un

comportamiento muy similar al de los linfocitos tratados con NaAsO_2 y SAM. Actualmente no existen reportes acerca de la influencia de SAM sobre ninguno de los efectos del NaAsO_2 , aunque si los hay acerca del efecto protector del ácido fólico, un precursor de SAM, contra la toxicidad inducida por el NaAsO_2 y su metabolito metilado, el ácido dimetilarsínico (Ruan et al., 2000). Resulta interesante el hecho de que tanto el ácido fólico como el SAM muestren un efecto protector contra la toxicidad del NaAsO_2 , tomando en cuenta que la función de donar grupos metilos es exclusiva de SAM. Debido a que el ácido fólico es un precursor de SAM, es posible que el efecto protector del ácido fólico se deba a una mayor disponibilidad de SAM después de la administración del primero. Sin embargo, debido a que el ácido fólico es necesario para la síntesis de timina a partir de uracilo, también es posible que su efecto protector se deba a una recuperación de las reservas de timina (Choi y Mason, 2000). La disminución de timina en las células se ha asociado con un incremento en el porcentaje de rompimientos cromosómicos causados por la incorporación inapropiada de uracilo y no de timina en el DNA. Por otro lado, algunos estudios que señalan la importancia del estado nutricional para los efectos tóxicos del arsénico, como el realizado en Bangladesh (Anaware et al., 2002 y Rahman et al., 2001) que muestra que los individuos alimentados con dietas pobres y expuestos crónicamente a arsénico desarrollan más tempranamente lesiones en la piel y otros síntomas causados por arsénico, inclusive a concentraciones menores que las de otras poblaciones alimentadas con dietas más nutritivas, las cuales tuvieron menores efectos tóxicos provocados por el arsénico (Ruan et al., 2000). Si bien dicho estudio no analiza el papel específico de SAM o sus precursores en los efectos del arsénico, de manera indirecta sus resultados apoyan un posible efecto protector de SAM sobre la genotoxicidad del arsénico.

Para evaluar que el efecto protector de SAM no se debía a una interacción química extracelular que inactivara al NaAsO_2 , se realizaron ensayos de RNM. Estos análisis demostraron que no existe ningún tipo de interacción química entre SAM y NaAsO_2 en un medio extracelular, lo cual sugiere que SAM está involucrado activamente en la reducción de la frecuencia de MN inducida por el NaAsO_2 .

Otra posibilidad que debíamos descartar era la influencia de la proliferación celular en la frecuencia de MN en las células tratadas con SAM y los distintos agentes químicos utilizados. Los MN requieren de la división nuclear para su expresión (Tenech y Morley, 1986), de manera que si el SAM retardaba la proliferación de las células tratadas con NaAsO_2 o con SOABZ, la reducción en la frecuencia de MN observada en ambos casos podría deberse a una menor expresión del daño causado por ambos compuestos y no a un efecto protector del SAM. Sin embargo, la reducción en la frecuencia de MN en los cultivos tratados con NaAsO_2 estuvo acompañada de un aumento en la proliferación celular, mientras que el SOABZ no alteró la proliferación celular, como lo habíamos reportado anteriormente (Ramírez et al., 2001). Por otro lado, las células tratadas con MMC o CIS muestran una disminución en su proliferación y la administración de SAM no alteró estos resultados. Por lo que podemos concluir que la reducción de la frecuencia de MN en las células inducida por SAM en células tratadas con NaAsO_2 o con SOABZ no se debe a una disminución en la expresión del daño causada por alteraciones en la proliferación celular.

El siguiente objetivo fue evaluar si la metilación del DNA y los cambios en las concentraciones intracelulares de SAM podrían jugar algún papel en el efecto protector

observado. La evaluación de la concentración intracelular de SAM, sin embargo, demostró que los cambios en este parámetro por el tratamiento con NaAsO_2 son mínimos y los otros compuestos tampoco alteran las concentraciones intracelulares de SAM. La adición de SAM a los cultivos tratados con NaAsO_2 incrementa ligeramente la concentración intracelular de SAM, pero nuevamente de manera poco significativa.

Debido a que la determinación de la metilación global del DNA se debe hacer en células aisladas, antes de poder hacer estos experimentos se corroboró que los efectos observados en cultivos de sangre completa eran reproducibles en cultivos de linfocitos aislados. Los resultados mostraron que el efecto protector de SAM en linfocitos aislados y tratados con NaAsO_2 o SOABZ era similar al observado en sangre completa, de la misma manera SAM no redujo la frecuencia de MN en células tratadas con MMC o CIS.

Los resultados del análisis de 5-MDC mostraron que ninguno de los agentes probados alteró el porcentaje de citosinas metiladas a excepción de la 5-AZA (control positivo), efecto que fue reducido con la administración de SAM. El tratamiento con NaAsO_2 no indujo un estado de hipometilación global en el DNA, como ya se ha reportado en otros estudios (Okoji et al., 2002). Esto puede deberse a que tanto el tiempo de tratamiento como la concentración de NaAsO_2 fueron menores que en los estudios citados. Este análisis mostró que en nuestro sistema, los cambios en el estado global de metilación del DNA no están involucrados en la reducción de la frecuencia de MN observados en los cultivos a los cuales se les administró SAM. De hecho, estos cambios tampoco están relacionados con la inducción de MN como lo sugieren los resultados de los experimentos de los agentes desmetilantes. A excepción de la 5-AZA, ninguno de los agente desmetilantes del DNA,

que evaluamos, incrementó la frecuencia de MN en linfocitos aislados, aunque de manera muy discreta, además la adición de SAM a los cultivos tratados con 5-AZA no revertió la formación de MN. Es posible que el mecanismo por el cual la 5-AZA causa un ligero incremento en la frecuencia de MN no esté asociado a su capacidad desmetilante del DNA sino a otros mecanismos, como por ejemplo la interferencia con el funcionamiento de la topoisomerasa II (Stopper et al., 1993; Stopper et al 1995) induciendo rompimientos cromosómicos que pueden observarse como MN, además es importante resaltar que estos últimos resultados sobre la frecuencia de MN no pueden explicarse mediante las alteraciones en la metilación del DNA, ya que SAM fue capaz de restablecer en un 60% el porcentaje de 5-MDC en los cultivos tratados con 5-AZA, pero no redujo la frecuencia de MN en estos mismos cultivos, lo cual nuevamente sugiere que ambos eventos no están relacionados. Dado que ni el NaAsO₂ ni el SOABZ alteraron el porcentaje de 5-MDC, y que no existe una relación en los efectos de SAM sobre la hipometilación inducida por 5-AZA y la frecuencia de células micronucleadas inducidas por este compuesto, podemos concluir que los cambios en el estado de metilación global del DNA no están relacionados con la reducción en la frecuencia de MN inducida por SAM. Sin embargo, no se puede descartar que existan cambios en la metilación que afecten a regiones específicas de la cromatina o a un número reducido de genes, por lo que un estudio futuro debe explorar esta posibilidad. Por ejemplo, se sabe que la región centromérica de los cromosomas de mamíferos contiene secuencias alfa-satélite altamente repetitivas, este tipo de secuencias también se encuentran en otras regiones que no forman el centrómero y se ha sugerido que estas últimas se encuentran altamente metiladas lo que impide que se formen otros centrómeros funcionales en un mismo cromosoma (Ehrlich, 2002; Amor y Choo, 2002). Si estas secuencias son desmetiladas es posible que puedan funcionar como centrómeros e

inducir alteraciones en la segregación cromosómica en el momento de la división celular que incluso podrían observarse como MN.

Si el efecto protector de SAM sobre la inducción de MN por el NaAsO_2 no es resultado de alteraciones en el estado de metilación global del DNA ¿Qué otros mecanismos podrían estar involucrados? El NaAsO_2 es capaz de inducir el daño al DNA por distintos mecanismos, uno de los que se han propuesto son las alteraciones en la polimerización de los MT (Ramírez et al., 1997; Bernstam y Nriagu, 2000), interfiriendo con la segregación correcta de los cromosomas durante la anafase-telofase. Este es un mecanismo de inducción de MN que el NaAsO_2 comparte con el SOABZ, un inhibidor de la polimerización de MT que indujo MN y cuyo efecto también fue prevenido por la adición de SAM. Por lo que se evaluó si SAM era capaz de prevenir la formación de MN inducidos por un inhibidor clásico de la polimerización de MT, el CLC. Los resultados mostraron un incremento significativo en la frecuencia de MN después del tratamiento con CLC, en tanto que la frecuencia de MN en las células tratadas con CLC y SAM disminuyó significativamente. Esto sugería que el efecto protector de SAM podría estar regulado por la integridad de los MTs. Para corroborar esta posibilidad se realizaron ensayos de integridad y organización de MT en fibroblastos primarios de humano tratados con los tres agentes durante 2 h. Se decidió utilizar este tipo de células para facilitar el análisis de la integridad de los MTs ya que crecen fácilmente adheridas a la superficie de laminillas de cultivo evitando así una mayor manipulación de las células. Los resultados mostraron que tanto el NaAsO_2 como el SOABZ y el CLC incrementaron el número de células con alteraciones y desarreglos de los MTs, y que la administración de SAM redujo tal efecto, siendo mucho más evidente en los cultivos tratados con NaAsO_2 . En estas células se evaluó simultáneamente la frecuencia de

MN en cada uno de los tratamientos, encontrándose un incremento en el número de células con MN con los tres compuestos probados, y una disminución en la frecuencia de MN con la administración de SAM. De estos datos se pueden comentar varios puntos. Por un lado, el hecho de que la reducción en el número de células alteradas en su citoesqueleto de tubulina correlacione con la reducción en la frecuencia de MN tanto en fibroblastos humanos indica que estos eventos probablemente estén relacionados, de tal forma que al alterarse la dinámica de polimerización y despolimerización de los MT durante la anafase-telofase se pueden producir errores en la segregación cromosómica, lo cual traería como consecuencia el retraso de cromosomas y la formación de MN.

¿Cómo se explica la reducción de MN por SAM bajo esta perspectiva? Es probable que SAM sea capaz de proteger a los MTs directa o indirectamente de los efectos tóxicos del NaAsO₂, el SOABZ y el CLC, de tal forma que se permitiera la polimerización-despolimerización y de esta forma se redujera el número de células con alteraciones en la segregación cromosómica, lo que conllevaría a la reducción de eventos de retraso cromosómico y la generación de MN. Esta explicación se apoya en la aparición de MN tan sólo 2 h después del tratamiento de células cultivadas durante 24 h, hecho que sólo se puede explicar por alteraciones en la maquinaria de segregación mitótica en células que se encontraban en anafase-telofase, es decir durante la formación del huso mitótico o en la de segregación cromosómica, en el momento del tratamiento. También es interesante analizar el efecto de cada uno de los agentes de manera individual, ya que a pesar de que los tres inhiben la polimerización del citoesqueleto de tubulina, lo hacen con distintas capacidades, hecho que se puede evaluar indirectamente al analizar el número de células que cada uno altero y la capacidad de SAM para revertir estos efectos. Por un lado tenemos que el CLC

en todos los casos fue el que incrementó en mayor proporción la frecuencia de MN, y también el que indujo el mayor número de células con desarreglos del citoesqueleto, seguido por el NaAsO₂ y el SOABZ. La administración de SAM a pesar de ser capaz de reducir ambos efectos relacionados con el citoesqueleto, lo hizo de acuerdo a la cantidad de daño generado por cada tratamiento, siendo muy efectivo para reducir el daño inducido tanto por NaAsO₂ y por SOABZ, no así en los cultivos tratados con CLC.

¿Cómo puede SAM proteger la dinámica de despolimerización y polimerización durante la anafase-telofase de los MTs en presencia de los disruptores y de esta forma inhibir la formación de MN? Nuestros datos aún no son concluyentes al respecto, ya que no dan evidencias definitivas de que estos eventos estén sucediendo y de que sean los responsables de la reducción del daño observado como MN y de que al parecer SAM este protegiendo a las células de este tipo de daño. Sin embargo, se han reportado algunas evidencias que pueden ayudar a entender el papel de SAM en la protección de los MTs de manera directa e indirecta. Se sabe que durante la neurulación tanto la tubulina como la actina y los neurofilamentos requieren de la metilación para su buen ensamblaje y funcionamiento (Moephilus et al., 1997); por lo que en teoría requieren de SAM para estos eventos, de tal forma que podemos decir que al menos en el desarrollo embrionario, la tubulina requiere de SAM para su organización y funcionamiento. Por otro lado, se ha reportado la importancia del ácido fólico durante el desarrollo embrionario, principalmente durante la neurulación, ya que deficiencias en esta molécula provocan defectos del cierre de tubo neural, efectos que se encuentran muy relacionados con alteraciones en la capacidad migratoria de los neuroblastos, la cual a su vez depende directamente de citoesqueleto de tubulina y de los neurofilamentos. Por lo que no sería difícil relacionar que las reducciones

en ácido fólico provocan deficiencias en los niveles de SAM alterando las reacciones de transmetilación y con ello la estructura y funcionamiento de neurofilamentos y tubulina, e inhibiendo así la migración celular. Así, estos datos sugieren que el efecto protector de SAM puede estar relacionado con la metilación de la tubulina y de esta manera permitir la segregación cromosómica adecuada. La otra posibilidad directa, por la cual se podría entender el papel que está jugando SAM en la reducción de la frecuencia de MN, involucra la propiedad de SAM de actuar como un atrapador de radicales libres (Lieber, 2002), evitando la oxidación de distintas estructuras celulares. Existen reportes que indican que las cisteínas de la tubulina que forman puentes disulfuro son susceptibles a ser oxidadas y con ello se altera la formación y función normales de los MTs (Ladino et al., 2002). De tal forma que SAM podría evitar la oxidación de los MT inducida por el tratamiento, permitiendo así su buen funcionamiento durante la segregación cromosómica y evitando la generación de MN. Se sabe que el NaAsO_2 es capaz de inducir un estrés oxidativo en las células tratadas (Kitchin y Ahmad, 2003); sin embargo, no se tienen reportes de que el SOABZ o el CLC tengan esta capacidad oxidante.

Las hipótesis antes discutidas tanto de las alteraciones en la metilación, como de la oxidación de la tubulina involucran a SAM de manera directa y serían convincentes si se supiera que tanto el CLC, como el SOABZ o los benzimidazoles carbamatados, en general, fueran capaces de alterar la metilación de la tubulina o de inducir daño oxidativo. Sin embargo, actualmente no existe ningún reporte que avalen estos eventos. Otra posible explicación a los efectos que encontramos de SAM sobre el daño inducido por estos agentes involucra su participación de manera más indirecta, así como la de una proteína de choque térmico, Hsp70 (*Heat shock protein 70*). Se ha reportado que la sobre-expresión

de esta proteína es capaz de reducir la frecuencia de MN con cromosomas completos en células humanas expuestas a NaAsO₂ (Barnes et al., 2002), esta sobre-expresión también es la responsable de la resistencia que presentan algunas células al tratamiento con fármacos que alteran el citoesqueleto, como el CLC (Wettergren et al., 1995). Hsp70 requiere para su funcionamiento de la metilación (Wang et al., 1992) y entre sus múltiples funciones se encuentra la de ser una molécula facilitadora de la polimerización de la tubulina, principalmente cuando la célula se encuentra en una situación de estrés. Tomando en cuenta todos estos eventos, y el hecho de que SAM es capaz de reducir la frecuencia de células micronucleadas tratadas sólo por aquellos agentes que alteran la polimerización de la tubulina y de que puede donar su grupo metilo a Hsp70, se puede sugerir que la reducción de MN por el tratamiento con SAM sólo ocurre en aquellos agentes que someten a las células a un estrés a través de las alteraciones en la polimerización de la tubulina, modificando la dinámica del huso mitótico durante la anafase-telofase. Por lo que las células tratarán de mantener la dinámica, organización y función del huso mitótico independientemente del agente que cause tales alteraciones, hecho que dependerá de la disponibilidad de Hsp70 activa, por lo que en este momento se utilizarían más moléculas de SAM para la metilación de Hsp70 y así lograr proteger a la tubulina durante el estrés celular. Al agregar SAM a los cultivos, las células tratadas con NaAsO₂, SOABZ o CLC tendrían una mayor reserva de grupos metilo que podrían utilizar durante la formación de Hsp70 funcionales, manteniendo así la estructura del huso mitótico. Como se puede observar, en ningún momento se habla de que CLC o el SOABZ estén alterando el estado de metilación de las proteínas ni tampoco que estuvieran oxidándolas, simplemente están sometiendo a las células a un estrés, el cual de manera intrínseca involucra el uso de los grupo metilo para poder metilar a las proteínas que se van a encargar de la estabilización

del citoesqueleto. Además, esta hipótesis también puede explicar las diferencias en cuanto a la capacidad de SAM para reducir la frecuencia de MN, siendo menor en los cultivos tratados con CLC y mucho mejor en NaAsO₂ y SOABZ, correlacionando con la capacidad de estas sustancias de alterar la estructura de los MT. De tal forma, el CLC al ser mucho más potente para interactuar con la tubulina y alterar el arreglo de los MT, induce un mayor estrés, por lo que se requerirían más moléculas metiladas de Hsp70, evento que quizá agote las reservas de SAM, lo cual se refleje en la incapacidad de éste de reducir en gran proporción la frecuencia de células micronucleadas, lo que no sucedería en el caso del NaAsO₂ y del SOABZ.

9. Conclusiones

El presente trabajo demuestra que SAM revierte el daño expresado como MN en linfocitos humanos tratados *in vitro* tanto con NaAsO_2 como por otros agentes que alteraran la dinámica de polimerización y despolimerización de la tubulina, por lo que se plantea que el efecto protector de SAM está relacionado con el mantenimiento de esta dinámica. Además, este trabajo demuestra que este efecto protector sobre el daño expresado como MN no está asociado ni con las alteraciones en las concentraciones intracelulares de SAM ni con cambios en la metilación global del DNA. Sin embargo, aún falta por evaluar el posible papel de la metilación otras moléculas, como proteínas que podrían estar influyendo en la respuesta observada, sobre todo considerando el tiempo de exposición tan corto y el efecto protector tan marcado que mostró SAM.

A la fecha no existe ningún reporte acerca del efecto protector de SAM sobre la genotoxicidad inducida por algún xenobiótico. Considerando que alrededor de 200,000,000 de personas en el mundo están expuestas a los efectos tóxicos del arsénico, es importante desarrollar medidas para disminuir sus efectos tóxicos, entre ellos su genotoxicidad, y así evitar el desarrollo de enfermedades como el cáncer, las cuales son altamente frecuentes en estas poblaciones crónicamente expuestas. Si bien SAM ha mostrado un efecto protector en linfocitos humanos tratados con NaAsO_2 , aún no tenemos pruebas de que esto pueda ocurrir *in vivo* y mucho menos si pueden contrarrestar los efectos de una exposición crónica. Sin embargo, es interesante explorar nuevas alternativas para proteger a los individuos expuestos crónicamente a arsénico. Considero que este trabajo puede ser la base sólida de estudios futuros que tengan como objetivo el uso de SAM como agente protector de daño al DNA en individuos expuestos.

Por otro lado, el hecho de que SAM proteja a las células expuestas a distintos tratamientos que alteran la dinámica de polimerización de los microtúbulos nos abre una alternativa para poder entender el mecanismo por el cual SAM está actuando. Los resultados sugieren una conexión entre el daño al DNA (expresado como MN) y alteraciones en otras estructuras celulares (citoesqueleto), que sería un mecanismo indirecto por el cual inducir inestabilidad genética. Basada en este argumento considero que el trabajo tiene aportaciones importantes desde un enfoque celular, ya que da elementos para afirmar que el daño al DNA está íntimamente relacionado con los cambios que ocurren en estructuras celulares como el citoesqueleto y no es resultado solo de mutaciones, cambios en la secuencia y expresión de genes.

Finalmente solo hace falta enfatizar que este estudio muy probablemente será parte de una serie de estudios que trataran de encontrar soluciones para contrarrestar o prevenir el daño genético en seres humanos, por lo cual sus aplicaciones pueden ser ilimitadas.

APÉNDICE I

Evaluación de micronúcleos *in vitro*

El estudio del daño al DNA a nivel cromosómico es muy importante ya que estas alteraciones representan eventos fundamentales para el desarrollo de algunas enfermedades como el cáncer. Las evidencias disponibles sugieren que las anomalías cromosómicas son una consecuencia directa del daño al DNA. Dentro de estas alteraciones cromosómicas se encuentran los rompimientos, las translocaciones, la pérdida y mala segregación de los cromosomas. Las técnicas de citogenética clásica que evalúan este tipo de daño se basan en la observación y conteo de las aberraciones cuando la célula está en metafase, este acercamiento provee un análisis muy detallado, pero su complejidad y laboriosidad así como la pérdida cromosómica debida a artefactos técnicos han estimulado la validación de otras metodologías.

Alrededor de los años 70's Heddle (1973) propuso que una alternativa para la evaluación del daño cromosómico era el conteo de micronúcleos (MN), anteriormente vistos por los hematólogos quienes les dieron el nombre de cuerpos de Howell-Jolly siendo éstos pequeños cuerpos nucleares que se teñían con el colorante de Feulgen en reticulocitos humanos. Tiempo después se demostró que no sólo se podían realizar las evaluaciones de MN en células de médula ósea, sino que además se podían usar distintos tipos celulares que se encontraran en división.

Los MN se expresan en células en división y son estructuras celulares que se forman durante la telofase ya sea por la ruptura o pérdida de cromosomas durante la división mitótica o meiótica (Fenech, 2000). A este material cromosómico se le forma una envoltura

nuclear similar a la del núcleo durante la telofase y además pierde la estructura altamente compacta que se genera para poder formar cromosomas, por lo que se observa como un núcleo interfásico, pero en pequeño, de ahí su nombre de micronúcleo. Esta técnica es práctica y confiable para la evaluación tanto de la pérdida como de la ruptura cromosómica (Fenech, 2000).

Dado que los MN se expresan en células que han completado la división nuclear, es fundamental poder discernir aquellas células que se han dividido de las que no. Además, debido a la poca certeza del destino de los MN después de una división celular, es necesario distinguir aquellas células que han completado una división nuclear solamente. Se han propuesto distintas metodologías para evaluar MN en células que sólo han tenido un ciclo de división nuclear. La que ha sido adoptada por la mayoría de los investigadores de este campo es el bloqueo de la citosinesis por medio de un inhibidor de la polimerización de actina, la citocalasina B (Fenech y Morley, 1986). Con este método las células que han completado un ciclo de división son retenidas en un estado binucleado al bloquear el proceso de división citoplásmica o citocinesis por acción de la citocalasina B, y por son fácilmente identificadas al microscopio por su apariencia binucleada. Además esta técnica permite evaluar la cinética de proliferación celular, ya que dependiendo del número de núcleos que tenga una célula se puede saber si no se dividió (mononucleada), o si lo hizo una (binucleada) o más veces en cultivo (polinucleada).

A la fecha los estudios de Fenech et al (2003) han sido los que más auge han dado a la evaluación de MN como una metodología alternativa al análisis de aberraciones cromosómicas, siendo este grupo el que se ha dedicado en gran medida a la estandarización

de los métodos así como al establecimiento de los criterios para el desarrollo y análisis de MN.

A continuación describo los criterios más recientes que se han establecido para la evaluación de MN en células binucleadas, y los cuales se utilizaron en el presente trabajo.

Criterios para la identificación de células binucleadas (CBN)

- a) Las células deben contener dos núcleos de apariencia similar.
- b) Ambos núcleos deben estar íntegros y situados dentro del mismo citoplasma.
- c) Deben poseer un tamaño y patrones de tinción similares.
- d) Los núcleos pueden llegar a tocarse, pero nunca se evaluarán aquellos que estén sobrelapados.
- e) Los bordes citoplasmáticos deben estar íntegros.

Criterios para la evaluación de MN

- a) El diámetro del MN en linfocitos humanos varía de $1/16$ a un $1/3$ del diámetro promedio de los núcleos.
- b) No deben ser refringentes y deben ser fácilmente distinguibles de los artefactos.
- c) No deben estar conectados ni sobrelapados con ninguno de los núcleos.
- d) Generalmente tienen la misma intensidad que los núcleos, aunque esta a veces puede ser mayor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE 2

Métodos para evaluar la metilación del DNA

La metilación del DNA es resultado de la transferencia del grupo metilo de SAM a la posición 5 del anillo de purina de la citosina. Este evento ocurre en la mayoría de los organismos vivos (Bird et al., 1998). Diversos estudios han demostrado que la metilación del DNA juega un papel importante en la regulación de la expresión génica, y por consecuencia en la etiología de diversas patologías. Tanto la hipometilación global del DNA como la hipermetilación de regiones específicas que regulan la expresión de genes supresores de tumores se han asociadas con el desarrollo de cáncer (Jeltsch, 2002). Por lo que la cuantificación del estado de metilación global y específico del DNA es una herramienta importante para el estudio del cáncer y de otras enfermedades crónicas. Se han desarrollado distintas metodologías para tratar de evaluar los niveles de metilación de distintos tipos celulares, por ejemplo el uso de enzimas de restricción, la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), la secuenciación después de la exposición a bisulfito de sodio, la metilación específica de oligonucleótidos en microarreglos (MSO).

Modificación diferencial de citosinas por medio de bisulfito de sodio

Este método permite el análisis de la metilación del DNA en ciertas regiones. Se basa en la conversión de todas las citosinas no metiladas en timinas, en tanto que las citosinas metiladas permanecen sin ninguna modificación. Este método puede realizarse con cantidades pequeñas de DNA; sin embargo, su limitante es el diseño de iniciadores para DNA convertido por el bisulfito, una vez que se han diseñado estos iniciadores y que se han hecho los PCRs correspondientes, basta con secuenciar los productos para poder obtener

resultados más o menos confiables acerca de la posición y el número de las citosinas metiladas.

Metilación específica de oligonucleótidos en microarreglos (MSO)

Después del tratamiento con bisulfito de sodio, el DNA se utiliza como templado para una reacción de PCR en la que el uracilo es inmediatamente convertido en timina, los productos amplificados por PCR son marcados con fluorescencia y después hibridados a sondas de microarreglos de oligonucleótidos específicamente diseñadas para discriminar entre nucleótidos convertidos y no modificados en un sitio CpG. La cuantificación de la metilación del DNA necesita el establecimiento de curvas estandarizadas para MSO.

Cromatografía Líquida de Alta Presión

Los métodos de HPLC utilizados hasta hace algunos años eran muy poco prácticos, en el sentido que se utilizaban un gran volumen de reacción que finalmente diluía la muestra y era prácticamente imposible poderla evaluar de manera confiable, por lo que el uso del HPLC para la evaluación de la metilación del DNA se consideró como un método inadecuado. Sin embargo, en 1994 Wise y Hass desarrollaron un método de HPLC para determinar el porcentaje de 5-metilcitosinas en el cual se utiliza un pequeña cantidad de volumen de reacción, lo que evita la dilución de la muestra y permite el análisis de una concentración reducida de DNA (Wise y Hass, 1994). La ventaja de este método incluye el poder utilizar un número pequeño de células además de la disminución del tiempo de análisis, ya que este en vez de realizar en días se realiza en unas cuantas horas.

ESTA TESIS NO SALE
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Más recientemente, se han desarrollado dos metodologías que, aunque están a prueba, parecen revolucionar el campo de la metilación para la identificación de nuevos genes, estas son: la Hibridación de metilación diferencial y el escaneo genómico con puntos de restricción. La primera metodología combina el empleo de enzimas de restricción sensibles a metilación y la tecnología de microarreglos para permitir el tamizaje de varios miles de islas CpG de manera simultánea (Shi et al., 2003). La segunda se basa en electroforesis bi-dimensional.

APÉNDICE 3

Resonancia Nuclear Magnética

La resonancia nuclear magnética es una técnica de caracterización en la cual el ejemplar es colocado en un campo magnético y bombardeado con ondas de radio. Estas ondas de radio excitan a los núcleos de las moléculas a generar una cierta energía que es detectada por un receptor y traducida por un decodificador, el cual se llama algoritmo de la Transformada de Fourier. Se trata de una ecuación que traduce las señales emitidas por los núcleos en números que pueden ser analizados.

Cuando los núcleos de un átomo giran, o más bien resuenan, y crean un momento magnético (MM), por lo que cuando se les coloca dentro de un campo magnético homogéneo, los MMs se alinean con el campo que gira con cierta inclinación. Cuando las ondas de radio bombardean los núcleos que giran, éstos se inclinan aún más y a veces hasta cambian su posición en 180° . Cuando el MM es desviado del campo magnético aplicado, algunos de estos MMs son detectados en posición perpendicular (90°) al campo aplicado. Lo importante para poder analizar estructura química es saber que núcleos de diferentes átomos resuenan a distintas frecuencias, lo que quiere decir que para hacerlos cambiar de posición se debe bombardear un átomo de carbono con una onda de radio de frecuencia diferente a la de un átomo de hidrógeno. También quiere decir que átomos similares en diferentes entornos, como por ejemplo un hidrógeno unido a un oxígeno y un hidrógeno unido a un carbono, cambian de posición a distintas frecuencias. Observando a que frecuencia cambian de posición estos núcleos, se puede determinar como está compuesta la molécula, así como otras propiedades de la misma. ¿Por qué dos átomos similares en

distintos entornos resucnan en distintas frecuencias? Esto se debe a un fenómeno conocido como apantallamiento, que no es más que el efecto de la carga de los electrones sobre el campo magnético de los núcleos, que reduce la magnitud del mismo, ya que la frecuencia de resonancia de los núcleos depende de la intensidad del campo magnético que éstos tienen en su entorno ("sienten").

La mayor parte del aparato de resonancia es un gran "enfriador" que contiene dos líquidos extremadamente fríos: helio líquido (-269°C) y nitrógeno líquido (-195°C), el helio se encuentra en la parte más interna del aparato para enfriar una bobina superconductora que crea el campo magnético a -269°C y el nitrógeno líquido lo rodea para evitar que el helio se evapore demasiado rápido. Una vez introducida la muestra, esta se gira para lograr una muestra más uniforme antes del análisis. Cuando la muestra se encuentra disuelta, el solvente o parte del mismo debe ser deuterado, es decir que en la molécula del solvente haya átomos de deuterio en lugar de hidrógeno, el cual posee un protón y un neutrón. Esto es necesario para fijar el espectro en una frecuencia específica, de modo que el espectro no se desplace durante la adquisición de datos. Cuando la muestra se encuentra dentro de un campo magnético, fijo y girando, un generador de radiofrecuencia emite a la muestra una ráfaga corta de ondas de radio. Estas ondas son absorbidas y transmitidas desde la muestra hasta el receptor, el cual detecta la señal desde la muestra. Esta información es luego transmitida a la computadora adosada al RMN donde es traducida y analizada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

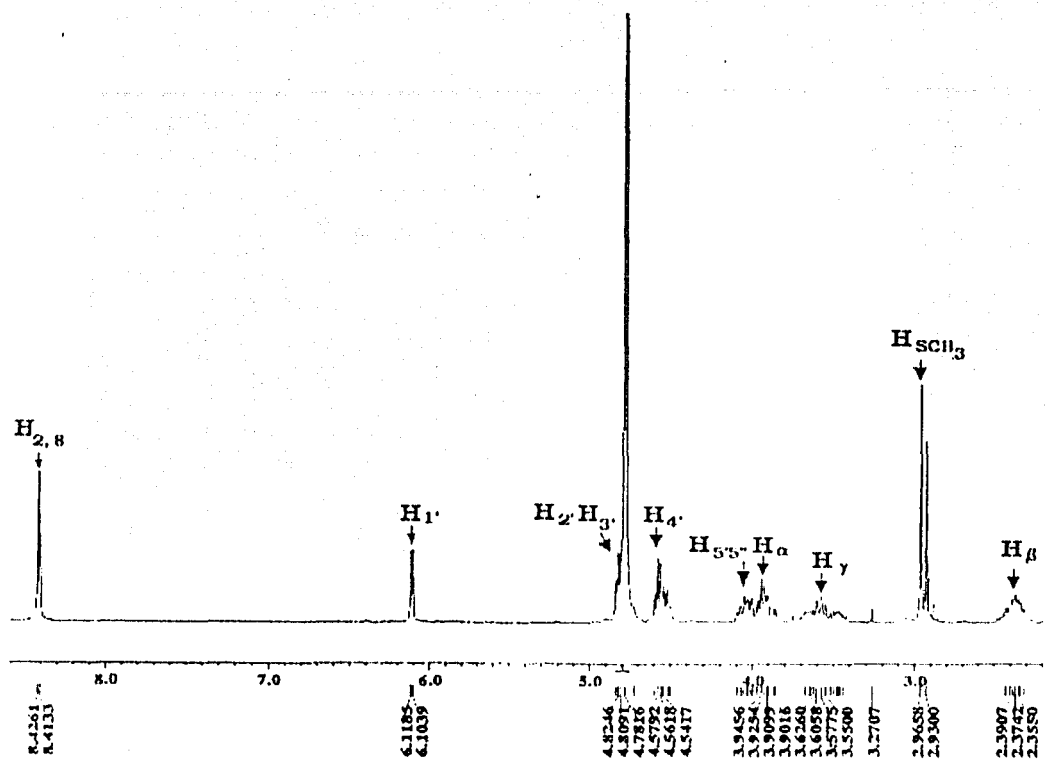


Fig 12.- Espectro de RNM¹H (300 MHz) de s-adenosil-L-metionina (SAM). Los desplazamientos (δ) se encuentran expresados en ppm con respecto al TMS.

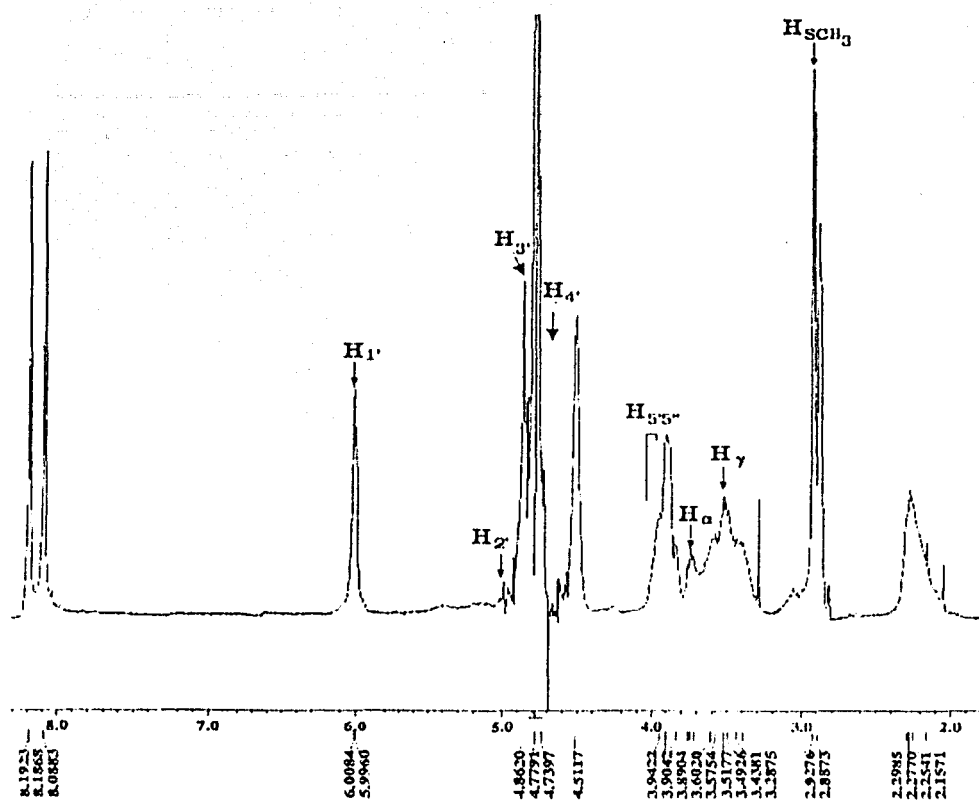


Fig 13.- Espectro de RNM^1H (300 MHz) de s-adenosil-L-metionina (SAM) en combinación con arsenito de sodio (NaAsO_2). Los desplazamientos (δ) se encuentran expresados en ppm con respecto al TMS.

APENDICE 4

Proliferación celular

Los experimentos llevados a cabo en los años 50 por Howard y Pelc (1953) establecieron los primeros métodos confiables para entender la dinámica del ciclo celular. Actualmente se ha avanzado mucho en el conocimiento de la cinética celular. De las metodologías más avanzadas para la evaluación de este parámetro se encuentra el marcaje con isótopos radiactivos, lo que nos permite estudiar la cinética celular en poblaciones asincrónicas, además de poder aplicarse al estudio de la proliferación *in vivo*. Otra herramienta que también ha sido muy utilizada para el estudio de la proliferación celular es la citofluorometría ya sea simple o de flujo, en la cual se detectan variaciones en la cantidad y contenido del DNA a lo largo del ciclo celular (Schwartz y Fernandez-Repollat, 2001).

En citogenética clásica, se ha utilizado el marcaje diferencial de las cromátides hermanas de cromosomas metafásicos, valiéndose del uso de un análogo de timina que es la bromodesoxiuridina (Craight-Holmes y Shaw, 1976). En presencia de este compuesto, las células en división son capaces de incorporarlo en su DNA, evento que después es revelado con el uso del colorante de Giemsa, de las laminillas se evalúan 100 metafases, de las cuales dependiendo del patrón de bandeo de las cromátides, se determina el porcentaje de las células que se han dividido una, dos o más veces en cultivo y de esto se obtiene un índice. Sin embargo, más recientemente con el desarrollo del bloqueo de la citocinesis se ha simplificado la evaluación de la cinética de proliferación celular, ya que la adición de citocalasina B permite analizar en la misma laminilla tanto el daño genotóxico (e.g. micronúcleos), como el daño en el ciclo celular (e.g. citostaticidad), ya que al bloquear el

proceso de citocinesis, los núcleos de las células hijas comparten el mismo citoplasma y contando el número de núcleos podemos diferenciar aquellas células que se dividieron una vez en cultivo (binucleada), dos (tetrannucleada), más de dos veces en cultivo (polinucleadas) de las que no se dividieron en cultivo (mononucleadas), con estos datos también se puede hacer un índice, conocido como el índice nuclear, para lo cual se utiliza la siguiente fórmula (Eastmond y Tucker, 1989): $NDI = (MI + 2MII + 3MIII + 4MIV) / N$, en donde MI a MIV representan el número de células con 1 a 4 núcleos y N representa el número total de células evaluadas. El empleo de esta fórmula provee información importante de los efectos citostáticos de un compuesto químico en particular, o de un agente físico o biológico, ayuda a identificar agentes xenobióticos que estimulan la proliferación celular (Fenech, 2000).

Porcentaje de linfocitos mono-, bi- y polinucleados, despues de tratamiento por 24 h con diferentes agentes químicos: A) Varias concentraciones de s-adenosyl-L-metionina (SAM) o arsenito de sodio (NaAsO₂, 10 μM) y ambos; B) mitomicina C (MMC), SAM, y ambos; C) cisplatino (CIS), SAM y ambos; D) sulfóxido de albendazol (SOABZ), SAM, y ambos.

A

Tratamiento	Mononucleada	Binucleadas	Polinucleadas
Control	13 ± 3	81 ± 2	5 ± 2
SAM 0.17 nM	21 ± 5	78 ± 4	3 ± 2
SAM 1.7 nM	21 ± 5	80 ± 1	4 ± 4
SAM 17 nM	14 ± 4	80 ± 4	5 ± 3
NaAsO ₂	56 ± 9	43 ± 9	1 ± 1
NaAsO ₂ + SAM 0.17 nM	49 ± 11	50 ± 10	1 ± 1
NaAsO ₂ + SAM 1.7 nM	30 ± 13	67 ± 11	4 ± 3
NaAsO ₂ + SAM 17 nM	32 ± 6	66 ± 5	2 ± 2

B

Tratamiento	Mononucleadas	Binucleadas	Polinucleadas
Control	15 ± 7	78 ± 6	7 ± 3
SAM 17 nM	16 ± 5	78 ± 2	4 ± 2
MMC 10 μM	74 ± 7	26 ± 7	0 ± 0
SAM + MMC	68 ± 9	32 ± 9	0 ± 1

C

Tratamiento	Mononucleadas	Binucleadas	Polinucleadas
Control	14 ± 8	77 ± 9	9 ± 4
SAM 17 nM	16 ± 8	74 ± 9	10 ± 4
CIS 10 μM	62 ± 7	36 ± 6	4 ± 2
SAM + CIS	59 ± 7	41 ± 7	0 ± 0

D

Tratamiento	Mononucleadas	Binucleadas	Polinucleadas
Control	21 ± 10	77 ± 9	3 ± 2
SAM 17 nM	16 ± 5	79 ± 1	6 ± 5
SOABZ 10 μM	22 ± 5	75 ± 3	3 ± 3
SAM + SOABZ	23 ± 5	75 ± 2	6 ± 0

Indice nuclear en linfocitos humanos después de tratamiento por 24 h con diferentes agentes químicos: A) Varias concentraciones de s-adenosyl-L-metionina (SAM) o arsenito de sodio (NaAsO_2 , 10 μM) y ambos; B) mitomicina C (MMC), SAM, y ambos; C) cisplatino (CIS), SAM y ambos; D) sulfóxido de albendazol (SOABZ), SAM, y ambos.

A

Tratamiento	Indice Nuclear
Control	1.970
SAM 0.17 nM	1.853
SAM 1.7 nM	1.876
SAM 17 nM	1.960
NaAsO_2	1.460
NaAsO_2 +SAM 0.17 nM	1.530
NaAsO_2 +SAM 1.7 nM	1.782
NaAsO_2 +SAM 17 nM	1.720

B

Tratamiento	Indice Nuclear
Control	1.990
SAM 17 nM	1.918
MMC 10 μM	1.260
SAM+ MMC	1.320

C

Tratamiento	Indice Nuclear
Control	2.040
SAM 17 nM	2.040
CIS 10 μM	1.471
SAM+ CIS	1.410

D

Tratamiento	Indice Nuclear
Control	1.851
SAM 17 Nm	1.960
SOABZ 10 μM	1.840
SAM+ SOABZ	1.894

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE 5

Mecanismo de acción de agentes desmetilantes

5-Azacitidina

La 5-azacitidina fue sintetizada hace unos 40 años, a partir de entonces se ha demostrado que tiene múltiples actividades de antimetabolito cuando se prueba en células cancerosas, siendo muy efectivo para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda. Sin embargo, pese a su gran efectividad es muy tóxica. El hallazgo de que la 5-azacitidina se incorporaba en el DNA inhibiendo la metilación de esta molécula, diversos estudios han demostrado la capacidad de esta sustancia de inducir la pérdida de la metilación de regiones completas del DNA y la subsiguiente activación de los genes que en ellas se encuentran, por lo que a la fecha se ha retomado su uso en la terapia contra cáncer (Christman, 2002). Uno de los mecanismos de acción de la 5-azacitidina es la inhibición de la metil-transferasa, previniendo de esta forma la metilación normal del DNA (Poirier et al., 2003). Además, exhibe actividad tumorigénica en animales (Pascale et al., 1991; Vesely, y Cihak, 1973) y transformante en células en cultivo (McGeedy et al., 1983; Landolph y Jones, 1982). A pesar de que no se ha encontrado ninguna evidencia que muestre que es capaz de alterar el metabolismo de los grupos metilo, revierte los efectos quimioprotectores de SAM en las etapas iniciales de la promoción de tumores de hígado inducidos por fenobarbital en ratas (Pascale et al., 1991).

Etionina

La etionina es un antimetabolito y antagonista de la metionina, interfiere con la incorporación de aminoácidos en las proteínas y con la utilización celular del ATP, así

como con todos los procesos de metilación. Produce cáncer de hígado en rata y ratones (Farber, 1963; Shinozuka et al., 1978; Hoover et al., 1986), fenómeno que se ha asociado a su capacidad de alterar la metilación del DNA y la regulación de la expresión génica, su capacidad carcinogénica es inhibida por metionina (Farber, 1963) e incrementada por dietas deficientes en grupos metilo (Shinuzoka et la., 1978). La etionina es un inhibidor competitivo de la metionina en la síntesis de SAM, especialmente en el hígado (Farber, 1963; Shivapurka y Poirier, 1985; Svardal et al., 1998), produce un ambiente de hipometilación en el hígado, tanto por la reducción de los niveles hepáticos de SAM, como por la acumulación de SAE, el cual es un inhibidor muy efectivo de varias reacciones dependientes de SAM. El tratamiento crónico con etionina provoca hipometilación de DNA (Shivapurkar et al., 1984; Kanduc et al., 1988).

Hidralazina y procainamida

Tanto la hidralazina como la procainamida, dos fármacos utilizados como antihipertensivos y asociados con el desarrollo de una enfermedad autoinmune similar al lupus, inhiben la metilación del DNA e inducen autoreactividad en líneas celulares de linfocitos T (Quddus et al., 1993). La hidralazina causa el desarrollo de anticuerpos antinucleares en el 50% de los pacientes que la consumen y en un 10% desarrollo de una enfermedad parecida al lupus, en tanto que la procainamida utilizada por un año anticuerpos antinucleares causa en el 90% de los que la consumen y enfermedad parecida al lupus en 13%. Ambos fármacos inhiben la metilación del DNA, lo que favorece un incremento en la expresión de ciertos genes de las células T, provocando la autoinmunidad. El estado de hipometilación del DNA correlaciona con el incremento en los niveles de función del linfocito asociada al antígeno (LFA-1)3.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11. Referencias

- ionine synthetase isozymes in the liver of tumor-bearing mice. *J Biochem*, 90(2): 571-574.
- s. *J Biochem*, 293 (Pt 2):481-486
- Amor DJ, Choo KH.(2002) Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet*, 71(4):695-714.
 - Anawar H.M., Akai J., Mostofa K.M., Safiullah S., Tareq S.M. (2002) Arsenic poisoning in groundwater: health risk and geochemical sources in Bangladesh. *Environ Int*, 27(7):597-604.
 - Axelrod J. (1971) Biochemical pharmacology of catecholamines and its clinical implications. *Trans Am Neurol Assoc*, 96:179-86.
 - Barcelo H.A., Wiemeyer J.C., Sagasta C.L., Macias M., Barreira J.C. (1990) Experimental osteoarthritis and its course when treated with S-adenosyl-L-methionine. *Rev Clin Esp*, 187(2):74-78.
 - Barnes J.A., Collins B.W., Dix D.J., Allen J.W. (2002) Effects of heat shock protein 70 (Hsp70) on arsenite-induced genotoxicity. *Environ Mol Mutagen*, 40(4):236-42
 - Bernstam L., Nriagu J. (2000) Molecular aspects of arsenic stress. *J Toxicol Environ Health; Part B*, 3 : 293- 322.- Bird A. (1992) The essentials of DNA methylation. *Cell*, 70(1):5-8
 - Blount B.C., Mack M.M., Wehr C.M., MacGregor J.T., Hiatt R.A., Wang G., Wickramasinghe S.N., Everson R.B., Ames B.N. (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(7):3290-5
 - Bottiglieri, T., Hyland, K. y Reynolds, E.H. (1994) The clinical potential of adomethionine (S- adenosylmethionine) in neurological disorders. *Drugs*, 48(2):137-152.

- bedside--molecular bass of a pleiotrophic molecule. *Am J Clin Nutr*, 76(5):1151S-1157S
- Boulanger-Gouaille, C. (1999) Focus on homocystein. Springer Verlag, France.
 - Borsook H., Dubnoff W.J. (1942) On the role of the oxidation in the methylation of guanidoacetic acid. *J Biol Chem*, 171: 363-375.
 - Brada Z., Bulba S., Altman N.H.(1976) The influence of DL-methionine on the metabolism of S-adenosylethionine in rats chronically treated with DL-ethionine. *Cancer Res* , 36(5):1573-1579.
 - Bremer J., Greenberg D. (1961) Methyltrasferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin. *Biochim Biophys Acta*, 46: 205-216.
- :7-14
- Butterworth C.E. Jr, Hatch K.D., Gore H., Mueller H., Krumdieck C.L. (1982) Improvement in cervical dysplasia associated with folic acid therapy in users of oral contraceptives. *Am J Clin Nutr*, 35(1):73-82.
 - Cantoni G.L. (1953) S-adenosylmethionine; a new intermediate formed enzymatically from L-methionine ans ATP. *J Biol Chem*, 204: 403-416.
 - Cantoni G.L. (1956) Enzymatic mecanismes and biological significance of transmethylation reactions. En *Proceedings of the Third International Congress of Biochemistry* (ed C. Liebecq) Academic Press, NY: 233-237.
 - Cantoni G.L. (1960) Onium compound and their biological significance. En *Comparative Biochemistry* (Eds. M. Florkin y H.S. Mason) Academic Press, 181-241.
 - Cantoni G.L. (1977) S-adenosylmethionin: present status and future prespectives. En *The Biochemistry of Adenosylmethionine* (cde. F. Salvatores, E. Borek, H. G. Williams-Ashman y F. Schlenk), Columbia University Press, New York, 557-577.

- Chiang, P.K., Gordon, R.K., Tal, J., Zeng, G.C., Doctor, B.P., Pardhasaradhi, K. and McCann, P.P (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB*, 10:471-479.
- Choi S.W., Mason J.B. (2000). Folate and carcinogenesis: An integrated Scheme. *Am Soc Nutr Sci* 129-132.
- Cai J., Mao Z., Hwang J.J, y Lu SC. (1998) Differential expression of methionine adenosyltransferase genes influences the rate of growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, 58(7):1444-50.
- Cedar H., Verdine G.L. (1999) Gene expression. The amazing demethylase. *Nature*, 397(6720):568-569
- Cimino M., Vantini G., Algeri S., Curatola G., Pezzoli C., Stramentinoli G. (1984) Age-related modification of dopaminergic and beta-Adrenergic receptor system: restoration to normal activity by modifying membrane fluidity with S-adenosylmethionine. *Life Sci*, 34(21):2029-2039.
- Cravo M.L., Pinto A.G., Chaves P., Cruz J.A., Lage P., Nobre Leitao C., Costa Mira F. (1998) Effect of folate supplementation on DNA methylation of rectal mucosa in patients with colonic adenomas: correlation with nutrient intake. *Clin-Nutr*, 17(2):45-49.
- Christman J.K. (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21(35):5483-95.
- Cornacchia E., Golbus J., Maybaum J., Strahler J., Hanash S., Richardson B. (1988) Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J Immunol*, 140(7):2197-200.
- Counts J.L., Sarmiento J.L., Harbison M.L., Downing J.C., McClain R.M., Goodman J.L. (1996) Cell proliferation and global methylation status changes in mouse liver after

phenobarbital and/or choline-devoid, methionine-deficient diet administration. *Carcinogenesis*, 17(6):1251-1257.

- Cox R., Irving C.C. (1977) Inhibition of DNA methylation by S-adenosylmethionine with the production of methyl-deficient DNA in regenerating rat liver. *Cancer Res*, 37(1):222-225.

- Craight-Holmes A.P., Shaw M.W. (1976) Cell cycle analysis in asynchronous cultures using the BdR-Hoechst technique. *Exp Cell Res*, 102: 232-239.

- De La Rosa J., Ostrowski J., Hryniewicz M.M., Kredich N.M., Kotb M., LeGros H.L. Jr, Valentine M., Geller A.M. (1995) Chromosomal localization and catalytic properties of the recombinant alpha subunit of human lymphocyte methionine adenosyltransferase. *J Biol Chem*, 270(37):21860-21868 .

- Delle Chiaie R., Pancheri P., Scapicchio P. (2002) Efficacy and tolerability of oral and intramuscular S-adenosyl-L-methionine 1,4-butanedisulfonate (SAMe) in the treatment of major depression: comparison with imipramine in 2 multicenter studies. *Am J Clin Nutr*, 76(5):1172S-1176S.

- Duce A.M., Ortiz P., Cabrero C., Mato J.M. (1988) S-adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis. *Hepatology*, 8(1):65-68.

- Eastmond D.A., Tucker J.D. (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ Mol Mutagen*, 13(1):34-43

- Esteller M., Herman J.G. (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol*, 196: 1-7.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Ehrlich M. (2002) DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J Nutr*, 132(8 Suppl):2424S-2429S.
- Farber, E. (1963). Ethionine Carcinogenesis. *Adv. Cancer Res*, 7: 383-474.
- Feinberg, A.P. (2000). DNA methylation, genomic imprinting. En *DNA methylation and cancer*. P.A. Jones y P.K. Vogt (Edits). Springer.
- Fenech M., Morley A.A. (1986) Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res*, 161(2):193-198. *Carcinogenesis*, 10(7):1183-1192.
- Fenech, M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, 455: 81-95.
- Fenech, M. (2001) The role of Folic acid and Vitamin B₁₂ in genomic stability of human cells. *Mutat Res*, 475: 57-67.
- Ferguson, A.T., Vertino, P.M., Spitzner, J.R., Baylin, S.B., Muller, M.T., and Davidson N.E. (1997). Role of estrogen receptor gene demethylation and DNA methyltransferase. DNA adduct formation in 5-aza-2' deoxycytidine-induced cytotoxicity in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 272: 32260-32366.
- Fetrow C.W., Avila J.R.(2001) Efficacy of the dietary supplement S-adenosyl-L-methionine. *Ann Pharmacother*, 35(11):1414-1425.
- Finkelstein J.D., Martin J.J. (2000) Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol*, 32(4):385-389.
- Friedel H.A., Goa K.L., Benfield P. (1989) S-adenosyl-L-methionine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in liver dysfunction and affective disorders in relation to its physiological role in cell metabolism. *Drugs*, 38(3):389-416.

- Garcea R., Daino L., Pascale R., Simile M.M., Puddu M., Ruggiu M.E., Seddaiu M.A., Satta G., Sequenza M.J., Feo F. (1989) Protooncogene methylation and expression in regenerating liver and preneoplastic liver nodules induced in the rat by diethylnitrosamine: effect of variations of S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio. *Carcinogenesis*, 10(7):1183-1192.
- Gebhart E., Arutyunyan R.M. (1991) *Anticlastogens in Mammalian and Human Cells*. Springer-Verlag, Germany, 125 pp.
- German D.C., Bloch C.A., Kredich N.M. (1983) Measurements of S-adenosylmethionine and L-homocysteine metabolism in cultured human lymphoid cells. *J Biol Chem*, 258(18):10997-11003.
- Gehrke C.W., McCune R.A., Gama-Sosa M.A., Ehrlich M., Kuo K.C. Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of major and modified nucleosides in DNA. *J Chromatogr*, 301(1):199-219.
- Giovannucci E., Stampfer M.J., Colditz G.A., Rimm E.B., Trichopoulos D., Rosner B.A., Speizer F.E., Willett W.C. (1993) Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer Inst*, 85(11):875-84 Comment in: *J Natl Cancer Inst*, 85(11):846-848.
- Gonzalvo M.L., Jones P.A. (1997) Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res*, 386(2):107-118.
- Handler P., Dann W.J. (1942) Inhibition of growth by nicotinamide. *J Biol Chem*, 146: 357-368.
- Healy S.M., Casarez E.A., Ayala-Fierro F., Aposhian H. (1998) Enzymatic methylation of arsenic compounds. V. Arsenite methyltransferase activity in tissues of mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 148(1):65-70.

- Heddle J.A. (1973) A rapid in vitro test for chromosomal damage. *Mutat Res*, 18: 187-190.
- Heimburger D.C., Alexander C.B., Birch R., Butterworth C.E. Jr, Bailey W.C., Krundieck C.L. (1988) Improvement in bronchial squamous metaplasia in smokers treated with folate and vitamin B12. Report of a preliminary randomized, double-blind intervention trial. *JAMA*, 259 (10):1525-1530.
- Hendrich B., Bird A. (2000) mammalian methyltransferases and methyl-CpG-Binding domains: Proteins involved in DNA methylation. En DNA methylation and cancer. P.A. Jones y P.K. Vogt (Edits). Springer.
- Hershfield M.S., Kredich N.M. (1980) Resistance of an adenosine kinase-deficient human lymphoblastoid cell line to effects of deoxyadenosine on growth, S-adenosylhomocysteine hydrolase inactivation, and dATP accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77(7):4292-4296.
- Hirata F., Axelrod J. (1980) Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science*, 209(461):1082-1090.
- Hoover K.L., Lynch P.H., Poirier L.A. (1984) Profound postinitiation enhancement by short-term severe methionine, choline, vitamin B12, and folate deficiency of hepatocarcinogenesis in F344 rats given a single low-dose diethylnitrosamine injection. *J Natl Cancer Inst*, 73(6):1327-1336.
- Hoover K.L., Hyde C.L., Wenk M.L., Poirier L.A. (1986) Ethionine carcinogenesis in CD-1, BALB/c and C3H mice. *Carcinogenesis*, 7(7):1143-1148.
- Horikawa S., Tsukada K. (1991) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding the human liver S-adenosylmethionine synthetase. *Biochem Int*, 25(1):81-90.

- Horikawa S., Tsukada K. (1992) Molecular cloning and developmental expression of a human kidney S-adenosylmethionine synthetase. FEBS Lett, 312(1):37-41.
- Howard A., Pelc S.R. (1953) Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity, 6: 261-273.
- Jacob R.A., Gretz D.M., Taylor P.C., James S.J., Pogribny I.P., Miller B.J., Henning S.M., Swendseid M.E. (1998) Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. J Nutr, 128(7):1204-12
- Jeltsch A. (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. ChemBiochem, 3(4):274-293
- Johanning G.L., Heimburger D.C., Piyathilake C.J. (2002) DNA methylation and diet in cancer. J Nutr 132(12):3814S-3818S.
- Jones P.A., Laird P.W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. Nat Genet, 21(2):163-167.
- Kanduc D., Ghoshal A., Quagliaricello E., Farber E. (1988) DNA hypomethylation in ethionine-induced rat preneoplastic hepatocyte nodules. Biochem Biophys Res Commun, 150(2):739-744.
- Kitchin K.T., Ahmad S. (2003) Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. Toxicol Lett ;137(1-2):3-13.
- Kolb M., Geller A.M. (1993) Methionine adenosyltransferase: structure and function. Pharmacol Ther, 59(2):125-143.
- Lacey, E. (1990) Mode of action of benzimidazoles. Parasitol Today, 6(4): 112-115.
- Ladino C.A., O'Connor C.M. (1992) Methylation of atypical protein aspartyl residues during the stress response of HeLa cells. J Cell Physiol, 153(2):297-304.

- Landolph J.R., Jones P.A. (1982) Mutagenicity of 5-azacytidine and related nucleosides in C3H/10T 1/2 clone 8 and V79 cells. *Cancer Res*, 42(3):817-823.
- Lei H., Oh S.P., Okano M., Juttermann R., Goss K.A., Jaenisch R., Li E. (1996) De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development*, 122(10):3195-3205.
- Lieber, CS (2002). S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. *Am J Clin Nutr* 76: 1183S-1187S.
- Lu, S.C. (2000) S-adenosyl-L-methionine. *Int J Biochem Cell Biol*, 32: 391-395.
- Lu S.C. (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J*, 13(10):1169-1183.
- Mass M.J., Wang L. (1997) Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res*, 386(3):263-277.
- Mato J.M., Corrales F.J., Lu S.C., Avila M.A. (2002) Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB J*, 16(1):15-26.
- Mato J.M., Corrales F.J., Lu S.C., Avila M.A. (2002) Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB J*, 16(1):15-26.
- McGeedy M.L., Jhappan C., Ascione R., Vande Woude G.F. (1983) In vitro methylation of specific regions of the cloned Moloney sarcoma virus genome inhibits its transforming activity. *Mol Cell Biol*, 3(3):305-314.
- Moeophuli S.R., Klein N.W., Baldwin, M.T. y Krider, H.M. (1997) Effects of methionine on the cytoplasmic distribution of actin and tubulin during neural tube closure in rat embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(2):543-548.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Molinoff PB, Axelrod J.(1971) Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem*, 40:465-500.
- Morana A., Di Lernia I., Carten M., De Rosa R., De Rosa M. (2000) Synthesis and characterisation of a new class of stable S-adenosyl-L-methionine salts. *Int J Pharm*, 194(1):61-68.
- Mudd S.H., Poole J.R. (1975) Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism*, 24(6):721-735.
- Okoji R.S., Yu R.C., Maronpot R.R., Froines J.R. (2002) Sodium arsenite administration via drinking water increases genome-wide and Ha-ras DNA hypomethylation in methyl-deficient C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* 23(5):777-85.
- Osman E., Owen J.S., Burroughs A.K. (1993) Review article: S-adenosyl-L-methionine-- a new therapeutic agent in liver disease? *Aliment Pharmacol Ther*, 7(1):21-28.
- Okano M., Xie S., Li E. Dnm2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 26(11):2536-2540.
- Pascale R.M., Simile M.M., De Miglio M.R., Nuftris A., Daino L., Seddaiu M.A., Rao P.M., Rajalakshmi S., Sarma D.S., Feo F. (1995) Chemoprevention by S-adenosyl-L-methionine of rat liver carcinogenesis initiated by 1,2-dimethylhydrazine and promoted by orotic acid. *Carcinogenesis*, 16(2):427-430.
- Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR, Feo F. (2002) Chemoprevention of hepatocarcinogenesis: S-adenosyl-L-methionine. *Alcohol*, 27(3):193-198.
- Pascale R., Simile M.M., Ruggiu M.E., Seddaiu M.A., Satta G., Sequenza M.J., Daino L., Vannini M.G., Lai P., Feo F.(1991) Reversal by 5-azacytidine of the S-adenosyl-L-methionine-induced inhibition of the development of putative preneoplastic foci in rat liver carcinogenesis. *Cancer Lett*, 56(3):259-265.

- Paulsen M., Ferguson-Smith A.C. (2001) DNA methylation in genomic imprinting, development and disease. *J Pathol*, 195: 97-110.
- Pfeifer G.P., Tang M., Denissenko M.F. (2000) Mutation hotspots and DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 249:1-19.
- Poirier, L.A. (1994) Methyl group deficiency in hepatocarcinogenesis. *Drug Metab Rev*, 6: 185-199.
- Poirier L.A.(2002) The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. *J Nutr*, 132(8 Suppl):2336S-2339S.
- Poirier L.A., Wise C.K., Delongchamp R.R., Sinha R. (2001) Blood determinations of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and homocysteine: correlations with diet. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10(6):649-655.
- Poirier LA, Herrera LA, Wise C. (2003). On the chemical causation of methyl deficiency and its attendant pathologies. *Regulatory Research Perspectives Journal*, 3:1-37. www.fda.gov/nctr/science/journals/text/vol3iss1/rrp0103.htm
- Qudus J., Johnson K.J., Gavalchin J., Amento E.P., Chrisp C.E., Yung R.L., Richardson B.C. (1993) Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngenic mice. *J Clin Invest*, 92(1):38-53
- Rahman M.M., Chowdhury U.K., Mukherjee S.C., Mondal B.K., Paul K., Lodh D., Biswas B.K., Chanda C.R., Basu G.K., Saha K.C., Roy S., Das R., Palit S.K., Quamruzzaman Q., Chakraborti D. (2001) Chronic arsenic toxicity in Bangladesh and West Bengal, India--a review and commentary. *J Toxicol Clin Toxicol* , 39(7):683-700.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Ramirez, P., Eastmond, D.A., Laclette, J.P. and Ostrosky-Wegman, P. (1997) Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat Res*, 386(3):291-298.
- Ramirez T., Benitez-Bribiesca L., Ostrosky-Wegman P., Herrera L.A.(2001) In vitro effects of albendazole and its metabolites on the cell proliferation kinetics and micronuclei frequency of stimulated human lymphocytes. *Arch Med Res*, 32(2):119-22.
- Ray J.S., Harbison M.L., McClain R.M., Goodman J.I. (1994) Alterations in the methylation status and expression of the raf oncogene in phenobarbital-induced and spontaneous B6C3F1 mouse liver tumors. *Mol Carcinog*, 9(3):155-66.
- Refsum H., Ueland P.M., Nygaard O., Vollset S.E. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med*, 49:31-62.
- Riggs A.D., Jones P.A. (1993) 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res*, 40:1-30.
- Rizwana R., Hahn P.J.(1999) CpG methylation reduces genomic instability. *J Cell Sci*, 112 (Pt 24):4513-4519.
- Robertson K.D., Wolffe A.P. (2000) DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*, 1(1):11-19.
- Ruan Y., Peterson M.H., Wauson E.M., Waes J.G., Finnell R.H., Vorce R.L. (2000) Folic acid protects SWV/Finn embryo fibroblasts against arsenic toxicity. *Toxicol Lett*, 117(3):129-137.
- Stallcup M.R. (2001) Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene*, 20(24):3014-3020.
- Sewalt R.G., Lachner M., Vargas M., Hamer K.M., den Blaauwen J.L., Hendrix T., Melcher M., Schweizer D., Jenuwein T., Otte A.P. (2003) Selective interactions between

vertebrate polycomb homologs and the SUV39H1 histone lysine methyltransferase suggest that histone H3-K9 methylation contributes to chromosomal targeting of Polycomb group proteins. *Mol Cell Biol*, 22(15):5539-5553.

- Schinstine M., Iacovitti L. (1997) 5-Azacytidine and BDNF enhance the maturation of neurons derived from EGF-generated neural stem cells. *Exp Neurol*, 144(2):315-325.

- Schwartz A., Fernandez-Repollet E. (2001) Quantitative flow cytometry. *Clin Lab Med*, 21(4):743-61.

- Shi H., Maier S., Nimmrich I., Yan P.S., Caldwell C.W., Olek A., Huang T.H. (2003) Oligonucleotide-based microarray for DNA methylation analysis: Principles and applications. *J Cell Biochem*, 88(1):138-143.

- Shinozuka H., Lombardi B., Sell S., Iammarino R.M. (1978) Enhancement of DL-ethionine-induced liver carcinogenesis in rats fed a choline-devoid diet. *J Natl Cancer Inst*, 61(3):813-817.

- Shivapurkar N., Poirier L.A. (1985) Levels of S-adenosylmethionine and S-adenosylethionine in four different tissues of male weanling rats during subchronic feeding of DL-ethionine. *Biochem Pharmacol*, 34(3):373-375.

- Shivapurkar N., Wilson M.J., Poirier L.A. (1984) Hypomethylation of DNA in ethionine-fed rats. *Carcinogenesis*, 5(8):989-992.

- Stolzenberg-Solomon R.Z., Albanes D., Nieto F.J., Hartman T.J., Tangrea J.A., Rautalahti M., Schlub J., Virtamo J., Taylor P.R. (1999) Pancreatic cancer risk and nutrition-related methyl-group availability indicators in male smokers. *J Natl Cancer Inst*, 91(6):535-541.

- Stopper H., Korber C., Schiffmann D., Caspaty W.J. (1993) Cell-cycle dependent micronucleus formation and mitotic disturbances induced by 5-azacytidine in mammalian cells. *Mutat Res*, 300: 165-177.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Stopper H., Korber C., Gibis P., Spencer D.K., Caspary W.J. (1995) Micronuclei induced by modulators of methylation: analogs of 5-azacytidine. *Carcinogenesis*, 16: 1647-1650.
- Stramentinoli G., Pezzoli C., Galli-Kienle M. (1979) Protective role of S-adenosyl-L-methionine against acetaminophen induced mortality and hepatotoxicity in mice. *Biochem Pharmacol*, 28(24):3567-3571.
- Struys E.A., Jansen E.E., De Meer K., Jakobs C. (2000) Determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma and cerebrospinal fluid by stable-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 46(10):1650-1656.
- Thomas T.J., Messner R.P. (1986) Effects of lupus-inducing drugs on the B to Z transition of synthetic DNA. *Arthritis Rheum*, 29(5):638-645.
- Tabor C.W., Tabor H. (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem*, 53:749-790.
- Thomas T, Thomas TJ.(2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*, 2001 58(2):244-258.
- Trouba K.J., Wauson E.M., Vorce R.L. (2000) Sodium arsenite inhibits terminal differentiation of murine C3H 10T1/2 preadipocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 168(1):25-35.
- Trouba K.J., Wauson E.M., Vorce R.L. (2000) Sodium arsenite-induced dysregulation of proteins involved in proliferative signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*, 164(2):161-170.
- Turchetti V., Bellini M.A., Leoncini F., Petri F., Trabalzini L., Guerrini M., Forconi S. (2000) Blood viscosity and red cell morphology in subjects suffering from cirrhosis before and after treatment with S-adenosyl-L-methionine (SAM). *Clin Hemorheol Microcirc* 2000;22(3):215-221.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Ubagai T., Lei K.J., Huang S., Mudd S.H., Levy H.L., Chou J.Y. (1995) Molecular mechanisms of an inborn error of methionine pathway. Methionine adenosyltransferase deficiency. *J Clin Invest*, 96(4):1943-1947.
- Vance D.E., de Kruijff B. (1980) The possible functional significance of phosphatidylethanolamine methylation. *Nature*, 1980 Nov 20;288(5788):277-9
- Varela-Morciras G., Alonso-Aperte E., Rubio M., Gasso M., Deulofeu R., Alvarez L., Caballeria J., Rodes J., Mato J.M. (1995) Carbon tetrachloride-induced hepatic injury is associated with global DNA hypomethylation and homocysteinemia: effect of S-adenosylmethionine treatment. *Hepatology*, (4 Pt 1):1310-1305.
- Vesely J., Cihak A. (1973) High-frequency induction in vivo of mouse leukemia in AKR strain by 5-azacytidine and 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Experientia*, 29(9):1132-1133.
- Wainfan E., Poirier L.A (1992) Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression.. *Cancer Res*, 52(7 Suppl):2071s-2077s.
- Wainfan E., Dizik M., Stender M., Christman J.K. (1989) Rapid appearance of hypomethylated DNA in livers of rats fed cancer-promoting, methyl-deficient diets. *Cancer Res*, 49(15):4094-4097.
- Walkey C.J., Yu L., Agellon L.B., Vance D.E. (1998) Biochemical and evolutionary significance of phospholipid methylation. *J Biol Chem*, 273(42):27043-27046.
- Wang C., Lin J.M., Lazarides E.(1992) Methylations of 70,000-Da heat shock proteins in 3T3 cells: alterations by arsenite treatment, by different stages of growth and by virus transformation. *Arch Biochem Biophys* 297(1):169-75.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Watson R.E., Goodman J.I. (2002) Effects of phenobarbital on DNA methylation in GC-rich regions of hepatic DNA from mice that exhibit different levels of susceptibility to liver tumorigenesis. *Toxicol Sci*, 68(1):51-58.
- Wettergren Y., Kullberg A., Levan G. (1995). Colemid resistance in murine SEWA cells: non-Pgy gene amplification at low levels of resistance and preferential Pgy2 gene amplification at high levels of resistance. *Hereditas* 122(2):125-34
- Wilson M.J., Shivapurkar N., Poirier L.A. (1984) Hypomethylation of hepatic nuclear DNA in rats fed with a carcinogenic methyl-deficient diet. *J Biochem*, 218(3):987-990.
- Wise C.K., Hass B.S. (1994) HPLC analysis for 5-methyldeoxycytidine in cellular DNA obtained directly from the culture flask. *Biotechniques*, 16(2):218-20.
- Wise, C.K. and Fullerton, F.R. (1995) Analytical procedure for determination of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocystein, and S-adenosylmethionine in the same isocratic HPLC run, with procedure for preparation and analysis of the analog S-adenosylhomocysteine sulfoxide. *J Liq Chromatogr*, 18: 2005-2017.
- Wise, C.K., Cooney, C.A., Ali, S.F., and Poirier, L.A. (1997) Analytical procedure for determination of S-adenosylmethionine in whole blood, red blood cells, and cultures cells using a fast preparation method and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 696: 145-152.
- Yamanaka K., Hayashi H., Tachikawa M., Kato K., Hasegawa A., Oku N., Okada S. (1997) Metabolic methylation is a possible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics. *Mutat Res*, 394(1-3):95-101.
- Zhao, C.Q., Young, M.R., Diwan, B.A., Coogan, T.P. and Waalkes, M.P. (1997) Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 10907-10912.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Zollino M., Neri G. (1987) Protective effect of S-adenosylmethionine against the induction of chromosome fragile sites. Acta Haematol, 1:100-103.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN