



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“UTILIZACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS
FLUORESCENTES EN TINCIONES CITOGENÉTICAS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

SUSANA YESENIA RIVERA MANCIA

ASESORES: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

DR. ENRIQUE ÁNGELES ANGUIANO



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
 Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

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

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

Utilización de compuestos orgánicos
fluorescentes en tinciones citogenéticas.

que presenta en pasante: Susana Yesenia Rivera Mancía
 con número de cuenta: 9951475-2 para obtener el título de:
Química farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Febrero de 2004

PRESIDENTE	<u>MC. Luisa Martínez Aguilar</u>	<u>L. S. A.</u>
VOCAL	<u>Cra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	<u>MC. Tais Wopal Guerrero</u>	<u>[Firma]</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Alberto Ramírez Murcia</u>	<u>[Firma]</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Rosa Isela Álvarez González</u>	<u>[Firma]</u>

Parte de este trabajo fue presentado en el Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética 2003 en Oaxaca, Oaxaca, bajo el título "Utilización de compuestos orgánicos fluorescentes alternativos en tinciones citogenéticas"

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Rosa Lidia y Oscar Rogelio por darme la vida, por su apoyo incondicional y por demostrarme con ejemplos que todo en esta vida es posible cuando se hace con amor.

A mis abuelitos por darme los maravillosos padres que tengo, principalmente a mi abuelito Raúl y mi abuelita Cande† por ser las personas con más fe que he conocido en toda mi vida.

A mis hermanos Oscar y Elena por hacerme sonreír e inspirarme a hacer lo posible por ser un ejemplo para ellos.

A mis profesores que contribuyeron, con su trabajo, para que cumpliera una de mis metas, en especial a:

Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo y Dr. Enrique Angeles Anguiano, mis asesores, por su apoyo e interés para la realización de este trabajo.

Dra. Luisa Martínez Aguilar por sus consejos y apoyo moral.

Mi admiración a estos tres profesores por no perder su sencillez a pesar de estar tan llenos de conocimiento.

A José Luis por darme ánimos cuando lo necesité.

A mis compañeros por alentarme a ser perseverante.

A mis amigos, cuyos nombres no menciono por temor a olvidar alguno, por estar conmigo en buenos y malos momentos.

A todos aquellos que creyeron en mí.

Sobre todo le agradezco a Dios y a la vida por darme la fortuna de conocer a todas estas personas, sin quienes esto hubiera sido más difícil.

Gracias a la F.E.S. Cuautitlán por brindarme la oportunidad de realizar uno de mis sueños.

ÍNDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	4
III.	Marco teórico	6
	1. Antecedentes	7
	2. El fenómeno de fluorescencia	8
	2.1 Fluorescencia	8
	2.2 Espectro de fluorescencia	13
	2.3 Fluorescencia de fondo	15
	2.4 Autoapagado	15
	3. Microscopía de fluorescencia	17
	3.1 Principio de la microscopía de fluorescencia	18
	3.2 Ventajas y desventajas de la microscopía de fluorescencia	20
	4. Fluorocromos	20
	4.1 Bromuro de etidio y yoduro de propidio	21
	4.2 Naranja de acridina	22
	4.3 DAPI	23
	4.4 Hoescht	25
	4.5 Quinacrina	26
	5. Mecanismos de unión de los fluorocromos al ADN	26
	6. Técnicas citogenéticas con fluorescencia	27
	6.1 Micronúcleos	28
	6.2 Ensayo cometa	30
	6.3 Bando cromosómico	31
	6.4 FISH	32
IV.	Justificación	34
V.	Hipótesis	36
VI.	Objetivos	38
VII.	Material y métodos	40

VIII.	Resultados	46
IX.	Discusión	54
X.	Conclusiones	60
XI.	Apéndice	62
XII.	Glosario	65
XIII.	Referencias	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Jablonski	10
Figura 2. Disminución de la intensidad de fluorescencia	11
Figura 3. Espectros de excitación y de emisión	12
Figura 4. Espectro de excitación y emisión a diferentes longitudes de onda	14
Figura 5. Relación entre la intensidad de fluorescencia y la concentración	16
Figura 6. Principio de la microscopía de fluorescencia	19
Figura 7. Yoduro de propidio	21
Figura 8. Bromuro de etidio	22
Figura 9. Naranja de acridina	23
Figura 10. DAPI	23
Figura 11. Tinción con DAPI.	24
Figura 12. Hoechst 33258	26
Figura 13. Formación de eritrocitos micronucleados por mutágenos.	29
Figura 14. Micronúcleos en eritrocitos policromáticos de ratón	29
Figura 15. Cometa teñido con bromuro de etidio	31
Figura 16. Procedimiento de la Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia	33
Figura 17. Metodología general seguida en el proyecto	45
Figura 18. Célula de mucosa oral (a) y cromosomas teñidos con bromuro de etidio (b)	48
Figura 19. Células de mucosa oral teñidas con LQM 231 a diferentes condiciones	49
Figura 20. Cromosomas teñidos con LQM 231 (100 mcg/ml) a diferentes condiciones	50
Figura 21. Cromosomas teñidos con LQM 231 (200 mcg/ml) a diferentes condiciones	51
Figura 22. Cromosomas teñidos con LQM 231 después de tratamiento con tripsina	52
Figura 23. Compuestos con área superficial equivalente a tres anillos bencénicos fusionados	55
Figura 24. LQM 231 vista frontal (a), LQM 231 vista lateral (b), LQM 238 (c), LQM 246 (d)	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la tinción de células de mucosa oral, cromosomas, cometas y micronúcleos.	47
Tabla 2. Precios de algunos fluorocromos en enero de 2004 (Molecular probes)	58

ABREVIATURAS

A	Adenina	FRET	Fluorescence resonance energy transfer (Transferencia de energía de resonancia y fluorescencia)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	G	Guanina
ARN	Ácido Ribonucleico	hEM	Fotón de emisión
C	Citosina	hEX	Fotón de excitación
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol	LQM	Laboratorio de Química Medicinal
DMSO	Dimetilsulfóxido	nm	Nanómetros
DSMI	Yoduro de trans-4-[4-(dimetilamino)estiril]1-metilpiridinio	PI	Propidium iodide (ioduro de Propidio)
dsADN	Double strand desoxirribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico de doble cadena)	QFQ	Bandeo Q por Fluorescencia utilizando Quinacrina
EMN	Eritrocito micronucleado	RFA	Bandeo Reverso por Fluorescencia utilizando naranja de acridina
EtBr	Ethidium bromide (Bromuro de etidio)	T	Timina
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (Hibridación <i>In situ</i> con fluorescencia)	UV	Ultravioleta

I. RESUMEN

I. RESUMEN

Los avances en el área citogenética han sido cada vez mayores, especialmente en las últimas dos décadas, con la introducción de las técnicas de fluorescencia. Sin embargo, dos aspectos importantes de los fluorocromos son su toxicidad ambiental y el alto costo que representan para un laboratorio nacional, por lo que se requieren alternativas que representen una reducción en los costos y en la toxicidad. En el Laboratorio de Química Medicinal de la FES Cuautitlán se detectó la capacidad fluorescente de varios compuestos que habían sido sintetizados con otra finalidad.

En el presente trabajo se realizó la evaluación de la capacidad fluorocrómica sobre el núcleo interfásico y los cromosomas metafásicos, de 16 de dichos compuestos orgánicos que mostraron la propiedad de fluorescencia al ser excitados con luz UV. Las técnicas citogenéticas que fueron empleadas para probar estos colorantes fueron el ensayo cometa con leucocitos, el ensayo de micronúcleos y la tinción de cromosomas humanos. Además se tiñeron células de la mucosa oral para observar el contraste núcleo-citoplasma.

Utilizando un microscopio de fluorescencia Iroscope de fabricación nacional se observó que, para la tinción de cromosomas, el compuesto más efectivo fue el denominado LQM 231, mientras que el LQM 246 no permitió la observación de cromosomas, de cometas, ni de células de la mucosa oral. No se encontró utilidad de estos compuestos en la técnica de micronúcleos. Los demás compuestos que fueron LQM 232 al 245 pusieron en evidencia los núcleos de las células de mucosa oral y los cromosomas, pero con una fluorescencia menor. Sin embargo, todos estos compuestos, al parecer, presentan mayores posibilidades de aplicación en la detección de proteínas. Se pretende continuar los estudios de los colorantes que resultaron satisfactorios ya que reducirían los costos en comparación a los compuestos que actualmente se utilizan.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

El área citogenética ha tenido grandes avances, sobre todo en las últimas dos décadas (Henriques-Gil y Col., 1997), pero al mismo tiempo la especificidad y sensibilidad de los nuevos métodos trae consigo dificultades, especialmente en cuanto a costos se refiere, haciéndose necesaria la búsqueda de alternativas más económicas para que la relación costo-beneficio proporcione mejores resultados. Un caso particular lo constituyen los colorantes fluorescentes, porque aunque los ya existentes cumplen con su objetivo, su costo limita su uso. Aunado a ello existe gran interés y demanda de ellos para la detección de materiales biológicos (Smith, 2002), lo que hace obvia la necesidad de encontrar colorantes más económicos.

Cuando las moléculas fluorescentes tienen la capacidad de interactuar con componentes celulares específicos, pueden emplearse para observaciones microscópicas (University of Illinois, 2003). De hecho, el uso de fluorocromos capaces de reconocer regiones ricas en guanina – citosina o adenina – timina, las modificaciones fisicoquímicas de la cromatina, y la incorporación de técnicas moleculares modernas en citogenética fueron los primeros pasos para la diferenciación longitudinal de cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos (Henriques-Gil y Col., 1997).

Actualmente, los fluorocromos son de gran utilidad en técnicas citogenéticas como el ensayo cometa, la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), el bandeo cromosómico, los micronúcleos, entre otras múltiples aplicaciones. Los fluorocromos han cobrado importancia en los últimos años, pues existe una gran cantidad de trabajos científicos en los que se han utilizado como una herramienta básica (McKelvey-Martin y Col., 1993; VanDiemen y Col., 1995). Entre los fluorocromos más utilizados para teñir el material genético se encuentran el Hoechst 33258 y 33342, el DAPI, la naranja de acridina, el bromuro de etidio y el yoduro de propidio (Smith y Col., 1990).

Si bien, las técnicas citogenéticas con fluorescencia se utilizan constantemente, el costo de los fluorocromos constituye una desventaja, pues es muy elevado; es por ello que en el presente trabajo se llevó a cabo la evaluación de 16 compuestos orgánicos en algunas de las técnicas más empleadas en el estudio citogenético. Con esto se intenta reducir los costos con respecto a los colorantes que actualmente existen en el mercado.

III. MARCO TEÓRICO

III. MARCO TEÓRICO

1. ANTECEDENTES

El fenómeno de fluorescencia fue descubierto a mediados del siglo XIX. Fue Stokes quien hizo la observación de que el mineral fluorospar fluoresce cuando recibe luz UV; él acuñó el término fluorescencia y observó que la longitud de onda correspondiente a la luz fluorescente es mayor que la de la luz de excitación, lo que se conoce como ley de Stokes (Abramowitz y Davidson, 2003; Loveland, 1981).

Por otro lado, en 1590 Hans y Zacharias Janssen construyeron el primer microscopio compuesto que introdujo al concepto básico del microscopio moderno y con los trabajos de Amici, Carl Zeiss, Ernst Abbe y Otto Schott el microscopio mejoró notablemente (Smith, 1990).

La microscopía de fluorescencia es un tanto antigua. A. Köhler fue el primero en notar este fenómeno en sus muestras cuando estaba desarrollando la fotomicrografía con UV antes de 1904 e hizo algunos estudios al respecto, introduciendo el método de iluminación que lleva su nombre además del diseño y perfeccionamiento de un microscopio para luz ultravioleta (Smith, 1990; Loveland, 1981). Asimismo, en 1912 Reichter diseñó un microscopio para el estudio de algunas sustancias, especialmente productos alimenticios, que se volvían fluorescentes en luz UV. El microscopio tenía un espejo condensador de cuarzo y una fuente de luz UV (Reichter, 1912) además de la incorporación un filtro para microscopios de fluorescencia elaborado por Heimstadt (Heimstadt, 1911).

Zeiss, Abbe, Schott y Köhler son lo que los autores llaman "Los Cuatro Jinetes de la Microscopía", pues ellos son los responsables del desarrollo del microscopio como lo conocemos actualmente (Smith, 1990).

Alrededor de 1936 Haitinger, quien ha sido llamado el padre de la microscopía de fluorescencia, y otros desarrollaron muchos métodos, como la técnica de fluorescencia secundaria, empleando fluorocromos para teñir componentes específicos en los tejidos, bacterias y otros patógenos que no autofluorescen. Sin embargo, no fue hasta finales de los 50's y principios de los 60's que este campo tomó fuerza (Loveland, 1981).

Como puede verse, el potencial del microscopio de fluorescencia no fue tomado en cuenta por varias décadas (Abramowitz y Davidson, 2003), pero con el advenimiento de varios procedimientos de tinción fluorescente a principios de los 70's^v, surgió una subespecialidad única de la genética, la citogenética clínica, convirtiendo así el papel que los cromosomas juegan en las enfermedades humanas y en el desarrollo en la primera preocupación de los biólogos y clínicos (Verma y Babu, 1995), valiéndose para sus estudios del microscopio de fluorescencia .

2. EL FENÓMENO DE FLUORESCENCIA

2.1 Fluorescencia

Debido a que suele existir confusión entre los conceptos de fluorescencia y fosforescencia es importante resaltar, como principal diferencia, que el intervalo de tiempo entre la absorción de la luz de excitación y la emisión de la luz reirradiada, en fluorescencia, tiene lugar en un periodo extremadamente corto, usualmente menos de una millonésima de segundo (Abramowitz y Davidson, 2003); en cambio, en la fosforescencia existe un intervalo de tiempo entre la absorción y la emisión de la radiación (Loveland, 1981). Es decir, si la emisión de luz persiste por más de unos cuantos segundos y la luz de excitación se retira, el fenómeno se conoce como fosforescencia, mientras que la fluorescencia se refiere a la emisión

^v Aunque antes, en 1968, Caspersson y colaboradores reportaron la técnica de bandeo con mostaza de quinacrina (Verma y Babu, 1995)

de luz que continua sólo mientras la muestra absorbe la luz de excitación (Abramowitz y Davidson, 2003). La luminiscencia es el término que abarca ambos fenómenos (Loveland, 1981.)

Por lo tanto, la fluorescencia es un proceso en el que las moléculas, en virtud de su estructura química, absorben la luz de determinada longitud y emiten luz a una longitud de onda específica mayor en un periodo de tiempo muy breve. (University of Georgia, 2003; Loveland 1981; Lodish y Col., 2000; Bieniarz, 1995)

Muchos materiales (microminerales, resinas, drogas, clorofila, vitaminas, compuestos inorgánicos, etc.) fluorescen en su forma natural al ser irradiados con luz UV, a lo que se denomina autofluorescencia o fluorescencia primaria. Ahora bien, si la fluorescencia se da cuando el espécimen es tratado con sustancias químicas capaces de fluorescer, es decir un colorante fluorescente o fluorocromo, se denomina fluorescencia secundaria. (Abramowitz y Davidson, 2003; Loveland, 1981).

La fluorescencia es un proceso de tres etapas que ocurre en los fluoróforos o colorantes fluorescentes (generalmente hidrocarburos poliaromáticos y/o heterocíclicos). Las tres etapas son excitación, tiempo de vida del estado excitado y emisión de la fluorescencia. El proceso responsable de la fluorescencia de los fluoróforos puede ilustrarse por el diagrama del estado electrónico simple o diagrama de Jablonski (Figura 1).

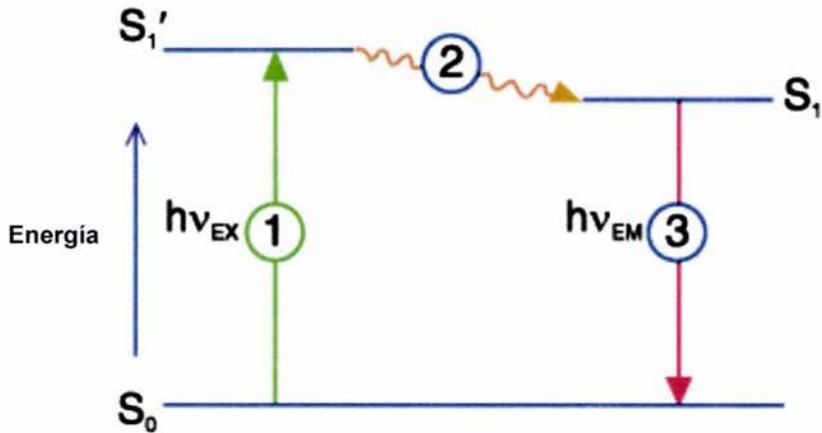


Figura 1 Diagrama de Jablonski, que ilustra el proceso involucrado en la creación de un estado de singlete electrónico excitado por absorción de luz y emisión subsecuente de la fluorescencia. (Molecular probes, 2003)

Excitación

A temperatura ambiente, las moléculas están predominantemente en el nivel vibracional del estado electrónico basal más bajo, S_0 (Fig. 1). Por absorción de luz de una longitud de onda correcta proporcionada por una fuente externa, por ejemplo una lámpara incandescente o un láser, una molécula puede excitarse a uno de los niveles vibracionales del primer estado electrónico excitado, S_1' . La absorción de un fotón se logra dentro de aprox 10^{-15} s. (Hovius y Col., 2000; Molecular probes, 2003).

Tiempo de vida del estado excitado.

El fluoróforo excitado pierde energía y se relaja en aproximadamente 10^{-12} segundos al estado vibracional más bajo del estado excitado, S_1 , del cual regresa a alguno de los niveles vibracionales del estado basal S_0 emitiendo un fotón (Figura 1) a lo cual se denomina emisión de la fluorescencia (Hovius y Col., 2000).

Durante el tiempo de vida del estado excitado el fluoróforo sufre cambios conformacionales y también está sujeto a una multitud de posibles interacciones con su ambiente molecular. Este proceso tiene dos consecuencias importantes; la primera es que la energía de S_1' es disipada parcialmente, dando lugar a un estado excitado de singulete relajado (S_1) del cual se origina la emisión de fluorescencia al regresar a S_0 ; y la segunda es que no todas las moléculas excitadas inicialmente por absorción regresan al estado basal (S_0) por emisión de fluorescencia. El rendimiento de fluorescencia, el cual es la proporción del número de fotones de fluorescencia y el número de fotones absorbidos, es una medida de la magnitud relativa a la cual esos procesos ocurren (Molecular probes, 2003).

Así que una vez que una solución de un fluoróforo ha sido iluminada por un pulso de luz excitante se observa una disminución en la señal de fluorescencia (Figura 2), dependiendo el tiempo de vida del estado excitado tanto de la naturaleza del fluoróforo como de su ambiente molecular (Hovius y Col., 2000).

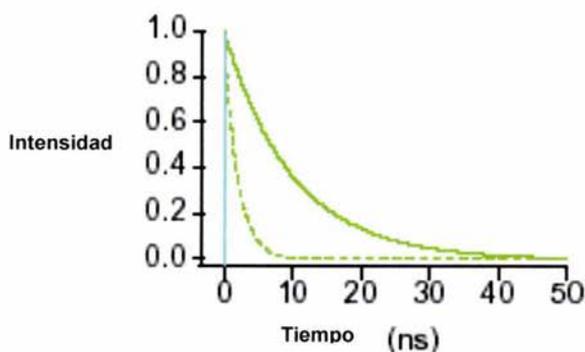


Figura 2. Disminución de la intensidad de fluorescencia. Al hacer incidir luz excitante a un fluoróforo en solución la señal disminuye a medida que transcurre el tiempo. Cada línea representa un fluoróforo distinto de acuerdo a su propio tiempo de vida del estado excitado (Hovius y Col., 2000).

Emisión de fluorescencia

Un fotón de energía $h\nu_{EM}$ (fotón de emisión) es emitido, regresando al fluoróforo a su estado basal S_0 (Figura 1) Debido a la disipación de la energía durante el tiempo de vida del estado excitado, la energía de este fotón es menor y, por lo tanto, de mayor longitud de onda que la del fotón de excitación $h\nu_{EX}$. La diferencia en energía o longitud de onda representada por $(h\nu_{EX}-h\nu_{EM})$ es llamada cambio de Stokes. El cambio de Stokes es fundamental para la sensibilidad de las técnicas de fluorescencia porque permite que la emisión de fotones sea detectada contra un fondo bajo, aislado de los fotones de excitación (Molecular probes, 2003).

Debido a esa disipación de energía de excitación la fluorescencia emitida es de menor energía; como consecuencia, el máximo del espectro de emisión cambia a longitudes de onda mayores cuando se comparan con las del espectro de excitación (Figura 3) aunque, cabe mencionar, que no todas las moléculas en el estado electrónico excitado emiten luz fluorescente (Hovius y Col., 2000).

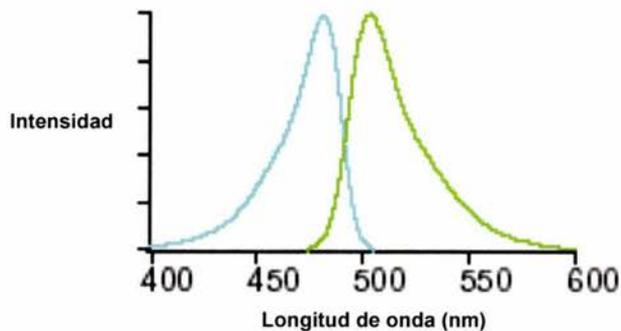


Figura 3. Espectros de excitación (línea azul) y de emisión (línea verde). La emisión tiene lugar a longitudes de onda mayores debido a la disipación de la energía de excitación. (Hovius y Col., 2000)

En resumen, para la emisión de fluorescencia, se requiere que un fotón de la fuente de radiación colisione con un electrón en el átomo, excitándolo y elevándolo a un nivel de energía más alto. Subsecuentemente, el electrón excitado se relaja a un nivel de energía menor y emite luz en forma de un fotón de menor energía (Abramowitz y Davidson, 2003).

En lo que se refiere a la intensidad de fluorescencia, ésta es cuantitativamente dependiente de los mismos parámetros que la absorbancia – definido por la ley de Lambert Beer como el producto del coeficiente de extinción molar, longitud de la ruta óptica y concentración del soluto – así como del rendimiento de la fluorescencia del colorante y la intensidad de la fuente de excitación y la eficiencia en la captación de la fluorescencia por parte del instrumento. En soluciones diluidas o suspensiones, la intensidad de fluorescencia es linealmente proporcional a todos estos parámetros (Molecular probes, 2003).

2.2 Espectro de fluorescencia

Todo el proceso de fluorescencia es cíclico. A menos que el fluoróforo sea irreversiblemente destruido en el estado excitado (proceso conocido como fotodestecimiento), el mismo fluoróforo puede ser repetidamente excitado y detectado. El hecho de que un solo fluoróforo pueda generar muchos miles de fotones detectables es fundamental para la sensibilidad de las técnicas de detección por fluorescencia. Para las moléculas poliatómicas en solución las transiciones electrónicas discretas representadas por hEX y hEM (Figura 1) son reemplazadas por espectros de energía bastante anchos llamados espectros de excitación de fluorescencia y espectro de emisión de fluorescencia (Figura 4), respectivamente (Molecular probes, 2003; Hovius y Col., 2000).

Con pocas excepciones, los espectros de excitación de fluorescencia de especies de un solo fluoróforo en solución diluida son idénticos a su espectro de absorción (Molecular probes, 2003).

Bajo las mismas condiciones, el espectro de emisión de fluorescencia es independiente de la longitud de onda de excitación, debido a la disipación parcial de la energía de excitación durante el tiempo de vida del estado excitado. La intensidad de la emisión es proporcional a la amplitud del espectro de excitación en la longitud de onda de excitación (Figura 4).

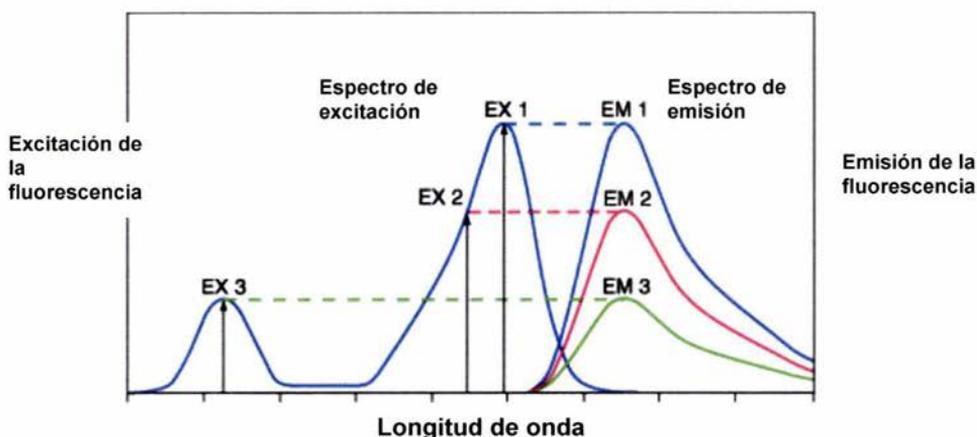


Figura 4. Espectro de excitación y emisión a diferentes longitudes de onda. La excitación de un fluoróforo en tres diferentes longitudes de onda (EX 1, EX 2, EX 3) no cambia el perfil de emisión pero produce variaciones en la intensidad de emisión de la fluorescencia (EM 1, EM 2, EM 3) que corresponde a la amplitud del espectro de excitación. (Molecular probes, 2003)

Cabe mencionar que algunos materiales, especialmente los inorgánicos, pueden tener más de una banda de fluorescencia (Loveland, 1981).

Las bandas de excitación y de emisión son afectadas, de alguna manera, por la temperatura y la concentración, pero no de la misma manera para todos los materiales. La disminución de la temperatura o el incremento de la concentración, por ejemplo, cambia las bandas de la rhodamina B a mayores longitudes de onda, mientras que con la fluoresceína los mismos factores cambian las bandas a longitudes de onda menores. Sin embargo, las bandas de absorción y de

fluorescencia son afectadas siempre de la misma manera para la misma sustancia. Esto conduce a la regla de Lewchin la cual puede expresarse de la siguiente manera: cuando las bandas de absorción y de fluorescencia se traslapan, en cualquier proporción, la forma del espectro de fluorescencia es la imagen especular de la banda de absorción (Loveland, 1981).

2.3 Fluorescencia del fondo

Las señales de fondo pueden originarse a causa de constituyentes endógenos de la muestra (refiriéndose a la autofluorescencia) o de moléculas del colorante no unidas o unidas de forma inespecífica (fondo del reactivo). La distorsión de la señal causada por la autofluorescencia de las células, tejidos y fluidos biológicos es mayormente minimizada por el uso de colorantes que puedan excitarse a más de 500 nm. Además, a mayores longitudes de onda, la dispersión de la luz por medios densos, tales como tejidos es muy reducido, dando como resultado una mayor penetración de la luz de excitación. (Molecular probes, 2003; Loveland,1981)

2.4 Autoapagado

El simple incremento de la concentración del colorante puede ser contraproducente y frecuentemente producir cambios marcados en las características ópticas (Figura 5) y químicas del colorante. La fluorescencia extra obtenida por fluoróforo adicionado típicamente decrece debido al autoapagado (Hamann y Col. 2002; Molecular probes, 2003).

El apagado de la fluorescencia, proceso descubierto por Walter en 1888 (Hamann y Col., 2002) puede definirse como un proceso bimolecular que reduce el rendimiento de la fluorescencia sin cambiar el espectro de emisión de la misma; puede ser el resultado de interacciones transitorias del estado excitado (apagado colisional) o de la formación de especies no fluorescentes en su estado basal

(Hamann y Col., 2002; Molecular probes, 2003) y se produce cuando las moléculas interactúan entre sí al encontrarse muy próximas (Bieniarz, 1995).

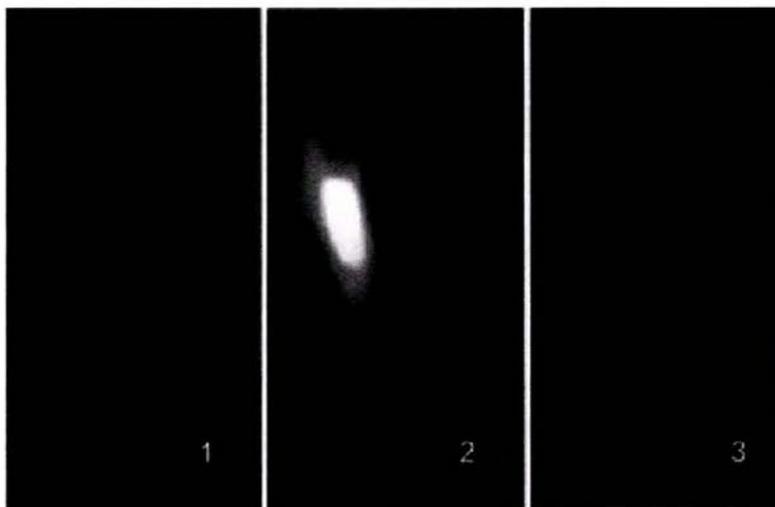


Fig 5. Relación entre la intensidad de fluorescencia y la concentración intracelular de calceína. La calceína se introdujo en una sola célula RPE por microinyección. Se inyectaron 15fl de una solución stock de calceína 20mM en la fotografía 1, otros 15 fl entre las fotografías 1 y 2 y 15fl más entre las fotografías 2 y 3. (Hamann y Col., 2002)

La FRET (transferencia de energía de resonancia y fluorescencia) también contribuye al autoapagado, pues es una interacción fuertemente dependiente de la distancia en el estado excitado, en el cual la emisión de un fluoróforo está acoplada a la excitación de otro, es decir, dos fluoróforos interactúan vía un mecanismo dipolo-dipolo, donde el fluoróforo excitado, llamado donador, transfiere su energía de excitación de manera no radiativa a un fluoróforo aceptor localizado muy cerca; entonces la fluorescencia original del donador se apaga y una nueva fluorescencia, la del aceptor, aparece (Hovius y Col., 2000).

El apagado de la fluorescencia es un efecto específico influido por factores como polaridad del solvente, pH, concentración, etc. (Loveland, 1981).

La diferencia de energía entre los estados electrónicos basal y excitado S_0 - S_1 , y por lo tanto el máximo de emisión, es sensible a la polaridad del medio en el que se encuentra el fluoróforo. La razón de este fenómeno es que en el estado basal, las interacciones entre el fluoróforo y las moléculas del solvente han adoptado la situación más favorable. En el estado excitado, la estructura electrónica del fluoróforo cambia y, en general, se vuelve más polar. Durante el tiempo de vida del estado excitado, las moléculas del solvente polar pueden reorganizarse alrededor de la molécula excitada y de ese modo disminuir la energía del estado excitado en relación con un solvente apolar. Inversamente, la energía del estado basal, más apolar, es incrementada en un ambiente polar en relación con uno apolar. Entonces la diferencia de energía entre S_1 y S_0 es, en general, más pequeña y el espectro de emisión cambia a mayores longitudes de onda en ambientes polares (Hovius y Col., 2000).

3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La iluminación y observación con fluorescencia es la técnica microscópica que se está expandiendo más rápidamente en la actualidad, tanto en las ciencias biológicas como en las ciencias médicas, un hecho que ha conllevado al desarrollo de microscopios más sofisticados y numerosos accesorios para fluorescencia. La epifluorescencia o fluorescencia de luz incidente se ha convertido en el método de elección en muchas aplicaciones (Axelrod y Col., 2000) al aprovechar las regiones visibles o cercanas al invisible del espectro electromagnético; y es precisamente en este punto en el que radica la diferencia entre las preparaciones fluorescentes y los métodos generales de microscopía en los cuales lo que se observa es la luz transmitida (Smith, 1990).

3.1 Principio de la microscopía de fluorescencia

En los sistemas para la detección de fluorescencia pueden detectarse cuatro elementos esenciales: 1) una fuente de excitación, 2) un fluoróforo, 3) filtros para aislar los fotones de emisión de los fotones de excitación y 4) un detector que registre los fotones de emisión y produzca un rendimiento registrable, usualmente como una señal eléctrica o una imagen fotográfica (Molecular probes, 2003).

En la fluorescencia, los especímenes se vuelven autoluminiscentes y esto es el resultado de la absorción de radiaciones de onda corta. La radiación de onda corta que excita al fluorocromo no contribuye a la formación de la imagen. Estas longitudes de onda son absorbidas por el filtro de barrera (Figura 6). Los productos de las ondas de luz se encuentran todas en el rango visible y son solo las longitudes de onda, resultantes de la excitación, las que forman la imagen (Smith, 1990).

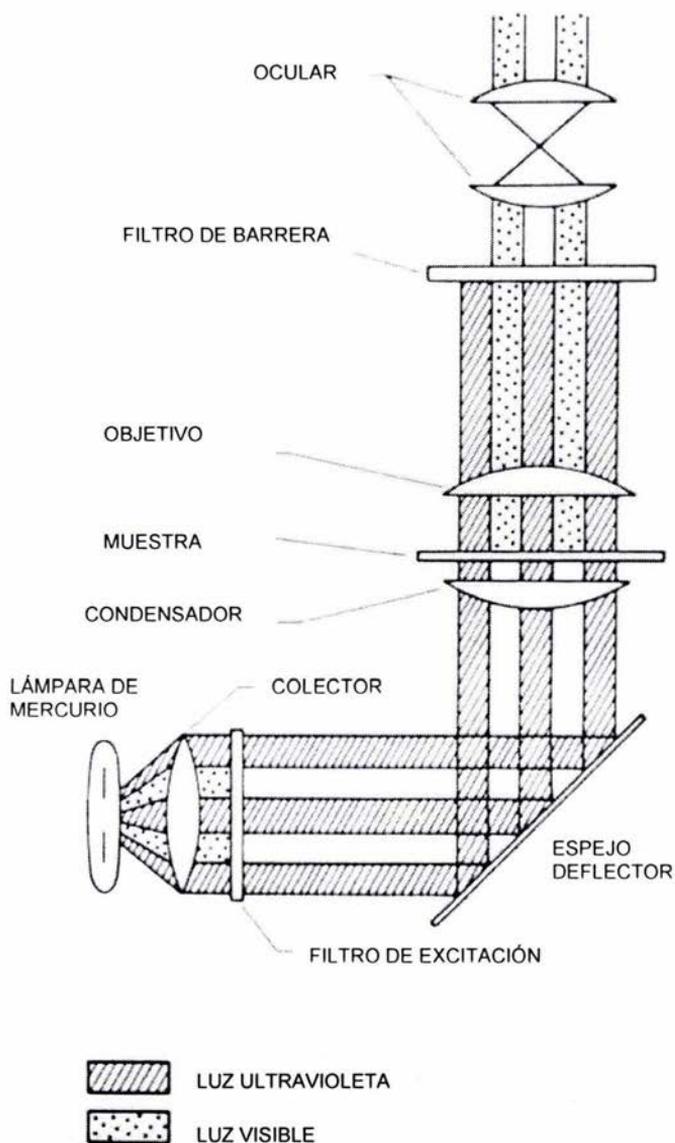


Figura 6. Principio de la microscopía de fluorescencia. Los productos de las ondas de luz están todas en el rango visible. Son sólo las ondas de luz que resultan de la excitación las que forman la imagen final (Smith 1990).

3.2 Ventajas y desventajas de la microscopía de fluorescencia

Entre las ventajas de la fluorescencia como técnica se encuentran las siguientes:

1. Especificidad. Pueden detectarse incluso trazas de un material, dentro del campo donde esté localizado.
2. Sensibilidad. Por ejemplo, pueden verse cerca de 100 moléculas de acriflavina por micrón cuadrado de superficie.
3. Contraste. Debido a que la luz es vista contra un fondo oscuro, muestra el alto contraste de los sistemas de campo oscuro.
4. La muestra actúa como cuerpos que autoluminescen, lo cual es ópticamente excelente en un sistema microscópico (Molecular probes, 2003).
5. Simplicidad de operación porque el objetivo sirve como su propio condensador (Smith, 1990).

Entre las principales desventajas se encuentran la baja intensidad del brillo del campo y, frecuentemente, su inestabilidad con el tiempo, así como la adaptación de la vista del analista al trabajo en un cuarto oscuro. La mayor desventaja es, probablemente, para la fotografía pues, desafortunadamente, se guarda muy poca de la intensidad del campo observado en las imágenes tomadas por una cámara (Loveland, 1981).

4. FLUOROCROMOS

Existe una gran variedad de fluorocromos para múltiples aplicaciones y permiten a los investigadores detectar componentes particulares de complejos biomoleculares, incluyendo células vivas, con gran sensibilidad y selectividad. Pero no cualquier compuesto fluorescente cumple con estas expectativas, pues, para que un compuesto químico se utilice como fluorocromo debe ser fuertemente fluorescente y hacer distinguibles las estructuras de interés de la fluorescencia natural de fondo (Hovius y Col., 2000).

Los fluorocromos pueden ser aplicados en tinción directa o como contratinción, lo cual implica una tinción con dos sustancias químicas diferentes. Por ejemplo, en los procedimientos de contratinción para cromosomas, los fluorocromos cuya fluorescencia se observa para examinarlos se denomina tinción primaria mientras que el otro agente que se une al ADN se denomina contratinción (Schweizer, 1981). Existen tres combinaciones de contratinción y tinción primaria basadas en la afinidad por las bases del ADN : (1) Tinción primaria AT-específica y contratinción AT-específica, (2) tinción primaria AT-específica y contratinción GC-específica, y (3) tinción primaria GC-específica y contratinción AT-específica (Verma y Babu, 1995). A continuación se describen algunos de los fluorocromos más empleados en citogenética.

4.1 Bromuro de etidio y yoduro de propidio

El bromuro de etidio (EtBr) y el yoduro de propidio (PI) son estructuralmente similares a los intercalantes fenantridínicos. El PI (Figura 7) es más soluble en agua y la membrana es menos permeable a él que al EtBr (Figura 8), aunque ambos colorantes son, generalmente, excluidos de células vivas. Ambos pueden ser excitados con lámparas de xenón o de mercurio-arc o con el láser iónico de argón, haciéndolos convenientes para la microscopía de fluorescencia (Molecular probes, 2003).

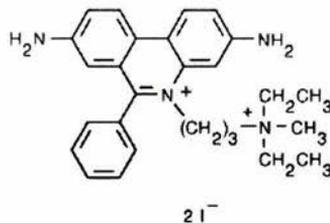


Figura 7. Yoduro de propidio

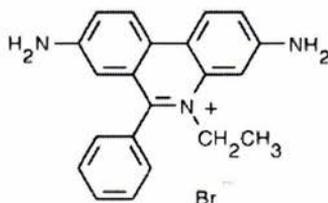


Figura 8. Bromuro de etidio

Estos colorantes se unen con poca o ninguna preferencia por secuencias específicas con una estequiometría de una molécula de colorante por 4 o 5 pares de bases de ADN. Tanto el EtBr como el PI, también se unen al ARN (Bieniarz, 1995), requiriendo tratamiento con nucleasas para distinguir entre ADN y ARN. Una vez que estas sustancias están unidas a los ácidos nucleicos, su fluorescencia es potenciada de 20 a 30 veces, su máximo de excitación está cambiado de 30 a 40nm al rojo y sus máximos de emisión están cambiados aproximadamente 15 nm al azul. El PI se usa comúnmente como contratinción nuclear o cromosómica y como tinción para células muertas. Actualmente el EtBr es la tinción general en gel más comúnmente usada para ácidos nucleicos, siendo útil para aplicarse en el ensayo cometa. Una desventaja de estos compuestos es que son potentes mutágenos y deben manejarse con mucha precaución (Molecular probes, 2003).

4.2 Naranja de acridina

La naranja de acridina (Figura 9) es un colorante que proporciona diferenciación policromática cuando hay un estricto control del pH. Strugger, quien la introdujo en 1948, encontró que diferenciaba células vivas de células muertas y esto es aplicado principalmente para las bacterias. Él pensaba que esto era debido a que mostraba fluorescencia roja a altas concentraciones y verde a bajas concentraciones y que las células viables aceptaban menos tinción. Después se encontró que la naranja de acridina diferencia entre ADN (verde) y ARN

citoplasmático (rojo) al pH óptimo de 6.0 y bajas concentraciones. Esto también podría explicar la reacción de las células vivas, ricas en ADN, aunque Strugger señala que el rojo enmascara al verde (Loveland, 1981).

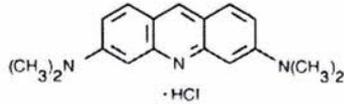


Figura 9. Naranja de acridina

Este fluorocromo tiene una afinidad extremadamente alta por las regiones ricas en Adenina –Timina de los ácidos nucleicos, siendo particularmente útil para el bandeado cromosómico. Es un colorante que interactúa tanto con el ADN como con el ARN por intercalamiento o atracciones electrostáticas. Este colorante catiónico tiene fluorescencia verde con un máximo de emisión a 525 nm cuando está unido al ADN en asociación con el ARN su emisión cambia a aproximadamente 650 nm (fluorescencia roja) (Molecular probes, 2003).

4.3 DAPI

El DAPI (Figura 10) se une al ADN con preferencia hacia los pares de bases AT y con mayor afinidad por el ADN de doble cadena, incorporándose en los surcos menores por un mecanismo no intercalante (Jansen y Col., 1993). Aunque la fluorescencia del DAPI es potenciada tanto por los pares AT como por los pares GC, la potenciación es significativamente mayor con las secuencias ricas en AT que con las ricas en GC (Lin y Col., 1977).

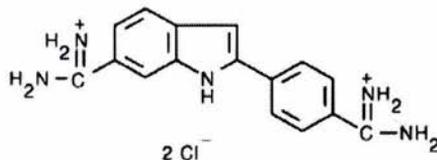


Figura 10. DAPI

La unión del DAPI al ADN de doble cadena produce una potenciación de aproximadamente 20 veces en la fluorescencia, aparentemente debido al desplazamiento de moléculas de agua, tanto del DAPI como del surco menor (Molecular probes, 2003).

Se ha encontrado que el mecanismo de unión del DAPI involucra una interacción cercana entre el ligando inclinado y la parte convexa del surco menor por medio de fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno con pares consecutivos de bases AT (Nunn y Col., 1993; Brown y Col., 1992).

Una particularidad que se encuentra en la tinción de cromosomas humanos con DAPI es una fluorescencia brillante en las constricciones secundarias de los cromosomas 1 y 16 y un patrón similar a las bandas Q en el resto de los cromosomas (Verma y Babu, 1995; Schweizer, 1976).

Asimismo el DAPI es una contratinción nuclear muy popular por su uso en técnicas fluorescentes multicolor. Su fluorescencia azul permanece fuera del contraste vivo de tinciones fluorescentes verdes, amarillas o rojas con otras estructuras (Figura 11). El DAPI tiñe el núcleo específicamente, con poco o ninguna tinción del citoplasma (Molecular probes, 2003).

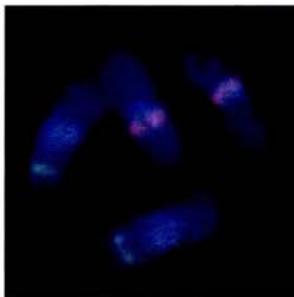


Figura 11. Tinción con DAPI. Cromosomas de *Zingera biebersteiniana* hibridizados con sondas de ADN ribosomal. (Henriques-Gil y Col., 1997)

El DAPI también se une al ARN, probablemente por medio de intercalación selectiva en los pares de Adenina- Uracilo pero muestra claras diferencias entre ambos ácidos nucleicos pues, el complejo DAPI- ARN exhibe un máximo de longitud de onda de emisión de fluorescencia mayor que el complejo DAPI-dsADN (aprox 500 nm vs. aproximadamente 460 nm) y un rendimiento apenas cercano al 20% como máximo. El máximo de excitación del DAPI unido a dsADN es de 358 nm, y el máximo de emisión es de 461 nm. El DAPI puede excitarse con una lámpara de xenón o mercurio-arc o con un láser UV (Molecular probes, 2003).

4.4 Hoescht

El Hoechst 33342 (bisbenzimidazol H 33342) y el 33258 (Figura 12) son colorantes específicos para las regiones ricas en Adenina – Timina de ADN de doble cadena, de modo similar al DAPI (University of Kiel, 2003), son permeables a la membrana celular y se unen a los surcos menores del ADN, con fluorescencia azul brillante. Ambos colorantes son completamente solubles en agua (pueden prepararse soluciones a concentraciones superiores al 2%) y relativamente no tóxicos. El Hoechst 34580 tiene de alguna manera un espectro de mayor longitud de onda que los otros colorantes Hoechst cuando se une a ácidos nucleicos. Estos colorantes, los cuales pueden excitarse con las líneas espectrales UV del láser iónico de argón y por la mayoría de las fuentes convencionales de excitación en fluorescencia, exhiben cambios de Stokes relativamente grandes (máximos de excitación/emisión ~ 350/460 nm) y parecen mostrar un amplio espectro de afinidades al ADN secuencia-dependientes y se unen con fuerza suficiente a secuencias poli(d(A-T)), pudiendo tomar el lugar de muchos intercalantes conocidos de ADN pues poseen patrones fluorescentes similares a las bandas Q, asimismo dan una fluorescencia brillante a las constricciones secundarias de los cromosomas humanos 1 y 16 (Verma y Babu, 1995). Los colorantes Hoescht se emplean en muchas aplicaciones celulares, incluyendo ciclo celular y estudios de apoptosis y son contraindicaciones nucleares comunes (Molecular probes, 2003).

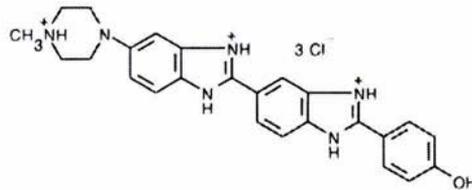


Figura 12. Hoechst 33258

4.5 Quinacrina

Fueron el Dr. Caspersson y sus colaboradores quienes descubrieron que los cromosomas podían teñirse con mostaza de quinacrina para observar bandas bajo luz UV (Verma y Babu, 1995).

La quinacrina se une covalentemente a los residuos de guanina en el ADN, por lo que se emplea en la técnica del bandeo Q (Weisblumlab antibiotics, 2003) y esa afinidad por los pares de citosina-guanina está dada por el anillo o núcleo central de la molécula (Salamanca, 1990).

La quinacrina tiene aplicación en protocolos de tinción secuenciales para facilitar la identificación de los cromosomas. Además, los patrones de fluorescencia que presentan con este colorante el cromosoma 3 y los grupos acrocéntricos son extremadamente importantes en estudios de polimorfismos que pueden servir también como marcadores cromosómicos en la investigación del origen familiar (Olson y Col., 1986).

5. MECANISMOS DE UNIÓN DE LOS FLUOROCROMOS AL ADN

No se conocen muchos mecanismos por los cuales los fluorocromos que tifen al ADN se unen a él, pero pueden mencionarse tres formas de unión:

1. Intercalamiento entre las bases de la doble hélice.
2. Acomodo en los surcos de la hélice.
3. Interacciones electrostáticas de tipo iónico con los grupos fosfato (Timcheva y Col., 1997).

El término intercalante se introdujo en el campo de la química alrededor de los años 60's para describir la inserción de compuestos planos aromáticos o heteroaromáticos entre pares de bases adyacentes en el ADN (Bienarz, 1995). Un ejemplo típico de un agente intercalante lo constituye el bromuro de etidio y un agente de unión a los surcos es el DSMI (Timcheva y Col., 1997).

Se ha demostrado que la especificidad hacia las bases puede lograrse por medio de enlaces de hidrógeno entre las bases de los ácidos nucleicos y grupos aceptores o donadores del ligando. Este es, por ejemplo, el caso de la actinomicina D o de los 9-(carboxamidoalquil) acridina. Sin embargo, para ganar especificidad y afinidad se requeriría por lo menos de 5 a 8 enlaces de hidrógeno, entre el agente intercalante y una secuencia apropiada de ADN. Los requerimientos para un perfecto posicionamiento de los grupos que formarían puentes de hidrógeno haría difícil el diseño de tal molécula (Laugaa y Col., 1985) y se ha aceptado que tres anillos aromáticos fusionados constituyen el área superficial óptima para el intercalamiento (McFadyen y Col., 1988).

6. TÉCNICAS CITOGÉNÉTICAS CON FLUORESCENCIA

La fluorescencia es ampliamente utilizada en las ciencias biológicas para estudiar una amplia variedad de estructuras y actividades intracelulares. Los avances en la tecnología de colorantes fluorescentes y de la microscopía han conducido a un rápido desarrollo de técnicas con fluorescencia, principalmente, en la década pasada (Nikon Microscopy, 2003), contribuyendo en gran medida al estudio citogenético. Las técnicas que se tratan en seguida son las técnicas con fluorescencia que con mayor frecuencia se emplean en citogenética.

6.1 Micronúcleos

La prueba de micronúcleos se basa en la detección de pequeños núcleos (micronúcleos) que se observan en el citoplasma celular. El micronúcleo se forma por la acción de agentes clastógenos o por agentes que dañan el huso acromático (Figura 13) (Sato y Tomita, 2001).

La tinción con naranja de acridina, introducida en 1983 (Hayashi y Col., 1983) ha comenzado a emplearse más frecuentemente que el método de tinción con Giemsa, facilitando la observación de eritrocitos inmaduros, y dando lugar a resultados más confiables. Esto se debe a que tanto los eritrocitos inmaduros (policromáticos) como los micronúcleos pueden ser fácilmente distinguibles de los eritrocitos maduros (normocrómicos), puesto que los eritrocitos policromáticos se observan de color naranja, los normocrómicos verdes y los micronúcleos amarillos (Figura 14).

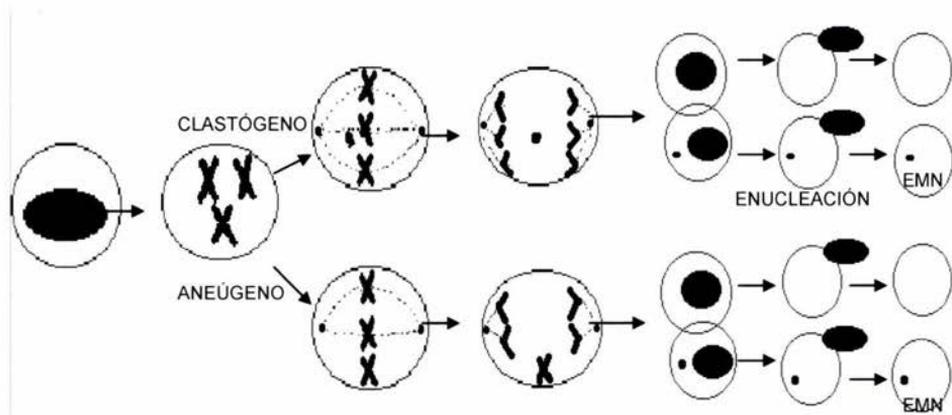


Figura 13. Formación de eritrocitos micronucleados por mutágenos. Las aberraciones cromosómicas estructurales ocurren en el eritroblasto como resultado de la exposición a ciertas sustancias químicas. En la anafase, los fragmentos cromosómicos se retrasan cuando los elementos céntricos se mueven hacia los polos. Después de la telofase, un micronúcleo se forma a partir de los fragmentos cromosómicos. Durante la enucleación, el micronúcleo permanece en el citoplasma, haciéndose más visible en los eritrocitos. Eventos similares ocurren por exposición a sustancias que dañan el huso mitótico; en general un micronúcleo formado de esta manera es más grande. EMN Eritrocito micronucleado. (Sato Y Tomita, 2001).

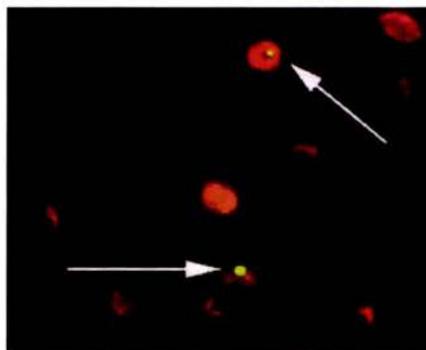


Figura 14. Micronúcleos en eritrocitos policromáticos de ratón (Bose y Col., 2001).

6.2 Ensayo cometa

La electroforesis unicelular en gel o ensayo cometa, es una técnica microelectroforética muy útil para la evaluación del daño y reparación del ADN en células individuales. La técnica se desarrolló para visualizar el daño al ADN inducido por radiación en células de mamíferos (Ostling y Johanson, 1984). Este método tiene muchas aplicaciones en la estimación de daños oxidativos y enlaces cruzados en el ADN, en apoptosis, en monitoreo ambiental, en el análisis de sensibilidad a radiaciones, y en genotoxicidad inducida por compuestos químicos y puede ser aplicado a cualquier célula eucariótica (Ramalho y Col., 1988; McKelvey-Martin, 1993; Collins y Col., 1997).

Las células se encuentran inmersas en gel de agarosa, se lisan, se someten a un campo electroforético y se tiñen con un colorante fluorescente que se une al ADN. Los fragmentos de ADN roto, cargados negativamente, migran hacia el ánodo y las células pueden observarse en un microscopio de fluorescencia para estimar el daño al ADN que forma una cola similar a un "cometa". La cantidad de ADN separado de la cabeza del cometa es proporcional a la magnitud del daño al ADN (Nadin y Col., 2001).

Los cometas pueden ser observados con colorantes como el bromuro de etidio (Figura 15) o yoduro de propidio.

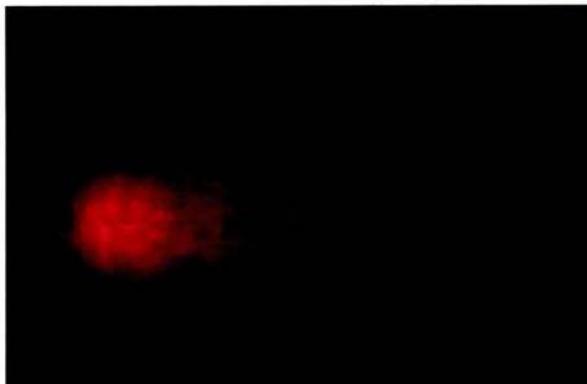


Figura 15. Cometa teñido con bromuro de etidio (Laboratorio de citogenética de la FES Cuautitlán)

6.3 Bando cromosómico

Los métodos de tinción con fluorescencia y con Giemsa que inducen bandas claras y oscuras a lo largo de los cromosomas, desde su descubrimiento han sido indispensables en la identificación de los cromosomas. Entre las técnicas de bandeo con fluorescencia se pueden citar el QFQ (Bando Q por fluorescencia utilizando quinacrina) RFA (Bando R o Reverso por fluorescencia utilizando naranja de acridina) (Verma y Babu, 1995).

Los cromosomas teñidos con quinacrina muestran una serie de regiones luminosas y opacas a todo lo largo de sus brazos. Estas bandas son características de cada cromosoma y contribuyen a su identificación. En el bandeo R se producen bandas inversas a las del bandeo Q (Verma y Babu, 1995; Salamanca, 1990).

Además de la tinción con naranja de acridina existen otros fluorocromos con los que se puede realizar el bandeo R, entre ellos se encuentran la cromomicina A_3 y la olivomicina, así como la incorporación de bromodesoxiuridina en la replicación del ADN durante el periodo terminal de la fase S (Verma y Babu, 1995).

6.4 Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

La técnica de FISH utilizando sondas marcadas no radiactivamente fue reportada por Pinkel y Cramer en 1986 (Tónies, 2002) y se ha aplicado en los últimos años en genómica, citogenética, diagnóstico prenatal, mapeo genético, investigación biomédica básica, etc. (Verma y Babu, 1995; Nikon Microscopy, 2003).

La técnica de FISH se basa en la reasociación de cadenas sencillas de ADN complementarias. La sonda está hecha de fragmentos específicos de ADN unidos a moléculas fluorescentes. El blanco lo constituye ADN desnaturalizado de una cierta muestra (por ejemplo cromosomas metafásicos o núcleo interfásico). Se permite que las secuencias complementarias de la sonda y el ADN blanco se unan (Figura 16). La señal fluorescente correspondiente a la parte específica del ADN de doble cadena se detecta por microscopía de fluorescencia. La FISH puede aplicarse para mostrar regiones cromosómicas específicas o cromosomas completos, simplificando el análisis de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (Metasystems, 2003).

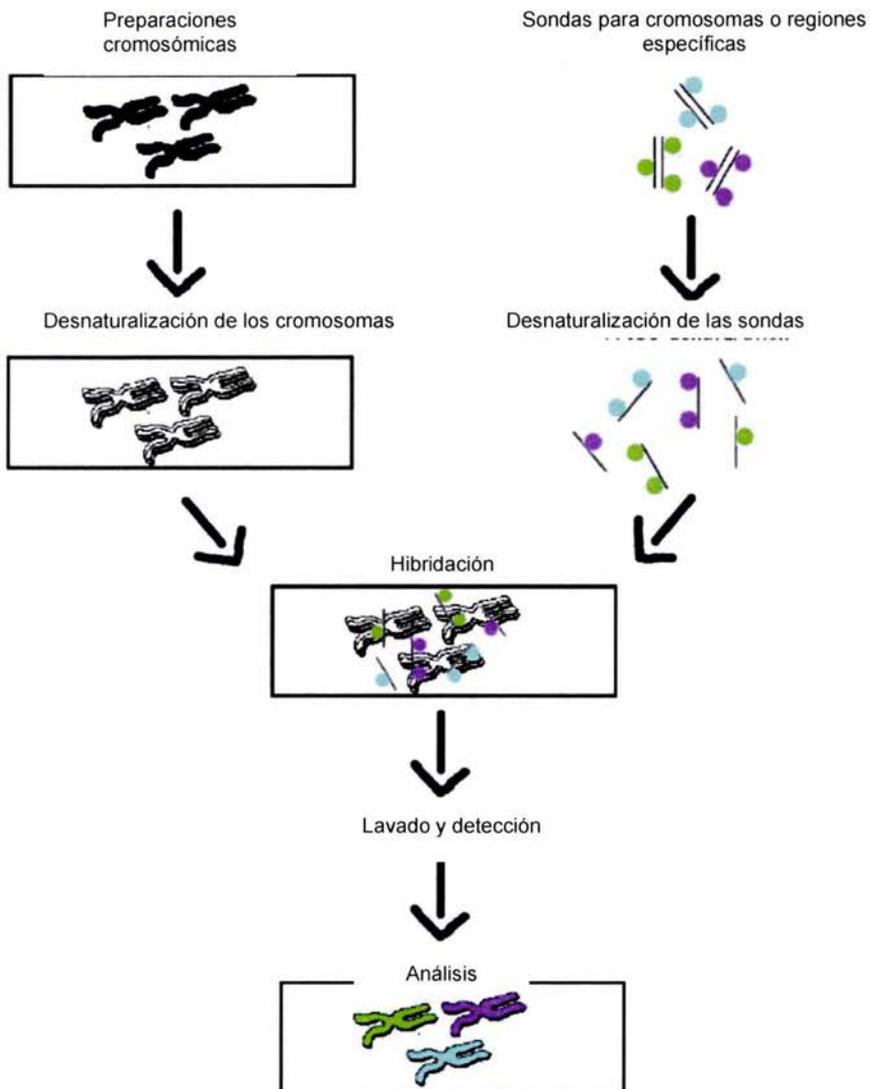


Figura 16. Procedimiento de la Hibridación *in situ* con fluorescencia (Metasystems, 2003)

IV. JUSTIFICACIÓN

IV. JUSTIFICACIÓN

En el Laboratorio de Química Medicinal de la FES Cuautitlán, se han sintetizado un gran número de compuestos orgánicos con diversas aplicaciones, como son, antiparasitarios, inmunoestimulantes, antibióticos, antihipertensivos, entre otros. Algunos de estos compuestos mostraron la propiedad de fluorescencia al ser observados con luz ultravioleta.

Considerando lo anterior y tomando en cuenta que los fluorocromos que actualmente se emplean como marcadores biológicos tienen un costo elevado surgió la idea de utilizar los compuestos fluorescentes con los que se contaba en el Laboratorio de Química Medicinal en técnicas citogenéticas, para analizar la posibilidad de unirlos a material genético y aplicarlos en las técnicas citogenéticas que se realizan con mayor frecuencia y, de esta manera, reducir los costos haciendo más factible el uso de técnicas con fluorescencia aún en laboratorios pequeños.

V. HIPÓTESIS

V. HIPÓTESIS

Si los compuestos orgánicos a estudiar tienen afinidad por el material genético, entonces lo teñirán adecuadamente y permitirán la detección de dicho material por microscopía de fluorescencia.

VI. OBJETIVOS

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la capacidad fluorocrómica de 16 compuestos orgánicos fluorescentes sobre el ADN, con respecto a otros ya existentes, utilizando las técnicas de micronúcleos, ensayo cometa y tinción cromosómica con el fin de aplicarlos en dichas metodologías.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Encontrar la manera de disolver en medio acuoso cada uno de los compuestos para facilitar su uso en las técnicas citogenéticas de micronúcleos, ensayo cometa y tinción cromosómica.
- Probar la capacidad de cada compuesto para teñir fragmentos de cromatina, en comparación con la naranja de acridina, para aplicarlos en la técnica de micronúcleos.
- Probar la capacidad de estos compuestos para teñir material genético interfásico, en comparación con el bromuro de etidio, para utilizarlos en el ensayo cometa.
- Probar la capacidad de estos compuestos para teñir cromosomas metafásicos en comparación con bromuro de etidio.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

VII. MATERIAL Y MÉTODOS**MATERIAL:**

- Abatelenguas
- Agitador magnético
- Balanza analítica
- Cámara de electroforesis
- Centrífuga
- Cubreobjetos
- Estufa de incubación
- Jeringa de 3 ml
- Lámpara de luz UV
- Lanceta estéril
- Matraces aforados de 5, 50, 100 y 250 ml
- Matraces bola
- Micropipetas
- Microscopio de fluorescencia
- Pipetas graduadas de 1,5 y 10 ml.
- Pipetas Pasteur
- Placas de hielo
- Portaobjetos
- Rotavapor
- Vasos Coplin
- Vasos de precipitados
- Vórtex

Reactivos:

- Ácido acético glacial
- Ácido clorhídrico concentrado
- Ácido oxálico
- Ácido sulfúrico 16 N
- Agarosa de bajo punto de fusión
- Agarosa regular
- Cloruro de calcio
- Cloruro de sodio
- Colchicina
- Dimetilsulfóxido
- Hidróxido de sodio
- EDTA disódico
- Fitohemaglutinina
- Heparina
- KCl
- Metanol
- Sarcosinato de sodio
- Tris
- Tripsina
- Bicarbonato de sodio
- Fosfato dibásico de sodio
- Fosfato monobásico de potasio

METODOLOGÍA

Tratamiento de los compuestos orgánicos fluorescentes

Se seleccionaron, de una serie de compuestos sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal, aquellos que fluorecían bajo luz UV.

Con la finalidad de aumentar su solubilidad en medio acuoso, los 16 compuestos seleccionados fueron sometidos a tratamiento con ácido oxálico y posteriormente con cloruro de calcio para la formación de los clorhidratos de cada uno de ellos, formándose sólo el clorhidrato del LQM 245 (soluble en agua).

Los demás compuestos fueron tratados con ácido clorhídrico concentrado y con ácido sulfúrico 16N, solubilizándose únicamente el LQM 231.

Los compuestos que no se solubilizaron con ninguno de los métodos anteriores fueron disueltos en dimetilsulfóxido para ser aplicados como tinción en los procedimientos que a continuación se describen

Tinción de células de la mucosa oral (Díaz-Barriga y Bonilla, 2001)

Se tomaron células de la mucosa oral de una persona del sexo femenino por raspado con un abatelenguas, se depositaron y dispersaron en un portaobjetos, preparándose 16 laminillas, las cuales se fijaron en metanol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos. Se depositaron $50\ \mu\text{l}$ del compuesto correspondiente sobre la preparación y se les colocó encima un cubreobjetos para su observación al microscopio de fluorescencia, comparado con un testigo de bromuro de etidio.

Preparaciones cromosómicas a partir de linfocitos de sangre periférica

(Díaz-Barriga y Bonilla, 2001)

Se tomaron 2 ml de sangre venosa con una jeringa heparinizada en zona estéril.

En cuatro frascos de cultivo estériles se depositaron 8 ml de medio de cultivo McCoy 5a, al cual se adicionaron previamente 250 μ l de una solución de fitohemaglutinina de concentración 2mg/ml (quedando a una concentración de 5 mcg/ml de medio de cultivo), y 0.5 ml de sangre. Se mezclaron y se incubaron a 37° C durante 71 horas.

Después del tiempo de incubación se agregaron 50 μ l de colchicina al 0.04% a cada frasco y se mezclaron. Se incubaron a 37° C por una hora más.

El contenido de cada frasco se centrifugó durante 10 minutos a 3000rpm. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 8 ml de KCl 0.075M a 37° C, resuspendiendo el paquete celular. Se incubaron durante 40 minutos a 37° C.

Se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm. Al paquete celular se le adicionaron 8 ml de una solución 3:1 de metanol-ácido acético fría y después de 15 minutos se centrifugó nuevamente. Este paso se repitió en dos ocasiones más, dejando, después de la última centrifugación, aproximadamente 0.5 ml de solución fijadora y se resuspendió el paquete celular.

Con una pipeta Pasteur se depositaron tres gotas de suspensión celular en portaobjetos fríos desde una altura de aproximadamente 50cm., se flamearon y se dejaron secar al aire

Las laminillas se tiñeron con 50 μ l del compuesto correspondiente contra un testigo de bromuro de etidio y se observaron al microscopio de fluorescencia.

Una vez que se observaron las laminillas con cada uno de los compuestos se llevó a cabo el procedimiento descrito para el bandeado G: Las laminillas se dejaron madurar en la estufa durante 24 horas a 60° C y se sumergieron sucesivamente en vasos Coplin que contenían solución de tripsina a una concentración de 0.4 mg/ml amortiguada a pH 8 con bicarbonato de sodio al 7%

(15 segundos), EDTA al 1% (15 segundos), buffer de fosfatos 0.06 M de pH 6.8 (inmersión en dos vasos con este buffer). Estas laminillas fueron teñidas con cada uno de los compuestos.⁶⁹

Ensayo cometa (Anderson y Col., 1997)

Se calentó agarosa regular al 0.5% en un horno de microondas hasta su fusión, y se agitó hasta su homogeneización, manteniéndose en baño de agua. Para cada laminilla se tomaron 110 μ l de esta agarosa y se depositaron sobre un cubreobjetos, colocando inmediatamente el portaobjetos de manera que la cara esmerilada entrara en contacto con la agarosa. Se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos.

Se mezclaron 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (37° C) con 5 μ l de sangre completa (obtenida, por punción con lanceta estéril, del dedo índice) y dicha mezcla se depositó sobre un cubreobjetos poniendo encima los portaobjetos que tenían la agarosa regular. Se colocaron los portaobjetos sobre una placa de hielo de 3 a 5 minutos hasta su solidificación.

Se retiraron los cubreobjetos de todas las preparaciones y se colocaron lentamente dentro de vasos coplin con solución de lisis fría y recientemente preparada. Estas preparaciones se refrigeraron a 4°C, protegidas de la luz, durante una hora.

Las preparaciones fueron sometidas a electroforesis en buffer pH = 13, después de reposar 20 minutos en dicho buffer, a 25 volts, con corriente de 300 miliamperes, durante 30 minutos.

Las laminillas se enjuagaron tres veces con buffer de neutralización pH 7.5.

⁶⁹ Ver discusión.

Se adicionaron 50 μ l de cada compuesto a las laminillas correspondientes y se montaron con un cubreobjetos para su observación microscópica por fluorescencia, contra un testigo de bromuro de etidio.

Micronúcleos (Hayashi y Col. 1990)

Se depositaron 10 μ l de solución del colorante en un portaobjetos precalentado a 70° C, se distribuyó sobre la superficie y se dejó secar al aire.

Se colocaron 5 μ l de sangre periférica sobre los portaobjetos y se montaron con un cubreobjetos.

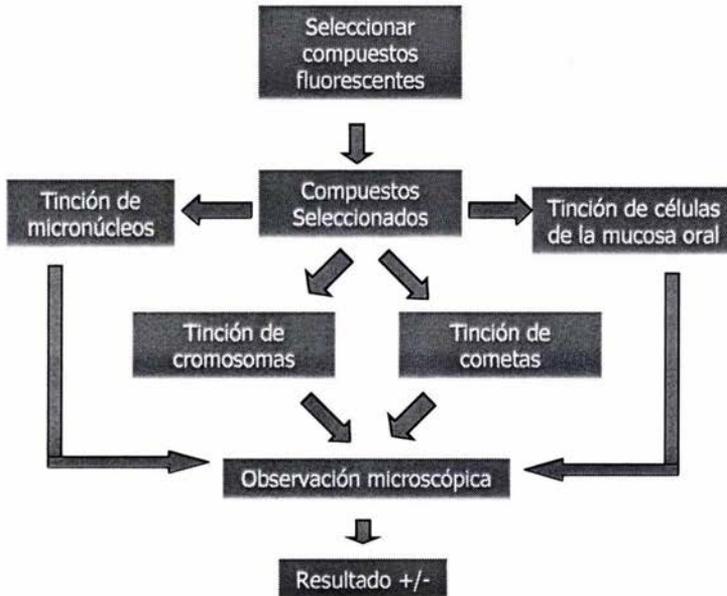


Figura 17. Metodología general seguida en el proyecto

VIII. RESULTADOS

VIII. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados correspondientes a las diferentes tinciones realizadas con los 16 compuestos seleccionados. En el caso de las células de mucosa oral, un resultado positivo indica que con la tinción se manifiesta contraste núcleo – citoplasma y para los cromosomas un resultado positivo indica la tinción homogénea de los mismos.

Compuesto	Tinción de células de mucosa oral	Tinción de cromosomas	Tinción en ensayo cometa	Tinción de micronúcleos
LQM 231	+	+	-	-
LQM 232	+	+	-	-
LQM 233	+	+	-	-
LQM 234	+	+	-	-
LQM 235	+	+	-	-
LQM 236	+	+	-	-
LQM 237	+	+	-	-
LQM 238	+	+	-	-
LQM 239	+	+	-	-
LQM 240	+	+	-	-
LQM 241	+	+	-	-
LQM 242	+	+	-	-
LQM 243	+	+	-	-
LQM 244	+	+	-	-
LQM 245	+	+	-	-
LQM 246	-	-	-	-

Tabla 1. Resultados de la tinción de células de mucosa oral, cromosomas, cometas y micronúcleos.

Las fotografías obtenidas en la observación por microscopía de fluorescencia son las siguientes:



Figura 18. Célula de mucosa oral (a) y cromosomas (b) teñidos con bromuro de etidio como controles positivos

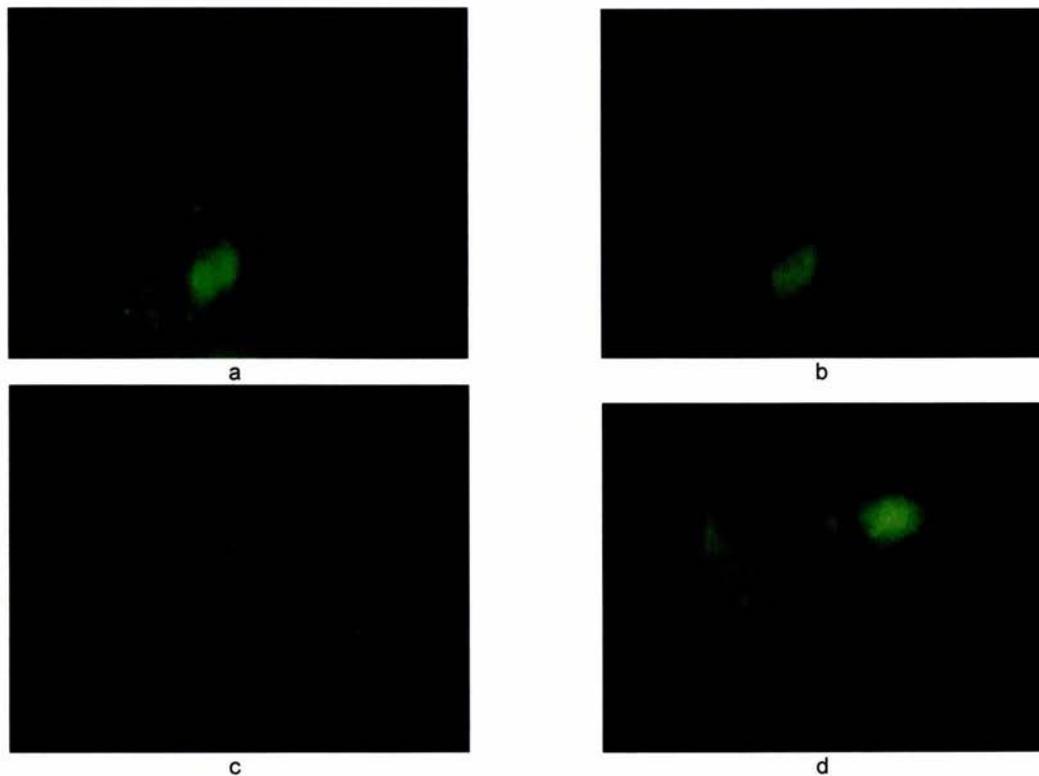


Figura 19. Tinción de células de la mucosa oral con LQM 231 en solución de H_2SO_4 (a y b) y de HCl (c y d) con filtros de excitación de 400-440 nm (a y c) y de 450-490nm (b y d)

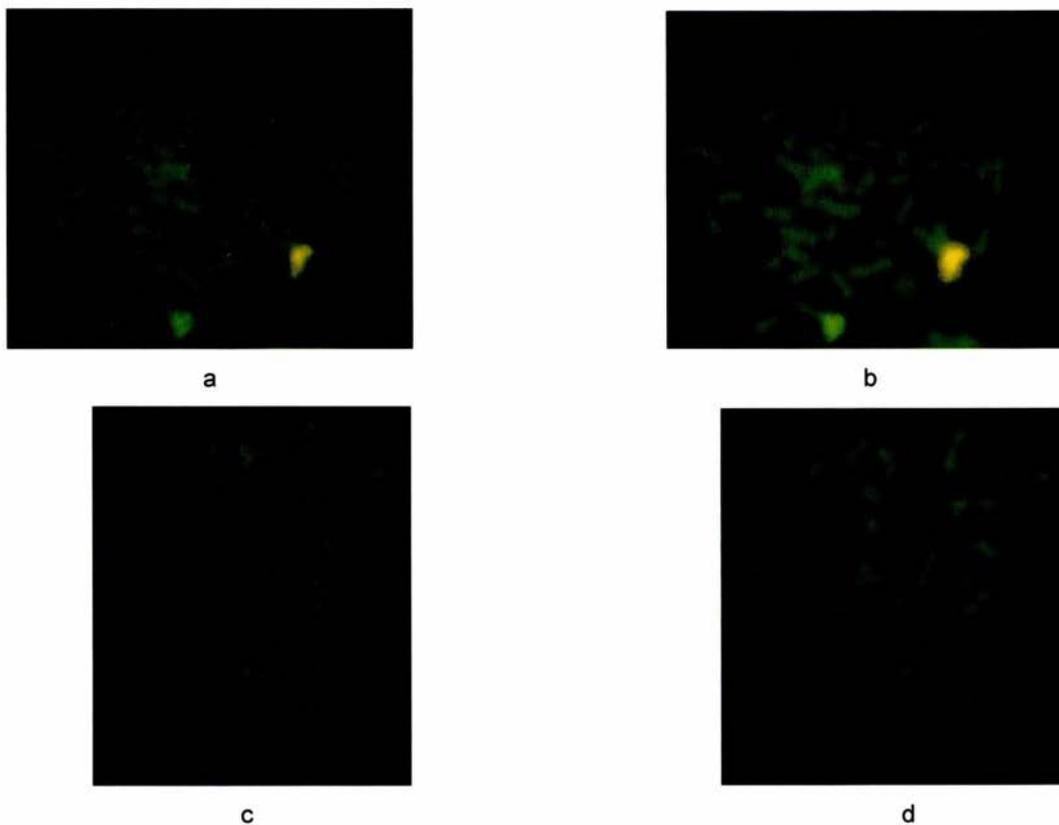


Figura 20. Tinción de cromosomas con LQM 231 (100 mcg/ml) en solución de H_2SO_4 (a y b) y de HCl (c y d) con filtros de excitación de 400-440 nm (a y c) y de 450-490 nm (b y d)

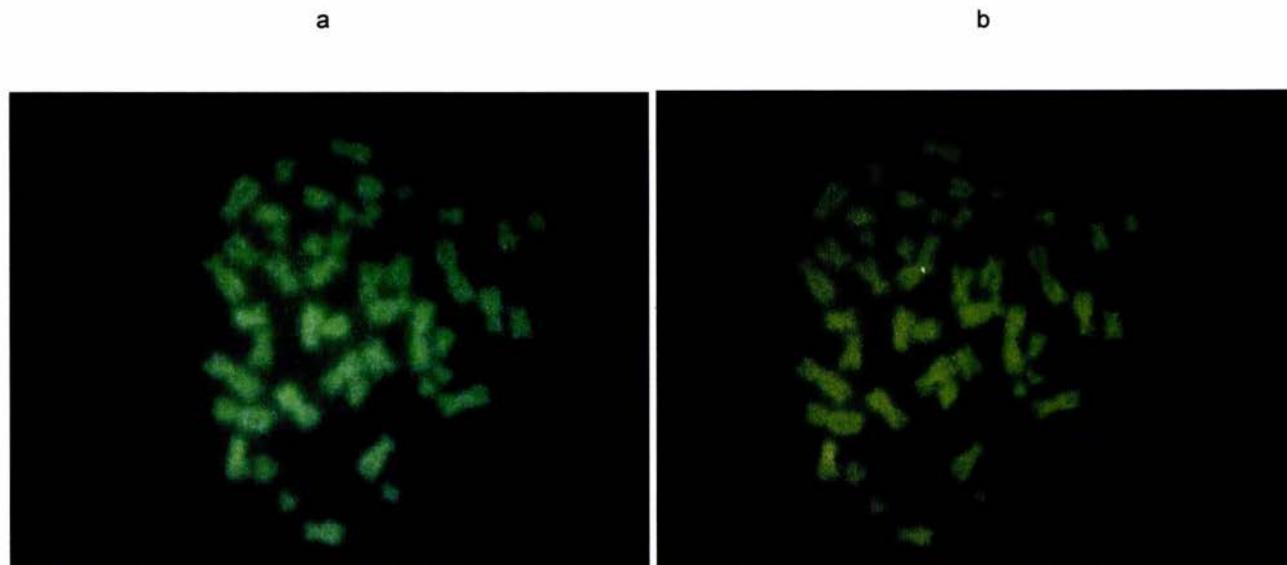


Figura 21. Cromosomas teñidos con LQM 231 (200 mcg/ml) en H_2SO_4 . Filtro de excitación 450-490nm (a) y 400-440 nm (b)

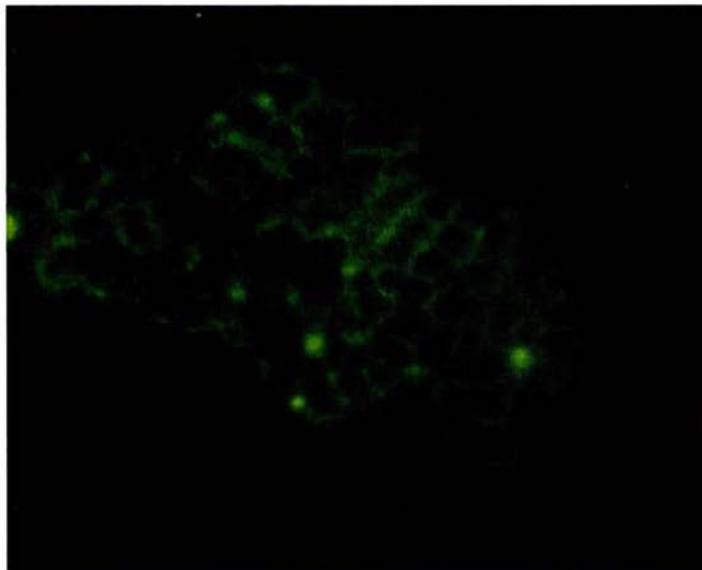


Figura 22. Cromosomas teñidos con LQM 231 después de tratamiento con tripsina

Todos los compuestos, excepto el LQM 246, permitieron la observación microscópica de células de mucosa oral, mostrando mayor afinidad por el núcleo celular y una ligera tinción del citoplasma. De igual forma, fueron los compuestos del LQM 231 al 245 los que tiñeron cromosomas metafásicos, sin embargo, el compuesto que los tiñó de forma más intensa fue el LQM 231 (Figuras 20 y 21).

La tinción, en todos los casos en los que resultó positiva, fue uniforme a lo largo de toda la estructura cromosómica (Figuras 20 y 21), existiendo una mayor definición de la forma y de las constricciones primarias de los cromosomas con el empleo del LQM 231 a una concentración de 200 mcg/ml (Figura 21). Para el resto de los compuestos al aumentar la concentración al doble se dificultó la observación, al incrementarse en gran medida la fluorescencia del fondo.

Al teñir las preparaciones cromosómicas después del tratamiento con tripsina sólo se observó fluorescencia en el contorno de los cromosomas (Figura 22).

Además el LQM 231 tiñó eritrocitos en frotis sanguíneo sin mostrar diferencia alguna de tinción entre eritrocitos normocrómicos y policromáticos. Con los compuestos restantes no se observaron eritrocitos.

En lo que se refiere al ensayo cometa, no se determinó si los compuestos realmente teñían la cromatina, puesto que el gel también fluorescía intensamente limitando la observación microscópica.

IX. DISCUSIÓN

IX. DISCUSIÓN

Desde el punto de vista estructural y pensando en el mecanismo más común de unión de los colorantes al ADN, el intercalamiento, el LQM 231 (Figura 24 a y b) es el único compuesto, de los 16 estudiados que cumple con algunas de las características necesarias para llevar a cabo este mecanismo, pues es una molécula plana, heterocíclica y posee un anillo aromático, sin embargo no cumple con una de las características más importantes que es un área superficial equivalente a tres anillos bencénicos fusionados (Figura 23).

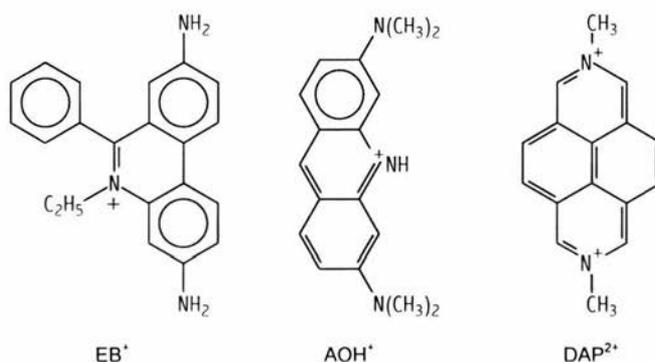


Figura 23. Compuestos con área superficial equivalente a tres anillos bencénicos fusionados, que se intercalan en el ADN de cadena doble: Bromuro de etidio (EB^+), Naranja de acridina (AOH^+) y dicloruro de N,N'-dimetil-2,7-diazapireno (DAP^{2+}). (Ramamurthy, 1998)

Existen ciertos compuestos similares en estructura al LQM 231 (grupo de las cumarinas), como la hidroxicumarina, la aminocumarina y la metoxicumarina, en su forma de succinimidil éster, que se emplean en conjugados proteicos. Por este motivo se llevó a cabo el tratamiento que se realiza previo a la tinción con Giemsa en el bandejo G, de una preparación cromosómica. Al recibir el tratamiento con tripsina, las proteínas asociadas al ADN sufren cierta degradación y era de esperarse que si el LQM 231 se estaba uniendo a dichas proteínas y no al ADN se observara una disminución en la intensidad de la tinción o que los cromosomas simplemente no se tiñeran. Esto puede apreciarse en la Figura 22, donde

únicamente se observan áreas ligeramente teñidas, muy cercanas a los cromosomas, que bien pudieran ser residuos de proteínas. Esto nos lleva a pensar que la tinción de los cromosomas por parte del LQM 231 se debe más que a una interacción con el ADN a la unión a las proteínas asociadas a él. Si se agrega que el LQM 231 mostró fuertemente teñidos los eritrocitos, los cuales contienen gran cantidad de proteína (hemoglobina) es posible que este compuesto se una a proteínas.

Los demás compuestos, excepto el LQM 246, son compuestos heterocíclicos, pero no son aromáticos y no tienen anillos fusionados (Figura 24 c y d), por lo que se descarta la posibilidad de que la tinción de los cromosomas se deba al intercalamiento. En este caso también podría tratarse de la unión a proteínas por lo que se realizó la misma prueba que para el LQM 231 donde se observó algo muy similar, excepto por la intensidad de fluorescencia.

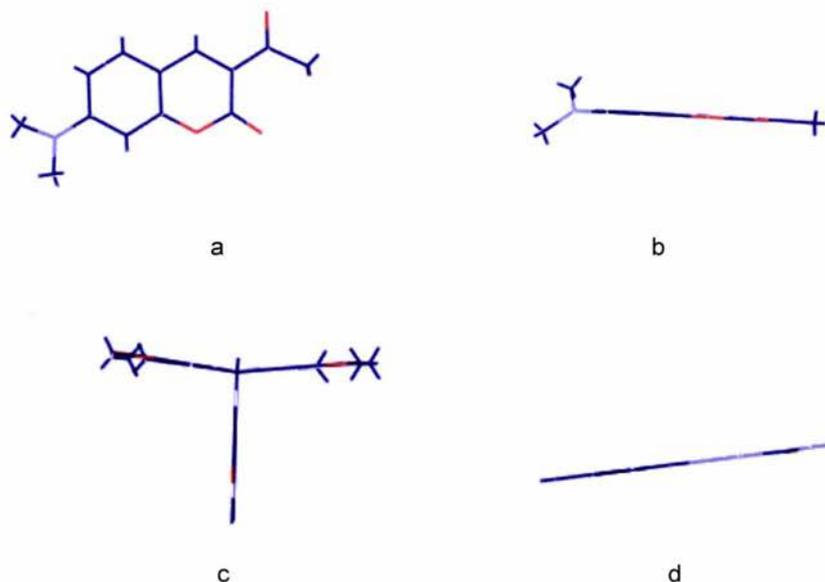


Figura 24. LQM 231 vista frontal (a), LQM 231 vista lateral (b), LQM 238 (c), LQM 246 (d)

Las diferencias en la intensidad de fluorescencia pueden deberse, entre otros factores, a que los filtros utilizados no permitieran el paso de luz de la longitud de onda adecuada que permitiera el máximo de excitación. Asimismo, otro factor que tiene gran influencia en la diferencia de la fluorescencia entre el LQM 231 y los demás compuestos es el disolvente, pues entre más polar es el disolvente se facilitan más los rearrreglos que tienen lugar en la molécula (Hovius y Col., 2000) y debe recordarse que el LQM 231 estaba disuelto en agua, mientras que los otros se encontraban en DMSO.

Por otro lado, el LQM 231 mostró mayor fluorescencia al estar disuelto en la solución de ácido sulfúrico que en la de ácido clorhídrico, lo cual es posible atribuir a que los iones HSO_4^- favorecieran más la fluorescencia que los iones Cl^- al momento de reorganizarse alrededor de las moléculas del fluoróforo durante la etapa de excitación (Hovius y Col., 2000).

Aunque existen diversos métodos para verificar el tipo de interacción de un fluorocromo con el ADN como son, la transferencia de energía potenciada por complejos de lantánido (Wensel y Col., 1985) y variación de la fuerza iónica (McFadyen y Col., 1988), entre otras, convendría de inicio realizar la tinción de geles con ADN puro y con proteínas para descartar por completo una interacción con el ADN.

Es conveniente que se continúe con estos estudios, pues aunque se han reportado diversos usos relacionados con las propiedades fluorescentes de estos compuestos como, por ejemplo, determinación de la polaridad de micelas y vesículas en el caso del LQM 231 (Gao y Col., 2000) y fotosensibilizadores en sistemas de fotopolimerización (en el caso del LQM 231 al 244) no se ha reportado la posibilidad de su empleo para unirse a proteínas.

La principal ventaja de estos compuestos, ya sea que tengan aplicación en técnicas para poner en evidencia ADN o bien, proteínas, es que tendrían un costo

mucho menor al de los compuestos comerciales (Tabla 2), entre 30 y 50 pesos por gramo.

Nombre del colorante	Aplicación	Precio por unidad	Unidad
Hoechst 33258 pentahidratado (bis-benzimida)	Tinción de ADN	59.80	100 mg
DAPI (dicloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol)	Tinción de ADN	83.20	10 mg
SYTOX® Blue tinción para ácidos nucleicos 5 mM solución en DMSO	Tinción de ADN	196.30	250 µl
Naranja de acridina	Tinción de ADN	93.60	1 g
Bromuro de etidio	Tinción de ADN	26.00	1 g
Yoduro de propidio	Tinción de ADN	107.90	100 mg
Yoduro de TOTO®-1 (514/533) 1 mM solución en DMSO	Tinción de ADN	418.60	200 µl
Yoduro de TO-PRO®-1 (515/531) 1 mM solución en DMSO	Tinción de ADN	248.30	1 ml
Succinimidil éster de 5-carboxyrhodamine 6G	Conjugados Proteicos	232.70	5mg
Clorhidrato de 4'-(aminometil)fluoresceína	Conjugados Proteicos	182.00	25mg
7-amino-4-metilcumarina	Conjugados proteicos	81.90	100mg

Tabla 2. Precios de algunos fluorocromos en marzo de 2004 (Molecular probes)

A la ventaja que representa la reducción del costo en la producción, debe sumarse la importancia de efectuar la síntesis de fluorocromos en nuestro país, reduciéndose también los gastos que implica la adquisición de compuestos producidos en otros países. Del mismo modo se ha visto que es factible la producción de compuestos fluorescentes con posibilidades de darles varias aplicaciones por lo que sería conveniente desarrollar métodos que permitan la síntesis de otros fluorocromos, tomando muy en cuenta la búsqueda de compuestos que sean menos tóxicos que los existentes porque como se ha mencionado en el apartado de fluorocromos muchos de ellos poseen una toxicidad muy elevada.

X. CONCLUSIONES

X. CONCLUSIONES

Los compuestos que se estudiaron muestran posibilidades de emplearse en técnicas citogenéticas como colorantes de contraste, sin embargo parecen tener mayores perspectivas para la detección de proteínas, siendo el LQM231 el mejor candidato.

Por lo anterior quedan por realizarse estudios que permitan determinar la posible aplicación de estos compuestos en conjugados proteicos o bien para demostrar la presencia de proteínas en geles y otros medios.

No se encontró utilidad de los LQM's como colorantes en las técnicas de ensayo cometa y micronúcleos.

Los costos de cualquiera de los 16 compuestos son notablemente menores a los comerciales. A ello debe agregarse la importancia de efectuar la síntesis de compuestos fluorescentes en México, incrementándose las ventajas en lo que se refiere a los costos, al evitar los gastos de importación.

El presente trabajo constituye el inicio de futuras investigaciones en el campo de los fluorocromos en la FES Cuautitlán, pues aún faltan por determinar diversos factores como son: genotoxicidad, mecanismo de unión, espectros de excitación y emisión, condiciones específicas de tinción como pH y tiempo de tinción, etc. para los compuestos estudiados; al mismo tiempo debe evaluarse la posibilidad de sintetizar otros compuestos fluorescentes.

XI. APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

-Solución de fitohemaglutinina

Disolver el contenido de un frasco de 5mg de fitohemaglutinina en 2.5 ml de agua destilada estéril y agitar hasta disolver. De esta solución se agregan 250 μ l a un frasco de 100 ml de medio de cultivo McCoy 5a para tener una concentración final de 5 μ g de fitohemaglutinina por mililitro de medio de cultivo.

-Solución de colchicina al 0.04%

Pesar 0.04 g de colchicina y disolverlos en 100 ml de agua destilada. Es importante el uso de guantes y cubrebocas para preparar esta solución.

-Solución de KCl 0.075 M

Pesar 1.3979 g de cloruro de potasio y disolverlos en 250 ml de agua destilada

-Solución fijadora de metanol-ácido acético (3:1)

Mezclar 75 ml de metanol y 25 ml de ácido acético.

-Solución de tripsina

Pesar 20mg de tripsina grado reactivo y disolverlos en 50 ml de agua destilada.

-Solución de bicarbonato de sodio al 7%

Pesar 7 g de bicarbonato de sodio y disolverlos en 100 ml de agua destilada

-Solución de EDTA al 1%

Pesar 500mg de EDTA y disolverlos en 50 ml de agua destilada

-Buffer de fosfatos 0.06M pH 6.8

Pesar 817mg de KH_2PO_4 y disolverlos en 100 ml de agua destilada.

Pesar 852mg de Na_2HPO_4 y disolverlos en 100 ml de agua destilada.

Para obtener la solución de trabajo mezclar 25 ml de cada una de las soluciones anteriores.

-Agarosa regular al 0.75%

Pesar 187 mg de agarosa y disolver en 25 ml de PBS libre de iones de calcio y magnesio.

-Agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%

Pesar 125 mg de agarosa y disolver en 25 ml de PBS libre de iones de calcio y magnesio.

-Solución de lisis

Para preparar la solución stock pesar 146.1g de NaCl, 37.2g de Na₂EDTA, 1.2g de Tris y 1 g de sarcosinato de sodio y disolver en 1l de agua destilada (NaCl 2.5M, Na₂EDTA 100mM y Tris 10mM)

Ajustar a pH 10 con NaOH, en ese momento se solubilizan todos los constituyentes de la mezcla

Tomar 33.5 ml de la solución stock de lisis y adicionar 3.7 ml de Tritón X-100 y 0.4 ml de DMSO

-Buffer de electroforesis

Pesar 100 g de NaOH y disolver en 250 ml de agua destilada (la vida media de esta solución es de dos semanas).

Pesar 3.7175 g de EDTA y disolver en 50 ml de agua destilada (EDTA 200mM).

Para correr la electroforesis mezclar 30 ml de la solución de NaOH y 5 ml de la solución de EDTA y aforar a un litro con agua destilada.

-Buffer de neutralización

Pesar 12.125 g de Tris y aforar a un litro con agua destilada (Tris 0.4M). Llevar a pH 7.5 con HCl concentrado.

XII. GLOSARIO

XII.GLOSARIO

Autoapagado Reducción aparente de la fluorescencia de un fluorocromo debido a la presencia cercana de otras moléculas fluorescentes.

Autofluorescencia Propiedad de algunas sustancias de emitir fluorescencia sin estar unidas a un fluorocromo.

Clastógeno Agente que provoca la ruptura de la cadena de ADN.

Cometa Estructura formada por fragmentos de ADN de células sometidas a electroforesis, que forman una cola cuya longitud es un índice del daño al material genético por un agente determinado.

Cromosoma Estructura bien organizada, formado por cromatina (ADN y proteínas), que se encuentra en el interior del núcleo celular.

Enucleación. Expulsión del núcleo.

Eritrocito normocrómico Eritrocito maduro en cuyo interior no se encuentra ARN y manifiesta una coloración rosada al teñirse con Giemsa.

Eritrocito policromático Eritrocito joven (reticulocito) recién expulsado de la médula ósea que presenta una coloración particular debida a la presencia de ARN mostrándose con un tono violáceo al teñirse con Giemsa.

Espectro de emisión Gráfica de la intensidad de luminiscencia en función de la longitud de onda de luminiscencia, obtenida cuando se utiliza una longitud de onda fija para la excitación.

Espectro de excitación. Gráfica de la intensidad de luminiscencia (medida a una longitud de onda fija) en función de la frecuencia o de la longitud de onda de excitación

Estado basal Estado de un átomo o de una molécula en el que su energía es mínima.

Estado excitado Cualquier estado de un átomo o molécula que tiene más energía que el mínimo posible.

Fluorocromo Molécula que tiene la capacidad de absorber radiación ultravioleta y emitir la energía absorbida de una manera que pueda ser vista a través del ojo humano.

Fotón Partícula de radiación electromagnética que lleva energía $h\nu$, donde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia de la radiación.

Infrarrojo Región del espectro electromagnético que se encuentra a longitudes de onda mayores a la región visible (por encima de 780 nm)

Intercalante Molécula que tiene la capacidad de introducirse entre la doble cadena de ADN.

Longitud de onda Distancia entre dos crestas sucesivas de una onda.

Luminiscencia Cualquier emisión de luz por una molécula.

Micronúcleo. Masa de cromatina citoplasmática con aspecto de núcleo pequeño que surge de fragmentos de cromátides o cromosomas rezagados en anafase

Ultravioleta Región del espectro electromagnético que se encuentra a longitudes de onda menores a la región visible (por debajo de 380 nm).

XIII. REFERENCIAS

XIII. REFERENCIAS

1. Abramowitz, M. y Davidson, M. W. (2003) Microscopía de fluorescencia: Conceptos introductorios:
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorources.html>
2. Anderson, D.; Yu, T.-W.; Browne, M.A. (1997) The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the comet and fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) assays, *Mutation Research*, 390, 69 – 77.
3. Axelrod, D.; Murray, J. M.; Piston, D. W.; Abramowitz, M.; Fester, W., Kawano, Y., Enders, R.G., Spring, K., Long, J., Parry-Hill, M. J.; Davidson, M. W. (2000) Microscopía de fluorescencia:
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorources.html>
4. Bieniarz, C. (1995) Intercalators having affinity for DNA and methods of use (Patente WO 95/01341), *World Intellectual Property Organization*.
5. Bose, M., Smith, L.E., Petrini, J., Concannon, P., Morgan W.F. (2001) Genetic factors affecting susceptibility to low-dose radiation;
<http://lowdose.tricity.wsu.edu/2001mtg/abstracts/smith/htm>
6. Brown, D.G., Sanderson, M.R., Garman, E, Neidle, S. (1992) Crystal structure of a berenil-d(CGCAAATTTGCG) complex. An example of drug-DNA recognition based on sequence-dependent structural features, *Journal of Molecular Biology*, 226, 481-490.
7. Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinká, M., Kennedy, G., Stetina, R. (1997) Te comet assay: what can it really tell us?, *Mutation Research*, 375, 183 – 193.
8. Díaz-Barriga, S., Bonilla, R. (2001) Técnicas básicas en citogenética: Elaboración y análisis de cariotipos, UNAM, 60 pp.
9. Gao, F., Li, H., Yang, Y. (2000) Influence of the molecular structure and medium on the absorption and emission character of ketocoumarin derivatives and probability of as fluorescence probes, *Dyes and pigments*, 47, 231-238

10. Hamann, S.; Kiilgaard, J. F., Litman, T., Álvarez-Leefmans, F.J, Winther, B.R., Zeuthen, T. (2002) Measurement of cell volume changes by fluorescence self-quenching, *Journal of Fluorescence*, 12, 139-145
11. Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M (1983) An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Research*, 120, 241-247.
12. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M.(1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research*, 245, 245-249.
13. Heimstadt, O. Filter for fluorescence microscopes (1911) Patente No. DE262432.
14. Henriques-Gil N., Parker J.S., Puertas M.J.(1997) *Chromosomes today*, vol. 11, Chapman & Hall, Madrid.
15. Hovius, R., Vallotton, P., Wohland, T., Vogel H.(2000) Fluorescence techniques: shedding light on ligand-receptor interactions, *Trends In Pharmacological Sciences*, 21, 266 –273
16. Jansen, K., Lincoln, P., Norden, B. (1993) Binding of DAPI analogue 2,5-bis(4-amidinophenyl)furan to DNA, *Biochemistry*, 32, 6605-6612.
17. Laugaa, P., Markovits, J., Delbarre, A., Le Pecq, J. B., Roques, B.P. (1985) DNA tris-intercalation: first acridine trimer with DNA affinity in the range of DNA regulatory proteins. Kinetic studies, *Biochemistry*, 24, 5567-5575.
18. Lin, M.S., Comings, D.E., Alfí, O.S. (1977) Optical studies of the interaction of 4'-6-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes, *Chromosoma*, 60, 15-25
19. Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000) *Biología celular y molecular*, 4ª ed, Médica Panamericana, Madrid.
20. Loveland, Roger P.(1981) *Photomicrography: a comprehensive treatise*, vol. II, John Wiley & Sons, United States of America, 1039 pp.
21. McFadyen, W. David, D., William A., Wakelin, L. (1988) Alkyl-linked diquinolines are monofunctional AT-selective DNA-intercalating agents, *FEBS Letters*, 228, 235-240.

22. McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Méo, M.P., Collins, A. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): A European review, *Mutation Research*, 288, 47 – 63.
23. Metasystems (2003): <http://www.metasystems.de>
24. Molecular probes (2003): <http://www.probes.com>
25. Nadin, S.B., Vargas-Roig L.M., Ciocca, D.R. (2001) A silver staining method for single-cell gel assay, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49, 1183-1186.
26. Nikon Microscopy (2003):
<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/insitu/brennerinsitu.html>
27. Nunn, C.M., Jenkins, T.C., Neidel, S. (1993) Crystal structure of d (CGCGAATTCGCG) complexed with propamide, a short-chain homologue of the drug pentamidine, *Biochemistry*, 32, 13838-13843.
28. Olson, S.B., Magenis, R.E., Lovrien, E.W. (1986) Human chromosome variation: the discriminatory power of Q-band heteromorphism (variant) analysis in distinguishing between individuals, with specific application to cases of questionable paternity, *American Journal of Human Genetics*, 38, 235-252
29. Ostling, O., Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemistry and Biophysics Research Community*, 123, 291-298
30. Ramalho, A.T., Sinjevaric, I., Natarajan, A.T. (1988) Use of the frequency of micronuclei as quantitative indicator of X ray induced chromosomal aberration in human peripheral blood lymphocytes. Comparison of two methods, *Mutation Research*, 207, 141-146.
31. Ramamurthy, V., Schanze, K. (1998) *Organic and inorganic photochemistry*, Marcel Dekker, U.S.A., 355 pp.
32. Reichter, K. (1912) *Fluorescence Microscope. Physic.* 1912. 12: 1010-1011
33. Salamanca, F. (1990) *Citogenética humana: fundamentos y aplicaciones*, Médica Panamericana, México, 400 pp.

34. Sato, S., Tomita, I. (2001) Short-term screening method for the prediction of carcinogenicity of chemical substances: current status and problems of an in vivo rodent micronucleus assay, *Journal of Health Science*, 47, 1-8.
35. Schweizer, D. (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI, *Chromosoma*, 58, 307-324
36. Schweizer, D. (1981) Counterstain-enhanced chromosome banding, *Human Genetics*, 57, 1-14
37. Smith, J. (2002) Quinacridone derivatives as labelling reagents for fluorescence detection of biological materials (Patente WO 02/099432A2), World Intellectual Property Organization.
38. Smith, P.J. Smith, Wiltshire, M., Davies, S., Patterson, L.H., Hoy, T. (1999) A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry, *Journal of Immunological Methods*, 229, 131 – 139.
39. Smith, R. (1990) *Microscopy and photomicrography: a working manual*. CRC Press, United States of America, 135 pp.
40. Timcheva, I., Maximova, V. A., Deligorgiev, T. G., Gadjev, N. I., Sabnis, R.W., Ivanov, I. G. (1997) Fluorescence spectral characteristics of novel asymmetric monomethine cyanine dyes in nucleic acid solutions, *FEBS Letters*, 405, 141-144.
41. Tönies, H. (2002) Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics, *TRENDS in Molecular Medicine*, 8, 246-250
42. University of Georgia, The Division of Biological Sciences (2003): http://www.biosci.uga.edu/almanac/archive/fall_98/cb_3410/Mitosis.htm
43. University of Illinois, The Imaging Technology Group (2003): <http://www.itg.uiuc.edu/publications/techreports/99-006/fluorescence.htm>
44. University of Kiel, Botanical Institute (2003): <http://www.microscope.de/fluoro.html>
45. VanDiemen, P.C.H., Maasdam, D., Vermeulen, S., Darrovdí, F., Natarajan, A.T. (1995) Influence of smoking habits on the frequencies of structural and numeric

- chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes using the fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) technique, *Mutagenesis*, 10, 487 – 495
46. Verma, R., Babu, A. (1995) *Human Chromosomes principles and techniques*, 2a ed., McGraw-Hill, U.S.A., 419 pp.
47. Weisblumlab antibiotics (2003):
<http://weisblumlab.pharmacology.wisc.edu/306.htm>
48. Wensel, T., Chang, C. H., Meares, C. F. (1985) Diffusion-enhanced lanthanide energy-transfer study of DNA-bound Cobalt (III) Bleomycins: comparisons of accessibility and electrostatic potential with DNA complexes of ethidium and acridine orange, *Biochemistry*, 24, 3060-3069.