



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO C677T  
EN EL GEN DE LA ENZIMA METIL-  
TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA  
(MTHFR) SOBRE LA RESPUESTA A LA  
RADIACIÓN**

**TESIS DE POSGRADO**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUBESPECIALISTA  
EN  
RADIO-ONCOLOGÍA**

**PRESENTA  
DRA. NORA PATRICIA ALVAREZ AGUILA**

**ASESOR: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO  
JEFE DEL DEPARTAMENTO: DRA. ADELA POITEVIN  
CHACÓN**

**México D.F. , 27 de Enero de 2006**



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.

## ÍNDICE

1. Antecedentes
  - a. Metiltetrahidrofolato Reductasa
  - b. Polimorfismos del gen de la MTHFR
  - c. Radiación y daño al DNA
  - d. Medición del daño al DNA
  - e. Radiación y Metilación
2. Planteamiento del problema
3. Hipótesis
4. Objetivo General
  - a. Objetivos específicos
5. Relevancia e Impacto
  - a. Genotipificación y selección de los individuos
  - b. Cultivo de Linfocitos
  - c. Exposición a radiación
  - d. Técnica de Obtención de micronúcleos con citocinesis bloqueada y cuantificación
  - e. Análisis estadístico
6. Resultados
7. Discusión
8. Referencias

## **INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO C677T EN EL GEN DE LA ENZIMA METIL-TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR) SOBRE LA RESPUESTA A LA RADIACIÓN**

### **ANTECEDENTES**

Los folatos, entre ellos el ácido fólico, tienen un papel fundamental en múltiples procesos en los organismos vivos, incluyendo algunos involucrados en el metabolismo del DNA. El ácido fólico es un micronutriente que no puede ser sintetizado en el organismo, por lo que debe obtenerse de manera exógena, a partir de frutas y vegetales verdes.

Los folatos son útiles como aceptores, transportadores o donadores de carbonos. Las reacciones dependientes de folatos se incluyen en el denominado metabolismo de “un-carbono”, el cual interviene en el procesamiento de aminoácidos, síntesis de purinas y pirimidinas, necesarias durante la replicación y reparación del DNA y también para la formación del principal donador de grupos metilo en los seres vivos, la S-adenosil-L-metionina (SAM) (2, 3). Estas reacciones permiten mantener la homeostasis celular y una división celular adecuada.

El ácido fólico se absorbe en forma de hidrofolato en la porción proximal del intestino delgado. Una vez absorbido, el ácido fólico debe ser convertido en 5-10 metilentetrahydrofolato, el cual da lugar a la formación de la forma circulante, el 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), molécula aceptora de folatos muy importante por su afinidad a la albúmina. Este paso es catalizado por la enzima metil-tetrahydrofolato reductasa (MTHFR). El 5-MTHF sirve como donador de grupos metilo a la homocisteína y mediante la enzima metion-sintasa y la vitamina B12 da lugar a la metionina, el cual junto al grupo adenosil del ATP, forma la S-adenosil-metionina (SAM). Es un agente metilante involucrado en más de 100 reacciones mediadas por las metiltransferasas, con una gran variedad de moléculasceptoras, dentro de las que se encuentran el DNA, proteínas y fosfolípidos de membrana. Su principal función es la donación de grupos metilo a citosinas específicas en el DNA, una característica epigenética esencial, muy importante para la expresión génica, la impronta génica, el silenciamiento de retrotransposones, estabilidad cromosómica y diferenciación celular. La principal fuente de grupos metilo usados

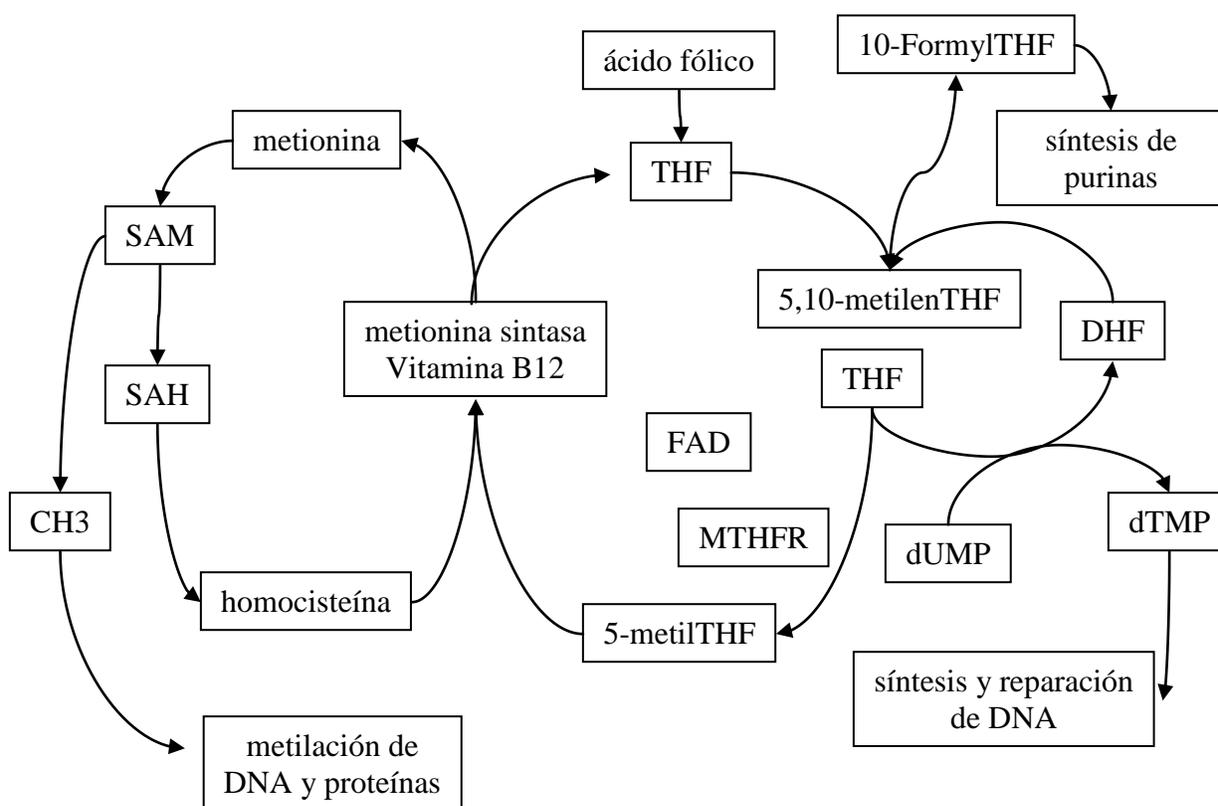
por SAM para las reacciones de metilación es la síntesis de novo de unidades de un-carbono dependiente de folatos.

Dentro de este ciclo, denominado ciclo de los grupos metilo, entonces se producen factores involucrados en la síntesis y la reparación del DNA, así como factores involucrados en la epigenética de la célula (Figura 1. Metabolismo de grupos metilo).

El ácido fólico y por ende el metabolismo de los grupos metilo juega varios papeles en la economía de los seres vivos, favoreciendo principalmente la hematopoyesis, la embriogénesis y la síntesis de dTMP a partir de dUMP, así como para la reparación adecuada del DNA y la metilación. Así, el déficit de folatos se ha asociado a enfermedades cardiovasculares, ciertas anomalías neurológicas, tales como defectos en el desarrollo embrionario, como malformaciones en el tubo neural, defectos cognitivos y neurotoxicidad fetal. La deficiencia de folatos también da lugar a un tipo específico de anemia, megaloblástica, que resulta de una falla en la síntesis de ácidos nucleicos, dando lugar a división celular anormal de los precursores de eritrocitos. (5). Igualmente, la deficiencia de ácido fólico se ha relacionado con un riesgo incrementado de cáncer de colon, mama, pulmón, piel, sistema nervioso central, sin embargo los mecanismos subyacentes no son del todo claros aún, involucrando a alteraciones en la reparación del DNA, hipometilación global, etc. (4, 6).

Dado el objetivo de este trabajo vamos a comentar el trabajo que cumple a nivel de la estabilidad genómica. Se sabe que la metilación del DNA, es producto del metabolismo de los grupos metilo y que deficiencias en tanto a nivel ingesta, así como en el medio celular de donadores de grupos metilo tiene repercusiones importantes sobre la estabilidad cromosómica, como rupturas, deleciones cromosómicas y otras formas de inestabilidad cromosómica atribuida a hipometilación del DNA, los cuales se asocian aneuploidia y por ende a enfermedades como el cáncer. La deficiencia de ácido fólico también se asocia a la excesiva incorporación errónea de uracilo al DNA en lugar de timina, que al repararse puede dar lugar a ruptura de una o de las dos cadenas del DNA, incluso generando puntos de ruptura de cromosomas (3). Se sabe igualmente que cuando el nivel de folatos es  $>700\text{nmol/l}$  se disminuyen fenómenos como hipometilación del DNA, rupturas cromosómicas, incorporación de uracilo al DNA y la formación de micronúcleos. Con un nivel de folatos  $<4\text{ ng/ml}$ , el contenido de uracilo en el DNA aumenta hasta 70 veces en

relación a un nivel  $>4\text{ng/ml}$ , los cuales se normalizan después de 3 días de dosis elevadas de ácido fólico (5). Como resultado de la deficiencia de folatos, la cantidad de SAM disminuye, generando hipometilación del DNA y dando lugar a alteración también en la expresión génica, a inestabilidad cromosómica y expresión de algunas regiones silenciadas en el genoma, como ciertos proto-oncogenes y retrovirus (4).



**Figura 1.** Metabolismo de grupos metilo.

El metabolismo del ácido fólico puede afectarse ya sea por la deficiencia del mismo a nivel de ingesta, relacionado clásicamente con malabsorción, alcoholismo, o por un aumento en la necesidad de su aporte, como es el caso del embarazo (1); por la deficiencia de cofactores que intervienen en las enzimas del ciclo de los grupos metilo (13) y recientemente se han asociado a alteraciones genéticas que pueden generar estados de déficit de folatos y sus metabolitos, aún con una adecuada ingesta, como son los polimorfismos en los genes que codifican las enzimas del ciclo. Dada su importancia, se considera que estos eventos pueden tener repercusiones a largo plazo (4).

### **METILTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA**

Hay dos enzimas de radical importancia en el metabolismo de los grupos metilo: la metionina-sintasa, dependiente de vitamina B12, que usa 5-MTHF para la metilación de homocisteína a metionina, y la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que reduce el 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, la cual es motivo de nuestro estudio, por lo que profundizaremos en su descripción.

La MTHFR fue descrita por primera vez en la década de los 70's, lográndose clonar su gen en 1993. Es una flavoproteína constituida por dos subunidades de 70kDa aproximadamente. Contiene una región catalítica N-terminal, que se liga a dinucleótido flavín-adenina, a dinucleótido nicotinamida-adenina y a 5,10-MTHF. El elemento regulador C-terminal se liga a su inhibidor SAM; ambas regiones se unen por una región hidrofílica (15). Es la enzima clave en el metabolismo de un-carbono, responsable de reducir 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, la primera forma circulante de los folatos, que dona un grupo metilo para la remetilación de la homocisteína a metionina, precursor de SAM (16). El gen de la MTHFR está localizado en el cromosoma 1p36.3. Tiene una longitud de 1.980 pb, y una masa molecular de 74.6 kDa. Contiene 11 exones con una longitud desde 102 pb a 432 pb, e intrones de 250 pb a 1.5 kb, excepto por un intrón de 4.2 kb (15).

La actividad de la MTHFR puede ser reducida mediante tres formas: 1) por polimorfismos en la secuencia génica que alteran su afinidad por un sustrato o cofactor; 2) por

una alta concentración de metionina o SAM y 3) por una baja concentración de su cofactor, el dinucleótido de adenina flavina (FAD) o de riboflavina, el precursor de FAD (7). La actividad disminuida de la MTHFR limita la producción de 5-metiltetrahydrofolato, incrementando la concentración de ,10-metiltetrahydrofolato, dando como resultado un aumento en la síntesis de dTTP en lugar de la metilación del dinucleótido citosin-fosfato-guanosina, una disminución de la incorporación del uracilo al DNA e incremento en la concentración de homocisteína (6).

### **POLIMORFISMO DEL GEN DE LA MTHFR**

Un polimorfismo es una forma alternativa de un gene que puede o no afectar la función de la proteína. Se han identificado varios polimorfismos en el gen que codifica la MTHFR, siendo más estudiados los que están localizados en los nucleótidos 677 y 1298. En la primera variante, C677T, localizada en el exón 4, hay una transición de bases Citosina a Timina en la posición 677 del gen, convirtiendo una alanina en valina, codificando una variante termolábil, la cual altera el dominio catalítico de la enzima.

Los individuos heterocigotos (677CT) y homocigotos (677TT) para este polimorfismo tienen una actividad enzimática *in vitro* reducida al 65% y 30% respectivamente con respecto a la forma no mutada (677CC), dando lugar a un decremento en el nivel de 5-metiltetrahydrofolato (Tabla 1) (8). Igualmente, se sabe que los individuos con ambos alelos T, tienen un nivel plasmático de homocisteína más elevado que en aquellos con sólo un alelo T o ambos alelos C, que se correlaciona con una menor actividad enzimática.

<b>GENOTIPO</b>	<b>ACTIVIDAD (%)</b>
CC	100%
CT	65%
TT	30%

**Tabla 1.** Actividad de la enzima MTHFR en cada genotipo

En el polimorfismo 1298AC, localizado en el exon 7, ocasiona un cambio de glutamina a alanina, con lo que disminuye la actividad *in vitro* de la enzima hasta un 60% en presencia de ambos alelos mutados, sin embargo no se ha encontrado influencia sobre la concentración sérica de homocisteína y no con el folato plasmático, de forma que su relevancia fisiopatológica no es clara (22).

El polimorfismo C677T tiene una frecuencia mundial elevada, siendo en promedio de 12%. En Europa la frecuencia del alelo mutado es de cerca de 32%, en tanto que en América es de 10%, con una mayor frecuencia en el norte, de hasta 35% (22). A nivel de Latinoamérica, vale la pena comentar que nuestro país cuenta con la frecuencia mundial reportada más elevada, con una frecuencia alélica del 51% (Tabla 2), con una prevalencia del 34% para ambos alelos mutados (Tabla 3).

<b>PAÍS</b>	<b>FRECUENCIA DE T (%)</b>
Sudáfrica	0
Kenia	13
Brasil	27
Rusia	28
China	36
Japón	37
Francia	41
Italia	47
Colombia	50
<b>México</b>	<b>51</b>

**Tabla 2.** Frecuencia alélica del polimorfismo del gen de la MTHFR en la población mundial

<b>GENOTIPO</b>	<b>PREVALENCIA (%)</b>
CC	17.6
CT	47.6
TT	34.8

**Tabla 3.** Prevalencia del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en la población mexicana

El polimorfismo C677T se ha asociado principalmente a un incremento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares y anomalías neurológicas, tales como defectos del tubo neural, ambos probablemente debidos a la hiperhomocisteinemia; aunque también se ha asociado a enfermedades cerebrovasculares, trombosis venosa, longevidad preeclampsia, diabetes mellitus, insuficiencia renal y síndrome de Down (23). En la variante homocigota, en la que la actividad enzimática se reduce, los niveles de 5-MTHF y SAM disminuyen, de forma que existe mayor riesgo de presentar consecuencias en la interferencia en el metabolismo de los grupos metilo, como hipometilación del DNA. Por otro lado, en presencia de mutación, se espera que haya acumulación de 5,10-MTHF, que desvía la reacción hacia la síntesis de timidina, lo que confiere un efecto protector para la carcinogénesis (4, 24). En Oncología, se sabe que este polimorfismo se asocia a una disminución del riesgo de una variedad de cánceres como leucemia aguda linfoblástica, linfoma y cáncer colorrectal, en presencia de un nivel sérico adecuado de folatos; aunque por otro lado, también se ha relacionado con un incremento en el riesgo de cáncer cervical, displasia gástrica, cáncer endometrial y cáncer de mama (6, 15, 22).

## **RADIACIÓN Y DAÑO AL DNA**

Los organismos vivos pueden ser dañados por exposición tanto a agentes producidos por procesos metabólicos endógenos, tales como reacciones oxidativas e hidrolíticas, así como a agentes ambientales, tales como agentes químicos sintéticos y naturales, la luz ultravioleta y la radiación ionizante.

La radiación ionizante produce daño celular mediante dos mecanismos: 1) directo: incidiendo directamente en el blanco, 2) indirecto, mediante la producción de radicales libres que inciden posteriormente en el blanco, es decir, mediante radiolisis o descomposición del agua, resultando en la formación de especies reactivas de oxígeno, como son el superóxido,

radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno (18). Todas las estructuras y moléculas intracelulares son susceptibles de daño por radiación, sin embargo el impacto más trascendental es el daño al DNA, por su papel imprescindible en la homeostasis celular. En el DNA, el daño puede ocurrir sobre cualquiera de sus componentes, como bases purícas y pirimídicas, grupos fosfato y la desoxirribosa.

Todas las células son susceptibles de daño; sin embargo las que se encuentran en constante división, en las fases G2 y M del ciclo celular, las menos diferenciadas, o en condiciones de hipoxia, son más susceptibles de daño por radiación. Otros factores que afectan la severidad del daño por radiación son la dosis y el tipo de energía (alta vs baja transferencia lineal de energía) (20). Todos estos factores determinan la capacidad celular para reparar el daño. Si el daño no se repara, el resultado es la muerte celular. Si el daño se repara en forma deficiente, la célula sobrevivirá pero heredará a sus descendientes inestabilidad genómica. (9).

Asimismo, son diversas las formas de daño al DNA por radiación, tales como daño a una sola base, inserciones, daño a sitios específicos de unión, entrecruzamiento de cadenas, entrecruzamiento dentro de la misma cadena, lesiones de bases en tandem (19), ruptura de cadenas simples y ruptura de doble cadena, entre otras. La radiación ionizante produce un espectro de daño al DNA, un Gy puede inducir al menos 10 000 bases dañadas, 1000 rupturas simples de cadenas y 40 dobles rupturas. La reparación del daño se lleva a cabo mediante diferentes mecanismos, tales como escisión-reparación de nucleótidos, reparación de malas incorporaciones de nucleótidos, escisión-reparación de una base y reparación por recombinación, que incluye unión de finales de DNA no homólogo y recombinación homóloga (14, 18). Se requieren complejas maquinarias proteicas para lograr dichas reparaciones así como un gran consumo de energía y sustratos, incluyendo a los grupos metilo. La eficiencia de la reparación dependerá de la gravedad del daño.

La lesión al DNA por radiación hasta ahora considerada más importante es la ruptura de doble cadena, que dará lugar tanto a aberraciones cromosómicas como en las hebras aisladas, si ocurre en las fases G1 (o G0) y G2 (21). Una sola ruptura de doble cadena puede ser suficiente

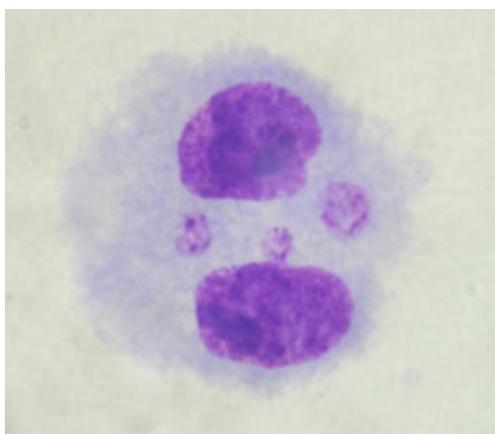
para la inactivación de un gen. Cuando ésta ocurre, la replicación celular se detiene en alguno de los puntos de chequeo en el ciclo celular, para tratar de repararse. La reparación se lleva a cabo mediante dos vías, una de las cuales es la recombinación homóloga, en la que se utiliza DNA homólogo como molde de reparación; sin embargo se requiere de cromátides hermanas, por lo que será más eficiente en las fases S y G2 del ciclo celular. La segunda vía de reparación es la unión de final de DNA no homólogo, en la que no se requiere de un molde, por lo que se puede llevar a cabo en la fase G1. La ruptura de doble cadena es la lesión más difícil de reparar, dando origen a aberraciones cromosómicas, arresto en el ciclo celular, apoptosis, muerte mitótica y/o senescencia (9, 10, 14). Este tipo de lesión tiene mayor relevancia en células en constante proliferación, puesto que dará lugar a inestabilidad genómica (17).

Hay patologías en las que existe una deficiencia en la reparación del daño al DNA, tales como xerodermia pigmentoso, síndrome de Cockayne, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, síndrome de Nijmegen, ataxia telangiectasia, síndrome de Rothmund-Thomson, síndrome de Werner, cáncer de colon hereditario no polipósico, mutación en BRCA1 y BRCA2, pénfigo y síndrome de Li-Fraumeni, entre otros. Estas patologías están a su vez asociadas a un incremento en el riesgo de carcinogénesis, dado que el daño no reparado da lugar a mutaciones que eventualmente darán lugar a un tumor. Asimismo, pueden correlacionarse con una menor capacidad de reparación de daño al DNA por radiación. Aunque no se conoce la causa de la elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas, la deficiente reparación de las rupturas de doble cadena en genes de baja penetrancia, es una de las teorías (21).

### **MEDICIÓN DEL DAÑO AL DNA**

Existen varias maneras de medir el daño al DNA inducido por radiación, entre las que se encuentran la Prueba del Cometa, la cual analiza la fragmentación del DNA y otras citogenéticas como la técnica de obtención de micronúcleos mediante citocinesis bloqueada. La primera ha tenido recientes desprobaciones en la literatura científica (25), mientras que la segunda se considera es una de las técnicas mejor establecidas dentro de la toxicología genética para la evaluación el efecto de xenobióticos sobre las células tanto *in vivo* como *in vitro*. (11).

Los MN son un índice de la ruptura de los cromosomas y de la pérdida de estos. Dado que los MN son expresados en células en división nuclear completa, deben ser idealmente identificados en el estado binucleado del ciclo celular. Otros marcadores de daño al DNA son los puentes nucleoplásmicos, que indica rearrreglos cromosómicos; gemas nucleares, que indican amplificación génica; necrosis y apoptosis. Sin embargo, la cantidad de puentes nucleoplásmicos puede modificarse de acuerdo al genotipo (7), por lo que no nos es útil en el estudio. Otras causas asociadas a una mayor formación de micronúcleos son: la enfermedad de Crohn, el tabaquismo y el envejecimiento (5).



**Figura 2.** Ejemplo de célula binucleada con micronúcleos mediante la técnica de citocinesis bloqueada, secundario a radiación.

## **RADIACIÓN Y METILACIÓN**

Se conoce que la deficiencia de ácido fólico tiene un efecto sinérgico sobre la sensibilidad a la inducción de micronúcleos por radiación ionizante, posiblemente por inhibición o deficiencia en la reparación de rupturas de cadenas inducidas por radiación, o por la suma de ambos factores (12). Dosis de 5-20 cGy pueden causar inestabilidad cromosómica del mismo tipo que por deficiencia de ácido fólico, tal como incremento en la mala segregación de cromosomas completos o segmentos de estos, dando lugar a aberraciones cromosómicas de diferentes tipos, incluyendo cromosomas dicéntricos (13). Se sabe también que se requiere de una concentración mayor a 20 nM de ácido fólico para mantener la estabilidad genómica *in vitro* (13) y que la disminución en la concentración de

folatos en el medio de cultivos celulares expuestos a radiación genera entonces una mayor tendencia a la formación de micronúcleos (12).

Igualmente se sabe que animales expuestos a radiación tienen una menor concentración sérica de ácido fólico, sin embargo se atribuye a menor absorción intestinal (25).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se sabe entonces que la deficiencia de ácido fólico tiene un efecto sinérgico sobre la sensibilidad a la inducción de micronúcleos por radiación ionizante. Igualmente sabemos que los individuos con el polimorfismo C677T de la MTHFR pueden llegar a tener alteraciones en el metabolismo de los grupos metilo incluyendo alteraciones en la segregación cromosómica que pueden derivar en la formación de células aneuploides. Dada la prevalencia de este polimorfismo en la población mexicana y la alta frecuencia de exposición a varios tipos de radiaciones, consideramos importante valorar la interacción que existe *in vitro* entre el daño inducido por radiación, medido como la formación de micronúcleos y el polimorfismo del gen de la enzima MTHFR.

Es posible que ambos efectos sean sumatorios, debido a que el daño inducido por la radiación sería mayor en presencia del polimorfismo C677T por la disminución en la disponibilidad de 5-metiltetrahidrofolato, sin embargo este efecto no ha sido estudiado hasta el momento.

## **HIPÓTESIS**

Existe diferencia entre los 3 genotipos del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en la respuesta al daño por radiación, medido como la formación de Micronúcleos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Valorar el efecto del polimorfismo C677T de la enzima MTHFR sobre el daño al DNA inducido por radiación ionizante medido mediante la técnica de formación de micronúcleos con citocinesis bloqueada.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Genotipificar por lo menos 2 individuos con cada uno de los posibles genotipo, silvestre CC, heterótipo CT y mutante TT.
2. Cultivar los linfocitos durante un periodo de 96h, siendo radiados a las 24h de ser cultivados
3. Realizar la técnica de obtención de micronúcleos en estos cultivos durante 3 periodos de estudio: 24h pos-radiación, 48h pos-radiación y 72h pos-radiación para valorar el efecto de la radiación y la reparación del daño.
4. Cuantificar 1000 células binucleadas de cada uno de los grupos en dos experimentos independientes, por dos individuos diferentes y la cantidad de micronúcleos en cada uno de ellos.
5. Realizar el análisis estadístico entre los diferentes grupos
6. Valorar la cinética de división celular y determinar su relevancia con los resultados
7. Determinar el grado de apoptosis y determinar su relevancia con los resultados

## **RELEVANCIA E IMPACTO**

Como ha sido comentado previamente, la frecuencia de homocigotos para este polimorfismo a nivel mundial es del 12.6% (6), sin embargo, los reportes en México, indican que representa una de las prevalencias más altas, llegando a ser de hasta un 50% por lo tanto, ante el creciente riesgo de exposición a los diferentes tipos de radiación ambiental y en algunos casos laboral (Rayos X, Radiación gamma), es importante determinar si este polimorfismo altera la respuesta individual ante un evento de daño al DNA.

Por lo tanto es importante valorar el efecto del polimorfismo C677T de la enzima MTHFR sobre la formación de micronúcleos inducidos por radiación ya que permitirá apoyar la hipótesis de la importancia del metabolismo de los folatos sobre la reparación del daño al DNA, así como determinar la radiosensibilidad, posiblemente mayor, en portadores de dicho polimorfismo y poder proponer medidas preventivas en el caso de personal ocupacionalmente expuesto (POE), e incluso llegar a catalogarlos como genotipos de riesgo, debiendo modificar la exposición anual permitida. En el caso de individuos que requieren de radioterapia, será posible establecer las bases para modificar la dosis total. Asimismo, permitirá fundamentar estudios posteriores para evidenciar la relación entre genotipos radiosensibles con la carcinogénesis, y entender mejor los mecanismos de daño al DNA por radiación ionizante.

Igualmente este estudio aportará resultados que fortalezcan la medicina genómica, la cual se basa en la detección muy precoz de individuos susceptibles a alguna alteración patológica, basados en el análisis del DNA en cualquier momento de la vida.

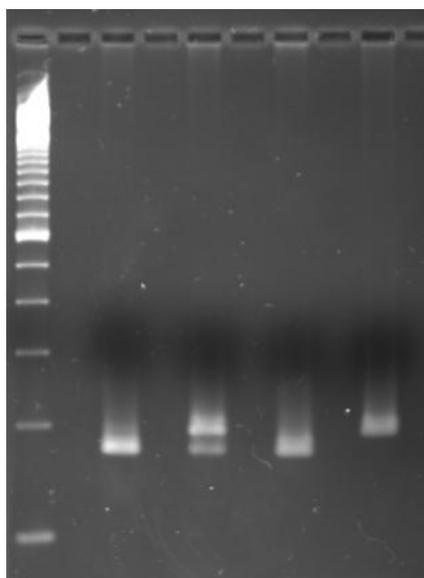
## MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología se resume en la gráfica 1.

### 1. Genotipificación y selección de individuos

Se seleccionaron individuos jóvenes, hombres, entre los 20 y 30 años, aparentemente sanos, sin antecedentes patológicos de importancia, incluyendo familiares (Tabla 3), de los cuales se obtuvieron muestras de sangre periférica para la obtención de DNA. Posteriormente se aisló este DNA mediante la técnica de Fenol-Cloroformo.

Posteriormente se tomó este DNA y se sometió a reacción en cadena de polimerasa (PCR) con primers diseñados para amplificar el fragmento del gen de la MTHFR de 198 pb que contenía el polimorfismo. Luego, este DNA se sometió a digestión por la enzima de restricción, *Infl*. Si la mutación se encontraba presente, la digestión mediante la enzima de restricción daba lugar a dos fragmentos, uno de 175 pb y otro de 23 pb. De esta forma, los sujetos homocigotos silvestres CC muestran 1 banda en la electroforesis (98pb), los individuos heterocigotos CT muestran tres bandas (198 pb, 175 pb y 23 pb), mientras que los homocigotos para el alelo mutado T solo tienen dos bandas (175 pb y 23 pb) dado que ambos alelos están mutados. (Figura 3).



**Figura 3.** Electroforesis para identificación de polimorfismo de productos de digestión enzimática de productos de PCR. De izquierda a derecha: Carril 1: Marcador de

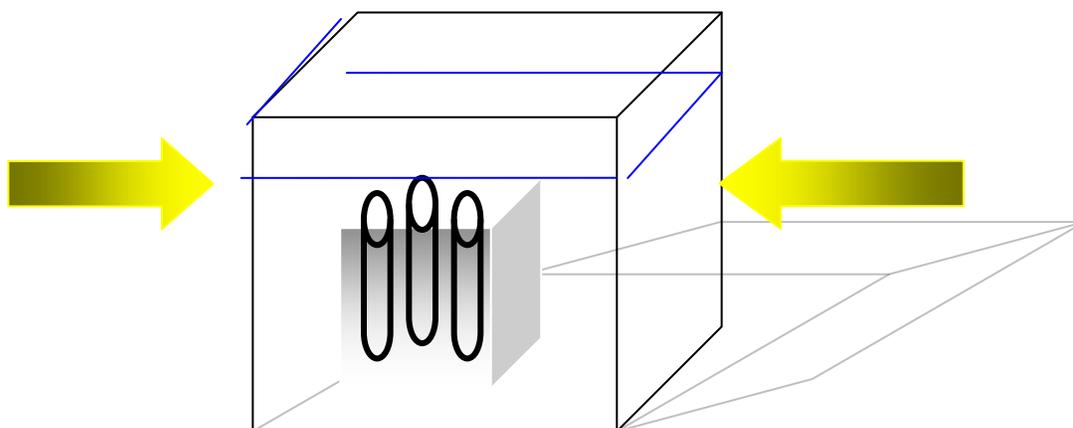
100pb, Carril 2: Fragmento de 175pb único (homocigoto TT), Carril 3: Fragmentos de 198 y 175pb (heterocigoto CT), Carril 4: Homocigoto TT, Carril 5: Fragmento de 198pb (Homocigoto silvestre).

### 2. *Cultivo de linfocitos*

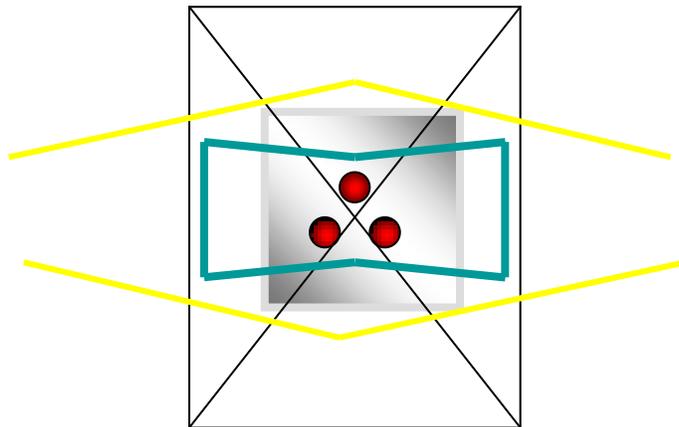
Se cultivó 1ml de sangre periférica en medio RPMI y fitohemaglutinina y se incubará a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante un periodo total de 96h, 24 de cultivo luego de las cuales se someten a radiación y tres periodos consecutivos de estudio (24h,48h,72h). El medio RPMI 1640 contiene 21.5 µM de clorhidrato de colina, 2.26 µM de ácido fólico (16), 100 µmol/L de metionina y 530 nmol/L de riboflavina (7). Fue suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, 1% de antibiótico, 1% de L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, 0.2 % de fitohemaglutinina.

### 3. *Exposición a radiación*

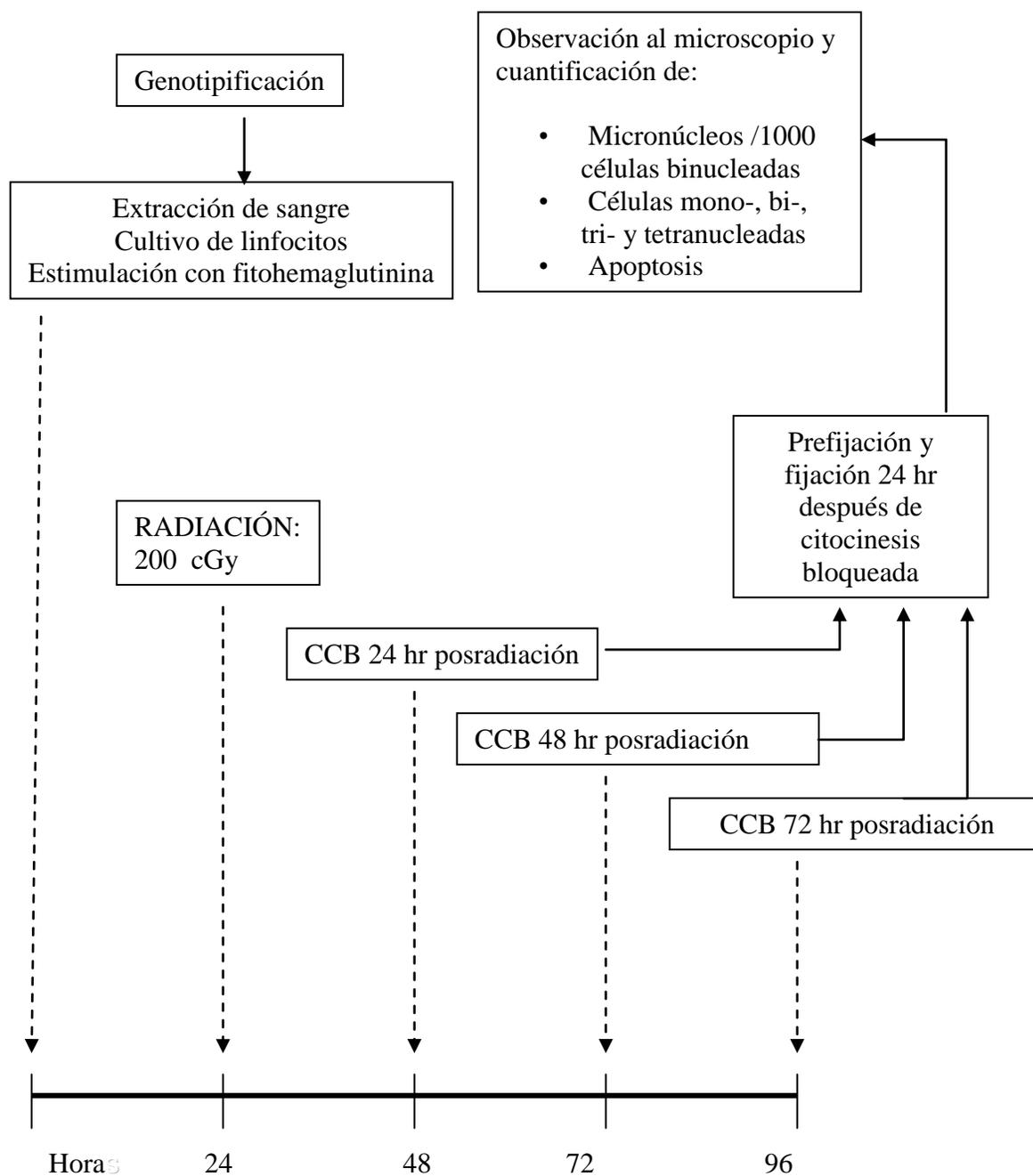
La exposición de los cultivos se llevó a cabo a las 24h de cultivo a 200 cGy de radiación gamma. El volumen blanco consistió de un tubo de ensayo de vidrio, conteniendo los linfocitos, de 10 cm de longitud y 1 cm de diámetro, que permitía contener todo el volumen del cultivo sin dejar cámaras de aire, sumergido en el centro de un contenedor de agua, de 22 cm de lateral. Para la técnica de radiación se utilizaron dos campos paralelos opuestos, de 12 x 12 cm, con técnica isocéntrica a una distancia de 89 cm, para una profundidad del isocentro a 11 cm. Se utilizó el equipo Theratron T-1000, requiriéndose un tiempo de exposición de 0.85' y 0.86' para cada campo. Se utilizó la curva de isodosis del 99%, lo cual significa que la diferencia en dosis entre cada punto del volumen blanco no fue mayor de 1%.



**Figura 3.** Vista frontal. Las flechas indican la dirección de los rayos gamma. Los tubos en el interior contienen el cultivo de linfocitos.



**Figura 3.** Vista Superior. Las líneas verdes indican el área que cubre la curva de isodosis del 99%.



**Gráfica 1.** Metodología

#### 4. Técnica de obtención de micronúcleos con citocinesis bloqueada y cuantificación

Luego de 24h de cultivo se adiciona citocalasina B, la cual detiene la citocinesis. Posteriormente se procesan los cultivos con solución fijadora de metanol:ácido acético en relación 3:1. Luego de varios eventos de lavado con solución fijadora se procesan las laminillas, las cuales se tincionan con azul de metileno y eosina. Posteriormente se procede al conteo de células binucleadas de acuerdo a los criterios del *Micronuclei Assay Working Group* (Kirsh-Volders 2003).

	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>
Número	2	2	2
Edad (años)	23	25-27	21-25
Género	M	M	M
Tabaquismo	(-)	(-)	(-)

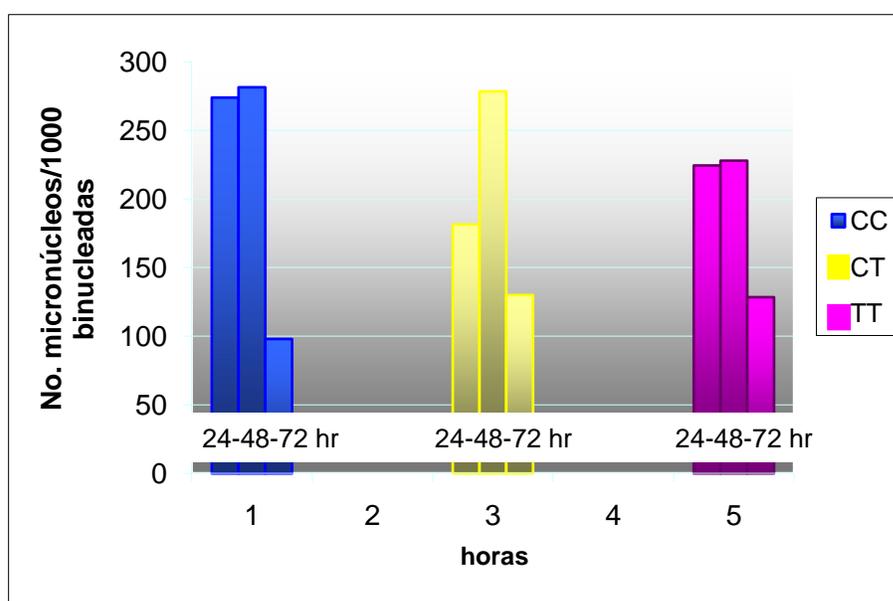
**Tabla 3.** Características de los donadores

#### 5. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo bajo la supervisión del servicio de epidemiología y cómputo del Instituto Nacional de Cancerología. Los datos fueron analizados en el programa Stata y se le aplicó la prueba estadística t de student, obteniendo intervalos de confianza, promedios, desviación estándar y valor p.

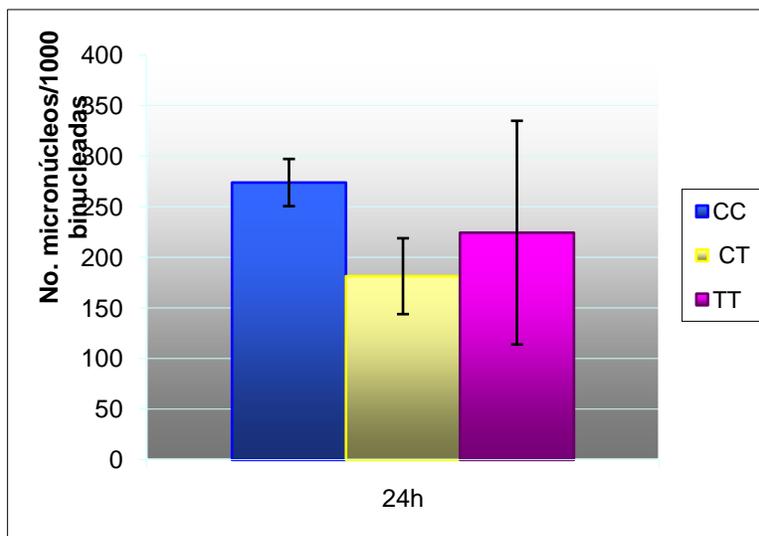
## RESULTADOS

En la figura 8, se puede comparar el número de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas entre los tres genotipos, CC, CT y TT. La tendencia en los tres genotipos es similar, con un aumento en el número de micronúcleos de las 24 a los 48 horas, que desciende posteriormente, al cumplirse las 72 hr.



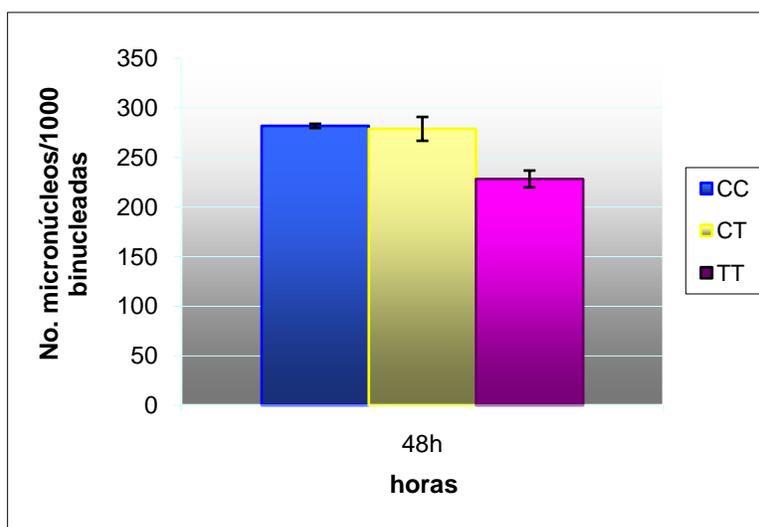
**Figura 8.** Semejanza en la respuesta al daño por radiación entre los tres genotipos.

En la figura 9, se compara el número de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas, entre los tres genotipos, a las 24 horas. Se observa que la desviación estándar no muestra diferencias importantes. Encontramos que la diferencia entre CC vs CT a las 24 hr no resultó ser estadísticamente significativa ( $p = 0.25$ ); la diferencia entre CC vs TT a las 24 hr tampoco es significativa ( $p = 0.93$ ); y por último la diferencia entre CT y TT a las 24 hr tampoco es significativa ( $p = 0.69$ ). Es decir que en las primeras 24 horas, el número de micronúcleos entre los tres genotipos es similar.



**Figura 9.** Daño inducido por radiación en las primeras 24 horas.

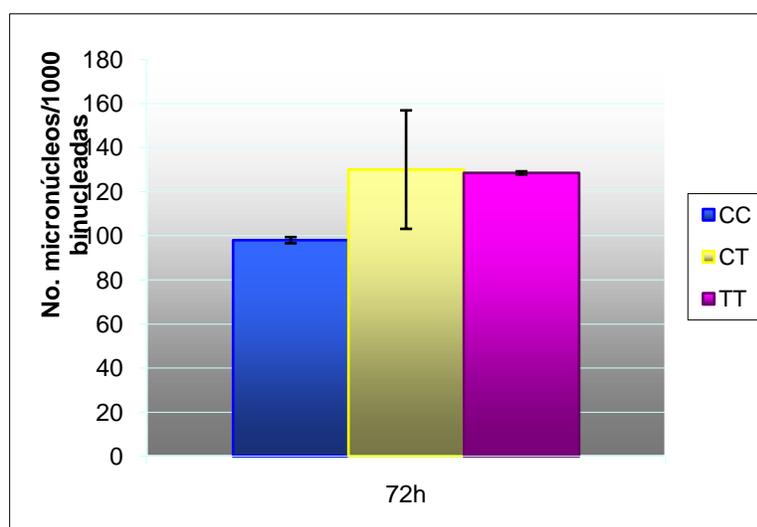
En la figura 10, se compara el daño entre los tres genotipos, a las 48 horas. En la gráfica es evidente que entre las dos primeras columnas, es decir genotipos CC y CT, no hay diferencia. Al hacer el análisis estadístico corroboramos que CC vs CT, no presenta diferencias significativas ( $p = 0.7422$ ). Sin embargo, comparando CC y TT, la diferencia sí resultó significativa ( $p = 0.0534$ ). De la misma forma, como es evidente en la gráfica, la diferencia entre CT y TT también resultó ser significativa ( $p = 0.0315$ ).



**Figura 10.** Daño inducido por radiación a las 48 horas.

Es decir que a las 48 horas, en presencia de mutación en ambos alelos (genotipo TT) el número de micronúcleos es menor que en los genotipos CC y CT, con resultados estadísticamente significativos, en tanto que entre CC y CT no hay diferencia.

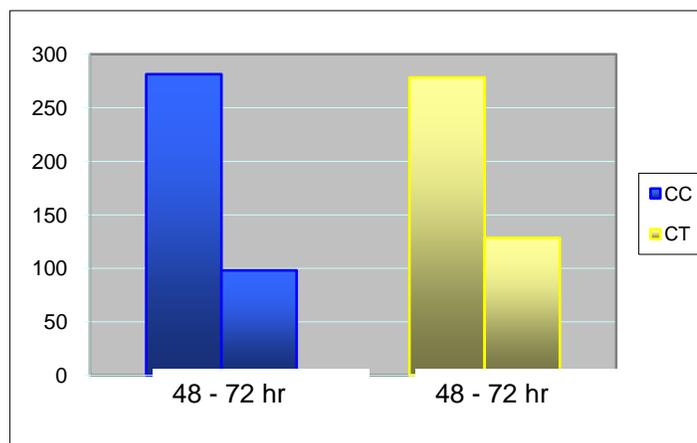
Ahora comparamos el número de micronúcleos al término de 72 horas, entre los tres genotipos. En la figura 11 se observa que aparentemente el número de micronúcleos en el genotipo CC es diferente del de los genotipos CT y TT. Sin embargo al obtener el valor de  $p$  comparando CC y CT, la diferencia no resultó ser estadísticamente significativa ( $p = 0.3262$ ). Por otro lado, se corrobora que la diferencia entre CC y TT sí es significativa, ( $p = 0.014$ ) y entre CT y TT a las 72h no resultó ser significativa ( $p = 0.9485$ ).



**Figura 11.** Daño inducido por radiación a las 72 horas.

De esta forma, hasta las primeras 24 horas, entre los tres genotipos no hay una diferencia significativa. Es hasta las 48 horas en que el genotipo homocigoto mutante tiene un menor número de micronúcleos, con una tendencia que no se mantiene a las 72 horas, en que es el genotipo homocigoto silvestre el que cuenta con el menor número de micronúcleos. En tanto que el genotipo heterocigoto se mantiene con una misma tendencia.

Así que comparamos el cambio en el número de micronúcleos, entre cada dos genotipos, de las 48 a las 72 horas.



**Figura 12.** Comparación entre genotipos CC y CT, entre las 48 y 72 horas.

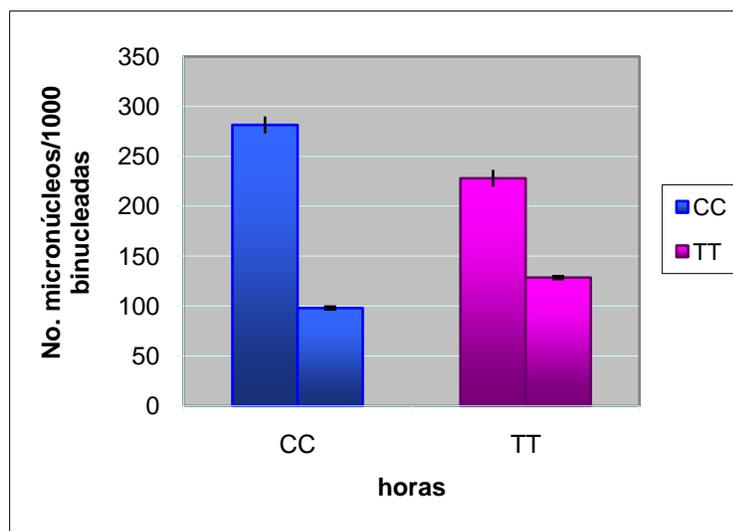
En la figura 12, se comparan los genotipos CC y CT, en relación al cambio en el número de micronúcleos que sucede desde las 48 hasta las 72 horas. La diferencia entre rangos resultó no ser estadísticamente significativa ( $p= 0.5635$ ). Es decir que el comportamiento es el mismo entre CC y CT desde las 24 a las 72 horas.

En la figura 13, comparamos ahora ambos genotipos homocigotos, CC y TT, en relación al cambio que sucede entre las 48 y las 72 horas en el número de micronúcleos. De acuerdo a la imagen, el cambio es significativamente mayor para el genotipo CC que para el TT, lo que significa que en el genotipo CC, a las 72 horas, el número de micronúcleos disminuye en mayor proporción que en el genotipo mutante.

En ambos casos, existe un descenso en el número de micronúcleos de las 48 a las 72 horas. En CC, a las 48 horas hay 290 células binucleadas con micronúcleos por cada 1,000 células binucleadas, número que desciende a 100 a las 72 horas. En el caso del genotipo TT,

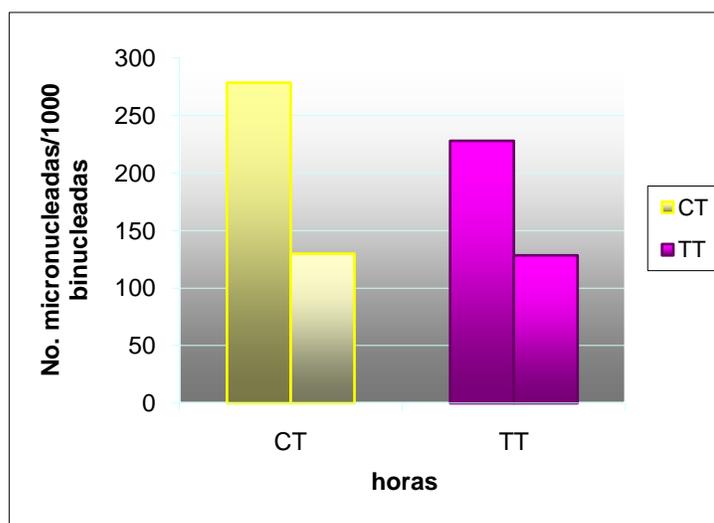
pasa de 240 a 125 células binucleadas con micronúcleos por cada 1,000 células binucleadas, de las 48 a las 72 horas, es decir que el descenso es menos pronunciado. La diferencia en el descenso del número de micronúcleos de las 48 a las 72 horas entre ambos

genotipos homocigotos sí resultó ser estadísticamente significativa ( $p= 0.0378$ ).



**Figura 13.** Comparación entre genotipos CC y TT, entre las 48 y 72 horas.

Por último comparamos el cambio de las 48 a las 72 horas entre los genotipos CT y TT. Como se observa en la figura 14, el cambio en el número de micronúcleos de las 48 a las 72 horas, es mayor para el genotipo heterocigoto que para el homocigoto mutante. Sin embargo, al hacer el análisis mediante el valor de  $p$ , el cambio no es significativo estadísticamente ( $p = 0.4745$ ). Es decir que el comportamiento desde las 24 a las 72 horas, es similar entre los genotipos CT y TT.



**Figura 14.** Comparación entre genotipos CT y TT, entre las 48 (columna izquierda) y 72 (columna derecha) horas.

Con estos resultados, se puede concluir que:

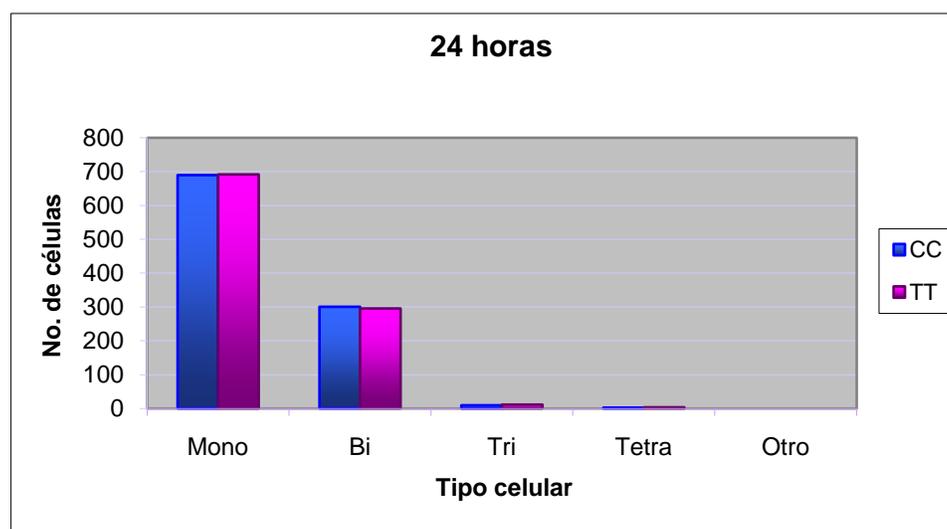
- No existen diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas entre los 3 genotipos.
- Existen diferencias estadísticamente significativas en el daño que sufren los genotipos CC y el CT vs el TT a las 48 horas de radiación.
- Existe diferencia significativa en el daño que sufren los genotipo CC vs TT a las 72 horas de radiación.
- Existe diferencia significativa entre los rangos de daño sufrido entre las 48 y las 72 horas entre los genotipo CC y TT.

Sin embargo, con estos resultados no podemos concluir que la diferencia entre los genotipos homocigotos mutante y silvestre, sea debida a una diferencia en la respuesta a la

radiación. Otra posibilidad es que se trate de una diferente cinética de división celular entre CC y TT.

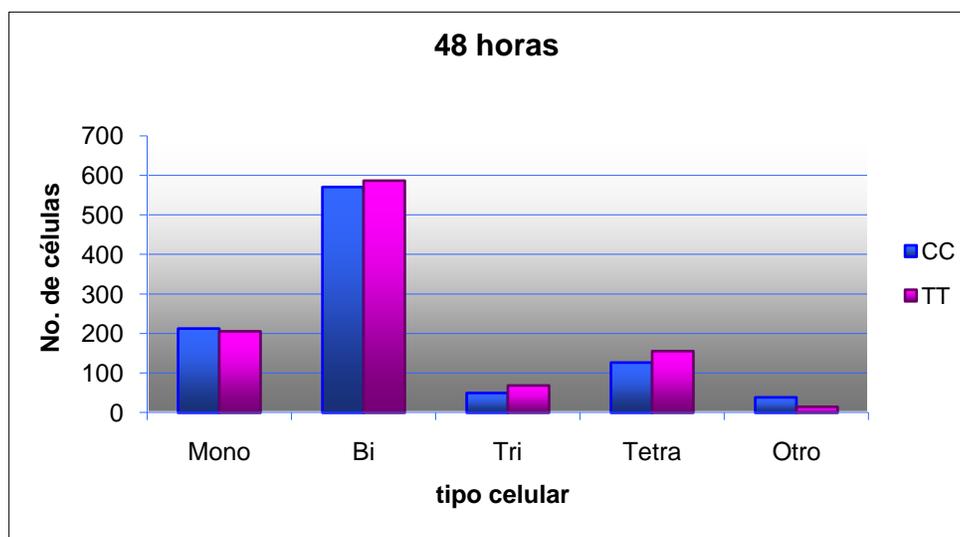
Para descartar esta posibilidad, se procedió a realizar el conteo de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas, o con más núcleos, por cada 1000 células contadas, para cada uno de los genotipos homocigotos, desde las 24 a las 72 horas, para posteriormente comparar dichos resultados.

En la figura 15, se compara la cinética de división celular de los genotipos CC y TT, a las primeras 24 horas. Se aprecia que en ambos genotipos existe un mayor número de células mononucleadas que binucleadas; a su vez, es mayor el número de células binucleadas en comparación con las células trinucleadas, tetranucleadas o con más núcleos. Se observa que no hay diferencia entre ambos genotipos homocigotos.



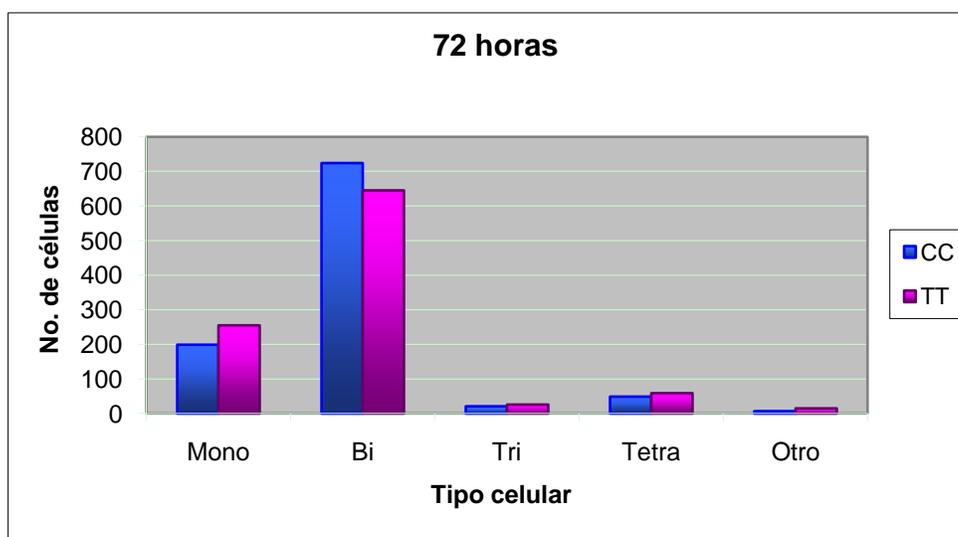
**Figura 15.** Cinética de división celular, a las 24 horas, de los genotipos CC y TT.

En la figura 16, comparamos la cinética de división celular de los mismos genotipos, a las 48 horas. Se observa ahora que el número de células binucleadas ya supera al de las mononucleadas, además de que ya se aprecia la presencia de células trinucleadas, tetranucleadas y con mayor número de micronúcleos. Sin embargo, nuevamente, no hay diferencia significativa entre los dos genotipos.



**Figura 16.** Cinética de división celular, a las 48 horas, de los genotipos CC y TT.

Por último, hacemos la misma comparación, ahora a las 72 horas. La tendencia es similar en ambos genotipos, como se observa en la figura 17.

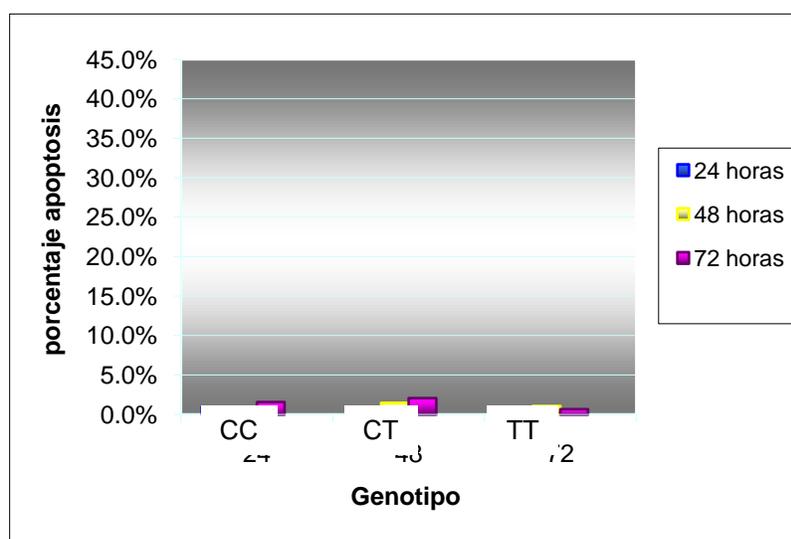


**Figura 17.** Cinética de división celular, a las 72 horas, de los genotipos CC y TT.

De esta forma, descartamos la cinética de división celular como causa de la diferencia entre CC y TT en relación al mayor descenso en el número de micronúcleos de las 48 a las 72 horas en el fenotipo CC.

Otra variable que pudiera dar lugar a este resultado es el número de apoptosis, de forma que existiera en mayor o menor proporción en uno de los genotipos, dando lugar a un cambio en la proporción de células binucleadas con micronúcleos por número de células binucleadas, o bien que el número de apoptosis cambie de las 24 a las 72 horas en distinta proporción entre los tres genotipos, indicando un comportamiento distinto.

En la figura 18 se muestra el porcentaje de apoptosis en los tres fenotipos, desde las 24 a las 48 horas. En los tres casos, el porcentaje de apoptosis no es mayor de 2.5% desde las 24 a las 72 horas. La diferencia no es estadísticamente significativa, con un valor de p de 0.2641.



**Figura 18.** Porcentaje de apoptosis a las 24, 48 y 72 horas, en los tres genotipos.

Hasta aquí, podemos entonces descartar como causa de nuestros resultados, tanto a la cinética de división celular como a la apoptosis; podemos sugerir que existe una diferencia en la respuesta a la radiación entre los genotipos CC y TT.

## DISCUSIÓN

El resultado de nuestro proyecto es que en las primeras 24 horas, el número de micronúcleos es similar en los tres genotipos. Sin embargo, a las 48 y 72 horas, la tendencia es distinta para cada uno de ellos, de tal forma que en el genotipo silvestre el número de micronúcleos a las 72 horas es menor que para el genotipo mutante. Hemos descartado que se trate de una diferencia en la cinética de división celular o que se trate de una diferencia en el número de apoptosis. De esta forma, es posible entonces que la reparación del daño por radiación sea más eficiente en CC que en TT. Para el genotipo heterocigoto, la reparación del daño por radiación es intermedia entre CC y TT.

Podemos considerar que la mayor sensibilidad a la radiación en el genotipo homocigoto mutante se deba a la disminución en la concentración de folatos que existe *per se* en el genotipo homocigoto mutante. Sabemos que los folatos se requieren para la síntesis de purinas y pirimidinas, condición necesaria ante la necesidad de reparación del daño al DNA. En presencia de daño al DNA por radiación, los requerimientos de folatos aumentan, en tanto que disminuye la síntesis de purinas y pirimidinas, lo cual agrava la ya presente baja concentración de folatos en el genotipo mutante homocigoto. Por otro lado, ante la disminución de la concentración de folatos, aumentará la incorporación inadecuada de uracilo al DNA, condicionando mayor daño al mismo en tanto que la reparación resulta aún menos eficiente. Y podemos agregar también que ante la acción deficiente de la enzima MTHFR en el genotipo mutante, disminuye el 5-MTHF, con lo que la concentración de SAM disminuye dando lugar a hipometilación del DNA, condición que aumentará el daño al mismo.

En el genotipo silvestre, por otro lado, la actividad de la enzima MTHFR es normal, de forma que ante el aumento en los requerimientos de purinas y pirimidinas por el daño al DNA por radiación, existirá un mayor aporte de dichas bases y la reparación del daño será más eficiente que en el caso de genotipo mutante. Además, la concentración de SAM será adecuada en el genotipo silvestre, y no habrá entonces hipometilación ni como consecuencia mayor daño al DNA.

Esto explica también el hecho de que en las primeras 24 horas, el número de micronúcleos es similar en los tres genotipos, momento en el que la concentración de folatos es aún suficiente para la inicial reparación del daño, aún cuando, como ya se mencionó previamente, dicha concentración es más baja en TT. Es decir que la radiación per se no produce mayor daño en un genotipo que en otro. Al llegar a las 48 –72 horas, la deficiencia de la enzima MTHFR en el genotipo TT se hace evidente ante la inducción de daño por radiación, el cual no podrá ser reparado en la misma proporción que en los otros dos genotipos, CC y TT.

## CONCLUSIONES

Existe mayor daño por radiación en el genotipo TT que en CC, lo cual puede asociarse a una menor reparación del daño al DNA. Es decir, que el polimorfismo del gen de la enzima MTHFR sí influye en la inducción de daño al DNA por radiación.

La respuesta a la radiación es distinta si comparamos dosis bajas con dosis altas, por lo que será necesario realizar estudios posteriores para determinar la influencia del polimorfismo ante el daño al DNA producido por dosis bajas de radiación, situación que se presenta en el personal ocupacionalmente expuesto.

Será interesante también poder determinar en estudios posteriores, la influencia del polimorfismo que nos ocupa, en los resultados del tratamiento con radiación en pacientes con cáncer, de forma que pueda orientar a modificar el fraccionamiento o la dosis de tratamiento que se pueda requerir para cada genotipo.

La relación entre el polimorfismo del gen de la enzima MTHFR también permitirá en estudios posteriores conocer más acerca de los mecanismos de daño por radiación y la reparación del mismo.

Es importante también determinar en estudios posteriores la interrelación del polimorfismo del gen de la enzima MTHFR y la radiación, mediante otras técnicas más específicas de la reparación del daño.

## REFERENCIAS

1. Bailey L. B. & Gregory J. F. Folate Metabolism and Requirements. Recent Advances in Nutritional Science. J. Nutr., 1999; 129: 779-782.
2. Wei Q., Shen H., Wang Li-E, Duphorne Ch. M., Pillow P.C., Guo Z. Association between Low Dietary Folate Intake and Suboptimal Cellular DNA Repair Capacity. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003; 12: 963-969.
3. Wang X. & Fenech M. A comparison of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate for prevention of DNA damage and cell death in human lymphocytes *in vitro*. Mutagenesis, 2003; 18(1): 81-86.
4. Duthie S. J., Narayanan S., Brand G. M., Pirie L. & Grant G. Impact of Folate Deficiency on DNA Stability. Trans-HHS Workshop: Diet, DNA Methylation Processes and Health. J. Nutr. 2002; 132: 2444S-2449S.
5. Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. Mutation Research, 2001; 475: 57-67.
6. Bailey L. B. & Gregory J. F. Polymorphisms of Methylenetetrahydrofolate Reductase and Other Enzymes: Metabolic Significance, Risks and Impact on Folate Requirement. J. Nutr, 1999; 129: 919-922.
7. Kimura M., Umegaki K., Higuchi M., Thomas P. & Fenech M. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T polymorphism, Folic Acid and Riboflavin Are Important Determinants of Genome Stability in –cultured Human Lymphocytes. J. Nutr., 2004: 134: 48-56.
8. Narayanan S., McConnell J., Little J., Sharp L., Piyathilake Ch. J., Powers H. Associations between Two Common Variants C677T and A1298C in Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Measures of Folate Metabolism and DNA Stability (Strand Breaks, Misincorporated Uracil, and DNA Methylation Status) in Human Lymphocytes *In vivo*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004: 13(9): 1436-1443.
9. Steel G. Basic Clinical Radiobiology, 3a edición. 2002.
10. Prise K. M., Schettino G., Folkard M., Held K. D. New insights on cell death from radiation exposure. Lancet Oncol, 2005; 6: 520-528.

11. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 2000; 455: 81-95.
12. Crott J. W., Mashiyama S. T., Ames B. N., Fenech M. The Effect of Folic Acid Deficiency and *MTHFR* C677T Polymorphism on Chromosome Damage in Human Lymphocytes *in Vitro*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001; 10: 1089-96.
13. Beetstra Sasja, Thomas Philip, Salisbury Carolyn, Turner Julie, Fenech Michael. Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei. *Mutation Research*, 2005.
14. Foray Nicolas, Charvet Anne-Marie, Duchemin David, Favaudon Vincent, Lavalette Daniel. The repair rate of radiation-induced DNA damage: A stochastic interpretation based on the Gamma function. *Journal of theoretical Biology*, 2005; 236: 448-458.
15. Fodinger Manuela, Horl Walter, Sunder-Plassmann Gere. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, *Journal Nephrology*, 2000; 13:20-33.
16. Wang Xu, Fenech Michael. A comparison of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate for prevention of DNA damage and cell death in human lymphocytes *in vitro*. *Mutagenesis*, 2003; 18 (1): 81-86.
17. Veelen Lieneke R., Cervelli Tiziana, van de Rakt Mandy W.M.N., Theil Arjan F, Essers Jeroen, Kanaar Roland. Analysis of ionizing radiation-induced foci of DNA damage repair proteins. *Mutation Research*, 2005; 574: 22-33.
18. Reddy Madhava C., Vasquez Karen M. Review: Repair of genome destabilizing lesions. *Radiation Research*, 2005; 164: 345-356.
19. Budworth Helen, Matthewman Gemma, O'neill Peter Dianov Grigory L. Repair of tandem base lesions in DNA by human cell extracts generates persisting single-strand breaks. *Journal of Molecular Biology*, 2005; 351: 1020-1029.
20. Rydberg Bjorn, Cooper Brian, Cooper Priscilla K., Holley William R., Chatterjee Alok. Dose-dependent misrejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts: experimental and theoretical study for high- and low-LET radiation. *Radiation research*, 2005; 163: 526-534.
21. Bryant Peter E. Repair and chromosomal damage. *Radiotherapy and Oncology*, 2004; 72: 251-256.

22. young-In Kim. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutrition Reviews*, 2000; 58 (7): 205-208.
23. James S Jill, Pogribna Marta, Pogribny Igor P, Melnyk Stepan, Hine Jean, Gibson James B, Yi Ping, Tafoya Dixie L., Swenson David H., Wilson Vincent L., Gaylor David W. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clinical Nutriology*, 1999; 70: 495-501.
24. Lathrop Stern Lori, Mason Joel B., Selhub Jacob, Choi Sang-Woon. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leucocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer, Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2000; 9: 849-853.
25. Brink A, Schulz B, Kobras K, Lutz WK, Stopper H. Time-dependent effects of sodium arsenite on DNA breakage and apoptosis observed in the comet assay. *Mutat Res*. 2005.
25. Batra V, Kesavan V, Mishra KP. Modulation of enzymes involved in folate dependent one-carbon metabolism by gamma-radiation stress in mice. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2004;45(4):527-33.