



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Polimorfismo C677T del gen de la enzima
Metilentetrahidrofolato reductasa humana y su relación
con el daño cromosómico producido por agentes químicos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ROXANNA PEREZ GARMENDIA

TUTOR: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO



2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto Nacional de Cancerología bajo la Tutela del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, con el apoyo de DGAPA por medio de los PAPIIT (IN207105) y de CONACYT (45875-M).

Indice

Resumen-----	9
Introducción	
• Metilen-tetrahidrofolato Reductasa Humana-----	11
• Ciclo de los grupo Metilo-----	16
• Polimorfismo C677T-----	20
• Importancia Clínica del Polimorfismo C677T-----	24
• Papel de la Metilación en la estabilidad Cromosómica y en la regulación de la expresión génica-----	29
• Importancia de la Proporción UMP/TMP en la estabilidad cromosómica-----	31
• Inestabilidad Cromosómica-----	31
Justificación-----	34
Hipotesis-----	34
Objetivo-----	34
Objetivos Específicos-----	34
Metodología A-----	35
Metodología B-----	36
Metodología C-----	46
Análisis Estadístico-----	50
Resultados	
• Genotipificación del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR humana-----	52
• Conteo de Micronúcleos de linfocitos humanos expuestos a agentes químicos -----	56
• Resultados de Micronúcleos bajo condiciones de déficit de folatos-----	67
• γ - H2A.X-----	75
• Resultados cuantificación de Histonas-----	76
• Resultados Western Blot-----	82
Discusión-----	88
Conclusión-----	94
Referencias-----	96

Abreviaturas

MTHFR	Metilentetrahidrofolato Reductasa
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
KDa	Kilodaltones
FAD	Flavin-Adenina Dinucleótido
Lys	Lisina
Arg	Arginina
Glu	Ácido Glutámico
mRNA	RNA mensajero
5 ^m CpG	citiosinas metilados en sitios CpG
GART	glicinamida ribonucleotido transformilasa
AICAR	aminoimidazol carboxamida transformilasa
SAM	S-adenosil Metionina
SAH	S-adenosil homocisteina
Hcy	Homocisteina
THF	Tetrahidrofolato
5-MetilTHF	5-metil Tetrahidrofolato
5,10-MetilenTHF	5,10-Metilen tetrahidrofolato
UMP	Uridilato
TMP	Timidilato
10-formilTHF	10-formil tetrahidrofolato
ALA	Alanina
VAL	Valina
Vmax	Velocidad Máxima
BSA	Albumina de Suero bovino
HMG	Proteínas con grupos de alta movilidad
ERK	cinasa regulada por señal extracelular
SAE	S-adenosil etionina
ATP	adenosín trifosfato
DNMT	DNA metil transferasa
MN	micronúcleo
5-aza	5 azacitidina
Rpm	revoluciones por minuto

PCR

Reacción en cadenas de la polimerasa

Ind

individuo

Abreviaturas de medidas:

G

Gramos

Mg

Miligramos

μ g

Microgramos

Ng

Nanogramos

ml

Mililitros

μ l

Microlitros

M

Moles

Mm

Milimoles

μ M

Micromoles

nM

Nanomoles

Pmoles

Picomoles

Pb

Pares de bases

Kb

Kilobases

H

Horas

Min

Minutos

Seg

Segundos

Resumen

La Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es la flavoproteína que cataliza la reducción irreversible del 5,10- metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, principal forma de folato en el plasma, mediante la utilización de NADPH como agente reductor. El 5-metilTHF es la forma coenzimática del folato que provee los grupos metilos necesarios para llevar a cabo la síntesis de novo de la metionina y las reacciones de transmetilación celular, mientras que el 5,10-metilenTHF es requerido para la conversión de deoxiuridilatos a timidilatos y puede ser oxidado para formar 10-formilTHF para la síntesis de novo de purinas. El polimorfismo C677T de este gen está asociado con una disminución en la actividad enzimática, lo cual, favorece un incremento en la disponibilidad de 5,10-metilentetrahidrofolato para la síntesis y reparación del DNA acompañado de una disminución en la disponibilidad de 5-metiltetrahidrofolato para su metilación. Esta situación favorece la síntesis de timidilatos sobre la metilación de las citocinas, minimiza la incorporación de uracilos al DNA y por lo tanto los rompimientos cromosómicos resultantes.

En el presente estudio se evaluó el efecto del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR humana en la respuesta a la inducción del daño cromosómico en linfocitos humanos expuestos a agentes químicos. Observamos que los individuos con genotipo CC presentan una mayor frecuencia de micronúcleos, sin exposición a sustancias, sin embargo bajo condiciones de deficiencia de ácido fólico el comportamiento cambia promoviendo que los individuos con el genotipo TT presenten un mayor daño cromosómico. Con el tratamiento a agentes Desmetilantes observamos que bajo condiciones de déficit de ácido fólico la Azacitidina induce una menor frecuencia de micronúcleos en los individuos TT. Con agentes Clastógenos, observamos, bajo condiciones de deficiencia de ácido fólico, que los individuos TT presentan una menor frecuencia de daño. También encontramos que son estos individuos con genotipo TT los que menores niveles de γ -H2A.X presentaron. Tras el tratamiento con Arsenito de Sodio observamos que los individuos CT presentan una mayor cantidad de micronúcleos a las 48 h, condición que se mantiene bajo condiciones de deficiencia de ácido fólico. Con el Arsenito de Sodio existe una tendencia de los individuos TT a presentar una menor cantidad de dicha histona, lo cual refleja menor cantidad de

rompimientos de doble cadena, sin embargo a las 72 h los individuos CC y TT presentan la misma frecuencia de ellos

Podemos con esto concluir que el polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR es capaz de promover una respuesta diferencial a la susceptibilidad de presentar daño cromosómico ante la exposición a agentes químicos, principalmente cisplatino y arsenito de sodio bajo condiciones de déficit de ácido fólico. Esta susceptibilidad puede ser atribuida a la distribución diferencial de las unidades de carbono hacia la síntesis de purinas y timidilatos sobre la metilación del DNA.

Introducción

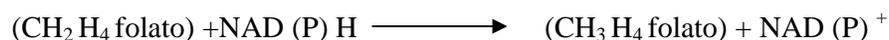
Metilen-tetrahidrofolato Reductasa Humana.

La Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (5-metil- tetrahidrofolato: (aceptor) oxidoreductasa, EC1.7.99.5) es la flavoproteína que cataliza la reducción irreversible del 5,10- metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, principal forma de folato en el plasma, mediante la utilización de NADPH como agente reductor [1]. Esta flavoproteína consiste de dos subunidades idénticas de aproximadamente 70 kDa [2]. En humanos, el gen de la MTHFR codifica mayoritariamente una proteína catalíticamente activa de 77 kDa, aunque se ha detectado un polipéptido adicional de 70 kDa en tejido de hígado [3].

La MTHFR se compone de 2 dominios: un dominio catalítico N-terminal que realiza la reacción enzimática, y un dominio C-terminal que regula la actividad de la enzima en presencia de inhibidores alostéricos. Esto se demostró tras realizar una digestión proteolítica de la enzima que medió la ruptura de cada subunidad en dos fragmentos, uno de 40 kDa perteneciente a la región N-terminal, y otro de 37 kDa perteneciente al C-terminal. La separación de estos dos dominios resultó en la pérdida de la capacidad de la MTHFR de ser regulada alostéricamente sin que su actividad enzimática fuera afectada, lo que llevó a sugerir que el dominio catalítico y regulador de la enzima consisten en regiones separadas [4]. El dominio catalítico de la MTHFR posee determinantes para poder asociarse a FAD, NADPH y al metilentetrahidrofolato. Al ser una enzima dimérica, la MTHFR posee dos moléculas de FAD unidas no covalentemente a cada dímero. Ambos dominios se encuentran enlazados por una región extremadamente hidrofóbica conformada por Lys-Arg-Arg-Glu-Glu-Asp.

La estructura de la MTHFR consiste en un barril $\beta_8 \alpha_8$, y es la única enzima con este tipo de estructura capaz de asociarse a FAD [5].

La MTHFR cataliza la reducción del 5,10- metilentetrahidrofolato ($\text{CH}_2 \text{H}_4$ folato) a 5-metiltetrahidrofolato ($\text{CH}_3 \text{H}_4$ folato) conforme a la siguiente ecuación:



El cofactor de Flavin adenin dinucleótido acepta los equivalentes de reducción del NADPH y los transfiere hacia el metilentetrahidrofolato. Esta es la única reacción que sintetiza metiltetrahidrofolato dentro de la célula. La reacción catalizada por la MTHFR es irreversible tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*, y su actividad se encuentra regulada por S-adenosilmetionina.

El gen de la MTHFR humana se encuentra localizado en el cromosoma 1p36.3 y codifica para una proteína de 656 aminoácidos. El cDNA tiene un tamaño de 2.2 kilobases y está compuesto por 11 exones. El tamaño de los exones varía en tamaños desde 102 pb hasta 432 pb y los intrones varían entre 250 pb hasta 4.2 Kb.

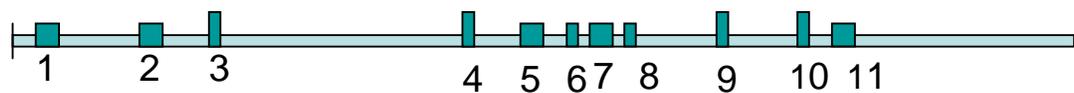


Figura1. Representación esquemática del gen de la enzima MTHFR humana. Los cuadros azules representan los exones.

La enzima que es codificada por este cDNA es la proteína catalíticamente activa de 70 kDa, pero la presencia de la proteína de 77 kDa encontrada en otros tejidos, sugiere que la presencia de isoformas de la MTHFR es tejido específico [6]. Hasta ahora, se han encontrado 3 diferentes transcritos para la MTHFR en células humanas con tamaños estimados en 2.8 Kb, 7.2-7.7 Kb y de 9.5-9.8 Kb. El mRNA de 2.8 y el de 7.2 Kb se ha detectado en todos los tejidos humanos, mientras que el de 9.8 Kb solo se ha encontrado en cerebro, músculo, placenta y estómago [6]. El mRNA de la MTHFR tiene poca abundancia en los tejidos humanos, sin embargo, los tejidos que mayores niveles que de éste presentan son el corazón, pulmón y testículo; el cerebro, placenta bazo y estómago presentan niveles intermedios, y el colon, riñón, hígado músculo esquelético e intestino delgado poseen bajos niveles de expresión. Las proporciones relativas de los 3 diferentes mRNA varían entre tejidos; por ejemplo, en el testículo se encuentran niveles semejantes del mRNA de 2.8 Kb y el de 7.2 Kb, mientras tanto, en el resto de los tejidos, el mRNA que se encuentra predominantemente es el de 7.2 Kb. Estos datos sugieren que la expresión de la MTHFR posee diferencias que son tejido

específicas de manera cualitativa y cuantitativa [7]. La presencia de estos diferentes mRNA de la MTHFR se debe a 3 factores: la presencia de múltiples sitios de iniciación de la transcripción y de la traducción, a una maduración diferencial del mRNA, y a la presencia de diversos sitios de poliadenilación. Estas características generan heterogeneidad en las regiones 5' y 3' no traducibles, diferentes isoformas de la proteína y aluden a múltiples regiones promotoras y a un sistema de regulación complejo.

La generación de transcritos por poliadenilación alternativa puede contribuir significativamente a la regulación. En los genes donde se encuentran varias secuencias en la región 3' no traducible los diferentes mRNA poliadenilados generados son normalmente el resultado de la expresión diferencial durante el desarrollo o es tejido específico. Se ha detectado, que el mRNA de 2.8 Kb se produce debido a la presencia de una señal de poliadenilación no-canónica AGAAAA, encontrada a 629 pb río abajo del codón de terminación. El mRNA resultante es cortado y poliadenilado a 24 pb de la señal en un dinucleótido CA (secuencia preferencial para la poliadenilación del mRNA en eucariontes). También se ha encontrado una señal consenso de poliadenilación AATAAA a 4937 pb río abajo del codón de terminación. El mRNA es cortado a 15 pb de esta señal y poliadenilado en el dinucleótido CA. Esta señal es la que es utilizada por el mRNA de 7.2 y 9.8 Kb. El mRNA más largo producido a partir de la señal consenso AATAAA, puede ser poliadenilado más eficientemente que el transcrito más corto producido a partir de la señal no consenso. El tamaño y la secuencia de la región 3' no traducible del mRNA puede brindarle diferentes grados de estabilidad [7]. En un estudio realizado por Poselo en 1994 se observó, que solo el 4% de los mRNA de la MTHFR humana poseían regiones 3' no traducibles mayores a 3500pb.

La diferencia encontrada entre el transcrito de 7.2 y 9.8 pb ha sido atribuida a la presencia de dos diferentes sitios de inicio de transcripción a 206 y 243 pares de bases del codón ATG de iniciación. Se sugiere que el transcrito más grande se debe a la presencia de secuencias adicionales en el extremo 5'. La presencia de estos dos sitios de inicio de la transcripción, proximal y distal, sugieren la presencia de dos regiones promotoras. Cerca del promotor proximal, el cual se encuentra cerca del sitio de iniciación de la transcripción para los mRNA's de 2.8 y 7.2 Kb, se encuentran dos sitios de unión para el factor de transcripción SP1. En la región del promotor distal se identificaron 6 sitios de unión para el factor SP1, así como sitios de unión para AP2 y

USF. En la región encontrada entre ambos promotores se reconocieron sitios de unión para Sp1, NF-GMA, HINF-3, c-Rel, UTRF, NF-kB, E2F1 y AP1. El contenido GC en la región que contiene ambos promotores es de 58% y se localizaron 2 islas CpG (2156 a -2387 y de -2615 a -2973) [7].

La MTHR posee splicing alternativo en el exón 1, lo que genera regiones 5' no traducibles de diferentes tamaños, lo cual tiene una gran influencia en la eficiencia traduccional, brindándole una mayor eficiencia a los mRNA's que posean secuencias más cortas y con menor cantidad de GC's. En el exón 1, río arriba del sitio de iniciación de la transcripción, se han localizado 6 sitios de corte (1-6) y 3 sitios de empalme (A-C), lo que puede llevar a la producción de múltiples mRNA's. A su vez, se han detectado dos sitios de iniciación de la traducción o codones ATG. Se ha detectado, que el corte generado del sitio 6 al B, genera la proteína de 77 kDa encontrada en los tejidos humanos [8].

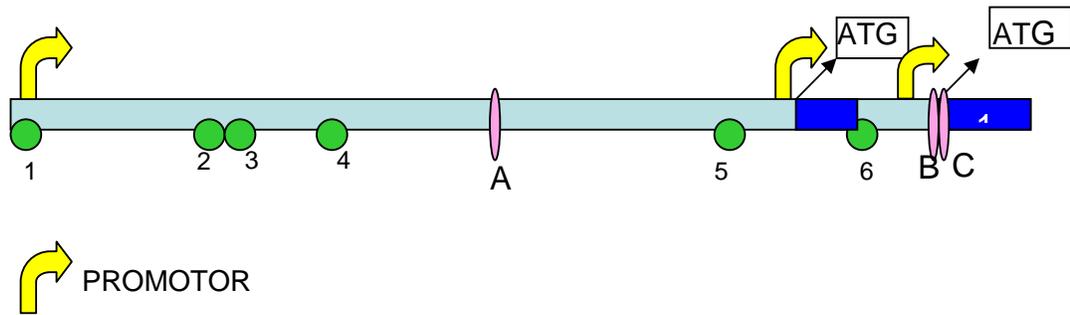


Figura 2. Representación esquemática de los posibles sitios de iniciación de la transcripción en el mRNA de la MTHFR

Para la traducción de la proteína de 70kDa se ha determinado que el codón de iniciación es el previamente reportado, el cual, se localiza en el exón 1. Para que se pueda sintetizar eficiente esta isoforma se debe dar el corte y empalme del mRNA en la región 1 –B, ya que de esta manera se elimina el otro codón de iniciación localizado río arriba del sitio de corte 6. Los transcritos que no son cortados en el sitio 1 poseen regiones 5' no traducibles mas largas y con mayor contenido de CG's los cuales generan estructuras secundarias a través de las cuales debe pasar el ribosoma. [8]

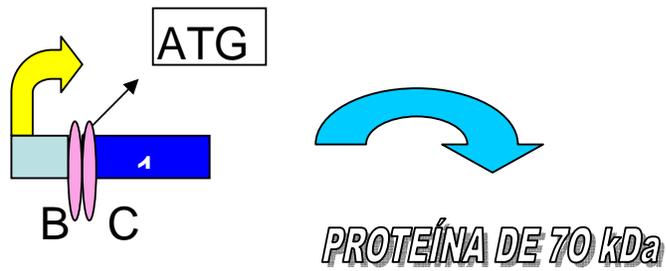
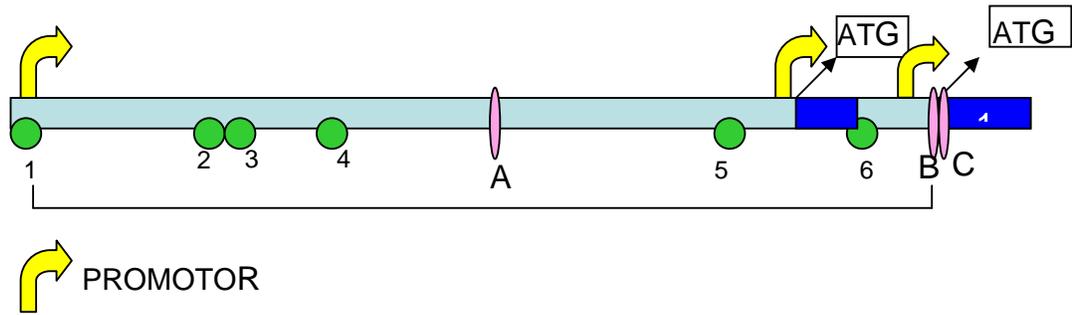
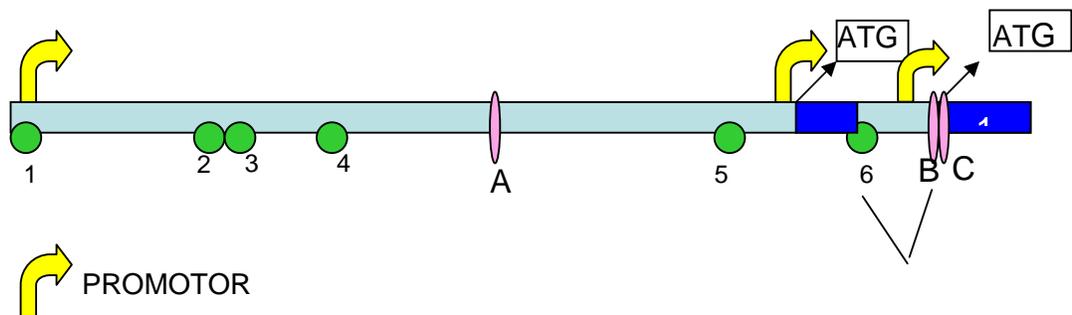


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de splicing alternativo del mRNA de la MTHFR para sintetizar la isoforma de 70 kDa.

Para que pueda traducirse la proteína de 77 kDa, es necesario que se lleve a cabo el corte del mRNA en la región 6-B, lo que permite que el inicio de la traducción se dé a partir del codón ATG encontrado río arriba del sitio 6 en el exón 1.



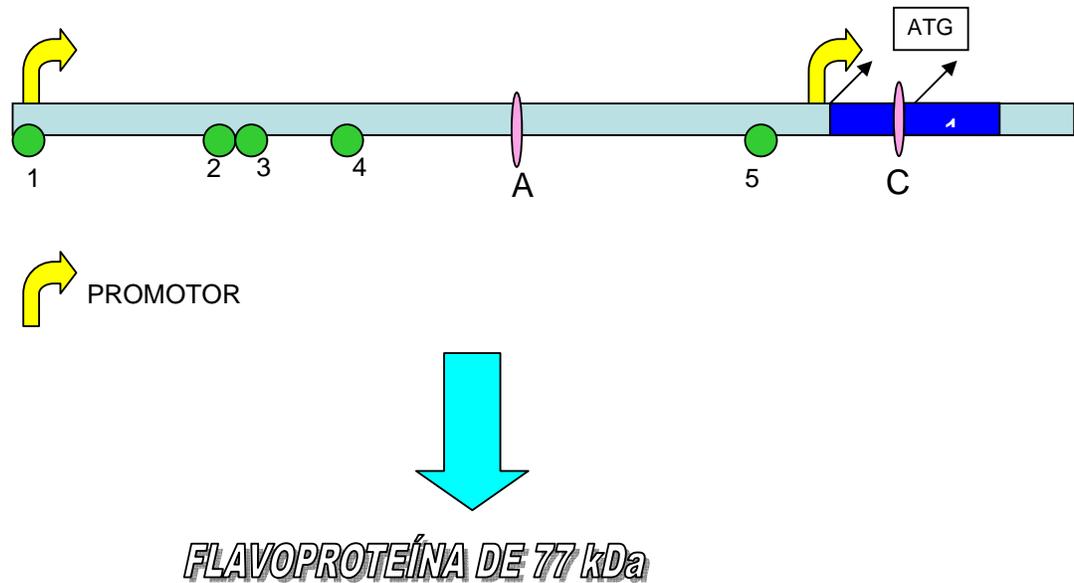


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de splicing alternativo del mRNA de la MTHFR para sintetizar la isoforma de 77 kDa.

El gen de la MTHFR posee un promotor que carece de la caja CAAT y la caja TATA, que usualmente se localizan a -25 y -35 pb del sitio de inicio de la transcripción. Esta es una característica que es compartida con otros genes que participan en el ciclo de los grupos metilo, tales como la metionina sintasa, metionina sintasa reductasa, cistatión β sintasa, timidilato sintasa y la dihidrofolato reductasa. Estos son genes que poseen promotores débiles y dirigen la transcripción de pocas copias de mRNA. [3,6].

CICLO DE LOS GRUPOS METILO.

Colectivamente se le ha designado metabolismo de los grupos metilo a todas aquellas reacciones celulares en las cuales el folato es requerido, incluyendo aquellas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, en la síntesis de purinas y pirimidinas y en la formación del principal agente metilador, la S-adenosilmetionina (SAM).La

principal función de las coenzimas del folato es la de aceptar y donar unidades de carbono en diversas reacciones metabólicas.

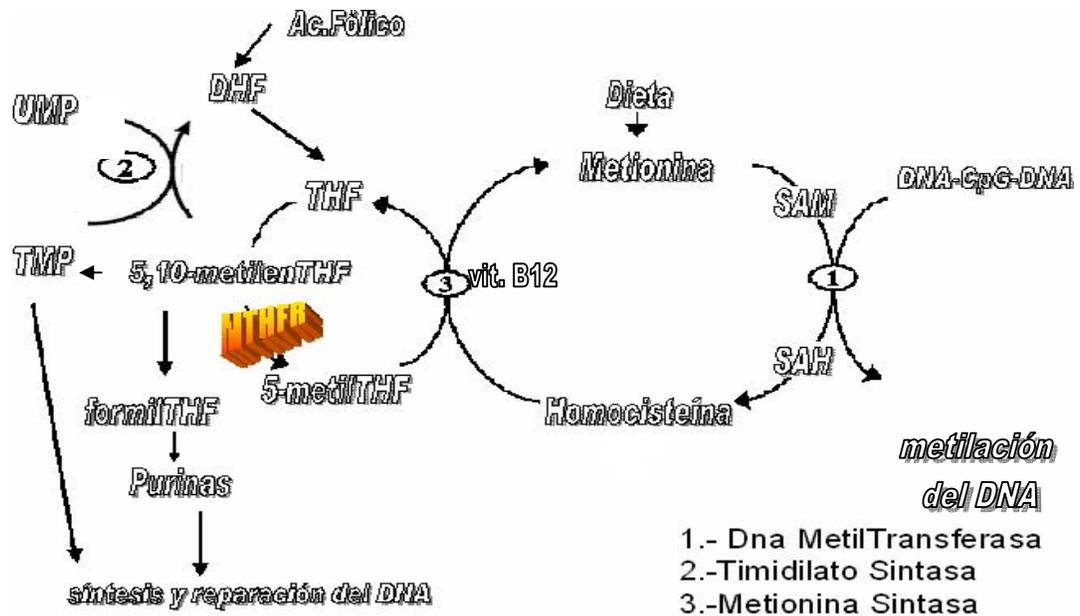


Figura 5. Esquema del ciclo de las Unidades de Carbono o de Grupos Metilo

La conversión del tetrahidrofolato (THF) a 5,10- metilentetrahidrofolato es el primer paso crucial en el ciclo. Esta reacción promueve la transferencia del carbono-3 de la serina, por medio de la hidroximetiltransferasa dependiente de pirodoxal fosfato, hacia el THF para formar 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-metilenTHF) y glicina [9].

La reducción del 5,10-metilenTHF está mediada por la MTHFR. Su producto, 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF) es la principal forma de folato circulante en el plasma, mientras que su sustrato (5,10-metilenTHF), se localiza principalmente de manera intracelular. El 5-metilTHF provee los grupos metilos necesarios para que se lleve a cabo la síntesis de novo de la metionina y las reacciones de transmetilación, mientras que el 5,10-metilenTHF es requerido para la conversión de deoxiuridilatos a timidilatos y puede ser oxidado para formar 10-formilTHF para la síntesis de novo de purinas [10].

Bajos niveles citosólicos de 5,10-metilenTHF disminuyen la síntesis de timidilatos, lo cual, lleva a un incremento en la relación UMP/TMP y por lo tanto al aumento de la inserción de uracilos en el DNA mediado por la DNA polimerasa. El uracilo es extraído del DNA por dos enzimas: la uracil-DNA-glicosilasa y la endonucleasa apirimidica, generando rompimientos de cadena sencilla transitorios que pueden resultar en rompimientos de doble cadena en caso de que dos rompimientos se den en hebras complementarias [11].

Debido a que los deoxinucleótidos son los sustratos utilizados por la DNA polimerasa para mediar la síntesis y reparación del DNA, la fidelidad en estos procesos depende del correcto balance y disposición de los deoxinuceótidos[11].

Las reacciones llevadas a cabo en el ciclo de los grupos metilo son utilizadas en el metabolismo de las 4 bases del DNA. Específicamente, el 10-formilTHF, provee las unidades de carbono necesarios para mediar las reacciones de transformilación empleadas en la formación de los anillos de purinas de la deoxiguanosina y deoxiadenosina [12].

La timidilato sintasa cataliza la transferencia del formaldehído del 5,10-metilenTHF a la posición 5 del deoxiuridilato, produciendo así deoxitimidilato [13]. Y finalmente, SAM funciona como donador de metilos para la metilación in situ de la deoxicitidina [12].

Por otro lado, tras ser reducido el 5,10 metilenTHF a 5-metilTHF vía la MTHFR, la metionina sintasa promueve la transferencia del grupo metilo desde el 5-metilTHF hacia la homocisteina generando metionina y THF [4]. Esta reacción es fundamental en el ciclo de los grupos metilo, ya que la metionina es el precursor de SAM, el cual es el donador de grupos metilo en más de 100 reacciones incluyendo, la metilación del DNA. Esta última característica es un determinante epigenético importante en la regulación de la expresión génica, así como en el mantenimiento de la estabilidad e integridad del DNA, en modificaciones cromosomales y en el desarrollo de mutaciones [14]. El producto de estas reacciones de metilación es la S-adenosilhomocisteina la cual es hidrolizada para formar homocisteina y adenosina. La homocisteina puede ser remetilada a metionina para proveer otro grupo metilo.

La homocisteína es un metabolito en un punto crítico del metabolismo de grupos metilo. Si la célula se encuentra repleta de SAM y el ratio SAM/SAH (S-adenosilhomocisteína) es alto, la MTHFR es inhibida. Por otro lado, si el ratio SAM/SAH es bajo, señal de que se requiere una mayor síntesis de SAM, la inhibición de la MTHFR es liberada, aumentando así la producción de 5-metilTHF para poder mediar el reciclamiento de la metionina. La actividad de la MTHFR es regulada alostéricamente por la relación SAM/SAH, donde la SAM funge como inhibidor, mientras que SAH compite con SAM por el sitio regulador de la enzima, sin inhibirla [4]. Por lo que SAH es capaz de revertir el efecto inhibitorio de SAM [15].

Se ha propuesto un modelo para explicar la interacción de la MTHFR con SAM y con NADPH. En este, la enzima se presenta en dos conformaciones cuaternarias R y T, a los cuales el ligando se asocia con diferente afinidad, produciendo un efecto de cooperatividad. Conforme la concentración de un ligando incrementa, la forma ligada de la enzima obtiene una mayor estabilidad, y debido a las diferentes afinidades de las 2 formas de la enzima, la especie ligada de afinidad mayor se estabiliza y por lo tanto, se acumula. La unión de los dos ligandos diferentes no es independiente, pero la unión de un ligando reduce ampliamente o elimina la afinidad por el otro ligando. Por ello la presencia de NADPH revierte el efecto inhibitorio de SAM. NADPH se asocia a las unidades libres de conformación R, removiendo su accesibilidad a SAM. Mientras que SAM se asocia a las unidades con conformación R favoreciendo su conversión a conformación T, la cual es inactiva, ya que hace que el sitio de unión para NADPH sea menos accesible [15].

Así mismo, hay evidencia que propone que existe una regulación dual de la actividad de la MTHFR: por inhibición alostérica y por fosforilación. Se ha determinado que la diferencia en la energía libre de la unión de SAM es insuficiente para dirigir el equilibrio totalmente hacia la conformación T, por lo que, inclusive a niveles de SAM de saturación, la enzima solo se encuentra parcialmente inhibida. La fosforilación de la MTHFR en un residuo de treonina encontrado en el extremo N-terminal altera el equilibrio intrínseco entre el estado R y T en la ausencia de ligandos. La conformación R se fosforila preferencialmente. Se ha propuesto, que un mecanismo mediante el cual la relación SAM/SAH modifica la actividad de la MTHFR es porque altera la

exposición del extremo N-terminal donde la fosforilación, que favorece el estado inactivo de la enzima, se lleva a cabo [16].

Sin embargo la actividad de la MTHFR no solo se ve afectada por la presencia de inhibidores sino también por una baja concentración de su cofactor FAD o por la presencia de polimorfismos en la secuencia del gen que afecten su interacción con su cofactor o sustrato.

POLIMORFISMO C677T

Tras la clonación de la MTHFR humana se han descrito alrededor de 34 mutaciones en pacientes que manifiestan homocisteinuria de las cuales 8 son sin sentido, 23 no sinónimas, 1 deleción y 2 resultantes del splicing alternativo. La mayoría de ellas son altamente raras sin embargo una de ellas ha sido la más fuertemente relacionada con una serie de trastornos metabólicos y citológicos. Esta mutación es el polimorfismo de nombre “C677T”, el cual se localiza en el exón 4 del gen, y consiste en una sustitución de una citosina por una timina en la posición 677 promoviendo así una sustitución de Alanina por Valina en el codón 222 de la proteína. Dicho polimorfismo se encuentra alejado del sitio de unión de la MTHFR con su cofactor el flavin adenin dinucleótido, es por ello que no afecta la actividad catalítica. Esta mutación puede ser detectada funcionalmente debido a que está asociada con una reducción en la actividad enzimática durante la incubación de los extractos proteicos a 45 °C donde, la mutación, que es de carácter recesivo, promueve que los linfocitos de los individuos homocigos posean una actividad enzimática específica reducida así como la pérdida de su estabilidad al ser sometida a las condiciones antes mencionadas. Es por ello, que se le ha designado como “MTHFR termolábil” [17]. La mutación C677T en el gen de la MTHFR promueve una disminución en la actividad enzimática favoreciendo así un incremento en la disponibilidad de 5,10-metilentetrahidrofolato para la síntesis y reparación del DNA acompañado de una disminución en la disponibilidad de 5-metiltetrahidrofolato para su metilación [18]. Esta situación favorece la síntesis de timidilatos sobre la metilación de las citocinas, minimiza la incorporación de uracilos al DNA y por lo tanto los rompimientos cromosómicos resultantes, así como favorece el incremento en las concentraciones de homocisteína [18].

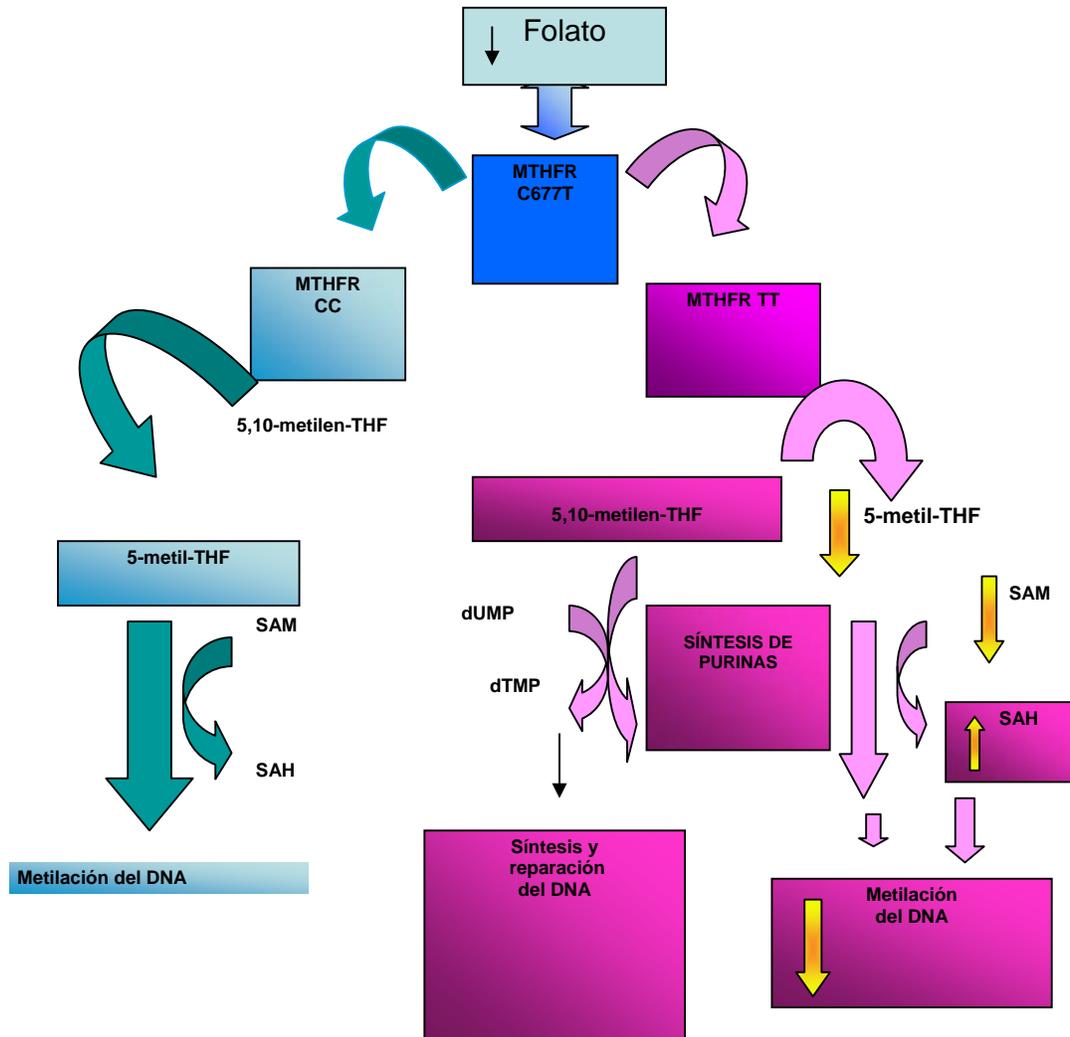


Figura 6. Esquema del comportamiento diferencial de los individuos con genotipo CC y TT bajo condiciones de deficiencia de ácido fólico

La MTHFR mutante presenta expuestos los residuos aminoácidos a los cuales se asocia el FAD, a diferencia de en la enzima no mutada donde estos residuos se encuentran embebidos en la estructura en forma de barril de la enzima. La exposición de dichos residuos promueve que se debilite el complejo enzima-cofactor. Recientemente se demostró, en estudios realizados sobre la función de la MTHFR humana, que en el momento en el cual el FAD es disociado de la enzima, se da una rápida conversión del dímero en monómeros, lo cual brinda una menor estabilidad. La pérdida de afinidad de la MTHFR por su cofactor resulta en la pérdida de la actividad enzimática [19]. Se ha propuesto que la enzima sufre una serie de cambios conformacionales que se propagan

a lo largo de toda su estructura, que surgen con la finalidad de compensar la presencia de la cadena lateral de mayor tamaño de la valina, y que estos cambios son los responsables de alterar la interacción de la MTHFR con FAD en una manera más sutil [20]. A su vez se ha determinado que la presencia de S-adenosilmetionina, inhibidor alosterico de la enzima, posee un efecto protector a la disociación del FAD, y que dicho efecto es bloqueado por la presencia de S-adenosilhomocisteína. En base a esto se ha postulado que la disociación del FAD se reduce en el estado inactivo de la enzima y se facilita en su estado activo[21]. Se han comparado las propiedades de la MTHFR con la sustitución Ala222Val con la silvestre y se observó que la mutación promueve una disminución de la afinidad de la enzima por su cofactor, más no se encontraron diferencias en la cinética de reducción del 5,10-MTHF a 5-metilTHF, es decir la K_M y la V_{max} entre los genotipos no presentan diferencias significativas [22].

En función de ello los individuos con un genotipo homocigoto para la mutación (TT) poseen un 30% de la actividad enzimática con respecto a los individuos silvestres (CC), mientras que los individuos heterocigotos poseen un 60% de la actividad a 46° C [23,24]. A 37°C los individuos TT poseen un 40-50% de la actividad específica encontrado en el silvestre, mientras que los heterocigotos poseen una actividad intermedia entre los homocigotos. [25]

Datos de estudios poblacionales en donde la ingesta de ácido fólico es menor a la recomendada (400µg/d de equivalentes de folatos) indican que los individuos que son homocigotos para el polimorfismo C677T de la MTHFR poseen niveles más bajos de folatos y niveles más elevados de homocisteína con respecto al CC [27]. Se ha reportado, que los heterocigotos para el polimorfismo (CT) posee una disminución del 10% en los niveles de folato en los eritrocitos con respecto al CC, y los homocigotos (TT) un 18% [19]. La presencia del polimorfismo no es un determinante positivo de las concentraciones de homocisteína cuando la concentración de folato es elevada, sin embargo, incrementa la sensibilidad al efecto que provee el déficit de folato sobre la concentración de homocisteína plasmática [28]. La actividad disminuida de la MTHFR se ha asociado con la alteración en la distribución de las formas coenzimáticas de los folatos en los eritrocitos. Se ha reportado, que estos folatos se encuentran exclusivamente en forma de 5-metiltetrahydrofolato con cadenas poliglutamadas de diferente longitud, sin embargo, una actividad diferencial para sintetizar esas formas de

folatos se manifiesta como la existencia de formas de folatos no metilados. De manera tal que se ha encontrado que en los individuos con el genotipo CC los folatos de los eritrocitos están conformados solamente por 5-metiltetrahidrofolato, a diferencia de en los individuos con genotipo TT donde se encuentran folatos tanto metilados como formilados, con una proporción de folatos formilados de entre 0 y 59% [29,30]. Esta distribución diferencial de las formas coenzimáticas de folatos en función del polimorfismo de la MTHFR es consistente con la hipótesis de que la MTHFR termolábil cataliza la síntesis de 5-metiltetrahidrofolato con menor eficiencia que la silvestre.

Debido a la capacidad de la MTHFR termolábil de distribuir diferencialmente las unidades de carbono dentro del ciclo de los grupo metilo, se ha correlacionado la presencia del polimorfismo C677T con una reducción en los niveles de metilación CpG en el DNA. La metilación del DNA posee un papel importante en la regulación de la transcripción así como en la estabilidad cromosómica. El genotipo 677TT de la MTHFR se ha asociado con una hipometilación del DNA, lo cual, se encuentra inversamente relacionado con los niveles de folatos. Esta hipometilación global del DNA se observó en asociación con hipermetilación localizada de genes supresores [12]. Los individuos homocigos para el polimorfismo C677T poseen niveles menores de citocinas metiladas en el DNA sólo bajo condiciones de déficit de folatos, cuando los niveles de folatos son los recomendados, los niveles de metilación no difieren en función del genotipo [31]. Conforme la concentración de folatos en los eritrocitos descende, los niveles de metilación del DNA disminuyen significativamente en los individuos con el genotipo TT. Sin embargo, no se alteran los niveles de metilación en los individuos silvestres. Así mismo, se ha determinado que los niveles de metilación del DNA correlacionan negativamente con los niveles de folatos formilados. El decremento en los niveles de metilación en los individuos con genotipo TT implica la capacidad limitada de la MTHFR mutada para sintetizar suficiente 5-metiltetrahidrofolato para satisfacer la demanda de grupos metilos requeridos para la síntesis de SAM, de manera tal, que se reduce la capacidad celular de metilar las moléculas biológicas, incluida el DNA. Se postula, que el decremento en la actividad de la MTHFR como resultado del polimorfismo C677T promueve una hipometilación en el DNA en función de la disminución de los niveles de SAM requeridos por la DNA-

metiltransferasa, o bien, por incremento en los niveles de SAH el cual es inhibidor competitivo de esta metiltransferasa, o bien por ambos mecanismos [32].

IMPORTANCIA CLÍNICA DEL POLIMORFISMO C677T

El polimorfismo C677T en el gen de la enzima MTHFR modula, de manera diferencial, el riesgo a presentar diversas enfermedades. El polimorfismo C677T ha sido propuesto como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, trombosis, preclampsia, neuropatía diabética, defectos del tubo neural, síndrome de Down así como desordenes psiquiátricos tales como depresión y psicosis esquizofrénica. El mecanismo mediante el cual dicho polimorfismo es capaz de modular el desarrollo de las enfermedades puede ser específico para cada condición, sin embargo se han considerado tres posibilidades: el aumento en los niveles plasmáticos de homocisteína, los cuales pudieran actuar como agente tóxico en la vasculatura y en el desarrollo embrionario; el decremento en la síntesis de metionina o de S-adenosilmetionina y alterar así los patrones de metilación celular y la distribución diferencial de las formas coenzimáticas de folatos. Con respecto al riesgo de desarrollar cáncer, el polimorfismo C677T parece incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de mama, endometrio, cervix, esófago, estómago y bazo. En contraste este polimorfismo parece disminuir, bajo condiciones adecuadas de ácido fólico, el riesgo a desarrollar cáncer colorectal, carcinoma hepatocelular, leucemia linfocítica aguda, algunas leucemias en niños y adultos y linfomas. Si las concentraciones de ácido fólico son inadecuadas, el efecto protector del polimorfismo se pierde. Una posible explicación de este fenómeno es que la presencia del polimorfismo C677T promueve un efecto positivo en la síntesis de nucleótidos por medio del incremento en los niveles de 5,10-MTHFR, lo cual se ve reflejado en una correcta síntesis de DNA y por lo tanto una división celular normal. Sin embargo, a bajas concentraciones de folatos, el polimorfismo C667 T promueve que tanto la metilación, así como la síntesis y reparación del DNA se ven comprometidas, promoviendo un incremento en la inestabilidad cromosómica siendo esto, el principal mecanismo de carcinogénesis [10, 17, 33]. De la misma manera, se ha propuesto que la capacidad del polimorfismo C677T de promover de manera diferencial el riesgo a desarrollar diferentes tipos de cánceres se debe a que en algunos casos, la prevención que brinda el

polimorfismo de generar rompimientos cromosómicos puede ser el mecanismo más relevante para reducir el riesgo, sin embargo, en otros la prevención de la hipometilación del DNA asociado con pérdidas cromosómicas, es necesario para reducir el riesgo, principalmente en aquellas causadas por la integración y expresión de DNA parasítico, o causado por aneuploidias[22]. Otra teoría propone que en los cánceres para los cuales la MTHFR promueve un incremento de riesgo es debido a que el decremento en los niveles de metilación del DNA activan oncogenes, y esto es su principal mecanismo de carcinogénesis, sin embargo, en aquellos en los que brinda protección, se debe a que esta hipometilación protege contra la hipermetilación de genes supresores de tumores [33]. Finalmente se ha propuesto que este efecto brindado por la MTHFR se debe a un requerimiento diferencial de folato entre los tejidos, y por lo tanto una diferente susceptibilidad a la deficiencia de éste [34].

Es de importancia recalcar, que la distribución del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR es muy heterogéneo a nivel mundial: donde la frecuencia más elevada del alelo T ha sido reportado en México, y la más baja en Sudáfrica [35].

Frecuencias de los genotipos MTHFR en diferentes poblaciones [36].

País	GENOTIPO		
	CC (%)	CT (%)	TT (%)
Holanda	53	42	5
Irlanda	50.5	43.4	6.1
Estados Unidos	62.4	33	4.6
Italia	34.9	50	15.1
Japón	35	46.3	18.6
México	17.6	47.6	34.8

Frecuencias del alelo mutante en las diferentes poblaciones [36,37]

País	Frecuencia de alelo 677T (%)
------	------------------------------

Oeste de África	9
Francia	36.1
Italia	47.3
México	58
Holanda	26
Irlanda	28
Estados Unidos	21
Japón	42

Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C677T MTHFR en diferentes poblaciones mexicanas [38]

Población	Frecuencia genotípica (%)			Frecuencia Alélica (%)	
	CC	CT	TT	C	T
Huichol	16	56	28	44	56
Tarahumara	45	39	16	64	36
Purepecha	19	48	33	43	57
Mestizo	31	50	19	56	44
Europea	45	40	15	65	35

La MTHFR se caracteriza por presentar una relación directa con la dieta, ya que se ha observado que las diferentes concentraciones de folato son capaces de modular su actividad, de manera tal que puede promover que a pesar de la presencia del polimorfismo, la enzima posea una actividad semejante al silvestre. Se ha observado que la presencia de FAD y de Metiltetrahydrofolato reduce la tasa de disociación del FAD del sitio catalítico de la enzima [21]. Dado que la alta concentración de folato se ve reflejada en el aumento en las concentraciones de metiltetrahydrofolato, este se asocia con un cambio conformacional en la enzima que permite que la interacción de esta con su cofactor sea fortalecida. La presencia de folatos induce que el FAD sea enterrado en el sitio de unión de la MTHFR lo que promueve, que tenga una menor probabilidad de ser liberado de la enzima [26]. Esto está en función de que el sitio de unión del metiltetrahydrofolato se encuentra adyacente al sitio de interacción de la MTHFR con su

cofactor, por lo que la presencia de folatos impide físicamente, la salida del FAD [21] El efecto protector que brinda el folato a la pérdida de la actividad enzimática es dependiente de la concentración de éste. Se ha observado, que el incremento en los niveles de ácido fólico reduce la tasa de disociación del FAD de la enzima tanto en la MTHFR mutada como en la silvestre, sólo que, la presencia de la mutación hace que los niveles de folato requeridos por la enzima para alcanzar los niveles de disociación encontrados inicialmente en la silvestre sean mayores [5]. Por lo que si existe un suministro de folato adecuado, a pesar de que la actividad de la MTHFR se encuentre disminuida, suficiente folato es reducido a 5-metilTHF para la metilación del DNA, pero al mismo tiempo suficiente 5,10-MTHF es dirigido hacia la conversión de uracilo a timidilatos [18].

Es importante recordar que la Ingesta diaria recomendada de ácido fólico, es decir, los niveles de ingesta diaria requerido para satisfacer las necesidades nutrimentales del 98% de la población, es de 460µ/d de ácido fólico de suplementos o comidas fortificadas para la población mexicana. La concentración de ácido fólico en el plasma necesario para minimizar el riesgo de defectos de tubo neural es de 400 ng/ml, concentración similar a la requerida para minimizar la inestabilidad genómica [57].

VITAMINAS

Valores nutrimentales de referencia para la población mexicana (IDR e IDS)

Edad y sexo	Vitaminas				Tiamina mg	Riboflavina mg	Pridoxina mg	Niacina mg ^e	Vit. B ₁₂ µg	Ácido fólico µEP	Vit. C mg	Ácido pantot. mg
	A µgER ^a	D µg ^{b,c}	E mg ^d	K µg								
Niños												
0 a 6 meses	s.i.	5	4	2.0	0.2	0.3	0.1	2	0.3	76	40	1.7
7 a 12 meses	s.i.	5	5	2.5	0.3	0.4	0.3	4	0.5	96	50	1.8
1 a 3 años	300	5	6	30	0.4	0.4	0.4	6	0.8	168	15	2.0
4 a 8 años	400	5	7	55	0.5	0.5	0.5	8	1.2	230	25	3.0
Hombres												
9 a 13 años	580	5	11	60	0.7	0.8	0.8	12	1.7	360	45	4.0
14 a 18 años	730	5	13	65	1.0	1.1	1.1	16	2.2	390	65	5.0
19 a 30 años	730	5	13	100	1.0	1.1	1.1	13	2.4	460	84	5.0
31 a 50 años	730	5	13	100	1.0	1.1	1.1	13	2.4	460	84	5.0
51 a 70 años	730	10	13	100	1.0	1.1	1.1	13	3.6	460	84	5.0
Más de 70 años	s.i.	15	13	100	1.0	1.1	1.1	13	2.4	460	80	5.0
Mujeres												
9 a 13 años	590	5	11	60	0.7	0.8	0.8	12	1.7	360	45	4.0
14 a 18 años	570	5	13	65	0.9	0.9	1.0	14	2.2	390	57	5.0
19 a 30 años	570	5	13	75	0.9	0.9	1.0	12	2.4	460	75	5.0
31 a 50 años	570	5	13	75	0.9	0.9	1.0	12	2.4	460	75	5.0
51 a 70 años	570	10	13	75	0.9	0.9	1.3	12	3.6	460	75	5.0
Más de 70 años	s.i.	15	13	75	0.9	0.9	1.0	12	3.6	460	70	5.0
Embarazadas	640	5	13	75	1.2	1.2	1.4	15	2.6	750	138	6.0
Lactantes	1100	5	17	75	1.2	1.3	1.6	15	2.8	650	128	7.0

^a µgER = µg equivalentes de retinol = 12 µg de β carotenos, 24 µg acaroeno o 24 µg criptoxantina.

^b Como colecalciferol. 1 µg = ui de vitamina D.

^c Sólo si no hay exposición al sol se recomienda ingerir suplementos.

^d Como α tocoferol. α tocoferol incluye RRR-α tocoferol, que es la única que se encuentra en los alimentos y las formas esteroisométricas 2R (RRR-, RSR-RRS- y RSS α tocoferol) que se encuentran en los suplementos y alimentos adicionados. No incluye las formas esteroisométricas de α tocoferol (SSR-, SSR-, SRS- y SSS), que también se encuentran en alimentos adicionados y suplementos.

^e Como equivalentes de niacina (EN). 1 mg de niacina = 60 mg de tritofano. En los niños de 0-6 meses no existe niacina preformada, por lo tanto no son EN -Si.

^f Como equivalentes de folato dietético (eFD). 1 eFD 0.1 µg de folato dietético - 0.6 µg de ácido fólico de alimentos adicionados o suplementos = 0.5 µg de suplemento consumido con el estómago vacío.

■ ingestión diaria recomendada (IDR)

■ ingestión diaria sugerida (IDS)

s.i. sin información suficiente para dar una IDS.

Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas, tomo I, Vitaminas y nutrimentos inorgánicos, H. Bourges-Rodríguez, E. Casanueva y J. L. Rosado, eds., México, Editorial Médica Panamericana, 2004

Figura 7. Tabla de las recomendaciones de ingesta diaria de nutrientes en la población mexicana.

PAPEL DE LA METILACIÓN EN LA ESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La metilación del DNA es una característica epigenética que juega un papel importante en la regulación de la expresión génica, estabilidad cromosómica, modulación de la cromatina así como en la diferenciación celular. La epigenética es el estudio de los cambios en un organismo a causa de la alteración en la expresión de la información genética, sin alteración en la secuencia de nucleótidos [39]. La metilación del DNA es una característica que consiste en la adición de un grupo metilo en la posición 5' de la citosina dentro de los dinucleótidos Citosina-Guanina (CpG) [40]. Aproximadamente el 4% de las citosinas pertenecientes a la secuencia de dinucleótidos CpG se encuentran metiladas en el genoma humano [41]. Normalmente la metilación del DNA se encuentra en regiones ricas en CpG's, llamadas "Islas CpG" las cuales se encuentran altamente representadas en las regiones promotoras, así como en las exones iniciales de los genes [40]. Estas islas CpG tienen un tamaño aproximado de 1 Kb de longitud y se ha estimado que se encuentran asociadas con aproximadamente la mitad de los genes en mamíferos [42]. La adición postreplicativa del grupo metilo a la citosina altera la apariencia del surco mayor del DNA, al cual, se asocian las proteínas de unión al DNA. Los patrones de metilación del DNA se establecen y mantienen por medio de las DNA metiltransferasas (DNMT) las cuales, al igual que el resto de las reacciones de metilación celular, utilizan a SAM como donador de grupo metilo. La DNMT 1, 3a y 3b, han sido las más estudiadas, y su actividad es usualmente descrita como de mantenimiento o *de novo*. La DNMT1 lleva a cabo una actividad de mantenimiento, es decir, se encarga de mantener el status de control epigenético preexistente en células en división al restaurar los sustratos de DNA hemimetilado a un estado de metilación de doble cadena. Mientras que la 3 a y b adicionan grupos metilo en sitios sin metilación preexistente, como por ejemplo durante el desarrollo embrionario temprano [43].

. Las islas CpG se encuentran, normalmente, no metiladas, y la metilación de estas regiones induce inhibición de la expresión génica. Es por ello, que los patrones de metilación distinguen los genes que serán expresados selectivamente. El mecanismo que participa en el silenciamiento de los genes como resultado de la metilación de las

islas CpG, involucra la asociación de proteínas de unión al DNA metilado (MBD's), el reclutamiento de complejos de silenciamiento así como de deacetilasas de histonas, esto promueve que la estructura del DNA cambie a un estado compactado y condensado que resulta en la inhibición del inicio de la transcripción ya que no permite el acceso de los factores de transcripción a las regiones promotoras. Es decir, que las células de mamíferos son capaces de alterar la apariencia del surco mayor del DNA modulando de esta manera la interacción DNA-proteínas, lo cual resulta en la capacidad de regular la transcripción génica. Las islas CpG se encuentran, normalmente, no metiladas y la metilación de estas regiones induce inhibición de la expresión génica. [40,44]. Debido a que la metilación de las citosina en una secuencia particular es capaz de modular la interacción de los factores de transcripción, la hipermetilación de las regiones codificantes puede disminuir la transcripción génica. Inversamente, la hipometilación de dichas regiones puede promover un incremento en la transcripción génica como resultado de una mayor asociación de los factores de transcripción.

En cáncer, la hipermetilación de las islas CpG se ha encontrado en más de 60 genes, incluyendo en genes supresores de tumores. Esta hipermetilación está asociada con inactivación de todas las vías de la regulación del ciclo celular y apoptosis. Últimamente se ha planteado la existencia de un fenotipo metilador de islas CpG que involucra el silenciamiento e inactivación de múltiples genes por hipermetilación de sus regiones promotoras y probablemente por desregulación de la DNMT1 [45, 46]. Así mismo, la hipermetilación de los sitios CpG puede predisponer a mutaciones como resultado de la deaminación hidrolítica espontánea de la citosina metilada, que resulta en transiciones citosina-timina [46]. Por otro lado la hipometilación del DNA es una característica predominante en muchos tipos de cánceres. Sin embargo, esta ocurre en regiones repetitivas que no poseen un efecto, hasta el momento obvio, sobre la expresión génica. [19]. La hipometilación de regiones no promotoras del DNA y de elementos estructurales tales como las regiones centroméricas, pueden llevar a inestabilidad génica y segregación anormal [32, 46]. La asociación de hipometilación con inestabilidad cromosómica se debe principalmente a hipometilación en secuencias satélite en las regiones pericentroméricas, ya que esto puede predisponer a rompimientos cromosómicos y recombinación [47]. Otra propuesta es que la hipometilación generalizada podría desestabilizar el genoma al activar secuencias trasponibles, lo cual puede inactivar genes de proliferación y crecimiento [40]. Así

mismo se ha propuesto, que la hipometilación de regiones promotoras de protooncogenes puede promover una inadecuada sobreexpresión de dichos genes [41].

IMPORTANCIA DE LA PROPORCIÓN UMP/TMP EN LA ESTABILIDAD CROMOSÓMICA

El ácido fólico es esencial para mediar la síntesis de purinas y de timidilatos. La timidilato sintetasa utiliza el 5,10-MTHF para mediar la metilación de la deoxiuridina monofosfato (dUMP) a deoxitimidina monofostato (TMP). Si la disposición de 5,10-MTHF se encuentra limitada, el balance de los precursores del DNA se encuentra desbalanceada, llevando a la acumulación de dUMP e incorporación de uracilos en el DNA [47]. Bajo condiciones normales la DNA uracil glicosilasa extrae el uracilo mal incorporado del DNA. La DNA glicosilasa específicamente hidroliza el enlace N-glicosílico que une a la base mal incorporada al esqueleto de DNA dejando un sitio abásico en el DNA [49, 50]. Las enzimas de reparación del DNA remueven el carbohidrato libre de base nitrogenada, lo que promueve la generación de un rompimiento transitorio en el DNA que posteriormente es sellado por la DNA ligasa. La remoción simultánea de 2 uracilos dentro de una distancia de 12 pb en hebras complementarias del DNA puede resultar en rompimientos de doble cadena [51]. La inducción de rompimientos de doble cadena por incorporación de uracilo puede ser el mecanismo molecular para la formación de rompimientos cromosómicos y la formación de micronúcleos [52]. En caso de que exista deficiencia en los niveles de 5,10-MTHF la incorporación de uracilo en el DNA y su reparación pueden ocurrir de manera cíclica. [47,53]

INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

La inestabilidad cromosómica es la pérdida o ganancia de cromosomas completos o fragmentos de cromosomas. En la mayoría de los casos, la aneuploidía (número anormal de cromosomas distribuidos en las células hijas) resulta de alteraciones numéricas, sin embargo, las pérdidas o ganancias de fragmentos cromosómicos resultan de alteraciones estructurales tales como traslocaciones,

amplificaciones, inserciones y deleciones. Las alteraciones estructurales pueden resultar en un desbalance en la expresión génica, resultando en inestabilidad cromosómica. Actualmente se considera que la inestabilidad cromosómica numérica resulta de defectos en la segregación cromosómica mientras que la inestabilidad cromosómica estructural resulta de rompimientos cromosómicos y rearrreglos resultantes de defectos en los puntos de monitoreo del ciclo celular, la respuesta al daño al DNA, o pérdida o ganancia de la integridad telomérica [54].

Durante la división celular el DNA es replicado y dividido de manera equitativa entre las células hijas, sin embargo, puede producirse erróneamente este proceso debido a errores en la replicación y segregación del material genético, o por rupturas cromosómicas (efectos de la radiación u agentes genotóxicos), propiciando que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético se desprende y queda excluido del núcleo de la célula hija, generando un núcleo de menor tamaño que el primario denominado micronúcleo (MN). El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las células durante la anafase mitótica a los cuales, durante la telofase, se les formó una envoltura nuclear, de manera tal que asumen gradualmente una morfología de núcleos en interfase con excepción de que son de menor tamaño que el núcleo principal. La formación de micronúcleos es inducida por sustancias que promueven rompimientos cromosómicos (aneugénicos) así como por agentes que afectan el huso mitótico (aneugénicos). Los micronúcleos son resultado de lesiones y aductos a nivel del DNA, rompimientos cromosómicos o bien por alteración a nivel de las proteínas involucradas, directa e indirectamente, con la segregación cromosómica (proteínas del cinetocoro y del huso mitótico). El ensayo de los micronúcleos en linfocitos humanos es uno de los más comúnmente utilizados para evaluar la tasa de daño al DNA en poblaciones humanas ya que es, relativamente, más sencillo contar micronúcleos que aberraciones cromosómicas. Es por ello que el ensayo de los micronúcleos es un método para mediar inestabilidad cromosómica, que evalúa *ex vivo*, pérdidas y rompimientos cromosómicos en individuos y poblaciones humanas [55,56]. La metodología actual se basa en ensayo de los micronúcleos con citocinesis bloqueada, donde los linfocitos son cultivados *ex vivo* y las células que han completado una división celular son reconocidas por su apariencia binucleada tras el bloqueo de la citocinesis con citocalasina B[57]. El ensayo

de micronúcleos está considerado como un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos.

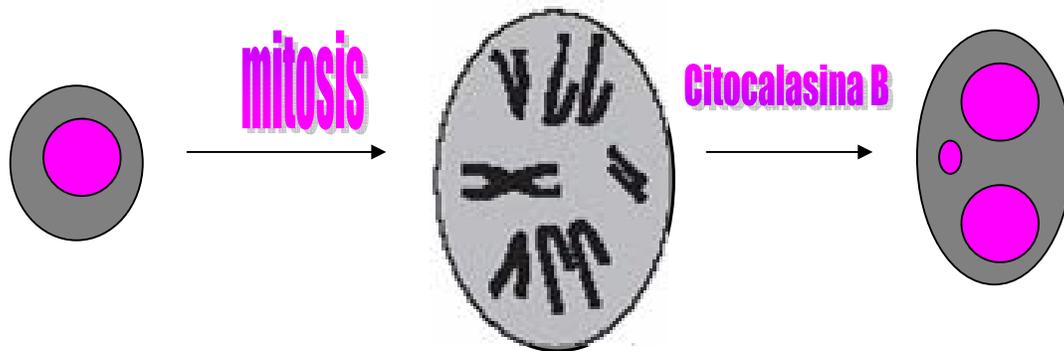


Figura 8. Esquema del proceso de formación de micronúcleos con la técnica de micronúcleos con citocinesis bloqueada

JUSTIFICACIÓN

La enzima MTHFR está asociada con una gran gama de enfermedades, tales como, cáncer de colon, hiperhomocisteinemia, defectos del tubo neural, síndrome de Down, etc. Su gran importancia radica en que el polimorfismo C677T presenta una frecuencia de 46.72% en la población mexicana. Es importante realizar esta investigación, ya que la correlación buscada entre polimorfismo de la MTHFR y daño por agentes químicos nunca antes ha sido aproximada.

HIPÓTESIS:

Los individuos portadores del genotipo T/T va presentar una mayor respuesta a los agentes químicos a los que será tratado, lo cual se verá reflejado como una mayor presencia de micro núcleos en las células observadas, con respecto al genotipo C/C.

OBJETIVOS:

1.- Evaluar si existen diferencias significativas en la respuesta a agentes químicos con respecto al polimorfismo C677T de la enzima MTHFR humana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar por medio de genotipificación dos individuos de cada genotipo.
2. Evaluar por medio del ensayo de micronúcleos el diferente grado de respuesta de los genotipos ante los diferentes agentes químicos.

METODOLOGÍA A

1- Se llevó a cabo la extracción del DNA a partir de 5ml de sangre humana, mediante la utilización de proteinasa K y una extracción con Fenol cloroformo y alcohol isoamílico (método usado por el FBI).

2- Genotipificación de la MTHFR

El análisis se realizó mediante PCR, utilizando los siguientes primers:

Primer 1 (Forward)= 5'-TGA-AGG-AGA-AGG-TGT-CTG-CGG-GA-3'

Primer 2 (backward) = 5'-AGG-ACG-GTG-CGG-TGA-GAG-TG-3'

Se utilizó la enzima platinum Taq polimerasa, y la mezcla se generó en función de los requerimientos de dicha enzima.

El fragmento amplificado fue de 198pb.

**tgaaggagaagggtgtctgcgggagccgatttcatcatcacgcagcttttctttgaggctgacacatttccgctttgtga
aggcatgcaccgacatgggcatcacttgccccatcgccccgggatcttcccatccaggtgaggggcccaggagagc
ccataagctccctccaccccactctcaccgcaccgtctct**

Las condiciones de la amplificación fueron:

94°C por 2 min

94°C por 30 seg

62°C por 30 seg } por 40 ciclos

72°C por 30 seg

72°C por 7 min

3- Posteriormente se llevó a cabo la digestión del fragmento amplificado con la enzima Hinf. I ya que el polimorfismo genera un sitio de corte para la MTHFR, dando como resultado un fragmento de 175pb y uno de 23pb.

cttgaaggagaagggtgtctgcgggag(C o T)cgatttcatcatcacgcagct

tttctttgaggctgacacattcttccgctttgtgaaggcatgcaccgacatgggcatcacttgcceccatcgccccgggat
ctttcccatccaggtgaggggccaggagagcccataagctccctccaccccactctcaccgcaccgtcct

De manera tal que:

Genotipo	Pares de bases
CC	198
CT	198,175,23
TT	175,23

METODOLOGÍA B

1) Se realizó un cultivo de linfocitos de sangre humana, con las siguientes condiciones:

Se utilizó el medio RPMI 1640 con y sin ácido fólico (Gibco) suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco), 1% de L-Glutamina (Sigma)

En cajas de cultivo de 25 cm² se adicionaron 9 ml de medio de cultivo, previamente suplementado, 0.2 ml de fitohemaglutina (Gibco) y 1 ml de sangre periférica. Para cada agente químico se colocaron cultivos para evaluar tres periodos de estudio (24, 48 y 72 h de exposición) con sus respectivos controles. Los cultivos se incubaron a 37 ° C con un 5% de CO₂ durante 48 h. Transcurrido este tiempo se realizó un cambio de medio, para lo cual, los cultivos de sangre fueron resuspendidos con pipetas y transferidos a tubos falcón de 15 ml. Se centrifugaron a 1200 rpm durante 8 minutos. Posteriormente con ayuda de una pipeta pasteur y una bomba de vacío, se retiró el medio de cultivo con cuidado de no tomar el botón celular. El botón fue resuspendido nuevamente en 9 ml de medio de cultivo suplementado. Con una pipeta pasteur se transfirió a una caja de cultivo de 25cm². Se adicionó 0.2 ml de fitohemaglutina y el agente químico a evaluar. En caso de ser el control solo se adicionó la fitohemaglutina. Los cultivos se incubaron a 37 ° C con un 5% de CO₂. 24 h previo a la cosecha se adicionaron 30 µl de citocalasina B (2mg/ml, Sigma) quedando una concentración final de 6 µg/ml.

2) Cosecha

Los cultivos se sacaron de la incubadora y se resuspendieron con ayuda de una pipeta. Se pasaron a tubos de 15 ml donde se les adicionó 1ml de solución fijadora (3:1 metanol: ácido acético) para prefijar los cultivos. Se centrifugaron a 1200 rpm durante 8 minutos. El sobrenadante fue descartado y el botón fue resuspendido en 12 ml de solución fijadora. La fijación se realizó a -20 °C durante 20 minutos. Las células fueron precipitadas mediante una centrifugación a 1200 rpm durante 8 minutos. Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 12 ml de solución fijadora con la finalidad de lavar el botón para eliminar los restos de eritrocitos y de hemoglobina. Tras 6 lavados las células fueron resuspendidas en 1ml de solución fijadora

3) Preparación de laminillas.

Se gotearon con una pipeta pasteur aproximadamente 8 gotas del botón celular previamente resuspendido en solución fijadora en laminillas lavadas con etanol al 70 %. Las laminillas se dejaron secar, por lo menos, por 24 h. Una vez secas se realizó la tinción de Wright, tinción con eosina y azul de metileno. La eosina es un colorante ácido de color rosa, el cual, debido a su polaridad negativa se enlaza con constituyentes celulares de naturaleza positiva, tales como el citoplasma (no puede asociarse al DNA debido a su carga negativa). El azul de metileno es un colorante electropositivo, debido a su alto contenido de protones H^+ , por lo que se asocia a los componentes negativos del núcleo, en especial al DNA. Una vez teñida se realizó la observación al microscopio con el objetivo de 100X.

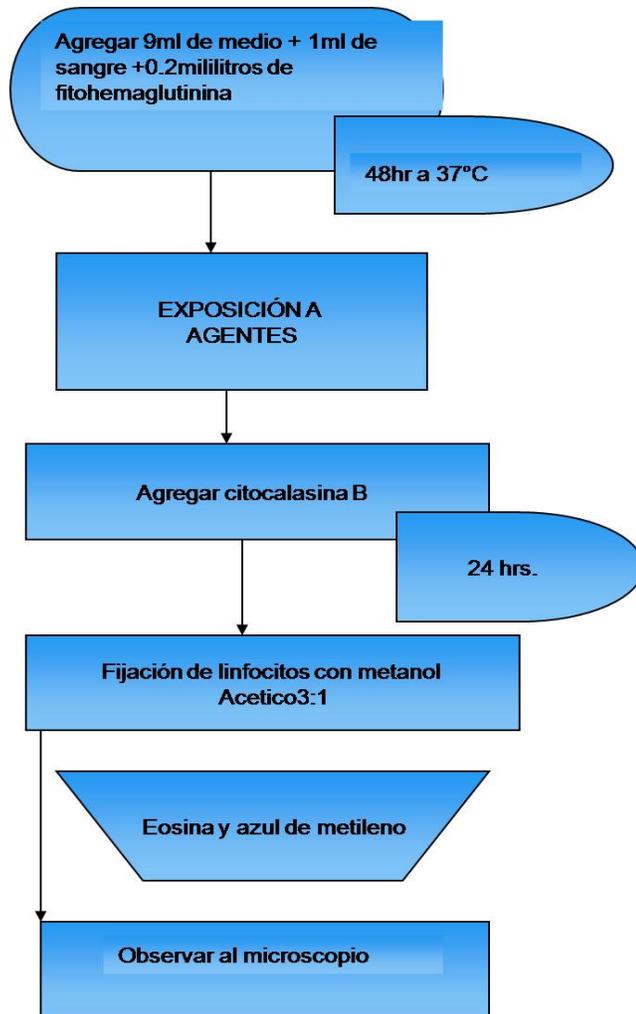


Figura 9. Esquema de la metodología utilizada para realizar el cultivo celular

Para el conteo de los micronúcleos se contaron 1000 células binucleadas de cada muestra. Donde los criterios usados para identificar células binucleadas [56]son:

1. Núcleos con membranas nucleares intactas y deben estar dentro del mismo límite citoplásmico.
2. Los dos núcleos tienen que ser aproximadamente iguales en el patrón de tinción e intensidad.
3. Los dos núcleos pueden estar unidos por un puente nucleoplasmático fino.
4. Los dos núcleos pueden tocarse pero no superponerse, al menos que los límites nucleares sean distinguibles.

5. El límite membranal o citoplásmico tiene que estar intacto y tiene que distinguirse del de otras células.

Los criterios para el conteo de micronúcleos según Fenech [56] son:

1. El diámetro del micronúcleo varía entre 1/16 y un 1/3 del diámetro del núcleo principal.
2. El micronúcleo tiene que ser redondo u ovalado.
3. Tiene que ser no refráctil.
4. Los micronúcleos no tienen que estar conectados con el núcleo principal.
5. El micronúcleo no tiene que sobrelaparse con el núcleo principal.

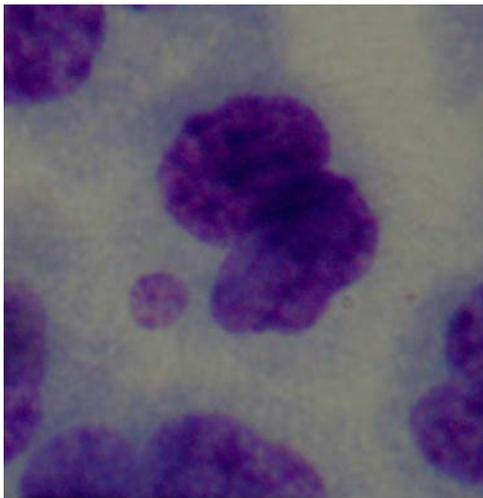


Figura.10 Foto de micronúcleo obtenido a partir del ensayo de micronúcleos con citocinesis bloqueada, la imagen es una célula binucleada con micronúcleo

A los cultivos se les expuso a los siguientes agentes químicos:

Grupo	Agente
Inhibidor de SAM	Etionina .-inhibidor competitivo de la metionina en la síntesis de SAM, lo que genera una hipometilación por la acumulación de su análogo etil S-adenosil etionina inhibidor efectivo de la metil-transferasa dependiente de SAM. Inhibe la síntesis de ATP, poliaminas, y

	<p>promueve la etilación postsintética de macromoléculas. Inhibe la fosforilación de la proteína S6 ribosomal así como la maduración del rRNA [72]. Actúa a través de la inhibición de las vías dependientes de SAM o Metionina. SAE es sustrato para la metiltransferasa de Arginina en histonas, mediando la etilación de dichos residuos. SAE funge como donador de grupos etilo en reacciones donde normalmente SAM dona metilos, incluyendo la alquilación de ácidos nucleicos. El desbalance entre la síntesis y degradación de SAE lleva a su acumulación en el hígado, lo cual promueve la acumulación de ATP en forma no metabolizable. Esto a su vez podría afectar la concentración de pirimidinas trifosfatadas y de esta manera afectar la síntesis de RNA [73].</p>
Desmetilantes	<p>5-Azacidina.- La 5-Azacidina es un análogo de la citidina en la cual se encuentra sustituido el carbono 5 del anillo de la pirimidina por un Nitrógeno. [61]. Se ha planteado que la azacidina posee su actividad antineoplásica debido a dos principales mecanismos: su capacidad citotóxica, debido a su incorporación en el DNA y RNA, y su capacidad de promover hipometilación en este [62]. Durante la reacción de metilación del DNA, la DNA metiltransferas (DNMT) se asocia covalentemente al Carbono 6 de la citosina mientras transfiere el grupo metilo de SAM al Carbono 5 de esta. Una vez realizada esta reacción se revierte el enlace DNA-proteína y la DNMT es disociada. Sin embargo, cuando se da la asociación con la 5 Azacidina se promueve la formación de un aducto irreversible DNA-PROTEINA [63].Esto resulta en una disminución en los niveles de DNMT en la célula lo cual promueve la desmetilación del DNA en consecuencia de su continua replicación [64]. Esta unión covalente e irreversible de la DNMT promueve muerte celular al bloquear la síntesis del material genética y a su vez es capaz de generar inestabilidad estructural en el sitio de incorporación [65].</p> <p>Este agente también es capaz de ser incorporado en el RNA, lo cual, promueve el desensamblaje de los ribosomas, una función</p>

inadecuada del tRNA, inhibición de la tRNA metiltransferas así como la inhibición de la síntesis protéica [65]. Pero su principal efecto radica en su deaminación enzimática, lo que conforma 5-azauridina, lo que interfiere con la síntesis de timidilatos de Novo [63].

Las células tratadas con Azacitidina sufren cambios tales como activación de genes silenciados, descondensación de la cromatina y alteración en el tiempo de replicación [66]. Entre estos cambios en particular, se ha observado que la azacitidina promueve la descondensación de los bloques de heterocromatina pericentromérica de los cromosomas 1,9,15,16 y Y, alterando el nivel de metilación de los satélites clásicos que conforman esta región, sin embargo el satélite alfa centromérico no se ve afectado. La azacitidina también es capaz de descondensar heterocromatina facultativa como es el caso del cromosoma X inactivo, sin embargo este proceso requiere una mayor concentración del fármaco y mayores tiempos de exposición [67]. Debido a que dichos cromosomas sufren descondensación en la heterocromatina pericentromérica y a que estos cromosomas son los preferencialmente encontrados en los micronúcleos de células tratadas con azacitidina, se ha propuesto que la descondensación de la heterocromatina constitutiva puede promover un rezago cromosómico en anafase o bien dar una susceptibilidad a los rompimientos cromosómicos [68, 69, 70]. Es un agente clastogénico debido a su incorporación en el DNA e interferencia con la topoisomerasa II. Se ha observado que la 5-azacitidina, promueve la fragmentación, adherencia y elongación de cromosomas [71], así como su condensación inadecuada, el intercambio de cromátides hermanas y endoruplicación [59].

Hidralazina.- Agente antihipertensivo que ha sido asociado con la inhibición de la metilación del DNA. Se utiliza como tratamiento para hipertensión y falla cardiaca sin embargo también es utilizado para promover la citotoxicidad tumoral [74]. Se asocia a las regiones ricas en GpC en el DNA afectando la traslocación de la DNA

	<p>metiltransferasa a lo largo de la hebra de DNA [75]. Se ha observado que posee la capacidad de desmetilar genes supresores de tumores tales como p16, RARB y ER. La hidralazina no inhibe directamente a la DNA Metiltransferasa 1 (DNMT1), sino que disminuye su expresión a nivel de proteínas. La hidralazina es un inhibidor de la Vía ERK. La hidralazina inhibe la fosforilación de ERK, lo que inhibe la vía, que finalmente reduce la expresión de la DNMT [76]. Tiene un efecto significativo (40-60%) en la hemimetilación, pero tiene un efecto más completo en la metilación <i>de novo</i>. La hidralazina produce radicales como el anión superóxido, peróxido y grupos hidroxilo, especies relacionadas con los rompimientos de doble cadena, que finalmente lleva a la producción de micronúcleos [77].</p> <p>Posee un efecto demetilante retardado. Su potencial citotóxico reside en su capacidad de promover la acidificación intracelular y la hipoxia tumoral específica[74].</p>
<p>Clastogéno-aneugenico</p>	<p>Arsenito de Sodio. El arsenito es un compuesto ampliamente distribuido en la naturaleza y es liberado al ambiente a través de procesos industriales y la agricultura. Es uno de los principales tóxicos arsénicos en el ambiente [78].</p> <p>El arsenito de sodio se caracteriza por ser un agente clastogénico, coclastogénico y mutagénico que ha sido relacionado con la inducción de amplificación génica, daño cromosómico, hipometilación del DNA, activación de protooncogenes así como con la inhibición de la reparación del DNA [79].El arsenito de sodio activa a la NADH oxidasa lo que resulta en niveles elevados del anión superóxido, que junto con su capacidad de promover niveles aumentados de óxido nítrico producen daño oxidativo en el DNA [80]. Los rompimientos de doble cadena inducidos por el arsenito de sodio son resultado de este daño y de los entrecruzamientos entre proteínas y DNA. Entre las anomalías mitóticas inducidas por el arsenito de sodio se encuentran alteraciones en la segregación cromosómica, un huso mitótico alterado, mitosis prolongadas así como cromosomas cortos y sobrecondensados [81].Es por ello que el arsenito de sodio no sólo induce aberraciones</p>

	<p>cromosómicas, tales como rompimientos, fragmentación y endoruplicación, sino también pérdidas de cromosomas [82]. Este agente no sólo induce daño al DNA por inducción de rompimientos, sino que también debido a su capacidad de inducir cambios en los niveles de metilación [83]. El arsenito depleta los niveles intracelulares de SAM lo que se asocia con hipometilación global. Se considera que el principal daño citotóxico inducido por el arsenito está en su capacidad de interactuar con grupos sulfhidrilo [84]. La tubulina es una proteína rica en cisteínas, lo que ha llevado a pensar, que el arsenito se asocia a estas grupos inhibiendo así la polimerización de la tubulina e incluso estimulando su despolimerización [85]. Esto, puede interferir con la organización y ensamblaje de los microtúbulos lo que podría explicar tanto el arresto mitótico como el gran número de aneuploidías encontradas con el tratamiento a arsenito de sodio [86]. Debido a la capacidad del arsenito de sodio de interferir con el funcionamiento y ensamblaje del huso mitótico, de inducir daño oxidativo e hipometilación del DNA, el arsenito de sodio es capaz de inducir micronúcleos resultantes de su actividad como agente aneugénico así como clastogénico [87].</p>
<p>Clastógenos</p>	<p>Mitomicina.- Es un antibiótico y agente antitumoral. Posee un ligero potencial mutagénico y carcinogénico. Su principal propiedad es la de unirse covalentemente con el DNA, tanto mono así como bifuncionalmente, este último promoviendo entrecruzamientos covalentes entre hebras complementarias [88]. Su estructura policíclica puede favorecer el intercalamiento de la mitomicina con el DNA como paso previo al entrecruzamiento. Dicho entrecruzamiento interfiere con la replicación, lo cual, lleva rápidamente a la muerte celular, sin embargo, posee un pobre efecto sobre la síntesis de proteínas ya que se requiere una pequeña cantidad de material genético para ello [89]. Bajo condiciones fisiológicas la reactividad de la mitomicina con el DNA requiere de reducción enzimática o química conocida como bioactivación, es por ello que se considera a la mitomicina como una</p>

agente alquilante bioreductor. La mitomicina reducida activada interactúa con el nitrógeno 2 de la guanina en el surco menor del DNA. Los aducto se forman entre guaninas en hebras opuestas del dúplex de DNA, lo cual, induce roturas monocatenarias del DNA y rompimientos cromosómicos[88]. La mitomicina se caracteriza por presentar una especificidad por secuencias CpG, por lo que, secuencias con repeticiones CpG presentan mayor entrecruzamiento [90].La mitomicina promueve el intercambio de cromatides hermanas, principalmente entre los cromosomas 1,9 y 16 [91].

Cisplatino. Es un agente quimioterapéutico altamente carcinogénico y mutagénico, capaz de inducir una gran cantidad de efectos celulares, sin embargo, su principal mecanismo de acción es el resultado de su interacción covalente con el DNA [92].El aducto covalente DNA-cisplatino inhibe procesos celulares fundamentales tales como replicación, transcripción, traducción y reparación [93]. El principal blanco del cisplatino son los átomos de nitrógeno en la posición 7 de la guanina y la adenina. La interacción del cisplatino con el DNA puede resultar en entrecruzamientos tanto intra como intercatenarios, lo cual, induce distorsiones en el DNA. El 90 % de los aductos generados doblan el DNA hacia el surco mayor y promueven su desenrollamiento. El principal aducto generado es el resultado de la unión del cisplatino con guaninas adyacentes, seguido por la unión con guanina y adenina adyacente, y finalmente por guaninas separadas por un nucleótido [94].Se ha postulado que el principal mecanismo mediante el cual el cisplatino actúa como agente quimioterapéutico es debido a su capacidad de inhibir la replicación del DNA [95].Existen proteínas llamadas proteínas de alta movilidad (HMG) las cuales poseen la capacidad de reconocer DNA distorsionado, éstas poseen una gran afinidad por el DNA modificado con cisplatino. Estas proteínas promueven una sensibilidad al tratamiento con cisplatino por uno de dos mecanismos. El primero propone que al asociarse las HMG's con los aductos de cisplatino, promueve su disociación de puntos clave

	<p>donde fungen como factores de transcripción . Por otro lado se propone que la asociación de estas proteínas con el aducto bloquean el reconocimiento del daño, y por lo tanto, al no haber reparación, la célula es dirigida a muerte celular [96]. La unión de estas proteínas de alta movilidad también bloquean la replicación y transcripción del DNA [97,98].El cisplatino no solo afecta al DNA, se ha observado su capacidad de interactuar con fosfolípido de membrana así como proteínas del citoesqueleto. Se ha observado que el cisplatino también participa en la formación de aductos con proteínas, uno de los ejemplos más claros es su interacción con la actina. Esta interacción es capaz de alterar el metabolismo nuclear y la distribución espacial de la cromatina. A bajas concentraciones el cisplatino afecta la polimerización de la G-actina y a altas concentraciones induce su despolimerización. También se ha observado la capacidad del cisplatino de interactuar con la telomerasa , lo que puede afectar la longitud de los telómeros. Los efectos citostáticos del cisplatino inducen aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátides hermanas en cultivo celular [999, 100].</p>
<p>Antagonista del ácido fólico</p>	<p>Metotrexate.- Es un antagonista del ácido fólico que inhibe la duplicación celular al inhibir irreversiblemente a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). Esta inhibición promueve una disminución en el pool de 5-10 MTHF y 10-FormilTHF, los cuales son utilizados como cofactores para mediar la síntesis de purinas y timidilatos, inhibiendo así la síntesis del DNA, principal mecanismo citotóxico del Metotrexate (MTX) [101].Así mismo el MTX compete con el ácido fólico para ser poliglutamado, estos derivados inhiben a enzimas como GAR e AICAR involucradas en la síntesis de novo de purinas, por lo que, el Metotrexate actúa por medio de dos mecanismos: mediante la disminución en el pool de nucleótidos para la síntesis del DNA y por medio de la inhibición de las enzimas encargadas en la síntesis de novo de purinas [102]. Al comparar los niveles de adeninas y guaninas en linfocitos tratados con MTX se observó una disminución hasta de un 50% [103].En un inicio se pensó que esto era lo que</p>

promovía el arresto en la fase S de dichas células, sin embargo la adición de timina libera a las células del arresto, esto permite postular que la inhibición de la síntesis de nucleótidos no es el único mecanismo involucrado [104]. La presencia de cadenas poliglutamadas en el MTX se asocia también con su citotoxicidad, ya que esto permite que el MTX sea retenido en el interior celular aún cuando ya no lo hay de manera extracelular. El Metotrexate también posee la capacidad de promover, debido a la disminución de timidilatos, la incorporación de uracilos en el DNA resultando en presencia de rompimientos de doble cadena [104, 105]. Pero al disminuir la síntesis de nucleótidos estos rompimientos de doble cadena no pueden ser eficientemente reparados, lo que culminará en muerte celular [106]. Es por ello que se postula que la mayoría de los rompimientos de doble cadena resultantes del tratamiento con MTX son originados por rupturas espontáneas que no pueden ser reparadas debido a la deficiencia de nucleótidos [107]. Debido a la disminución de los niveles de 5-10 MTHF tras el tratamiento con MTX, se ha propuesto que éste es capaz de afectar también las reacciones de transmetilación celular [103].

METODOLOGÍA C

Western Blot y H2A.X

Cultivos de linfocitos aislados.

Se obtuvo una muestra de sangre periférica por medio de venopunción. En un tubo falcón de 50 ml se adicionó un volumen de ficoll (histopaque 1077, Sigma) y lentamente por las paredes del tubo, se adicionó un volumen de sangre. Se centrifugó a 1600 rpm por 30 minutos, sin freno. Durante esta centrifugación los eritrocitos y granulocitos son agregados por la polisucrosa contenida en el histopaque sedimentándose, mientras que, los linfocitos permanecen en la zona entre el histopaque y el plasma.

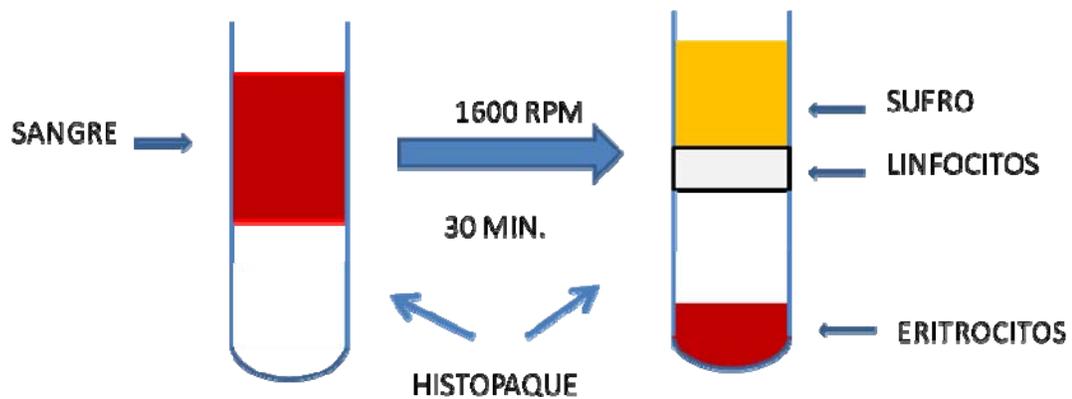


Figura 11. Esquema de la separación de linfocitos por gradiente de centrifugación con Ficoll

Con una pipeta pasteur se transfirió la capa de linfocitos a un tubo falcón de 15 ml de poliestireno. Se realizaron 3 lavados en PBS para eliminar los restos de ficoll. Una vez resuspendidas en 10 ml de PBS se tomaron 20 μ l de esta muestra y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml donde se le adicionaron 40 μ l de azul tripano. El conteo se realizó con la cámara de neubauer.

En cajas de cultivo de 75 cm² se sembraron 4 millones de linfocitos en 10 ml de medio RPMI 1640 sin ácido fólico (GIBCO) suplementado con 1% aminoácidos no esenciales (Gibco), 1% L-Glutamina (Sigma) y 10% suero bovino fetal dializado (Sigma). con 0.2 ml de fitohemaglutina (Gibco). Los cultivos se incubaron a 37 ° C con un 5% de CO₂ durante 48 h. A las 48 h se realizó un cambio de medio como anteriormente fue mencionado. Para cada agente químico se colocaron cultivos por duplicado para evaluar tres periodos de estudio (24, 48 y 72 h de exposición) con sus respectivos controles.

EXTRACCIÓN DE HISTONAS

Los linfocitos cultivados se resuspendieron por agitación y fueron transferidos a tubos cónicos de 15 ml donde fueron lavados 3 veces con PBS. El pellet se resuspendió en 500 μ l de Buffer de Lisis NIB (1% Nonidet P40 in IB[10mM Tris-HCl, pH 7.4, 2mM $MgCl_2$, 3mM $CaCl_2$, 0.05 mg/ml aprotinina, 0.5mg/ml pepstatina, 0.1 mg/ml PMSF, 2 mM Pirofosfato, 2mM Ortofosfato de sodio]. Se recolectaron los núcleos mediante la centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Las histonas fueron extraídas del pellet nuclear con 0.2 ml de H_2SO_4 0.2 M por 90 minutos en hielo. Las histonas extraídas se precipitaron con 80% de acetona (0.8ml adicionado a los 0.2 ml del extracto) y se conservaron a -20°C toda la noche. Para remover la acetona se centrifugaron los extractos a 13200 rpm durante 30 minutos a 4°C. Finalmente las histonas fueron resuspendidas en Urea 4M.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se preparó una solución stock de BSA (albumina bovina) 10 μ g/200ml.

Se hicieron diluciones de la siguiente manera para poder realizar la curva estándar

	μ g por muestra	μ l de la solución stock de BSA	μ de PBS
Blanco	0	0	200
STANDARD 1	0	0	200
STANDARD 2	1.25	25	175
STANDARD 3	2.5	50	150
STANDARD 4	3.75	75	125
STANDARD 5	5	100	100

Para la cuantificación de la muestra se adicionaron 198 μ l de PBS en tubos eppendorff y se adicionaron 2 μ l del extracto proteico. A cada tubo se le adicionó 50 μ l del reactivo de tinción de proteínas de Bio-Rad coomasie G-250. Las muestras se

dejaron 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de las Densidades Ópticas en el espectrofotómetro (Beckman Coulter) realizando las lecturas a 595 nm.

WESTERN BLOT

Una vez que las proteínas fueron cuantificadas por el Método de Bradford. Se corrieron 15µg de proteína en geles de tricina al 16% a 25 V durante 3 h. Una vez que las bandas fueron correctamente separadas las proteínas fueron transferidas, por medio de transferencia semiseca, a membrana PVDF de 22 µm (Biorad). Esta se realizó a 25 V por 2 h. Las membranas fueron bloqueadas con 5% leche /TBS-tween 0.1% durante 1 h. La incubación con el anticuerpo primario, anti-γH2A.X de ratón (UPSTATE), se realizó a 4°C toda la noche utilizando una dilución 1:5000 .Las membranas se lavaron con TBS-tween 0.1%. Se incubaron las membranas durante 1 h con el anti-HRP (ZYMED) a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas durante 2 h con TBS-tween 0.1% para remover el anticuerpo unido inespecíficamente. La detección de las proteínas se realizó por medio de quimioluminiscencia (Chemicon, millipore).

Una vez que se realizó la exposición y el revelado de las placas (MARCA), las membranas fueron sometidos a la solución de stripping (100mM 2-mercaptoetanol, 2%SDS, 62.5 mM. Tris-HCl, pH6.7) durante 30 minutos a 50°C. Posteriormente fueron lavadas con TBS-TWEEN 0.1% para eliminar el mercaptoetanol. Las membranas fueron bloqueadas nuevamente con 5% leche /TBS-tween 0.1% durante 1 h. La incubación de los anticuerpos se realizó como fue descrito previamente utilizando anticuerpo primario de conejo anti-H2A.X (1:5000,UPSTATE) y secundario conjugado a peroxidasa de rábano.

GELES DE TRICINA AL 16%

	4% Gel Concentrador	16% Gel separador
Acrilamida/bisacrilamida (49.5%T,3% C)	500 μ l	3.33 ml
Buffer 3M Tris, pH 8.25, SDS 0.3%	1500 μ l	3.33 ml
Glicerol		0.792 ml
Agua destilada	4 ml	2.5 ml
Persulfato de amonio 10%	45 μ l	33 μ l
TEMED	4.5 μ l	3.3 μ l

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la distribución de los micronúcleos en las células binucleadas se utilizó la prueba Z de proporciones. (Diferencia entre las proporciones de dos poblaciones (estadístico Z), ambas con un nivel de significancia de 0.05.)

✦ Prueba de hipótesis (estadístico Z)

Donde:

$$Z = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{\frac{pq}{n_1} + \frac{pq}{n_2}}}$$

P₁ = proporción de la muestra de éxito del grupo 1

P₂ = proporción de la muestra de éxito del grupo 2

n₁ = tamaño de la muestra del grupo 1

n₂ = tamaño de la muestra del grupo 2

q₁ = proporción de la muestra de fracasos en el grupo 1

q₂ = proporción de la muestra de fracasos del grupo 2

Para el análisis del Western Blot las imágenes fueron analizadas y cuantificadas con el programa Scion Image. Y la comparación entre los genotipos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Friedman con ayuda del software MiniTabtm.

RESULTADOS

1.-Genotipificación del polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR humana.

Se realizó la extracción del DNA a partir de 10 ml de sangre periférica de 42 individuos bajo las condiciones previamente mencionadas. Para valorar la eficiencia de la extracción se realizó el corrimiento de cada una de las muestras en geles de agarosa al 1%. De cada muestra se corrieron 4 μ l +1 μ l de muestra de aplicación. En cada una de las muestras, se observó una banda de aproximadamente 12 000 pb, lo que refleja que el material extraído estaba poco degradado.

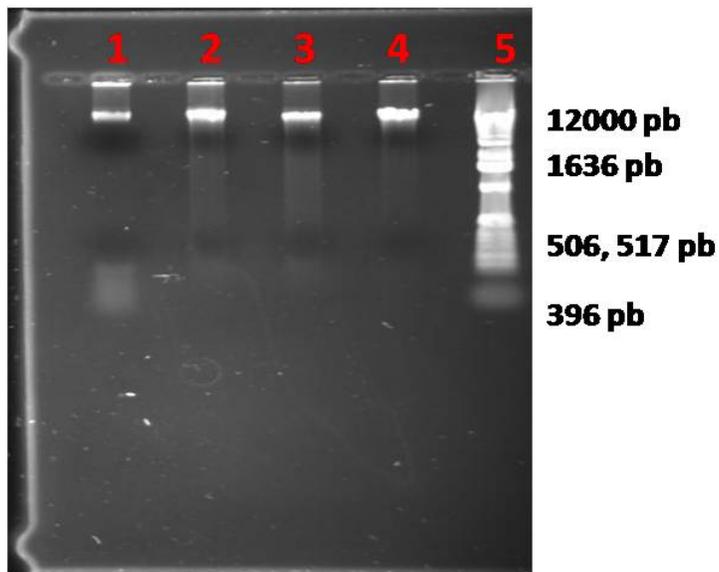


Figura 11. Gel de agarosa al 1% donde en los carriles 1-4 se observa el DNA extraído de sangre periférica, carril 5 marcador de peso molecular de 1Kb.

A su vez, la eficiencia y la pureza de la extracción fueron corroboradas mediante la lectura de las muestras en el espectrofotómetro. La pureza se evaluó mediante la relación de lectura 260nm/280nm. A 260 nm se leen las bases del DNA, a 280nm, se leen las proteínas. El radio 260/280 es utilizado para determinar la pureza de la

extracción de DNA, ya que determina el contenido relativo de DNA/proteínas. El radio óptimo debe de ser de 1.8, un radio menor indica la contaminación por proteínas. Las lecturas obtenidas fueron las siguientes:

Muestra	260 nm	280 nm	260/280	µg/µl
1	0.22	0.112	1.9642857	143.31268
2	0.11	0.052	2.1153846	154.33673
3	0.122	0.072	1.6944444	123.62528
4	0.133	0.033	4.030303	294.04762
5	0.172	0.096	1.7916667	130.71854
6	0.219	0.21	1.0428571	76.086006
7	0.158	0.072	2.1944444	160.10488
8	0.275	0.163	1.6871166	123.09065
9	0.204	0.133	1.5338346	111.90732
10	0.175	0.121	1.446281	105.51948
11	0.204	0.158	1.2911392	94.200465
12	0.147	0.103	1.4271845	104.12621
13	0.143	0.068	2.1029412	153.42887
14	0.154	0.11	1.4	102.14286
15	0.084	0.05	1.68	122.57143
16	0.124	0.071	1.7464789	127.42167
17	0.731	0.581	1.2581756	91.795462
18	0.087	0.05	1.74	126.94898
19	0.117	0.078	1.5	109.43878
20	0.133	0.069	1.9275362	140.63147
21	0.165	0.092	1.7934783	130.85071
22	0.101	0.045	2.2444444	163.75283
23	0.111	0.07	1.5857143	115.69242
24	0.18	0.11	1.6363636	119.38776
25	0.15	0.08	1.875	136.79847
26	0.2	0.123	1.6260163	118.63282

27	0.234	0.13	1.8	131.32653
28	0.67	0.4	1.675	122.20663
29	0.159	0.082	1.9390244	141.469637
30	0.19	0.094	2.0212766	147.47069
31	1.776	0.957	1.8557994	135.397607
32	2.08	1.123	1.8521817	135.133662
33	0.125	0.082	1.5243902	111.218268
34	0.54	0.094	5.7446809	419.12723
35	1.33	0.6	2.2166667	161.72619
36	2	1.18	1.6949153	123.65963
37	0.891	0.53	1.6811321	122.654024
38	0.19	0.09	2.1111111	154.024943
39	0.879	0.468	1.8782051	137.032313
40	0.12	0.075	1.6	116.734694
41	0.211	0.123	1.7154472	125.157624
42	0.19	0.1	1.9	138.622449

Tabla 1. Resultados de la cuantificación de DNA

A partir de estas muestras se llevó a cabo la genotipificación, mediante el procedimiento antes mencionado. Las muestras amplificadas se corrieron en geles de agarosa al 3%. El fragmento amplificado fue de 198 pb

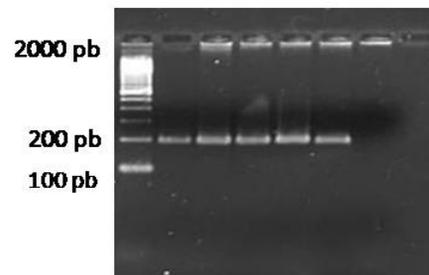


Figura 12. Gel de agarosa al 3% donde se observa el producto de PCR, fragmento de 198 pb

Las muestras amplificadas se digirieron con la enzima Hinf I, utilizando 0.25 unidades, y dejándola actuar durante una hora a 37 °C. Posteriormente se corrieron las muestras en geles de agarosa al 3%.

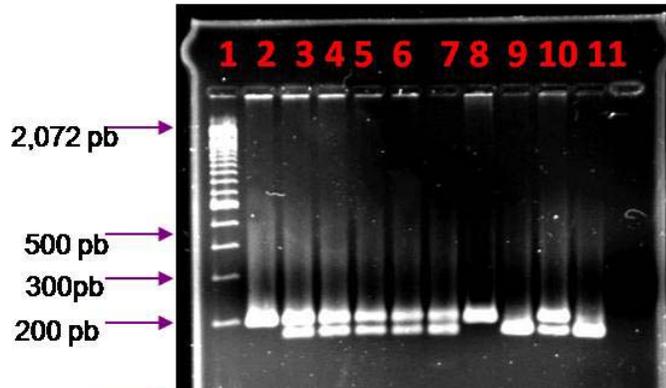


Figura 13. Gel de agarosa al 3% se observan los productos de la digestión, con la enzima de restricción Hinf I, del fragmento de 198 pb amplificado. El Carril 1 representa el marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2 y 8 individuo C/C, carriles 3,4,5,6,7 y 10 individuos C/T, carriles 9 y 11 individuos T/T para el polimorfismo C677T de la MTHFR.

Las frecuencias genotípicas obtenidas fueron:

Genotipo	# de individuos	Porcentaje
C/C	9	21.43%
C/T	20	47.62%
T/T	13	30.95%

Tabla 2. Resultados de las frecuencias genotípicas para el polimorfismo C677T de la MTHFR

Las frecuencias alélicas son:

C ---45.24%

T---- 54.76%

A partir de estos resultados, se seleccionaron 2 individuos de cada genotipo para poder realizar los cultivos celulares con exposición a los agentes antes mencionados. Los conteos se hicieron por duplicado bajo los criterios antes establecidos.

2.- CONTEO DE MICRONÚCLEOS DE LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A AGENTES QUÍMICOS

Para evaluar el efecto del polimorfismo en la susceptibilidad a desarrollar daño cromosómico tras la exposición a los agentes aneugénicos, clastogénicos y desmetilantes mencionados, se realizó el ensayo de micronúcleos con citocinesis bloqueada. Esto se llevó a cabo a partir de cultivos de sangre completa en el medio RPMI1640. Estos cultivos fueron estimulados con Fitohemaglutinina y se permitió la proliferación de los linfocitos por 48 h. 24 , 48 y 72 h posteriores a este tiempo de proliferación se realizó la lectura de los micronúcleos

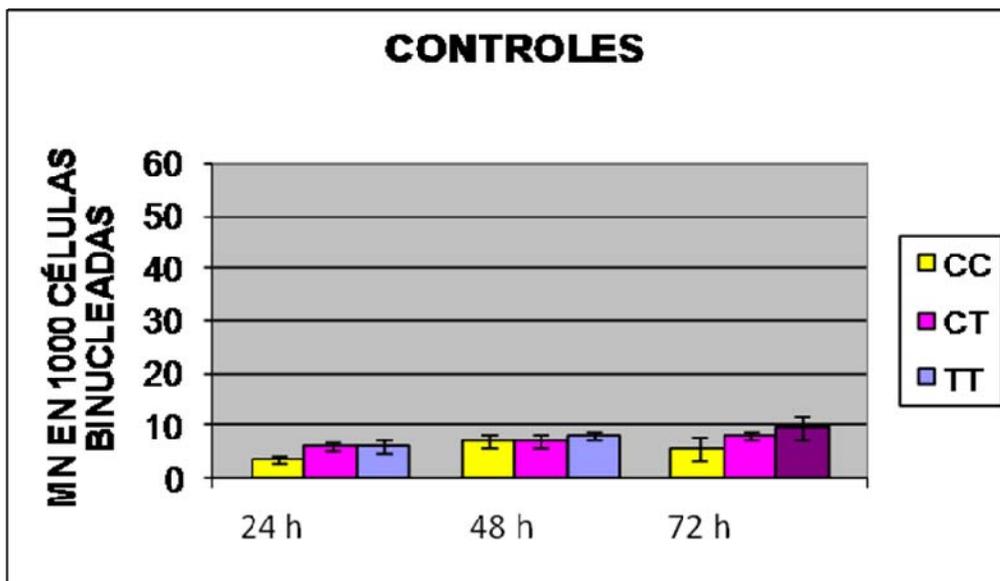


Figura 13. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	2.8 E ⁻⁷ *
	CC vs TT	0.0126*
	CT vs TT	0.5
48h	CC vs CT	0.5
	CC vs TT	0.5
	CT vs TT	0.158
72 h	CC vs CT	0.047 *
	CC vs TT	0.029 *
	CT vs TT	0.15

Tabla 3. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Se encontró que a las 24 h los individuos CC presentan una menor frecuencia de micronúcleos con respecto a los CT y TT. Sin embargo a las 48 h la frecuencia de micronúcleos no difiere entre los genotipos. Finalmente a las 72 h encontramos que los individuos CC presentan una menor frecuencia de micronúcleos con respecto a los otros dos genotipos.

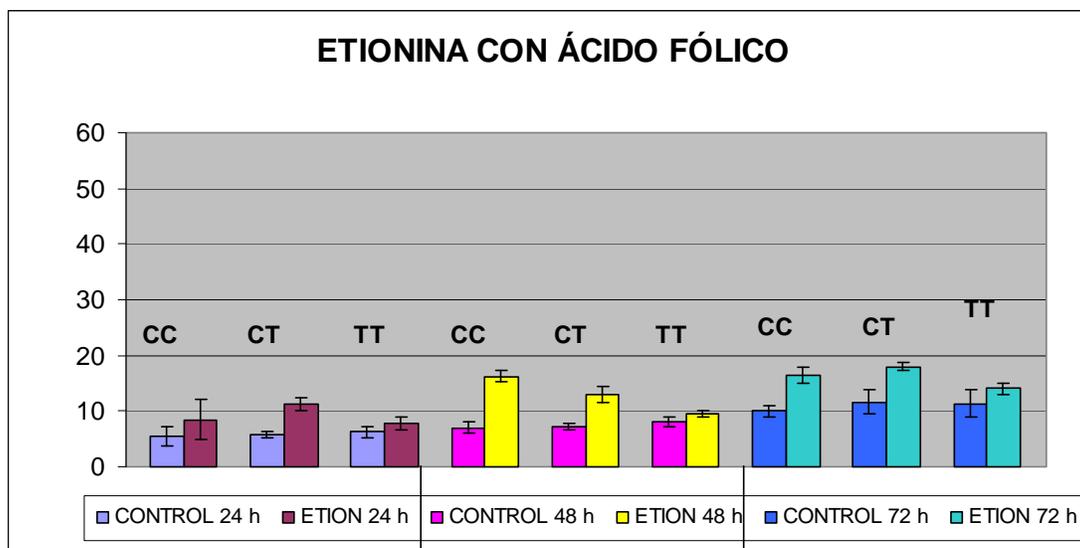


Figura 14. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con etionina 10 μ M, comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.14
	CC vs TT	0.38
	CT vs TT	0.0005 *
48h	CC vs CT	0.0046 *
	CC vs TT	3.48 E ⁻¹⁴ *
	CT vs TT	0.008 *
72 h	CC vs CT	0.089
	CC vs TT	0.006 *
	CT vs TT	6.66 E ⁻¹⁶ *

Tabla 4. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Tras el tratamiento con una concentración de 10 μ M de etionina se observó que la frecuencia de micronúcleos presentada en los 3 periodos de estudios y en los 3 genotipos fue mayor a los presentes en los controles. A las 24 h los individuos CC no difieren en la frecuencia de micronúcleos con respecto a los otros dos genotipos, sin embargo los individuos CT presentan una mayor frecuencia de micronúcleos con respecto a los TT. Hacia las 48 h de exposición los individuos CC son los que presentan la mayor frecuencia de micronúcleos y los TT la menor. Finalmente a las 72 h de exposición los individuos con genotipo CC y TT manifiestan el mismo comportamiento presentando una mayor frecuencia de micronúcleos con respecto a los TT.

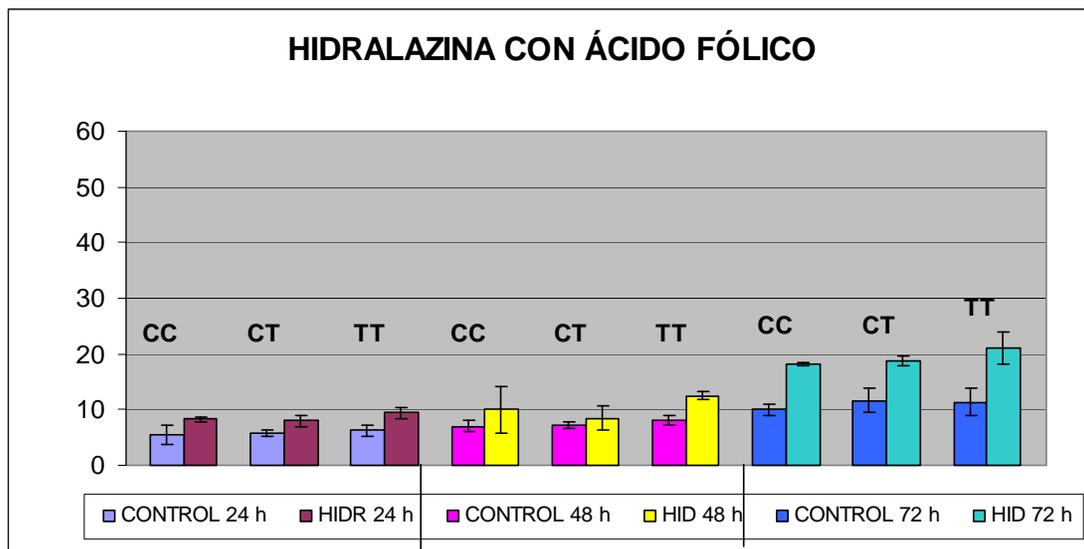


Figura 15. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con hidralazina 10 μ M, comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.158
	CC vs TT	2.89 E ⁻⁷ *
	CT vs TT	0*
48h	CC vs CT	0.327
	CC vs TT	0.20
	CT vs TT	0.0057 *
72 h	CC vs CT	0.26
	CC vs TT	0.08
	CT vs TT	0.14

Tabla 5. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Después de 24 h de exposición con una concentración de 10 µM de hidralazina, los individuos con genotipo TT son los que presentan la mayor frecuencia de micronúcleos mientras que los individuos CC y CT no presentan diferencias en su frecuencia. A las 48 h los individuos TT presentan una mayor frecuencia de micronúcleos con respecto a las CT, sin embargo en relación con los CC presentan el mismo comportamiento. A las 72 h la frecuencia de micronúcleos entre los genotipos no presenta diferencias significativas.

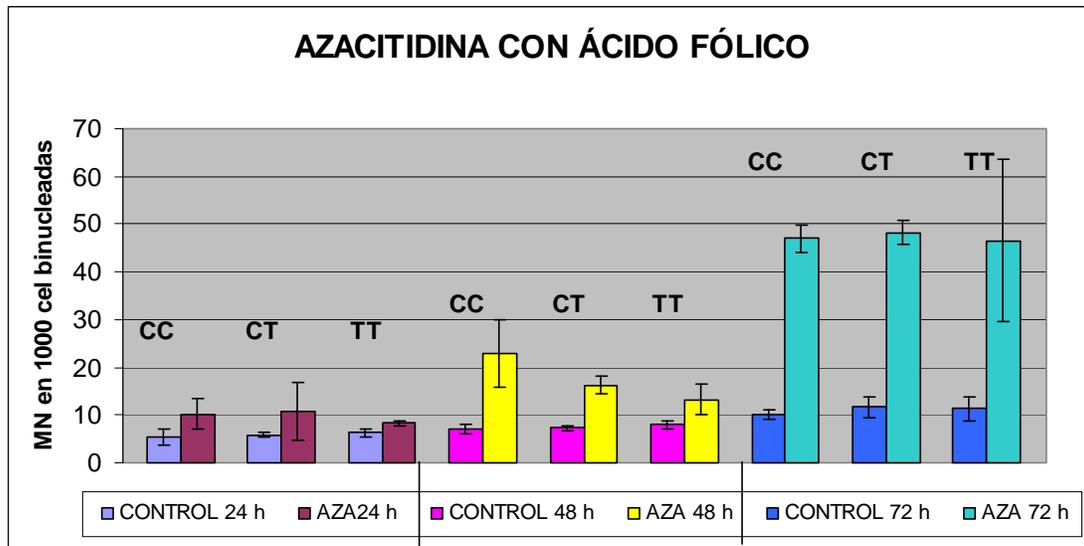


Figura 16. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con azacitidina 10 μ M, comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.45
	CC vs TT	0.18
	CT vs TT	0.27
48h	CC vs CT	0.09
	CC vs TT	0.037 *
	CT vs TT	0.12
72 h	CC vs CT	0.31
	CC vs TT	0.48
	CT vs TT	0.44

Tabla 6. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

A la 24 h tras la exposición a una concentración 10 μ M de Azacitidina no se encuentran diferencias significativas en la frecuencia de micronúcleos entre los genotipos, sin embargo hacia las 48 h de exposición los individuos TT presentan una menor frecuencia

de micronúcleos con respecto a los CC, finalmente hacia las 72 h el comportamiento de los genotipos es igual.

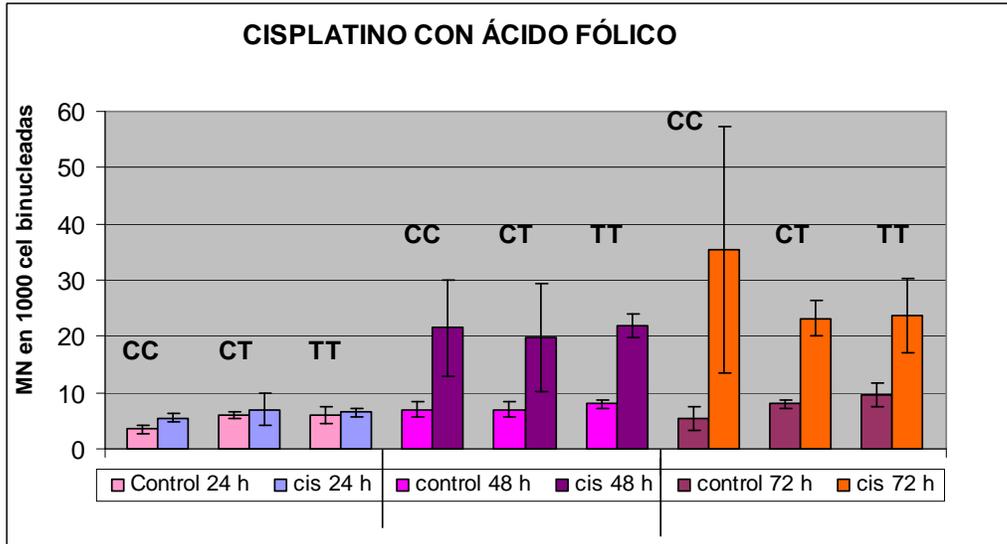


Figura 17. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con Cisplatino 0.5 μ M, comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h.

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.23
	CC vs TT	0.078
	CT vs TT	0.4
48h	CC vs CT	0.423
	CC vs TT	0.46
	CT vs TT	0.37
72 h	CC vs CT	0.217
	CC vs TT	0.23
	CT vs TT	0.46

Tabla 7. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Con el tratamiento con cisplatino a una concentración de 0.5 μM encontramos que no hay diferencia en la frecuencia de micronúcleo entre los genotipos a ningún período de estudio.

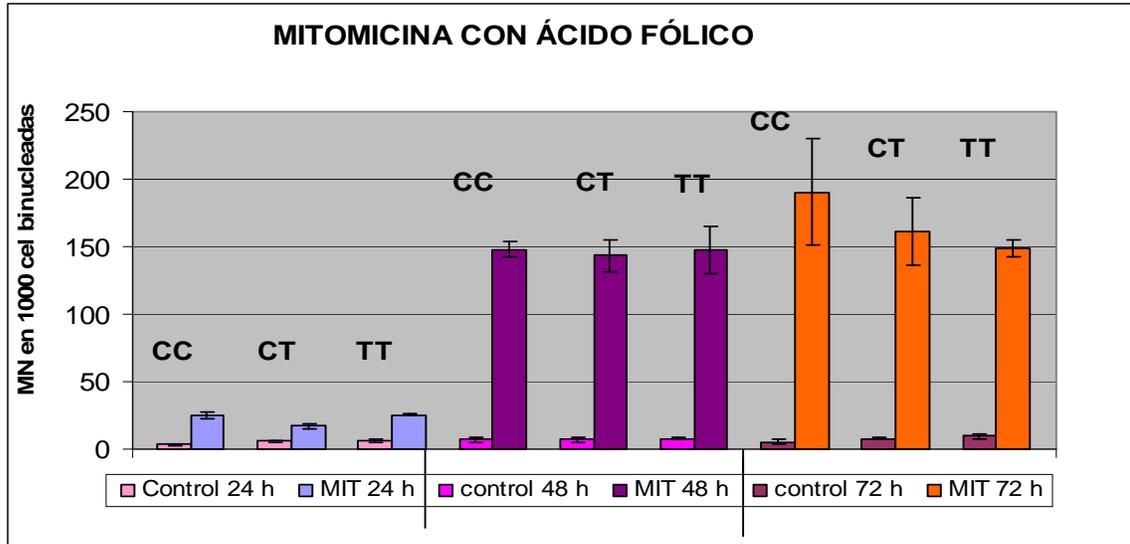


Figura 18. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con Mitomicina 0.5 μM , comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.0001*
	CC vs TT	0.404
	CT vs TT	1.45 E ⁻¹⁴ *
48h	CC vs CT	0.035
	CC vs TT	0.059
	CT vs TT	0.29
72 h	CC vs CT	1.66
	CC vs TT	1.11
	CT vs TT	0.88

Tabla 8. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Tras la exposición a una concentración de mitomicina 0.5 μ M los individuos con el genotipo CT presentan una menor frecuencia de micronúcleos con respecto a los otros dos genotipos. Hacia las 48 y 72 h la frecuencia de micronúcleos no difiere entre los genotipos.

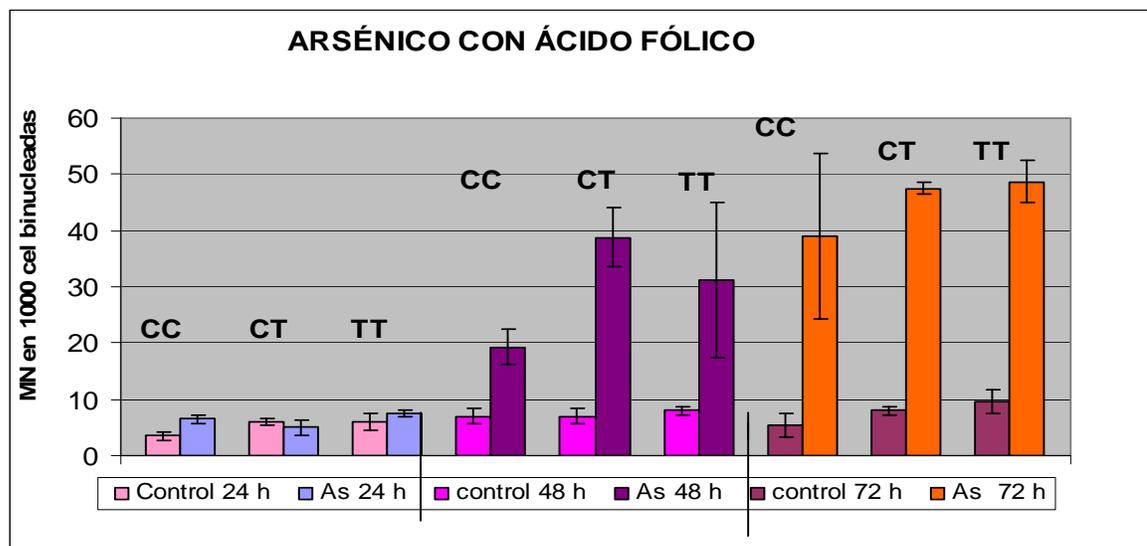


Figura 19. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con Arsenito de Sodio 5 μ M, comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.089
	CC vs TT	0.078
	CT vs TT	0.012*
48h	CC vs CT	4.11 E ⁻⁶ *
	CC vs TT	0.11
	CT vs TT	0.23
72 h	CC vs CT	0.2
	CC vs TT	0.18
	CT vs TT	0.32

Tabla 9. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Con la exposición a Arsenito de Sodio 5 μ M los individuos con genotipo CT presentan una menor frecuencia de micronúcleos con respecto a los TT, sin embargo no difieren con los CC. A las 48 de exposición los individuos CC presentan una menor frecuencia de micronúcleos con respecto a los CT, pero no difiere con los TT. A las 72 h los genotipos no difieren en la frecuencia de micronúcleos.

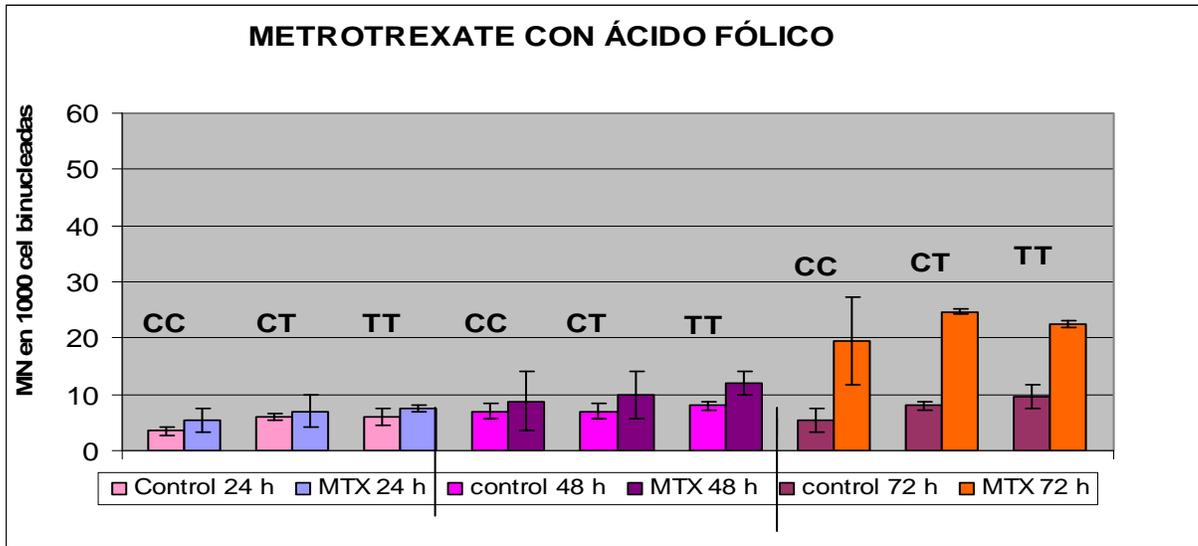


Figura 20. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con Metotrexate 0.05 μ M, comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.27
	CC vs TT	0.120
	CT vs TT	0.404
48h	CC vs CT	0.39
	CC vs TT	0.21
	CT vs TT	0.27
72 h	CC vs CT	0.17
	CC vs TT	0.29
	CT vs TT	2.84 E ⁻⁵ *

Tabla 10. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Con el tratamiento con Metotrexate 0.05 μ M solo se observó diferencia en la frecuencia de micronúcleos entre los individuos CT y TT hacia las 72 h de exposición.

3.- RESULTADOS DE MICRONÚCLEOS BAJO CONDICIONES DE DEFICIT DE FOLATOS

El medio de cultivo que utilizamos contiene una concentración de 2.26 $\mu\text{M/L}$ de ácido fólico. Es decir que este contiene una concentración suprafisiológica de éste ya que sabemos que el nivel fisiológico encontrado en el plasma va desde < 7 nmol/l en individuos con un balance deficiente de folato, a > 50 nmol/L en individuos que consumen el índice diario recomendado. Debido a que el efecto del polimorfismo es evidente bajo condiciones de deficiencia de ácido fólico decidimos evaluar la respuesta ante la exposición a las sustancias bajo dicha deficiencia, para ello utilizamos el medio RPMI 1640 sin ácido Fólico.

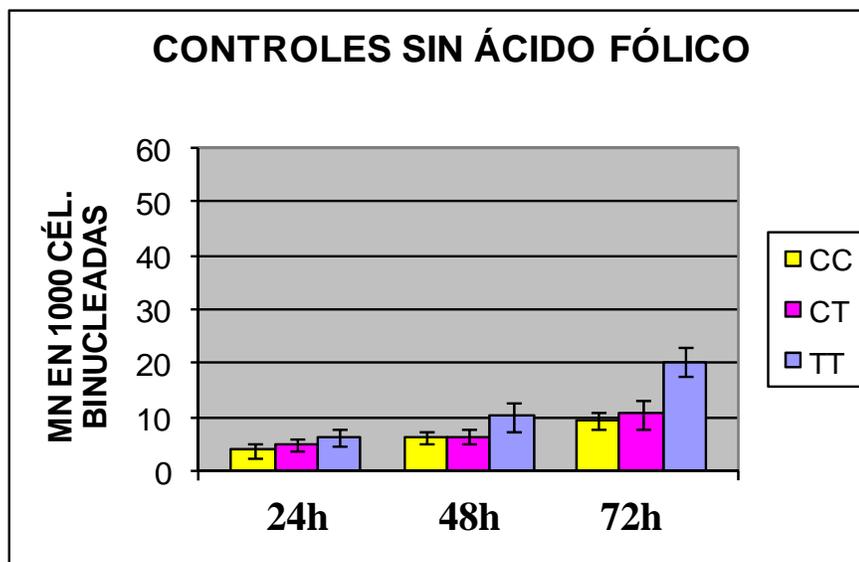


Figura 21. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.120
	CC vs TT	0.0138*
	CT vs TT	0.045*
48h	CC vs CT	0.5
	CC vs TT	0.006 *
	CT vs TT	0.006 *
72 h	CC vs CT	0.34
	CC vs TT	3.13 E ⁻¹³ *
	CT vs TT	0.007 *

Tabla 11. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

En los 3 periodos de estudio los individuos TT presentan una mayor frecuencia de micronúcleos con respecto a los CC y CT. Estos últimos no difieren en su frecuencia de micronúcleos

Debido a que existe una diferencia en la frecuencia de micronúcleos entre genotipos sin tratamiento, para evaluar la frecuencia de micronúcleos resultante de la exposición a agentes utilizados fue necesario hacer un ajuste donde se restara el daño basal de cada individuo

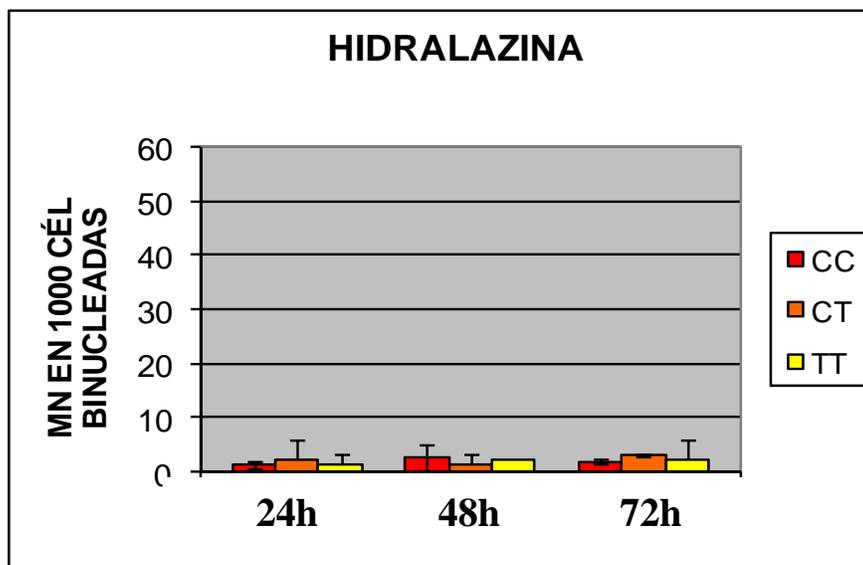


Figura 22. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con Hidralazina 10 μ M bajo deficiencia de ácido fólico, comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.34
	CC vs TT	0.5
	CT vs TT	0.36
48h	CC vs CT	0.29
	CC vs TT	0.44
	CT vs TT	0.25
72 h	CC vs CT	$2.89 E^{-7} *$
	CC vs TT	0.42
	CT vs TT	0.38

Tabla 12. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Con el tratamiento con hidralazina 10 μ M solo se observa una diferencia en la frecuencia de micronúcleos entre los individuos CC y CT después de 72 h.

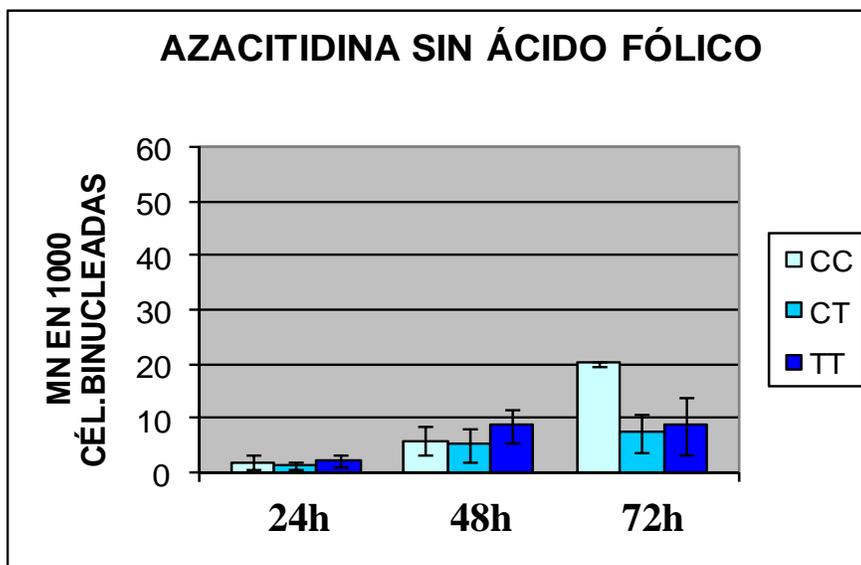


Figura 23. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con Azacitidina 10 μ M bajo deficiencia de ácido fólico, comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.32
	CC vs TT	0.42
	CT vs TT	0.2
48h	CC vs CT	0.4
	CC vs TT	0.18
	CT vs TT	0.13
72 h	CC vs CT	1.94 E ^{-7*}
	CC vs TT	0.001*
	CT vs TT	0.39

Tabla 13. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Con el tratamiento con Azacitidina 10 μ M la frecuencia de micronúcleos tras 24 y 48 h de exposición no difiere en función del genotipo, sin embargo hacia las 72 h de

exposición encontramos que los individuos CC presentan una mayor frecuencia de micronúcleos con respecto a las CT y TT.

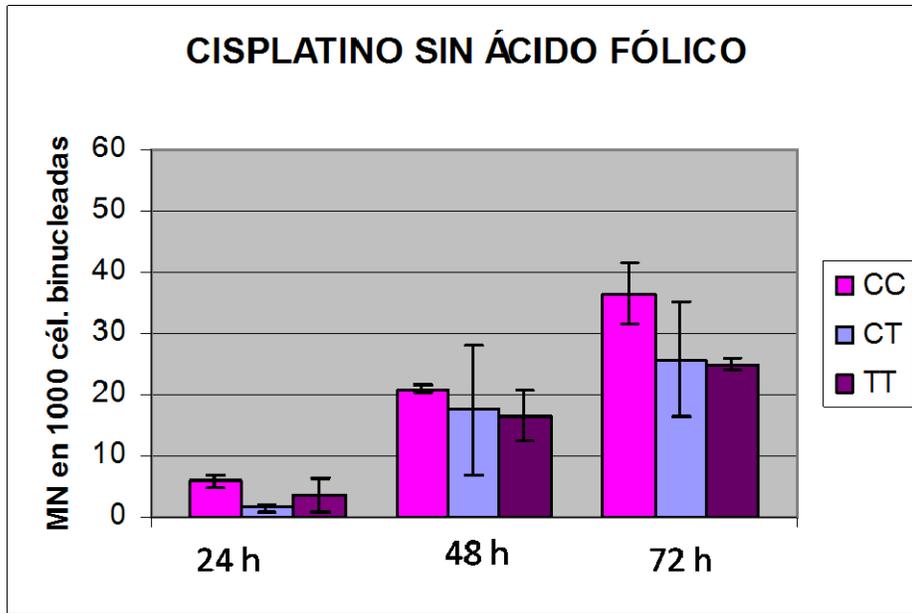


Figura 24. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con Cisplatino 0.5 μM bajo deficiencia de ácido fólico, comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h.

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0 *
	CC vs TT	0.10
	CT vs TT	0.16
48h	CC vs CT	0.32
	CC vs TT	0.06
	CT vs TT	0.45
72 h	CC vs CT	0.07
	CC vs TT	0.005*
	CT vs TT	0.45

Tabla 14. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Con el tratamiento con cisplatino 0.5 μ M a las 24 h de exposición los individuos CC presentan una mayor frecuencia de micronúcleos con respecto a los CT. A las 48 h la frecuencia de micronúcleos no difiere entre los genotipos, sin embargo a las 72 h los individuos CC presentan una mayor frecuencia de micronúcleos con respecto a los TT.

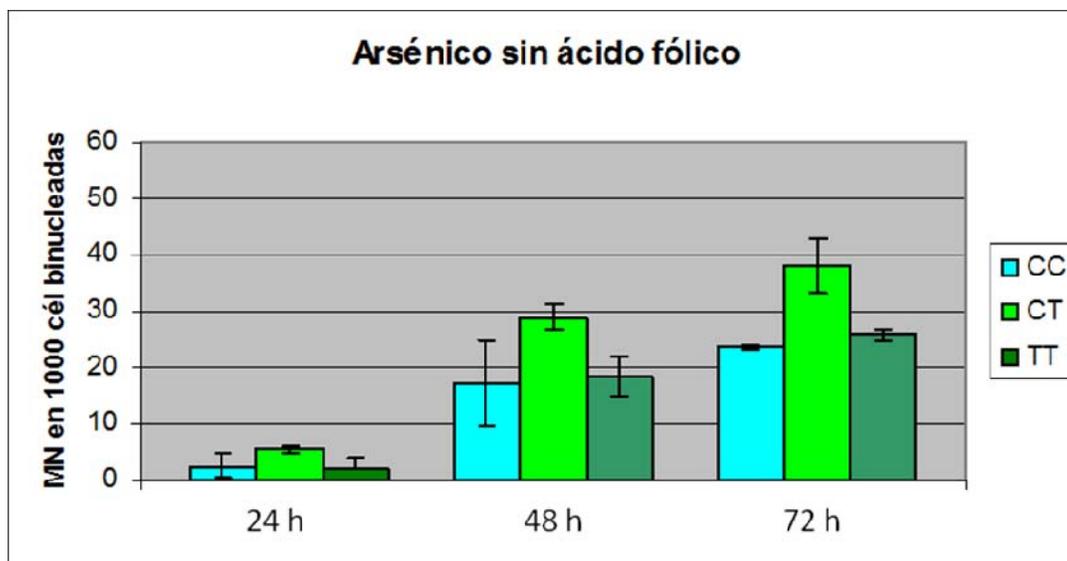


Figura 25. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con Arsenito de Sodio 5 μM bajo deficiencia de ácido fólico, comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.02*
	CC vs TT	0.4
	CT vs TT	0.01 *
48h	CC vs CT	0.015*
	CC vs TT	0.414
	CT vs TT	0.0001*
72 h	CC vs CT	2.44 E ⁻⁵ *
	CC vs TT	0 *
	CT vs TT	0.005*

Tabla 15. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Con el tratamiento con Arsenito de Sodio 0.5 μM los individuos CT presentan una mayor frecuencia de micronúcleos con respecto a los CC y TT, mientras que estos

últimos no difieren en su frecuencia. Este comportamiento se mantiene durante los 3 periodos de estudio.

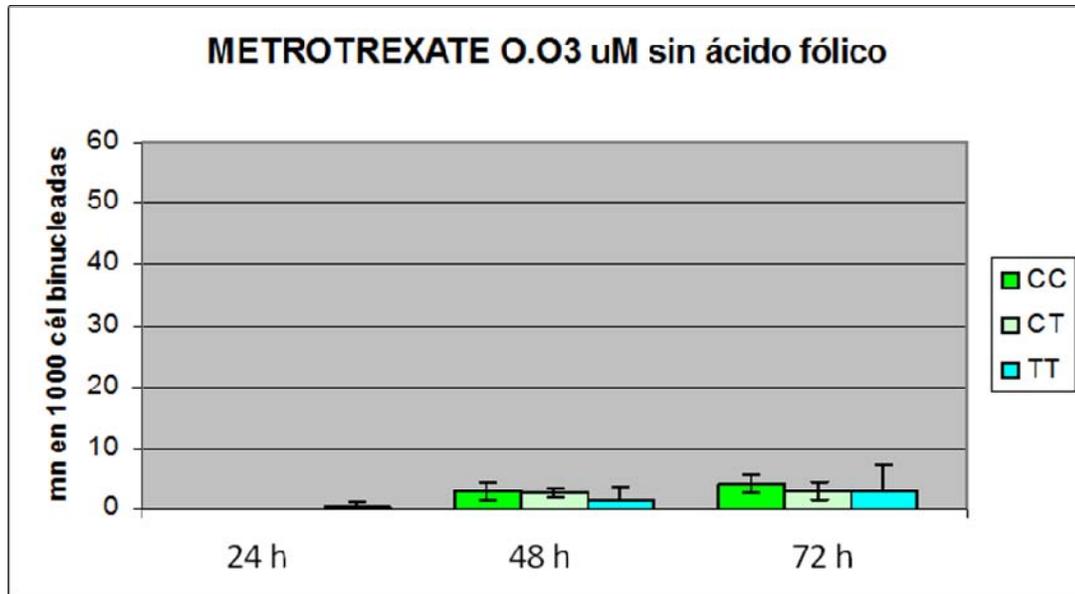


Figura 26. Gráfica de los resultados de micronúcleos en 1000 células binucleadas tratadas con Metotrexate 0.03 μ M bajo deficiencia de ácido fólico, comparando los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en tres periodos de estudio 24, 48 y 72 h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.5
	CC vs TT	0.15
	CT vs TT	0.15
48h	CC vs CT	0.32
	CC vs TT	0.202
	CT vs TT	0.202
72 h	CC vs CT	0.239
	CC vs TT	0.37
	CT vs TT	0.5

Tabla 16. Valor de P resultante de la Prueba Z de proporciones comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Con el tratamiento Metotrexate 0.03 μ M no hay diferencia en la frecuencia de micronúcleos entre los genotipos en ningún periodo de estudio.

Γ -H2A.X

Una de las lesiones más serias en la inestabilidad de la integridad del genoma son los rompimientos de doble cadena. Estas lesiones promueven una serie de respuestas celulares tales como arresto del ciclo celular, relocalización de los factores de reparación en el DNA y en algunos casos apoptosis [108]. La manera en la cual se induce la reparación de estos rompimientos es mediante la fosforilación de una histona miembro de la familia H2A en los nucleosomas vecinos al sitio del daño. Esta modificación se da en la histona variante de H2A, la histona H2A.X, la cual se caracteriza por ser fosforilada en un residuo de serina localizada a 4 residuos del extremo carboxilo terminal, generando así la llamada γ -H2A.X [109]. A la γ -H2A.X se le han atribuido una serie de funciones que incluyen la inducción de una cromatina más accesible para los factores de reparación, el reclutamiento de los factores de reparación, así como la asociación de proteínas como la cohesina, que mantengan los extremos fragmentados cerca [110]. La γ -H2A.X se asocia con ensamblajes dinámicos y organizados de factores de reparación, incluyendo BRCA1, Rad 51 y Nbs 1. A estas estructuras supramoleculares se les ha designado como focos y cada foco corresponde a un rompimiento de doble cadena [111]. Cuando se genera un rompimiento de doble cadena se observa que rápidamente se fosforila la H2A.x hasta una distancia de 1 Mb del sitio de daño, sin embargo no se encuentra en la región de 1-2 Kb inmediata a dicho sitio. Esto quiere decir que aproximadamente se fosforilan 2000 moléculas de H2A.X por rompimiento de doble cadena. A partir de esto se ha sugerido que los focus de γ -H2A.X ayudan a mantener los extremos fragmentados juntos, atrae factores de reparación ensamblando una alta concentración de estos en el sitio de rompimiento, lo cual resulta en una reparación más exitosa y eficiente [112,113 y 114].

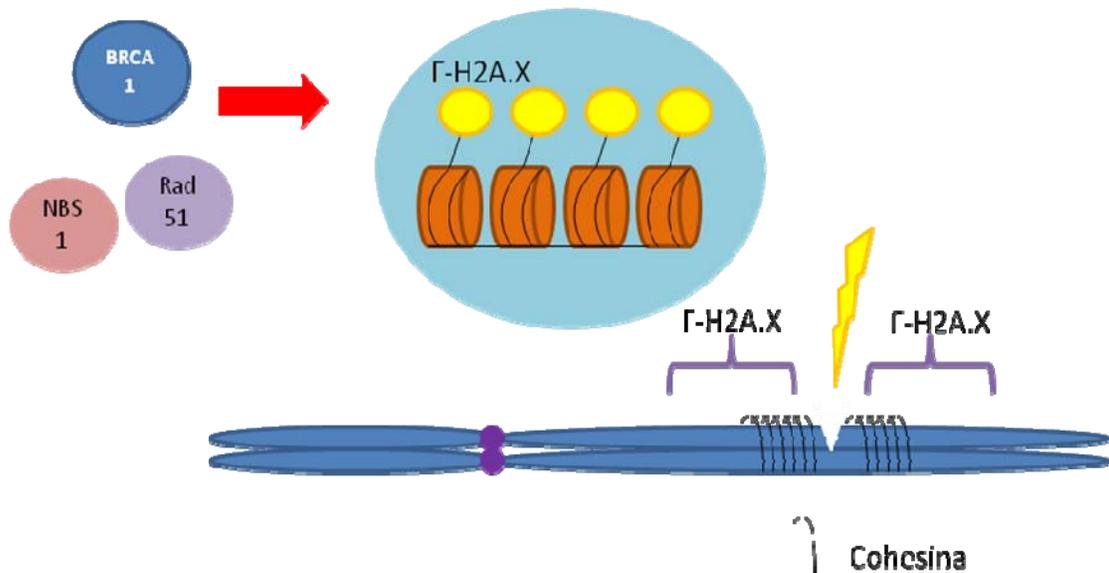


Figura 27. Esquema del papel de γ -H2A.X en la reparación de los rompimientos de doble cadena

Debido a la propuesta de que los individuos homocigos para el polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR poseen una mejor síntesis y reparación del DNA decidimos evaluar si las diferencias encontradas en la frecuencia de micronúcleos entre los genotipos estaba en función de dicha cualidad, para ello, decidimos cuantificar la presencia de la γ -H2A.X como marcador de la frecuencia de rompimientos de doble cadena

3.- RESULTADOS CUANTIFICACIÓN DE HISTONAS

Se realizaron cultivos de linfocitos de los mismos individuos, 2 de cada genotipo, a partir de los cuales se llevó a cabo el conteo de micronúcleos. Estos cultivos se montaron por duplicado y a partir de ellos se procedió a la extracción ácida de histonas. Estas proteínas fueron cuantificadas por el Método de Bradford previamente mencionado.

Para ello es necesario hacer una curva estándar a partir de concentraciones establecidas de Albumina Bovina.

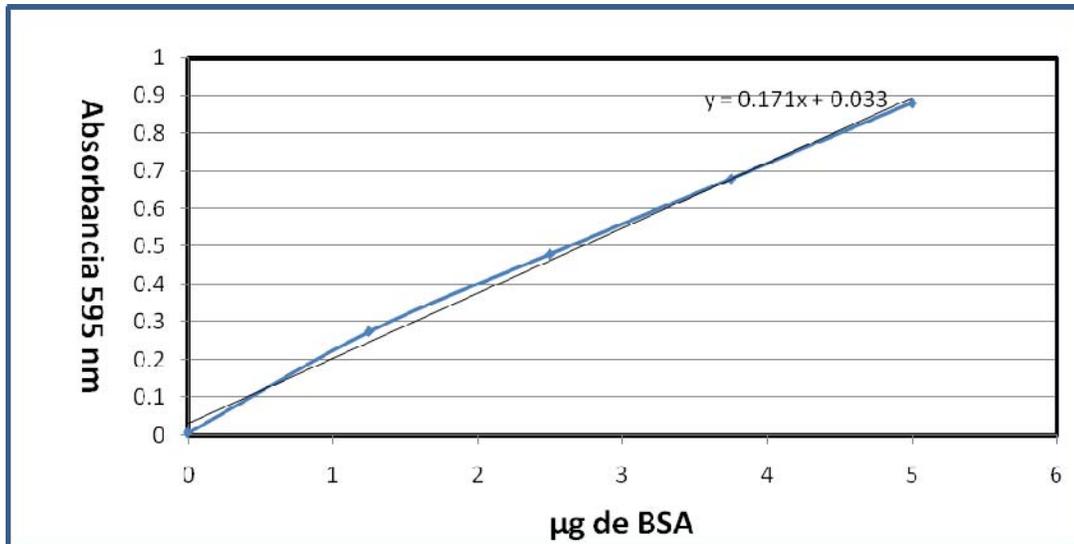


Fig. 28 Grafica de la curva estándar de diferentes concentraciones de Albumina Bovina

Utilizando la ecuación obtenida en la curva estándar se calcula la concentración de proteína a partir de su lectura a 595 nm.

Histonas		OD	Proteína por ul	25ug	15ug
CC1	control 72 h	1.024	5.83030303	8.57588358	5.14553015
	control(2) 72 h	0.917	5.181818182	9.64912281	5.78947368
	Arsenito de sodio 72 h	0.531	2.842424242	17.5906183	10.554371
	Arsenito de sodio (2) 72 h	0.865	4.866666667	10.2739726	6.16438356
	cisplatino 72 h	0.707	3.909090909	12.7906977	7.6744186
	cisplatino (2) 72 h	1.155	6.624242424	7.54803294	4.52881976
CC1	control 48 h	0.553	3.4	14.7058824	8.82352941
	control(2) 48 h	0.475	2.896774194	17.2605791	10.3563474
	Arsenito de sodio 48 h	0.477	2.909677419	17.1840355	10.3104213
	Arsenito de sodio(2) 48 h	0.57	3.509677419	14.2463235	8.54779412
	cisplatino 48 h	0.774	4.825806452	10.3609626	6.21657754

	cisplatino (2) 48 h	0.766	4.774193548	10.472973	6.28378378
CC1	control 24 h	0.683	4.238709677	11.7960426	7.07762557
	control(2) 24 h	0.701	4.35483871	11.4814815	6.88888889
	Arsenito de sodio 24 h	0.843	5.270967742	9.48592411	5.69155447
	Arsenito de sodio(2) 24 h	0.696	4.322580645	11.5671642	6.94029851
	cisplatino 24 h	0.906	5.677419355	8.80681818	5.28409091
	cisplatino (2) 24 h	0.868	5.432258065	9.20427553	5.52256532
CC2	control 72 h	0.4	2.706078824	9.23845964	5.54307578
	control(2) 72 h	0.291	1.977955912	12.639311	7.58358663
	Arsenito de sodio 72 h	0.485	3.273881096	7.63619669	4.58171802
	Arsenito de sodio (2) 72 h	0.305	2.071476286	12.0686875	7.24121251
	cisplatino 72 h	0.381	2.579158317	9.69308469	5.81585082
	cisplatino (2) 72 h	0.425	2.873079492	8.70146478	5.22087887
CC2	control 48 h	0.756	4.228070175	11.8257261	7.09543568
	control(2) 48 h	0.741	4.140350877	12.0762712	7.24576271
	Arsenito de sodio 48 h	0.555	3.052631579	16.3793103	9.82758621
	Arsenito de sodio(2) 48 h	0.456	2.473684211	20.212766	12.1276596
	cisplatino 48 h	0.709	3.953216374	12.647929	7.5887574
	cisplatino (2) 48 h	0.586	3.233918129	15.4611212	9.27667269
CC2	control 24 h	0.45	2.438596491	20.5035971	12.3021583
	control(2) 24 h	0.542	2.976608187	16.7976424	10.0785855
	Arsenito de sodio 24 h	0.365	1.941520468	25.753012	15.4518072

	Arsenito de sodio(2) 24 h	0.469	2.549707602	19.6100917	11.766055
	cisplatino 24 h	0.469	2.549707602	19.6100917	11.766055
	cisplatino (2) 24 h	0.543	2.98245614	16.7647059	10.0588235
CT1	control 72 h	0.512	3.135483871	15.9465021	9.56790123
	control(2) 72 h	0.253	1.724114896	14.5001937	8.70011623
	Arsenito de sodio 72 h	0.2	1.37007348	18.2471965	10.9483179
	Arsenito de sodio (2) 72 h	0.089	0.628590514	39.7715197	23.8629118
	cisplatino 72 h	0.234	1.597194389	15.6524467	9.39146801
	cisplatino (2) 72 h	0.287	1.951235805	12.812393	7.68743581
CT1	control 48 h	0.414	2.228070175	22.4409449	13.4645669
	control(2) 48 h	0.512	2.801169591	17.8496868	10.7098121
	Arsenito de sodio 48 h	0.407	2.187134503	22.8609626	13.7165775
	Arsenito de sodio(2) 48 h	0.318	1.666666667	30	18
	cisplatino 48 h	0.397	2.128654971	23.489011	14.0934066
	cisplatino (2) 48 h	0.267	1.368421053	36.5384615	21.9230769
CT1	control 24 h	0.215	1.064327485	46.978022	28.1868132
	control(2) 24 h	0.156	0.719298246	69.5121951	41.7073171
	Arsenito de sodio 24 h	0.096	0.368421053	135.714286	81.4285714
	Arsenito de sodio(2) 24 h	0.151	0.69005848	72.4576271	43.4745763
	cisplatino 24 h	0.149	0.678362573	73.7068966	44.2241379
	cisplatino (2) 24 h	0.467	2.616766467	22.9290618	11.4645309
CT2	control 72 h	0.527	3.554442218	7.03345236	4.22007142

	control(2) 72 h	0.605	4.075484302	6.13424029	3.68054417
	Arsenito de sodio 72 h	0.413	2.792919172	8.95120785	5.37072471
	Arsenito de sodio (2) 72 h	0.453	3.06012024	8.16961362	4.90176817
	cisplatino 72 h	0.388	2.625918504	9.52047825	5.71228695
	cisplatino (2) 72 h	0.437	2.953239813	8.46527935	5.07916761
CT2	control 48 h	1.1	6.239766082	8.0131209	4.80787254
	control(2) 48 h	0.933	5.263157895	9.5	5.7
	Arsenito de sodio 48 h	0.613	3.391812865	14.7413793	8.84482759
	Arsenito de sodio(2) 48 h	0.681	3.789473684	13.1944444	7.91666667
	cisplatino 48 h	0.952	5.374269006	9.30359086	5.58215452
	cisplatino (2) 48 h	0.804	4.50877193	11.0894942	6.6536965
CT2	control 24 h	0.628	3.777027027	13.2379249	7.94275492
	control(2) 24 h	0.697	4.243243243	11.7834395	7.07006369
	Arsenito de sodio 24 h	0.535	3.148648649	15.8798283	9.527897
	Arsenito de sodio(2) 24 h	0.48	2.777027027	18.0048662	10.8029197
	cisplatino 24 h	0.549	3.243243243	15.4166667	9.25
	cisplatino (2) 24 h	0.466	2.682432432	18.6397985	11.1838791
TT1	control 72 h	0.575	3.8750835	6.45147388	3.87088433
	control(2) 72 h	0.52	3.507682031	7.12721386	4.27632832
	Arsenito de sodio 72 h	0.474	3.200400802	7.8115216	4.68691296
	Arsenito de sodio (2) 72 h	0.444	3	8.33333333	5
	cisplatino 72 h	0.556	3.748162993	6.66993406	4.00196043
	cisplatino (2) 72 h	0.525	3.541082164	7.05998868	4.23599321

TT1	control 48 h	0.468	2.543859649	19.6551724	11.7931034
	control(2) 48 h	0.805	4.514619883	11.0751295	6.64507772
	Arsenito de sodio 48 h	0.77	4.30994152	11.6010855	6.96065129
	Arsenito de sodio(2) 48 h	0.755	4.222222222	11.8421053	7.10526316
	cisplatino 48 h	0.532	2.918128655	17.1342685	10.2805611
	cisplatino (2) 48 h	0.705	3.929824561	12.7232143	7.63392857
TT1	control 24 h	0.818	4.590643275	10.8917197	6.53503185
	control(2) 24 h	0.575	3.169590643	15.7749077	9.46494465
	Arsenito de sodio 24 h	0.556	3.058479532	16.3479924	9.80879541
	Arsenito de sodio(2) 24 h	0.609	3.368421053	14.84375	8.90625
	cisplatino 24 h	0.673	3.742690058	13.359375	8.015625
	cisplatino (2) 24 h	0.789	4.421052632	11.3095238	6.78571429
TT2	control 72 h	0.575	3.8750835	6.45147388	3.87088433
	control(2) 72 h	0.52	3.507682031	7.12721386	4.27632832
	Arsenito de sodio 72 h	0.474	3.200400802	7.8115216	4.68691296
	Arsenito de sodio (2) 72 h	0.444	3	8.33333333	5
	cisplatino 72 h	0.556	3.748162993	6.66993406	4.00196043
	cisplatino (2) 72 h	0.525	3.541082164	7.05998868	4.23599321
TT2	control 48 h	0.59	3.257309942	15.3500898	9.21005386
	control(2) 48 h	0.802	4.497076023	11.1183355	6.6710013
	Arsenito de sodio 48 h	0.669	3.719298246	13.4433962	8.06603774
	Arsenito de sodio(2) 48 h	0.59	3.257309942	15.3500898	9.21005386

	cisplatino 48 h	0.583	3.216374269	15.5454545	9.32727273
	cisplatino (2) 48 h	0.654	3.631578947	13.7681159	8.26086957
TT2	control 24 h	0.703	3.918128655	12.761194	7.65671642
	control(2) 24 h	0.634	3.514619883	14.2262895	8.53577371
	Arsenito de sodio 24 h	0.509	2.783625731	17.9621849	10.7773109
	Arsenito de sodio(2) 24 h	0.406	2.18128655	22.922252	13.7533512
	cisplatino 24 h	0.578	3.187134503	15.6880734	9.41284404
	cisplatino (2) 24 h	0.575	3.169590643	15.7749077	9.46494465

Tabla 17. Resultados de la cuantificación de histonas

4. RESULTADOS WESTERN BLOT

Para poder determinar la cantidad de γ -H2A.X inducida por el tratamiento con arsenito de sodio y cisplatino se tomó como control la H2A.X no fosforilada. Tomando como proteína total la suma de la H2A.X y de γ -H2A.X, se calculó que proporción de este total corresponde a la proteína fosforilada.

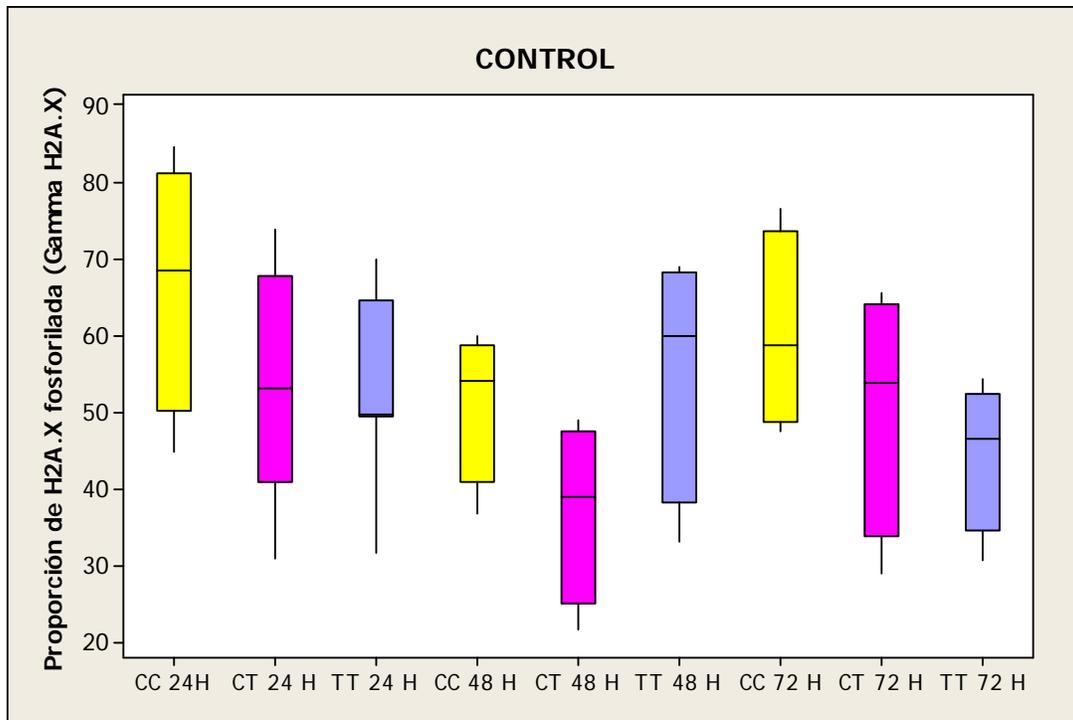


Figura 29. Gráfica de la proporción de γ -H2A.X encontrados en los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en los 3 periodos de estudio, 24,48 y 72h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.034 *
	CC vs TT	0.157
	CT vs TT	1
48h	CC vs CT	0.317
	CC vs TT	1
	CT vs TT	0.046 *
72 h	CC vs CT	1
	CC vs TT	0.046*
	CT vs TT	0.317

Tabla 18. Valor de P resultante de la Prueba no paramétrica de Friedman comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Al comparar las medianas de la proporción de H2A.X fosforilada se encontró que a las 24 h la mediana de los CC fue de 68.41, la de los CT de 53.22 y la de los TT de 49.6, solo hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los CC y CT. A las 48 h los CC presentaron una mediana de 54.06, los CT de 39.13 y los TT de 59.79, solo se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los CT y TT. Finalmente a las 72 h la mediana de los CC fue de 58.63, de los CT de 58.89 y los TT 46.57, la diferencia significativa se observó ente los CC y TT.

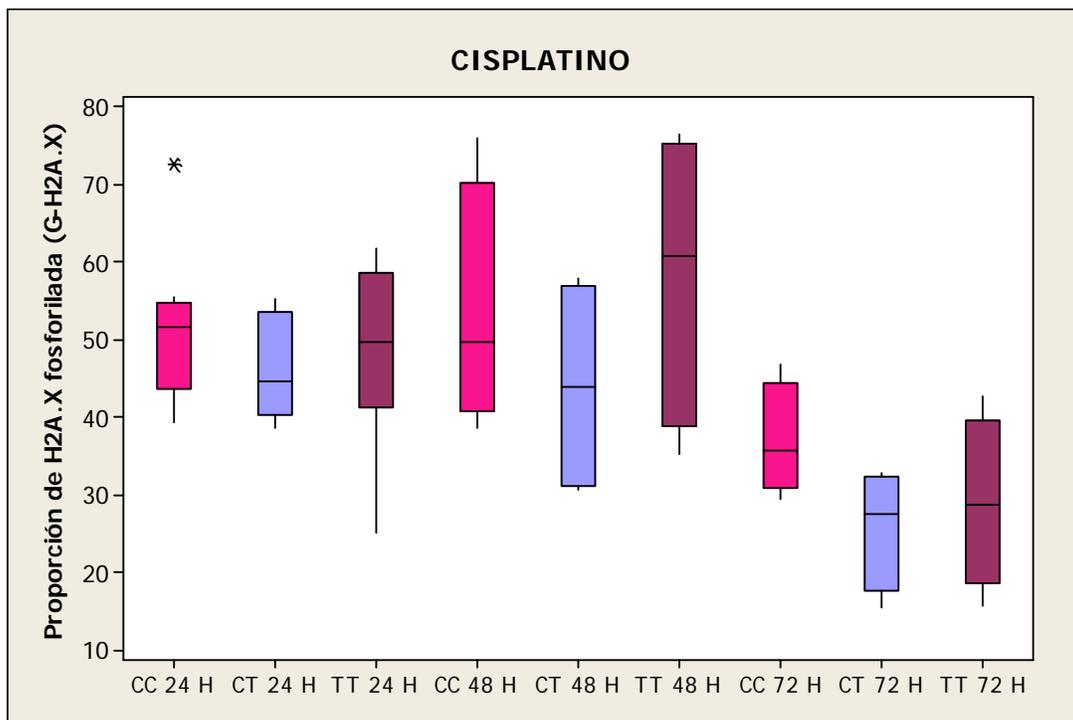


Figura 29. Gráfica del la proporción de γ -H2A.X encontrados en los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en los 3 periodos de estudio, 24,48 y 72h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	0.48
	CC vs TT	0.48
	CT vs TT	0.48
48h	CC vs CT	0.317
	CC vs TT	0.317
	CT vs TT	0.046 *
72 h	CC vs CT	0.317
	CC vs TT	0.046*
	CT vs TT	1

Tabla 19. Valor de P resultante de la Prueba no paramétrica de Friedman comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

Con el tratamiento con Cisplatino a las 24 h de exposición la mediana de los CC fue de 51.83, de los CT 44.82 y los TT 49.79, estos se caracterizaron por no poseer diferencias estadísticamente significativas. A las 48 h de exposición la mediana de los CC fue de 49.94, CT 43.94 y los TT 60.91, en este periodo la diferencia de las medianas ente los CT y TT fue estadísticamente significativa. Hacia las 72 h de exposición la mediana de los CC fue de 35.95, de los CT 27.62 y de los TT 28.83, las únicas medianas que no difieren entre sí son las de los CC con los CT.

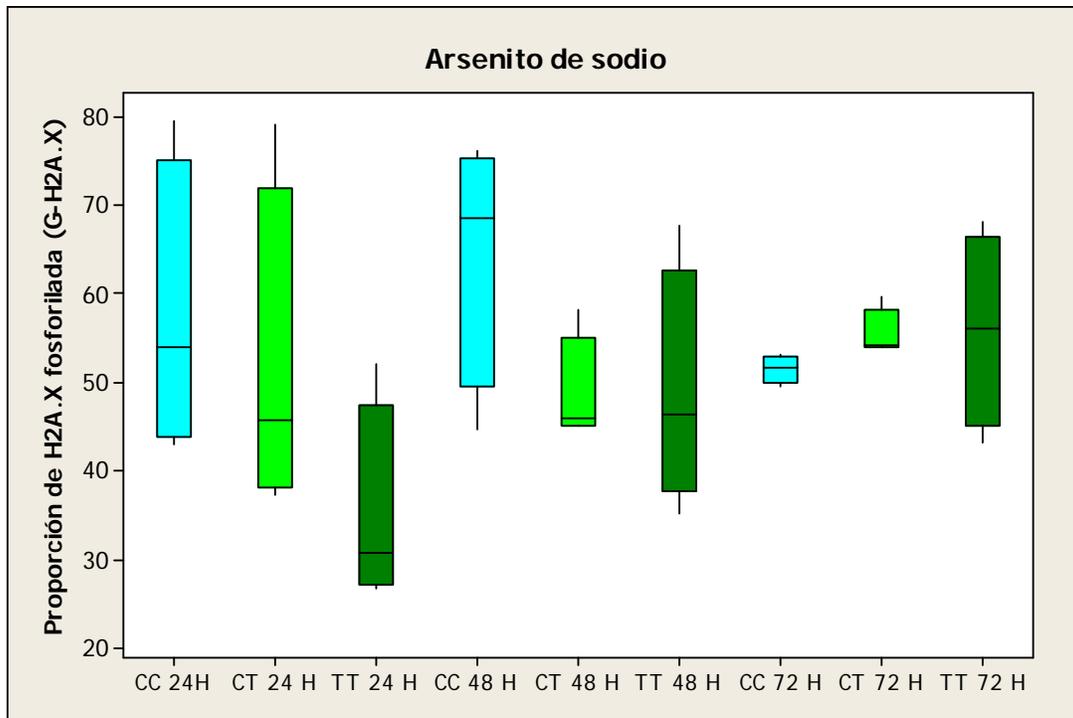


Figura 30. Gráfica de la proporción de γ -H2A.X encontrados en los 3 genotipos de la MTHFR, CC, CT y TT, en los 3 periodos de estudio, 24,48 y 72h

Tiempo de exposición	Genotipos	p < 0.05
24h	CC vs CT	1
	CC vs TT	0.317
	CT vs TT	0.317
48h	CC vs CT	0.317
	CC vs TT	0.317
	CT vs TT	0.317
72 h	CC vs CT	0.046 *
	CC vs TT	1
	CT vs TT	1

Tabla 20. Valor de P resultante de la Prueba no paramétrica de Friedman comparando el comportamiento de los 3 genotipos en los 3 periodos de estudio.

El tratamiento con arsenito de sodio 5 μ M por 24 h la proporción de H2A.X fosforilada generó una mediana de 43.79 en los CC, 45.71 en CT y 27.71 en TT, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas. A las 48 h de tratamiento las medianas fueron de 68.46, 45.87 y 46.35 para los genotipos CC, CT y TT respectivamente, estas no presentaron diferencias estadísticamente significativas. A las 72 h de tratamiento las medianas para el CC, CT y TT fueron de 50, 54.02 y 56.05 respectivamente, los individuos CC y CT difieren en la proporción de γ -H2A.X.

DISCUSIÓN.

La Metilentetrahidrofolato reductasa humana es una enzima clave en el metabolismo de los grupos metilo, la cual promueve la reducción irreversible del 5, 10 Metilentetrahidrofolato a 5-metil tetrahidrofolato [1]. Donde el 5,10 Metiltrahidrofolato provee los grupos metilo para la síntesis de timidilatos y purinas, mientras que el 5-metiltetrahidrofolato los provee para mediar la metilación, en el caso particular, la del DNA [10]. Sin embargo, la actividad de la MTHFR se puede ver afectada por una serie de factores, de los cuales el más estudiado y descrito en las poblaciones humanas es la presencia de polimorfismos. EL polimorfismo C677T es el polimorfismo de la MTHFR más ampliamente estudiado y comparado entre las diversas poblaciones mundiales, donde se encontró, que en la población mexicana el alelo mutante presenta una frecuencia del 58% [36, 37], es por ello que ha sido foco de interés para evaluar su respuesta ante la exposición a diferentes agentes químicos. El polimorfismo C677T promueve una disminución en la actividad enzimática hasta en un 70% en los individuos de carácter homócigos, en función del decremento de la afinidad de la enzima con su cofactor, FAD, resultante de la sustitución de una Alanina por una Valina en el codón 222 [22].

En el presente estudio tratamos linfocitos humanos con diferentes agentes químicos y evaluamos su susceptibilidad a desarrollar daño cromosómico mediante la evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas en 3 periodos de estudio, 24, 48 y 72h. A partir de esto, nosotros encontramos que los individuos con genotipo CC presentan una menor frecuencia de micronúcleos con respecto a los otros dos genotipos en cultivo, sin tratamiento. Los micronúcleos son cuerpos citoplásmicos de naturaleza nuclear que corresponden a material genético, ya sea fragmentos o cromosomas completos, que no fueron integrados en el núcleo de la célula hija tras la división celular [55, 56]. Por otro lado se ha propuesto que el polimorfismo C677T desvía las unidades de carbono preferencialmente hacia la síntesis de timidilatos y purinas, lo cual, favorece la síntesis y reparación del DNA comprometiendo las reacciones de metilación celular [18]. Por lo que la frecuencia de micronúcleos aumentada en los individuos CC podrá ser el resultado de rompimientos cromosómicos debido a la mala incorporación de uracilos en el DNA o a deficiencias en la síntesis de

esto como resultado de un bajo pool de nucleótidos A partir de se utilizaron agentes que afectaran una de las dos vías en las cuales participa la MTHFR, es decir, agentes que promovieron disminución en los niveles de metilación del DNA, y agentes que indujeran rompimientos en éste. Primero tratamos los linfocitos humanos con agentes Desmetilantes: etionina, hidralazina y 5-azacitidina. Con el tratamiento a Etionina encontramos que los individuos homócigos para el polimorfismo presentan una menor frecuencia de micronúcleos con respecto a los CC y CT. Esto resultó contrario a lo que postulamos ya que al tratarse de un agente desmetilante esperábamos que afectara más a los individuos TT que presentan comprometidos y disminuidos sus niveles de metilación [32]. Ya que niveles de metilación inadecuados en el DNA pueden promover un aumento en la frecuencia de micronúcleos como resultado de la descondensación de la cromatina en las regiones de heterocromatina pericentrómerica, lo cual puede resultar en pérdidas de cromosomas completos debido a problemas de no disyunción [68]. Con la exposición a hidralazina, encontramos que hacia las 24 y 48 h los individuos con genotipo TT presentan mayor frecuencia de micronúcleos, sin embargo, hacia las 72 h de tratamiento el efecto es igual entre los genotipos. Por lo que parece que los TT tienen una tendencia a presentar mayor daño cromosómico con la exposición a hidralazina. Finalmente con el tratamiento con la 5-Azacitidina no encontramos un efecto del polimorfismo en la susceptibilidad a presentar daño cromosómico.

Por lo que se decidió evaluar la respuesta del polimorfismo ante la exposición a agentes clastogénicos. Con el tratamiento a Cisplatino encontramos que los 3 genotipos responden de igual manera, es decir, la frecuencia de micronúcleos no difiere entre genotipos. Con la Mitomicina A las 24 h observamos que los individuos con genotipo CT presentan una menor frecuencia de micronúcleos pero hacia las 48 y 72 h la respuesta es igual entre genotipos. Finalmente con Arsenito de Sodio encontramos que los CC a las 48 h de exposición presentan menor frecuencia de micronúcleos sin embargo, a las 72 h el efecto es igual entre los 3 genotipos. Debido a que no observamos diferencias importantes entre los genotipos decidimos evaluar un agente que se ha propuesto brinda más susceptibilidad a desarrollar micronúcleos en los individuos TT con respecto a los CC, el Metotrexate [103]. Sin embargo nosotros no observamos diferencias significativas entre estos grupos.

El polimorfismo C677T genera un complejo enzima /FAD (cofactor) débil y por lo tanto la pérdida de la actividad enzimática [17]. Pero, la presencia de folato promueve que el FAD sea enterrado en su sitio, reduciendo así, la probabilidad de disociación, ya que la presencia de folato, genera un cambio conformacional que fortalece el complejo del cofactor con la enzima. Se ha determinado que tanto con la enzima silvestre como con la enzima mutada, la adición de derivados de folatos, al parecer cualquiera de ellos, promueven una disminución en la tasa de disociación de la flavina y por lo tanto de pérdida de la actividad. Así mismo, la adición de metiltetrahidrofolato o FAD protege a la enzima de la desactivación térmica. La suplementación con ácido fólico, incrementa la concentración intracelular de derivados de folato, incluyendo el metiltetrahidrofolato. Los resultados reportados sugieren que el incremento en el folato, conocido por disminuir los niveles de homocisteína en TT, actúa mediante la supresión de la pérdida del FAD de la MTHFR.

Es probable que la concentración de ácido fólico contenido en el medio RPM1 1640 enmascare los efectos que tiene el polimorfismo sobre la respuesta ante la exposición a los agentes, ya que el medio posee una concentración de 2.26 $\mu\text{M/L}$, valor que está muy por encima del nivel fisiológico encontrado en el plasma que va desde $< 7 \text{ nmol/l}$ en individuos con un balance deficiente de folato, a $> 50 \text{ nmol/L}$ en individuos que consumen el índice diario recomendado de ácido fólico que es de $> 400 \mu\text{g/día}$. [29]

Es por ello que decidimos evaluar la respuesta a los agentes químicos en función del genotipo para el polimorfismo C677T bajo condiciones de deficiencia de ácido fólico.

Lo que observamos fue que los individuos con genotipo TT presentan una mayor frecuencia de micronúcleos en los 3 periodos de estudio sin tratamiento. Con ácido fólico encontramos que los CC eran los individuos con mayor frecuencia de micronúcleos, sin embargo, bajo deficiencia de ácido fólico el comportamiento cambia. Se sabe que la deficiencia de ácido fólico induce un incremento en la inestabilidad cromosómica como resultado del aumento de la incorporación de uracilos en el DNA, lo cual, induce rompimientos de doble cadena [57]. Nosotros proponemos que los individuos con genotipo TT presentan una menor frecuencia de dichos rompimientos con respecto a los CC en función de una mejor capacidad de sintetizar y reparar el DNA

gracias a una mayor síntesis de purinas y timidilatos. Sin embargo estos individuos TT presentan comprometidas sus reacciones de metilación celular, lo cual, puede promover hipometilación del DNA y por lo tanto presentar pérdidas cromosómicas como resultado de inestabilidad en las regiones de heterocromatina pericentromérica [18]. Por lo que la menor frecuencia de micronúcleos encontrada en los individuos con genotipo CC puede ser resultado de la presencia de niveles adecuados de metilación en el DNA, lo cual resulta en mayor estabilidad cromosómica, lo que probablemente refleje que el principal efecto en la inducción de micronúcleos en estas condiciones sea los niveles de metilación del DNA, más que los niveles de rompimientos de doble cadena. Por ello decidimos evaluar nuevamente el efecto de agentes desmetilantes y clastogénicos bajo condiciones de deficiencia de ácido fólico. Con el tratamiento con Hidralazina, desmetilante, encontramos que hay una muy pobre inducción de micronúcleos, aproximadamente 7 micronúcleos por 1000 células binucleadas, y que los individuos CC presentan menor frecuencia de micronúcleos con respecto a los CT a las 72 h de tratamiento. Con 5-Azacitidina encontramos, que los individuos con genotipo TT presentan la menor frecuencia de micronúcleos hacia las 72 h de exposición. La azacitidina es un agente desmetilante, sin embargo se ha observado que los micronúcleos que induce son mayoritariamente resultantes de rompimientos cromosómicos, es decir, la mayoría de dichos micronúcleos presenta fragmentos cromosómicos. [71]. Con el cisplatino, inductor de rompimientos en el DNA, se encontró que los individuos TT presentan menor frecuencia de micronúcleos con respecto a los CC hacia las 72 h de tratamiento. Los resultados obtenidos con Cisplatino y Azacitidina coinciden con el postulado de mejor síntesis y reparación del DNA en los individuos con genotipo TT. Se ha postulado que por un lado, al tener un mayor pool de Timidilatos es menos probable la inserción incorrecta de uracilos en el DNA en dichos individuos lo cual disminuye la frecuencia de rompimientos de doble cadena con respecto a los CC, por otro lado una vez que hay uno de estos rompimientos es más probable la adecuada reparación de este en los individuos TT debido a la presencia de un mayor pool de purinas. Por lo que en los individuos CC se espera que se forme un ciclo de rompimiento de doble cadena e inadecuada reparación, por deficiencia de nucleótidos[19].

Con Arsenito de Sodio en condiciones de déficit de ácido fólico encontramos que los individuos CT poseen una mayor frecuencia de micronúcleos y que los

individuos homocigos poseen el mismo comportamiento. El arsenito de sodio es un agente capaz de promover daño al DNA por 2 mecanismos principales. Uno de ellos son los rompimientos de doble cadena resultantes del estrés oxidativo, y el otro es el daño inducido por hipometilación. Es por ello que se ha observado que el Arsenito de Sodio es capaz de inducir micronúcleos resultantes de rompimientos cromosómicos, así como resultantes de problemas de no disyunción. Estos últimos podrían ser el resultado de niveles disminuidos de metilación en el DNA. Sin embargo podría ser que el tipo de daño generado por el Arsenito de Sodio sea diferencial entre los genotipos de la MTHFR. Es decir, podría ser que en los individuos CC la pérdida de cromosomas se vea disminuida como resultado de una adecuada metilación del DNA, pero, podría haber incremento en el daño inducido por rompimientos de doble cadena, mientras que los TT posean menor frecuencia de rompimientos de doble cadena pero una ganancia en pérdidas cromosómicas resultado de niveles de metilación disminuído. Mientras que los CT pueden poseer daño resultante de ambos mecanismos. Esto podría ser la razón por la cual los individuos homocigos presentan la misma frecuencia de micronúcleos y los CT presentan una frecuencia aumentada. Sin embargo es necesario evaluar que tipo de micronúcleos predominan entre genotipos para corroborarlo.

Finalmente probamos el Metotrexate y encontramos que bajo condiciones de déficit de folatos es un pobre inductor de micronúcleos, probablemente esta deficiencia compromete la vía a un nivel tal, que la inhibición de la DHFR no posee un efecto aditivo.

El principal efecto que brinda el polimorfismo a presentar daño cromosómico lo observamos tras la exposición a Cisplatino y Arsenito de Sodio. Para evaluar si esta susceptibilidad diferencial en función del polimorfismo podría asociarse a una diferente susceptibilidad a presentar rompimientos de doble cadena, decidimos evaluar los niveles de la histona γ -H2A.X Esta histona la buscamos solamente como marcador de frecuencia de dichos rompimientos. Este análisis lo hicimos con linfocitos aislados a partir de sangre periférica. Para que estos linfocitos proliferen adecuadamente es necesario enriquecer el medio de cultivo con suero bovino, sin embargo este contiene una concentración supra fisiológica de ácido fólico y nosotros necesitábamos condiciones de deficiencia de éste. Para ello decidimos utilizar suero bovino fetal dializado el cual contiene una

concentración de 9 nmol/L de ácido fólico lo que resulta en 0.9 pmol/L en el medio completo.

Se encontró que los individuos CC presentan mayores niveles de γ -H2A.X a las 24 y 72 en los linfocitos cultivados sin tratamiento. Esto indica que al poseer niveles menores de la proteína, hay una menor cantidad de rompimientos de doble cadena en estos individuos con respecto a los CC. Esto apoyó el postulado de mayores niveles de reparación en dichos individuos.

Con el tratamiento a cisplatino encontramos que a las 72 h de exposición los individuos con genotipo CC presentan una mayor cantidad de γ -H2A.X con respecto a los TT, esto hace notar que los individuos TT presentan una menor frecuencia de rompimientos de doble cadena. Esto correlaciona con nuestros datos de micronúcleos, los cuales proponemos tienen una menor frecuencia en los individuos con genotipo TT, como resultado de mejor síntesis y reparación del DNA, y por lo tanto de menor frecuencia de rompimientos de doble cadena.

Finalmente con Arsenito de Sodio observamos que los individuos silvestres presentan una menor cantidad de la γ -H2A.X con respecto a los CT, pero no al compararlos con los TT. A las 24 y 48 h de exposición con este Arsenito de Sodio existe una tendencia de los individuos TT a presentar una menor cantidad de dicha histona, lo cual refleja menor cantidad de rompimientos de doble cadena, sin embargo a las 72 h los individuos CC y TT presentan la misma frecuencia de ellos.

Es importante recalcar que estos rompimientos de doble cadenas no van a resultar necesariamente en rompimientos cromosómicos ni en micronúcleos, sólo muestran la susceptibilidad de cada genotipo a presentar dichos rompimientos.

CONCLUSIÓN.

En el presente trabajo observamos que el polimorfismo C677T es capaz de promover una respuesta diferencial al daño cromosómico principalmente bajo condiciones de deficiencia de ácido fólico en linfocitos humanos.

Observamos que los individuos con genotipo CC presentan una mayor frecuencia de micronúcleos, sin exposición a sustancias, sin embargo bajo condiciones de deficiencia de ácido fólico el comportamiento cambia promoviendo que los individuos con el genotipo TT presenten un mayor daño cromosómico. Así también encontramos que los individuos con genotipo CC presentan una mayor frecuencia de rompimientos de doble cadena, lo que se refleja como mayores niveles de la histona γ -H2A.X

Con el tratamiento a agentes desmetilantes observamos que bajo condiciones normales, los genotipos tienen la misma respuesta, sin embargo bajo condiciones de ácido fólico la Azacitidina induce una menor frecuencia de micronúcleos en los individuos TT, esto puede ser resultado de su actividad de agente clastógeno, y la facilidad de este genotipo para reparar este tipo de daño.

Con agentes clastógenos, observamos que el polimorfismo no tiene una influencia en el desarrollo del daño cromosómico en condiciones con altos niveles de ácido fólico, sin embargo bajo su deficiencia los individuos TT presenta una menor frecuencia de daño. También encontramos que son estos individuos con genotipo TT los que menores niveles de γ -H2A.X presentaron.

Tras el tratamiento con Arsenito de Sodio observamos que los individuos CT presentan una mayor cantidad de micronúcleos a las 48 h, condición que se mantiene bajo condiciones de deficiencia de ácido fólico. Con el Arsenito de Sodio existe una tendencia de los individuos TT a presentar una menor cantidad de dicha histona, lo cual refleja menor cantidad de rompimientos de doble cadena, sin embargo a las 72 h los individuos CC y TT presentan la misma frecuencia de ellos.

Podemos con esto concluir que el polimorfismo C677T del gen de la enzima MTHFR es capaz de promover una respuesta diferencial a la susceptibilidad de presentar daño cromosómico ante la exposición a agentes químicos, principalmente cisplatino y arsenito de sodio bajo condiciones de déficit de ácido fólico. Esta susceptibilidad puede ser atribuida a la distribución diferencial de las unidades de carbono hacia la síntesis de purinas y timidilatos sobre la metilación del DNA.

REFERENCIAS

1.-Bagley PM, Selhub J, (1998) A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolate in red blood cells, Proc. Natl. Sci. USA 95: 13217-13220

2.-Fodinger M, Hori WH, et. Al, (2000) Molecular Biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductasa , J. of Nephrology 13: 20-33

3.-Homberger A, Linnebank M etal, (2000), Genomic Structure and Transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductasa gene, Eur J of Human Genetics 8: 725-729

4.- Matthews RG, Sheppard C, Goulding C (1998) Methylenetetrahydrofolate Reductase And Methionine Synthase: Biochemistry And Molecular Biology. Eur J Pediatr 2:54-59

5.-Guenther BD, Sheppard CA et al, (1999) The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductasa from Escherichia coli suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia, Nature Structural Biology 6(4): 359-65

6.- Goyette P, Pai A, et al, (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), Mamm. Genome 9:652-56

7.- GAUGHAN DJ, Barbaux S, ET.AL, (2000) The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductasa (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene, Gene 257:279-89

8.-Tran P, Leclerc D, et.al. (2002) Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms, Mamm Genome 13 :483-492

9.-Bailey LB, Gregory JF, (1999) Folate metabolism and requirements, J.Nutr 129:779-782

10.- Kim Y, (2000) Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism, Folate and Cancer Risk: A paradigm of Gene nutrient interactions In Carcinogenesis, Nutr. Rev 58(7): 205-290

11.-Blount BC, Mack MM, et.al, (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage, Proc. Natl. Acad Sci. USA 94: 3290-95

- 12.-Quinlivan EP, Davis SR, et.al., (2005) Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T polymorphism and folate status affect one carbon incorporation into human DNA deoxynucleosides, *J. Nutri* 135: 389-96
- 13.-ChoiW, Mason JB, (2002) Folate Status: Effects on Pathways of colorectal carcinogenesis, *J. Nutr* 134: 2413S-18S
- 14.-Kim Y, (2005) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductasa polymorphism and pharmacogenetics: a new role of single nucleotide polymorphisms in the folate metabolic pathway in human health and disease, *Nutr. Rev* 63(11): 398-407
- 15.- Jencks DA, Mathews RG, (1987) Allosteric Inhibition of the methylenetetrahydrofoalte reductasa by adenosylmethionine, *J. Bioo Chem.* 262(6): 2485-93
- 16.- Yamada K, Strahler JR, et.al, (2005) Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductasa by phosphorylation, *PNAS* 102(30): 10454-59
- 17.- Bailey L, Gregory J, (1999), Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductasa and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement, *J Nutr* 129: 919-922
- 18.- Eaton A, Sandler R, et.al., (2005) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductasa 677 and 1298 polymorphisms, folate intake, and microsatellite instability in colon cancer, *Can Epidemiol Biomarkers* 14(8): 2023-2029
- 19.-Friso S, Choi S, (2005) Gene-Nutrient interactions in one carbon metabolism, *Curr Drug Metb* 6:37-46
- 20.- (1999) How folate fight disease, *Nature Struc Biol* 6(4) 293-294, editorial
- 21.- Ueland P.M, Rozen R. (2005) MTHFR Polymorphisms and disease, *Landes Bioscience, Cap. 3* (31-41)
- 22.-Yamada Kazuhiro, Chen Z, et. Al., (1999), Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase, *Nat. Struct. Biol.* 6:359-365
- 23.-Kimura M,Umegaki K, et.al. (2004) Methelenetetrahydrofolate reductasa C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes, *J Nutr* 134:48-56
- 24.-Boot L, Yang Q, (2000) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductasa gene variants and congenital anomalies: A HuGE review, *Am J Epidemiol* 151:862-877

25.-Rozen R, (1997), Genetic Predisposition to hyperhomocysteinemia: Deficiency of methylenetetrahydrofolate reductasa (MTHFR), *Throm, Hemaes* 78(1): 523-526

26.-Stern L, Mason J, et.al., (2000) Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leucocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductasa gene, *Cancer Epidem Biomar Prev* 9:846-853

27.- Shelnut K, Kauwell G, et.al. (2003), Folate Status response to controlled folate intake is affected by the methylenetetrahydrofolate reductasa 677C-T polymorphism in young women, *J. Nutr.* 133:4107-4111

28.-Davis S, Quinlivan E, et.al., (2005) The methylenetetrahydrofolate reductasa 677C-T polymorphism and dietary b folate restriction affects plasma one carbon metabolites and red blood cell folate concentration and distribution in women, *J. Nutr* 135:1040-1044

29.- Bagley P, Selhub J, (1998) A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductasa gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells, *PNAS* 95:13217-13220

30.- Stern L, Bagley P, et.al., (2000) Conversion of 5- formyltetrahydrofolic cid to 5-methyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate adequate persons homozygous for the C677T Mutation in the Methylenetetrahydrofolate reductasa gene, *J. Nutr.* 130:2238-2242

31.- Friso S, Choi S, et.al. (2002) A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductasa gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status, *PNAS* 99(8) 5606-5611

32.- James S, Pogribna M, et.al. (1999) Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductasa gene may be maternal risk factors for Down syndrome, *Am J Clin Nutr* 70: 495-501

33.- Miao X, Xing D, et. Al., (2002) Susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma and genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase in an At-risk Chinese population, *Canc. Epid. Biom Prev.* 11: 1454-1458

34.-Kim Y, (2005) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and pharmacogenetics: A new role of single nucleotide polymorphisms in the folate metabolic pathway in human health and disease, *Nutr. Rev.* 63 (11): 398-407

35.- Guéant-Rodriguez R., Guéant J, et.al, (2006) Prevalence of methylenetetrahydrofoalte reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations, Am J. Clin Nutr. 83:701-707

36.- Mutchinick O, López M, et.al. (1999) High Prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico, A country with a very high prevalence of neural tube defects, Molec. Gen. Metab. 68:461-467

37.- Guéant-Rodriguez R.M, Jean-Louis Guéant, et.al. (2006), Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations, Am J Clin Nutr.83(3):701-7

38.-Dávalos I., Olivares N, (2000) The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofoalte reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations, Annales Genetique 43: 89-92

39.- Neissa J.I, Guerrero C., (2004) Del código genético al código epigenético: nuevas estrategias terapéuticas, Rev Fac Med Univ Nac Colom 52(4) 287-303

40.- Friso S, Choi S, (2002) Gene nutrient interactions and DNA methylation, J. Nutr. 132:2382S-87S

41.- Mason J, (2003) Biomarkers of nutrient exposure and status in one carbon metabolism, J. Nutr 133: 941S-47S

42.- Laird P, Jaenisch R, (1996) The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics, Annu Rev Genet 30: 441-64

43.- Ulrey C, Liu L, et.al., (2005) The impact of metabolism on DNA methylation, Hum Molec Gen 14(1): R139-147

44.-Jones P., Takai D, (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics, Science 293: 10681070

45.- Ross S, (2003) Diet and DNA methylation interactions in cancer prevention, Ann, N.Y. Acad Sci. 983:197-207

46.- Moore L, Huang W, et.al., (2003) Epidemiologic considerations to asses altered DNA methylation from environmental exposures in cancer, Ann, N.Y. Acad Sci. 983:181-196

47.- Feinberg A, Tycko B, (2004) The history of cancer epigenetics, Nature Reviews Cancer 4:143-152

48.- Narayana S, McConnel J, et.al, (2004), Associations between two common variants C677T and A 1298C in the methylenetetrahydrofoalte reductase gene as measures of folate metabolism and DNA stability (Strand breaks, misincorporated Uracil, and DNA methylation Status) in Human Lymphocytes In vivo, *Cancer Epidem Biomar Prev* 13(9) 1436-43

49.-Verri A, Mazarello P, et.al. (1992) Uracil DNA glycosylase preferentially excise mispaired uracil, *J. Biochem* 287:1007-1010

50.-Krokan H., Diablos F, et.al, (2002) Uracil in DNA Occurrence, consequences and repair, *Oncogene* 21:8935-48

51.- Blount B, Mack M, et.al., (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage, *PNAS* 94:3290-95

52.-Crott J, Mashiyama T, et.al., (2001) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism does not alter folic acid deficiency-induced uracil misincorporation into primary human lymphocyte DNA in vitro, *Carcinogenesis* 22(7) : 1019-25

53.-Kapiszewska M, Kalembe M, et.al., (2005) Uracil misincorporation into DNA leukocytes of young women with positive folate balance depends on plasma vitamin B12 concentrations and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism. A pilot Study, *J. Nutr Bioch* 16:467-478

54.-Gollin S, (2005) Mechanisms leading to chromosomal instability, *Seminars in Cancer Biology* 15:33-42

55.-Zalacain M, Sierrasesúмага L, Patiño A, (2006) El ensayo de los micro núcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos, *Annales de la universidad de Navarra* 28:2

56.- Fenech M, Chang w, (2000) HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mut. Res* 534:65-75

57.-Fenech M, (2001) The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells, *Mut Res* 475:57-67

58.-Fenech M, (2002) Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer, *DDT* 7(22) 1128-1137

59.-Hori T,(1983) Induction of chromosome decondensation, sister-chromatid exchanges and endoreduplications by 5-azacytidine, an inhibitor of DNA methylation, *Mut Res* 121(1):47-52

60.- (2005) Azacytidine: a novel drug for myelodysplastic syndrome *Am J Health-Syst Pharm.* 62(15):1567-1573.

61.- Kuo H, Griffith J,(2007) 5-Azacytidine–Induced Methyltransferase-DNA Adducts Block DNA Replication In vivo, *Cancer Res*;67(17):8248–54

62.-Christma J., (2002), 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy,*Oncogene* 21, 5483 – 5495

63.- Kaminskas E, Farrell A, et.al.,(2005) FDA Drug Approval Summary: Azacitidine (5-azacytidine, Vidaza™)for Injectable Suspension, *The oncologist*;10:176–182

64.- Lyko F , Brown R. (2005), DNA Methyltransferase Inhibitors and the Development of Epigenetic Cancer Therapies, *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1498 – 506

65.- Goffin F., Eisenhauer E, (2002) DNA methyltransferase inhibitors—state of the art, *Annals of Oncology* 13: 1699–1716

66.- Juttermann R, Li N, Jaenisch R, (1994) Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation *PNAS* 91:11797-11801

67.- Haaf T, Schmid M, (2000) Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes ,*Cytogenetics and Cell Genetics* 91(1-4):113-123

68.-Guttenbach M, Schimid M, (1994) Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures, *Exp. Cell Res* 211: 127-132

69.- Fauth E., Scherthan E, Zankl H, (1998) Frequencies of occurrence of all human chromosomes in micronuclei from normal and 5-azacytidine-treated lymphocytes as revealed by chromosome painting. *Mutagenesis* 13(3):235-241

70.- Li H, Olin E, (1970) Cytotoxicity and Mode of Action of 5-Azacytidine on LI 210 Leukemia, *Cancer Research* 30, 2760-2769,

- 71.- Satoh H, Yamamoto K,(2004) Region-specific chromatin decondensation and micronucleus formation induced by 5-azacytidine in human TIG-7 cells *Cytog Genome Research* 104: 1-4
- 72.-Alix H, (1982) Molecular aspects of the in vivo and in vitro effects of ethionine, an analog of methionine, *Microbiological Rev* 46(3):281-195
- 73.-Allen P, Poirier L, (1997) Suppression by Phenobarbital of ethionine induced hepatocellular carcinoma formation and hepatic S-adenosylethionine levels, *Carcinogenesis* 18(3):1103-1107
- 74.- Pacheca B, Trejo-Becerril C, et.al, (2003) Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy, *Clinical Cancer Res* 9:1596-1603
- 75.-Mathison B, Murphy S, (1994) Hydralazine and other hydrazine derivatives and the formation of DNA adducts, *Tox Appl Pharm* 127:91-98
- 76.-Deng C, LuQ, et.al, (2003) Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal regulated kinase pathway signaling, *Arth and Rheum* 48(3):746-756
- 77.- Cholpkiewicz B, (2001) Influence of metabolic activation on the induction of micronuclei by antihypertensive drugs in L929 cells, *Arch Toxicol* 74:794-798
- 78.-Aposhian H, (1989) Biochemical toxicology of arsenic, *Rev. Biochem Toxicol* 10:265-299
- 79.- Lee-Chen S, Gurr J, (1993) Arsenite enhances DNA double strand breaks and cell killing of methyl methanelsulfonate treated cells by inhibiting the excision of alkali-labile sites, *Mut. Res.* 294:21-28
- 80.-Wang T, H T, et.al, (2001) Arsenite induces oxidative DNA adducts and DNA-protein cross links in mammalian cells, *Free Radical biology and medicine* 31(3)321-330
- 81.-Yih L, Ho I, et.al, (1997) Region-specific chromatin decondensation and micronucleus formation induced by 5-azacytidine in human TIG-7 cells, *Cancer Research* 57:5051-5059,
- 82.-Hughes M, (2002) Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicology letters* 133:1-16
- 83.-Sciandrello G. Caradonna F, et.al, (2004) Arsenic induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells, *Carcinogenesis* 25(3) 413-417

84.- Vahter M. (2000) genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity, *Toxicology letters* 112-133: 209-217

85.-Vega L., Gonshebbatt M, et.al, (1995) Aneugenic effects of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected, *Mut. Res.* 334:365-373

86.-Ramirez P, Eastmond D, et.al.,(1997) Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide, *Mut. Res.* 386: 291-298

87.-Rossman T, (2003) Mechanisms of arsenic carcinogenesis:An integrated approach, *Mut. Res.* 533:37-65

88.-Sgura A, Antoccia A, et.al, (1997) Micronuclei, centromere positive micronuclei and chromosome non disjunction in cytokinesis blocked human lymphocytes following mitomycin c o vincristine treatment, *Mut. Res.* 392:97-107

89.-Iyer N, Szybalsky W,(1963) A molecular mechanism of mitomycin action: linking complementary DNA strands, *Microbiology* 50:355-362

90.-Borowy-Borowski H., Lipman R, Tomasz M, (1989) Recognition between mitomycin C and specific DNA sequences for crosslink formation, *Biochemistry* 29:2999-3006

91.- H. I. Abdel-Halim, A. T. Natarajan , (2005) Mitomycin C-induced pairing of heterochromatin reflects initiation of DNA repair and chromatid exchange formation *Journal Of Cell Science* 118, 1757-1767

92.- Dabholkar M, Bradshaw L, et.al, (1992) Cisplatin DNA damage and repair in peripheral blood leukocytes in vivo and in vitro, *Env Health Pers* 98:53-59

93.-Wozniak K, Blasiak J. (2002) Recognition and repair of DNA cisplatin adducts, *Acta Biochimica Polonica* 49(3) 583-596

94.- Malinge J, Giraud-Panis M, Leng M, (1999)Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA, *Journal of Inorganic Biochemistry* 77: 23–29

95.- Jamieson E, Lippard S., (1999) Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts, *Chem. Rev.* 9: 2467-2498

96.- Zamble D, Mu D, et.al., (1996) Repair of cisplatin DNA adducts by the mammalian excision nuclease, *Biochemistry* 35:10004-100013

97.-Chu G., (1994) Cellular responses to cisplatin, *Journal of Biol. Chem* 269(2) 787-790

- 98.-Ohndorf U, Rould M, et.al., (1999) Basis for recognition of cisplatin modified DNA by high mobility group proteins, *Nature* 399:708-711
- 99.-Gebel T, Lantzsch, et.al, (1997) Genotoxicity of platinum and palladium compounds in human and bacterial cells, *Mut. Res.* 389:183-190
- 100.- Nefic H, (2001) Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures *Mut. Res.* 498:89-98
- 101.-Whittle S, Hughes R,(2004) Folate supplementation and metotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review *Rheumatology* 43:267-271
- 102.-Longo Sorbello G, Bertino J, (2001) Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemia. Use of new antifolates in clinical trials, *Haematologica* 86:121-127
- 103.-Budzik G, Colletti L, et.al, (2000) Effects of methotrexate on nucleotide pools in normal human T cells and the cem T cell line, *Life Sciences* 66(23):2297-2307
- 104.- Chiusolo P, Reddiconto G, et. al.,(2002) Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate, *Annals of Oncology* 13:1915-1918
- 105.- Li J, Kaminskas E, (1984) Accumulation of DNA strand breaks and methotrexate cytotoxicity, *PNAS* 81:5694-5698
- 106.-Goulin M, Breile B, Tseng B, (1980) Methotrexate induced misincorporation of uracil into DNA, *PNAS* 77(4):1956-1960
- 107.-Maskaleris T., Lialiaris T, Triantaphyllidis C, (1998) Induction of cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro and of antineoplastic effects in Ehrlich ascites tumor cells in vivo treated by methotrexate, hyperthermia and/or caffeine, *Mut. Res.* 442:229-236
- 108.-Paul T, Rogakoyu E, et.al, (2000) A critical role for histone h2a.x in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage, *Curr Biol* 10:886-895
- 109.- Thriet C, Hayes J, (2005) Chromatin in need of a fix: Phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair, *Mol Cell* 18:617-622
- 110.- Bassing C, (2004) H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity, *Cell Cycle* 3(2):149-153
- 111.- Lowndes N, Toh G,(2005) DNA repair: the importance of the phosphorylating histone H2A.X, *Curr Biol* 15(3) R99-101
- 112.- Pilch D, Sedelnikova O, et.al, (2003) Characteristics of h2a.x foci at DNA double strand breaks sites, *Bioch Cell Biol* 81(3): 123-129

113.- Fernandez Capetillo O, Lee A, H2A.X: the histone guardian of the genome, DNA repair 3:956-967