



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización de los Patrones de Metilación y su
Relación con Errores en la Segregación de
Cromosomas con Regiones Pericentroméricas
Altamente Metiladas en Linfocitos Tratados con
5-azacitidina**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Lisandro Sánchez Hernández

TUTOR: Dr. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

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 de la UNAM y el Instituto Nacional de Cancerología. Bajo la tutela del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, con el apoyo de DGAPA, PAPIIT proyecto IN207105 y CONACyT proyecto 45875-M.

A mi madre adorada

Por su amor y esfuerzo incansable:

Gracias

AGRADECIMIENTOS

Quiero externar mi admiración y agradecimiento a mi tutor Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo por su calidez humana el apoyo ofrecido en todo momento y la confianza depositada en mí. Pero en especial por la experiencia y los conocimientos transmitidos a lo largo de mi estancia en el Instituto Nacional de Cancerología.

Por lo anterior mi mas sincero agradecimiento y aprecio.

La maestra Clementina Castro Hernández ha sido un pilar fundamental para la mi formación académica, y como individuo, debido a que es un ejemplo como científica y como persona. Agradezco su apoyo y asesoría incondicional en cuestiones técnicas y teóricas así como por sus acertadas opiniones, En particular quiero resaltar su a apoyo moral, sinceridad y su gran amistad. Gracias querida Clemen

Agradezco a los miembros del jurado quienes con sus valiosos comentarios y sugerencias contribuyeron al enriquecimiento de este trabajo: Dra. Patricia Ostrosky Wegman. Dra. Sandra Gómez Arrollo. Dra. Bertha Molina Álvarez

Gracias a mis queridas hermanas Pati y José que siempre creyeron en mí y permanecieron a mi lado en las buenas y en las malas cobijándome con su cariño y comprensión. A todos mis hermanos y demás miembros de mi familia por sus diferentes muestras de apoyo.

A mi amigo y asesor Didier G. Prada Ortega por sus constantes aportaciones y comentarios para enriquecer este trabajo. “Fue un gusto colaborar con usted caballero y compartir una siempre respetuosa y chévere amistad” (H e P).

A mis compañeros de laboratorio que hicieron muy agradable mi estancia en el mismo, a los miembros del H. congreso que se ha mantenido debido a sus torrenciales y castas ponencias. En particular agradezco la amistad y hermandad brindada por Miguel y Marco que más que compañeros han llegado a ser cuasi-hermanos.

Un gusto haber compartido con mis amigos de la facultad de ciencias todas las aventuras, experiencias y los buenos momentos en las prácticas de campo y clases.

Muy en particular agradezco a todos los profesores de la facultad de ciencias que contribuyeron a mi formación académica transmitiendo sus conocimientos, experiencia y sobre todo el amor y la pasión por la biología.

A mi grandioso pueblo de México por pagar mis estudios.

Sin embargo después de haber concluido mis estudios de la carrera de biología. Puedo decir que cuanta razón tenía Nietzsche al apuntar que: Los monos son demasiado buenos para que el hombre pueda descender de ellos.

INDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
METILACIÓN DEL DNA EN MAMÍFEROS	7
PATRONES DE METILACIÓN	9
DNA METILTRANSFERASAS	9
BIOQUÍMICA DE LA METILACIÓN DE LAS CITOSINAS DEL DNA	10
DNMT1	11
DNMT2	13
DNMT3	13
DESMETILACIÓN DEL DNA	17
ESTRUCTURA CROMOSÓMICA EN EUCARIONTES	17
MODIFICACIÓN DE HISTONAS	20
EUCROMATINA Y HETEROCROMATINA	21
HETEROCROMATINA FACULTATIVA	22
HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA DE REGIONES PERICENTROMÉRICAS	22
MITOSIS Y SEGREGACIÓN	23
INESTABILIDAD CROMOSÓMICA	25
5-AZACITIDINA	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
PREGUNTA QUE SE DESEA RESPONDER	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
JUSTIFICACIÓN	30



DISEÑO METODOLOGICO	31
CULTIVO CELULAR	31
TECNICA DE OBTENCIÓN Y FIJACIÓN DE METAFASES	31
TECNICA DE INMUNODETECCIÓN INDIRECTA CONTRA 5mC	31
TECNICA DE CITOCINESIS BLOQUEADA PARA MICRO NÚCLEOS	33
TECNICA DE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH)	34
ANALISIS ESTADÍSTICOS APLICADOS	35
RESULTADOS	36
PATRONES DE METILACIÓN EN METAFASE	36
PATRON A (NORMAL)	36
PATRÓN B (MOTEADO)	37
PATRÓN C (MOTEADO)	38
PATRÓN D (DESMETILADO)	40
PATRÓN E (DISPAR)	42
METILACIÓN PERICENTROMÉRICA	43
ESTUDIO DE EVENTOS DE NO- DISYUNCIÓN POR FISH	48
EVALUACIÓN DE ERRORES EN LA SEGREGACIÓN POR FISH	52
DISCUSIÓN	60
REFERENCIAS	64
ABREVIATURAS	69



RESUMEN

La metilación del DNA es un proceso esencial para la condensación de la cromatina y el control de la expresión génica de cada tipo celular. Alteraciones en la metilación del DNA se han asociado con la generación de inestabilidad cromosómica, esta relación se ha observado en síndromes como el ICF (Inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales) el cual se encuentran alteradas las enzimas como la DNA metiltransferasa3b que se encargan de la metilación de regiones altamente metiladas que contienen satélites 2 y 3 las cuales se encuentran en particular en los cromosomas 1 y 16 así como del 9 y Y, respectivamente. En este trabajo se analizaron los cambios en los patrones de metilación de cromosomas de linfocitos humanos expuestos a 5-azacitidina (5AZA), un análogo de la citidina que inhibe la metilación del DNA y la relación con la generación de errores en la segregación de cromosomas con regiones pericentroméricas altamente metilables. **Metodología:** Se realizaron cultivos de linfocitos, los cuales fueron expuestos a 24, 48 y 72 h a 5-AZA 10 μ M. Estos cultivos se procesaron dependiendo de los requerimientos de cada técnica. Para la detección de los patrones de la metilación se arrestaron las células en metafase y fueron sometidas a inmunodetección indirecta contra 5-metilcitosina. En el caso de la técnica de FISH (Hibridación *in situ* fluorescente) se inhibió la citocinesis con el fin de obtener células binucleadas y procesarlas para la hibridación de sondas específicas para las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9, 16 y los brazos largos del cromosoma Y. Ambas técnicas fueron procesadas cualitativa y cuantitativamente mediante un analizador de imágenes. **Resultados:** Los cromosomas de células no tratadas mostraron un patrón de metilación definido y homogéneo a lo largo de las cromátidas en particular en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9, y 16, y brazos del cromosoma Y. En contraste las células expuestas presentaron patrones predominantes para cada ciclo de tratamiento mostrando estos desde las 24h. Observándose un patrón moteado a lo largo de las cromátidas y sin afectar la metilación registrada en las regiones pericentroméricas; A las 48h se observó un patrón hemimetilado en el cual una se encontró cromátida metilada y la otra desmetilada, en tanto que las regiones pericentroméricas mostraron modificación en la metilación sobre todo en los cromosomas Y y 9, en el periodo de las 72h predominó un patrón dispar de metilación en donde había una hipermetilación marcada en una de las cromátidas o sólo en uno de los brazos del cromosoma. Por su parte las regiones pericentroméricas presentaron una desmetilación gradual en base al tiempo de exposición, acentuándose esta en los cromosomas Y y 9 y en menor medida en el 16 y 1. Los resultados obtenidos del análisis del (FISH) mostraron que el cromosoma 1 se vio implicado significativamente en los eventos de no disyunción en contraste con los demás cromosomas en estudio. En el caso del estudio de los Micronucleos, el cromosoma 1 casi a la par con el cromosoma 16 se encontraron en gran frecuencia implicados en la generación de MN, incrementándose estos en función del tiempo de exposición al agente desmetilante. En menor medida se registro la presencia los MN para el cromosoma 9 y casi nula para el cromosoma Y. **Conclusión:** Se pudo caracterizar patrones de metilación y establecer una relación entre la pérdida gradual de la metilación y la generación de inestabilidad cromosómica esto en función del tiempo de exposición y los ciclos de síntesis del DNA. Involucrando sobre todo a los cromosomas con regiones pericentroméricas altamente metilables que contienen satélite 2 y en menor medida satélite 3.



INTRODUCCIÓN

La estructura básica del DNA sería obsoleta sin todo el sistema que se encuentra orquestando y regulando su funcionamiento. Algunos de estos mecanismos que se encuentran directamente interactuando sobre el DNA se les ha denominado en su conjunto como epigenética. La epigenética se puede definir como cualquier efecto en función del control o la regulación genética que ejerza algún metabolito o proteína externa a la secuencia de de DNA.

“La diferencia entre genética y epigenética probablemente puede compararse con la diferencia que existe entre escribir y leer un libro. Una vez que el libro ha sido escrito, el texto (los genes o la información almacenada en el DNA) será el mismo en todas las copias que se distribuyan entre los lectores. Sin embargo, cada lector podría interpretar la historia del libro de una forma ligeramente diferente, con sus emociones y proyecciones particulares que pueden ir cambiando a medida que se desarrollan los capítulos. De una forma muy similar, la epigenética permitiría disimiles interpretaciones de un molde fijo (el libro o código genético) y resultaría en una diversidad de lecturas, dependiendo de las condiciones variables en las que se interprete el molde”

La epigenética. Se presenta con una complejidad y dinamismo como respuesta a las necesidades que requiere la célula a través del ciclo celular. En el cual, se presentan múltiples variaciones que pueden ser resultado de la modificación de proteínas o moléculas que tienen interacción directa con el DNA. Cambios en la cantidad, funcionamiento o estructura de estas, pueden acarrear modificaciones importantes en el metabolismo, fisiología o incluso en la anatomía de la descendencia, esto como resultado de la acción directa o indirecta con su ambiente, por ejemplo: exposición a agentes químicos o el tipo de nutrición que recibe el organismo. Esta interacción se conforma por medio de toda una estructura y andamiaje que se relaciona física y químicamente sobre el material genético la cual bien podría ser entendido como interlocutor del ambiente con la genética, que se puede interpretar como la acción del estilo de vida sobre los genes.



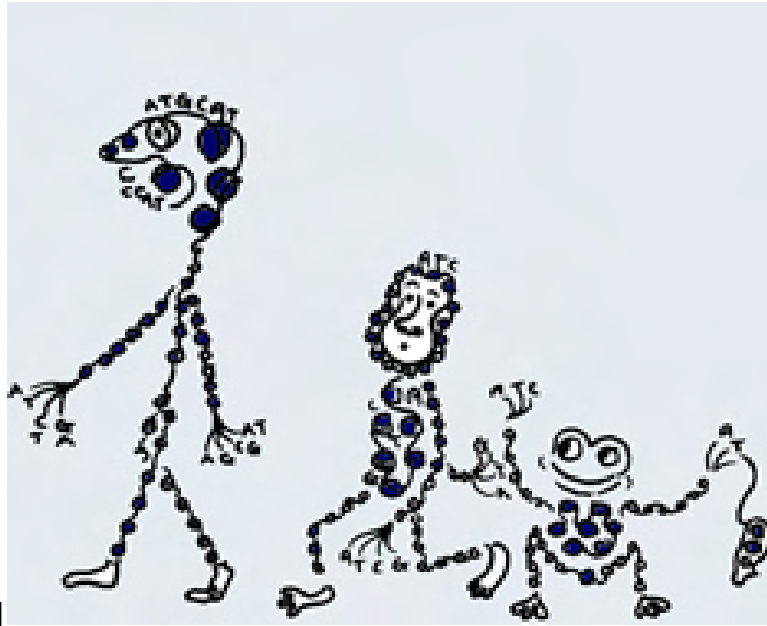


Fig. 1 *Epigenética*

www.epigenome.eu/es/1,22,0

En general, los mecanismos moleculares que regulan la epigenética son la modificación de las histonas y la metilación del DNA siendo este último el mecanismo más estudiado ya que fue el primero que se descubrió en la década de los 80s y del cual a la fecha se conoce su importancia en múltiples procesos fundamentales para la vida de un organismo, además de estar implicado en diversas patologías de gran importancia para la salud humana. La metilación del DNA es una de las principales modificaciones del genoma sin afectar su secuencia y ocurre principalmente, en mamíferos, particularmente en las citosinas [2]. Se considera que hasta un 8% de las citosinas del genoma están metiladas, producto de la donación del grupo metilo de la S-adenosilmetionina, que es considerada donador universal de grupos metilo. En este proceso intervienen un grupo de enzimas especializadas, denominadas DNA-metiltransferasas (DNMTs), de las cuales en los mamíferos, las principales son la DNMT1, DNMT3a y DNMT3b [1,2]. La metilación regula aspectos fundamentales como son la diferenciación celular, la estabilidad cromosómica, el silenciamiento de ciertos genes tejido específico y la inactivación del cromosoma X cuando es requerida, así también fenómenos como la impronta génica y la segregación cromosómica [4,5].



METILACIÓN DEL DNA EN MAMÍFEROS

La única modificación covalente sobre el DNA genómico en los mamíferos es la metilación del carbono 5 del residuo de la citosina, la cual da lugar a la 5-metilcitosina (5mC) que es considerada la quinta base del DNA debido a su alta frecuencia (Fig. 2). La metilación de la citosina se encuentra en gran medida dirigida hacia los nucleótidos en la secuencia citosina-guanina (CpG) que se encuentra apareada con las mismas secuencias en la dirección opuesta en la hebra complementaria de DNA [6, 10].

La 5mC en células somáticas humanas constituye el 1% del total de las bases del DNA y afecta un porcentaje importante de todos los dinucleótidos CpG en el genoma [10]. La metilación de la citosina genera un cambio en la conformación del DNA, lo cual está implicado en la señalización de moléculas específicas que intervienen en la regulación de la expresión génica [7]. Por otra parte, el estado de metilación de los residuos de citosina le puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina en la que se sabe existe una correlación inversa entre los niveles de metilación del DNA y la compactación de la cromatina, en particular de ciertas regiones específicas de los cromosomas como son las regiones subteloméricas y las pericentroméricas, las cuales tienen secuencias repetitivas ricas en dinucleótidos CpG [2, 6].

La distribución de los dinucleótidos CpG no es homogénea en el genoma humano encontrando que se encuentran en promedio una vez cada 80 dinucleótidos. En contraste existen otras regiones, de 200 pb a varias kilobases, que tienen una frecuencia cinco veces mayor de dinucleótidos CpG (> 60% de CG), denominadas "islas CpG" [2,10]. Aproximadamente 60 a 90% de todas las secuencias CpG establecidas en el genoma están metiladas, mientras que las correspondientes a las islas CpG ubicadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están. En este último caso por lo general las islas CpG se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, lo cual promueve una metilación en estas regiones, que en conjunto con la modificación de histonas y el reclutamiento de otras proteínas, impiden la llegada de la maquinaria involucrada en la transcripción [10,11].



Se sabe entonces, que la metilación bloquea la transcripción y se han propuesto dos mecanismos que llevan esta función. En el primero, la 5mC inhibe la unión de factores de transcripción que contienen sitios de unión a secuencias CpG en sus sitios de reconocimiento, ejemplo de ello es la modificación en la unión de factores de transcripción como: E2F, CREB, AP2, cMyc/ Myn y NFkB [7, 31, 37]. El siguiente mecanismo propuesto es más general e involucra proteínas o complejos proteicos que interactúan específicamente con dinucleótidos CpG metilados y evitan indirectamente la unión de los factores de transcripción, al limitar su acceso a los elementos reguladores. Estas proteínas contienen dominios conservados de unión a DNA metilado y son llamadas MBDs (del inglés, *Methyl Binding Domain*) [2, 13,17].

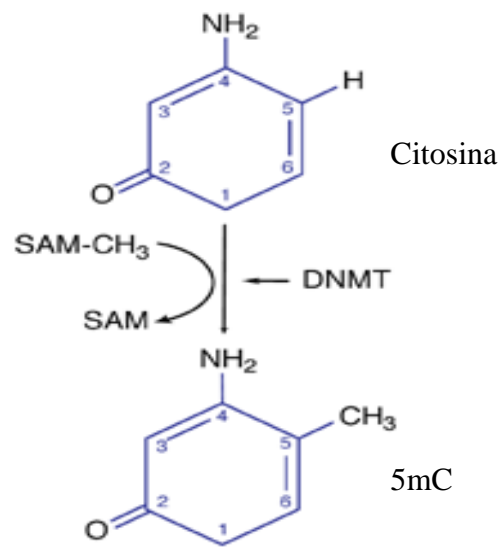


Fig. 2 Metilación de la citosina



PATRONES DE METILACIÓN

La metilación en el genoma de un organismo es un proceso dinámico, el cual puede generar patrones sobre el epigenoma a lo largo la vida, cuyas variaciones dependen de diversos factores como la edad del organismo, el tipo celular e incluso interacciones directas con el ambiente. Por ejemplo, los patrones de metilación en las células somáticas de mamíferos son generalmente estables y heredables, sin embargo, son reprogramados ampliamente en las células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano, para generar un nuevo patrón de metilación para estas etapas [13,14].

La maquinaria de la metilación del DNA cuenta con dos sistemas, llamados *de novo* y de mantenimiento. La metilación *de novo* se encuentra particularmente activa durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, también puede ocurrir en las células somáticas adultas [14,15]. Un número significativo de islas CpG son susceptibles de metilación aberrante en ciertos tejidos durante el proceso de envejecimiento o en las implicaciones neoplásicas, en los cuales se ha asociado a la metilación de *de novo*, sin embargo, la velocidad con que ocurren estos cambios parece ser muy lenta [9,15]. Por otro lado la metilación de mantenimiento se encarga de añadir los grupos metilo a partir de hebras de DNA previamente metiladas [18,19, 20].

DNA METILTRANSFERASAS

Un aspecto interesante ha sido cómo se generan los patrones de DNA metilado durante el desarrollo y cómo se mantienen en las células diferenciadas. Estos procesos son resultado de la acción combinada de las DNA metiltransferasas, las cuales fueron descubiertas. Durante la década pasada, la primera en ser caracterizada fue la DNMT1, a la cual se le denomina enzima de mantenimiento y presenta una estructura altamente conservada en eucariontes. Las siguientes en ser caracterizadas fueron la DNMT2 y la familia de la DNMT3 incluyendo a las (DNMT3A y DNMT3B) (Fig. 3). Las tres enzimas y sus variantes comparten dominios estructurales muy importantes, como es el caso del dominio catalítico el cual se caracteriza por 10 motivos con residuos de aminoácidos altamente conservados tanto entre la familia de las metiltransferasas como entre especies. Estas regiones estructurales cumplen una función importante en la reacción catalítica que involucra la transferencia del grupo metilo de la S-



adenosil-L-metionina al carbono 5 de la citosina. Por otra parte, algunas de estas enzimas comparten un gran dominio amino terminal el cual se encarga de la ubicación celular durante las fases del ciclo de la célula, así como de la unión y la especificidad al sustrato [21, 22, 23].

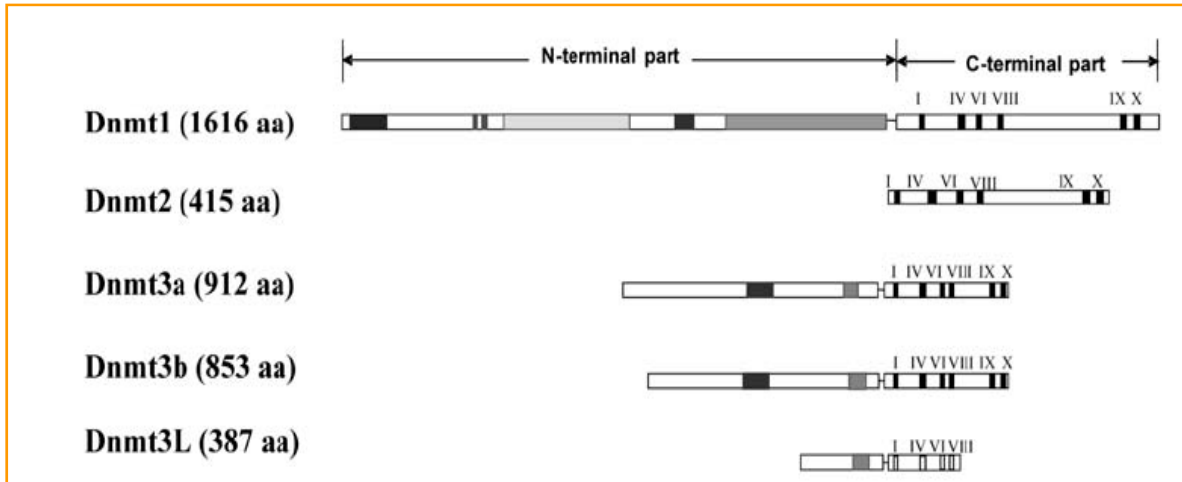


Fig. 3. Organización de los dominios terminales de las DNMT's (20)

BIOQUÍMICA DE LA METILACIÓN DE LAS CITOSINAS DEL DNA

La metilación del DNA es introducida generalmente después de la replicación por las DNA metiltransferasas usando el grupo metilo de la S-adenosil –L –metionina [20]. Este grupo metilo está ligado a un ion sulfonio que termodinámicamente desestabiliza la molécula y hace relativamente inerte al metil-tiol de la metionina. Esto permite un ataque nucleofílico por parte del nitrógeno, oxígeno, azufre o un carbanión (Fig. 4) [20].



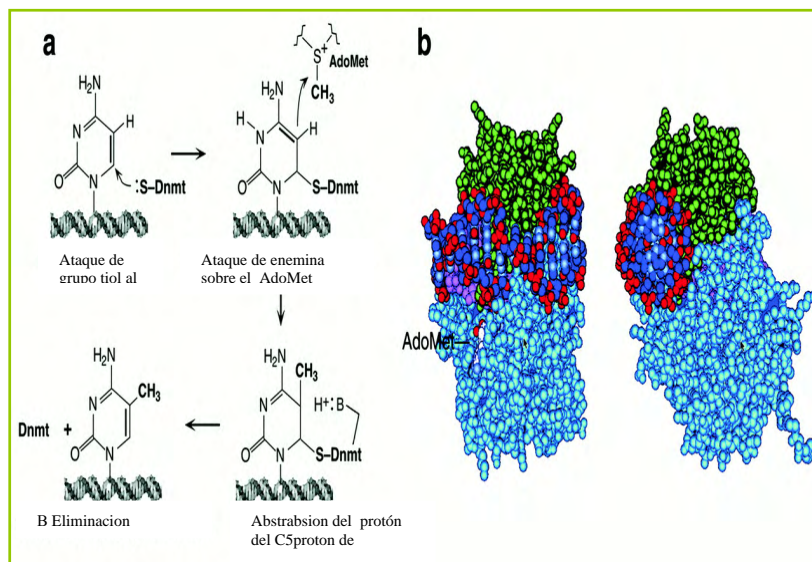


Fig. 4 Mecanismo y estructura catalítica de las DNA 5-metilcitosina metiltransferasas (22)

El mecanismo de reacción de la metilación del carbono-5 (C-5) de la citosinas fue descubierto en los procariontes. En procariontes y eucariontes las C-5 metiltransferasas (DNMTs) tienen un número conservado de aminoácidos que son estructuralmente muy importantes en la reacción catalítica de estas enzimas. Una característica de este proceso catalítico es el ataque nucleofílico de dichas enzimas en el carbón 6 de la citosinas. Este ataque es realizado por un grupo tiol del residuo de la cisteína en un motivo perteneciente a la región catalítica de la DNMT (motivo IV) [21,22]. La formación de un enlace covalente activa el C- 5, dirigiéndolo hacia el ataque nucleofílico, seguido por una adición del grupo metilo al carbono 5 de la citosina, continuando con la eliminación de protones en la posición 5 y la resolución de los intermediarios covalentes [22].

A continuación se mencionarán algunas características más relevantes de las DNMT's:

DNMT1

Esta enzima, en su estructura presenta un gran dominio amino terminal, el cual comprende varios motivos cargados, además de codones de inicio, una señal de localización nuclear



PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) y una región rica en cisteína Zn²⁺, la cual es parte fundamental del dominio de unión. Este dominio comprende ocho residuos conservados y organizados en dos grupos (CXXCXXC) y dos cisteínas aisladas en un único dominio, el cual le permite la unión al DNA en las secuencias repetidas CpG [20, 21, 22].

En el ratón, la Dnmt1 tiene preferencia 5 a 30 veces mayor por sustratos hemimetilados. Esta enzima tiene su mayor actividad en células somáticas adultas, sobre todo durante la replicación, interactuando activamente con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Esta proteína ancla la DNA polimerasa con la horquilla de replicación. Por otro lado, se han encontrado datos que apuntan a que también la DNMT1 puede actuar como metiladora *de novo*, siendo específica para dinucleótidos CpGs, en particular en las conformaciones de heterocromatina [22].

La parte N-terminal de la Dnmt1 también interactúa con la proteína de retinoblastoma (Rb) para reprimir la transcripción de E2F1, los cuales en conjunto, realizan una retro-alimentación que podría constituir un mecanismo eficiente para mantener un equilibrio de expresión. Esta enzima interactúa directamente con otras enzimas que se encargan de modificar histonas, como las histonas metiltransferasas SUV3 H1 y las desacetilasas de histona HDAC1 y HDAC2. Adicionalmente la Dnmt1 puede interactuar con proteínas de unión a sitios CpG metilados como MBD2, MBD3 y MeCP2 y con proteínas de unión a heterocromatina como HP1. Todas estas interacciones en conjunto resultan en la represión de la transcripción y en la estabilización del material genético [22,23].

Además de todas las interacciones que se pueden dar, se suma la presencia de algunas isoformas como (DNMT1b, DNMT1o, DNMT1p) (Fig. 5) formadas por *splicing* alternativo, que presentan diferencias en la cantidad de aminoácidos. Estas variantes pueden estar presentes en tejidos y en etapas específicas del desarrollo. Tal es el caso de las isoformas DNMT1o de la cual se han encontrado acumulaciones durante la fase de crecimiento en ovocitos y durante la implantación embrionaria. Por su parte la isoforma DNMT1p presenta acumulaciones muy específicas durante la fase de paquíteno en la espermatogénesis, sin embargo, se desconocen las implicaciones funcionales de estas isoformas [22,23].



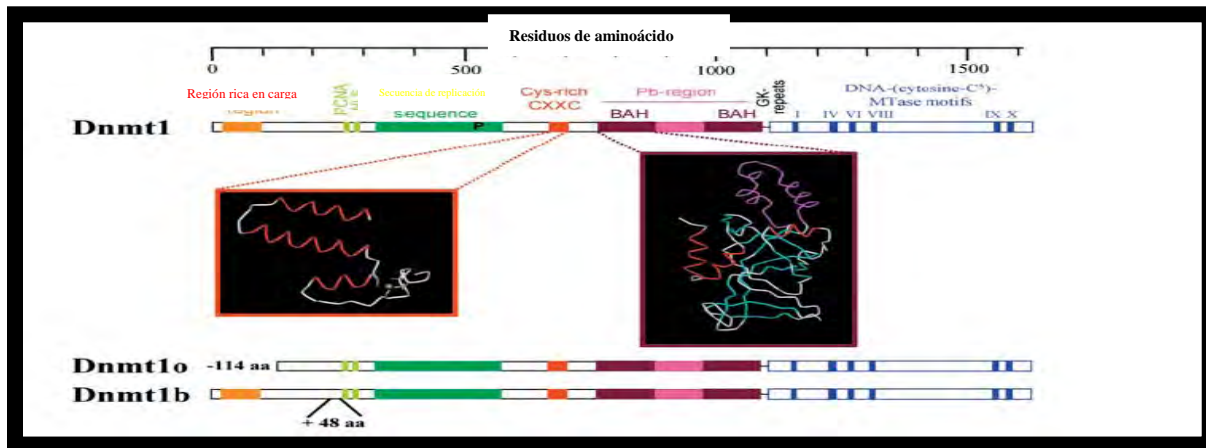


Fig. 5 Arquitectura de la enzima DNMT1 y sus isoformas (20)

DNMT2

Este gen se localiza en el cromosoma 10p15 en seres humanos y está conservado entre eucariontes sin embargo, la enzima carece de una actividad detectable de metilación. Esta enzima presenta un parecido con las DNMTs bacterianas, las cuales carecen del extremo regulador amino-terminal y comparte la estructura del extremo catalítico carboxilo-terminal con la DNMT1 3a y 3b de humanos [20,22]. Su RNA mensajero es ubiquitinado y expresado en bajas concentraciones en tejidos humanos y en ratones adultos, así como en células totipotenciales de ratón. En contraste, pueden encontrarse concentraciones más altas en células transformadas de cáncer, aunque tampoco se sabe su repercusión en estas. Las células totipotenciales de embriones murinos homocigotos mutantes nulificados para la expresión de DNMT2 son viables y muestran niveles de metilación normales [20,22].

Una débil pero reproducible actividad de metiltransferasa fue recientemente demostrada por una proteína DNMT2 recombinante en experimentos *in vitro* e *in vivo*. La evidencia sugirió una preferencia por los sitios CG CT y CA, aunque la especificidad de esta enzima no es clara aún [20, 22].

DNMT3

La familia de las DNMT3 esta conformada por dos enzimas DNMT3a y DNMT3b, las cuales se encuentran altamente relacionadas. A pesar de que se localizan ubicadas en diferentes cromosomas, comparten una arquitectura muy similar. El gene de la DNMT3a



humana fue mapeado en el cromosoma 2p23 y el gen de la DNMT3b en el cromosoma 20q11.2 [22,23].

Las DNA metiltransferasas con actividad *de novo*, DNMT3A y DNMT3B, se relacionaban solo con actividad metiladora en algunos periodos de la vida de un organismo, como la implantación y el desarrollo embrionario, adicionando un grupo metilo a la citosina del dinucleótido CpG no metilado. La disrupción de la actividad de estas enzimas de *de novo* en células embrionarias de ratón ha demostrado que ambas proteínas son esenciales para el desarrollo del organismo, en el cual cada una de estas enzimas desempeña funciones especializadas.

Al parecer las actividades de las metiltransferasas *de novo* no se sobreponen durante el desarrollo embrionario del ratón y la DNMT3B metila específicamente las secuencias satélites pericentroméricas, tal como ha sido sugerido por los datos encontrados en los pacientes con síndrome ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales) en este síndrome, se ha encontrado una mutación en el gen *DNMT3B*. afectando sobre todo la región pericentromérica que es rica en secuencias repetitivas en dinucleótidos CG metilables dentro de las cuales se encuentran los satélites 2 y 3 que se encuentran hipometilados debido a la ineficiencia de ésta enzima particular. En este síndrome no se presenta una alteración de la DNMT3a pero esta enzima no puede remplazar las funciones específicas de la DNMT3b [23, 24, 30].

Las DNMT3a y DNMT3b son muy similares en su estructura. La especificidad de cada una de estas enzimas se debe a la estructura de los extremos N-terminal los cuales tienen en particular un dominio llamado ATRX rico en cisteína y un dominio PWWP caracterizado por la presencia de un motivo altamente conservado prolina- triptófano triptófano- prolina. Por su parte el dominio ATRX es también llamado dominio PHD (Homodominio de planta) y su estructura muestra motivos conservados con uniones de zinc en el núcleo, con dos asas variables que son fundamentales para la especificidad de la unión en particular con el DNA en las regiones pericentroméricas (Fig. 20) [26, 27].



Estudios *in vivo* han demostrado que la metilación en la que participan las DNMT 3a y 3b no se limita a los sitios ricos en CG sino que se ha encontrado una metilación significativa en los sitios no-CG. En algunos estudios en células de tumor de hámster reportan metilación No-CG en el promotor de un virus de DNA integrado al genoma. Esta metilación se piensa puede ser producto de una metilación de *ново* como respuesta para silenciar la secuencia viral. Por su parte, Woodcock reporta metilación de nucleótidos no-CpG en regiones con elementos L1, esto en fibroblastos de embriones humanos [28, 47]. A pesar de estos y otros datos aún son pocas las evidencias y los estudios que se han realizado acerca de la función y las características de la metilación no-CG. Por otro lado, se conoce que este tipo de metilación no es mantenida por la DNMT1 durante la renovación de la metilación en estos sitios específicos, por lo tanto esta pudiera estar a cargo específicamente de la DNMT3a (Fig. 6) [30,31].

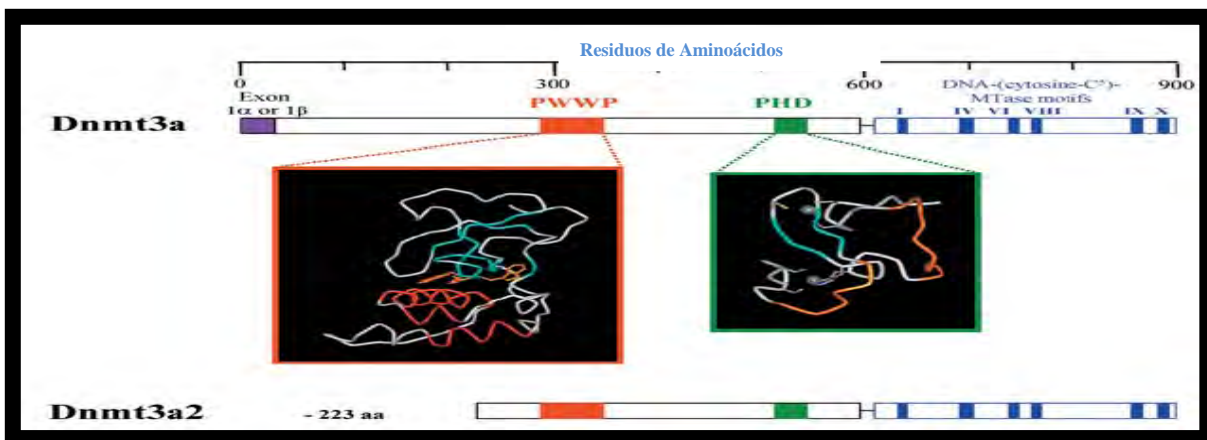


Fig. 6 Arquitectura de la enzima DNMT3a y sus isoformas (20)

Al igual que la DNMT1, las DNMT's 3a y 3b muestran isoformas, resultado del *splicing*, la DNMT3a cuenta con una isoforma denominada DNMT3a2, la cual carece de 223 residuos de aminoácidos en el dominio amino-terminal. Esta forma corta es transcrita a partir de un sitio de inicio interno bajo el control de un promotor intrónico. La DNMT3a es la mayor forma hallada en tejido adulto, la cual co-localiza con la heterocromatina. En contraste la DNMT3a2 se expresa durante la embriogénesis y co-localiza en la eucromatina, lo que sugiere una funcionalidad y especificidad de la sección N-terminal de la DNMT3a, la cual no está presente en la DNMT3a2. Adicionalmente existe el uso alternativo del exón 1 en el transcrito de la DNMT3a, el exón 1β es empleado en las células totipotenciales



embrionarias mientras que el exón 1 α es utilizado en células somáticas, dando como resultado marcadas diferencias en los transcritos. Por otra parte la DNMT3b genera isoformas resultado del splicing alternativo de los exones 10, 21 y 22 las cuales son expresadas en diferentes niveles durante el desarrollo. La isoforma DNMT3b3, la cual carece de una región del motivo IX es inactiva, en cuanto que las isoformas DNMT3b4 y DNMT3b5 codifican proteínas trucadas, las cuales carecen de los motivos IX y X y son probablemente inactivas y tienen un papel independiente a la metilación o participan reguladores positivos y negativos de la metilación del DNA [22,30,31].

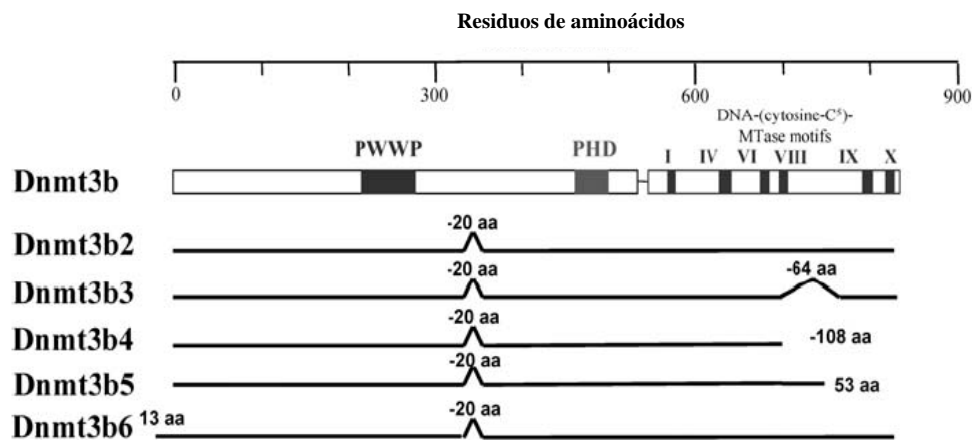


Fig. 7 Dominios de la enzima DNMT3b y sus isoformas (20)

Existe un miembro más de la familia DNMT3, esta es la DNMT3L, la cual se piensa que no codifica para una metiltransferasa funcional o activa, dada la carencia de diferentes motivos conservados del dominio catalítico de la enzima. Sin embargo, la DNMT3L contiene el motivo conservado PHD, el cual se asocia con la desacetilasa de histonas 1 (HDAC1) para reprimir la transcripción. Se ha sugerido que la DNMT3L podría tener un papel en la regulación del establecimiento de la metilación en la impronta genómica y que la asociación con las HDAC podría ser de importancia para su funcionamiento [20, 22, 26].



DESMETILACIÓN DEL DNA

Durante el ciclo de vida la variación de los patrones de metilación es muy dinámica, debido a que las necesidades metabólicas, fisiológicas y genéticas son diferentes en cada etapa. Ejemplo de esto es el proceso de desarrollo embrionario en el cual durante las etapas de morulación, gastrulación y segmentación, la dinámica de expresión génica cambia. Esto conlleva a que diferentes genes que se encuentran apagados se enciendan y viceversa. En este punto la metilación y en particular la desmetilación del DNA tienen un papel fundamental en esta dinámica.

La desmetilación del DNA es regulada por dos mecanismos el pasivo y el activo. El primero ocurre cuando la DNMT es incapaz de metilar el DNA que ha sido sintetizado durante la replicación. Un ejemplo de este es el mecanismo por el cual actúa la 5- azacitidina un inhibidor irreversible de las metilasas que produce hipometilación pasiva del DNA.

Otro ejemplo es mutación DNMT3b presente en el síndrome ICF que en consecuencia provoca hipometilación pasiva en las regiones pericentroméricas. Se ha reportado que algunas proteínas nucleares de unión al DNA, en específico proteínas variantes de las MBDs también pueden bloquear la metilación de las citosinas en la fase de S (síntesis) del ciclo celular [32, 33].

El mecanismo activo al parecer involucra a enzimas llamadas desmetilasas, las cuales pueden estar involucradas en la remoción de grupos metilo de las citosinas y participar en la expresión de genes silenciados, pero los mecanismos de acción de estas enzimas aun no han sido bien determinados y su capacidad desmetiladora ha sido debatida [33, 34].

ESTRUCTURA CROMOSÓMICA EN EUCARIONTES

Los cromosomas son el resultado de un estado de máxima compactación de la cromatina, estas son entidades dinámicas y formadas por DNA y proteínas que cambian su apariencia durante las diferentes fases del ciclo celular. En virus y bacterias su información genética consiste en DNA o RNA prácticamente desprovisto de proteínas. En el caso de las eucariontes, se encuentra una cantidad substancial de proteínas asociadas al DNA



cromosómico durante las diferentes fases del ciclo celular. Estas proteínas se clasifican en histonas, las cuales tienen una carga positiva (básica), y las no histonas, con una carga positiva menor. De estas dos tipos de proteínas asociadas, las histonas desempeñan un papel estructural primario o básico para la formación de la cromatina, dado que contienen muchos aminoácidos como lisina y arginina que tienen carga positiva la cual promueve que se ligan con los grupos fosfato de los nucleótidos cargados negativamente, permitiendo la compactación u organización del DNA [35].

La formación del nucleosoma representa el primer nivel de compactación del DNA. Este se encuentra estructurado por aproximadamente 146 pb de longitud (el número es dependiente del organismo) asociados a un complejo de 8 histonas nucleosómicas (octámero de histonas). Cada nucleosoma tiene una forma de disco, con un diámetro de 11 nm y contiene dos copias de cada una de las 4 histonas H3, H4, H2A y H2B. Este octámero forma un núcleo proteico alrededor del que se enrolla la doble hélice de DNA que da aproximadamente 1.8 vueltas (Fig. 8) [36, 37].

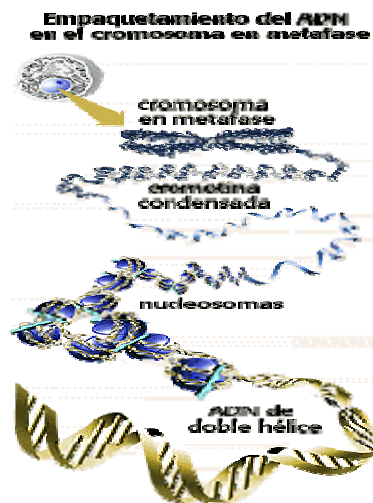


Fig. 8 Empaquetamiento del DNA

www.biologia.arizona.edu/.../mitosis/cells1.html

La trayectoria super-helicoidal no es homogénea ya que el DNA tiene tendencia intrínseca a doblarse en zonas ricas en A-T, las que se localizan donde el surco menor hace contacto con el octámero. Mientras que zonas ricas en G-C se ubican donde el contacto con el



octámero es menor [37]. El siguiente nivel de compactación es estructurado por una elevada fuerza iónica y la histona H1 lo que da lugar a la formación de la fibra de 10 nm que se puede enrollar en un solenoide que gira a la izquierda y el cual contiene seis nucleosomas por vuelta organizados radialmente, con un paso de rosca de 110 Å (el diámetro de un nucleosoma) dando lugar a la fibra de 30 nm. Aquí los nucleosomas interactúan a través de la molécula H1, la cual estabiliza la estructura solenoidal. Posteriormente se estructura una fibra de 30 nm que estructura una serie de dominios en forma de hebras que promueve más la condensación de las hebras de cromatinas cuyo diámetro alcanza los 300 nm estas fibras se enrollan para constituir ya como tal el cromosoma [38].

En algunas formas de vida, como en procariontes, el genoma entero está contenido en un único cromosoma. Pero otros organismos, con genomas más grandes, dividen su material genético entre varios cromosomas. En este caso el número de cromosomas depende de la especie. Por ejemplo, un mosquito tiene 6 cromosomas, un perro 78 y la dotación cromosómica normal de la especie humana es de 46, XX para las mujeres y de 46, XY para los hombres [38, 39].

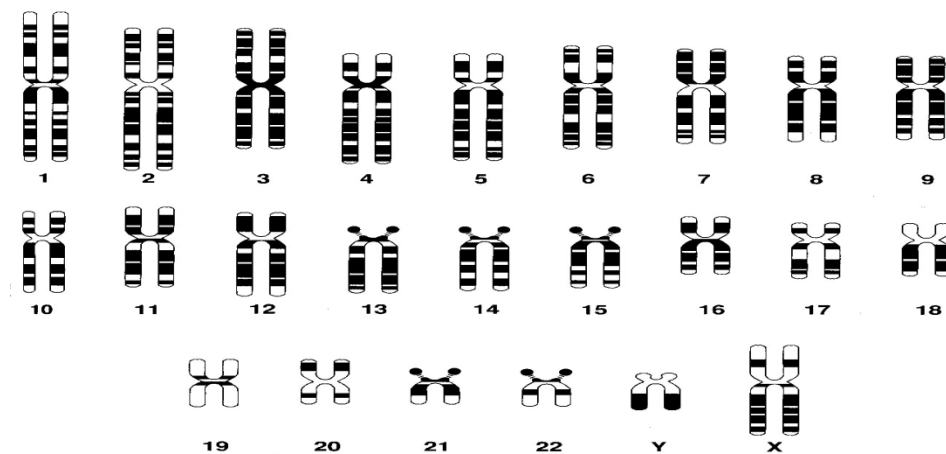


Fig. 9 Los grupos que comprende el cariotipo humano: - Cromosomas grandes Grupo A, (cromosomas 1, 2 y 3), meta y submetacéntrico. Grupo B, (cromosomas 4 y 5), submetacéntricos, Cromosomas medianos Grupo C, (cromosomas 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y los cromosomas X), submetacéntricos Grupo D, (cromosomas 13, 14 y 15) acrocéntrico Cromosomas pequeños Grupo E, (cromosomas 16, 17 y 18) submetacéntrico Grupo F, (cromosomas 19 y 20) metacéntricos Grupo G, (cromosomas 21 y 22) acrocéntrico.



MODIFICACIÓN DE HISTONAS

Son múltiples las modificaciones epigenéticas que pueden llegar a esculpir cambios en la estructura de la cromatina. Estos incluyen la metilación del DNA, la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y ADP ribosilación de las histonas. Entre otras, a esto hay que añadir el gran número de sitios de modificación post-traducciona para cada una de las cuatro histonas centrales del nucleosoma. Esto da como resultado un gran número de modificaciones y de interacciones en los nucleosomas.

Se ha propuesto que los patrones de modificaciones en las histonas actúan como un código, cifrando las interacciones nucleosómicas y la asociación con otras proteínas cromosómicas-no histonas que promueven el empaquetamiento y la regulación de la expresión del DNA [36, 39].

La mayoría de las modificaciones, las cuales ocurren en el amino terminal de las histonas H3 y H4, participan de manera importante en la estructuración de los cambios en la cromatina que regulan la actividad génica. Ejemplo de ello es la hipoacetilación de histonas H3 y H4 es característica de las regiones que presentan actividad transcripcional, modificaciones como la acetilación son reguladas por un grupo de enzimas denominadas acetiltransferasas de histonas (HAT) y las desacetilasas de histonas (HDAC). Estas últimas promueven la actividad transcripcional, propiciando una estructura laxa de la cromatina [36].

La modificación en uno o varios de los residuos de aminoácidos que conforman las histonas pueden llegar a ser fundamentales para alterar el funcionamiento o la actividad de una histona. Por ejemplo la metilación en K4 y acetilación en K9 se encuentran en cromatina transcripcionalmente activa, mientras que la metilación en K9 se correlaciona con el silenciamiento de genes y la formación de la heterocromatina, en particular la constitutiva, promoviendo una interacción de proteínas metiladoras de histonas como (SUVAR39H1) y proteínas como Hp1 (Fig. 10), las cuales son muy importantes para la remodelación y condensación de la cromatina, sobre todo en las regiones pericentroméricas [36, 42].



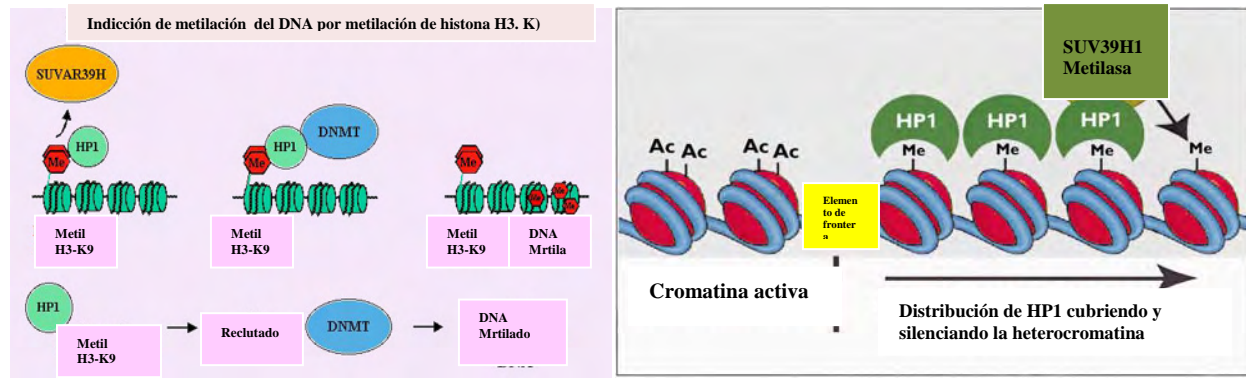


Fig.10 Función de HP1 En el ensamble de heterocromatina (42)

Otro ejemplo del punto anterior es la metilación de los residuos de lisina Lys4 en una variante de la histona H3 llamada CENP-A, la cual muestra un 57% de homología en el carboxilo terminal de la H3. Esta variante es parte fundamental de la estructura del centrómero, uniéndose con las H2A, H2B, y H4 para formar la heterocromatina centromérica [36,42].

EUCROMATINA Y HETEROCROMATINA

La cromatina se puede clasificar con base en su condensación, de la cual prácticamente deriva su estructura y función. En el caso de la eucromatina, esta se encuentra poco condensada y el material genético es transcripcionalmente activo. El nivel de condensación varía a través del ciclo celular permitiendo a las proteínas reguladoras de genes y a las proteínas que conforman la maquinaria de la transcripción, que puedan unirse fácilmente a la secuencia de los promotores de genes favoreciendo así el inicio de la transcripción [49]. La condensación del material genético, está asociada a su inactividad, pero no es totalmente responsable de ello. Aunque los genes activos se encuentran en la eucromatina, sólo una pequeña minoría se transcribe. Esto significa que el estado de la cromatina es una condición necesaria pero no suficiente para la represión génica.



Por su parte la heterocromatina, se encuentran sobre todo localizada en regiones subteloméricas y pericentroméricas y a lo largo del cromosoma X inactivo. En mamíferos, las células tienen dos clases de heterocromatina las cuales varían en su estructura y función, estas son la heterocromatina constitutiva y la facultativa y serán descritas a continuación [41,42].

HETEROCROMATINA FACULTATIVA

Este tipo de cromatina tiene un dinamismo intrínseco el cual tiene la capacidad de cambiar de un estado altamente compactado a un estado más relajado. Ejemplo de ello es el cromosoma X en mujeres en quienes uno de los dos cromosomas es completamente inactivo y perpetuado en estado heterocromático y el otro es activo y forma parte de la eucromatina transcripcionalmente activa [36,42].

HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA DE REGIONES PERICENTROMÉRICAS

Este tipo de cromatina contiene regiones de DNA altamente repetido llamadas satélites que en general no son codificantes. Cumplen un papel de suma importancia para la estructuración de los mecanismos de segregación cromosómica [42, 43, 44].

Las regiones pericentroméricas, adyacentes a los centrómeros, se definen como las 2Mb más proximales de todos los brazos de los cromosomas. Se sabe que es heterocromatina inerte y baja en su actividad recombinante y por lo tanto tiene características diferentes al resto del DNA [43,44]. Algunas de estas regiones están constituidas por satélite 2 y 3. En el caso del satélite 2, las repeticiones en tandem son de 23 a 26 pb compuestas por repeticiones GGAAT y ATC. En el caso del satélite 3, se encuentra una repetición estricta de pentámeros CCATT. En ambos satélites se encuentra un porcentaje importante de CpGs metiladas, especialmente en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1 y 16 en el caso del satélite 2, y en los cromosomas 9 y en los brazos largos del cromosoma Y para el satélite 3.



Estas secuencias cumplen funciones fundamentales para la conformación, integridad y el buen funcionamiento de los cromosomas, ya que alteraciones en estas regiones se encuentran involucradas en diferentes patologías, como en el caso del cáncer, en el cual se sabe que estas regiones son altamente susceptibles a sufrir rupturas y recombinaciones y estas se encuentran involucradas frecuentemente en cáncer [43, 44].

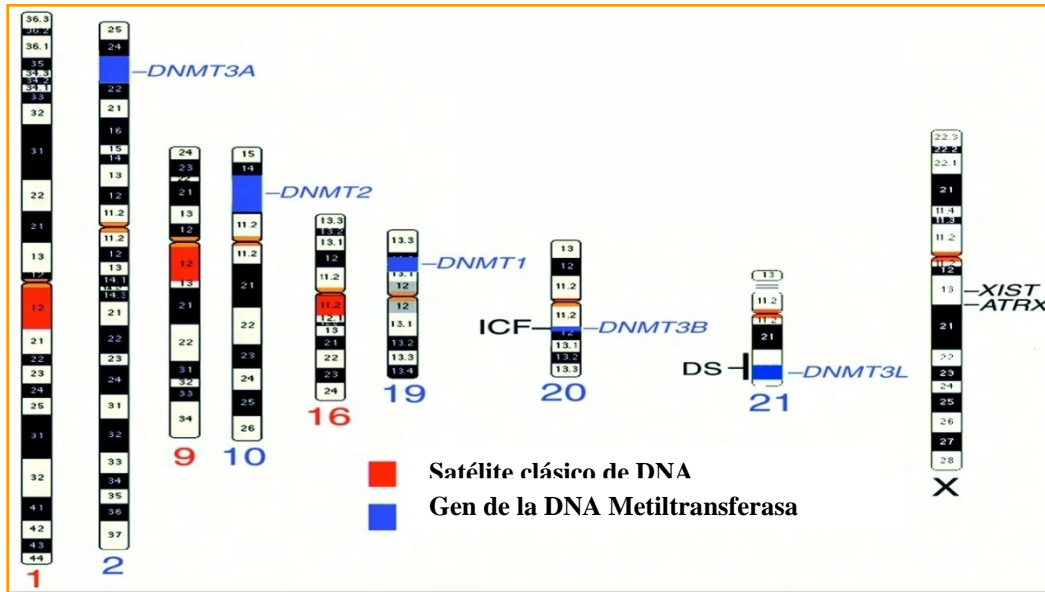


Fig. 11 Cromosomas en donde se localizan secuencias satélites y los genes de las DNA metiltransferasas (22)

MITOSIS Y SEGREGACIÓN

R. Virchow en 1858 utilizó el aforismo "*Omnis cellula e cellula*": Todas las células provienen de otras células. Pasteur en 1860 lo amplía y dice "*Omne vivum e vivo*" (todo lo vivo proviene de lo vivo). Por lo tanto hoy por hoy consideramos que la célula es la estructura básica de la vida y para la perpetuación de su estirpe hace uso de una serie de mecanismos secuenciales y periódicos que dan como resultado el ciclo celular, mediante el cual logra el objetivo de la generación de otro organismo semejante. La vida de las células pasa por dos etapas generales que se alternan cíclicamente: interfase y división o mitosis. Durante la interfase, la cromatina está descondensada o dispersa. Esta fase de dispersión permite al DNA estar accesible para llevar a cabo la replicación y transcripción. La interfase se subdivide en tres fases G1, S y G2 [35].



La siguiente etapa es la mitosis o fase M. Su primera manifestación apreciable es la progresiva compactación de la cromatina interfásica, estructurando unos cuerpos en forma de hilo que son los cromosomas. Esta condensación se muestra en gran medida orquestada por las proteínas HP1, las cuales se encuentran concentradas en los nucleosomas, y que reclutan otras proteínas que participan en los posteriores sucesos de compactación [36,37]. Posterior a la compactación de la cromatina en cada centrómero, maduran complejos proteínicos especializados llamados cinetocoros que son indispensables para la unión y el anclaje de los microtúbulos provenientes del huso mitótico.

Finalmente los microtúbulos del huso mitótico alinean a los cromosomas en el eje del ecuador referente a la célula. Cada cromosoma se mantiene en tensión en la placa metafásica, debido a los cinetocoros apareados y a sus microtúbulos asociados, los cuales están unidos a los polos opuestos del huso y ejercen fuerzas de tensión encontrada.

La anafase comienza cuando los cinetocoros apareados de cada cromosoma se separan, permitiendo que cada cromátida sea jalada hacia un polo del huso. Todos los cromosomas que se acaban de separar se desplazan a la misma velocidad, que es de aproximadamente 1µm por minuto. Los microtúbulos se acortan a medida que los cromosomas se aproximan a los polos. Mientras que los microtúbulos polares se alargan y los dos polos del huso se separan completamente [36].

Finalmente en la telofase, los cromosomas hijos separados llegan a los polos y los microtúbulos polares se alargan aun más y se vuelve a formar una envoltura nuclear. La cromatina condensada se expande de nuevo y los nucléolos que habían desaparecido en la profase empiezan a conformarse de nuevo [39, 40].



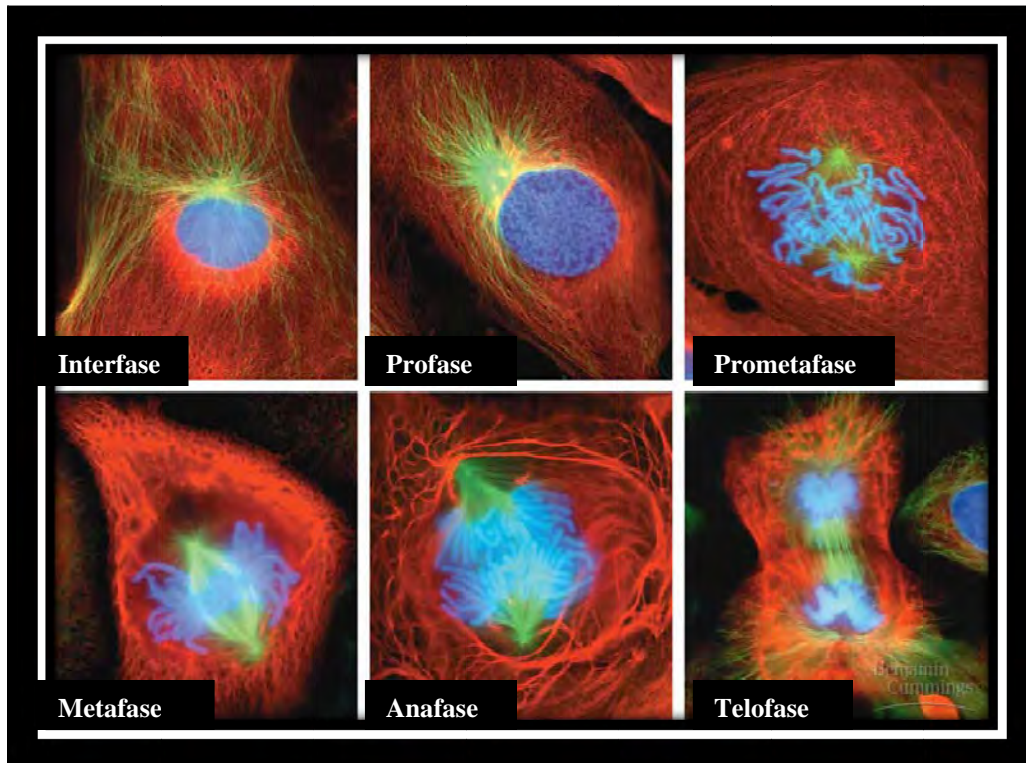


Fig.12 Fases de la mitosis celular

www.web.bio.ed.ac.uk/.../groups/earnshaw/Mitosis.htm

INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

La inestabilidad cromosómica, es un fenómeno celular en el cual las células distribuyen de manera anormal su material cromosómico. Puede atribuirse a diferentes alteraciones citológicas tales como rompimientos cromosómicos, fenómenos de no-disyunción, aneuploidías (desbalance en la dotación de cromosomas completos) que pueden generar hiperploidias o hipoploidias. Este tipo de alteraciones se ha relacionado con la generación de enfermedades de gran impacto a la salud pública como el cáncer [48].

La interacción de un organismo con su medio puede exponerlo a agentes citotóxicos, que tienen la capacidad de alterar la maquinaria de segregación. Tal es el caso de los agentes aneugénicos, los cuales son sustancias que afectan la segregación de los cromosomas, debido su efecto sobre el huso de mitótico, dando como resultado la pérdida o la ganancia de cromosomas completos, de tal modo que estas sustancias son modelos usualmente adecuados para el estudio de la formación de aneuploidías [48].



Las aneuploidías se asumen generalmente que son producidas por dos mecanismos: la no disyunción de uno o más cromosomas durante la división celular y por pérdida o ganancia de cromosomas en las células hijas durante la segregación [49]. Los mecanismos subyacentes de esta última pueden ser alteraciones en el huso mitótico debido a trastornos en la polimerización de las tubulinas o por división errónea de los centriolos, entre otras. Ejemplos clásicos de estos efectos están representados por la colchicina, un alcaloide que inhibe la polimerización de la tubulina [48].

Una consecuencia característica de los errores en la segregación cromosómica son los micronúcleos (MN). Estos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear constituidos con el material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular. Este tipo de estructuras regularmente son usados como índice para medir la cantidad de errores en la segregación y la genotoxicidad de sustancias [48, 49].

Durante el proceso de segregación, la metilación del DNA juega un papel importante para dar estabilidad al genoma, contribuyendo en la estructuración y el funcionamiento de la cromatina durante el ciclo celular. Existen alteraciones clínicas debido a las aberraciones en la metilación del DNA como el síndrome ICF, que genera múltiples formas de inestabilidad cromosómica [51,52,53]. Para conocer mejor el efecto de la metilación y sus posibles consecuencias se han utilizado agentes desmetilantes como la 5-Azacitidina, la cual se considera el agente desmetilante más potente conocido. Éste interfiere con la actividad de la DNMT's y por ende con la metilación del genoma. En este modelo se ha observado descondensación de regiones centroméricas y pericentroméricas en los cromosomas Y, 1, 9, 15, 16 [54, 55, 56]. Estos cromosomas se ven involucradas en diferentes tipos de cánceres. También se ha descrito hipometilación de regiones pericentroméricas y aberraciones cromosómicas como recombinación de cromátidas hermanas, asociación cromosómicas, cromosomas multirradiados así como eventos de no disyunción y la generación de MN es decir múltiples formas de inestabilidad cromosómica [57, 58, 59].



5-AZACITIDINA

La 5-azacitidina es un análogo de la citosina, y difiere por una modificación en el carbono 5 del anillo de la pirimidina. Este compuesto tiene la capacidad de incorporarse al DNA y al RNA, interfiriendo directamente en la actividad de las enzimas DNMT's en particular con la DNMT1, que en condiciones normales se anclan al DNA mediante una unión covalente en el carbono 6 del anillo de la citosina. Posteriormente la enzima acerca topológicamente al nucleótido exponiendo de esta manera el carbono 5 a la molécula de S-adenosil-L-metionina promoviendo un ataque nucleofílico y la unión del grupo metilo con la citosina. Posteriormente se disocia el enlace covalente y se libera la enzima, la 5-azacitidina forma un aducto irreversible que inhabilita a la enzima para seguir metilando [56, 60].

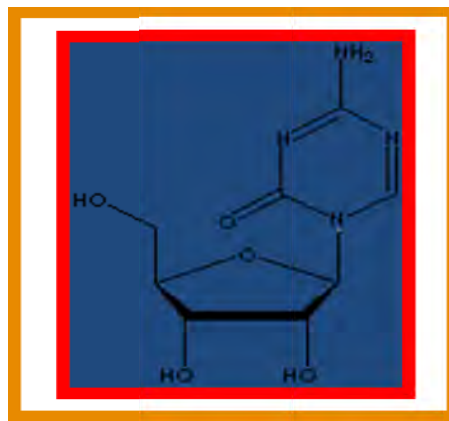


Fig.13 Nucleosido de 5- azacitidina
(www.epigenome.eu/media/images)

Esta sustancia tiene el máximo grado de actividad sobre las DNMT's en las primeras 24 h de exposición y que posteriormente disminuye notablemente su efecto sobre las células. [53,60]. Esto genera en consecuencia una desmetilación paulatina del material genético, en particular en regiones de heterocromatina con secuencias CpG altamente repetidas, generando una descondensación y consecuentes rupturas de cromosomas y errores en la segregación. Este fármaco entra a la célula con su forma conocida como 5-azacitidina, que es posteriormente metabolizada y fosforilada a 5-azacitidina monofosfato, la cual se transforma en 5-azacitidina difosfato para ser reducida posteriormente a 5-azaDeoxicitidina difosfato y finalmente es incorporado al DNA como 5-azaDeoxicitidina trifosfato [60,61].



Este fármaco también puede ser incorporado en el RNA. Esto genera alteraciones en ribosomas, y consecuencias en los diferentes tipos de RNA, que regulan la producción de proteínas, desaminación enzimática, y la conformación de 5-azauridina, que interfiere con la síntesis de timidilatos de novo [59, 60, 61].

Este compuesto se ha empleado en varios esquemas de quimioterapia para tratar algunos tipos de leucemias, como la leucemia mieloide aguda, debido a la acción que tiene sobre la desmetilación de promotores de genes que pueden estar involucrados en el proceso de inhibición de la carcinogénesis, como los genes supresores de tumores. En general no es incluida en los esquemas de quimioterapia, debido a que presenta un alto grado de toxicidad en los pacientes [61, 62].

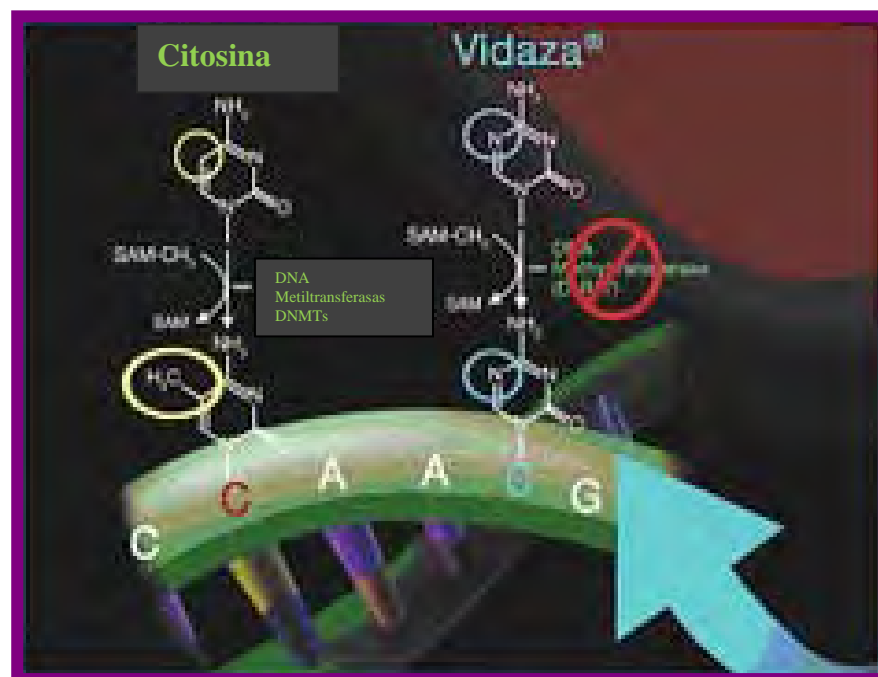


Fig. 14 Substitución de la Citosina por la 5- azacitidina en el DNA



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La metilación del DNA es un proceso dinámico y variable que cumple un papel fundamental para la estructuración y función de los cromosomas. Su alteración puede dar como resultado inestabilidad cromosómica, la cual se involucra con la génesis de enfermedades como el cáncer. La falta de información acerca del establecimiento de la metilación y sus alteraciones en los cromosomas completos así como en regiones particulares altamente metilables no permite conocer de manera más amplia la participación y la relación de la metilación en la generación de aberraciones cromosómicas y la génesis de otras enfermedades que involucran alteraciones en la metilación.

PREGUNTA QUE SE DESEA RESPONDER

¿La 5-azacitidina generará cambios en los patrones de metilación cromosómicos que involucren desmetilación de regiones pericentroméricas y estos cambios se asocian a la generación de errores en la segregación de cromosomas?

HIPÓTESIS

La 5-azacitidina causará una alteración gradual, en función del tiempo de exposición, en la metilación general de los cromosomas y en regiones particularmente metiladas como las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9, 16 y los brazos largos del cromosoma Y, esto tendrá como consecuencia repercusiones en la segregación adecuada de estos cromosomas.



OBJETIVO GENERAL

Detectar y caracterizar patrones de desmetilación de cromosomas de células tratadas y no tratadas con 5-azacitidina, así como la presencia de desmetilación de regiones pericentroméricas y la generación de errores en la segregación cromosómica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- **Detectar patrones de metilación en cromosomas de linfocitos humanos tratados con 5-azacitidina**
- **Caracterizar la modificaciones de los patrones de metilación de cromosomas de linfocitos humanos, después de diferentes tiempos de exposición a 5-azacitidina**
- **Observar si se presenta de manera natural algún tipo de patrón de desmetilación en cromosomas no tratados después de varios ciclos celulares.**
- **Analizar los cambios en la metilación las regiones de heterocromatina de los cromosomas 1, 9, 16 y Y**
- **Evaluar la inestabilidad cromosómica causada por la 5-azacitidina por medio de la técnica de citocinesis bloqueada para obtención de micronúcleos.**
- **Analizar la presencia de los cromosomas específicos en micronúcleos inducidos por 5-azacitidina.**

JUSTIFICACIÓN

Con este estudio se podrá observar y entender la dinámica que presentan los patrones de metilación en metafase de linfocitos humanos, bajo condiciones de cultivo y de tratamiento con un agente desmetilante. Esto dará una perspectiva sobre el papel de las alteraciones de la metilación en la generación de inestabilidad cromosómica.



DISEÑO METODOLOGICO

CULTIVO CELULAR

Se cultivó 1ml de sangre periférica de un individuo joven, sin evidencia de enfermedad, sin consumo previo de medicamentos ni alcohol, en cajas de cultivo de 15 ml adicionando medio RPMI 1640 (GIBCO®), suplementado con 10% de suero fetal bovino (HyClon®), 1% de L-Glutamina (GIBCO®) y 1% de aminoácidos no esenciales (SIGMA®). A cada cultivo se le adicionaron 200 µl de fitohemaglutinina (GIBCO®) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Se dejaron proliferando durante 48 h y posteriormente se cambió el medio de cultivo, adicionando 5-azacitidina (SIGMA) a una concentración final de 10 µM, dejando en tratamiento durante 24, 48,72 horas.

TECNICA DE OBTENCIÓN Y FIJACIÓN DE METAFASES

Para la obtención de metafases, previo a la cosecha se adicionó colchicina a una concentración final de 0.2 µg/ml (Colcemid GIBCO®) durante 60 minutos, tanto a los cultivos expuestos como a sus controles. Posteriormente se extrajeron las células del cultivo centrifugando a 1200 rpm 8 min y enseguida se rompieron las membranas mediante un shock hipotónico, agregando una solución de KCl, 0.075 mM, (J.T-Baker®) incubando a 37 °C 40 minutos. Posteriormente se agregó una solución fijadora de metanol - ácido acético (3:1) y se procedió a centrifugar. Se retiró el sobrenadante y se agregó más solución fijadora. Se resuspendió el botón de células y se realizó el procedimiento de lavado varias veces hasta obtener un botón celular blanquecino, a partir del cual se prepararon las laminillas, goteando las células resuspendidas sobre éstas a una distancia de 30 cm, dejando secar posteriormente.

TECNICA DE INMUNODETECCIÓN INDIRECTA CONTRA 5mC

Una técnica para proporcionar información sobre el estado de metilación del DNA genómico, es el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra 5mC, los cuales se han empleado para observar los patrones de metilación a nivel de tejido en diferentes estados patológicos como el cáncer [3, 4].



Las láminillas se cubrieron con PBS y se irradiaron con una lámpara germicida de luz Ultravioleta (15W) a una distancia de 15 cm, a una temperatura de 4°C durante 90 minutos. Luego las láminas se sumergieron en PBM (PBS + 2% Seroalbúmina bovina (SIGMA®) + 0.1% Tween 20 (QUIMICA MEYER®) 15 min a temperatura ambiente. el PBM fue preparado minutos antes de su empleo. Esta solución se utiliza con el fin de purificar la unión del anticuerpo y evitar uniones inespecíficas.

La técnica para realizar inmunodetección contra 5mC descrita por Bensaada y modificada por Sciandrello et al. [3, 4], fue modificada en algunos parámetros. El tiempo de exposición planteado inicialmente por los autores fue de 10 horas, con una lámpara de luz UV de 15W a una distancia de 15 cm a una temperatura 4°C. Estas condiciones se intentaron establecer en el laboratorio, pero obtuvieron cromosomas demasiados degradados. Para solucionar este problema se manejaron diferentes tiempos de radiación hasta obtener una adecuada degradación, que se consiguió cuando los cromosomas conservaban su morfología y la inmunodetección era adecuada y homogénea. Esta degradación se logró en un tiempo de 90 minutos bajo la radiación de una lámpara de 15W, a una distancia de 15 cm, a una temperatura de 4 °C.

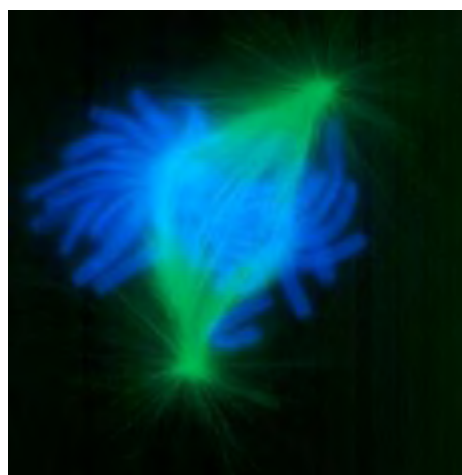


Fig. 15 Cromosomas en metafase



Posteriormente se diluyó el anticuerpo contra 5mC (anti-5mC, Calbiochem®) en PBM 1:1000 y se adicionan 70 µl a cada laminilla y se cubrió con parafilm y se incubaron en una cámara húmeda durante 60 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, se sumergieron las laminillas en PBS 5 min, en cámaras de Koplín diferentes y se retiró el parafilm®. Se sumergieron una vez en PBM, se aplicaron 70µl de anticuerpo secundario, IgG anti-ratón conjugado con fluoresceína (Calbiochem®) diluido en PBM al 1:100, y se cubrió con un papel parafilm y se incubó en una cámara húmeda a 37°C durante 60 min. Enseguida de un corto lavado con PBS, se retiró el parafilm y las láminas se montaron con una solución anti-desvanecimiento (Vectashield®) y se colocó un cubreobjetos sellado con barniz de uso común. Se guardaron las laminillas en un congelador a -20 °C durante al menos 20 min. La detección de 5mC se llevó a cabo en cromosomas en metafase de linfocitos tratados y no tratados y se observaron las láminas bajo un microscopio de fluorescencia Axioskop 2 motplus de Zeiss equipado con una lámpara de mercurio HBO 100 y un filtro para fluorescencia intercambiable. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Axio Cam Hr de Zeiss® y se procesaron mediante el software Axiovision 4.6 de Zeiss®

Se evaluaron 50 metafases por cada laminilla correspondiente a las 24 h, 48 h, 72 h de tratamiento así como sus respectivos controles. Al mismo tiempo se analizaron y cuantificaron las regiones pericentroméricas de las mismas metafases, tomando como criterios presencia o no de bloques altamente metilados en estas regiones para cada uno de los cromosomas de interés y en los diferentes tiempos de exposición al fármaco.

TECNICA DE CITOCINESIS BLOQUEADA PARA LA OBTENCIÓN DE MICRONÚCLEOS

Veinticuatro horas antes de que se cumpliera cada periodo de tratamiento, se adicionó citocalasina B (SIGMA®). A continuación se extrajeron las células del cultivo y se procesaron con solución fijadora, realizando varios lavados con el fin de purificar el botón celular. Posteriormente, se resuspendió el botón en 1 ml de solución fijadora y se prepararon las laminillas, goteando a una corta distancia para no romper la envoltura nuclear y poder realizar la identificación de MN.



TECNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de DNA en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos en muestras citogenéticas fijadas. En la técnica se utiliza una sonda de DNA que hibrida los cromosomas completos o las secuencias únicas simples. Después de la fijación, el DNA blanco se trata con calor y formamida para desnaturalizar el DNA bicatenario, haciendo que resulte monocatenario. El DNA blanco queda entonces disponible para hibridarse con una sonda de DNA igualmente desnaturalizada, monocatenaria, marcada con fluorescencia, que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación, la sonda de DNA no hibridada e hibridada inespecíficamente se elimina tras varios lavados y se aplica un contraste al DNA para su visualización.

El protocolo para realizar este análisis se describe a continuación:

Se secaron las laminillas a temperatura ambiente, se revisaron bajo microscopia de contraste y se seleccionó la zona a hibridar. Para preparar la solución de hibridación se utilizaron secuencias específicas de las regiones pericentroméricas para cada cromosoma de nuestro interés. Para el cromosoma 1 se utilizó una sonda CEP 1 (VYSIS®), para el cromosoma 16 CEP 16 (VYSIS®), de igual manera para el cromosoma 9 se empleo una sonda CEP 9 (VYSIS®) y para el cromosoma Y se uso una sonda CEP Y (VYSIS®) para preparar la mezcla de hibridación se agregó un buffer el cual contiene formamida, sulfato de dextrán como desnaturalizante que permite la incorporación de la sonda al DNA, los reactivos contenidos en el amortiguador no se especifican en su totalidad en los lineamientos y características del producto.

Para preparar esta mezcla de hibridación se utilizó 1 µl de sonda, 7 µl de amortiguador y 2 µl de H₂O, se agregaron 10 µl por cada zona de hibridación, se cubrió con cubreobjetos y se selló con cemento (Rubber Cement Electron Microscopy Sciences®). Se colocan las laminillas en un equipo de hibridación (Hybrite VYSIS®) inicialmente por 2 minutos a 75 °C para la desnaturalización y posteriormente mantenida a una temperatura de 37 °C para la hibridación. Pasadas 12 h se quitó el cubreobjetos, se lavó con solución 0.4 SSC-0.3% NP-



40 minutos a una temperatura de 73 °C. Posteriormente se sumergieron en una solución de 2XSCC- 0.1% NP-40 durante 1 minuto a temperatura ambiente. En seguida se contratiñó con una solución anti-desvanecimiento (Vectashield®). Se colocó un cubreobjetos y se selló con resina transparente la zona de hibridación. La observación y el análisis se realizó con un microscopio de fluorescencia axioskop 2 motplus Zeiss® equipado con una lámpara de mercurio HBO 100 y un filtro intercambiable para fluorescencia, las fotografías fueron tomadas con una cámara Axio Cam Hr Zeiss® y se procesaron mediante un software Axovision 4.6 Zeiss®. Se evaluaron 500 células binucleadas por cada tiempo de exposición 24h, 48h, 72h. Así como 500 células por cada tiempo de cultivo en el caso de los controles. En cada laminilla se hibridaron combinaciones de las sonda CEP1 y CEP9 así como CEP16 y CEPY esto para contrastar los colores de los fluorocromos y facilitar el análisis. Se cuantificaron eventos de no disyunción y los MN negativos para cualquier señal así como los que marcaban señal positiva para los cromosomas Y, 1, 9 y 16

ANALISIS ESTADÍSTICOS APLICADOS

Los resultados de los patrones de metilación así como los de la metilación pericentromérica se analizaron por medio de frecuencias porcentuales. Para el análisis de los eventos de no disyunción y de micronúcleos por FISH se utilizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney.



RESULTADOS

PATRONES DE METILACIÓN EN METAFASE

Después de realizada la inmunodetección contra 5mC, se detectaron y se caracterizaron los patrones de metilación en metafase de linfocitos humanos, pudiéndose determinar diferentes patrones, dependiendo tanto el tiempo de tratamiento así como del tiempo de cultivo. A partir de esto obtuvimos con base en sus características lo que se denominó como:

Patrón A (Normal), B (Moteado), C (Hemimetilado), D (Desmetilado), E (Dispar), los cuales se describirán a continuación:

PATRON A (NORMAL)

Este patrón se caracterizó por la presencia de fluorescencia homogénea en los cuatro brazos de cada cromosoma, manteniéndola a lo largo de estos hasta llegar a las regiones pericentroméricas en donde se acentúa la fluorescencia y se presenta en forma de bloques que abarcan el centrómero sobre todo en los cromosomas 1, 9, 16 (Figura 16). Otro bloque observable se localizó en los brazos largos del cromosoma Y. Estos cromosomas fueron identificados con base en su tamaño, morfología y posición del centrómero. Este patrón de metilación presentó una frecuencia cercana al 100% a las 24 h y 48 h en los controles que contrasta con los patrones de metilación vistos en las células tratadas donde prácticamente no se observó este patrón de metilación en ninguno de los periodos de tratamiento (Gráfica 1).



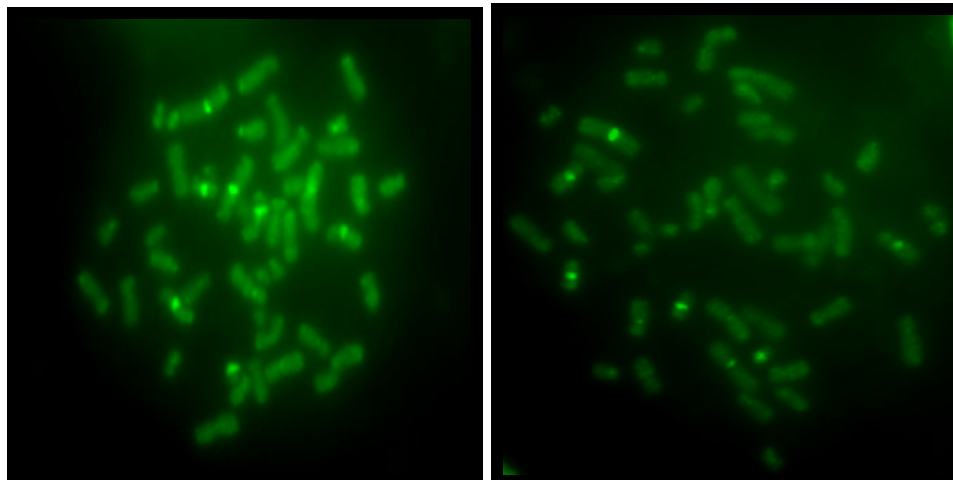
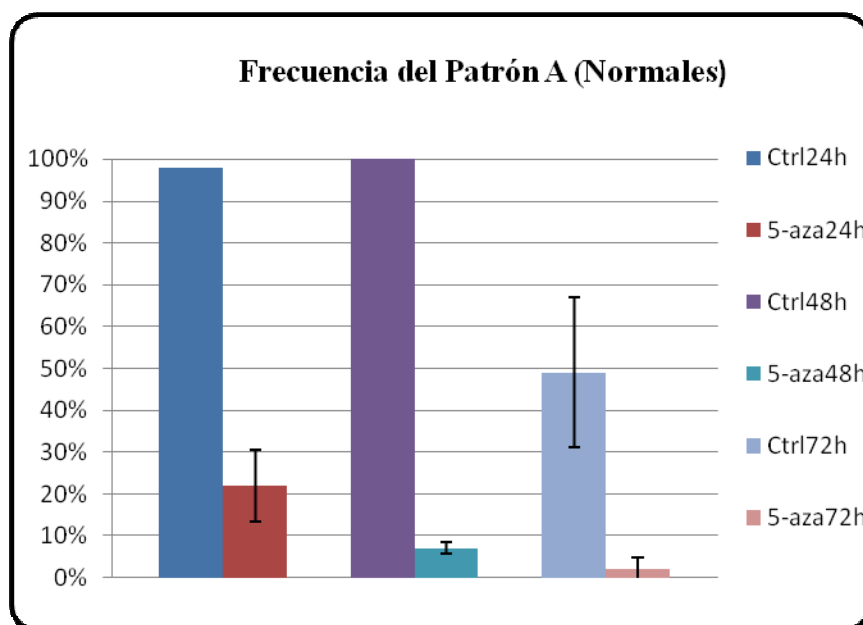


Fig. 16 *Metafases con patron A en controles 24 h*



Gráfica 1. Frecuencias de metafases normales en los diferentes tiempos de exposición a 5-Azacidina. Mostrando alta frecuencia en controles 24 y 48h

PATRÓN B (MOTEADO)

Este patrón se caracterizó por presentar puntos de fluorescencia a lo largo de los cromosomas, dando una apariencia moteada (Figura 17). Este tipo de metilación se presento con una alta frecuencia en dos de las condiciones a las que fueron sometidos los cultivos, tanto a las 24 h del tratamiento así como a 72 h de cultivo en los controles.

Otra característica fue que en este tipo de patrón aún fueron observable los bloques de heterocromatina pericentromérica (Grafica 2).

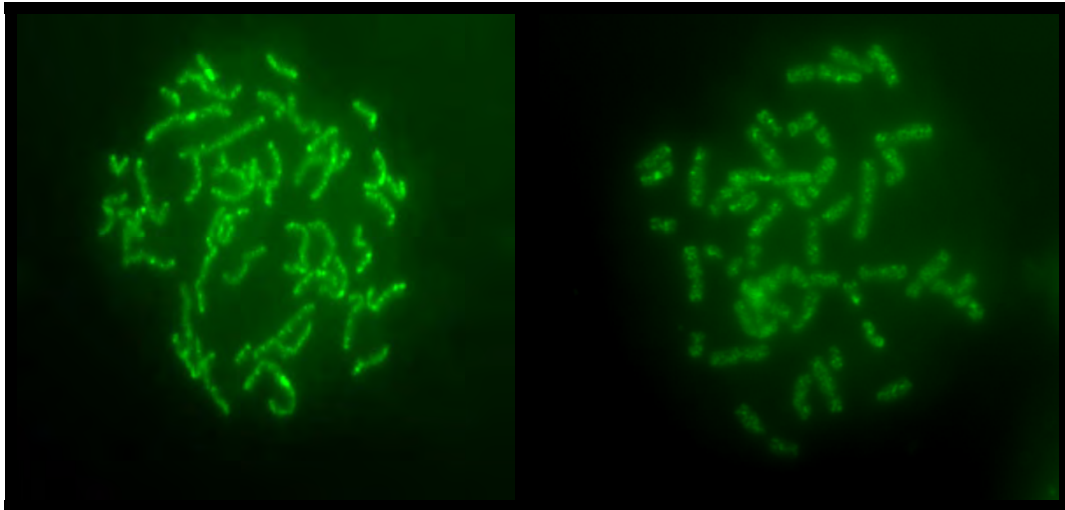
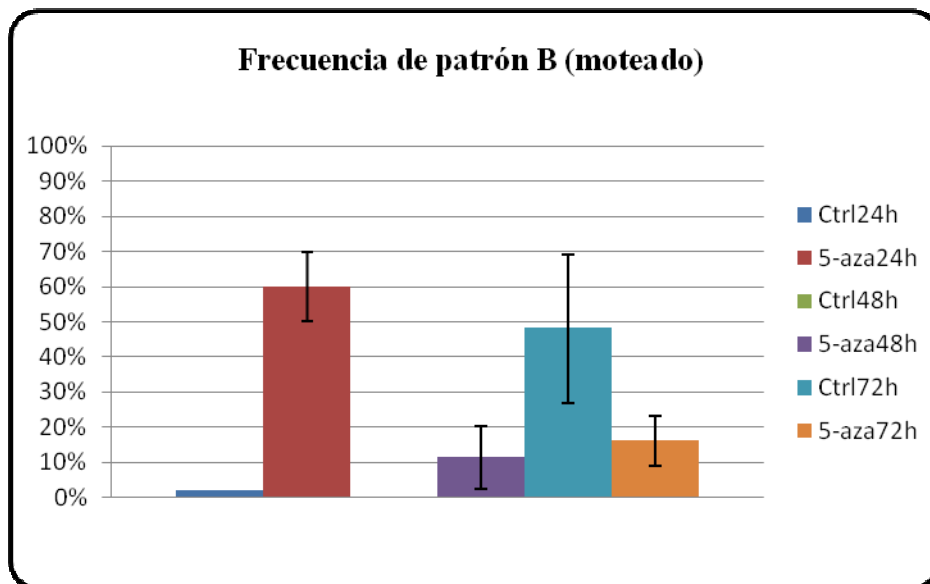


Fig. 17 metafases con patrón de metilación moteado, denominado patrón B.. encontrado en el la exposición a 5-azacitidina 24 h

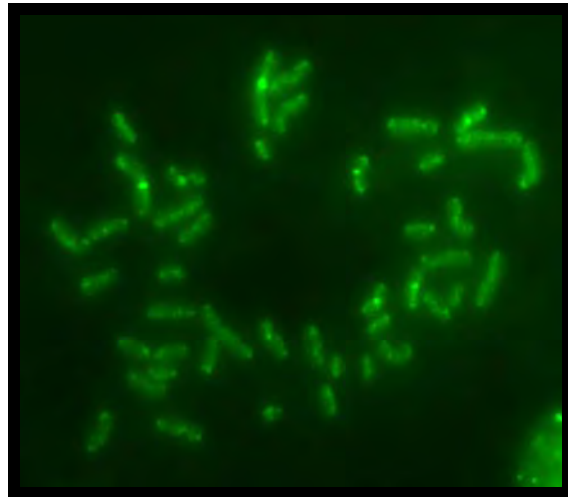
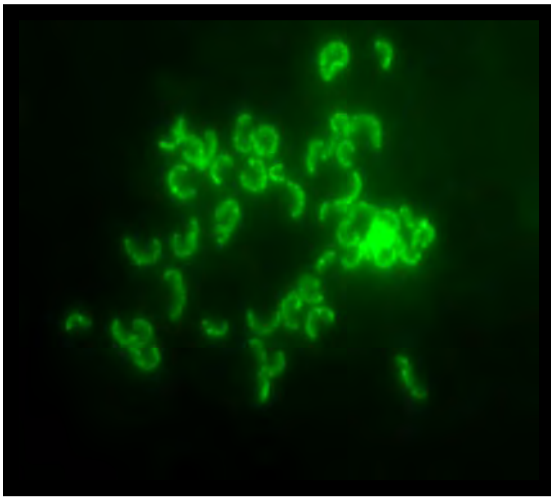


Gráfica 2. Frecuencias de metafases con patrón moteado en los diferentes ciclos de tratamiento Mostrando una mayor presencia a las 24h de tratamiento.



PATRÓN C (MOTEADO)

Podría tomarse este patrón como un estadio intermedio entre los patrones normales y los patrones que pierden totalmente la metilación ya que presenta una de las cromátidas totalmente desmetiladas y la otra cromátida con un patrón metilado homogéneo a lo largo de los brazos (Figura 18), conservando en la mayoría de los casos, gran parte de los bloques de heterocromatina pericentromérica. Este patrón denominado hemimetilado se observa sobre todo a las 48 h en las células tratadas con 5-azacitidina, en donde se presenta con una frecuencia de alrededor del 68%. Su respectivo control no muestra este patrón en este periodo de experimentación, sin embargo a las 72 h de experimentación los grupos tratados casi no muestran este patrón de metilación y los controles alcanzan una frecuencia del 20% (Grafica 3).



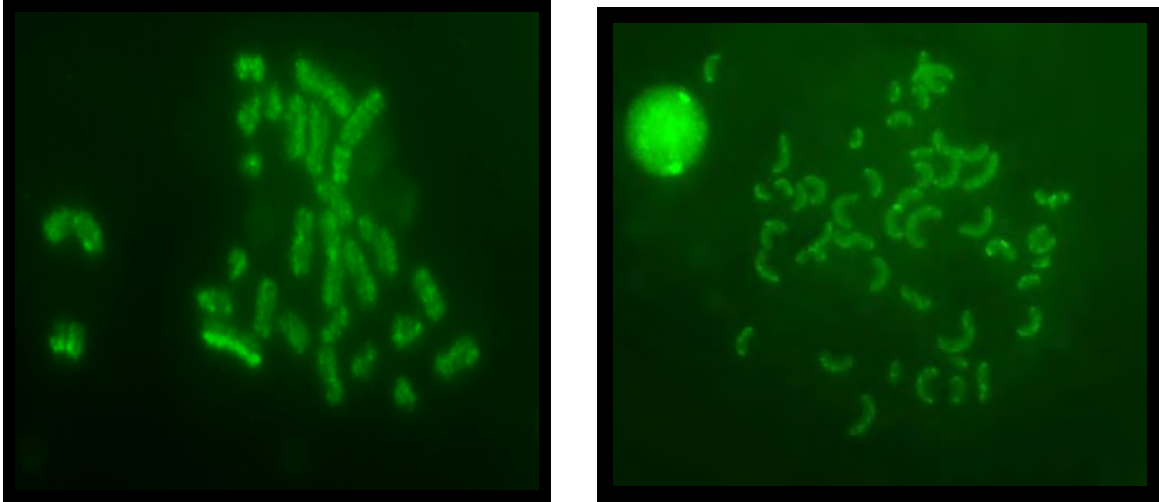
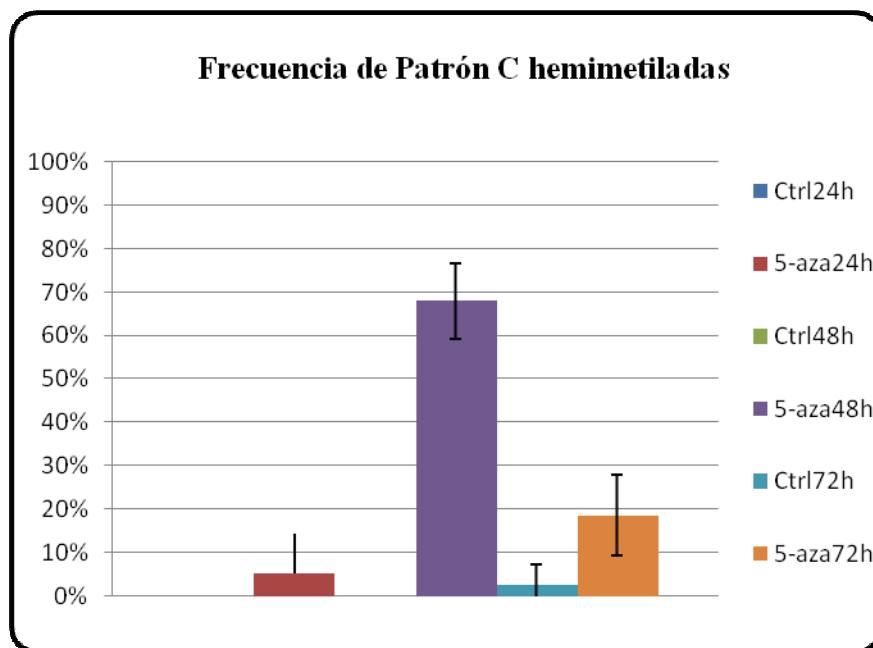


Fig.18 Inmunodetección- indirecta de Metafases con patrón hemimetilado denominado patrón C y en la imágenes inferiores se muestran aberraciones cromosómicas resultado posible de este patrón, se observa encorvamiento anormal de cromosomas a 48 h de exposición a 5-azacitidina hacia la cromátida hemimetilada .



Gráfica 3 Se muestra una alta frecuencia del patrón C (hemimetilado) en 48h de tratamiento en comparación con los demás ciclos



PATRÓN D (DESMETILADO)

La característica fundamental de este patrón es una carencia de la fluorescencia en todas las regiones tanto en los bazos de las cromátidas así como en las regiones centroméricas y pericentroméricas (Figura 19). Este patrón fue uno de los menos frecuentes. Se encontró en tan solo el 10 % de los tratados expuestos 24h a la 5-azacitidina y en menor frecuencia a las 48h y las 72h en los grupos tratados sin ser observado en los grupos controles (Gráfica 4).

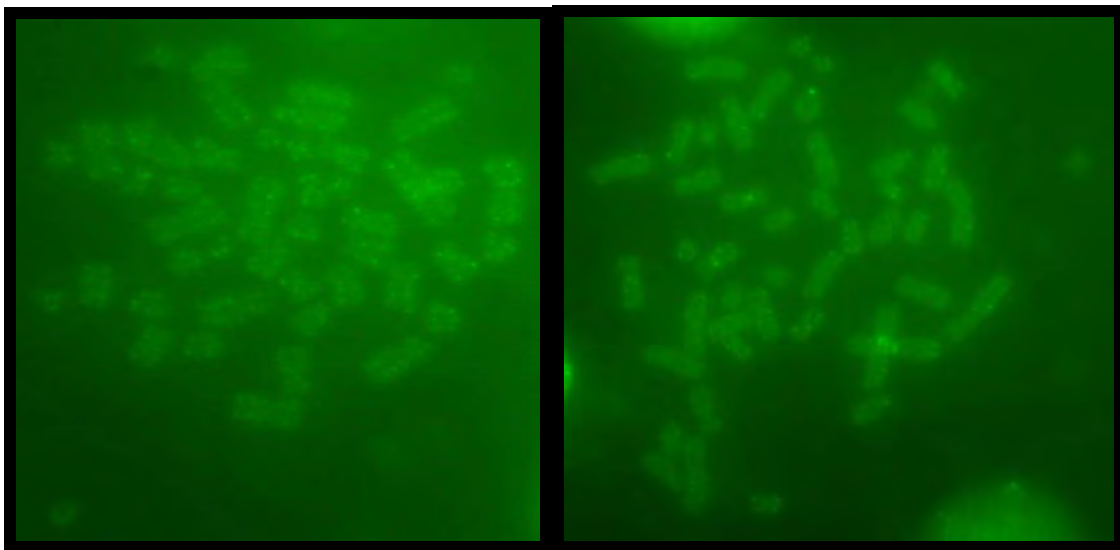
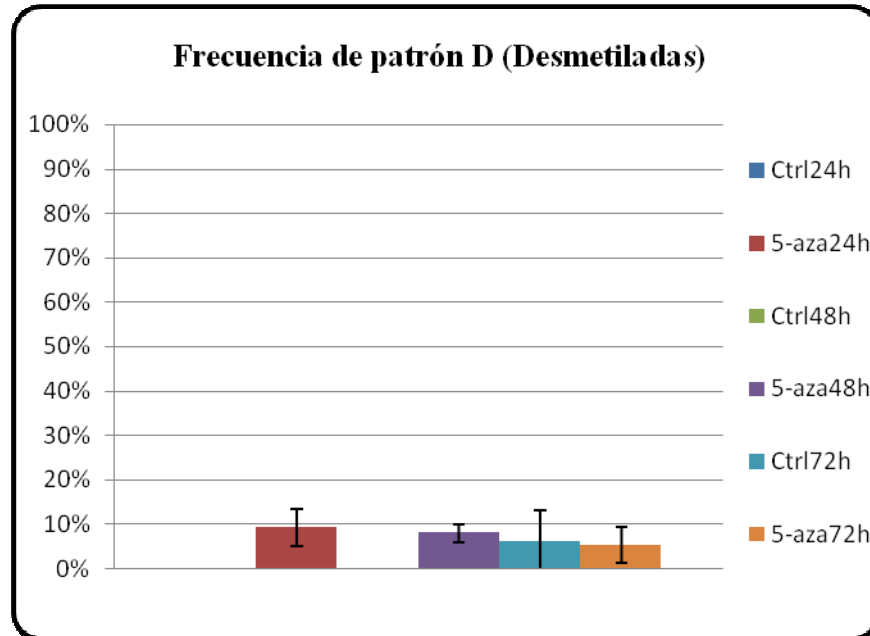


Fig.19 Metafases con patrón desmetilado denominado patrón D.



Grafica 4 La grafica muestra la frecuencia del patrón de D (desmetiladas) en los diferentes ciclos de tratamiento

PATRÓN E (DISPAR)

Este patrón es uno de los más interesantes y complejos de los observados debido a que discierne en gran medida a lo esperado. Se caracteriza por la presencia de cromosomas hipermetilados y desmetilados en la misma metafase. Por otra parte se mostraron parches de cromatina sin ningún rastro de fluorescencia incluso se observaron cromátidas completas con hipermetilación y desmetilación en la otra cromátida en el mismo cromosoma. En algunos casos se observaron bloques de centrómeros con metilación normal y ausencia de metilación en el resto del cromosoma. En otros casos sólo se observó metilación en las regiones subteloméricas (Figura 20).

Por las características descritas anteriormente se le designó como patrón dispar, el cual fue muy frecuente a las 72 horas de tratamiento (56%). En su respectivo control



no se registró en lo absoluto este patrón, siendo casi nula su frecuencia en los demás tiempos de experimentación (Gráfica 5).

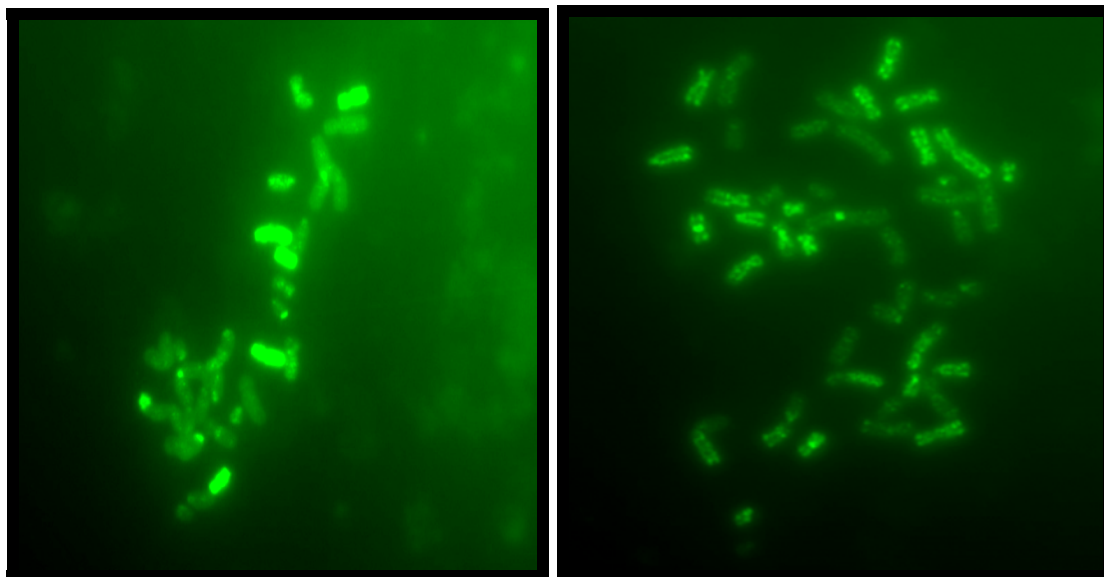
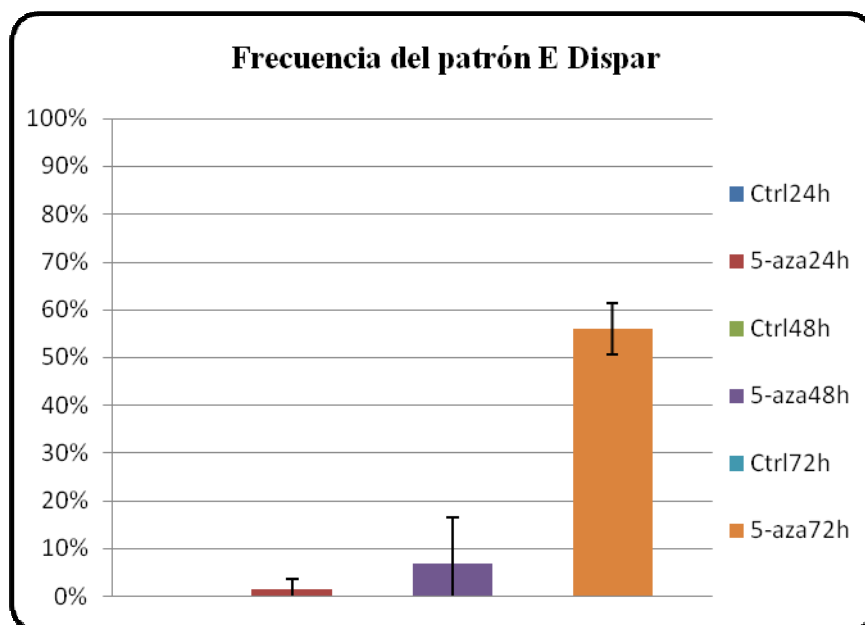


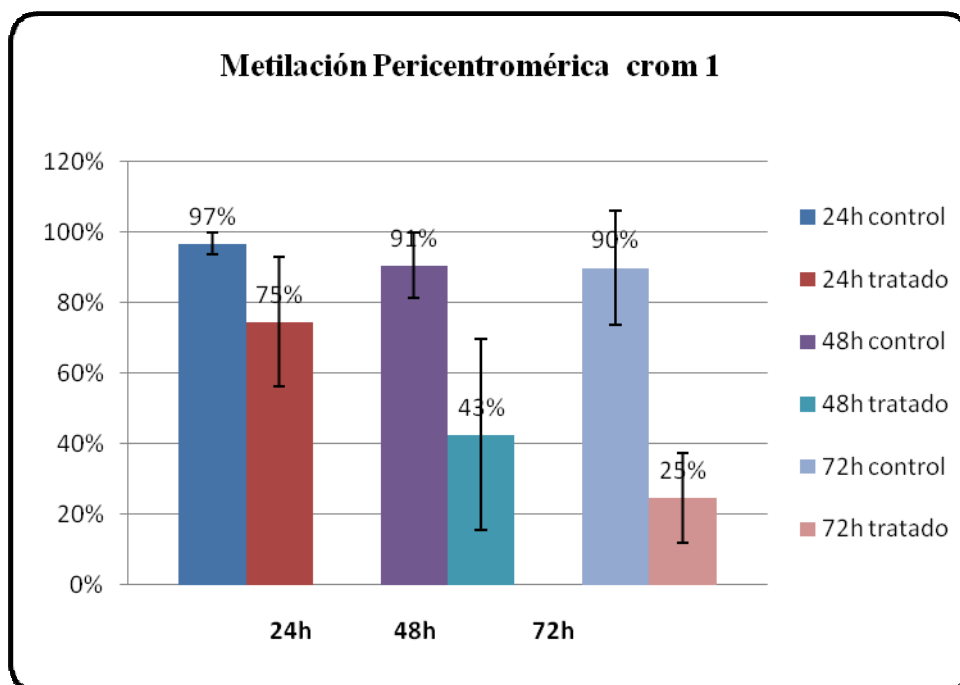
Fig. 20. Metafases con patrón E (Dispar) tratado 72h



Grafica 5. La grafica muestra frecuencia marcada del patrón de metilación E denominado dispar a las 72 h de tratamiento con 5-azacitidina

METILACIÓN PERICENTROMÉRICA

Posterior a la evaluación de los patrones de metilación en metafase, se procedió a evaluar los bloques de heterocromatina pericentromérica. Dichas regiones eran muy evidentes en algunos periodos de experimentación, en particular en los cromosomas, 1, 9,16, los cuales contienen gran cantidad de secuencias satélites 2 y 3. Vale la pena recalcar la importancia de estas regiones en la segregación cromosómica.

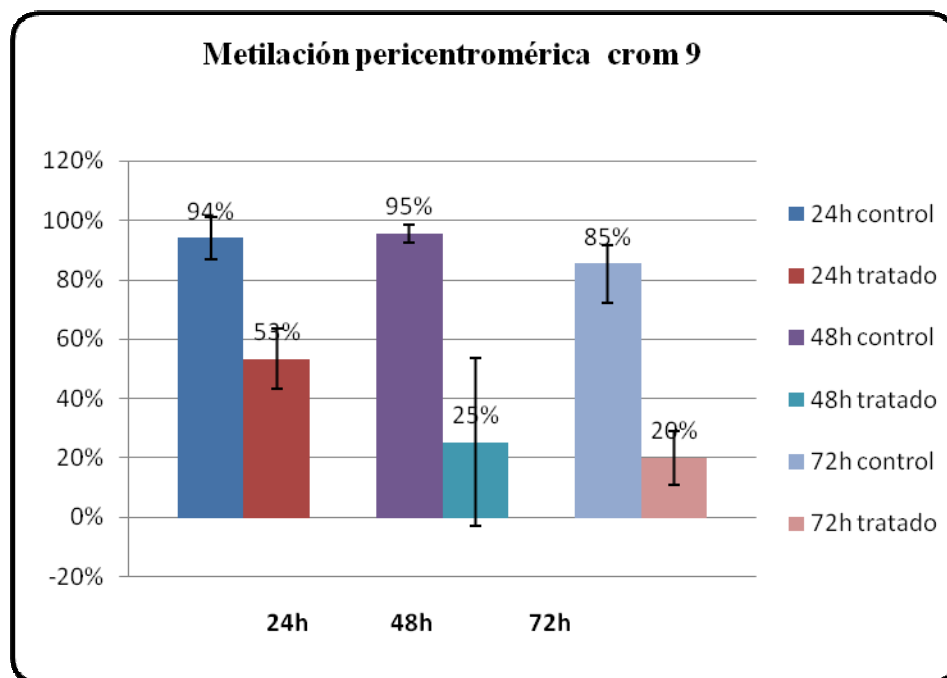


Grafica 6. Frecuencia de la metilación pericentromérica del cromosoma 1 en los diferentes ciclos de tratamiento

La grafica anterior representa la desmetilación pericentromérica para el cromosoma 1, donde se muestra una perdida gradual de la metilación en función del tiempo de

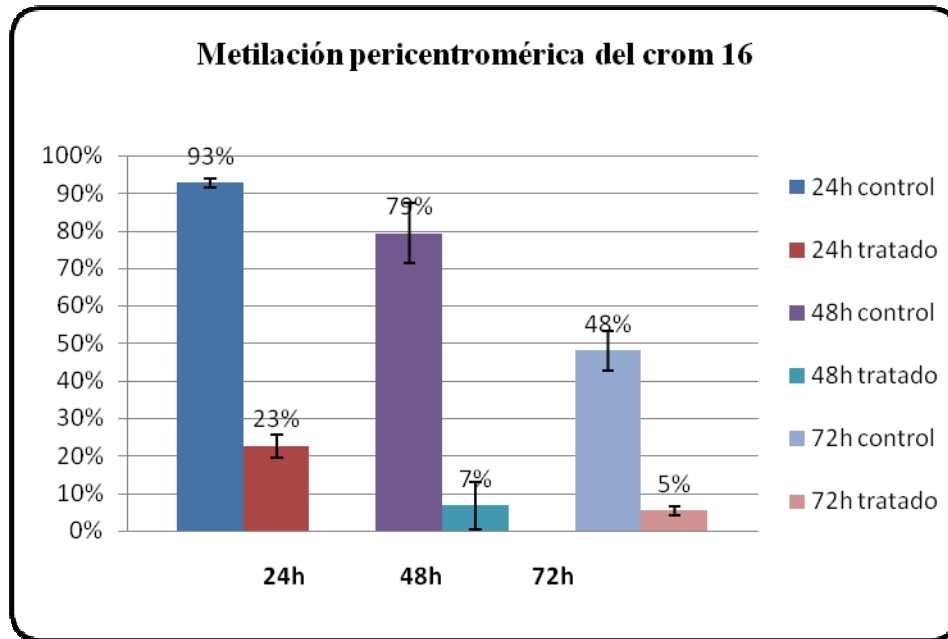


exposición a la 5-aza. En contraste se puede observar que los controles, para cada tiempo de experimentación, presentan una leve tendencia a desmetilarse.



Grafica 7 Frecuencia de la metilación pericentromérica de el cromosoma 9 en controles así como en los ciclos de tratamiento

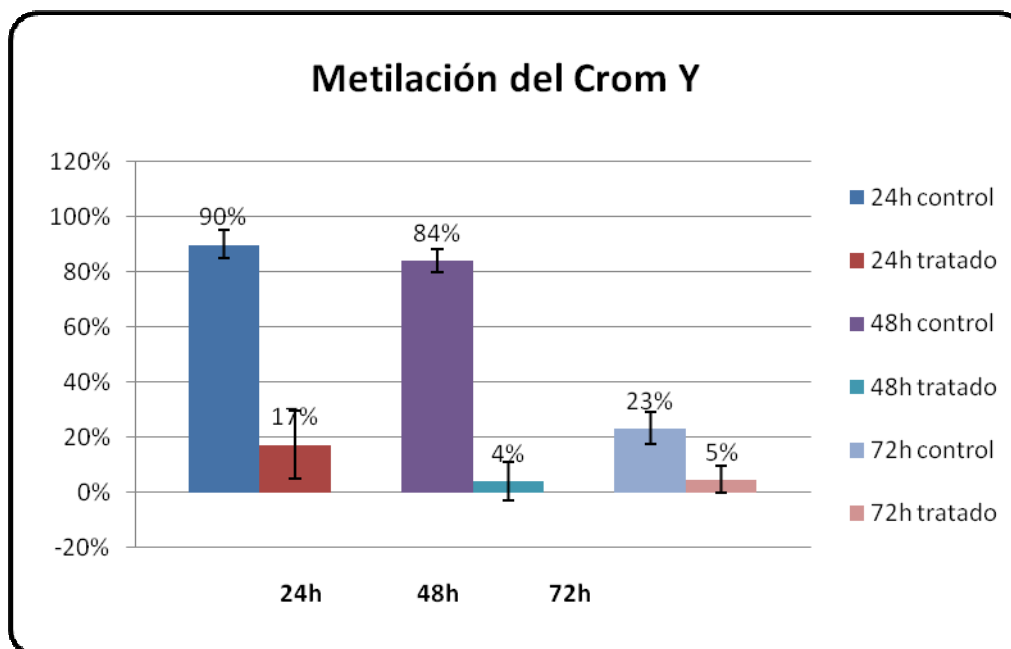
En los resultados para el cromosoma 9 mostrados en la grafica anterior, se puede observar que la tendencia a la desmetilación debido a la exposición a la droga, continúa marcando una tendencia al decremento, la cual es evidente a partir de las 24 h de exposición y gradualmente sigue descendiendo hasta las 72 h. Por el contrario los controles solo muestran tendencia hacia la disminución en el control de 72 h.



Grafica 8. Frecuencia de la metilación de las regiones pericentroméricas del cromosoma 16 después de los diferentes tiempos de cultivo y tratamiento

En cuanto al cromosoma 16, este muestra una disminución de la metilación pericentromérica casi del 80% a partir de las 24 h de tratamiento, hasta casi perder la totalidad de la metilación a las 72h. Por su parte los controles, muestran pérdida de la metilación pericentromérica que es paulatina y dependiente del tiempo de cultivo. Esto se puede apreciar claramente en la grafica anterior (Gráfica 7).





Grafica 9. Frecuencia de la metilación de los brazos largos del cromosoma Y después de los ciclos de cultivo y tratamiento

Los brazos largos del cromosoma Y pierden la metilación desde el inicio del tratamiento y en 48 h y 72 h registran un comportamiento similar de desmetilación prácticamente total. Los controles también muestran una desmetilación secuencial por efecto de los tiempos de cultivo, mostrando sobre todo una desmetilación importante a las 72 h de cultivo.

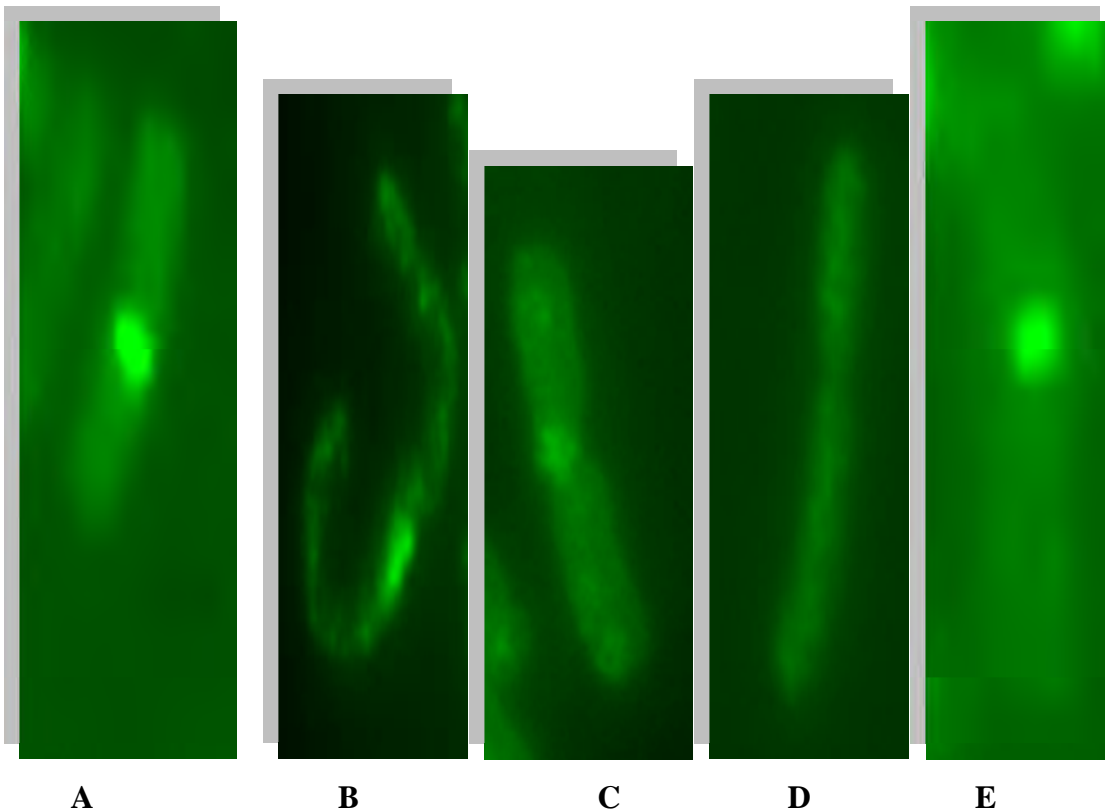


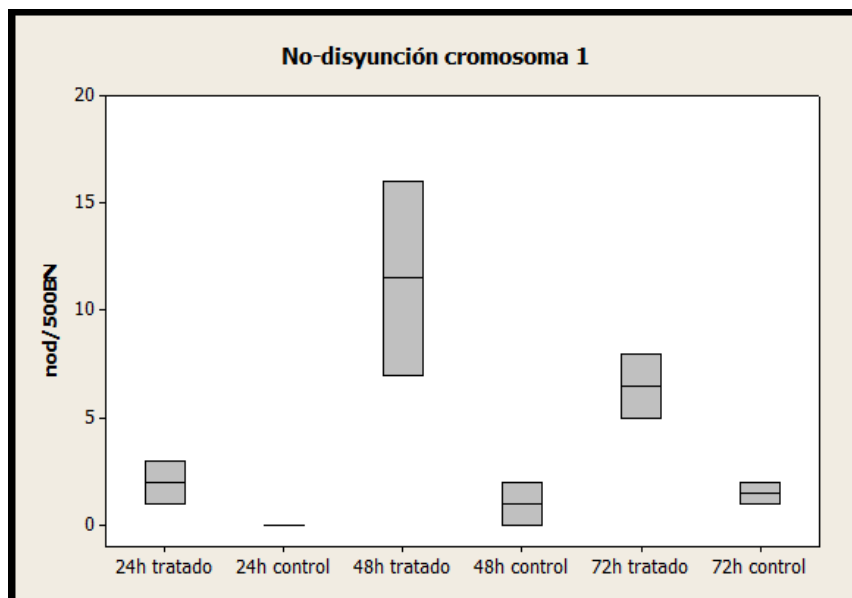
Fig. 21 Variaciones en la metilación pericentromérica del cromosoma 1; A) controles 24 h, B) Tratado 24 h, C) tratado 48 h, D) Tratado 72 h, E) Tratado 72 h

ESTUDIO DE EVENTOS DE NO- DISYUNCIÓN POR FISH

Con el empleo de la técnica de FISH, se evaluaron los eventos de no disyunción y los errores en la segregación cromosómica en los linfocitos expuestos a 5-azacitidina, a 24,

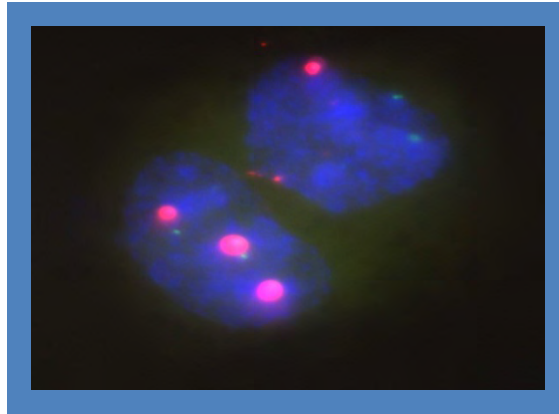


48 y 72 h de exposición, así como sus controles. Esto, dada la importancia de estos fenómenos en la generación de aneuploidías.

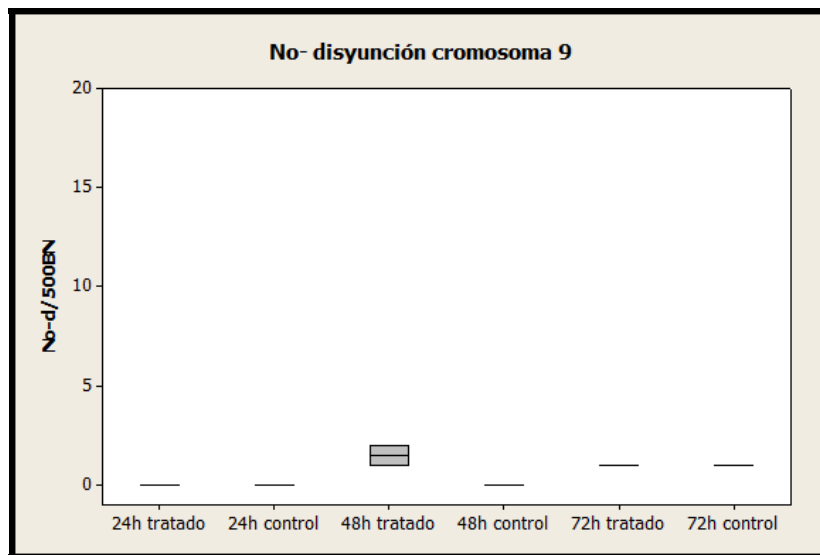


Grafica 10. Eventos de no disyunción para cromosoma 1

Los resultados del análisis realizado a los eventos de no-disyunción para el cromosoma 1 mostraron que a 24 h se encontró presencia de no-disyunción en tratado, pero esta no fue estadísticamente significativa entre el control y el tratado. Subsecuentemente se registró un incremento en la frecuencia de los eventos de no-disyunción, resultando que a las 48 h se encontró un aumento importante en la no-disyunción de los tratados, representando diferencia estadística significativa entre controles y tratados mostrando una $P = 0.010$, con respecto al último ciclo de 72 h, el análisis mostró una disminución en los eventos de no-disyunción sin embargo también se encontraron diferencias estadísticamente significativas con $p = 0.024$



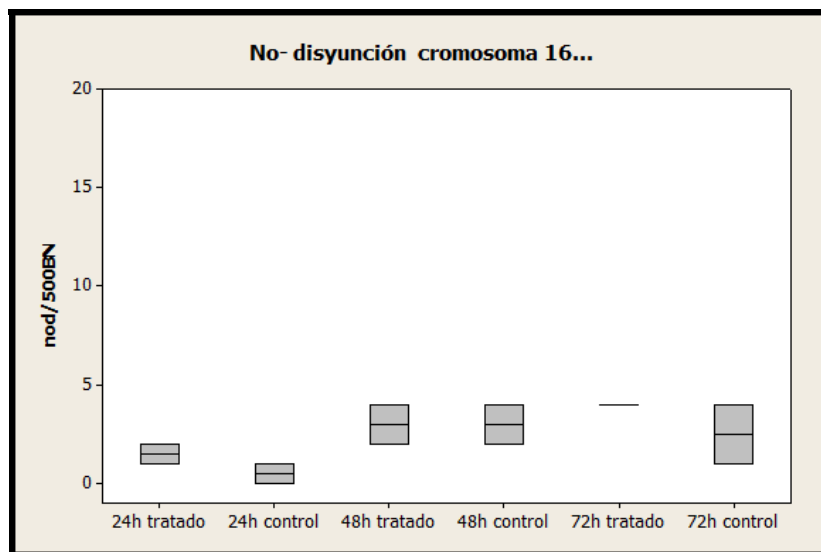
Evento de no disyunción para cromosoma 1



Grafica 11. Eventos de no disyunción para el cromosoma 9

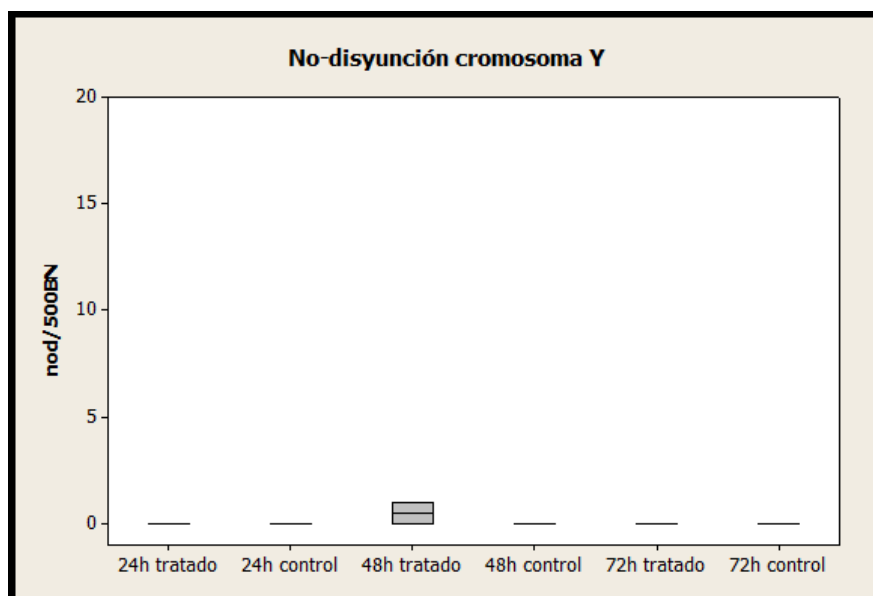
Del análisis del cromosoma 9 para evaluar no disyunción se encontró que a 24 h no se registraron eventos ni en tratado ni en control. En el caso de las 48 h se mostro el mayor incremento de eventos de no-disyunción en el tratado sin llegar a representar una diferencia significativa. En el caso de 72 h se registraron muy pocos eventos y en igual proporción tanto para tratados como para controles.





Grafica 12. Eventos de no disyunción cromosoma 16

La presencia del cromosoma 16 en los eventos de no-disyunción, mostró un comportamiento similar entre tratados y controles en los tres diferentes ciclos de cultivo. Registrando en particular una homogeneidad en los eventos de no disyunción tanto en 48 h como a 72 h y no presentando diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos.



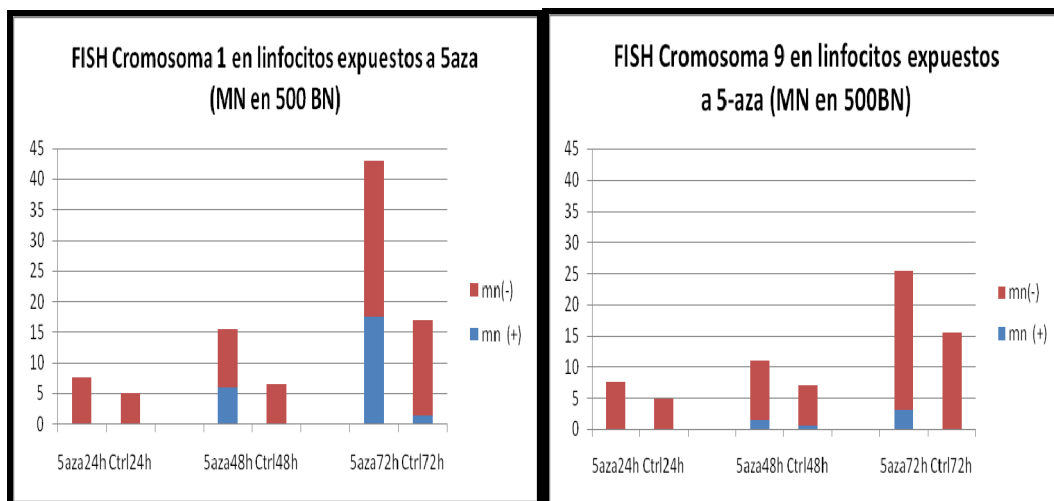
Grafica 13. Eventos de no disyunción para el cromosoma Y

En el caso del análisis realizado para el cromosoma Y, básicamente no se registraron eventos de no-disyunción, exceptuando el caso del tratado 48 h en el que se presentaron algunos eventos de no-disyunción, pero esto no representó ninguna diferencia estadística. Cabe señalar que de todos los cromosomas evaluados para este rubro el cromosoma Y fue el que menos eventos de no disyunción presentó.

Para los cromosomas 9, el cromosoma 16 y el Y, prácticamente no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de eventos de no-disyunción en ninguno de los tiempos de experimentación. Pero a pesar de ello se evidencio una tendencia que se mantuvo durante todos los tiempos evaluados en todos los cromosomas en la que la mayoría de los eventos de no-disyunción se presentaban en las 48 h de exposición a la 5- azacitidina

EVALUACIÓN DE ERRORES EN LA SEGREGACIÓN POR FISH

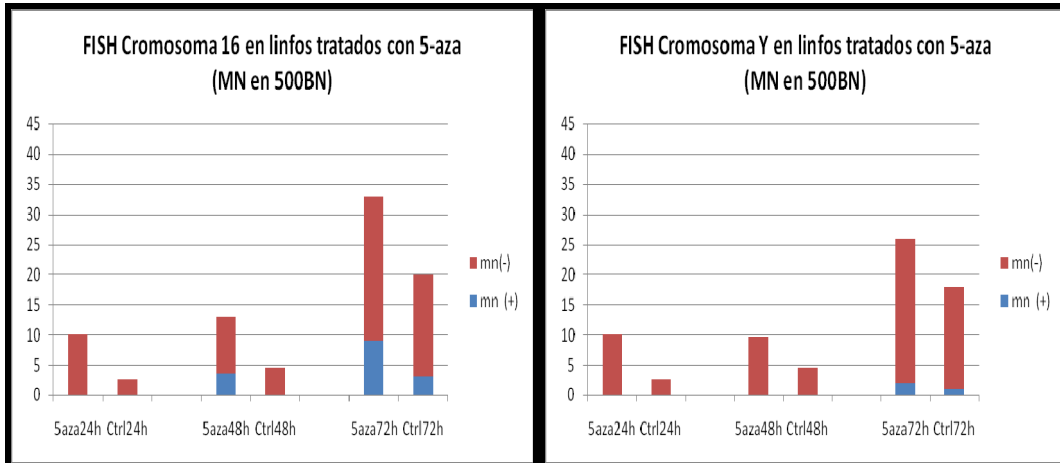
Para la búsqueda y análisis de errores en la segregación cromosómica, se uso la técnica de citocinesis bloqueada y el procesamiento de laminillas con FISH para la búsqueda de cromosomas específicos sobre MN, para lo cual se tomaron en cuenta tanto los MN con señal positiva como los MN sin señal, estimando de esta manera, el porcentaje de cada cromosoma de interés en el total de los MN encontrados.



Grafica A

Grafica B

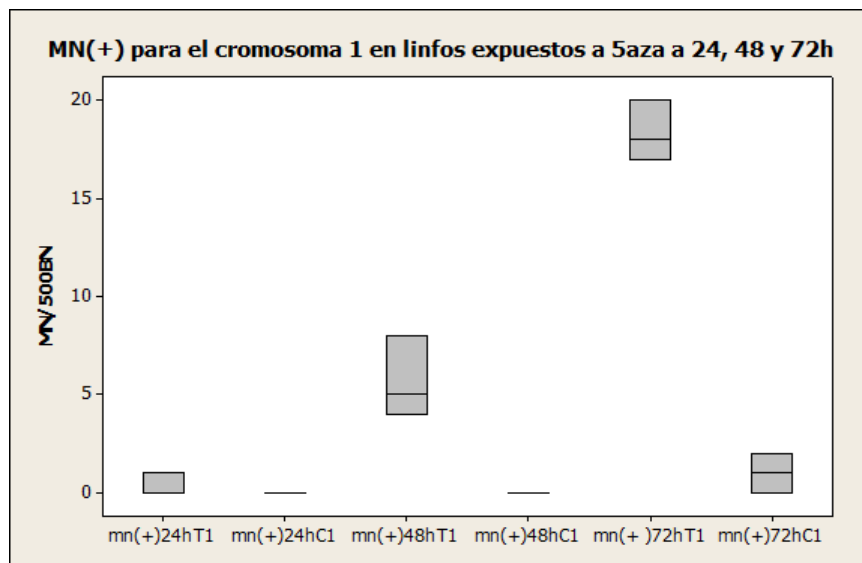




Grafica C

Grafica D

Grafica 14. Muestra los resultados de los MN (+) para cada una de las sondas monitoreadas así como los MN (-) teniendo en general el total de MN encontrados a los diferentes condiciones en los conteos realizados a las células binucleadas



Grafica 15. MN con señal (+) para el cromosoma 1

Se muestran los resultados de los MN encontrados para el cromosoma 1, después de los ciclos de tratamiento donde se encontró que en 24 h la presencia de MN que contienen el cromosoma 1 fue poco representativa en el caso del tratado y nula en el control. En 48 h se presentó incrementó en los MN del cromosoma 1 en el tratado y nula en el caso de el control esto si representó diferencias estadísticamente

significativas entre el tratado vs control mostrando una $p=0.042$. Para el caso de las 72h los MN encontrados para el cromosoma 1 mostraron un incremento bastante considerable y una diferencia bastante significativa en comparación con su respectivo control representando esta una diferencia estadísticamente significativa de $p=0.007$.

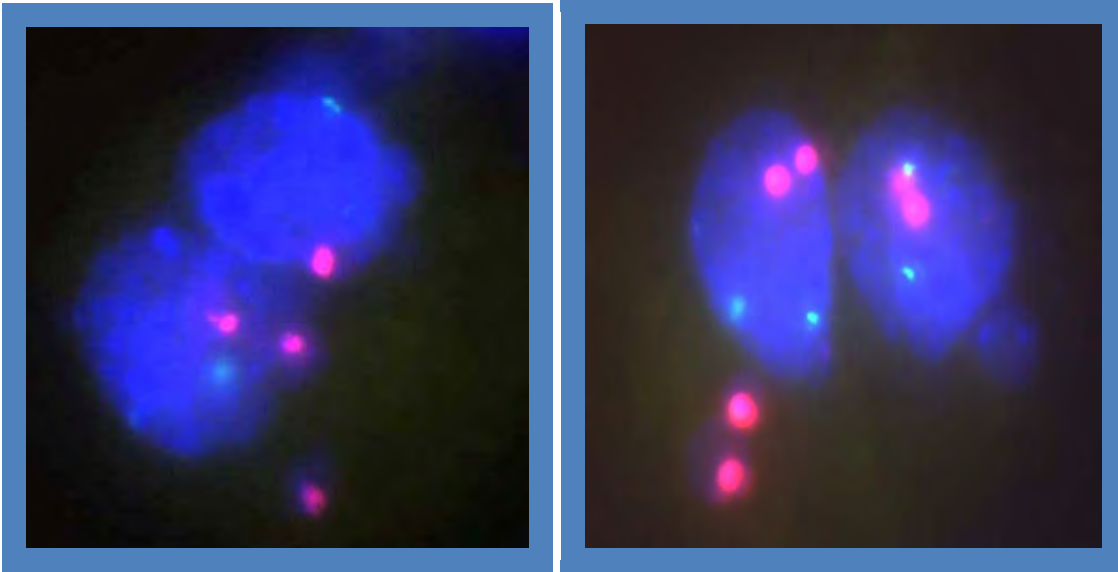
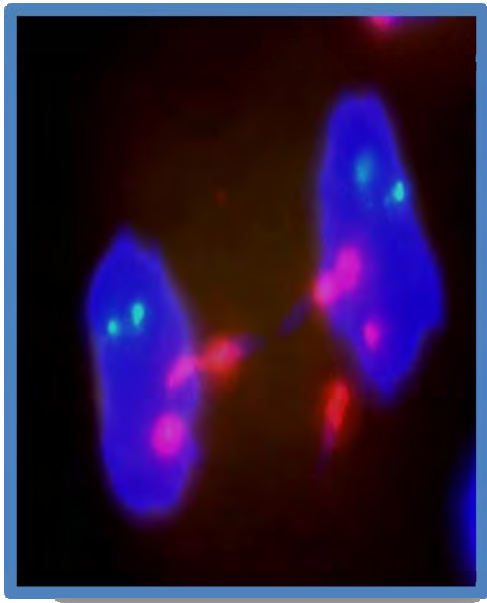
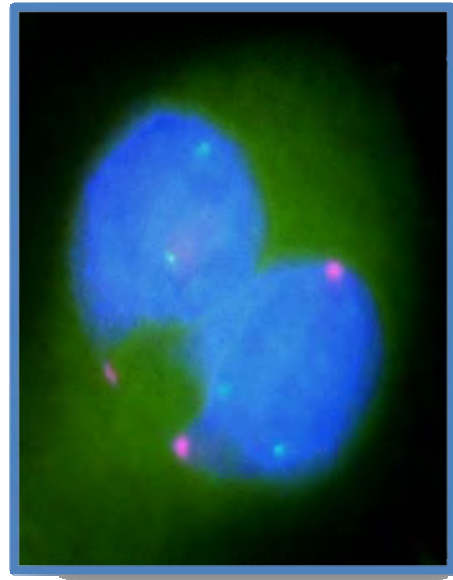


Fig. 21 MN positivos para la sonda dirigida al cromosoma 1, Célula BN con MN(+) para el cromosoma

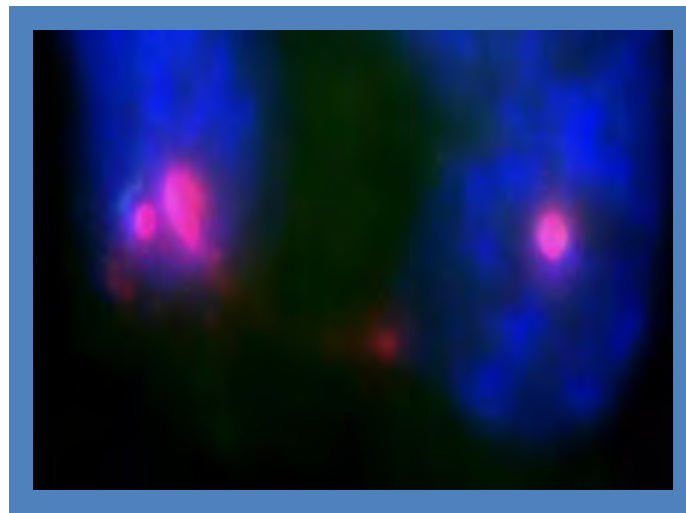




A



B

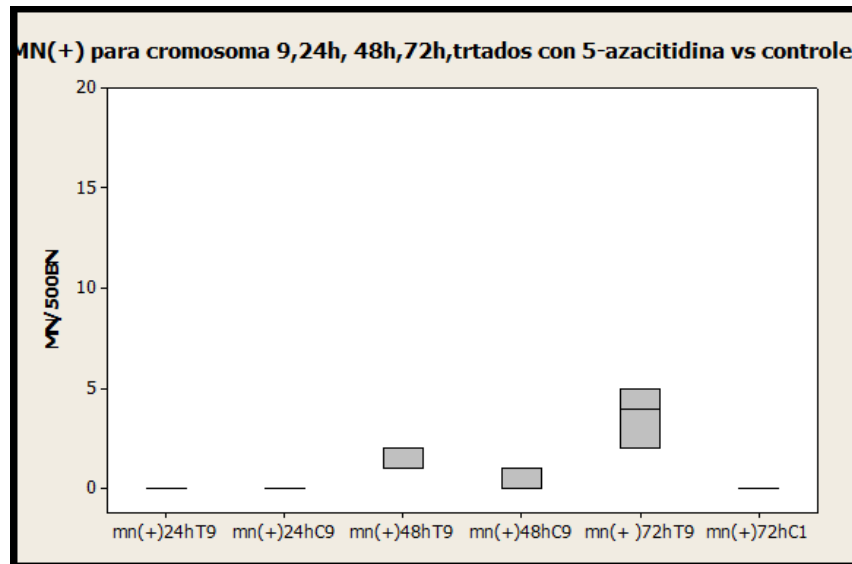


C

Fig. 22 Muestra diferentes aberraciones en la segregación que involucran al cromosoma 1 A) posible asociación de los telomeros del cromosoma 1. B y C)Puente cromosómico por posible asociación centromérica del cromosoma 1

Los resultados obtenidos para el cromosoma 1 muestran un incremento en la presencia de este cromosoma en los MN, en función del tiempo de exposición,

encontrándose su máxima frecuencia después de las 72h de exposición al fármaco. Esto generó como resultado diferencias significativas entre controles y tratados a partir de las 48h.



Grafica 16. MN con señal (+) para cromosoma 9

Se muestran los resultados de la evaluación de MN encontrados para el cromosoma 9. En donde a 24 h de experimentación no presentaron MN ni tratados ni control. En el siguiente tiempo de experimentación 48 h se presentaron MN con mayor presencia en el caso del tratado pero sin que esta diferencia fuera significativa. La evaluación realizada a las 72 h a pesar de que el tratado fue el que mayor presencia de MN tuvo durante esta evaluación en los tres tiempos de experimentación, no arrojó resultados estadísticamente significativos en la comparación en tratados Vs controles.

Al comparar los resultados de los MN encontrados para el cromosoma 9 con sus respectivos controles, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, a



pesar de que se podía observar una tendencia a la inducción de errores en la segregación de este cromosoma en función del tiempo de exposición.

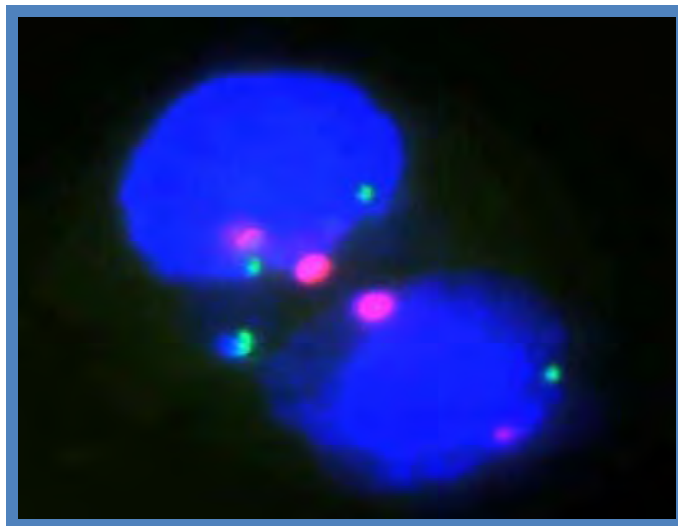
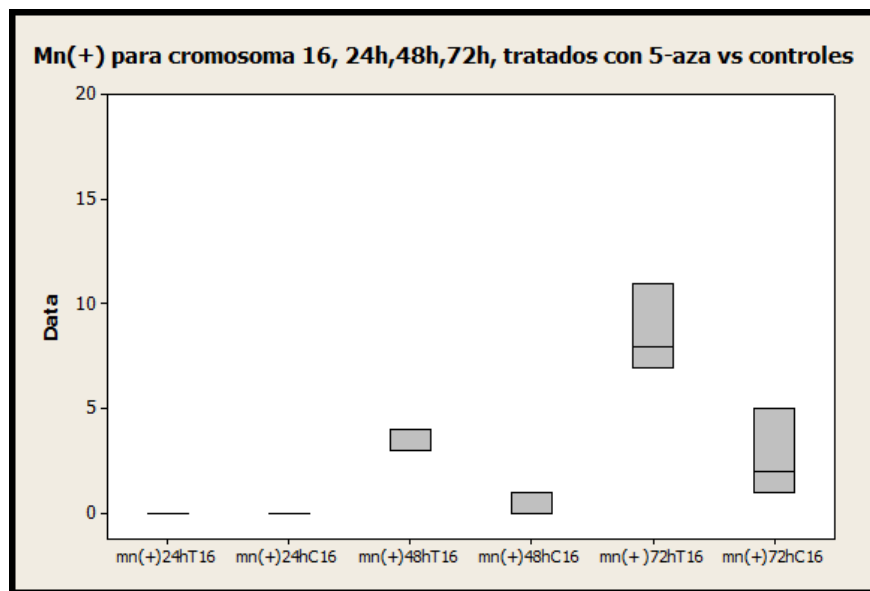


Fig. 23. MN positivos para la sonda dirigida al cromosoma 9 Célula BN con MN(+) para el cromosoma 9



Grafica 17 MN con señal (+) para cromosoma 16

Los MN encontrados en los diferentes ciclos de tratamiento y que los cuales involucraban el cromosoma 16, mostraron como resultado que en las primeras 24 h de experimentación. Prácticamente no hubo presencia de MN positivos para el cromosoma 16. En el siguiente ciclo a 48 h se encontro que las células tratadas presentaron una mayor presencia de MN positivos que su control, ésto se reflejó en la

diferencias significativas que dio como resultado una $p= 0.01$ y en las últimas 72 h también se registraron diferencias significativas con una $p= 0.024$ entre tratados Vs. controles.

Los resultados de MN positivos para el cromosoma 16 mostraron una tendencia muy similar a la encontrada en el cromosoma 1, en donde se incrementó la presencia de MN a partir del periodo de 48h de exposición al fármaco. Al comparar los resultados de los controles contra los tratados se notaron diferencias estadísticamente significativas a partir de las 48 h de tratamiento, igual que en el cromosoma 1.

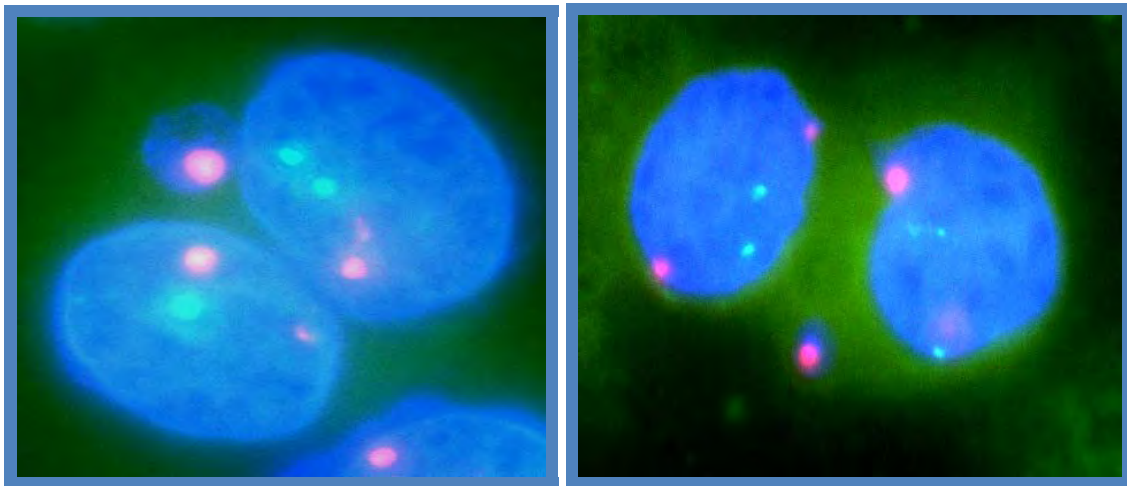
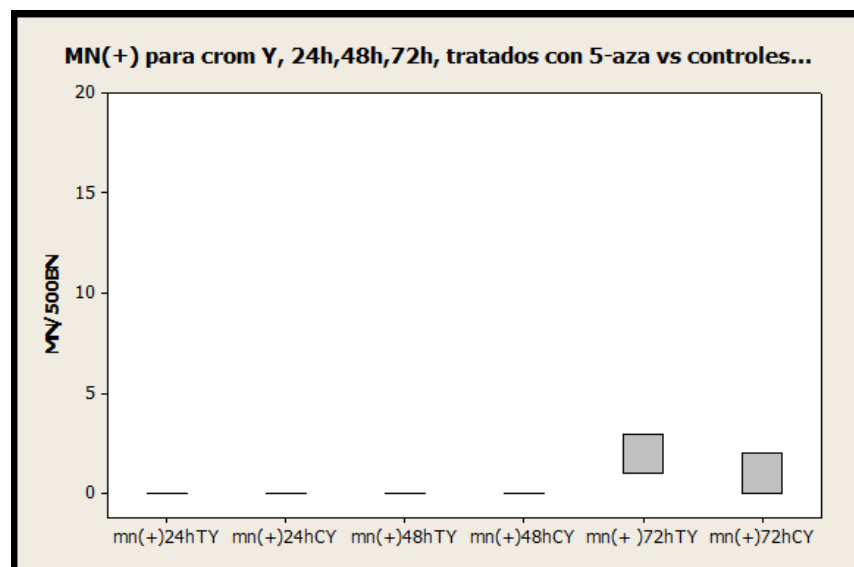


Fig 24. MN positivos para la sonda dirigida al cromosoma 16 Célula BN con MN(+) para el cromosoma 16



Gráfica 18. MN con señal(+) para cromosoma Y

El análisis realizado a los MN para el cromosoma Y, dieron como resultado que tanto en las 24 como a las 48 h de experimentación no se registraron mn positivos para cromosoma Y, mientras que en las 72 h de evaluación se registro presencia casi nula de MN y la comparación de los MN del tratado y del control en este tiempo nos dio como resultado diferencias no significativas.

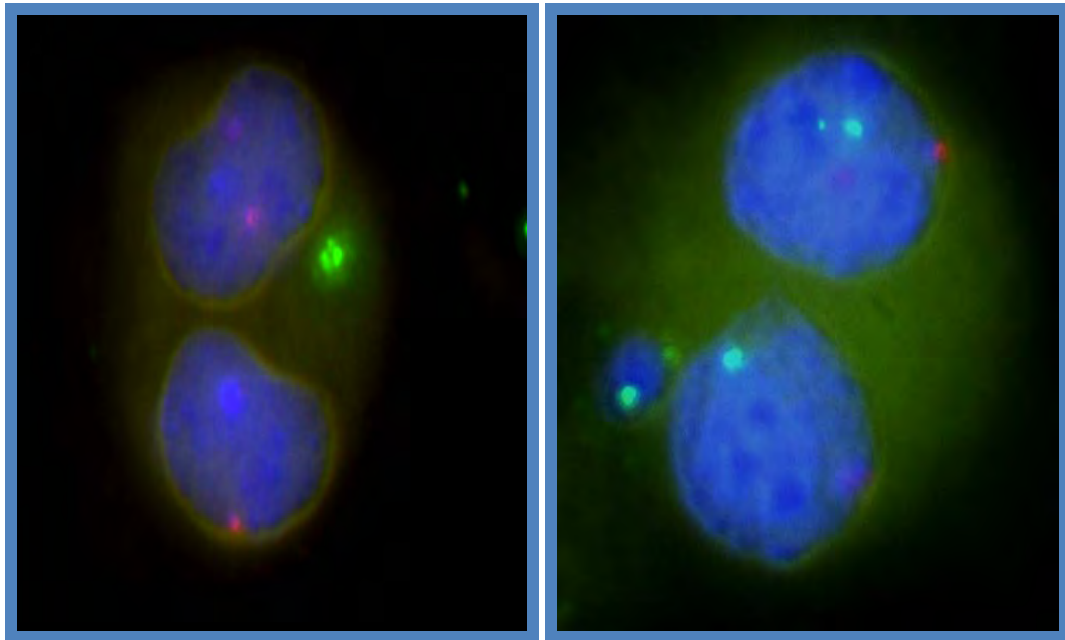


Fig. 25. MN positivos para la sonda dirigida al cromosoma Y, Célula BN con MN (+) para el cromosoma Y

De los cromosomas en estudio, los que se reflejaron con mayor presencia en MN inducidos con 5-azacitidina, fueron el cromosoma 1, seguidos por el cromosoma 16, subsecuentemente del cromosoma 9 y con menor frecuencia los MN positivos para el cromosoma Y. Los MN, tanto positivos como negativos, tuvieron su mayor presencia a las 72 horas de experimentación, tanto bajo tratamiento y en menor medida en los controles.

DISCUSIÓN

Se sabe que la metilación del DNA es muy importante en múltiples procesos celulares y su alteración está asociada a varias enfermedades humanas, como cáncer, ICF, enfermedades autoinmunes, etc. Por otro lado, también se conoce que algunas de estas enfermedades, se asocian a inestabilidad cromosómica, la cual es parte fundamental de la génesis y progresión de éstas, como en el caso de las células cancerosas.

En el presente trabajo, se pudieron caracterizar cinco patrones de metilación en metafase, las cuales dependieron del número de ciclos de síntesis del DNA y del tiempo de exposición al fármaco, en los cuales se vieron datos que sugerían una desmetilación paulatina relativa al tiempo de exposición al fármaco. En controles normales no cultivados, se observó metilación homogénea con acentuación a nivel de las regiones pericentroméricas, siendo la base de comparación para los posteriores periodos de experimentación. A 24h, basado en el patrón de metilación parcial, puntiforme en las cromátidas, deduciendo que ocurrió un primer ciclo de desmetilación durante esta primera síntesis de DNA. Un ciclo celular de los linfocitos en cultivo oscila entre 22 y 24 h [35]. Ya se ha reportado previamente que el mecanismo de acción de la 5-azacitidina es mediante la inhibición de las enzimas Dnmts -1 y -3a y por ende genera una desmetilación pasiva [64].

También se encontraron datos que sugerían desmetilación en los controles sobre todo luego de 72 h de experimentación (120 h de cultivo). Se sabe que las células primarias en cultivo, luego de varios pasajes, presentan desmetilación asociada al envejecimiento sin embargo las razones por las cuales ocurre se desconocen [65]. Igualmente se ha descrito que los mamíferos también muestran desmetilación global asociada al envejecimiento [6].

A las 48 h destaca un patrón compatible con dos ciclos de desmetilación, lo que generaría una cromátida metilada y la otra desmetilada. A las 72h, esperábamos una presencia importante de desmetilación total y fue sorprendente el hallazgo de



metafasas con cromosomas metilados y desmetilados, así como cromosomas incompletamente metilados y regiones de cromosomas hipermetiladas. Este hallazgo pudiese ser explicado por una respuesta celular a la desmetilación inducida por la sustancia, probablemente por alteraciones en la señalización o en la funcionalidad de alguna de las Dnmts. como lo han demostrado en líneas celulares tratadas con 5 azadC en donde se han visto alteraciones importante en las DNMT1 y 3B ocasionando graves alteraciones a los niveles de metilacion en el DNA. [67].

Uno de estos patrones resultó ser similar a otros reportados previamente en células expuestas a arsénico, sin embargo, los autores no pudieron explicar este a que se debía este patrón de metilación en metafase [4]. Basados en los hallazgos encontrados en nuestra demostración se puede inferir que este patrón puede ser secundario a la inducción de un primer ciclo de desmetilación ocasionada por el arsénico, el cual se sabe que puede interferir con el metabolismo de la S-adenosilmetionina [1,4]. Otros patrones de metilación similares a los observados en nuestro estudio en metafase han sido descritos para líneas celulares de leucemia [3].

En este trabajo se evaluaron también los efectos de la 5-azacitidina sobre las regiones pericentroméricas ricas en satélite 2 y 3. Se encontro una desmetilación gradual en función del tiempo y de exposición al fármaco.

Se ha mostrado desmetilación de estos satélites en diferentes patologías humanas, como el síndrome ICF, donde se sabe que ocurre una desmetilación de estas regiones relacionada con mutaciones en el gen de la Dnmt3b, la cual se sabe metila regiones ricas en CpG [9,12]. Otros estudios donde se ha evaluado la 5-aza y el efecto que tiene sobre la descondensación del centrómero, han dado como resultado una alta frecuencia de descondensación de estas regiones de cromosomas 1, 9 y 16 secundaria a desmetilación pericentromérica, así como descondensación de los brazos largos del cromosoma Y [56]. En cáncer de mama y en hepatocarcinoma, se han encontrado descondensación de las regiones pericentroméricas del cromosoma 1 asociado a desmetilación pericentromérica [12,16].

En general se considera que las causas de la aneuploidía son las alteraciones en la segregación y eventos de no-disyunción de cromátidas. Dada la importancia de la

aneuploidía en enfermedades humanas como el cáncer y en síndromes congénitos, como el síndrome de Down, Turner, Edwards, etc, Se decidió abordar la relación entre la exposición a un agente desmetilante y la generación de aneuploidías. Nos enfocarnos en los cromosomas que contienen en la región pericentromérica satélites 2 y 3, dados los resultados de los patrones de metilación y a que se han visto implicados en algunas de las patologías mencionadas previamente [12,16].

En los resultados se observó la generación de eventos de no disyunción en el cromosoma 1, en particular a las 48 y 72 h de exposición al fármaco. En los demás cromosomas de interés, no se presentaron diferencias significativas con los controles. Los hallazgos encontrados, particularmente en relación al cromosoma 1, ofrecen datos muy interesantes que pueden ser de gran ayuda para entender los procesos que conllevan a la generación de los eventos de no disyunción, sobre todo por que los estudios en este rubro son escasos. De los resultados obtenidos se podría inferir que están implicados mecanismos particulares en cada cromosoma que podrían estar siendo afectados y ocasionando una selectividad en cuanto a la generación de estos eventos asociados al agente desmetilante, como por ejemplo, la estructura o el tamaño de las regiones pericentroméricas de cada cromosoma etc.

El análisis de los errores en la segregación mostro que los cromosomas que contienen satélite 2 estuvieron implicados con mayor frecuencia en los micronúcleos generados por la sustancia desmetilante, comparado con sus controles y con los cromosomas que contenían el satélite 3. Por el contrario, el cromosoma Y, con heterocromatina metilada no pericentromérica, no estuvo implicado en los errores de segregación inducidos por 5-aza.

Se sabe que la hipometilación del satélite 2, ubicado en las regiones pericentroméricas (9, 50) puede inducir algún grado de descondensación del centrómero (9, 50) y hoy se sabe que dicha descondensación puede generar unión inadecuada de proteínas



involucradas en la segregación cromosómica, como la HP1 y Rad21, así como la pérdida de proteínas de unión al DNA metilado (MBDs, del inglés, methyl binding domain) y la hipometilación de regiones pericentroméricas se relaciona con la inducción de una reorganización importante de la heterocromatina pericentromérica (37). Dicha hipometilación ha sido observada en ICF, anteriormente mencionado, donde se presentan múltiples formas de inestabilidad cromosómica, como la formación de micronúcleos y otras aberraciones [9].

Por lo tanto, los resultados encontrados en este trabajo sugieren que la alteración de la metilación de estas regiones está implicada probablemente en la generación de aneuploidías, sin embargo, no actuaría como un mecanismo aislado, sino que otros factores podrían estar actuando en estas alteraciones, como por ejemplo, proteínas del punto de monitoreo de la mitosis, proteínas de ensamble del cinetocoro, entre otros.

Algunos Cuestionamientos que sería interesante abordar en futuras investigaciones. Como el profundizar en el estudio de las DNMTs en particular abordar el efecto que tienen fármacos desmetilantes sobre la DNMT3b e investigar puntualmente los efectos de su alteración en los procesos de inestabilidad cromosómica. Así como profundizar en las peculiaridades e interacciones que presentan cada uno de los satélites estudiados para entender la causa de la respuesta diferencial en función de su desmetilación.

REFERENCIAS

- 1; Ramirez T, Herrera L. S-adenosyl-L-methionine is able to reverse micronucleus formation induced by sodium arsenite and other cytoskeleton disrupting agents in cultured human cells. *Mutation Research* 2003; 528; 61-74
- 2; Rakesh S, Gordon D. DNA Methylation. *Blood*, 1999; 95; 4059-4070
- 3; Bensaada M, Kiefer H. et al Altered Patterns of DNA Methylation on Chromosomes from Leukemia Cell Lines: Identificación of 5-methylcytosine by indirect Immunodetección. *Cancer Genet Cytogenet* , 199; 8 103; 101-109
- 4; Sciandrello G, Caradonna F. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammal cell. *Carcinogenesis*, 2004; 25; 413-417
- 5; Habib M, Fares F. DNA Global Hypomethylation in EBV-Transformed Interphase Nuclei. *Experimental. Cell Research*, 1999; 249; 46–53
- 6; Robertson K. D. DNA methylation and chromatin unraveling the tangled web. *Oncogene*, 2002; 21; 5361 – 5379
- 7; Clark J, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* , 2002; 21; 5380 – 5387
- 8; Okoji S, Yu C. Sodium Arsenite Administration Via Drinking Water increases genome-wide and HA-ras DNA Hypomethylation in methyl deficient C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, 2002; 23; 777-785
- 9; Gisselsson D, Shao C. Interphase chromosomal abnormalities and mitotic missegregation of hypomethylated sequences in ICF syndrome cells. *Cromosoma*. 2005; 114; 118-126
- 10; Razin A, Cedar H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *PNAS* . 1977; 74: 2725–2728
- 11; Antequera F. Boyes, J. Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 1990; 62: 503-514
- 12; Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu.Rev.Pharmacol Toxicol*. 2005. 45: 629-56
- 13; Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21
- 14; Turker M. S. The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cells. *Semin Cancer Biol*, 1999; 9, 329-37



- 15; Fraga M. Ballestar E. *et al.* Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twings. *PNAS* 2005; 103; 10604-10609
- 16; Andrew P. Feinberg, Rolf Ohlsson, Steven Henikoff. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature*, 2006; 7; 21-33
- 17; Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem*, 2003; 278: 4035–40
- 18; Yoo C, B. Jones P, A. Epigenetic therapy of cancer Past, Present, and future. *Nature Reviews*, 2006; 5: 37-50
- 19; Capoa A. Di Leandro M. Computer Assisted Análisis of Methylation Status Of Individual Interphase Nuclei in human cultured cells. *Cytometry* 1998; 31: 85-92.
- 20; Hermanna A. Gowhera H. Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA Methyltransferases *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004; 61; 2571–2587
- 21; Kumar S, Cheng X., Klimasauskas S., Mi S., Posfai J., Roberts R. J. *et al.* The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, 1994; 22: 1–10
- 22; Bestor T H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 2000; 9: 2395-2402.
- 23; Turek-Plewa J. Pawel P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cellular & Molecular Biology letters*. 2005; 10: 631-647
- 24; Dodge E J, Masaki Okano, Fred Dick, *et al.* Inactivation of Dnmt3b in Mouse Embryonic Fibroblast, and Spontaneous Immortalization. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280; 17986-17991
- 25; Burgers A, Fuks F, Kouzarides T. DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends in Genetics*. 2002; 16; 275-277
- 26; Robertson K D, Uzvolgyi E, *et al.* The human DNA methyltransferases (DNMTS) 1,3a and 3b: coordinate the mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Research*, 1999; 27; 2291- 2298
- 27; Chen T, Tsujimoto N. The PWWP Domain of Dnmt3a and Dnmt3b is required for directing DNA methylation to the major Satellite Repeats at pericentric heterochromatin. *Molecular and Cellular Biology*. 2004; 24; 9048-9058.
- 28; Soejima K., Weizhao F, Rollins B. DNA methyltransferase 3b contributes to oncogenic transformation induced by SV40t antigen and activated Ras. *Oncogene*, 2003; 22; 4723–4733
- 29; Hoffmann, M. J. Schulz, W. A. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem. Cell Biol*. 2005; 83; 296–321.



- 30; Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for the novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-57.
- 31; Geiman M, Umesh T. Sankpal A. Robertson K, Yue Chen. *et al.* Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery. *Nucleic Acid Research* 2004; 32: 2716-2729.
- 32; Wolffe A P. Jones PL, Wade PA. DNA demethylation *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 5894-6
- 33; Mc Garvery K. M, Greene E. Silenced Tumor Suppressor Genes Reactivated by DNA Demethylation do not Return to fully. *Cancer Research* 200; 66; 3541-3548
- 34; Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Exp Rev Mol Med* 2002; 4; 1-17
- 35; Bruce Alberts, *et al.* (2002) *Molecular Biology of Cell* (4 edición) Garland Publishing.
- 36; P. Jeanteur (2005) *Epigenetics and chromatin* (36) Springer
- 37; Jiménez L. P, Merchant H. (2003) *Biología Celular y Molecular* (1 edición) Pearson Prentice Hall
- 38; William S. Klung, Michael R. Cumming, Charlotte A. Spencer (2006) *Genética* (8 edición) Pearson Prentice Hall
- 39; Lewin B. (2004) *Genes VIII* Pearson Prentice Hall.
- 40; O'Connell B. Khodjakov A. Cooperative mechanisms of mitotic spindle formation. *Journal of Cell Science*. 2007; 120; 1717-1722.
- 41; Avramova V. Z, Heterochromatin in animals and plants similarities and differences. *Plant Physiology* 2002; 129, 40-49
- 42; Haaf T, Schmid M. Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes. *Cytogenetics and cell Genetics*.. 2000; 91, 113-123
- 43; Vos J, Famulski K. J, and Gordon K. T. Chen. How to build a centromere: from centromeric and pericentromeric chromatin to kinetochore assembly. *Biochem, Cell Biol.* 2006; 84, 619-639
- 44; Jeanpierre M. Human satellite 2 and 3. *Ann. Genet.* 1994; 37; 162-171.



- 45; McManus J. K. Biron L. V, *et al.* Dynamic changes in Histone H3 Lysine 9 Methylations Identification of mitosis specific function for dynamic methylation in chromosome congression an segregation. *Journal Biology Chemistry* 2006;281; 8888-8897.
- 46; Tsuda H, Takarabe T, Kanai Y, Fukutomi T, Hirohashi S. Correlation of DNA Hypomethylation at Pericentromeric Heterochromatin Regions of Chromosomes 16 and 1 with Histological Features and Chromosomal Abnormalities of Human Breast Carcinomas. *American Journal of Pathology*, 2002: 161:859-866.
- 47; Ramsahoye H. B, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V. Bird P. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a, *PNAS*, 2000; 10; 5237–5242
- 48; Seoane1 A. Dulout F. inducción de aneuploidia por metales pesados: su evaluación a través de técnicas citogenéticas en células de mamíferos. *Analecta Veterinaria* 1999; 19; 30-39
- 49; Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and Cancer. *Nature*, 2004; 432; 338-341
- 50; Suzuki T, Fujii M, Dai A. Demethylation of classical satellite 2 and 3 DNA with chromosomal instability in senescent human fibroblasts. *Experimental Gerontology*, 2002; 37; 1005–1014
- 51; GIsselson D. Shao C, *et al.* Interphase chromosomal abnormalities and mitotic missegregation of hypomethylated sequences in ICF syndrome cells. *Chromosoma*. 2005; 114; 118-126.
- 52; Wong N, Lam W-C, Lai PB-S, Pang E, Lau W-Y, Johnson PL: Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with DNA Hypomethylation in Breast Cancer. *AJP September* 2002; 161
- 53; Cimini D.C. Degrassi F. T. Effects of 5-azacytidine on the centromeric región of human fibroblast studied by CREST staining an in in situ Hybridization on cytokinesis- blocked cells. *Cytogenetics and cell Genetics*. 1996; 72; 219 -224
- 54 ; Schmid M. Haaf T, Grunert D. 5-azacitidine- induced undercondensations in human chromosomes. *Human Genetics* 1984; 67; 257-263.
- 55; Sataoh T. K. Yamamoto. K. F, Miura T. Región- specific chromatin decondensation and micronúcleos formation induced by 5-azacitidine in human TIG-7 cells. *Cytogenetic and. Genome Research*. 2004; 104; 289-294
- 56; Guttenbach M. Michael Schmid. Exclusion of Specific human chromosome into micronuclei by 5- azacytidine treatment of lymphocyte cultures. *Experimental Cell Research* 1994; 211;.127-132.



- 57; Grundy G, Narayan A, Ehrlich M. Frequent hypomethylation in Wilms' tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 109: 34–39
- 58; Hernández R. Frady A. *et al* preferential induction of chromosome 1 multibranching figures and whole –arm deletion in a human pro-B cell line treated with 5- azacytidine or 5- azadeoxycytidine. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1997; 76; 196-201
- 59; Vendela C. Parrow P. A, Gautvik K. 5-Azacytidine-induced alterations in the GH12C1 cells: effects on cellular morphology, chromosome structure, DNA and protein synthesis. *Journal of Cell Science*. 1989; 93; 533-543.
- 60; Broday L. Yong – Woo L. Max C. 5-Azacytidine Induces Transgene Silencing by DNA Methylation in Chinese Hamster Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 1999; 19; ;3198-3204
- 61; Christman K. J. 5-azacytidine and 5aza-2-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation mechanistic and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2002; 21; 5483-5495
- 62; Mund C, Hackson B, Streseman C, Lubbert M, Lyko F. Characterization of a DNA Demethylation effects induced by 5-Aza-2 Deoxycytidine in patients with Myelo dysplastic Syndrome. *Cancer Research*, 2005; 16 ;7086-7090.
- 63; Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *An. Sist. Sanit. Navar*. 2005; 28; 227-236.
- 64; Schneider S. R, Diab A. M, Rohrbeck A, Foltzer J. C, Boltze C, Hartig R, Schönfeld P, Roessner A, Gali-Muhtasib H. 5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312; 525-36
- 65; Chu W M, Siegmund D. K, Eckstam L. C, Yeon J. K, Yang S. A, Kanel C. G, Tavaré S. Shibata D. Lack of increases in methylation at three CpG-rich genomic loci in non-mitotic adult tissues during aging. *BMC Med Genet*. 2007; 8:1-10
- 66; Barbot W, Dupressoir A, Lazar V, Heidmann T. Epigenetic regulation of an IAP retrotransposon in the aging mouse: progressive demethylation and de-silencing of the element by its repetitive induction. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30: 2365–2373
- 67; Stela S. Pali, B. O. Emburgh V. Umesh T. Sankpal K. D, Robertson. K. D. DNA Methylation Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidine Induces Reversible Genome-Wide DNA Damage That Is Distinctly Influenced by DNA Methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol*. 2008; 28: 752–771



ABREVIATURAS

DNMT's: DNA metiltransferasas

DNA: Acido desoxiribonucleico

RNA: Acido ribonucleico

5mC: 5metilcitosina

HAT: Histonas-acetiltransferasas

HDAC: Histonas deacetilasas

ICF: Inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anormalidades faciales

MBD: del *ingles methyl binding domain*, Proteínas con un sitio de unión a citosina metilada

CENP: Proteína centromérica

KCl: Cloruro de Potasio

PCNA (Antígeno nuclear de proliferación celular)

PBS: del *ingles Phosphate Buffered saline*, bufer salino de fosfatos

SSC: del *inglés saline sodium citrate*, citrato de sodio salino

NaCl: Cloruro de Sodio

SBF: Suero Fetal Bovino

MN: Micronucleo



ABREVIATURAS DE MEDIDAS

Kb: kilobase

KDa: kilodaltones

nm: Nanometro

rpm: Revoluciones por minuto

min: Minutos

μM: Micromolar

h: Horas

mg/ml: Miligramos por mililitro

Cm: Centímetros

°C: Grados centígrados

ml: Mililitros

μl: Microlitros

Å: Amstrongs

W: Watt

