



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Estudio de la naturaleza de las gemaciones
de cromatina producidas en respuesta a una
agresión química

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Antonio Tezozomoc Araujo Soto

DIRECTORA DE TESIS: DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA

MÉXICO, D.F

MAYO, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

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.

Estás a mi lado cuando llueve en mí,
cuando quiero sol...
Te espero a mi lado,
porque yo sin ti ¿qué sería yo?

(Cuando quiero sol, Presuntos Implicados)

Espero que el tiempo ahora no borre
a esta gente que tanto amo
porque sin ustedes no valgo nada
su alma es mi alimento.

(Aún sigo cantando, Enanitos verdes)

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por la oportunidad de continuar con mi formación profesional. Gracias a su infraestructura académica y administrativa que me han permitido cumplir con este objetivo.

También agradezco su apoyo para asistir al trigésimo noveno congreso anual de la “Environmental Mutagen Society”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento concedido durante mis estudios de maestría (proyecto 202578).

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el cual se realizó el presente trabajo y al que agradezco todos sus recursos.

A mi Tutora

Dra. Regina D. Montero Montoya por la dirección del presente trabajo y su guía en mi formación profesional; por la libertad y confianza, así como las correcciones y los consejos. Gracias por aceptarme en su laboratorio y su apoyo a lo largo de todo este tiempo.

Al Comité Tutorial

Dr. Rafael Camacho Carranza por toda su ayuda y consejos durante la realización de los experimentos, las observaciones durante los tutorales y al resultado final. Gracias por todo lo que logré aprender y ser un impulso para mejorar.

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz por aceptar ser parte de este trabajo, por sus observaciones y señalamientos - muy oportunos - durante la realización del proyecto y al resultado final.

A los miembros del Jurado de Grado.

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dra. Sara Frías Vázquez

Dra. Regina D. Montero Montoya

M. en I.B.B. Clementina Castro Hernández

Dr. Rafael Camacho Carranza

Gracias por todas sus observaciones al presente trabajo, que sin duda ayudaron a mejorarlo y a tener una perspectiva más clara del mismo.

Al M.V.Z. Luis Serrano García por su ayuda técnica en los cultivos de linfocitos y durante la evaluación de genotoxicidad.

A las M. en C. Beatriz Andrea Zamora Silva y Flor M. Martínez Romero por su ayuda para la toma de fotografías.

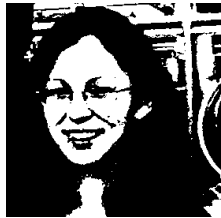
Al M. en C. Jesús Guillermo Jiménez Cortés por su ayuda en la parte estadística.

A la Dra. Patricia Ramírez Noguera por su ayuda en la técnica de FISH.

A M. en C. Sandra L. Hernández Ojeda por toda la ayuda que me brindó durante la tesis.

Al Dr. Omar Arellano Aguilar por la revisión y sugerencias a este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio por su ayuda y el hacerme tan agradable el trabajo. Especialmente a Luis, Víctor y Javier que durante un buen tiempo sólo ellos me soportaron, a Paloma, Gustavo, Karen, Betzabe, Diego, Fernanda, Dulce, Helena, y Eunice, Omar, Abraham y Paulina. Que el laboratorio siga siendo el excelente lugar que es y que ustedes y los que me faltan logren todas sus metas.



Gracias y mis mejores deseos siempre.

Finalmente quiero agradecer a la Sra. Delfina, así como a todas las personas que conocí durante este tiempo en el IIB y que de una u otra forma me ayudaron.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Breve historia de la toxicología genética humana	3
1.2. Midiendo el daño al DNA	4
1.3. La prueba de micronúcleos	7
1.3.1. Formación de micronúcleos	8
1.4. Gemaciones de cromatina	10
1.5. Amplificación génica	11
1.5.1. El caso de la dihidrofolato-reductasa (DHFR)	14
2. Planteamiento del problema	15
Hipótesis	15
Objetivos	15
3. Material y Método	16
3.1. Prueba de Micronúcleos	16
3.1.1. Cultivos de sangre y tratamientos con metotrexate	16
3.1.2. Evaluación de genotoxicidad: gemaciones de cromatina, micronúcleos y puentes nucleoplásmicos	16
3.1.3. Índice de marcaje	17
3.1.4. Análisis estadístico	17
3.2. Sonda de Hibridación	17
3.2.1. Extracción de DNA	17
3.2.2. Amplificación de los genes dihidrofolato reductasa (DHFR) y cadherina 12 (CDH12) PCR	17
3.2.3. Secuenciación	19
3.2.4. Marcaje de secuencias con digoxigenina (DIG-11-dUTP) por random priming (preparación de sondas)	19
3.3. Hibridación Fluorescente <i>in situ</i>	20
3.3.1. Genes DHFR y CDH12	20
3.3.2. Secuencias satélite	20
3.4. Dot blot	21
3.4.1. Análisis	22
4. Resultados	23
4.1. Daño genotóxico	23
4.2. Amplificación de dihidrofolato-reductasa (DHFR) y cadherina-12 (CDH12)	26

4.3. Hibridación Fluorescente <i>in situ</i>	26
4.4 Dot blot	28
5. Discusión	30
6. Conclusiones	36
7. Referencias	37
Complemento A: Frecuencia de GC y MN en cultivos sin BrdU	44
Complemento B: Electroferogramas	45
Complemento C: Método FISH	47

Estudio de la naturaleza de las gemaciones de cromatina producidas en respuesta a una agresión química

Resumen

La amplificación genética implica la síntesis múltiple de ciertas secuencias específicas del genoma. Este fenómeno ha sido observado en células cancerosas con múltiples copias de oncogenes como *c-myc* y en líneas celulares resistentes a sustancias antineoplásicas como el metotrexato (MTX). Recientemente se propuso que la amplificación genética podría ser el origen de estructuras como las gemaciones de cromatina (GC), las cuales son biomarcadores de daño genotóxico observadas en la prueba de micronúcleos (MN), tanto en linfocitos tratados *in vitro* como en individuos ocupacional o ambientalmente expuesta a agentes genotóxicos. Para probar si las GC están constituidas por la amplificación genética de algún gen, cultivos de sangre entera fueron tratados con cinco diferentes concentraciones de MTX (0.01 mM-2.5 mM) por 24 horas. Las GC y MN se evaluaron con el método de incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en los cultivos, y un incremento con respecto a la dosis fue encontrado en ambos parámetros. Simultáneamente se realizaron cultivos sin BrdU para evaluar la amplificación del gen dihidrofolato reductasa (DHFR); las técnicas de FISH y dot blot se emplearon con una sonda de 231 pb que abarcaba parte del intrón y exón 5 de DHFR, que se obtuvo por PCR y posteriormente se marcó con digoxigenina por random-priming. No se encontró evidencia de amplificación en las condiciones de cultivo utilizadas (72 horas de incubación con 24 horas de exposición); sin embargo, sí se observó la formación de GC, MN en una mayor frecuencia y otros eventos genotóxicos como puentes nucleoplásmicos (PN). Este daño puede ser producto de un efecto clastogénico por parte del MTX, lo cual es apoyado por la baja frecuencia de secuencias centroméricas en GC y MN encontradas mediante FISH. No obstante, no se descarta la posibilidad de que en posteriores ciclos de replicación en presencia del MTX, las células puedan experimentar la amplificación del gen DHFR, lo que debe ser motivo de nuevos estudios.

Palabras clave: gemaciones de cromatina, micronúcleos, amplificación genética, dihidrofolato reductasa, metotrexato, genotoxicidad.

Study of the nature of the chromatin budding produced in response to a chemical attack

Abstract

Gene amplification implies multiple synthesis of specific sequences of the genome. It has been observed in cancer cells with numerous copies of oncogenes like c-myc and cultured cell lines that resist the action of antineoplastic drugs like Methotrexate (MTX). It was recently proposed that gene amplification could be the origin of structures like the Chromatin buds (CHB) observed in the human lymphocyte Micronucleus test (ly-MN). CHB are formed when lymphocytes are treated *in vitro* and had been observed in *in vivo* studies of people exposed to genotoxic agents. To test the hypothesis that CHB are constituted by gene amplifications, whole blood cultures were set-up and treated with MTX at five concentrations of MTX (0.01-2.5 mM) for 24 hours. MN and CHB were evaluated according to the method of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation; an increase with the dose was found for both parameters. Simultaneous cultures without BrdU were used to look for the amplification of the gene dihydrofolate reductase (*DHFR*); FISH and dot blot were used to assess whether this gene was amplified using a probe of 231 bp corresponding to intron 5 and exon 5, obtained by PCR and labeled with digoxigenin by random priming. No evidence of amplification in the culture conditions used was found (72 hours of incubation with 24 hours of exposure), but CHB, MN and other events like nucleoplasmic bridges were observed, which could be the product of a clastogenic effect by MTX. This is supported by the low frequency of centromeric sequences found in CHB and MN by FISH. However, the possibility that in subsequent cycles of replication in the presence of MTX, cells may suffer DHFR gene amplification, which should be the subject of further studies.

Key words: Chromatin buds, micronucleus, gene amplification, dihydrofolate reductase, methotrexate, genotoxicity.

1. Introducción

1.1. Breve historia de la toxicología genética humana

La toxicología genética se podría definir como el estudio de la forma en que agentes químicos, físicos y biológicos afectan el material hereditario. La probabilidad de que un agente cause algún tipo de daño genético dependerá de distintas variables, como el tipo y nivel de exposición, la distribución y retención de éste una vez que ha penetrado en el cuerpo, la eficacia en la activación y/o en la desintoxicación en los tejidos diana y la capacidad del agente o sus derivados (metabolitos) de provocar daño. Si el daño se presenta, la probabilidad de que se promueva alguna enfermedad dependerá de su naturaleza y de la respuesta que tenga la célula para reparar o expresar cualquier alteración que se haya inducido [1].

El desarrollo de esta disciplina implicó tiempo y la aportación de un gran número de personas hasta el día de hoy. El primer paso en esta historia fueron los trabajos realizados por Herman Müller en 1927, quien demostró que los rayos X causaban alteraciones genéticas en *Drosophila melanogaster*, y un año después, Lewis Stadler observó el efecto mutagénico de los rayos X y el radio sobre la cebada. Otros sucesos importantes ocurrieron en los años 40, cuando Charlotte Auerbach y James M. Robson señalaron los efectos mutagénicos del gas mostaza, estudios publicados hasta 1946 una vez concluida la Segunda Guerra Mundial. En la misma década, D.G. Catcheside y D.E. Lea observaron una baja frecuencia de alteraciones cromosómicas (AC) en *Tradescantia* con radiación de baja energía, lo cual mostraba una relación entre el tipo de radiación y la frecuencia de AC producidas [2].

En las siguientes décadas se suscitaron varios descubrimientos de gran impacto en la toxicología genética, estos suelen relacionarse más al desarrollo de la citogenética humana, pero como señala García-Sagredo: “hay un claro paralelismo entre estas dos disciplinas” [2], por lo que no pueden dejar de mencionarse y más aún, porque permitieron realizar estudios de genotoxicidad en humanos.

Los cromosomas habían sido ilustrados por Walter Flemming desde 1882 y reconocidos como cromosomas en 1888 por Heinrich von Waldeyer. Sin embargo, el “gran evento” señalado como el iniciador de la citogenética humana moderna –con justa razón- ocurrió en 1956, cuando Joe Tjio y Albert Levan dieron a conocer el número exacto de cromosomas en humanos que es $2n=46$ [3].

Dos hechos previos a la publicación de Tjio y Levan fueron importantes en el estudio de los cromosomas. El primero ocurrió en 1952, cuando Tao-Chiuh Hsu describió que las células que habían permanecido por varios minutos en una solución hipotónica antes de ser fijadas, tenían una mejor separación de los cromosomas. La segunda modificación fue el uso de la colchicina en cultivos celulares, sustancia que afecta la polimerización de los microtúbulos y permite detener a los cromosomas en metafase, en la cual los cromosomas se pueden ver mejor individualmente. La

combinación de estos procedimientos permitió a Tjio y Levan llegar sin equivocaciones al número de 46 cromosomas en células de embriones bajo cultivo [3-5].

En aquel mismo año de 1956, los resultados de Tjio y Levan fueron confirmados por Charles Ford y John Hamerton y con ello, quedó atrás la propuesta hecha por Theophilus Painter en 1921, la cual señalaba un total de 48 cromosomas y que prevaleció durante tres décadas. Cabe mencionar que este trabajo sustituyó a su vez a otros que reportaban un número de 24 cromosomas, así como diferencias entre hombres (47) y mujeres (48) o entre caucásicos y personas de color [5]. Por otro lado, se iniciaba una nueva etapa en el estudio de las alteraciones genéticas humanas.

En los siguientes años varias AC fueron reportadas; tan sólo en 1959 se describieron los síndromes de Down (trisomía 21), Turner (X0) y Klinefelter (XXY), y un año después, se reportó la asociación entre leucemia mieloide crónica y una aberración estructural conocida como cromosoma Filadelfia [6]. Al mismo tiempo se publicaron estudios de AC en humanos expuestos a rayos X por terapia (1960), aberraciones por mostaza nitrogenada (1961), por virus (1961), en pacientes tratados con citostáticos (1962) y al final de la década (1968), estudios citogenéticos en sobrevivientes de Hiroshima y Nagasaki, es decir, por una irradiación masiva. [2].

Durante los años 60 no sólo se describió el efecto de diversos agentes sobre el material hereditario, también fue una época de aportaciones en el estudio de los cromosomas. Una de estas contribuciones fue realizada por Peter Nowell en 1960, cuando descubrió que la fitohemaglutinina, una proteína obtenida de *Phaseolus vulgaris* (frijol rojo), estimulaba la división de leucocitos en cultivo. Otra gran aportación fue la introducción del bandedo de cromosomas, técnica implementada en 1968 por el grupo de Torbjorn Caspersson's, y con lo cual se pudo distinguir entre un cromosoma y otro [3,5].

Hoy en día la toxicología genética en humanos se ha beneficiado por el desarrollo en el cultivo de células, así como de los avances en biología molecular. Esto último mediante el empleo de nuevas técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación fluorescente in situ (FISH) o los microarreglos. No obstante este desarrollo producido en las últimas tres décadas, los descubrimientos realizados en los años 50 y 60 siguen siendo necesarios en el estudio de las alteraciones cromosómicas. Lo importante de esto, es que ahora podemos estudiar mejor el daño ocasionado por un agente, el origen de ese daño y sus consecuencias; además, podemos aprovechar más el uso de biomarcadores citogenéticos como los micronúcleos, las aberraciones cromosómicas u otros. Finalmente, cabe decir que la toxicología genética es hoy una parte importante de la evaluación de riesgo, y en los últimos tiempos ha cobrado más importancia como instrumento para predecir de manera fiable la actividad carcinógena [1].

1.2. Midiendo el daño al DNA

¿Por qué estudiar el daño al DNA? El valor de los estudios de genotoxicidad radica en la importancia de la molécula, que es la unidad fundamental de herencia, reproducción y

Tabla 1.1. Biomarcadores de daño al DNA

Ensayo de micronúcleos
Aberraciones cromosómicas
Intercambio de cromátidas hermanas
Electroforesis en gel de células individuales (SCGE) o ensayo cometa
Sitios apurínicos
Aductos
Oxidación del DNA
Metilación del DNA
Ensayos de mutación génica: Ames, hipoxantina-guanosina fosforribosil transferasa (HPRT)
Mutaciones en DNA mitocondrial
Daño al DNA en células germinales

Modificado de Ref. 17.

diferenciación por lo que cualquier alteración en su estructura o función puede tener efectos a nivel individual e incluso poblacional [7-9]. En términos generales, las consecuencias dependerán de la célula que se afecte, es decir, si la célula es somática o germinal. Si el daño ocurre en una célula somática, los efectos no se perpetuarán más allá del individuo afectado, y las consecuencias podrían ser trastornos en el metabolismo o el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Si la célula afectada es germinal, el daño puede tener un efecto tanto para el individuo como para su descendencia, lo que puede traducirse en infertilidad o cáncer en el individuo afectado, o el desarrollo de enfermedades hereditarias en su descendencia [10].

Por lo anterior, en las últimas tres décadas se ha incrementado la conciencia con respecto al impacto de actividades asociadas con la agricultura, industria y comercio sobre la salud humana y, considerando que muchos agentes ambientales y productos químicos de uso común pueden causar daño al DNA, es que se han establecido procedimientos para evaluar el daño genético que puedan ocasionar (Tabla 1.1.) [10]. Si bien el tipo y número de ensayos que se utilizan están en constante cambio, los más frecuentes son los siguientes: 1) mutaciones genéticas en bacterias o células de mamíferos en cultivo, 2) alteraciones cromosómicas en células de mamíferos en cultivo o en modelos animales. La elección de estos ensayos se debe en parte, a numerosos estudios en los cuales se ha observado la presencia de mutaciones puntuales o AC en células cancerosas, por lo que su empleo es para predecir la potencial carcinogenicidad de un agente (Figura 1.1.) [1,7,11].

Con respecto a la evaluación de AC en células de mamíferos en cultivo, los ensayos más aceptados actualmente por los organismos de regulación son las aberraciones cromosómicas y los micronúcleos [1]. Estos marcadores de daño entre otros suelen ser conocidos como biomarcadores citogenéticos o de efecto temprano [12], ya que indican la producción de un daño en el organismo que puede ser generalmente: rompimientos tipo cromátida, rompimientos cromosómicos o la pérdida de cromosomas completos [13] y podrían indicar el proceso de un

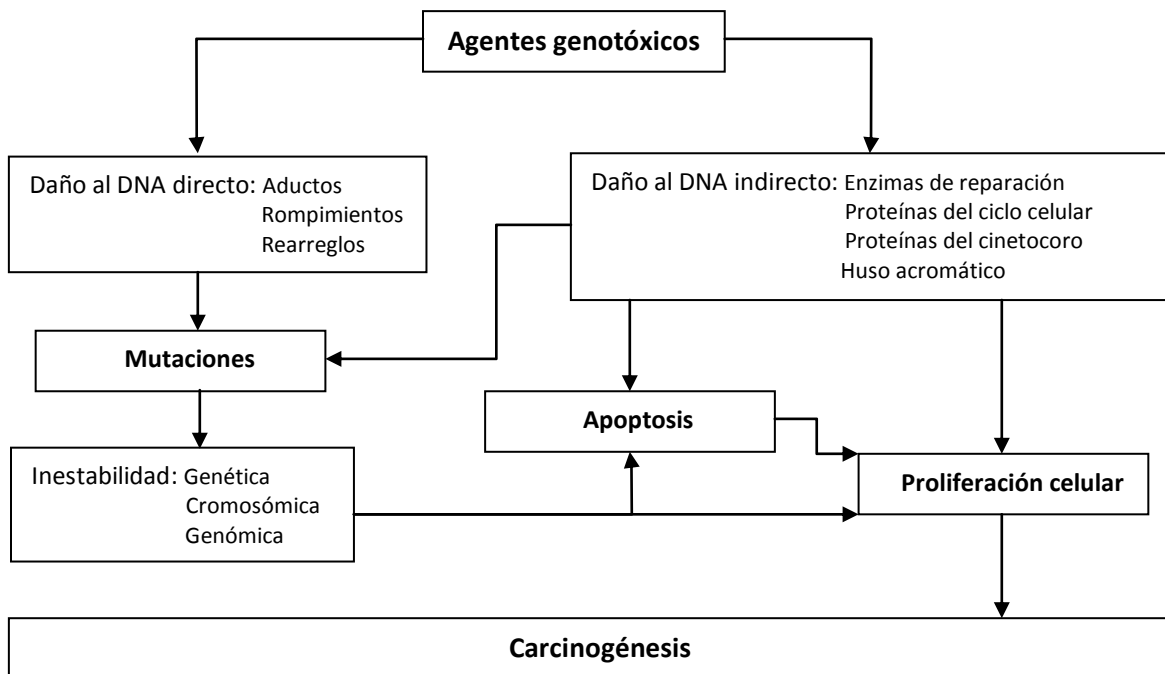


Figura 1.1. Mecanismos de acción de compuestos genotóxicos y el desarrollo de procesos carcinogénicos (Modificado de Ref. 13).

proceso carcinogénico. De hecho, se ha validado el papel de estos biomarcadores como indicadores de riesgo a desarrollar cáncer, mediante la colaboración y análisis de estudios realizados en poblaciones de diferentes países [14,15]. En epidemiología molecular, estos biomarcadores son ampliamente usados para estudiar genotoxicidad por exposición ambiental u ocupacional en poblaciones humanas, debido a su sensibilidad para detectar compuestos genotóxicos [13,16].

En relación a su uso, el ensayo de AC fue el primero en ser utilizado; sin embargo, la prueba de MN presenta algunas ventajas como son: 1) la posibilidad de estimar un índice de división nuclear y eventos de muerte celular como apoptosis, lo cual permite también evaluar los efectos de algún agente sobre la capacidad de proliferación de las células y su citotoxicidad; 2) La evaluación de MN tiene más poder estadístico, debido a la posibilidad y facilidad de evaluar un mayor número de células; 3) Para la evaluación de AC se requiere de una considerable formación y experiencia, lo que hace que sea un procedimiento costoso en tiempo. Por lo anterior, es que la prueba de MN ha llegado a ser más popular que las AC [1, 13,16].

1.3. La prueba de micronúcleos

Los micronúcleos son cuerpos suspendidos en el citoplasma formados de material genético, material que no ha sido incorporado al núcleo de las células hijas durante la división celular, por lo que se consideran un reflejo de daño por pérdida de material genético. Los MN pueden

presentarse de manera espontánea o en mayor frecuencia por la exposición a compuestos genotóxicos. La frecuencia espontánea o basal de MN corresponde al número de MN en individuos “no expuestos”, lo cual no debe ser tomado en un sentido estricto, puesto que no se puede hablar en realidad de tal condición, además, esta frecuencia basal puede diferir considerablemente dependiendo del sistema elegido para estudiarlos [18,19]. Por otro lado, existen varios factores que pueden influir o modificar el número de MN presentes en una célula, como son: la edad, el género, el estado de nutrición, ciertos hábitos y el genotipo de cada individuo [12,20-23].

Los MN se han observado desde hace muchos años y entre los primeros en describirlos se puede mencionar a W.H. Howell en 1891 y J. Jolly en 1907. Ambos detallaron la presencia de pequeñas estructuras que se teñían como el núcleo celular en el citoplasma de eritrocitos, estructuras nombradas como “fragmentos de material nuclear” y “corpúsculos intraglobulares” por Howell y Jolly respectivamente, y que hoy en día son conocidas como cuerpos de Howell-Jolly por los hematólogos [18]. Posteriormente, estructuras similares fueron descritas por J.M. Thoday en 1951, mientras estudiaba el efecto de los rayos X y las partículas α en células de *Vicia Faba*; fue él quien denominó a estos cuerpos “fragmentos nucleares” o “micronúcleos”, los cuales siguieron apareciendo en estudios de células expuestas a radiación. En 1959, John Evans y colaboradores, fueron los primeros en utilizar la frecuencia de MN como una “medida” de daño por radiación, y para 1971 y 1973, Boller Matter y Werner Schmid, así como John A. Heddle respectivamente, reportaron de manera independiente la inducción de MN *in vivo* en médula ósea de mamíferos, proporcionando así, un método para evaluar el daño al material genético en animales [24-26].

En la actualidad la prueba de MN puede realizarse en varios sistemas, entre los que se encuentran plantas del género *Tradescantia*, el haba (*Vicia faba*) e incluso la cebolla (*Allium cepa*) [27-29]; en eritrocitos de animales como el ratón (*Mus musculus*) y varias especies de peces (*Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* y *Cyprinus carpio*) [30-31], así como en células de mamíferos en cultivo (células de hámster chino o CHO, células tumorales, hepatocitos, fibroblastos) [18]. En humanos la evaluación puede ser hecha en células exfoliadas de epitelios como el bucal, nasal, de vejiga y células del cérvix, además de linfocitos; estos últimos se cultivan *in vitro* con fitohemaglutinina para estimular su división y con 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) o citocalacina-B para reconocer a las células que han proliferado, ya que es en estas células en las cuales se evalúan los MN [32-35].

El empleo de células sanguíneas fue propuesto por Paul Countryman y John Heddle en 1976 [36], y su rápida aceptación se debió a que es una fuente de fácil acceso y a que se distribuyen por todo el cuerpo, por esta razón, es que se consideró que podrían representar un sistema de exposición sistémico, es decir, que podrían reflejar lo ocurrido en algún tejido blanco, lo cual ha sido demostrado en estudios en los que se ha relacionado el riesgo de cáncer con los niveles de daño cromosómico en linfocitos de sangre periférica [14,15]. Otra ventaja es la posibilidad de evaluar el daño genético debido a una exposición crónica, ya que cierta fracción de linfocitos presenta un tiempo de vida largo, lo que asociado a la pérdida de proliferación de estas células

puede resultar en una acumulación de daño en poblaciones ocupacional o ambientalmente expuestas [12,18].

1.3.1. Formación de micronúcleos

Desde las primeras observaciones de micronúcleos hechas por Howell, la explicación dada para su formación consistió en que estos eran fragmentos del núcleo que se habían separado. Hoy en día se acepta que los MN corresponden a fragmentos de material genético sin centrómero o cromosomas completos que han quedado fuera del núcleo al concluir la división celular (Figura 1.2.). Los fragmentos acéntricos pueden originarse por el rompimiento directo o indirecto del DNA, mientras que la pérdida de cromosomas puede ser producto de alteraciones durante el proceso de segregación de los cromosomas. Si ocurre un rompimiento éste puede ser de las dos hebras del DNA o de una sola, si es solo de una, éste puede convertirse en un rompimiento de doble cadena después de la replicación del DNA o por una mala reparación. Por otro lado, la pérdida de cromosomas completos puede ocurrir por defectos en el DNA centromérico, un daño a las proteínas del cinetocoro o un enlace inadecuado con los microtúbulos, así como por la despolimerización de la tubulina [13,37]. En cualquier caso se debe tener en cuenta que la célula requiere entrar en división para observar el daño.

En un principio la evidencia sobre el contenido de los MN se debía a la tinción que presentaban al usar colorantes como el Giemsa, el cual tiñe de color oscuro al material nuclear, coloración que era la misma que mostraban los MN. Sin embargo, en la actualidad y mediante el uso de anticuerpos contra el cinetocoro o al empleo de secuencias específicas del genoma, se ha podido no sólo conocer el contenido de los MN, es decir, la detección de cromosomas específicos, sino que además se puede obtener información del mecanismo de genotoxicidad, distinguiendo entre un daño clastogénico (fragmentos de cromosomas) y un daño aneugénico (pérdida o ganancia de cromosomas) [38-40].

1.4. Gemaciones de cromatina

Como se ha mencionado, la prueba de micronúcleos permite evaluar la pérdida de material genético en forma de fragmentos o de cromosomas completos en células en interfase; sin embargo y a diferencia de hace algunos años, hoy en día la prueba se ha convertido en un ensayo más completo en que se puede analizar la inestabilidad “celular”, ya que también se evalúan otros eventos como los puentes nucleoplásmicos formados por cromosomas dicéntricos, la muerte celular por apoptosis y las gemaciones de cromatina (Figura 1.3.).

Las GC, gemaciones nucleares o “broken eggs” son cuerpos de forma esférica que permanecen unidos al núcleo celular. Estas estructuras han sido observadas durante mucho tiempo y en varios tipos celulares como células CHO, células exfoliadas de epitelios y linfocitos, y a pesar de esto, durante muchos años no fueron propiamente cuantificadas como un daño, puesto que no

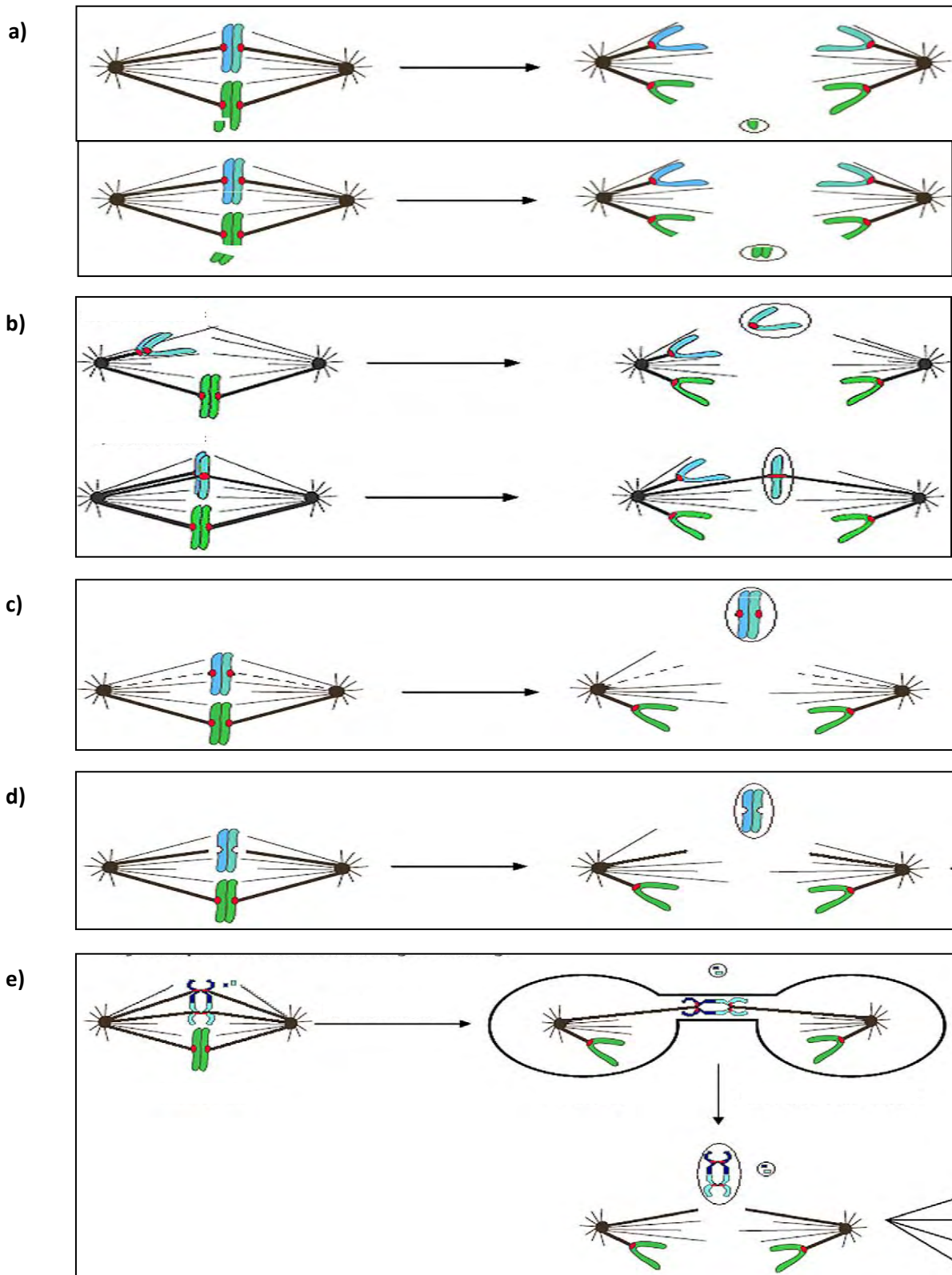


Figura 1.2. Mecanismos de formación de micrónúcleos. a) rompimiento de material genético cromatídico y cromosómico; b) pérdida de cromosomas por el inadecuado enlace entre el cinetoro y los microtúbulos; c) despolimerización temprana de la tubulina y pérdida de cromosomas; d) defectos en el cinetocoro; e) rearrreglo asimétrico que produce la formación de un cromosoma dicéntrico y la pérdida de fragmentos sin centrómero. El cromosoma dicéntrico a su vez puede formar un puente nucleoplásmico entre las dos células en división, puente que posteriormente puede ser roto y dar paso a un nuevo puente en el siguiente ciclo celular (Tomado de Ref. 13).

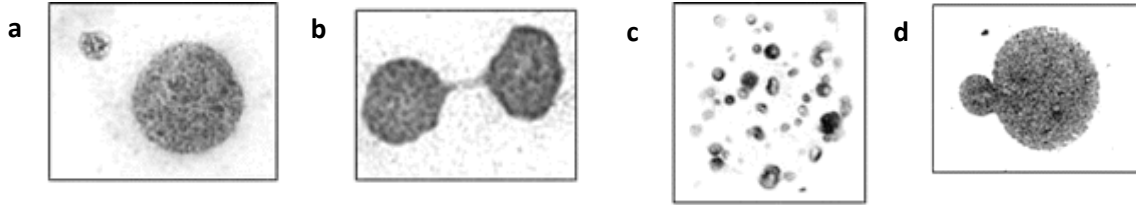


Figura 1.3. Daño genotóxico encontrado en la prueba de micronúcleos con marcaje de BrdU. a) micronúcleo; b) puente nucleoplásmico; c) apoptosis; d) gemación de cromatina (Tomado de Ref. 23).

requieren de una división celular para su formación; esto cambió cuando se demostró que su frecuencia era similar a la de los MN en linfocitos tratados con agentes genotóxicos como la mitomicina C [41-43].

Las GC al igual que los MN, muestran una tinción similar al núcleo mediante el uso de colorantes o al ser teñidas mediante anticuerpos en una reacción inmunocitoquímica. Por ello, se dice que se originan a partir de elementos nucleares, que pueden ser hebras de cromatina, cromosomas y nucléolos [41]; además y debido a su semejanza en la forma con los MN, se han considerado como un mecanismo más de formación de estos últimos, es decir, que están constituidas por material genético roto o cromosomas rezagados. Recientemente un nuevo mecanismo fue propuesto, en el cual se afirmó que las GC se forman a partir de genes amplificados o amplificación génica, fenómeno que se ha observado y estudiado en cultivos celulares mantenidos bajo ciertas condiciones [44-45].

La propuesta de la amplificación génica como origen de las GC en la prueba de MN, se basó en estudios realizados en la línea celular COLO 320DM, que se caracterizan por tener un exceso de copias por célula del gen *c-myc*. Además mostraron que las copias extra se localizaban preferentemente en la periferia del núcleo y que eran eliminadas en forma de gemaciones nucleares en la fase de síntesis; más aún, también observaron copias extra de *c-myc* en MN, por lo que sugirieron que las gemaciones podrían ser precursores de MN [46-47]. Cabe mencionar que anteriormente ya se habían descrito cuerpos en forma de gemaciones o “bud-shape”, así como MN en cultivos de células CHO resistentes a Metotrexato (MTX) y N-(fosfonacetil)-L-aspartato, resistencia que había sido lograda por la amplificación de los genes dihidrofolato reductasa (DHFR) y carbamoil-fosfato sintetasa 2/aspartato transcarbamoilasa/dihidroratasa (CAD) respectivamente [44].

También se han reportado eventos similares con la amplificación del gen adenilato deaminasa 2 o adenosina-monofosfato deaminasa 2 (AMPD2) en células CHO, así como MN y GC con DNA mitocondrial amplificado en células de leucemia mieloide (HL-60) y en células neuroendocrinas tumorales, pero no en fibroblastos humanos normales ni en linfocitos T [48-49], en realidad, la mayor parte de la evidencia que se tiene de la amplificación génica en mamíferos se deriva de cultivos celulares o células tumorales.

1.5. Amplificación génica

Durante el ciclo celular de las células eucariontes, cada cromosoma se replica una vez durante la fase de síntesis, y de esta forma, una copia completa del genoma se reparte entre cada una de las células hijas al concluir la mitosis. Sin embargo, existen excepciones a esta forma de replicación, en las cuales, un complemento cromosómico completo puede ser replicado muchas veces antes de que ocurra la división celular.

Un ejemplo de ello ocurre en ciertas especies de dípteros como *Drosophila melanogaster*; los cromosomas presentes en las células de las glándulas salivales de estos insectos, se replican continuamente hasta producir cromosomas gigantes hasta con 1,024 veces más hebras de cromatina [50]. Otra excepción ocurre con la replicación preferencial de genes ribosomales en la ovogénesis, evento que implica la síntesis de un solo locus de manera repetida y que al igual que en la formación de los cromosomas politénicos, se debe al elevado nivel de actividad durante las etapas de desarrollo de los organismos [51].

La replicación múltiple de un locus en un momento del desarrollo es un fenómeno que se conoce como *amplificación programada*, mientras que la replicación múltiple de un locus en células cultivadas es un ejemplo de *amplificación selectiva*, la cual ha recibido mucha atención en años recientes por dos razones principalmente [50]. La primera es la resistencia que muestran líneas celulares en cultivo a altas concentraciones de ciertas drogas de uso clínico; estas células suelen sobre expresar la proteína “blanco” de la droga en uso y suelen también presentar múltiples copias del gen codificante, de tal modo, que la resistencia descrita en estas células estaría relacionada con la cantidad de copias existentes de un gen en particular, haciendo que la amplificación génica pueda significar un problema en la quimioterapia. El segundo motivo de interés, se da a partir de muestras obtenidas de pacientes con cáncer, en cuyas células se ha descubierto la presencia de genes amplificados fuera de los cromosomas o insertados en éstos, por lo que se piensa que el fenómeno de amplificación puede ser un mecanismo de carcinogénesis (Tabla 1.2.) [51-55].

El análisis citogenético del DNA amplificado permite observarlo de dos formas: como unidades extracromosómicas sin centrómero conocidas como “dobles minutas” (DM) o de forma integrada en el cromosoma de origen u otros cromosomas, a lo que se le llama “regiones homogéneamente teñidas” (HSR) o “regiones cromosómicas expandidas” (ECR). Un mismo gen puede ser observado en una u otra forma en una población celular, pero la coexistencia de ambas en una misma célula es inusual, por lo que no es claro cuál de ellos es el evento de amplificación primario (Figura 1.4.) [51,56]. El tamaño de las DM parece ser variable y se ha llegado a estimar entre menos de 300 kb a 5000 kb, mientras que el estimado en las HSR es de 10,000 kb [56].

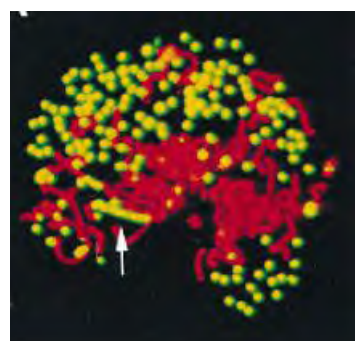


Figura 1.4. Amplificación de c-myc de forma extracromosomal e intracromosomal (flecha) (Tomado de Ref. 46)

1.2. Genes amplificados en tumores sólidos

Gen	Localización	Tumor
MYCN	2p24.1	Neuroblastoma, retinoblastoma, cáncer de pulmón
MDM2	12q14.3-q15	Neuroblastoma y sarcomas
ERBB2	17q21.1	Cáncer de mama y ovario
EGFR	7p12	Gliomas
CCND1	11q13	Melanoma
MYC	8q24.21	Cáncer de mama
KIT	4q11-q12	Gliomas

Con respecto a los mecanismos que dan origen a este fenómeno, se han propuesto varios modelos que pueden ser agrupados en dos clases [51,56]. En la primera, en un solo ciclo se puede generar una gran cantidad de copias extra, como resultado de “alteraciones” en los mecanismos de control de la replicación o mutaciones en los orígenes de replicación, lo que conllevaría en este caso, a que un sitio en particular fuera replicado más de una vez en cada división. La segunda clase implica un intercambio desigual de los genes, mientras que el proceso de replicación permanece normal durante el ciclo celular. El intercambio desigual puede ocurrir por eventos de rompimiento y reunión entre cromátidas hermanas, lo que a su vez podría ocasionar ciclos de rompimiento-fusión-puente (BFB, por sus siglas en inglés) en una célula; hecho que fue postulado por Barbara McClintock en 1941.

El mecanismo de amplificación genética por BFB ha recibido mucho interés en los últimos años, y es de hecho, el modelo mediante el cual se propuso pueden formarse las GC [45]. El modelo implica el rompimiento de un cromosoma y la posterior unión de las cromátidas hermanas en los extremos rotos, lo que dará paso a un cromosoma dicéntrico, es decir, con dos centrómeros. Durante la telofase cada centrómero es atraído hacia polos opuestos y al concluir la división celular se establece un puente entre las dos células recién formadas, puente que posteriormente se rompe y deja a cada célula con una parte del cromosoma roto. Este proceso se repetirá en divisiones sucesivas y de ahí el nombre de este mecanismo (Figura 1.5.).

No obstante el interés mostrado en el mecanismo de BFB, lo más probable es que la amplificación de genes sea producto de diferentes procesos, como lo sugiere la variedad de estructuras y secuencias amplificadas en los diferentes sistemas de estudio; se puede considerar que el origen de este fenómeno en líneas celulares en cultivo y en tumores es variable, así como la posibilidad de que un mecanismo inicial lleve a otro [56].

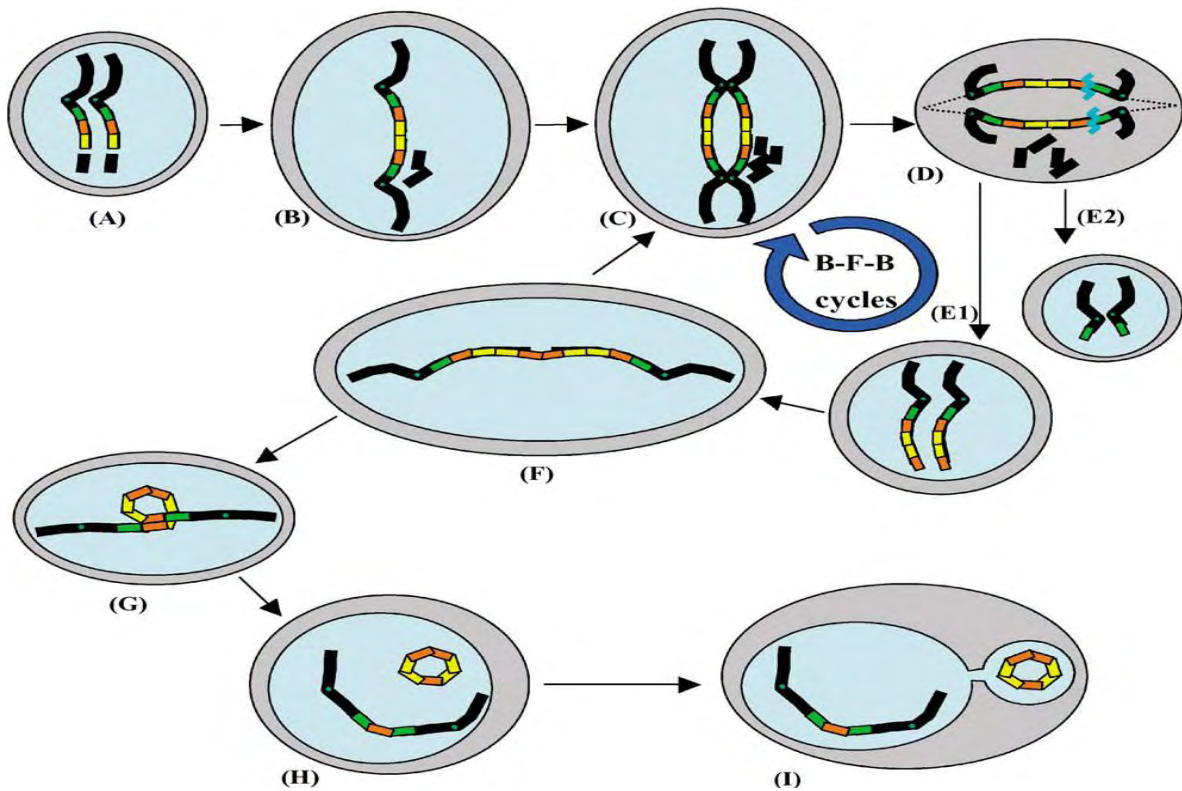


Figura 1.5. Formación de GC por el mecanismo de BFB. En el esquema se muestra un par de cromosomas homólogos que sufren un rompimiento en su parte distal (A); a continuación los extremos rotos se unen y este cromosoma dicéntrico es replicado (B, C). Posteriormente el cromosoma dicéntrico formará un puente entre las dos células en división (D), el cual terminará por romperse y con ello una de las células tendrá copias extra de un gen (E1), mientras que en la otra se dará su delección (E2). El cromosoma con copias de más puede iniciar de nuevo el ciclo BFB y de esta forma generar más copias dentro de un cromosoma (F), por otro lado, puede haber un entrecruzamiento entre secuencias homólogas y dar como resultado un fragmento acéntrico (DM) (G, H). Este fragmento que lleva las copias extras puede a su vez ser expulsado de la célula como una GC (I) (Tomado de Ref. 45).

1.5.1. El caso de la dihidrofolato-reductasa (DHFR)

Gran parte del conocimiento que se tiene acerca de la amplificación génica ha sido obtenido de estudios con células en cultivo resistentes a drogas; en estos casos, la amplificación de un gen se origina como una respuesta a la inhibición selectiva de su producto, de tal forma que las células pueden seguir creciendo en la presencia de agentes químicos. Un claro ejemplo de esto es la inhibición de la enzima dihidrofolato reductasa por el metotrexato (MTX), lo que ocasiona que se interrumpa la síntesis de novo de timidilato y nucleótidos de purina, asimismo, la síntesis de DNA y el crecimiento de las células, lo que induce al gen DHFR a amplificarse cientos de veces para hacer frente a la inhibición (Figura 1.6.) [57,58].

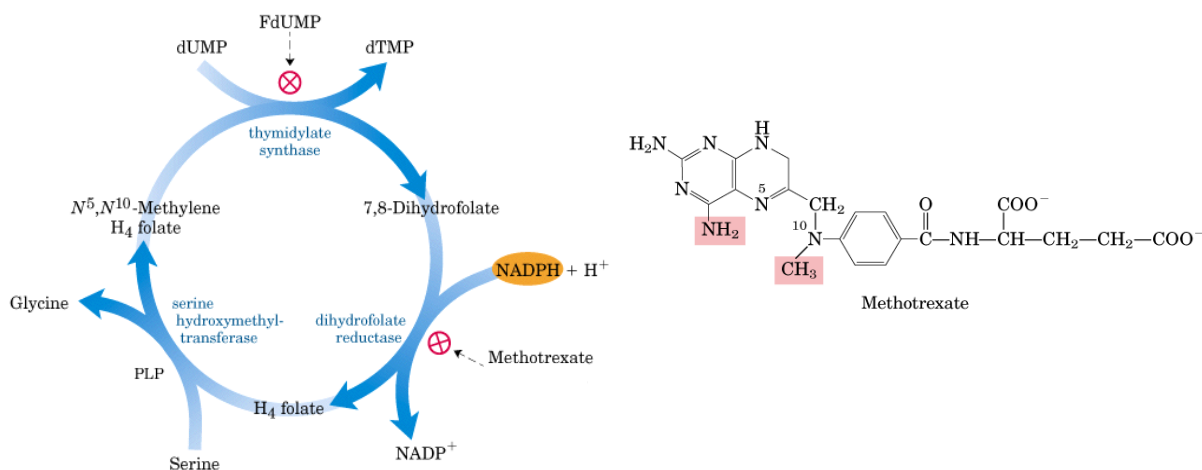


Figura 1.6. La enzima dihidrofolato reductasa reduce el 7,8-dihidrofolato a 5,6,7,8-tetrahidrofolato, lo que es un paso necesario para la biosíntesis de desoxitimidina 5'-monofosfato, ya que el tetrahidrofolato es requerido para regenerar el 5,10-metileno-tetrahidrofolato, que es utilizado entonces por la timidilato sintetasa para producir el timidilato. La inhibición de dihidrofolato reductasa por el MTX interrumpe la biosíntesis de timidilato y de esta manera se puede inhibir también la replicación del DNA, ya no se produce el desoxirribonucleótido dTTP (Tomado de Ref. 57).

El MTX es compuesto análogo del ácido fólico utilizado en el tratamiento de varias neoplasias [58]. La dihidrofolato reductasa es una enzima compuesta de 187 aminoácidos producto del gen DHFR, que se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 5, en posición 5q11.2-q13.2. Este gen mide aproximadamente 30 Kb y se divide en seis exones separados por cinco intrones; además del gen funcional se han encontrado cuatro pseudogenes, los cuales se caracterizan por la pérdida de intrones [59]. También se ha reportado la presencia de polimorfismos que se han estudiado en relación con la resistencia adquirida por las células [60], así como por posibles anomalías en el desarrollo fetal.

La amplificación de DHFR como respuesta al MTX se ha observado en una gran variedad de células de mamífero en cultivo, por lo que se puede decir que es el modelo de amplificación mejor estudiado [51, 61]. La resistencia puede variar dependiendo de la línea en cultivo, por ejemplo, desde 0.0001 mM en células derivadas de cáncer de colon y metástasis de hígado, hasta 1.6 mM en la línea V79 de células CHO [44,62]. La amplificación también es variable y se ha observado entre 40-400 veces dependiendo de la selección y de la línea celular [63]. Además, existen algunos estudios que dan cuenta de este fenómeno en personas enfermas de cáncer de mama o por leucemia, pero no en personas con artritis reumatoide [64-66]. Cabe mencionar que la resistencia a MTX no es exclusiva de amplificación génica, otros mecanismos pueden ser una disminución en la entrada y permanencia del MTX a la célula, o un incremento en la cantidad de enzima al evitar su degradación [67].

Como se ha venido mencionando, la amplificación génica se encuentra bien caracterizada en células tumorales o bajo una selección en cultivo, y aunque existen algunos reportes que dan cuenta de este fenómeno, en tejidos sanos, el evento es raro [68-71].

Planteamiento del estudio

El sistema de MN en linfocitos de sangre periférica *in vitro* es un sistema que permite detectar compuestos químicos capaces de inducir alteraciones en el DNA. Por mucho tiempo se evaluó ese único parámetro, los MN, como demostración de actividad aneuploidogénica o clastogénica, dejando de lado otros eventos relevantes que también son resultado de eventos de genotoxicidad; tal es el caso de las gemaciones de cromatina y de los puentes nucleoplásmicos.

Cuando Fenech y cols. [17,45] propusieron la evaluación comprensiva para el sistema de MN, incluyeron la evaluación de gemaciones de cromatina como un evento de amplificación génica, independientemente de que se tratara de un ensayo *in vivo* o *in vitro*. Esta afirmación exige el respaldo experimental que demuestre que efectivamente, cualquier gemación de cromatina evaluada en el sistema de MN, *in vivo* o *in vitro*, puede atribuirse a eventos de amplificación génica.

Debido a que las gemaciones de cromatina observadas en la prueba de micronúcleos *in vitro* han sido observadas en tiempos cortos de exposición [34,43], nos preguntamos si en estas condiciones podrían formarse por amplificación génica. El metotrexato es un agente que puede inducir la amplificación del gen dihidrofolato reductasa en varios tipos celulares, por lo que decidimos estudiar la formación de gemaciones de cromatina y micronúcleos por acción del metotrexato en linfocitos, y si estos eventos podrían contener amplificados de dihidrofolato reductasa, copias extra del gen que se producen en respuesta a la presión del metotrexato en el medio y que serían expulsadas del núcleo mediante el evento de gemación de cromatina.

Hipótesis

El tratamiento con un agente como el MTX que es capaz de inducir amplificación génica, tendrá un efecto inductor de GC y MN en linfocitos de sangre periférica en cultivo, y estas estructuras estarán formadas por amplificaciones del gen DHFR.

Objetivos

Nuestros objetivos fueron los siguientes:

- 1) Determinar si el tratamiento con metotrexato induce un incremento en la frecuencia de gemaciones de cromatina y micronúcleos en linfocitos.
- 2) Determinar si estas estructuras podrían estar constituidas por amplificaciones del gen dihidrofolato reductasa.

3. Material y Métodos

3.1. Prueba de Micronúcleos

3.1.1. Cultivos de sangre y tratamientos con metotrexato

Se realizaron cultivos con 0.5 ml de sangre heparinizada, 4% de fitohemaglutinina (PHA), 0.016 mM de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) y medio RPMI-1640 en un volumen de 5 ml. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 48 horas y una vez concluido este tiempo se trataron con las siguientes concentraciones de MTX: 0.01 mM, 0.05 mM, 0.25 mM, 1.25 mM y 2.5 mM; una vez agregada la sustancia los cultivos se mezclaron suavemente y se mantuvieron 24 horas en incubación. Los cultivos tratados y su control se efectuaron por triplicado.

Al mismo tiempo se sembraron cultivos en las condiciones descritas sin BrdU, con el objetivo de que no interfiera con la unión de la sonda y su secuencia blanco durante la hibridación *in situ*.

Finalizadas las 24 horas de tratamiento (72 horas en total) los cultivos se centrifugaron 10 minutos a 380 g, después se retiró la mayor cantidad de sobrenadante y al botón celular se le añadieron 5 ml de KCL 75 mM. Nuevamente se centrifugaron las células, se retiró el sobrenadante y a continuación el paquete celular se lavó varias veces con metanol-ácido acético (3:1) hasta dejar un botón limpio y de color blanco. Las células fijadas se guardaron en refrigeración (4°C).

3.1.2. Evaluación de genotoxicidad: gemaciones de cromatina, micronúcleos y puentes nucleoplásmicos

Los cultivos con BrdU se centrifugaron 10 minutos a 380 g, se les retiró el fijador hasta dejar el botón en ~0.5 ml y posteriormente se resuspendió. De esta suspensión se depositó una gota de cada cultivo en laminillas de vidrio previamente limpiadas con alcohol, siendo guardadas en un desecador a -20°C hasta su uso.

Inmunocitoquímica: las laminillas se desnaturalizaron en formamida al 40% en SSC 2X por 15 minutos a 80°C; posteriormente se lavaron en PBS 5 min, se delimitó el material celular con un lápiz graso y se colocaron en una cámara húmeda con 100 µl de un anticuerpo anti-BrdU hecho en ratón, diluido en PBS (1:50) y 1% de suero de bovino recién nacido por 90 minutos. Trascorrido el tiempo se lavaron en PBS con 0.1% de Nonidet P40 por 5 minutos dos veces y se colocaron nuevamente en la cámara húmeda con 100 µl de un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa en PBS (1:100) y 1% de suero de bovino recién nacido por 45 minutos; las laminillas fueron lavadas nuevamente en PBS con 0.1% de Nonidet P40 por 5 minutos dos veces. Como sustrato de la peroxidasa se utilizaron 150 µl de diaminobenzidina (0.5mg/ml) en PBS con 0.09% de peróxido de hidrógeno, la reacción se dejó 20 minutos y a continuación las laminillas

se lavaron en agua corriente 1 minuto. Las laminillas fueron montadas con ENTELLAN 24 horas después.

En cada laminilla se evaluaron 1,000 células teñidas, con un microscopio compuesto (Nikon, Eclipse E600) de campo claro y se registró el número de GC, MN y PN presentes en cada célula utilizando un aumento de 1000X.

3.1.3. Índice de marcaje

En otra serie de laminillas al terminar la inmunocitoquímica se realizó una contratinción para ver las células que no proliferaron; para ello se utilizó solución de Giemsa (sin diluir) directamente sobre las preparaciones y posteriormente éstas se lavaron con agua desionizada 4 minutos. Se evaluaron 2,000 células y el índice de marcaje se determinó dividiendo el número de células café (que proliferaron) entre el total de células contadas (con y sin proliferación).

3.1.4. Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor para evaluar las diferencias en la formación de GC, MN e IM entre los distintos tratamientos empleados, y para determinar cuál o cuáles medias son las que difieren significativamente, se aplicó la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD). Todos los análisis se realizaron con el programa SPSS 16.0.

3.2. Sonda de Hibridación

3.2.1. Extracción de DNA

El DNA se obtuvo de sangre periférica utilizando el Kit de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit (250) de QIAGEN, el cual utiliza columnas para la separación del DNA.

3.2.2. Amplificación de los genes dihidrofolato reductasa (DHFR) y cadherina 12 (CDH12) PCR

Para el gen DHFR se amplificó un fragmento que abarca parte del exón e intrón cinco. Para el gen CDH12 se amplificó una región del primer exón (www.ncbi.nlm.nih.gov/, LOCUS NC_000005, VERSIÓN NC_000005.7, GI: 42406224).

La amplificación de las secuencias se logró con los siguientes oligonucleótidos.

	FW	RV	Producto
DHFR	5'-CAGTTGCTGATTTCTGCCCGGATTC-3'	5'-GAAGAGGTTGTGGTCATTCTCTGGT-3'	231 pb
CDH12	5'-TCCCGCAATACCATCACAGCAGA-3'	5'-CGATGATGAAGGAGGTGGGGAGGAA-3'	859 pb

Los oligonucleótidos de DHFR fueron reportados previamente [72]. Para CDH12 fueron diseñados y donados por el Dr. Rafael Camacho Carranza del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Las reacciones se corrieron en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Los productos se visualizaron en geles de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio.

Condiciones de reacción para obtener las secuencias para elaborar las sondas.

Mezcla de reacción DHFR y CDH12	[]	Programa PCR DHFR	Temperatura	Tiempo
dNTP's	0.2 mM	Desnaturalización inicial	94°C	3 min
Oligo 1	0.5 µM	1) Desnaturalización	94°C	30 seg
Oligo 2	0.5 µM	2) Alineamiento	62°C	15 seg
Taq polimerasa	4 unidades	3) Extensión	72°C	30 seg
Buffer de reacción (1mM MgCl2)	1 X	Repetición 29 ciclos (1-3)		
DNA	10-50 ng	Extensión final	72°C	3 min

Programa PCR CDH12	Temperatura	Tiempo	Continuación	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	4) Desnaturalización	94°C	45 seg
1) Desnaturalización	94°C	90 seg	5) Alineamiento	60°C	45 seg
2) Alineamiento	60°C	60 seg	6) Extensión	72°C	45 seg
3) Extensión	72°C	60 seg	Extensión final	72°C	4 min
Repetición de 5 ciclos (1-3)			Repetición de 29 ciclos (4-6)		

5' - { TCCAGACAGAACCTACTATGTGCGGCGGCAGCTGGGGCGGGAAGGCGGGAGCTGGGGCGCTGGGGCGCTGCGGCCGCTG
CGGCCGCTGCAGCCGCTGCAGCGCCAGGGTCCACCTGGTCGGCTGCACCTGTGGAGGAGGAGGTGGATTTCAGGCTTCCCGTAG
ACTGGAAGAATCGGCTCAAACCGCTTGCCTCGCAGGGGCTGAGCTGGAGGCAGCGAGGCCGCCGACGCAGGCTTCCGGCGAG
ACATGGCAGGGCAAGGATGGCAGCCCGCGGCAGGGCTGGCGAGGAGCGCGAGCCCGCGCCGAGTTCAGGCGTCTGCG
GGCGGAGCACGCCGCGACCCTGCTGCGCCGGGGCGGGGGGGCGGGGCTCGCTGCACAAATGGGGACGAGGGGGCGGG
GCGGCCACAATTCGCGCCAACTTGACCGCGGTTCTGCTGTAACGAGCGGGCTCGGAGGTCTCCCGCTGCTGTCATGGTTGGT
TCGCTAAACTGCATCGTCGCTGTGTCCAGAACATGGGCATCGGCAAGAACGGGGACCTGCCCTGGCCACCGCTCAG} GTATCTGC
CGGGCCGGGGCGATGGGACCAAACGGGCGCAGGCTGCCACGGTTCGGGGTGGCCGACTCCCGCGAGAGGATGGGGCCAGAC
TTGCGGTCTGCGCTGGCAGGAAGGGTGGGCCCGACTGGATTCCCTTTTCTGCTGCGCGGGAGGCC **CAGTTGCTGATTTCTGCC**
GGATTTCTGCTGCCCGTGAGGTCTTTGCCCTGCGCGCCCTCGCCAGGGCAAAGTCCAGCCCTGGAGAAAACCTCACCCCTA
CCACAGCGCTCCGTTTGTGAGGTGCCTTAGAGCTCGAGCCCAAGGGATAATGTTTCGAGTAACGCTGTTTCTCTAACTGTAG { GA
ATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTCTTC AGTAGAAG} GTAATGTGGGATTAAGTAGGGTCTTGCTTATGAAGT
TTACCAGTGCAAATGTTAGTTAAATGGAAAGTTTTCCGTGTTAATCTGGGACCTTTCTTATTATGGATCTGTATGATCTGTATG - 3'

Exón 5 {

Exón 6 }

Figura 3.1. Secuencia genética del gen DHFR: { } de arriba a abajo se muestran los exones 6 y 5, en negritas los oligonucleótidos empleados y el fragmento amplificado para elaborar la sonda se encuentra subrayado.

3.2.3. Secuenciación

Cinco reacciones de cada gen se juntaron y mezclaron con acetato de amonio 2 M concentración final, posteriormente se agregaron dos volúmenes de etanol frío y se guardaron a -20°C toda una noche. Al siguiente día las muestras se centrifugaron 15 minutos a 290 g y 4°C, el sobrenadante fue retirado y el botón se lavó con 1 ml de alcohol al 70%, entonces las muestras se centrifugaron cinco minutos en las mismas condiciones y después de retirar el sobrenadante se dejó secar el botón a 37°C de 10-15 minutos. Finalmente el DNA se hidrató en agua libre de DNAsas.

La secuenciación fue realizada en la unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con un secuenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

3.2.4. Marcaje de secuencias con digoxigenina (DIG-11-dUTP) por random priming (preparación de sondas)

Las reacciones de PCR de los genes DHFR y CDH12 se purificaron añadiendo acetato de sodio a una concentración final de 0.3 M y siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado de secuenciación. A continuación el DNA se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop 1000 (Thermo scientific), y de 1 a 3 µg de producto disuelto en agua se desnaturalizó a 92°C por 10 min en baño maria, inmediatamente después la muestra fue colocada en hielo.

Al producto de amplificación desnaturalizado se le añadió entonces una mezcla de hexanucleótidos 1X, dNTPs 1X con DIG-11-dUTP y dos unidades del fragmento mayor de la DNA polimerasa I (fragmento klenow), todo esto en un volumen final de 20 µl siguiendo las instrucciones del DIG DNA labeling Kit (Roche). La reacción se llevó a cabo a 37°C por 20 horas, concluido el tiempo se calentó la muestra a 65°C por 10 minutos y se guardó a -20°C.

3.3. Hibridación Fluorescente *in situ*

3.3.1. Genes DHFR y CDH12

El procedimiento para la preparación de laminillas fue el mismo que en la evaluación de genotoxicidad pero utilizando cultivos sin BrdU.

Las laminillas se deshidrataron en alcohol al 70%, 85% y 100% por un minuto respectivamente, posteriormente se desnaturalizaron en formamida al 70% en SSC 2X por 5 minutos a 80°C. A continuación se deshidrataron nuevamente en alcohol al 70%, 85% y 100% por 30 segundos en cada uno, se dejaron secar a temperatura ambiente delimitando el material celular con un lápiz grasoso y se colocaron en una cámara húmeda con 15 µl de una mezcla de hibridación que fue recubierta con un cubreobjetos Hybri-slips de 22mm x 22mm (Sigma-Aldrich) y sellado con pegamento plástico. La sonda se desnaturalizó previamente a 80°C por 10 minutos a baño maría en una mezcla que contenía formamida 50%, sulfato de dextran 10%, SSC 1X y 100 ng de la sonda. La hibridación se llevó a cabo a 37°C entre 18 y 20 horas.

Concluido el tiempo de hibridación, las laminillas se lavaron dos veces a 45°C en SSC 2X con 0.1% de SDS por 5 minutos. Después, las laminillas fueron colocadas en PBS con 5% de leche en polvo (Bio-Rad) por 15 minutos y a continuación se colocaron en una cámara húmeda con 100 µl de un anticuerpo anti-Digoxigenina-borrego en PBS (1:200) con 1% de leche en polvo a 37 °C por una hora. Posteriormente se lavaron dos veces en PBS con 0.05% de Tween por 5 minutos y se incubaron con 100 µl de un anticuerpo anti-IgG de borrego conjugado con Fluoresceína en PBS (1:200) con 1% de leche en polvo a 37°C por una hora. Las laminillas entonces fueron nuevamente lavadas dos veces en PBS con 0.05% de Tween por 5 minutos y finalmente se realizó una contratinción con DAPI o yoduro de propidio (1.5 µl/ml). La solución con cada uno de los anticuerpos fue cubierta con parafilm y sellada con pegamento plástico.

El análisis consistió en identificar la presencia de la sonda en GC y MN, para lo cual se utilizó un microscopio compuesto epifluorescente con un filtro triple multi-banda (Nikon, Eclipse E400).

3.3.2. Secuencias satélite

Para el reconocimiento de centrómeros se utilizó un kit con secuencias satélite marcadas con digoxigenina (Aquarius probes, Cytocell), y se siguió el mismo procedimiento empleado con las sondas para DHFR y CDH12 a excepción de los lavados posteriores a la hibridación, los cuales en este caso fueron en SSC 0.5X con 0.1% de SDS a 45°C (www.cancergenetics.com). El uso de la sonda en este caso se hizo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La evaluación se realizó por duplicado en un total de 12,000 células, sumando el número total de eventos (GC o MN) con o sin señal de secuencias satélite de cada muestra.

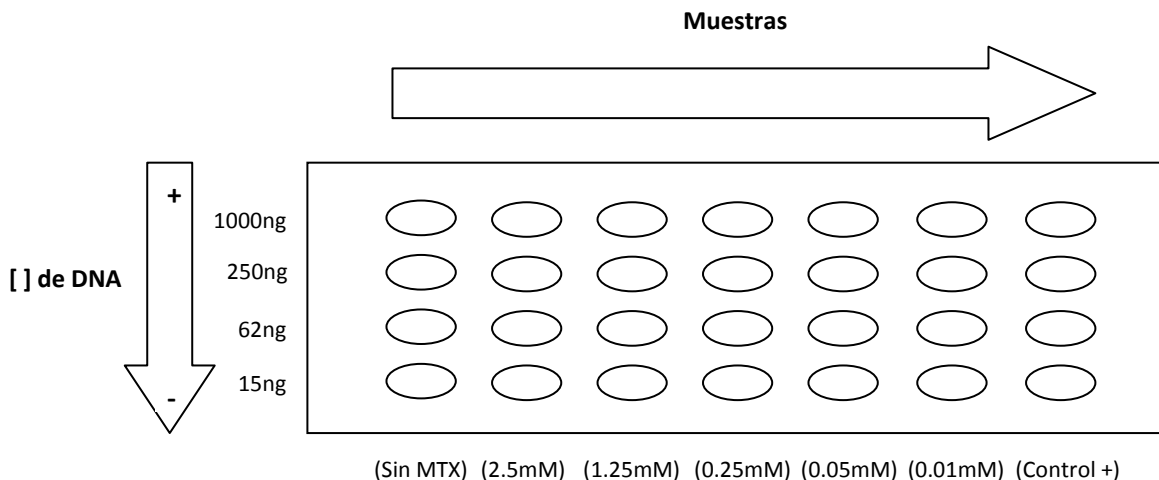


Figura 3.2. Las muestras de DNA se colocaron de manera horizontal de izquierda a derecha y las diluciones de manera vertical.

3.4. Dot blot

El DNA se obtuvo de cultivos sin BrdU, para ello se utilizó el Kit de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit (250) de QIAGEN y se siguió el protocolo para células en cultivo. El DNA se cuantificó de la manera previamente descrita y de cada cultivo se tomaron 1,334 ng, de los cuales se realizaron tres diluciones (1:4) para tener finalmente 4 diferentes concentraciones de DNA: 1000 ng, 250 ng, 62 ng y 15 ng; además, se puso un control “positivo” (Control +), que en el primer punto consistió de 1000 ng de DNA genómico extraído de células sin tratamiento, más 1000 ng de cada fragmento amplificado respectivamente (DHFR o CDH12).

El DNA fue entonces desnaturalizado con hidróxido de sodio 0.3 M y EDTA 10 mM a 96°C por 10 min, e inmediatamente después colocado en hielo; después se neutralizó con 100 µl de acetato de amonio 2 M para tener un volumen final de 200 µl.

Se ensambló un manifold (Bio-Rad) con una membrana de nylon⁺ previamente humedecida en acetato de amonio 1 M por 10 minutos, además de un filtro soporte humedecido brevemente en la misma solución. Posteriormente en cada pozo se añadieron 100 µl de acetato de amonio 1 M, el vacío era encendido hasta que la solución se filtraba y al finalizar se cerraba nuevamente. A continuación, las muestras se colocaron en el manifold y el vacío se abrió hasta ser totalmente filtradas, luego el vacío se cerró y se repitió el paso inicial con acetato de amonio 1 M. Finalmente, el manifold fue desarmado y la membrana secada a temperatura ambiente para continuar con la hibridación (Figura 3.2).

El DNA en la membrana se fijó con luz UV a 1,200 µj y enseguida se colocó en un contenedor con 10 ml de una mezcla para hibridar que contenía: SDS al 7%, fosfato de sodio monobásico 0.5M (pH 7.2) y EDTA 10 mM. Esta prehibridación se realizó por 2 horas a 62°C y concluido el tiempo la

mezcla se reemplazó con 15 ml de la misma solución más 50 ng/ml de la sonda para el gen DHFR o CDH12. La hibridación se llevó a cabo entre 18 y 20 horas a 62°C y después la membrana se lavó dos veces en SSC 2X con 0.1% de SDS a la misma temperatura de hibridación por 15 minutos cada lavado. Un tercer lavado fue hecho con SSC 1X y 0.1% de SDS a temperatura ambiente por 15 minutos, al terminar se bloqueó la membrana con TBS y 5% de leche en polvo (Bio-Rad) por una hora a temperatura ambiente y en agitación.

Después de bloquear la membrana se le añadió un anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina en PBS (1:2000) con 1% de leche en polvo y se mantuvo a temperatura ambiente por una hora en agitación. Dos lavados de 15 minutos con TBS fueron realizados una vez concluido el tiempo de incubación con el anticuerpo y al terminar la membrana se lavó 5 minutos con buffer de predetección. Como sustrato se utilizó el Kit Vector Red alkaline phosphatase (Vector labs) que produce un precipitado rojo debido a la reacción enzimática, la cual se llevó a cabo a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad de 15 a 20 minutos. Al terminar, la membrana fue enjuagada en agua desionizada y posteriormente se digitalizó con el programa Kodak Digital Science versión 3.0.

3.4.1. Análisis

El análisis de las membranas digitalizadas consistió en sacar una proporción de los tratamientos con respecto al grupo control o sin tratamiento por cada concentración de DNA (1000 ng, 250 ng, 62 ng y 15 ng). Para sacar la proporción se utilizó la intensidad neta obtenida con el programa Kodak Digital Science versión 3.0 y la proporción se determinó con el mismo.

Soluciones

PBS (pH 7.4)	SSC 20X (pH 7)	TBS (pH7.5)	Buffer de predetección (pH 9.5)
NaCl 137 mM	NaCl 3 M	NaCl 150 mM	NaCl 100 mM
KCl 2.7 mM	Citrato de sodio 0.3 M	Tris base 100 mM	Tris 100 mM
Na ₂ HPO ₄ 4.3 mM			MgCl ₂ 50 mM
KH ₂ PO ₄ 1.4 mM			

4. Resultados

4.1. Daño genotóxico

El metotrexato (MTX) en las cinco concentraciones utilizadas promovió la formación de micronúcleos (MN) y gemaciones de cromatina (GC), de éstos, los MN fueron el evento genotóxico más frecuente. Con respecto a los tratamientos, se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la concentración de 1.25 mM para las GC, mientras que para los MN las diferencias se encontraron en las concentraciones de 0.01 mM, 0.05 mM, 0.25 mM y 1.25 mM, todas ellas con respecto a los cultivos control (Tabla 1, Figura 1). El tratamiento que indujo el mayor número de GC fue de 1.25 mM, mientras que el mayor número de MN fue con 0.25 mM, en ambos casos, se observó un incremento en el daño conforme se aumentaba la concentración de MTX.

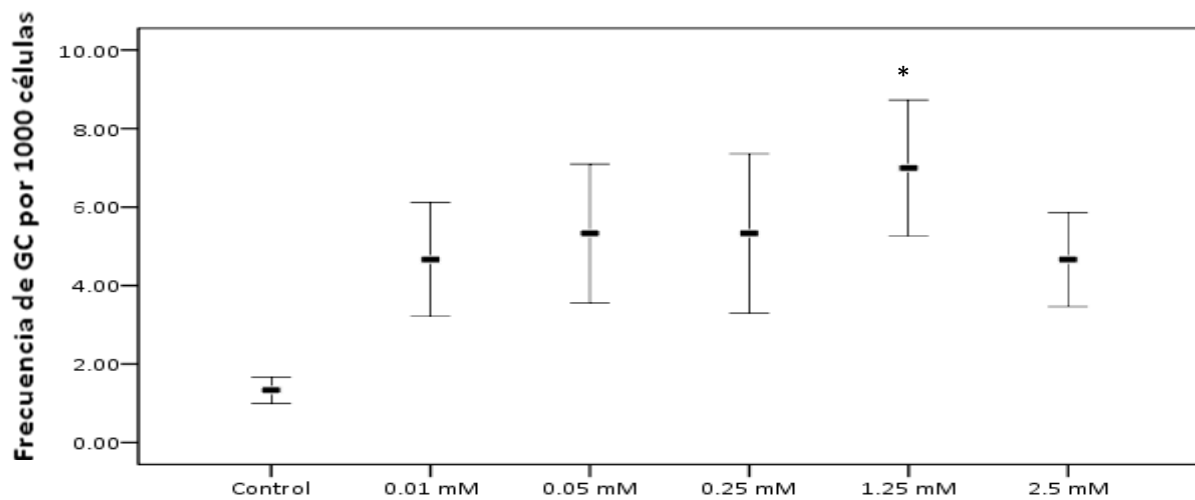
También se observaron puentes nucleoplásmicos (PN), los cuales indican la formación de un cromosoma dicéntrico por la ruptura y fusión de dos cromosomas; los puentes se encontraron en los siguientes cultivos: control, 0.01 mM y 1.25 mM de MTX (un puente por cada tratamiento).

El índice de marcaje (IM) se evaluó como un indicador de la capacidad de las células para proliferar en presencia del MTX, pero ningún tratamiento mostró diferencias significativas con respecto al control, pese a que éste tuvo una mayor cantidad de células en proliferación. Los tratamientos con 0.01 mM, 1.25 mM y 2.5 mM de MTX presentaron el menor IM (Tabla 4.1., Figura 4.1.).

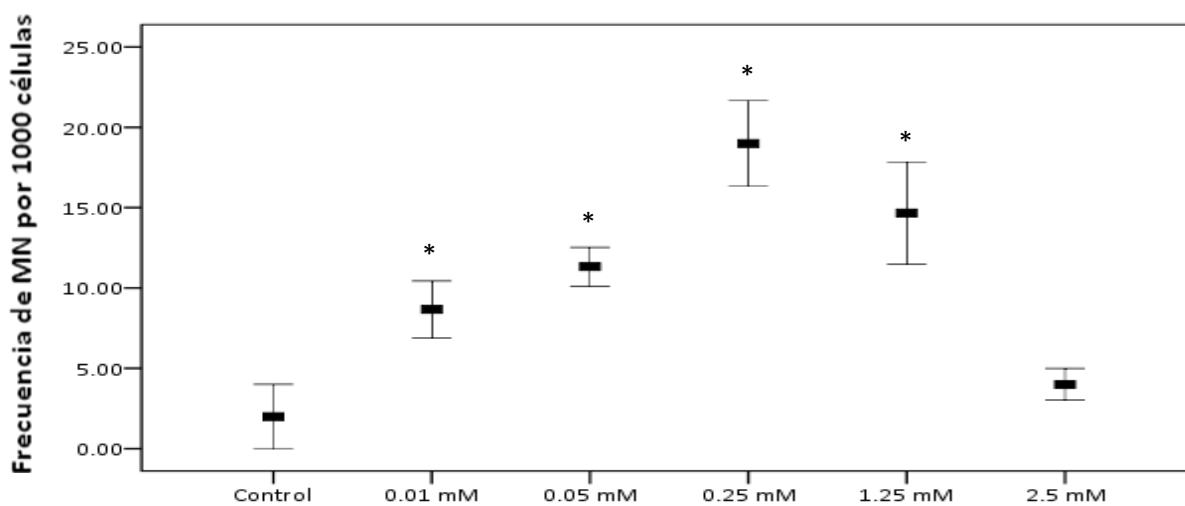
Tabla 4.1. Frecuencias de GC y MN en mil células por los tratamientos con MTX

Tratamientos	GC			MN			IM		
	Media	E. estándar+/-	<i>p</i>	Media	E. estándar+/-	<i>p</i>	Media	E. estándar+/-	<i>p</i>
Control	1.3	0.3		2	2		0.38	0.04	
0.01 mM	4.6	1.4	0.147	8.6	1.7	0.045	0.26	0.03	0.053
0.05 mM	5.3	1.7	0.088	11.3	1.2	0.009	0.29	0.01	0.122
0.25 mM	5.3	2.0	0.088	19	2.6	0.000	0.32	0.03	0.332
1.25 mM	7	1.7	0.022	14.6	3.1	0.001	0.26	0.02	0.053
2.5 mM	4.6	1.2	0.147	4	1	0.515	0.26	0.06	0.059

IM es el índice de marcaje.
Los promedios son de cultivos por triplicado.



Tratamientos con metotrexato



Tratamientos con metotrexato

Figura 4.1. Frecuencia de gemaciones de cromatina y micronúcleos en cultivos de sangre entera tratados con metotrexato por 24 horas (* $p < 0.05$).

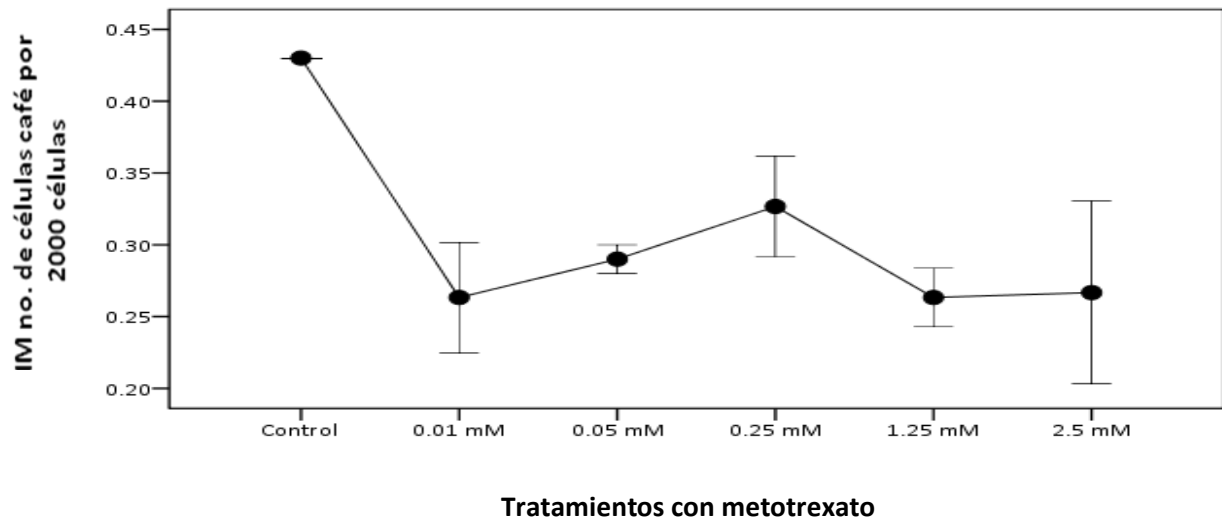


Figura 4.2. Índice de marcaje en cultivos de sangre entera tratados con metotrexato por 24 horas.

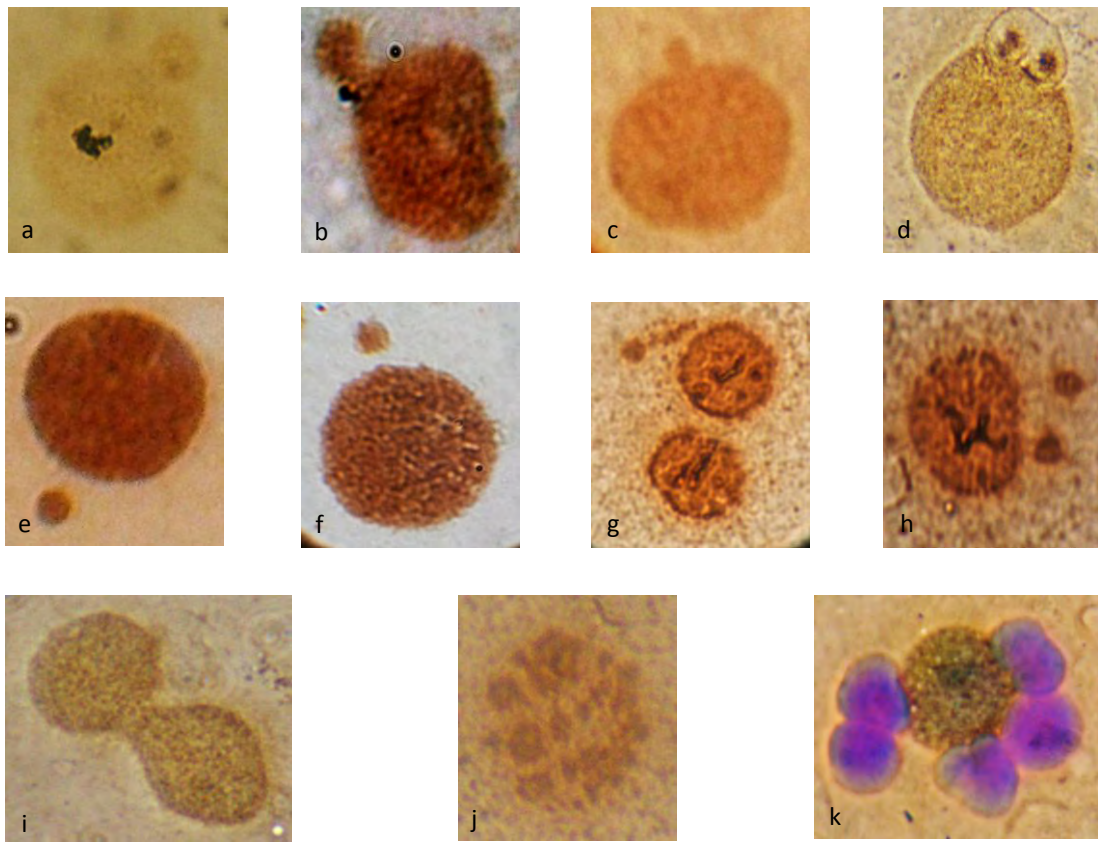


Figura 4.3. Daño genotóxico encontrado en cultivos tratados con metotrexato: (a-c) GC; (d) célula con dos GC; (e-g) MN; (h) célula con dos MN; (i) NP; (j) apoptosis; (k) contratinción con giemsa para evaluar el IM.

4.2. Amplificación de dihidrofolato-reductasa (DHFR) y cadherina 12 (CDH12)

La secuencia que se utilizó como sonda del gen DHFR se obtuvo amplificando un fragmento de 231 pb, para la sonda del gen CDH12 se amplificó un fragmento de 859 pb (Figura 4.4.).

Una vez obtenidas las secuencias, estas se alinearon en el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés), los resultados fueron positivos para ambos genes y con ello se confirmó la especificidad de los productos obtenidos por PCR.

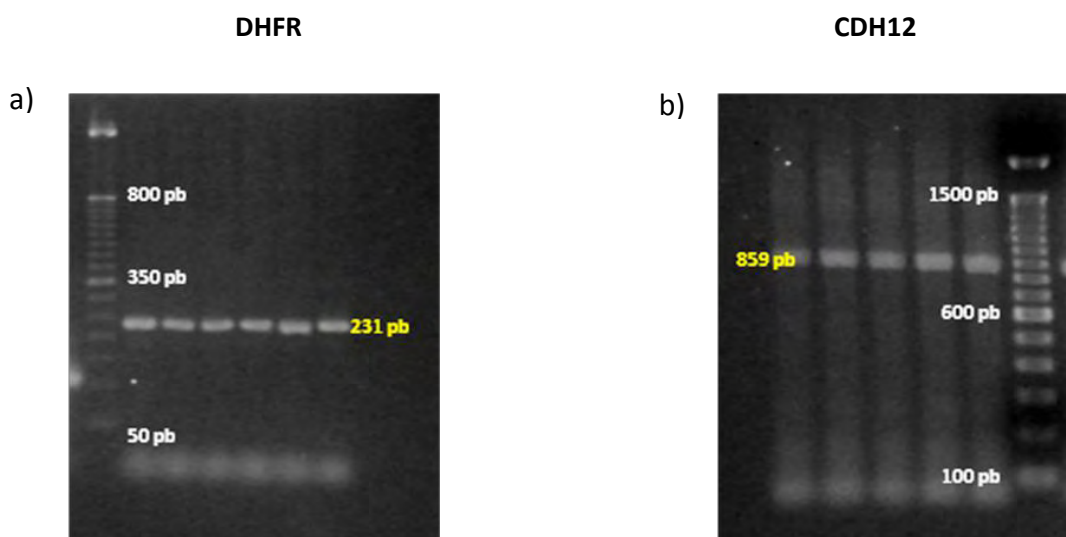


Figura 4.4. a) Amplificación de DHFR en un gel de agarosa al 3% y un marcador de 50 pb; b) amplificación de CDH12 en un gel de agarosa al 1.5% y un marcador de 100 pb. En amarillo se muestra el tamaño de los productos de amplificación.

4.3. Hibridación Fluorescente *in situ*

Cultivos sin BrdU fueron utilizados para evaluar la amplificación genética del gen DHFR y, aunque se observó la formación de GC y MN, no fue posible detectar la señal de hibridación de este gen, ni tampoco la del gen CDH12 en cultivos control o tratados. Por otro lado, las hibridaciones con secuencias satélite fueron positivas, es decir, que fue posible observar señales de estas secuencias en GC y MN aunque en un porcentaje bajo (Tabla 4.2., Figura 4.5.). También se registraron 4 puentes nucleoplásmicos con señal de las secuencias centroméricas en todos ellos.

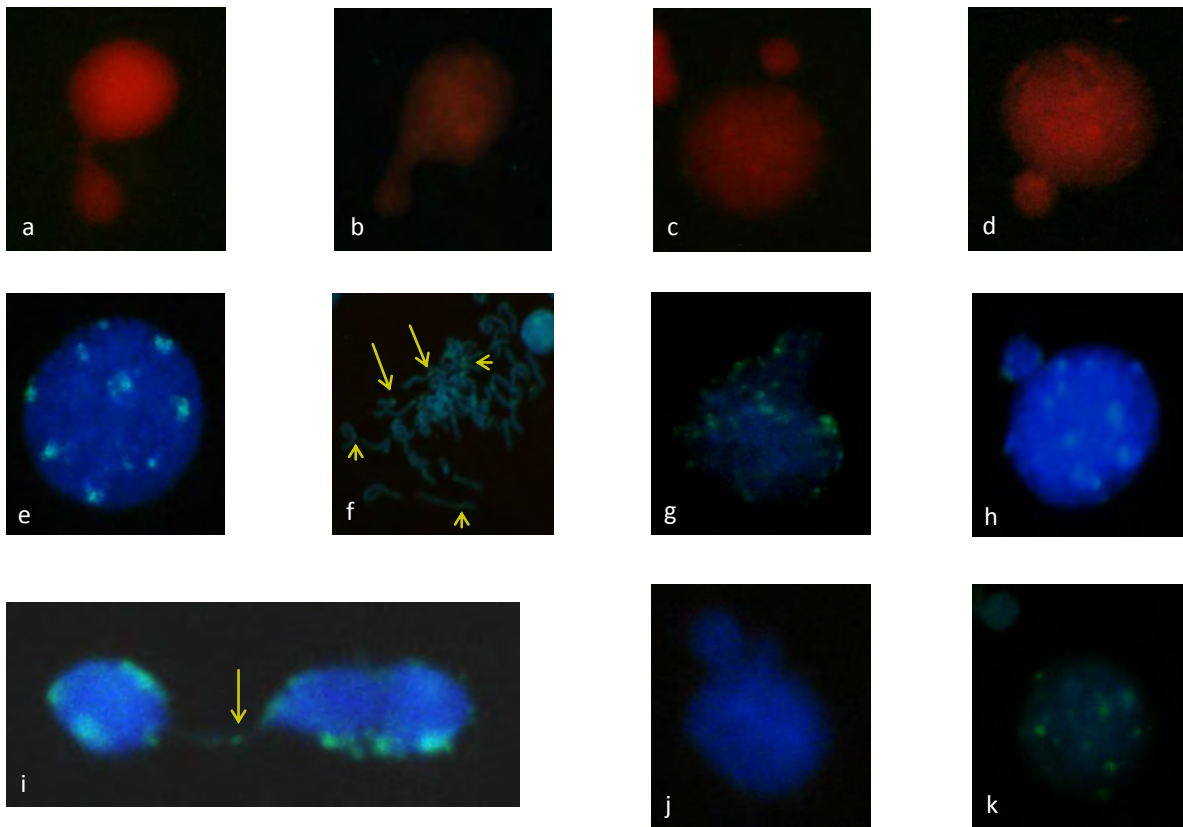


Figura 4.5. (a-d) gemaciones de cromatina y micronúcleos sin señal para el gen DHFR (núcleos teñidos con ioduro de propidio); (e-f) núcleo y cromosomas en metafase con señal de secuencias centroméricas; (g-i) gemación de cromatina, micronúcleo y puente nucleoplásmico con señal de secuencias centroméricas; (j) gemación de cromatina sin señal de secuencias centroméricas; (k) célula con micronúcleo y señal de secuencias centroméricas dentro del núcleo (núcleos teñidos con DAPI).

Tabla 4.2. Gemaciones de cromatina, micronúcleos y puentes nucleoplásmicos con señal positiva para centrómeros (C+) en cultivos de sangre entera tratados con metotrexato

Tratamientos	No. total GC	GC C+ (%)	No. total MN	MN C+(%)	No. total PN	PN C+
Control	2	-	12	-		
0.01 mM	3	1 (33.33)	10	-	2	2 (100)
0.05 mM	6	-	14	2 (14.28)	1	1 (100)
0.25 mM	4	-	11	-		
1.25 mM	3	1 (33.3)	13	-		
2.5 mM	7	2 (28.57)	10	1 (10)	1	1 (100)
Total	25	4 (16)	70	3 (4.28)	4	4 (100)

Número de células analizadas 12,000 por grupo.

El número de GC, MN y PN es la suma de eventos de dos muestras por grupo.

4. Dot blot

Para evaluar la amplificación genética por dot blot se determinó la intensidad neta de cada punto, y ésta, se transformó en una proporción con respecto a los cultivos sin tratamiento. Al transformar la intensidad neta en una proporción el valor del control negativo o sin tratar siempre fue uno, mientras que los valores de los cultivos tratados se encontraban entre 0.4-1.3 para DHFR y entre 0.2-1.4 para CDH12 (Tabla 3).

Al comparar los valores por concentración de DNA entre los grupos tratados y el control (sin tratar), no se observó una clara diferencia entre éstos; en cambio, el Control + que simula una condición de amplificación genética si presenta valores superiores al grupo sin tratamiento. También puede observarse que conforme disminuye la concentración de DNA la diferencia entre el Control y el Control + es más evidente, lo que se percibe mejor en el caso del gen DHFR (Figura 6).

Tabla 3. Intensidad neta dada como proporción de DNA extraído de células tratadas con metotrexato con respecto a células sin tratamiento.

DHFR	Control	2.5 mM	1.25 mM	0.25 mM	0.05 mM	0.01 mM	Control +
1000 ng	1	0.9*	1.3	1	1	1.2*	1.7
250 ng	1	0.9*	0.9	0.9	0.9	0.8	2.6
62 ng	1	0.7*	1.1	1	1.2	1.1	5.4
15 ng	1	0.9*	1.2	1	0.5	0.4	5.2
<hr/>							
CDH12	Control	2.5 mM	1.25 mM	0.25 mM	0.05 mM	0.01 mM	Control +
1000 ng	1	-	0.9	0.8	0.8	0.8*	1.5
250 ng	1	0.9	1	1	1.1	0.5*	2
62 ng	1	0.7	1	1	1	0.6*	2.1
15 ng	1	0.8	1.4	1	1.3	0.2*	2.3

Los datos mostrados son el promedio de valores asignados por el programa de análisis de imágenes de dos experimentos independientes.

* Datos obtenidos a partir de un solo experimento

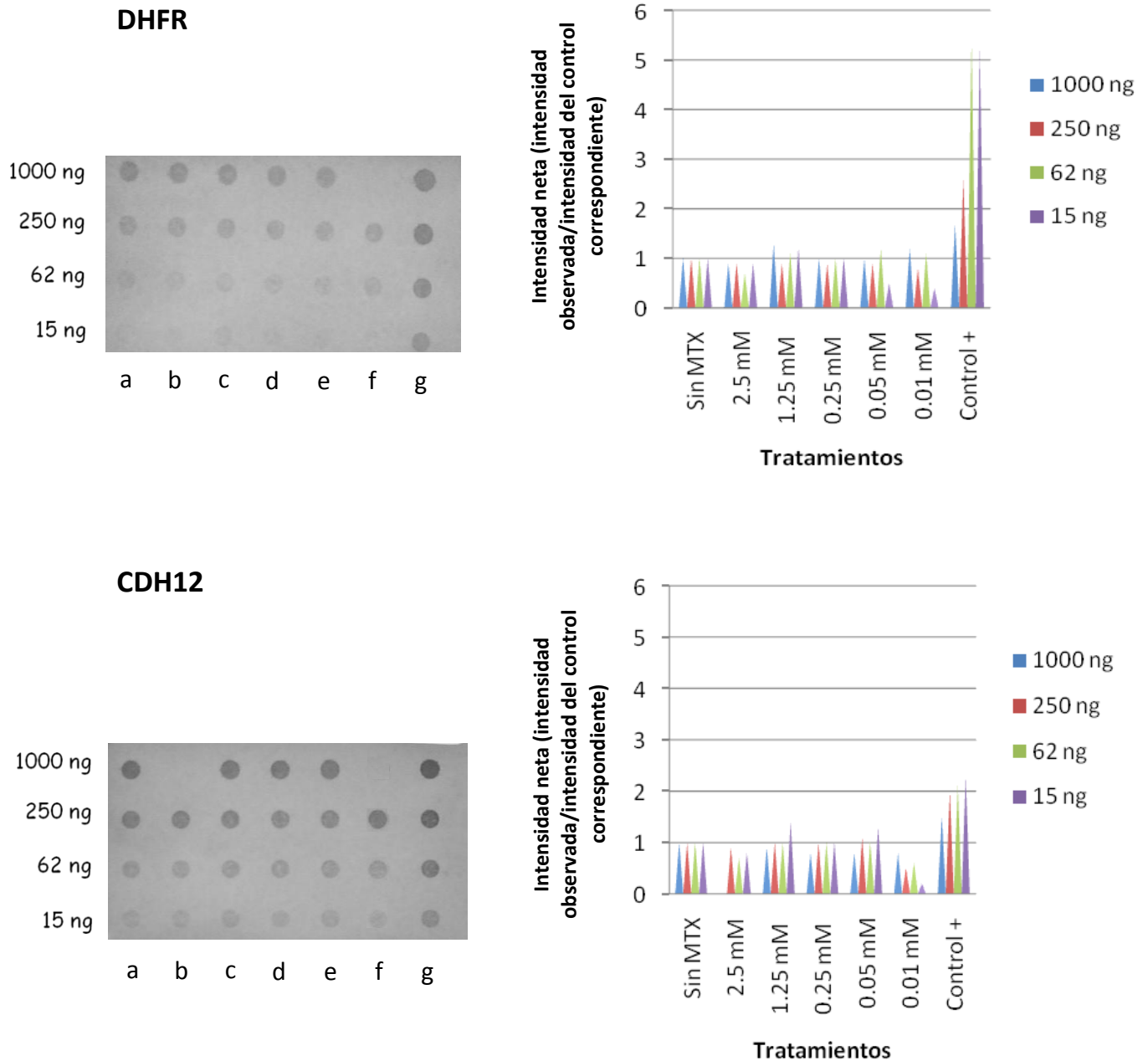


Figura 6. Membranas digitalizadas de la hibridación realizada para DHFR y CDH12 con cromógenos: a) Cultivos sin MTX; b. 2.5 mM de MTX; c. 1.25 mM de MTX; d. 0.25 mM de MTX; e. 0.05 mM de MTX; f. 0.01 mM de MTX; g. Control + (1000 ng de DNA genómico sin tratamiento + 1000 ng producto amplificado por PCR de cada gen respectivamente en el primer punto). Las gráficas que aparecen a los lados de cada membrana representan la intensidad neta obtenida por la razón entre la intensidad de los cultivos tratados sobre la intensidad de los cultivos control. Puede apreciarse en ambos genes que salvo el Control + todos los tratamientos exhiben valores similares a 1 o menos. La cantidad de DNA es equivalente a: 151,515 células para 1000 ng; 37,878 células para 250 ng; 9,393 células para 62 ng y 2,272 células para 15 ng.

5. Discusión

El metotrexato (MTX) es ampliamente usado en el tratamiento de algunos tipos de cáncer como leucemia y cáncer de mama; además de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y desordenes inflamatorios como la psoriasis. La toxicidad más frecuente asociada al MTX se da en tejidos de alta proliferación como la mucosa gastrointestinal, aunque también se presentan casos de hepatotoxicidad y neurotoxicidad; otros efectos son la inmunosupresión y en altas dosis reacciones anafilácticas [73]. Como carcinógeno el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) lo agrupa dentro del grupo III, que se refiere a aquellos compuestos para los cuales no existe suficiente evidencia [<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/Suppl7-102.pdf> 02/10/09, 5621 bytes], pese a esto, existen estudios en varios sistemas en los cuales se ha reportado un efecto genotóxico por parte del MTX, como el que se encontró en el presente trabajo.

En una línea celular (V79) derivada de células CHO y resistente a 1.6 mM de MTX se observó la formación de gemaciones de cromatina (GC) y micronúcleos (MN), incluso después de retirar el compuesto de los cultivos [44]. En células somáticas de *Drosophila* el MTX induce entrecruzamientos, y en ratones expuestos a tres diferentes dosis de este compuesto (2, 10 y 20 mg/kg) se encontró un efecto clastogénico con las pruebas de aberraciones cromosómicas y MN, las cuales se realizaron 24 y 30 hrs después de los tratamientos [74,75]. También se han realizado estudios en personas tratadas con antineoplásicos, por ejemplo, en un trabajo con niños enfermos de leucemia se encontró una menor frecuencia de MN antes de administrar quimioterapia; en otro estudio se analizó el daño genético en trabajadores de una fábrica que produce MTX y, lo que se encontró, fue una diferencia significativa entre los trabajadores y un grupo control con la prueba de MN, el ensayo cometa y la mutación de los genes HPRT y TCR [76].

En las condiciones de nuestro estudio, se observó claramente la formación de MN y GC; de estos eventos, la aparición de MN fue más frecuente con las distintas concentraciones usadas. Estos resultados además de demostrarnos que el MTX es un agente genotóxico, también pueden ser un indicio del origen del daño, es decir, si consideramos que el origen de los MN se debe a rompimientos de DNA o a cromosomas perdidos y, lo que observamos es una mayor frecuencia de MN, entonces podríamos decir que el efecto que está teniendo el MTX en los cultivos es un efecto clastogénico o aneugénico.

La evidencia sugiere que el daño que observamos es debido a la ruptura del DNA, lo que produciría fragmentos acéntricos que no serían integrados dentro del núcleo una vez concluida la mitosis. En apoyo a lo anterior, existen estudios en los cuales se ha evaluado el potencial genotóxico del MTX con el ensayo cometa, que es una prueba que permite medir rompimientos de cadena en el DNA; por ejemplo, en células ascíticas de tumor de Ehrlich se reportó el rompimiento de DNA (rompimientos de una sola cadena) con un tratamiento de 2 μ M en

diferentes tiempos de exposición [77]. En otros estudios con linfocitos humanos tratados in vitro, se ha reportado un efecto genotóxico en exposiciones de una hora y concentraciones de 10, 15 y 20 µg/ml (22, 33 y 44 µM respectivamente), así como una diferencia significativa en el rompimiento de cadenas sencillas con una concentración de 0.260 µM/ml y 24 hrs de exposición [78,79].

El mecanismo de acción propuesto para agentes como el MTX es de tipo indirecto, y el daño ocasionado podría ser provocado por un desbalance en el “pool” celular de los desoxirribonucleótidos (dNTPs), lo que sucedería al inhibir la regeneración de tetrahidrofolato, y con ello, la síntesis de timidilato. El descenso de este precursor podría a su vez, ocasionar la incorporación incorrecta de residuos de uracilo, que al ser removidos daría como resultado la fragmentación del DNA por la activación de endonucleasas o la formación de sitios apirimídicos que pueden dar lugar a fracturas de cadena [77,80,81].

El MTX también podría causar la pérdida de cromosomas completos, sin embargo, las pruebas de FISH con sondas centroméricas nos permiten reiterar un mayor efecto clastogénico, ya que el porcentaje de GC y MN (16.6 y 4.10 % respectivamente del total de eventos encontrados) con señal fue bajo. Al respecto, en un estudio realizado con una línea celular de fibroblastos permanentes de ratón, se encontró que solamente el 21.4% de MN inducidos con mitomicina C mostraban señal para el centrómero y telómeros, mientras que en cultivos tratados con colchicina el porcentaje de MN con ambas señales fue de 74.5% [82]. En un trabajo similar con los clastógenos mitomicina C y ciclofosfamida, además de las sustancias aneugénicas vinblastina y colchicina, el análisis de MN inducidos con estas últimas sustancias mostró que del 89 al 100% de los MN presentaba señal de sondas centroméricas, y que sólo entre un 9 y 12% de MN con señal eran inducidos por los clastógenos [83].

En cuanto a las GC, existe un estudio en linfocitos cultivados por nueve días, en el que se observó las diferencias en su contenido con sondas centroméricas y teloméricas después de ser inducidas con diferentes concentraciones de ácido fólico y 5-metiltetrahidrofolato. Sus resultados indican que del total de GC encontradas, un 43.5% tiene señal de secuencias teloméricas, 3.6% de centrómeros, 10.5% de centrómeros y telómeros y 42.7% no muestra señal alguna; en cuanto a los MN, el 62.2% da positivo para telómeros, 2.9% para centrómeros, 22% para ambas y el 12.9% no presenta ninguna señal. Para los autores, el gran porcentaje de GC sin señal sugiere que éstas se forman principalmente de DNA intersticial, que puede ser de genes amplificados, secuencias repetidas o restos de puentes formados en anafase [84]. En otro estudio con células tumorales fue posible detectar material de los cromosoma 9 y 3 en gemaciones nucleares (nuclear blebs), puentes (chromatin strings) y MN [85].



Figura 5.1. Núcleos unidos por cromatina con señal para secuencias centroméricas (flechas) en cultivos tratados con 10 μ M de metotrexato.

La posibilidad de rompimientos y rearrreglos entre cromosomas como los que dan origen a los cromosomas dicéntricos, puede ser la explicación a los puentes hallados en este trabajo, aunque éstos también podrían formarse de otro modo. En un artículo escrito por Daniela Cimini y Francesca Degrossi [37], se mencionan varios mecanismos de aneuploidía, uno de ellos, se produce cuando uno de los cinetocoros es fijado por los microtúbulos a ambos polos (Figura 1.2.b); cuando las cromátidas se separan, podría suceder que el cinetocoro (de una cromátida) al momento de ser jalado por los microtubulos hacia los dos polos se rompiera, y junto con él, el centrómero, de tal forma que se podría formar un “puente” entre los dos núcleos compuesto de secuencias centroméricas, como los que observamos en las preparaciones de cultivos tratados con MTX, hibridadas con secuencias satélite y teñidas con DAPI (Figura 5.1.). De ocurrir la formación de cromosomas dicéntricos, su rompimiento tendría que ser de igual forma cercano al centrómero, puesto que de ocurrir lejos no se esperaría la señal de las secuencias satélite.

Por otra parte, el índice de marcaje no mostró diferencias significativas entre el grupo control y los tratados, a pesar de esto, en el primero logramos observar una mayor cantidad de células con 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), lo que se explica por la posible inhibición de la síntesis en los cultivos tratados, lo que pudo haber ocasionado un retraso en el ciclo celular que, sin embargo, no fue significativo. Si el MTX detiene a las células en la etapa de replicación, lo que observamos en los cultivos es el resultado de las primeras 48 hrs de proliferación, en las cuales las células crecieron en condiciones idénticas y las variaciones entre los cultivos pueden ser por las diferencias de los linfocitos en su respuesta a un estímulo para dividirse, así como en su cinética de proliferación, las cuales pueden ocasionar que algunas células entren rápidamente en síntesis y tengan un ciclo corto, mientras que otras se retrasan en la etapa de replicación y consecuentemente presentan un ciclo más largo [86].

En un estudio realizado bajo condiciones de cultivo similares al nuestro [87], se reportó que el MTX en concentraciones tan bajas como 0.1 μ M ocasionó una disminución de las células en mitosis, efecto que es mantenido en concentraciones mayores. Sin embargo, el índice de replicación no se afectó aun en concentraciones de 100 μ M, lo que indica que el MTX puede ocasionar que las células se detengan antes de la mitosis, sin que se la concentración de MTX

tenga un efecto significativo en la replicación del DNA. En este sentido nuestro trabajo coincide con los resultados de E. Rojas y cols. [87].

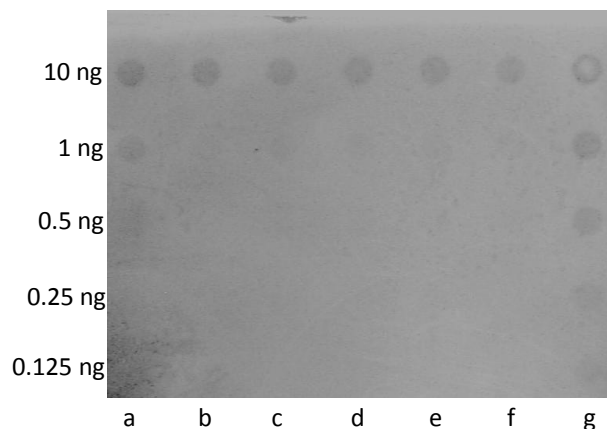
Con respecto a la amplificación génica del gen dihidrofolato reductasa (DHFR) y su detección en GC o MN, nuestros resultados con FISH no mostraron evidencia alguna de amplificación; sin embargo, tampoco logramos detectar su señal o la de cadherina 12 (CDH12) en núcleos ni en cromosomas en metafase, lo que puede ser debido al tamaño de las sondas empleadas, que fueron de 231 y 859 pb para DHFR y CDH12 respectivamente. En el caso de DHFR, el fragmento se había utilizado previamente en una PCR semicuantitativa para detectar la amplificación génica en pacientes con cáncer de mama [64,72], y aunque al parecer su tamaño afecta su visualización al microscopio, esto puede ser una evidencia de que no existe amplificación en nuestros cultivos, ya que de ser así, se habría podido distinguir una señal intensa si las amplificaciones se encontraran cerca, tal como ocurre en el caso de las secuencias satélite, que a pesar de medir entre 5 y 171 pb su arreglo en tándem les permite formar bloques con un tamaño que puede alcanzar hasta 100 kb (100,000 pb) [88].

Debido a que no fue posible obtener una evidencia directa de amplificación contenida en GC y MN, ni en núcleos interfásicos por la técnica de FISH, se buscó determinar si el tratamiento pudo inducir amplificación de DHFR en el cultivo total, mediante el método de dot blot, el cual nos permitió responder esta interrogante y los resultados no dan muestra de ello. Al comparar los valores de los distintos tratamientos con el control negativo, no se observó una gran diferencia entre éstos, a diferencia del Control +, en el que se simuló una condición de amplificación, al agregar más fragmentos complementarios a las secuencias de DNA utilizadas como sondas, como si fueran copias extra producto de amplificación génica.

Algo notable en las imágenes digitalizadas de los primeros dot blot, fue que en la menor cantidad de DNA utilizada (15 ng) la diferencia entre los cultivos y el Control + fue más evidente, puesto que tenían la misma cantidad de DNA genómico, entonces la diferencia de intensidad podría atribuirse al exceso de copias de la secuencia de DHFR en el Control +. Con la finalidad de llegar a un nivel de detección mayor, se realizó un nuevo dot blot para detectar la secuencia de DHFR usando cantidades menores de DNA genómico, que iban desde 10 ng a 0.125 ng, y el cual fue revelado con quimioluminiscencia para lograr una mayor sensibilidad (Figura 5.2.). En este dot blot al igual que en los anteriores la señal es muy similar entre los distintos tratamientos y el control negativo, esto hasta la cantidad de 1ng de DNA, mientras que la señal en Control + aun es visible con esa misma cantidad y hasta 0.125 pg de DNA, debido al exceso de copias de la secuencia de DHFR.

Estos resultados no muestran indicios de amplificación génica, aunque si ésta llegara a suceder se esperaría que fuera un evento raro. Así lo demuestran estudios realizados en células humanas y de roedores no transformadas, las cuales fueron expuestas a diferentes agentes químicos, entre ellos el MTX, y en los que no se halló evidencias de amplificación en un rango de 10^{-8} células, mientras que la aparición en células transformadas es en el rango de 10^{-3} [70,71]. Si la frecuencia

Figura 5.2. Membrana digitalizada de la hibridación realizada para DHFR y revelada con quimioluminiscencia: **a)** Cultivos sin MTX; **b.** 2.5 mM de MTX; **c.** 1.25 mM de MTX; **d.** 0.25 mM de MTX; **e.** 0.05 mM de MTX; **f.** 0.01 mM de MTX; **g.** Control + (DNA genómico más el producto amplificado por PCR del gen DHFR).



de amplificación es tan baja, no se habría esperado detectar en los dot blot de células normales, ya que la mayor cantidad de DNA utilizada (1 μ g) equivaldría solamente a 151,515 células, y además se debe recordar las condiciones en la cuales se llevaron a cabo los cultivos en el presente trabajo.

El objetivo del presente trabajo fue comprobar si las GC, que se forman bajo las condiciones en las que normalmente se realiza la prueba de MN *in vitro* para estudios de genotoxicidad, podrían estar constituidas por genes amplificados; en ese sentido, las condiciones normales implican cultivos entre 48 y 72 horas, y la exposición a algún agente químico suele ser de 24 horas o menos. Estas condiciones fueron las que se siguieron en este trabajo, con un modelo de amplificación como lo es DHFR-MTX.

Como se ha mencionado anteriormente, la evidencia de amplificación génica se deriva de líneas celulares en cultivo, células derivadas de algún tumor o bajo una selección por exposición [53,89-91]. La intención de llevar a cabo cultivos en los cuales células no transformadas estuvieran expuestas durante una sola división, consistió en estudiar la posibilidad de encontrar GC con genes amplificados producto de tiempos cortos de exposición, tomando la propuesta hecha por Fenech y cols. a partir de estudios realizados por Shimizu y cols. con la línea tumoral COLO 320DM [17,45-47], y que a pesar de no haber sido comprobada, si se ha manejado ya por otros autores [13]. Si se llegan a presentar GC producto de amplificación génica, debe considerarse en qué condiciones son formadas, porque las GC encontradas en la prueba de MN, al igual que los mismos MN se forman después de un tiempo de cultivo corto y exposiciones únicas, así como en células no transformadas. Con respecto a células no transformadas, existe sólo un reporte de amplificación del gen HRAS (c-Ha-ras-1) en fibroblastos humanos normales durante la última etapa de su cultivo *in vitro* [68].

Por otro lado, si se acepta que las GC encontradas en la prueba de MN contienen genes amplificados, se podría pensar que esto también sucede *in vivo* ante la exposición de un agente capaz de generar amplificación. La amplificación *in vivo* en personas enfermas con algún tipo de cáncer se ha reportado [64,65,92,93]; sin embargo, de la amplificación *in vivo* por exposición sólo

existe un reporte del gen butirilcolinesterasa (BCHE, CHE) en un padre y su hijo, miembros de una familia expuesta a plaguicidas organofosforados por varias generaciones [69].

Tampoco se puede rechazar la amplificación génica como mecanismo para la formación de GC y MN, tal como se puede observar en los estudios realizados con la línea tumoral COLO 320DM. Si entendemos a las GC o MN como cuerpos que contienen material genético que no está siendo retenido dentro del núcleo, copias extra de genes pueden formar parte de estos eventos; como ya se ha mencionado, la cuestión no sólo es de qué están formados, sino también bajo qué condiciones se puede tener un fragmento, un cromosoma o un gen amplificado en las GC y aun en los MN. En la literatura se ha reportado que la amplificación es un evento que se induce bajo una presión química y resulta en que las células portadoras resisten esa presión y sobreviven. Cuando se ha hecho en líneas transformadas, esta resistencia se da con una cierta frecuencia, es decir, no todas las células de la línea celular muestran la amplificación. Lo mismo se esperaría en células normales y quizás con una frecuencia considerablemente más baja, por lo que si hemos de detectar estos eventos hace falta otro tipo de diseño experimental.

Lo cierto es que cuando una célula muestra protuberancias en la superficie de su envoltura nuclear puede ser que el núcleo expulsa o introduce algo; con esta idea en mente, las GC que observamos pueden ser fragmentos de DNA expulsados o material genético reintroducido, material que puede ser parte de un puente roto.

Cabe decir que el estudio de la amplificación génica como elemento de inestabilidad genética o factor en el desarrollo de tumores malignos es un tema de gran interés; por lo que de seguir estudiando este fenómeno podría considerarse la selección y clonación de linfocitos en cultivos de largo tiempo. De esta manera se podrían contestar otras cuestiones, como la población de células que podrían experimentar amplificación génica y el rango de amplificados; además de las preguntas que ya se han formulado anteriormente como saber si el evento de amplificación ocurre en células no transformadas, en qué condiciones sucede y qué pasa con los amplificados.

6. Conclusiones

Como conclusiones del presente trabajo podemos mencionar las siguientes.

En la prueba de micronúcleos con 5-bromo-2'desoxiuridina el metotrexato ocasiona la formación de gemaciones de cromatina, micronúcleos y puentes nucleoplásmicos utilizando sangre entera; de estos eventos, la frecuencia de micronúcleos fue mayor.

No se encontraron evidencias de amplificación génica del gen dihidrofolato reductasa por FISH y Dot blot en las condiciones de cultivo utilizadas, las cuales consistieron de una exposición única a metotrexato en diferentes concentraciones por 24 horas.

Los eventos genotóxicos observados en cultivos de sangre entera de corta duración, ocasionados por el metotrexato, son en su mayor parte material genético acéntrico.

Complemento I

Frecuencias de GC y MN en mil células por los tratamientos con MTX en cultivos sin BrdU

Tratamientos	No. Células evaluables	GC	MN
Control	4,560	0.4	2.6
0.01 mM	3,120	1	3.2
0.05 mM	3,480	1.7	4
0.25 mM	3,840	1	3
1.25 mM	3,120	1	4
2.5 mM	3,120	2.2	3.2

Las células evaluables se calcularon multiplicando el índice de marcaje de cada tratamiento por 12,000, para así obtener el número de células que proliferaron en estos cultivos y sobre ellas calcular la frecuencia de GC y MN.

La frecuencia en mil células se obtuvo dividiendo el número de GC o MN entre el número de células evaluables por 1000.

Como puede observarse en la presente tabla, en cultivos sin BrdU la frecuencia de GC y MN es menor con respecto a los cultivos con BrdU, diferencia que puede ser por un efecto sinérgico entre el MTX y la BrdU. El MTX al afectar la síntesis *de novo* de timidina, podría ocasionar un aumento en la incorporación no sólo de residuos de uracilo, sino de la misma BrdU, nucleótidos que al ser removidos daría como resultado un mayor cantidad de cortos en el DNA, que podrían a su vez resultar en una mayor fragmentación. Sin embargo, también puede notarse que la frecuencia de MN es mayor que la de GC, como en los cultivos con BrdU.

Complemento II

Electroferogramas Dihidrofolato reductasa (DHFR)

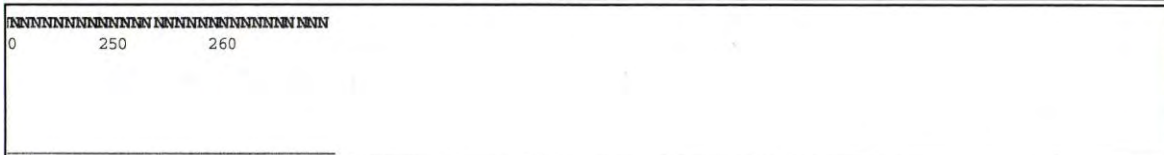
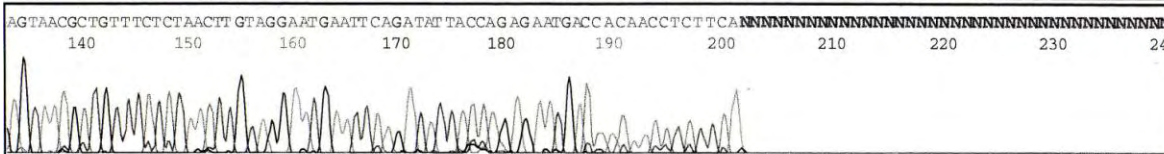
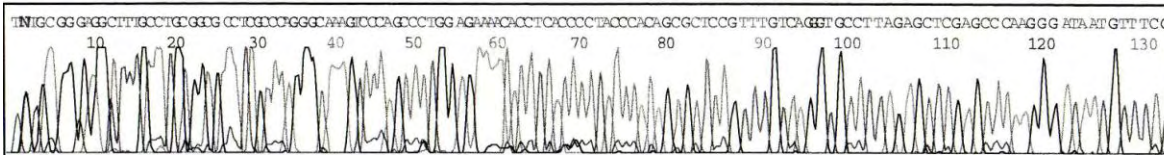


Model 310
Version 3.3
ABI-CE1
Version 3.2

231+231sFwSample3
Dra. Montero
231+231sFw
Lane 3

Signal G:1316 A:1418 T:894 C:1905
DT310POP6(BDv3)v1.mob
BDT3.0_30may07
Points 1453 to 4408 Pk 1 Loc: 1453

Page 1 of 1
miér., 17 octu 2007 08:57
mart., 16 octu 2007 19:45
Spacing: 10.78(10.78)

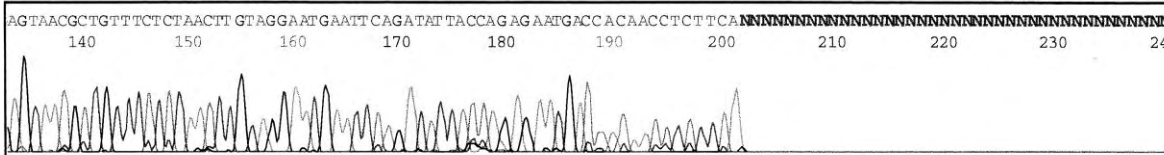
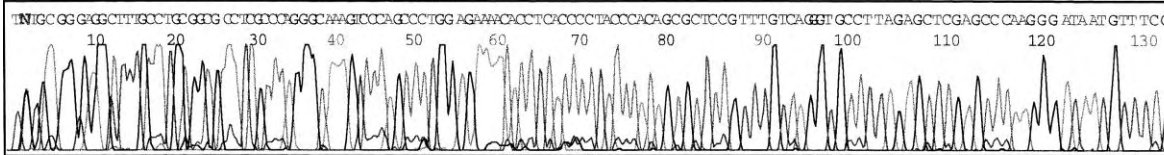


Model 310
Version 3.3
ABI-CE1
Version 3.2

231+231sFwSample3
Dra. Montero
231+231sFw
Lane 3

Signal G:1316 A:1418 T:894 C:1905
DT310POP6(BDv3)v1.mob
BDT3.0_30may07
Points 1453 to 4408 Pk 1 Loc: 1453

Page 1 of 1
miér., 17 octu 2007 08:57
mart., 16 octu 2007 19:45
Spacing: 10.78(10.78)



Complemento III



CANCER GENETICS, INC.

Scientific Leadership in CANCER GENETICS

Fluorescent in situ hybridization (FISH) protocol ULS™-dGreen and ULS™-Rhodamine labeled probes for translocation, locus specific and chromosome copy number detection

ULS™-dGreen and/or ULS™-Rhodamine labeled ready-to-use probes are tested for co-denaturation of probe and target on a temperature controlled hot plate, thus avoiding use of formamide during pre and post hybridization steps. Probe performance was also tested under denaturation conditions using 70% formamide/2X SSC. It is important to view all the target slides under phase contrast for sparse cells and visible cytoplasm before proceeding to FISH hybridization.

Protocol I & II

Gloves
Ethanol
20X SSC
10% SDS
Coplin Jar
Water bath
DAPI/antifade
Micro centrifuge
Deionized formamide*
0.5ml microfuge tube
Autoclaved distilled water
Cover slip 22x22 & 24x50
Temp. controlled hot plate

*required for formamide denaturation only

REAGENT PREPARATION

Note: Use autoclaved water for the preparation of all stock and working solutions

Alcohol Series

•Prepare fresh 70%, 80% and 100% ethanol and store at room temperature (RT).
•Prepare a second set of ethanol series and store at -20°C for probe denaturation using the formamide method.

20% (w/v) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
•Dissolve 1 g of SDS in distilled water to a final volume of 5 ml. This reagent may be stored at room temperature (RT). Resolubilize any crystallized SDS by heating at 37°C prior to use.

20xSSC
•Dissolve 175.3 g Sodium chloride and 88.23 g tri-sodium-citrate in 900 ml of water.
•Bring the volume to 1000 ml and adjust to pH 7.0 with hydrochloric acid (HCL). (Sigma Catalog # S6639).

70% Formamide/2XSSC
•For 50 ml, add 35 ml formamide, 10 ml distilled water, 5 ml 20X SSC. Adjust pH to 7.0 using HCL. Pre-heat to 75°C in a water bath. (Sigma Catalog # F7503).

0.5xSSC/0.1% SDS
•For 1000 ml mix 25 ml of 20X SSC and 5 ml of 20% SDS in sterile distilled water and store at RT.

0.01M HCL
•Add 0.5 ml of 1M HCL to 49.5 ml of sterile distilled water. Pre-warm the solution to 37°C in a water bath.

Pepsin Stock Solution
•Prepare 10% stock (100 mg/ml) in sterile distilled water. Store at -20°C. (Sigma Catalog # P6887.)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (1x)
•Prepare PBS and store at RT. (Sigma Catalog # 1000-3).

1% Formaldehyde
•Add 2.7 ml of 37% formaldehyde to 100 ml of 1X PBS and store at RT. (37% Formaldehyde - Sigma Catalog # F1268)

2X SSC/0.1% Tween 20
•Add 100 ml of 20X SSC and 1.0ml Tween 20 to a total of 1000 ml distilled water mix well on a magnetic stir plate and store at RT.

DAPI
•(Vector Laboratories H-1200)

Mounting medium/antifade
•(Vector Laboratories H-1000)

Tween 20
•(Fisher Scientific: BP337-100)

Additional items for Protocol I

Tween 20
Hydrochloric acid
37% Formaldehyde
Pepsin
Phosphate Buffered Saline

In addition to the items required for protocol I the above items are required for protocol II

PROTOCOL I:

For cells with visible cytoplasm surrounding interphase and metaphase

Slide Preparation

1. Incubate slide in 0.01M HCl with 0.005% pepsin at 37°C for 10 min.
2. Wash slide 2 x 1 min in PBS at RT.
3. Incubate slide for 10 min in 1% formaldehyde in PBS at RT.
4. Wash slide for 2 x 1 min in PBS at RT.
5. Dehydrate slides in 70%, 95%, 100% Ethanol at RT for 1 min each.
6. Air dry.

Probe Denaturation/ Hybridization

1. Aliquot 10 µl of probe for each target into 0.5 ml microfuge tube.
2. Incubate at 96°C for 5 min in water bath.
Procedure Note: Do not heat probes for more than 5 minutes.
3. Shortly spin the tube in a micro centrifuge.
4. Apply 10 µl of the probe mix to each target and cover with a cover-slip (22x22mm).
Procedure Note: Care should be taken to avoid air bubbles.
5. Denature slide and probe for 2 min at 80°C on a temperature controlled hot plate.
6. Incubate for 12-18 hours in a humidified environment at 37°C.

Post Hybridization Washing

1. Remove cover-slip by soaking in 2X SSC/0.1% Tween-20 at 37°C.
2. Wash slide 4 x 5 min in 0.5X SSC/0.1% SDS at 60-65°C.
3. Briefly rinse slides in distilled water.
4. Air dry slides out of direct light.
5. Apply 20 µl DAPI/anti fade solutions to the target and cover with a cover slip. (24x50mm).

Storage of slides

Store hybridized slides at -20°C in dark.

Storage of Probe

Store probe at 4 °C

The DNA for the probes in this product was manufactured by Cancer Genetics, Inc, Cambridge, MA, USA. The probes in this product are labeled with the Universal Linkage System (ULS®) and manufactured by KREATECH Biotechnology BV, Amsterdam, The Netherlands. ULS and KREATECH are registered trade marks of KREATECH Biotechnology BV, Amsterdam, The Netherlands.

PROTOCOL II:

For fresh slides from cultured cells and from direct harvest.

This protocol is recommended for cultured cells fixed in Methanol:Acetic Acid (3:1) and for cells prepared by direct harvest. For samples requiring same day hybridization or with-in 24 hours, pre-treatment in 2X SSC at 37°C for 2-3 hours is required for better probe performance and consistent results.

Slide Preparation

Procedure Note: If slides are pretreated in 2X SSC rinse briefly in distilled water then proceed to dehydration

Method A. Probe Denaturation and Hybridization (Hot plate method)

- Slide denaturation**
1. Dehydrate slide in 70%, 80% and 100% Ethanol at RT for 1 min each.
 2. Air dry.
 3. Aliquot 10 µl of probe for each slide into 0.5 ml microfuge tube.
 4. Incubate the tube at 96°C for 5 min in water bath.

Procedure Note: Do not heat probes for more than 5 min.

5. Shortly spin the tube in a micro centrifuge.
6. Apply probe mix to each slide and cover with a cover-slip (22x22mm).

Procedure Note: Preset the hot plate to the required temperature.

7. Denature slide and probe for 2 min at 80°C on a temperature controlled hot plate.
8. Incubate for 12-18 hours in a humidified environment at 37°C.

Method B. Probe Denaturation and Hybridization (Formamide method)

- Slide denaturation**
1. Dehydrate slide in 70%, 80% and 100% Ethanol at RT for 1 min each.
 2. Air dry for 5 min.
 3. Denature slides in denaturing solution for 2-3 min at 75°C.
 4. Incubate in cold alcohol series (70%, 80% and 100%)
 5. Air dry.

Probe denaturation

1. Aliquot 10 µl of probe for each slide into 0.5 ml microfuge tube.
2. Incubate the tube at 75°C for 7 min in water bath.
3. Incubate at 37°C for 10 min.
4. Shortly spin the tube in a micro centrifuge.
5. Apply probe mix to each slide and cover with a cover-slip (22x22mm).
7. Incubate for 12-18 hours in a humidified environment at 37°C.

Post Hybridization Wash: Same procedure for methods A & B

1. Remove cover slip and wash slide twice in 0.5X SSC/0.1 %SDS at 45°C for 5 min each.
2. Briefly rinse slide in distilled water.
3. Air dry.
4. Apply 20 µl DAPI/antifade (40 ng/ml) to the hybridized target and cover with cover slip (24x50 mm).

Procedure Note: Lower concentration of DAPI/antifade allows better signal visualization under triple band filter.

2004 Rev 3.07

Bibliografía

1. R.R. Misra y M.P. Waalkes, Toxicología genética, En: E.K. Silbergeld, Toxicología, Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, Vol. I, parte IV, capítulo 33.
<http://www.ilo.org/public/spanish/protection/safework/cis/products/encyclo/index.htm>
2. J.M. García-Sagredo, Fifty years of cytogenetics: a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology, *Biochimica et Biophysica Acta* 2008, 1779: 363-375.
3. D.F. Smeets, Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray, *Clinical Biochemistry* 2004, 37: 439-446.
4. S. Gilgenkrantz y E.M. Rivera, The history of cytogenetics portraits of some pioneers, *Annales de Génétique* 2003, 46: 433-442.
5. S.M. Gartler, The chromosome number in humans: a brief history, *Nature Reviews Genetics* 2006, 7: 655-660.
6. B.J. Trask, Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting, *Nature Reviews Genetics* 2002, 3: 769-778.
7. C.M. Muñeton y J.L. Ramírez, Citogenética de tumores sólidos, *IATREIA* 2002, 15 (2): 86-95.
8. C.W. Theodorakis, Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment, *Ecotoxicology* 2001, 10: 245-256.
9. J.W. Bickham, S. Sandhu, P.D.N. Hebert, L. Chikhi y R. Athwal, Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology, *Mutation Research* 2000, 463: 33-51.
10. J. Pincheira, Daño, reparación y mutación del material genético, *Mediterraneo, Chile*, 2000, pp. 87-93.
11. M. Shimada y M. Nakanishi, DNA damage checkpoints and cáncer, *Journal of Molecular Histology* 2006, 37: 253-260.
12. H. Norpa, Cytogenetic biomarkers, En: P. Buffler, J. Rice, R. Baan, M. Bird y P. Boffetta (eds), *Mechanisms of Carcinogenesis: Contribution of Molecular Epidemiology*, IARC Scientific Publications No. 157, Lyon, France, 2004, pp. 179-196.
13. R. Mateuca, N. Lombaert, P.V. Aka, I. Decordier y M. Kirsch-Volders, Chromosomal changes: induction, detection methods and aplicability in human biomonitoring, *Biochimie* 2006, 88 (11): 1515-31.
14. H. Norppa, S. Bonassi, I.-L. Hansteen y cols., Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cáncer risk, *Mutation Research* 2006, 600: 37-45.
15. S. Bonassi, A. Znaor, M. Ceppi y cols., An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cáncer in humans, *Carcinogenesis* 2007, 28 (3): 625-631.

16. S. Bonassi, D. Ugolini, M. Kirsch-Volders, U. Strömberg, R. Vermeulen y J.D. Tucker, Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2005, 45: 258-270.
17. M. Fenech, Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cáncer, *Drug Discovery Today* 2002, 7 (22): 1128-37.
18. W.-U. Müller y C. Streffer, Micronucleus assays, En: G. Obe (ed), *Advances in Mutagenesis Research* 5, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1994, pp.1-108.
19. M. Zalacain, L. Sierrasesúмага y A. Patiño, El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos, *Anales del sistema sanitario de Navarra* 2005, 28 (2): 227-235.
20. A. Wojda y M. Witt, Manifestations of ageing at the cytogenetic level, *Journal of Applied Genetics* 2003, 44 (3): 383-399.
21. M. Fenech, Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs), *Food and Chemical Toxicology* 2002, 40: 1113–1117.
22. H. Ishikawa, Y. Miyatsu, K. Kurihara y K. Yokoyama, Gene–environmental interactions between alcohol-drinking behavior and ALDH2 and CYP2E1 polymorphisms and their impact on micronuclei frequency in human lymphocytes, *Mutation Research* 2006, 594: 1-9.
23. R. Montero, L. Serrano, A. Araujo, V. Dávila, J. Ponce, R. Camacho, E. Morales y A. Méndez, Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes, *Mutagenesis* 2006, 21 (5): 335-342.
24. H.J. Evans, Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 1997, 392: 5-10.
25. B. Matter y W.S. Schmid, Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of Mutagenesis* 1971, 12 (4): 417-425.
26. J. A. Heddle, A rapid in vivo test for chromosomal damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of Mutagenesis* 1973, 18 (2): 187-190.
27. W.F. Grant, The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1994, 310: 175-185.
28. T.-H. Ma, G. L. Cabrera, R. Chen, B.S. Gill, S.S. Sandhu, A. L. Vandenberg y M.F. Salamone, *Tradescantia* micronucleus bioassay, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1994, 310: 221-230.
29. S. Cotelle, J-F. Masfaraud, J-F. Férad, Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1999, 426: 167-171.

30. M. Hayashi, T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni y M. Ishidate Jr., The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research Letters* 1990, 245: 245-249.
31. C.K. Grisolia y C.M. Torres, variability in micronucleus induction with mutagens applied to several species of fish, *Genetics and Molecular Biology* 2000, 23 (1): 235-239.
32. M. P. Rosin, The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1992, 267 (2): 265-276.
33. R. Montero, L. Serrano, V. Dávila, Y. Segura, A. Arrieta, R. Fuentes, I. Abad, L. Valencia, P. Sierra y R. Camacho, Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2003, 42: 216-222.
34. R. Montero-Montoya, L. Serrano y P. Ostrosky-Wegman, In vitro induction of micronuclei in lymphocytes: the use of bromodeoxyuridine as a proliferation marker, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 1997, 391: 135-141.
35. M. Fenech y A. A. Morley, Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Research* 1985, 147: 29-36.
36. P.I. Countryman y J.A. Heddle, The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1976, 41: 321-332.
37. D. Cimini y F. Degrossi, Aneuploidy: a matter of bad connections, *TRENDS in Cell Biology* 2005, 15 (8): 442-451.
38. M. Fenech, The in vitro micronucleus technique, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2000, 455: 81-95.
39. H. Acar, Ü. Caliskan, S. Demirel y D.A. Largaespada, Micronucleus incidence and their chromosomal origin related to therapy in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients: detection by micronucleus and FISH techniques, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*
40. H.W. Chung, S.J. Kang y S.Y. Kim, A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2002, 516: 49-56.
41. A. Crosby y G. Yerganian, Some observations on nuclear budding and nuclear extrusions in a Chinese Hamster cell cultura, *Journal of the National Cancer Institute* 1965, 34: 53-69.
42. P.E. Tolbert, C.M. Shy y J.W. Allen, Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development, *Mutation Research* 1992, 271: 69-77.
43. L. Serrano-García y R. Montero-Montoya, Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2001, 38: 38-45.

44. M. Miele, S. Bonatti, P. Menichini, L. Ottaggio y A. Abbondandolo, The presence of amplified regions affects the stability of chromosomes in drug-resistant Chinese hamster cells, *Mutation Research* 1989, 219: 171-178.
45. M. Fenech y J.W. Crott, Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2002, 504: 131-136.
46. N. Shimizu, N. Itoh, H. Utiyama y G.M. Wahl, Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase, *Journal of Cell Biology* 1998, 140 (6):1307-1320.
47. N. Shimizu, T. Shimura y T. Tanaka, Selective elimination of acentric minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2000, 448: 81-90.
48. F. Toledo, D. Le Roscouet, G. Buttin y M. Debatisse, Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification, *The EMBO Journal* 1992, 11 (7): 2665-2673.
49. T. Hirano, K. Shiraishi, K. Adachi, S. Miura, H. Watanabe y H. Utiyama, Co-localization of mitochondrial and double minute DNA in the nuclei of HL-60 cells but not normal cells, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1999, 425: 195-204.
50. G. Karp, *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*, McGraw-Hill Interamericana, México, 1998, pp. 389-394.
51. J.L. Hamlin, J.D. Milbrandt, N.H. Heintz y J.C. Azizkhan, DNA sequence amplification in mammalian cells, *International Review of Cytology* 1984, 90: 31-82.
52. I.B. Roninson, H.T. Abelson, D.E. Housman, N. Howell y A. Varshavsky. Amplification of specific DNA sequences correlates with multi-drug resistance in Chinese hamster cells, *Nature* 1984, 309: 626-628.
53. F. Mahjoubi, R.J. Hill y G.B. Peters, Chromosome microdissection identifies genomic amplifications associated with drug resistance in a leukemia cell line: an approach to understanding drug resistance in cancer, *Chromosome Research* 2006, 14: 623-276.
54. M. Schwab, Oncogene amplification in solid tumors, *Seminars in Cancer Biology* 1999, 9: 319-325.
55. D.G. Albertson, Gene amplification in cancer, *TRENDS in Genetics* 2006, 22 (8): 447-455.
56. G.R. Stark, M. Debatisse, G.M. Wahl y D.M. Glover, DNA amplification in eukaryotes, En: B.D. Hames y D.M. Glover (eds), *Gene Rearrangement*, Oxford University Press, 1990, pp. 99-138.
57. D.L. Nelson y M.M. Cox, *Lehninger principios de Bioquímica*, Ediciones Omega, Barcelona, España, 2001, pp. 848-865.

58. L. Genestier, R. Paillot, L. Quemeneur, K. Izeradjene y JP. Revillard, Mechanisms of action of methotrexate, *Immunopharmacology* 2000, 47: 247-257.
59. N.P. Anagnou, S.J. O'Brien, T. Shimada, W.G. Nash, M-J. Chen y A.W. Nienhuis, Chromosomal organization of the human dihydrofolate reductase genes: dispersion, selective amplification, and a novel form of polymorphism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984, 81: 5170-5174.
60. P.J. Mishra, R. Humeniuk, P.J. Mishra, G.S.A. Longo-Sorbello , D. Banerjee y J. Bertinos, A mirR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104: 13513-13518.
61. C. Lücke-Huhle, Review: gene amplification-a cellular response to genotoxic stress, *Molecular Toxicology* 1989, 2 (4): 237-253.
62. C. Morales, M. Ribas, G. Aiza y M.A. Peinado, Genetic determinants of methotrexate responsiveness and resistance in colon cancer cells, *Oncogene* 2005, 24: 6842-6847.
63. B. Lewis, *Genes VIII*, Pearson Prentice Hall, United States of America, pp. 534-536.
64. U. Lönn, S. Lönn, B. Nilson y B. Stenkvist, Higher frequency of gene amplification in breast cancer patients who received adjuvant chemotherapy, *CANCER* 1996, 77 (1): 107-112.
65. R. Nano, R. Invernizzi, A. Facchetti, E. Raimondi, D. Moralli y G. Gerzeli, Quantification of the DHFR gene in blast cells of leukaemia patients by fluorescence *in situ hybridisation*, *Anticancer Research* 2003, 23: 3883-3888.
66. S. Rodenhuis, J.M. Kremer y J.R. Bertino, Increase of dihydrofolate reductase in peripheral blood lymphocytes of rheumatoid arthritis patients treated with low-dose oral methotrexate, *Arthritis and Rheumatoid* 1987, 30 (4): 369-374.
67. D. Banerjee, P. Mayer-Kuckuk, G. Capioux, T. Budak-Alpdogan, R. Gorlick y J.R. Bertino, Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase, *Biochimica et Biophysica Acta* 2002, 1587: 164-173.
68. A. Srivastava, J.S. Norris, R.J. Shmookler Reis y S. Goldstein, c-Ha-ras-1 Proto-oncogene amplification and overexpression during the limited replicative life span of normal human fibroblasts, *The Journal of Biological Chemistry* 1985, 260 (10): 6404-6409.
69. C.A. Prody, P. Dreyfus, R. Zamir, H. Zakut y H. Soreq, De novo amplification within a "silent" human cholinesterase gene in a family subjected to prolonged exposure to organophosphorous insecticides, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, 86: 690-694.
70. J.A. Wright, H.S. Smith, F.M. Watt, M.C. Hancock, D.L. Hudson y G.R. Stark, DNA amplification is rare in normal human cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, 87: 1791-1795.

71. T.D. Tlsty, Normal diploid human and rodent cells lack a detectable frequency of gene amplification, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, 87: 3132-3136.
72. U. Lönn, S. Lönn y B. Stenkvist, Appearance of amplified thymidylate synthase or dihydrofolate reductase genes in stage-IV breast-cancer patients receiving endocrine treatment, *International Journal Cancer* 1993, 54: 237-242.
73. D.J. Sweeny y B. Diasio, Toxicity of antimetabolites, En: G. Powis y M.P. Hacker (Eds), *The toxicity of anticancer drugs*, Pergamon Press 1991, New York, United States of America, pp. 63-68.
74. F.E. Würgler, U. Graf, H. Frei y H. Juon, Genotoxic activity of the anti-cancer drug methotrexate in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutation Research Letters* 1983, 122: 321-328.
75. R.C. Choudhury, S.K. Ghosh y A.K. Palo, Cytogenetic toxicity of methotrexate in mouse bone marrow, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2000, 8: 191-196.
76. H. Deng, M. Zhang, J. He, W. Wu, L. Jin, W. Zheng, J. Lou y B. Wang, Investigating genetic damage in workers occupationally exposed to methotrexate using three genetic end-points, *Mutagenesis* 2005, 20 (5): 351-357.
77. J.C. Li y E. Kaminskis, Accumulation of DNA strand breaks and methotrexate cytotoxicity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984, 81: 5694-5698.
78. S. Enciso Sosa, Estudio de efecto genotóxico del metotrexato con el ensayo cometa en linfocitos humanos, Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, UNAM, México, 2000, 60 p.
79. P. Mussali Galante, ¿Es la técnica de electroforesis unicelular (ensayo cometa) capaz de predecir el efecto de fármacos antineoplásicos? Estudio inicial sobre la inducción de daño al DNA de sustancias antineoplásicas con mecanismos de acción conocidos, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 2001, 113 p.
80. A. Yoshioka, S. Tanaka, O. Hiraoka, Y. Koyama, Y. Hirota, D. Ayusawa, T. Seno, C. Garrett y Y. Wataya, Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance, *The Journal of Biological Chemistry* 1987, 262 (17): 8235-8241.
81. B.C. Blount, M.M. Mack, C.M. Wehr, J.T. MacGregor, R.A. Hiatt, G. Wang, S.N. Wickramasinghe, R.B. Everson y B.N. Ames, Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and Chromosome breakage: implications for cáncer and neuronal damage, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94: 3290-3295.
82. Y.M. Jie y C. Jia, Chromosomal composition of micronuclei in mouse NIH 3T3 cells treated with acrylamide, extract of *Tripterygium hypoglaucum* (level) hutch, mitomycin C and colchicine, detected by multicolor FISH with centromeric and telomeric DNA probes, *Mutagenesis* 2001, 16 (2): 145-149.

83. C.S. Farabaugh, D.J. Roberts, S.K. Roy, C.A. Middendorf y Jr L.E. Stankowski, Validation of the *in vitro* micronucleus assay and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in human lymphocytes, *Environmental and molecular Mutagenesis* 2008, 49 (7): 574, Resumen P104.
84. H.K. Lindberg, X. Wang, H. Järventaus, G.C.-M. Falck, H. Norppa, M. Fenech, Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2007, 617 (1-2): 33-45.
85. D. Gisselsson, J. Björk, M. Höglund, F. Mertens, P. Dal Cin, M. Åkerman y Nils Mandahl, Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability, *American Journal of Pathology*, 158 (1): 199-206.
86. P.E. Crossen y W.F. Morgan, Proliferation of PHA-stimulated lymphocytes measured by combined autoradiography and sister chromatid differential staining, *Experimental Cell Research* 1979, 118: 423-427.
87. E. Rojas, L.A. Herrera, M. Sordo, M.E. Gonsebatt, R. Montero, R. Rodríguez y P. Ostrosky-Wegman, Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity, *Anti-Cancer Drugs* 1993, 4: 637-640.
88. T. Strachan y A.P. Read, *Human molecular genetics 2*, Oxford: Bios Scientific, New York, USA, 1999, pp. 160-162.
89. M. Serra, G. Reverter-Branchat, D. Maurici, S. Benini, J.-N. Shen, T. Chano, C.-M. Hattinger, M.-C. Manara, M. Pasello, K. Scotlandi y P. Picci, Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cell, *Annals of Oncology* 2004, 15: 151-160.
90. D.R. Turner, S.A. Grist, M. Janatipour y A.A. Morley, Mutations in human lymphocytes commonly involve gene duplication and resemble those seen in cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, 85: 3189-3192.
91. C. Lücke-Huhle y S. Mai y J. Moll, *c-myc* Overexpression facilitates radiation-induced DHFR gene amplification, *International Journal of Radiation Biology* 1997, 71 (2): 167-175.
92. S. Aulmann, N. Adler, J. Rom, B. Helmchen, P. Schirmacher y H.P. Sinn, *c-myc* Amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences, *Journal of Clinical Pathology* 2006, 59: 424-428.
93. J.A. Engelman y cols., *MET* Amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling, *Science* 2007, 316: 1039-1043.