



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**“EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A INSECTICIDAS EN LA INDUCCIÓN DE DAÑO  
EN EL GEN *MLL* EN LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO*”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MARÍA DEL PILAR NAVARRETE MENESES**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA  
FACULTAD DE MEDICINA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ  
FACULTAD DE MEDICINA

**MÉXICO, D.F. MAYO, 2014**



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 17 de febrero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **NAVARRETE MENESES MARÍA DEL PILAR** con número de cuenta **301567822**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A INSECTICIDAS EN LA INDUCCIÓN DE DAÑO EN EL GEN *MLL* EN LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO*"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA**:

Presidente: MED. ESP. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI  
Vocal: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL  
Secretario: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO  
Suplente: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO  
Suplente: DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 08 de abril de 2014

*M. del Coro Arizmendi*  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

## **AGRADEZCO:**

**Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por recibirme  
dentro de su privilegiada comunidad de alumnos**

**Los apoyos económicos que permitieron la realización de este  
trabajo:**

**Beca de Maestría CONACYT (385279)  
“Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-  
CONACYT” CB-2012-01/183467  
Fundación Miguel Alemán 2012  
Fondos Federales 2013 del Instituto Nacional de Pediatría**

**A los miembros del Comité Tutor por todo su apoyo, consejos y  
aportaciones:**

**Dr. Mario Altamirano Lozano**

**Dr. Edmundo Bonilla González**

**MUCHAS GRACIAS:**

A la **Dra. Patricia Pérez** por confiar en mi, por sus consejos, enseñanzas y su enorme apoyo

Al **Dr. Miguel Betancourt** por su especial dedicación y ayuda para la realización de este trabajo

A los miembros del jurado por sus observaciones y aportaciones

**Dra. Alessandra Carnevale Cantoni**  
**Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal**  
**Dr. Juan José Rodríguez Mercado**

Al **Departamento de Investigación Genética Humana**, del Instituto Nacional de Pediatría

A los integrantes del **Laboratorio de Cultivo de Tejidos, INP:**

**Chío, Vero, Chelo, Adri, Meche, Rob, Alex y J. Carlos;**  
por su apoyo, disposición, ayuda y amistad

A los donadores que aceptaron participar en este estudio, gracias por su fundamental ayuda.

*Dedicado a los niños con cáncer, inspiración y motivo de este proyecto*

**Con infinito amor y agradecimiento a mis padres, TODO  
se los debo a ustedes**

**Laura Meneses**

**y**

**Tomás Navarrete**

**Agradezco a Dios por tenerlos conmigo y porque nos ha  
llenado de bendiciones**

**Gracias por todo su amor e invaluable apoyo,  
son parte fundamental de mi vida:**

**Sergio, Leo, Dian, Ricardo, Vale, Tita**

**...Y toda mi Familia (Meneses y Navarrete)**

***"Nothing in life is to be feared, only to be understood.  
Now is the time to fear less so we can understand more"***

***-Marie Curie***

# ÍNDICE

Página

<b>I RESUMEN</b>	i
<b>II ABSTRACT</b>	ii
<b>1. ANTECEDENTES</b>	1
1.1. Leucemia linfoblástica aguda	1
1.1.1. Epidemiología y definición	1
1.1.2. Etiología	1
1.1.3. Características genéticas	2
1.1.4. Origen intrauterino de las leucemias pediátricas	5
1.1.5. Leucemia secundaria a tratamiento	6
1.1.6. LLA con rearrreglos en el gen <i>MLL</i>	6
1.1.7. Rearreglos en el gen <i>MLL</i> inducidos por la exposición a agentes	10
1.2. Insecticidas: Malatión y permetrina	11
1.2.1. Malatión	12
1.2.2. Permetrina	13
1.2.3. Plaguicidas y leucemia	13
1.3. Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH) en linfocitos de sangre periférica	15
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	18
<b>3. HIPÓTESIS</b>	18
<b>4. OBJETIVO</b>	18
<b>5. METODOLOGÍA</b>	19
5.1. Ensayos para establecer la concentración de insecticidas con mayor efecto: Donador I	19
5.1.1. Cultivo de linfocitos, tratamiento, viabilidad, cosecha e índice mitótico	19
5.1.2. Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia	20
5.1.3. Análisis estadístico	21
5.2. Ensayos en ambos donadores (I y II) con el tratamiento seleccionado	22
<b>6. RESULTADOS</b>	24
6.1. Ensayos para establecer la concentración con mayor efecto: Donador I	24
6.1.1. Viabilidad	24
6.1.2. Índice Mitótico	24
6.1.3. Análisis del gen <i>MLL</i> por medio de FISH	26



6.2. Ensayos con muestras de ambos donadores (I y II) con la concentración seleccionada: 200 $\mu$ M	31
6.2.1. Viabilidad celular	31
6.2.2. Índice Mitótico	31
6.2.3. Análisis del gen MLL por medio de FISH	33
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
7.1. Ensayos para establecer la concentración con mayor efecto: Donador I	43
7.1.1. Viabilidad e IM	43
7.1.2. Daño al gen <i>MLL</i>	44
7.2 Ensayos con el esquema de tratamiento seleccionado (Donadores I y II)	47
7.2.1 Viabilidad e IM	47
7.2.2 Daño al gen MLL	47
<b>8. CONCLUSIÓN</b>	<b>58</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>60</b>
<b>ANEXOS</b>	

## Listado de Tablas y Figuras

<b>Figura/Tabla</b>	<b>Página</b>
Figura 1	4
Figura 2	9
Figura 3	17
Figura 4	17
Figura 5	23
Figura 6	25
Figura 7	30
Figura 8	32
Figura 9	37
Figura 10	38
Figura 11	39
Figura 12	50
Tabla 1	21
Tabla 2	26
Tabla 3	28
Tabla 4	29
Tabla 5	31
Tabla 6	36
Tabla 7	39
Tabla 8	40
Tabla 9	53
Tabla 10	54

## i. RESUMEN

**Antecedentes:** La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el tipo de cáncer más común en pediatría por lo que se considera una prioridad en salud. Aproximadamente el 75% de los pacientes con LLA presentan algún rearrreglo cromosómico; en particular, las alteraciones que afectan al gen *MLL* se observan en la mayoría de las leucemias neonatales (80%) y en el 3-5% de las leucemias pediátricas. Se ha propuesto que las alteraciones en este gen se originan *in utero* y son inducidas por la exposición a diversos agentes, como los insecticidas. En numerosos estudios epidemiológicos se han asociado estos agentes con el desarrollo de LLA, sin embargo la evidencia biológica es limitada. La genotoxicidad de los insecticidas también ha sido analizada midiendo daño global al ADN, sin embargo, poco se ha profundizado en el estudio de alteraciones en genes específicos asociados a esta enfermedad. **Objetivo:** Detectar si la exposición a los insecticidas permetrina y malatión induce alteraciones en el gen *MLL*, rupturas o desviaciones en el número de copias, en cultivos de linfocitos de sangre periférica de individuos sanos. **Métodos:** Inicialmente se buscaron las condiciones adecuadas (concentración, tiempo de exposición, inducción de daño en *MLL*) para realizar el estudio, utilizando una muestra de sangre periférica de un donador sano; se probaron tres concentraciones de los insecticidas malatión y permetrina (100, 200 y 300  $\mu\text{M}$ ). Se realizaron cultivos de 72 h por triplicado a partir de células mononucleadas. A las 48 h se aplicó el tratamiento correspondiente, como controles negativos se utilizaron los disolventes etanol y dimetilsulfóxido (DMSO). Se incluyeron cultivos sin tratamiento, así como cultivos expuestos a 1 y 10  $\mu\text{M}$  de etopósido, como control positivo. Finalizado el tiempo de cultivo se determinó la viabilidad y el índice mitótico. El análisis del gen *MLL* se realizó mediante hibridación *in situ* con fluorescencia utilizando una sonda de ruptura de doble color. Se analizaron 1000 núcleos por ensayo y condición de tratamiento. Se determinó la frecuencia de células con alteraciones numéricas o estructurales, se hicieron comparaciones mediante la prueba de U-Mann Whitney (etanol vs malatión y permetrina vs DMSO), se consideró significancia estadística con una  $p \leq 0.05$ . Derivado de estos ensayos, se seleccionó para ambos insecticidas la concentración de 200  $\mu\text{M}$  como la de mayor efecto de causar daño estructural, conservando la viabilidad celular. Con el tratamiento descrito se llevaron a cabo experimentos con la muestra de un segundo donador sano y se completaron seis repeticiones. Posteriormente se realizó el análisis estadístico conjuntando los resultados de ambos donadores. **Resultados: Etapa 1, selección de concentración de mayor efecto:** La exposición a ambos insecticidas afectó la viabilidad e índice mitótico, sin embargo no se encontró correlación significativa (prueba de Spearman). En cuanto al daño en el gen *MLL*, no se observó un comportamiento de tipo

concentración-respuesta lineal con ningún insecticida. La máxima frecuencia de células con daño estructural se observó con la concentración de 200  $\mu\text{M}$  para ambos insecticidas; la permetrina también indujo alteraciones numéricas. **Etapa 2, análisis de ambos donadores:** Los resultados con ambos donadores mostraron disminución significativa en la viabilidad por efecto de la exposición a malatión. Adicionalmente se encontró que ambos insecticidas incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) la frecuencia de células con daño estructural en comparación con el control. En particular, la permetrina elevó el número de células con daño numérico ( $p < 0.05$ ) e incrementó la heterogeneidad de daño ( $p < 0.05$ ), ya que se detectaron diversos patrones de alteración. Algunos de los patrones observados también fueron identificados en cultivos expuestos a etopósido, el cual es un conocido agente inductor de LLA. **Discusión/Conclusión:** Se encontró que ambos insecticidas, malatión y permetrina, son capaces de inducir daño estructural en el gen *MLL*. Algunas de las alteraciones observadas son similares a las referidas en células tratadas con inhibidores de la ADN topoisomerasa II, que son leucemógenos conocidos. Se observó que la exposición a permetrina incrementa la diversidad de daño e induce alteraciones numéricas, este resultado revela su potencial aneuploidógeno el cual no ha sido previamente descrito. El mecanismo por el que estos insecticidas generan daño a *MLL* debe ser elucidado, es probable que se asocie a su función como disruptores endócrinos, ya que se refiere que los estrógenos inducen rupturas en este gen. Sin embargo, no se debe descartar que sea a través de la activación de sistemas apoptóticos, especialmente en el caso de malatión, ya que se encontró una disminución significativa en la viabilidad. De manera general, este trabajo ofrece evidencia biológica sobre la capacidad de los plaguicidas, malatión y permetrina, de inducir lesiones en *MLL*, las cuales están involucradas en el desarrollo de la LLA. Los resultados encontrados apoyan las observaciones derivadas de los estudios epidemiológicos.

## ii. ABSTRACT

**Introduction:** Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent childhood cancer and is considered a health priority. Approximately 75% of ALL patients present a chromosome rearrangement; particularly those abnormalities involving *MLL* gene are mostly observed in infant-ALL (80%), and in 3-5% of childhood-ALL. It has been proposed that *MLL* abnormalities arise *in utero* and are induced by exposure to certain agents including insecticides. Numerous epidemiological studies have demonstrated strong association between exposure to pesticides and the development of ALL. The genotoxic effects of these agents have also been widely studied; global DNA damage has been monitored, however there are limited reports analyzing the damage induced by insecticides in specific genes involved in leukemogenesis. The aim of this study was to detect if the *in vitro* exposure to the insecticides, malathion and permethrin, induces aberrations in *MLL*, as breaks or copy number deviations, in cultured lymphocytes from peripheral blood of healthy volunteers. **Methods:** At first, the experimental conditions (concentration, time of exposure, *MLL* damage) were optimized using a blood sample obtained from one healthy donor. Three different concentrations of malathion and permethrin were tested (100, 200 and 300  $\mu\text{M}$ ). Mononuclear cells were obtained and cultured for 72 h in triplicate. Treatments were applied after 48 h of culture. Ethanol and dimethyl sulfoxide (DMSO) were used as solvents and thus, as negative controls. Cultures without any treatment, as well as cultures exposed to 1 and 10  $\mu\text{M}$  of etoposide (positive control), were included. After 72 h of culture viability and mitotic index were determined. The *MLL* gene was analyzed by fluorescence *in situ* hybridization using a break-apart double colored probe. One-thousand nuclei were analyzed by assay. The frequency of cells with numerical and/or structural aberrations was determined and compared by the U-Mann Whitney test (ethanol vs malathion and DMSO vs permethrin);  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant. The 200  $\mu\text{M}$  concentration was selected to perform the experiments with both insecticides, based on its major effect inducing structural damage, but preserving cell viability. Using this treatment condition, experiments with a peripheral blood sample from a second healthy donor were carried out in triplicate; a total of six replications for this exposure scheme were completed. Statistical analysis was performed using the results of both donors. **Results: Stage 1, selecting the concentration with major effect:** Exposure to both insecticides affected viability and mitotic index, however this was not statistically significant (Spearman test). Concerning *MLL* gene damage, a concentration-response correlation was not observed with any agent. The major cell frequency with structural aberrations was observed with 200  $\mu\text{M}$  for both pesticides. The permethrin exposure also increased the frequency of cells with numerical

abnormalities. **Stage 2, analysis with both healthy donors:** The results obtained with both donors showed a significant decrease in viability by exposure to malathion. In addition, both insecticides increased ( $p < 0.05$ ) the frequency of structural damage compared to controls. The exposure to permethrin also induced numerical aberrations ( $p < 0.05$ ) and increased the heterogeneity of damage ( $p < 0.05$ ) reflected as a higher number of different patterns of damaged cells. Some of the damage patterns produced by insecticides have been also identified in cells exposed to etoposide, a well-known leukemogenic agent.

**Discussion/Conclusion:** The results revealed that malathion and permethrin can induce structural damage in *MLL* gene. Some of these abnormalities are similar to those observed in cells exposed to DNA-topoisomerase inhibitors, which are well-known leukemogenic agents. In addition, it was observed that permethrin exposure increase the damage heterogeneity and induce numerical abnormalities; the aneuploidogenic potential of this insecticide has not been reported to date. The mechanism by which these agents produce *MLL* aberrations requires to be elucidated; one possibility is by their function as endocrine disruptors, since there is evidence that shows that estrogens can induce *MLL* breaks. However, activation of apoptotic systems as a mechanism of breakage induction may not be discarded, since malathion reduced significantly the viability. In general, this study offers a biological evidence of the ability of the insecticides malathion and permethrin to induce *MLL* gene lesions, which are involved in the ALL development. The results obtained herein supports the observations derived from epidemiological studies.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Leucemia linfoblástica aguda**

#### **1.1.1 Epidemiología y definición**

El cáncer es la segunda causa de muerte infantil, y las leucemias agudas constituyen el tipo más común. En los Estados Unidos representan el 31% de todos los tipos de cáncer y se diagnostican más de 3000 casos nuevos al año <sup>1,2</sup>. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) conforma el 80% de las leucemias agudas, es una enfermedad hematológica maligna que se caracteriza por la proliferación desordenada de células linfoides inmaduras que predominan en la médula ósea y alteran la hematopoyesis normal <sup>1,3</sup>. El subtipo de LLA más frecuente es el que presenta células con inmunofenotipo B, constituyendo aproximadamente el 85% de todas las LLA <sup>1,4,5</sup>. La incidencia de leucemia en México referida en 2010, fue de aproximadamente 6.2 casos por cada 100, 000 habitantes, por lo que se considera un problema de salud en nuestro país <sup>4-6</sup>.

#### **1.1.2 Etiología**

La etiología de la LLA es multifactorial, los únicos factores que se han reconocido como causales son la exposición a radiación ionizante y la presencia de síndromes genéticos específicos como el síndrome de Down; no obstante estos tan sólo explican la minoría de los casos (10%) <sup>2-4</sup>. Igual que en otros tipos de cáncer, se ha identificado que los mecanismos que llevan al desarrollo de LLA involucran interacciones génico-ambientales <sup>7</sup>.

Existe evidencia de que la exposición a productos químicos como benceno, derivados del petróleo y plaguicidas contribuyen al desarrollo de leucemia, dependiendo del tiempo de exposición y de la susceptibilidad genética del individuo <sup>8-14</sup>.

El período prenatal se ha identificado como una etapa de especial susceptibilidad, de hecho existe una fuerte asociación entre la exposición *in utero* a agentes y el desarrollo de LLA. En lo que se refiere a plaguicidas, a la fecha se han realizado por lo menos 30 estudios epidemiológicos que asocian la exposición a estos agentes con el desarrollo de LLA en niños <sup>14-16</sup>. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*IARC=International Agency for Research on Cancer*), ha clasificado a varios de los insecticidas que se aplican por aspersion como probables carcinógenos de importancia en el desarrollo de estas enfermedades. Las fuentes de exposición en niños pueden ser mediante la ingesta de leche materna y otros alimentos; a través de la piel o inhalados, ya sea en el hogar en forma de polvo, o en el exterior en el agua, aire, o suelo <sup>16</sup>. De forma similar también se puede exponer el feto durante la gestación <sup>7,17</sup>. La información obtenida de los estudios de casos y controles es numerosa, sin embargo, es escasa la evidencia biológica directa que soporta la asociación entre la exposición a insecticidas y el desarrollo de neoplasias hematológicas como LLA.

### **1.1.3. Características genéticas**

La LLA se origina a partir de progenitores hematopoyéticos comprometidos a diferenciarse en linaje T (LLA-T) o B (LLA-B), los cuales sufren lesiones génicas que les confieren capacidades como la auto-renovación ilimitada o arresto en la diferenciación. Existe evidencia sólida que muestra que la adquisición de estos cambios genéticos es necesaria en el desarrollo de la leucemia, ya que están directamente asociados con la biología de la enfermedad, razón por la cual confieren un valor pronóstico específico para el paciente y son usados para la estratificación de riesgo <sup>3,18</sup>. Aproximadamente el 75% de los pacientes con LLA presentan algún rearreglo cromosómico relevante para el pronóstico <sup>19-21</sup>. Se han identificado alrededor de 200 genes



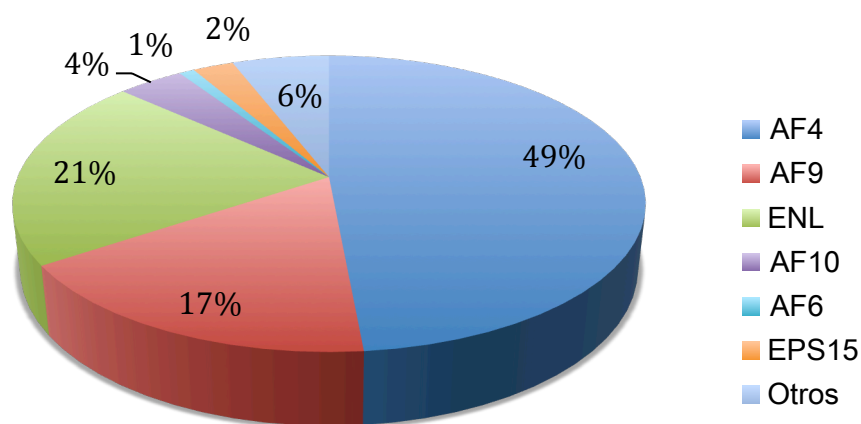
involucrados en alteraciones cromosómicas, de los cuales algunos predominan por la frecuencia con la que se alteran y porque han sido encontrados en rearrreglos asociados con el pronóstico de los pacientes que los presentan <sup>22</sup>.

Las aberraciones cromosómicas pueden afectar el número (ploidía) y/o la estructura de los cromosomas, llevando a la desregulación de genes que generalmente codifican factores de transcripción y que en consecuencia, afectan las vías transcripcionales que regulan la homeostasis de la célula hematopoyética <sup>3,18</sup>. Entre los cambios estructurales se encuentran inversiones, deleciones y translocaciones, éstas últimas son las más frecuentes en LLA y conllevan a: a) Reubicación de genes que normalmente se encuentran separados, en este caso uno de los genes funciona como potenciador de la transcripción que activa la expresión del segundo gen, que en su sitio original se encontraba regulado; este es el caso de los oncogenes *MYC* y *BCL2* que se sobre-expresan bajo la influencia del potenciador transcripcional del gen que codifica la cadena pesada de inmunoglobulinas (*IGH*). b) Con mayor frecuencia se originan fusiones génicas que codifican proteínas híbridas, que generalmente resultan en la alteración de la actividad de cinasas o de factores de transcripción; un ejemplo es la proteína codificada por la fusión *ETV6-RUNX1*, en la que *RUNX1* pierde su capacidad de reclutar factores de transcripción necesarios para la expresión de genes requeridos en la hematopoyesis normal <sup>22,23</sup>.

Los puntos de ruptura de las translocaciones ocurren en genes y sitios específicos, y se encuentran agrupados en regiones conocidas como BCR (*Breakpoint Cluster Region*). Se plantea que la especificidad de corte en el BCR puede deberse a que la región posea vulnerabilidad para la ruptura, como es el caso de las regiones de cromatina abierta en la que los genes se expresan activamente; otra posibilidad es que tanto las rupturas como las

translocaciones ocurran al azar en el genoma. Sin embargo, de las alteraciones que se generen por cualquiera de estas vías, sólo algunas conferirán ventajas para la transformación leucémica y serán las que promuevan la expansión clonal <sup>22,23</sup>.

Las translocaciones más frecuentemente observadas en LLA pediátrica y con valor en el pronóstico desde el punto de vista clínico, son: a) La translocación t(12;21)(*ETV6-RUNX1*) detectada en el 10 al 25% de los pacientes; b) t(9;22)(*BCR-ABL1*) en el 4% de los casos; c) t(1;19)(*E2A-PBX1*) se reporta en el 6% y d) las alteraciones en 11q23 que involucran al gen *MLL* y a diversas parejas, entre las más frecuentes están la t(4;11)(*AF4-MLL*), t(9;11)(*AF9-MLL*), t(11;19)(*MLL-ENL*) y t(6;11)(*AF6-MLL*) (**Figura 1**) <sup>24</sup>. En particular, la t(4;11) se presenta en el 80% de los pacientes que desarrollan leucemia durante el primer año de vida (leucemia neonatal) y en el 3-5% de los niños mayores <sup>3,22,25</sup>. La presencia de esta translocación específica en leucemia neonatal, y el corto tiempo en que se desarrolla la enfermedad (menos de 1 año), ha sugerido la posibilidad de que el origen de la LLA ocurra *in utero*.



**Figura 1.** Genes con los que *MLL* forma fusiones más frecuentemente en LLA pediátrica<sup>24</sup>.

#### 1.1.4 Origen intrauterino de las leucemias pediátricas

En las leucemias pediátricas el primer evento de mutación posiblemente lo constituye una fusión génica, que se ha propuesto que ocurre en células troncales durante las primeras etapas de la vida <sup>22</sup>. Las evidencias que llevaron a sugerir este concepto, son el corto período en el que se desarrolla la leucemia neonatal, la alta frecuencia de alteraciones del gen *MLL* en esta enfermedad y el 100% de concordancia de aparición de LLA con alteración de este gen en gemelos monocigotos <sup>22,26</sup>.

Lo anterior, motivó la búsqueda de la fusión génica *MLL-AF4* en muestras de sangre de filtros de Guthrie del tamiz neonatal de pacientes con esta enfermedad <sup>26</sup>. A través de estos estudios, se detectó la presencia de la alteración en muestras de sangre neonatal y se determinó el origen intrauterino de la fusión *MLL-AF4* en el 100% de los casos analizados <sup>22</sup>. De forma similar también se detectó que las fusiones *ETV6-RUNX1* (75% de los casos), *E2A-PBX1* (10% de los casos) y las hiperdiploidías (100% de los pacientes, estudio único), se encuentran presentes en los filtros de Guthrie <sup>22</sup>. Con base en estas observaciones, se asume que la mayoría de las alteraciones que caracterizan a las leucemias agudas pediátricas son adquiridas desde la etapa intrauterina, aunque no siempre son suficientes para el desarrollo de la enfermedad por lo que se requieren mutaciones adicionales <sup>3,22</sup>.

### 1.1.5 Leucemia secundaria a tratamiento

Se ha observado que 5 al 15% de los pacientes con un cáncer primario que fueron tratados con agentes inhibidores de la ADN topoisomerasa II (etopósido, tenipósido, mitoxantrona, daunorubicina, actinomicina D, adriamicina), desarrollan leucemia secundaria al tratamiento con rearrreglos en *MLL* <sup>27,28</sup>. Esta estrecha asociación, ha motivado la evaluación de inhibidores sintéticos y naturales para conocer su capacidad de causar rearrreglos en *MLL* <sup>29</sup>. Estos estudios han sugerido que entre los agentes de riesgo se encuentran: bioflavonoides (genisteína, quercetina, naringina), benceno, estrógenos, medicamentos (metronidazol, dipirona) así como insecticidas (permetrina) <sup>11,17,29-31</sup>. Sin embargo, actualmente no se conoce si todos los agentes que alteran a *MLL* lo hacen a través de la inhibición de dicha enzima.

### 1.1.6 LLA con rearrreglos en *MLL*

Las leucemias que presentan rearrreglos cromosómicos en la banda 11q23, donde se ubica el gen de leucemia de linaje mielo/linfoide o mixto (OMIM: 159555, *MLL*, *MLL1*, *ALL1*, *TRX* o *HTRX*), son de mal pronóstico. Este tipo de aberraciones se observa en la mayoría de las leucemias neonatales, en el 10% de las leucemias *de novo* en adulto y en el 33% de los pacientes con leucemias secundarias a tratamiento por un cáncer previo <sup>32</sup>. El gen *MLL* es el candidato idóneo para sustentar el modelo de la génesis de mutaciones asociadas a LLA *in utero*, por su alta frecuencia en leucemia neonatal, por la presencia de rearrreglos de este gen en muestras de sangre proveniente de los filtros del tamiz metabólico, y porque existe concordancia en gemelos con LLA con mutación en *MLL* <sup>22,26</sup>.

El gen *MLL* es el homólogo humano del gen *tritórax* de *Drosophila melanogaster*, consiste en 36 exones y codifica una proteína de unión a ADN de 430 kDa que regula genes homeóticos (*HOX=homeobox*) a través de la metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4) <sup>33</sup>. La proteína madura se compone de dos subunidades no covalentemente asociadas (MLL-N 300 kDa y MLL-C 180 kDa), las cuales se generan a partir de la escisión de MLL por la enzima treonina-aspartasa (taspara 1) <sup>25,34</sup>.

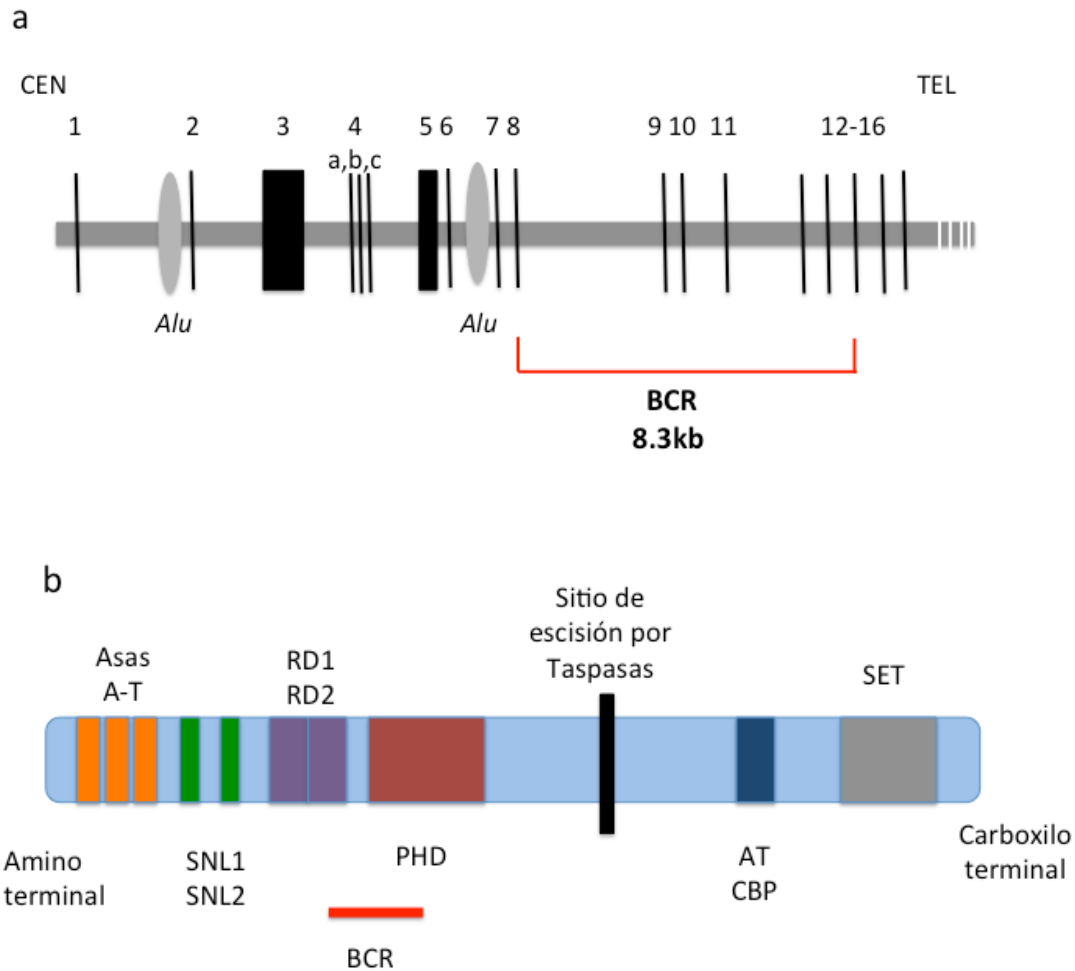
MLL es una proteína de múltiples dominios que se unen directamente al ADN por medio de secuencias ricas en AT o islas CpG no metiladas, o indirectamente a través de factores de transcripción de secuencia específica. Los dominios que presenta MLL son: 1) asas AT, que participan en la unión a ADN, 2) dos motivos SNL1 y 2 (*Speckled Nuclear Localization sites*), 3) un dominio de represión transcripcional compuesto por dos subunidades, RD1 y RD2, 4) un dominio PHD (*Plant Homology Domain*) que media interacciones proteína-proteína, 5) un dominio activador de la transcripción que recluta al coactivador transcripcional CBP (*CREB-Binding Protein*) y 6) un dominio con actividad metil transferasa, SET (*Supressor of variegation, Enhancer-of-zeste, Trithorax*).

A pesar de que MLL contiene las subunidades RD1 y RD2, que reclutan represores transcripcionales y desacetilasas de histonas, es considerado un activador de la transcripción debido a su actividad metil transferasa y su dominio de activación transcripcional (**Figura 2**)<sup>20,25,32</sup>.

La proteína MLL se expresa en poblaciones celulares hematopoyéticas incluyendo progenitoras y troncales, su función mejor caracterizada es como regulador positivo de genes *HOX*, los cuales son factores de transcripción que

participan en el desarrollo de múltiples tejidos. Además de dictar el destino celular, MLL también orquesta la progresión del ciclo celular, por ejemplo a través de la regulación de la expresión de ciclinas y de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (*CDKIs*=cyclin-dependent kinase inhibitor) <sup>25,32</sup>.

Las translocaciones que involucran al gen *MLL* definen un grupo de leucemias con características muy particulares. La translocación más frecuente es la *t(4;11)(AF4-MLL)* (**Figura 1**)<sup>25</sup>, sin embargo, se han identificado más de 70 genes con los que *MLL* puede rearrreglarse y producir proteínas quiméricas en las que la actividad H3K4 metil transferasa normal se pierde. Estas proteínas con nuevas propiedades tienen la habilidad de transformar a las células hematopoyéticas en células leucémicas, a través de diferentes mecanismos; aunque las fusiones génicas constituyen el primer evento del origen de la leucemia no son suficientes para generarla, ya que se requieren mutaciones adicionales <sup>32,35</sup>.



**Figura 2.** a) Estructura del gen *MLL*, se muestran únicamente los exones del 1 al 16. El BCR (*Breakpoint Cluster Region*) comprende los exones 8 a 14. b) Estructura de la proteína *MLL*. En el extremo amino terminal se encuentran las asas A-T, que median la unión al ADN. Enseguida se encuentran los motivos SNL 1 y 2 (*Speckled nuclear localization sites*), a los que les sigue el dominio de represión transcripcional (compuesto por RD1 y RD2) y el PHD (*Plant Homology Domain*); entre estos últimos se encuentra el BCR. Hacia el extremo carboxilo terminal se encuentran el dominio de activación transcripcional, que recluta activadores como CBP (*CREB-Binding Protein*), así como el dominio SET (*Supressor of variegation, Enhancer-of-zeste, Trithorax*), que tiene actividad metil transferasa.

Los mecanismos propuestos para la generación de estas translocaciones incluyen la recombinación de secuencias altamente repetidas tipo *Alu*, este proceso es mediado por inhibidores de la ADN topoisomerasa II y por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (*NHEJ=non homologous end joining*). La gran mayoría de los rearrreglos en *MLL* tienen puntos de ruptura

que ocurren en la región de 8.3 kb, BCR, que comprende los exones 8 a 14 (**Figura 2**)<sup>25,34</sup>. *MLL* es rico en A-T, contiene elementos Alu y LINE, secuencias repetidas MER, sitios de reconocimiento de la ADN topoisomerasa II, así como regiones de unión al andamio (*SAR/MAR=scaffold attachment region /matrix attachment region*); se ha propuesto que estos elementos pueden tener un papel directo o indirecto en la formación de los rearreglos<sup>34,36</sup>.

### 1.1.7 Rearreglos en *MLL* inducidos por la exposición a agentes

En numerosos estudios se ha asociado la exposición a inhibidores de la ADN topoisomerasa II y la generación de rupturas en la región BCR de *MLL*, esto ha sugerido una relación causa-efecto entre las rupturas y la formación de translocaciones<sup>37</sup>. Como se indicó, existe un número amplio de agentes que han sido clasificados como inhibidores de dicha enzima, entre ellos las drogas utilizadas en quimioterapia tal como las antraciclinas (daunorubicina, doxorubicina y epirubicina), epipodofilotoxinas (etopósido y tenipósido), derivados de la dioxipiperazina (razoxano y bimolano) y antracenodionas como mitoxantrona. Otros agentes que se consideran inhibidores potenciales son los metabolitos del benceno, los bioflavonoides, las resinas, antibióticos, compuestos fenólicos y plaguicidas<sup>11,36</sup>.

En diversos estudios se ha investigado *in vitro* e *in vivo* si algunos de los agentes epidemiológicamente asociados al incremento de riesgo de desarrollar leucemia, son capaces de producir rupturas en el gen *MLL*; con este fin se han utilizado diferentes modelos como líneas celulares linfoblastoides leucémicas y normales, células troncales hematopoyéticas humanas CD34+ obtenidas de cordón umbilical, linfocitos de sangre periférica, células murinas del hígado fetal (que es el órgano en el que se establece la hematopoyesis embrionaria), así como células troncales embrionarias humanas.



Derivado de estos estudios se ha identificado que diversos bioflavonoides, estrógenos y plaguicidas son capaces de inducir rupturas en el gen *MLL* en células de origen hematopoyético <sup>17,29-31,36,38-42</sup>. Sin embargo, la gran mayoría de estos trabajos se han centrado en medicamentos quimioterapéuticos (etopósido) y son escasos los que incluyen otros agentes; más aún, para el caso de los plaguicidas existe solamente un estudio en el que se asoció la exposición a un insecticida (permetrina) con el daño específico en el gen *MLL* <sup>17</sup>. Aunque la evidencia epidemiológica que asocia a los plaguicidas con el desarrollo de leucemia es vasta, son necesarios más estudios que demuestren si estos agentes son capaces de inducir alteraciones relacionadas con la enfermedad.

## **1.2 Insecticidas: permetrina y malatión**

Los insecticidas son un grupo de agentes químicos ampliamente utilizados por el hombre, tanto para proteger de organismos nocivos la producción y calidad de las cosechas, como para el control de vectores y plagas importantes en la salud pública, por lo que tienen una amplia utilidad pecuaria y doméstica. Aunque los insecticidas producen efectos tóxicos altamente específicos, actuando en un solo blanco molecular o afectando principalmente a un grupo de organismos, también pueden incidir sobre el humano. Por lo anterior, existe preocupación sobre sus efectos en la salud; el interés en este tema se ha incrementado por episodios de envenenamientos asociados a insecticidas en las últimas décadas. También pueden presentarse efectos crónicos como el desarrollo de cáncer y la presencia de enfermedades hereditarias <sup>43,44</sup>.

La genotoxicidad de los insecticidas ha sido ampliamente estudiada, se ha demostrado su capacidad de causar rupturas en el ADN a través de los análisis de aberraciones cromosómicas (AC), micronúcleos (MN), intercambio de cromátidas hermanas (ICH), ensayo cometa y mutaciones del gen *HPRT* <sup>43-46</sup>. A continuación se describen los resultados encontrados al analizar la genotoxicidad de dos insecticidas de uso común, el malatión y la permetrina.

### 1.2.1 Malatión

El malatión es un insecticida organofosforado frecuentemente usado en jardinería y en la agricultura. Se ha determinado que produce ICH, AC, mutaciones en el gen *HPRT* en linfocitos humanos, e induce la producción de MN mayormente negativos a cinetocoro. Se asume que debe interactuar con el ADN, pero no se conoce el mecanismo <sup>47-50</sup>. Recientemente, se estudió con microarreglos que la exposición a este agente en cultivos de epitelio mamario incrementa en la expresión del gen responsivo a estrógeno (*EBBP*) y disminución en la timidilato sintetasa (*TYMS*) y en la cinasa del punto de control mitótico *BUB1*; la alteración de estos dos últimos genes podría repercutir en la inducción de daño génico/cromosómico estructural y numérico<sup>51</sup>.

Para el humano existen diversas formas de exposición al malatión, y se ha demostrado daño cromosómico en animales en ensayos *in vivo*. Aunque la demostración de genotoxicidad/carcinogenicidad en humanos no ha sido concluyente, este agente se considera de riesgo para la salud <sup>51</sup>.

### 1.2.2 Permetrina

La permetrina es un piretroide sintético utilizado como insecticida, se refiere que tiene baja toxicidad en mamíferos y deja pocos residuos en plantas, por lo que se usa ampliamente en el hogar. Se ha demostrado que este agente es capaz de inducir ICH, MN y AC de tipo estructural <sup>52-55</sup> y probablemente también numéricas, aunque este resultado no se ha reproducido en otros trabajos <sup>56</sup>. La permetrina no se ha clasificado como un carcinógeno en humanos, sin embargo, se ha encontrado en el modelo murino que en dosis altas causa tumores hepáticos y de pulmón <sup>52,53,55</sup>.

Como se puede observar, existen trabajos que evidencian la genotoxicidad de la permetrina y el malatión y se ha mostrado que causan daño global al ADN. Sin embargo, no se ha explorado su capacidad de producir lesiones en genes específicos asociados con el desarrollo de hemopatías malignas ni en sus consecuencias en la linfopoyesis. Por lo que se requiere mayor estudio para aportar evidencia biológica que sustente la asociación entre la exposición a insecticidas de uso común y el desarrollo de leucemias y linfomas.

### 1.2.3 Plaguicidas y leucemia

A través de estudios epidemiológicos se ha observado que las poblaciones expuestas a altas concentraciones de insecticidas presentan mayor riesgo de desarrollar LLA, de hecho esta enfermedad se ha asociado con la exposición *in utero* a estos agentes <sup>11,15,16</sup>. En México, el Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes refiere que en el período comprendido entre 2005 y 2010, en los pacientes menores de 20 años con leucemias y tumores, los plaguicidas y

fumigantes ocuparon el primer lugar en exposición a agentes químicos con el 53% y el 47% de los casos respectivamente <sup>5</sup>. Sin embargo, aunque existen numerosos estudios epidemiológicos que asocian la exposición a plaguicidas con el desarrollo de esta enfermedad, aún no se cuenta con suficiente evidencia biológica que sustente estas observaciones.

En la literatura sólo dos referencias vinculan directamente la exposición a insecticidas con la producción de daño en genes alterados en leucemia. Se refiere el caso de una mujer que en el hogar estuvo expuesta a permetrina antes y durante el embarazo; su hijo fue diagnosticado al nacimiento con leucemia positiva a la fusión génica *MLL/AF4*. Estos hallazgos sugieren que la permetrina fue capaz de atravesar la barrera placentaria y afectar al producto durante su desarrollo. Para dar solidez a esta hipótesis, se realizó un estudio *in vitro* con la línea celular leucémica BV173, en el que se comprobó por la técnica de Southern-blot que la permetrina induce ruptura en el gen *MLL* <sup>17</sup>.

En un trabajo independiente se estudiaron niños recién nacidos, hijos de trabajadores expuestos a propoxur y cipermetrina; se detectaron trazas de los agentes en el íleo meconio de los niños estudiados, y en células del cordón umbilical se identificó la fusión génica *RUNX1-RUNX1T1*, la cual es característica de la leucemia aguda mieloide tipo M2. Los resultados mostraron asociación entre los niveles de propoxur detectados y la presencia de la fusión génica analizada, lo cual sugiere la participación del agente en la generación del rearreglo <sup>57</sup>.

Como se mencionó anteriormente, tanto el malatión como la permetrina son capaces de inducir genotoxicidad y además existe evidencia a nivel clínico y epidemiológico que asocia la exposición a estos agentes con el desarrollo de leucemias y linfomas. Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado directamente si estos insecticidas son capaces de producir daño en genes involucrados en LLA. La detección del aumento en la frecuencia de rupturas y cambios en el número de copias en los genes alterados en LLA, como *MLL*, ayudará a determinar el efecto de la exposición a malatión y permetrina en la generación de las alteraciones genéticas causales de esta leucemia.

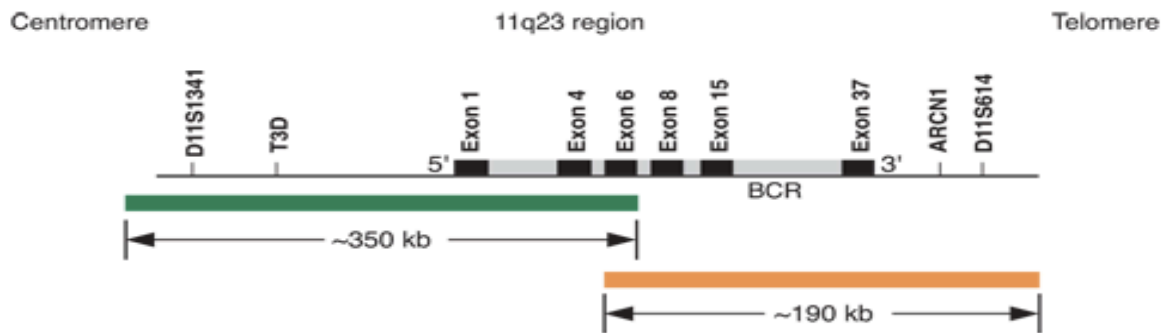
### **1.3 Hibridación *in situ* con fluorescencia en linfocitos de sangre periférica**

Entre las metodologías utilizadas para el análisis de daño al gen *MLL* por exposición a agentes se encuentra la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), la cual es una prueba que revela la presencia y localización de sondas de ADN específicas marcadas con fluorocromos que forman híbridos con la secuencia complementaria en la muestra problema <sup>58</sup>.

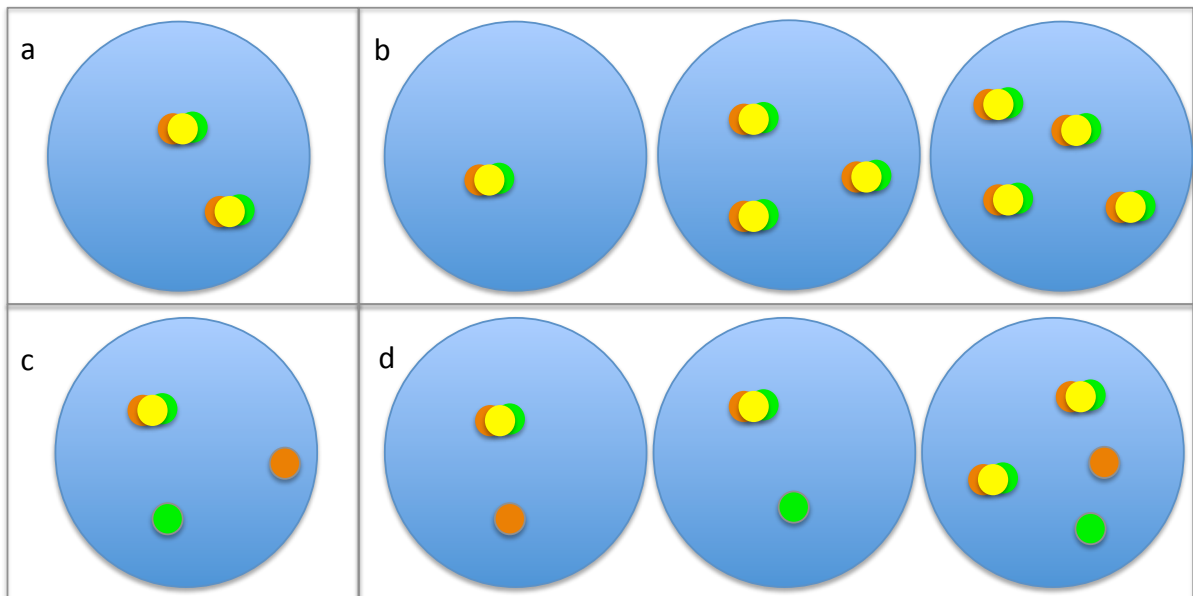
El método es aplicable tanto a cromosomas en metafase como a núcleos en interfase, lo cual permite analizar un número amplio de células, del orden de cientos o miles. Para el análisis de *MLL* se utiliza una sonda de segregación de doble color diseñada para detectar rupturas del gen; consiste en una porción de 350 kb centromérica a la región del punto de ruptura del gen (BCR) marcada con fluorocromo con espectro verde, así como una porción telomérica al BCR de 190 kb marcada con fluorocromo con espectro naranja (**Figura 3**). El uso de estas sondas, además de permitir la detección de alteraciones estructurales como rupturas, translocaciones y rearrreglos complejos, también

permite analizar alteraciones en el número de copias que pueden originarse por aneuploidía o por amplificación génica <sup>36,59</sup> (**Figura 4**).

El ensayo de FISH se puede realizar en diversos tipos celulares incluyendo al linfocito humano, el cual ha sido utilizado exitosamente para estimar la citotoxicidad y genotoxicidad *in vitro* producidas por diversos agentes. El modelo del linfocito humano es comúnmente usado porque confiere reproducibilidad, permite realizar comparaciones con trabajos similares y se aplica ampliamente en el estudio de poblaciones humanas expuestas a insecticidas, ya que la obtención de la muestra de sangre y su cultivo son muy accesibles <sup>43,44,49,50,52,54,55</sup>.



**Figura 3.** Diseño de la sonda de doble color para el análisis del gen *MLL* por medio de FISH<sup>59</sup>. La colocación de la señal verde y la naranja se observa como una señal amarilla.



**Figura 4.** Patrones de señales de *MLL*. a) célula sin alteración (*MLLx2*, dos señales amarillas); b) células con variación en el número de copias (*MLLx1*, *MLLx3* y *MLLx4*); c) célula con ruptura clásica de *MLL*; d) células con diferentes patrones de daño (célula con *MLLx1* más señal roja; célula con *MLLx1* más señal verde y célula con *MLLx2* más una copia de *MLL* con ruptura clásica)

## 2. JUSTIFICACIÓN

La genotoxicidad de los insecticidas ha sido ampliamente estudiada y se ha demostrado su capacidad de causar rupturas en el ADN. Sin embargo, estos estudios sólo monitorizan el daño global en el ADN, pero pocos profundizan en las alteraciones producidas en genes específicos asociados a enfermedades como la leucemia.

En reportes previos se ha mostrado asociación entre la exposición a plaguicidas y la presencia de fusiones génicas asociadas a leucemia, lo cual sugiere la participación de los agentes en la generación de rearrreglos génicos. El presente trabajo amplía el conocimiento sobre la capacidad de los insecticidas malatión y permetrina de generar lesiones en el gen *MLL*, el cual está involucrado en el desarrollo de la LLA.

## 3. HIPÓTESIS:

La exposición a los insecticidas malatión y permetrina induce alteraciones en el gen *MLL*, como rupturas o desviaciones en el número de copias, en linfocitos de donadores sanos.

## 4. OBJETIVO:

Determinar si la exposición a los insecticidas malatión y permetrina induce alteraciones en el gen *MLL*, rupturas o desviaciones en el número de copias, en linfocitos de sangre periférica de donadores sanos.



## 5. METODOLOGÍA:

### Población de estudio

Se trabajó con muestra sanguínea de dos donadores sanos, varones, no fumadores, de 26 y 27 años de edad, que aceptaron participar en el proyecto mediante la firma de una carta de consentimiento informado (Anexo 1).

### 5.1. Ensayos para establecer la concentración con mayor efecto: Donador I

#### 5.1.1 Cultivo de linfocitos, tratamiento, viabilidad, cosecha e índice mitótico (IM)

Para los ensayos preliminares se utilizó muestra de sangre periférica heparinizada de un individuo sano de 27 años de edad. A partir de la muestra se separaron las células mononucleares por gradiente de densidad y se cultivaron por 72 h (Anexo 2.1). Con base en lo reportado en la literatura <sup>48-50,52,53,55,60,61</sup>, se planteó como esquema de tratamiento la exposición a 100, 200 y 300  $\mu\text{M}$  tanto de malatión como de permetrina durante las últimas 24 h de cultivo. El malatión fue disuelto en etanol absoluto y la permetrina en dimetilsulfóxido (DMSO) por lo que se incluyeron estos dos agentes como controles negativos (etanol 0.2%, DMSO 0.4%); adicionalmente, se incluyeron cultivos que no fueron expuestos a ningún agente y como control positivo se utilizó etopósido en concentración de 1 y 10  $\mu\text{M}$ , el cual es un agente quimioterapéutico que induce rupturas en *MLL* <sup>36,38</sup>. Cada condición de cultivo se realizó por triplicado (**Tabla 1**) (Anexo 2.2). Después de 72 h de cultivo se cuantificó la viabilidad por el método de exclusión con azul tripano (Anexo 2.3) y se procedió con la cosecha (Anexo 2.1). Por cada cultivo se elaboraron laminillas por goteo, las cuales fueron teñidas con colorante Giemsa para determinar el IM (Anexo 2.3).

### 5.1.2 Hibridación *in situ* con fluorescencia

Se elaboraron laminillas para efectuar el ensayo de FISH con la sonda comercial LSI *MLL* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (VYSIS®), con el fin de detectar rupturas o desviaciones en el número de copias del gen *MLL*. Esta sonda flanquea la región BCR del gen, en la cual se ha observado que ocurren la mayoría de los puntos de ruptura de los rearrreglos en los que participa. El extremo centromérico (5') del BCR es hibridado con una sonda de 350 kb marcada con fluorocromo de espectro verde, mientras que el extremo telomérico (3') es hibridado con una sonda de 190 kb marcada con fluorocromo de espectro naranja. **(Figura 3)** <sup>59</sup>. Cuando el gen *MLL* no presenta alteraciones se observa como una señal amarilla, resultado de la colocación de una señal verde y una roja. Una célula es considerada normal si presenta dos señales amarillas. Por el contrario, cuando existe ruptura del gen las señales roja y verde se encuentran separadas. Adicionalmente, se pueden detectar otros patrones de señal anormales como variaciones en el número de copias o bien, combinación de ruptura del gen con cambios en el número de copias, generando patrones de señal más complejos. **(Figura 4)**. Se analizaron aproximadamente 1000 núcleos por muestra, siguiendo los criterios mostrados en el Anexo 2.4 **(Figura 4)** y sobre laminillas codificadas por un individuo ajeno al estudio. Se completó la hibridación de cada uno de los triplicados por condición de tratamiento, excepto para la concentración de malatión 300  $\mu$ M y de etopósido 1  $\mu$ M, que se hicieron por duplicado **(Tabla 1)**.

**Tabla 1. Tratamientos aplicados, tiempo de exposición de 24h**

Tratamiento	Número de repetidos
Sin tratamiento	6 <sup>a</sup>
Etanol 0.2%	6 <sup>a</sup>
Malatión 100 µM	3 <sup>b</sup>
Malatión 200 µM	6 <sup>a</sup>
Malatión 300 µM	2 <sup>b</sup>
DMSO 0.4%	6 <sup>a</sup>
Permetrina 100 µM	3 <sup>b</sup>
Permetrina 200 µM	6 <sup>a</sup>
Permetrina 300 µM	3 <sup>b</sup>
Etopósido 1 µM	2 <sup>b</sup>
Etopósido 10 µM	3 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Se utilizó muestra proveniente de ambos donadores, tres repeticiones por cada uno,

<sup>b</sup> Se utilizó muestra del donador I.

### 5.1.3 Análisis estadístico

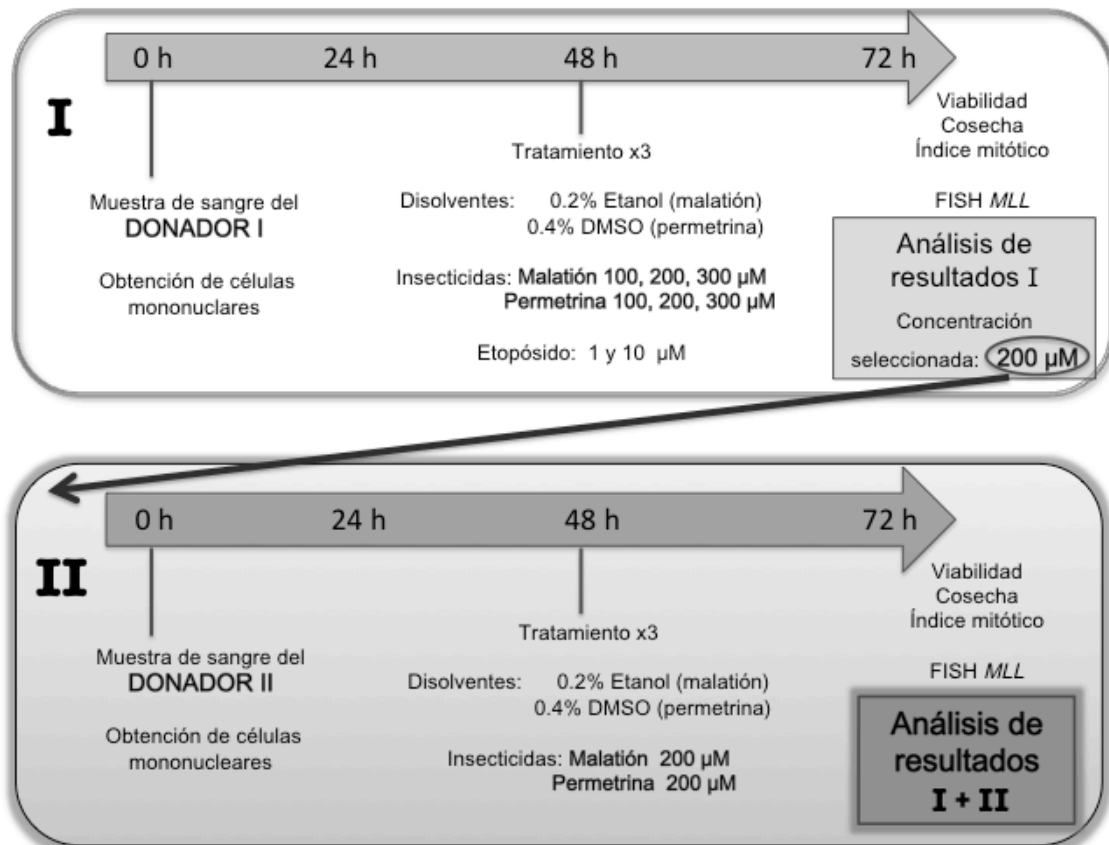
El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS. Los resultados de los ensayos de viabilidad e IM se analizaron mediante la prueba de correlación de Spearman, considerando significativa una  $p \leq 0.05$ . Los resultados del estudio de *MLL* con FISH se analizaron mediante la prueba de U-Mann Whitney. Se consideró significativa una  $p \leq 0.05$ , de una cola. Se hicieron comparaciones entre los ensayos sin tratamiento y con cada disolvente (sin tratamiento *versus* etanol y sin tratamiento *versus* DMSO), así como entre

cultivos con disolventes y plaguicidas (etanol *versus* malatión y DMSO *versus* permetrina). Se compararon entre los grupos los siguientes parámetros: a) número de células normales, b) número de células alteradas (variaciones numéricas más alteraciones estructurales), c) número de células con daño exclusivamente numérico (cambios en el número de copias) y d) número de células con daño exclusivamente estructural.

Para realizar los ensayos con el segundo donador sano, se eligió la concentración con la que se observó mayor efecto en la frecuencia de células con alteración estructural (**Figura 5**). Los hallazgos de esta parte del estudio se describen en la sección 6.1, los resultados conjuntando los datos obtenidos con ambos donadores se muestran en la sección 6.2.

## **5.2. Ensayos en ambos donadores (I y II) con el esquema de tratamiento seleccionado**

Se incluyó un varón de 26 años de edad con los criterios ya señalados. Se siguió la misma metodología y análisis previamente descritos en el apartado 5.1 y el Anexo 2. Los resultados obtenidos del donador I se conjuntaron con los derivados del donador II, de manera que para cada condición de tratamiento se reunieron seis repeticiones (tres por cada donador). Se realizaron comparaciones y el análisis estadístico mediante la prueba de U-Mann Whitney, considerando significancia estadística con una  $p \leq 0.05$  de una sola cola.



**Figura 5.** Diseño experimental. En la primera etapa (I), se analizó la muestra de un solo donador (I) y se probaron en ésta tres diferentes concentraciones para cada insecticida, se encontró un mayor efecto con la concentración de 200 µM. Esta concentración fue utilizada para los ensayos de la segunda etapa (II), en los que se incluyó la muestra de un segundo donador (II).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Ensayos para establecer la concentración con mayor efecto:

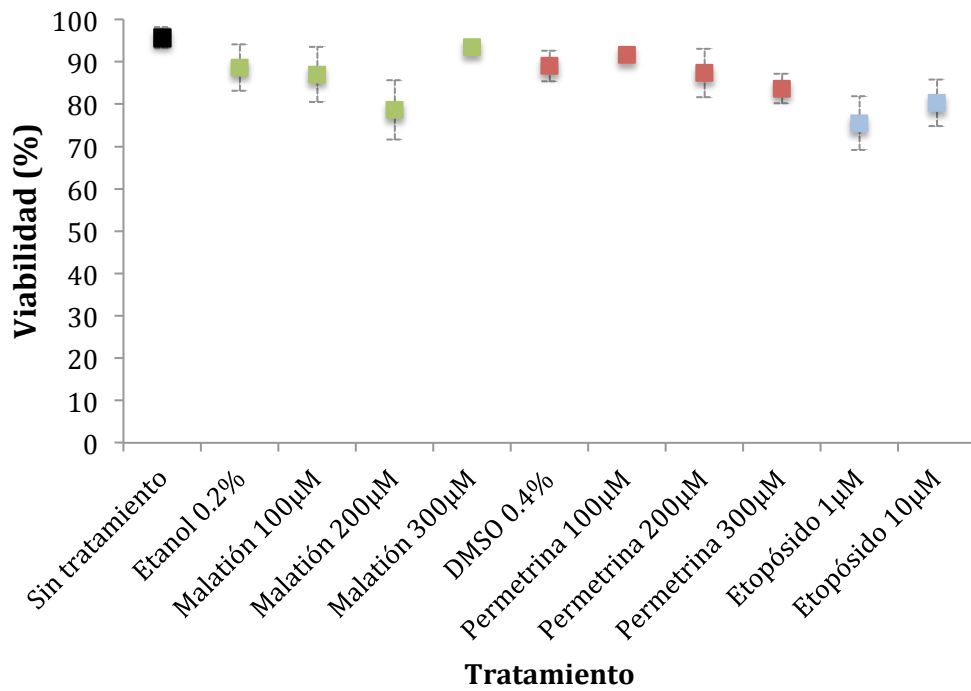
#### Donador I

##### 6.1.1 Viabilidad

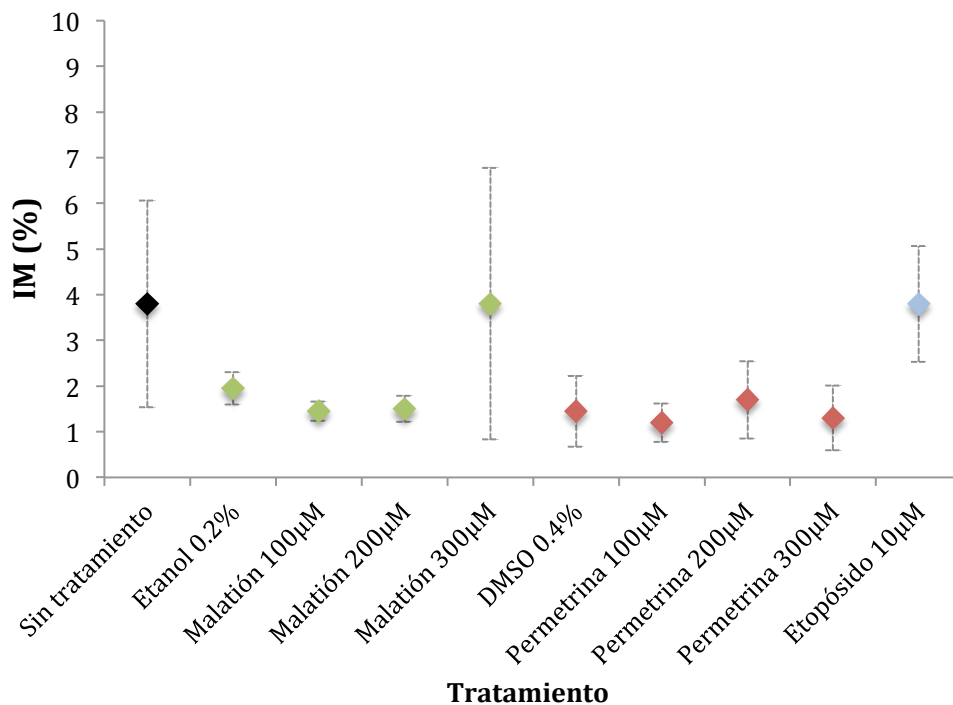
Se analizó la viabilidad celular de los cultivos sin tratamiento, con insecticidas y con disolventes; los resultados se muestran en la **Figura 6a** y en la **Tabla 2**. Los cultivos sin tratamiento mostraron la viabilidad más alta (95.7%), en el resto de las muestras este porcentaje mostró reducción (**Tabla 2**). En el caso de la exposición a permetrina se observó disminución en la viabilidad con el aumento en la concentración (**Figura 6a**), sin embargo no se encontró correlación significativa (Spearman,  $p=0.078$ ,  $r^2=0.286$ ). El efecto de disminución de viabilidad a mayor concentración no se observó con la exposición a malatión; en la máxima concentración (300  $\mu\text{M}$ ) el porcentaje de células viables (93.5%) fue mayor que el observado a concentraciones menores (78.7%) (**Figura 6a**), sin embargo, no se encontró correlación significativa (Spearman,  $p=0.901$ ,  $r=0.0003$ ). No se observaron diferencias estadísticas en la viabilidad celular al aplicar el tratamiento de etopósido con ambas concentraciones (75.5% y 80%, **Figura 6a**).

##### 6.1.2 Índice Mitótico

Los valores más altos de IM se observaron en los cultivos sin tratamiento (3.8%), aunque se observó amplia variabilidad en los ensayos. No se encontró un efecto concentración-respuesta con ninguno de los dos insecticidas (Spearman,  $p>0.05$ ). Cabe mencionar que al igual que la viabilidad, el IM incrementó en la máxima concentración de malatión. La exposición a etopósido no afectó el IM ya que el valor observado fue igual al de cultivos sin tratamiento (3.8%) (**Figura 6b** y **Tabla 2**).



**Figura 6a.** Viabilidad de los cultivos tratados con insecticidas. Ensayo para establecer la concentración con mayor efecto (donador I). Se muestra el promedio de tres experimentos independientes.



**Figura 6b.** Índice Mitótico de cultivos tratados con insecticidas. Ensayo para establecer la concentración con mayor efecto (donador I). Se muestra el promedio de dos experimentos independientes.

**Tabla 2.** Viabilidad e Índice Mitótico: Ensayo para establecer la concentración con mayor efecto (muestra del donador I):

Tratamiento	Viabilidad(%)± D.E.	IM (%) ± D.E.
Sin tratamiento	95.7 ± 2.5	3.8 ± 2.26
Etanol 0.4%	88.7 ± 5.5	1.9 ± 0.35
Malatión 100 µM	87.0 ± 6.6	1.4 ± 0.21
Malatión 200 µM	78.7 ± 7.0	1.5 ± 0.28
Malatión 300 µM	93.5 ± 0.7	3.8 ± 2.97
DMSO 0.2%	89.0 ± 3.6	1.4 ± 0.78
Permetrina 100 µM	91.7 ± 0.6	1.2 ± 0.42
Permetrina 200 µM	87.3 ± 5.7	1.7 ± 0.85
Permetrina 300 µM	83.7 ± 3.5	1.3 ± 0.71
Etopósido 1 µM	75.5 ± 6.4	ND
Etopósido 10 µM	80.3 ± 5.5	3.8 ± 1.27

DE, desviación estándar. ND, no determinado

### 6.1.3. Análisis del gen *MLL* por medio de FISH

En las **Tablas 3 y 4** se muestran el número de células sin alteración, y con alteraciones numéricas y/o estructurales encontrados en cada serie de ensayos con malatión y permetrina, respectivamente. No hubo diferencia estadística al comparar las muestras sin tratamiento con respecto a las tratadas con los disolventes en ninguno de los parámetros analizados.

No se observó una respuesta relacionada con la concentración con ninguno de los insecticidas, ya que el número de células alteradas tendió a disminuir con el aumento en la concentración (**Figura 7**). Con el tratamiento con malatión, al analizar únicamente células con alteración estructural, se encontró que la frecuencia de células con este tipo de daño fue tres veces mayor (19) en cultivos expuestos a 200 µM del agente en comparación con el control (6.3), esta diferencia mostró significancia estadística marginal (U-Mann Whitney,



$p=0.05$ ) (**Tabla 3**). Por otro lado, en los cultivos expuestos a 200  $\mu\text{M}$  de permetrina (**Tabla 4**) se encontró un aumento significativo (U-Mann Whitney,  $p=0.05$ ) en el número global de células alteradas (95.3) respecto a su control (46). También para el caso de permetrina el máximo número de células con daño estructural (18.3) fue observado en la concentración de 200  $\mu\text{M}$ . Con esta misma concentración, se observó un incremento significativo en el número de células con daño numérico (77) (**Tabla 4**). Adicionalmente, el número de diversos patrones de daño fue mayor en los cultivos expuestos a insecticidas. Por otro lado, la exposición a 10  $\mu\text{M}$  de etopósido incrementó significativamente (U-Mann Whitney,  $p=0.05$ ) el número de células alteradas (96), con la concentración 1 $\mu\text{M}$  no se observó diferencia estadística en comparación con el control (DMSO) (**Tablas 3 y 4**).

Para incrementar el número de ensayos y corroborar los resultados obtenidos con el donador I, se seleccionó la concentración de 200  $\mu\text{M}$  para ser probada en un segundo donador sano (II). Los resultados en conjunto se muestran a continuación.

**Tabla 3.** Número de células normales y con daño numérico o estructural detectado en cultivos tratados con malatión: Ensayo para establecer la concentración con mayor efecto (muestra del donador I):

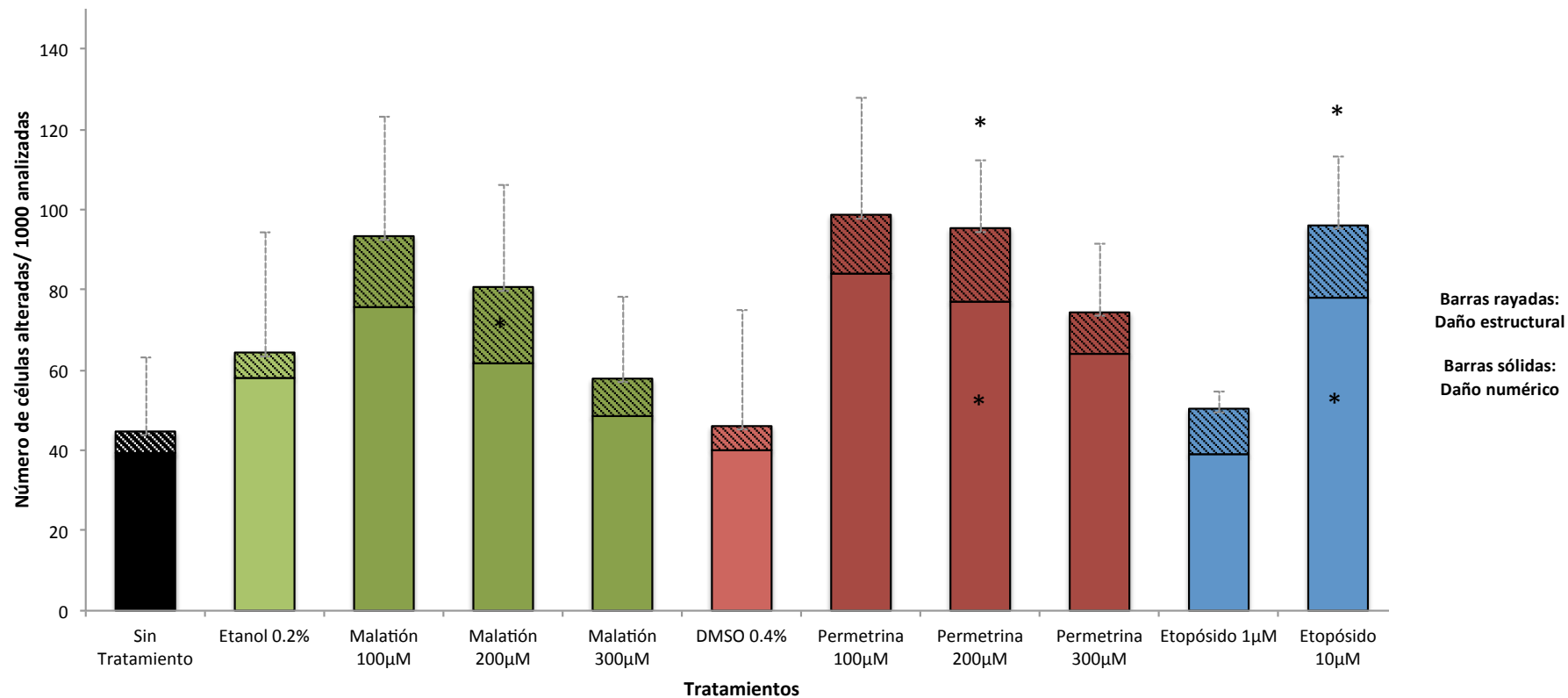
Tratamiento Repetidos n=3	Sin tratamiento			Etanol 0.2%			Malatión 100µM			Malatión 200µM			Malatión 300µM		Etopósido 1µM		Etopósido 10µM		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	I	II	I	II	III
<b>Células sin alteración</b>	<b>966</b>	<b>966</b>	<b>934</b>	<b>965</b>	<b>905</b>	<b>937</b>	<b>880</b>	<b>901</b>	<b>939</b>	<b>936</b>	<b>890</b>	<b>932</b>	<b>952</b>	<b>923</b>	<b>941</b>	<b>947</b>	<b>885</b>	<b>909</b>	<b>918</b>
<i>Promedio</i>	955.3			935.7			906.7			919.3			937.5		944.0		904.0		
<b>Alteración numérica</b>																			
1F	11	17	45	13	35	33	61	44	41	27	49	28	10	25	18	34	38	46	31
3F	16	10	3	10	8	4	14	3		4	6	6	3	5	17	4	15	4	5
4F			2		3	3	1							1				2	3
5F																			
1Famp		5	9	7	43	15	17	31	15	7	42	16	24	29		5	33	24	33
<b>Total de células con alteración numérica</b>	<b>27</b>	<b>32</b>	<b>59</b>	<b>30</b>	<b>89</b>	<b>55</b>	<b>93</b>	<b>78</b>	<b>56</b>	<b>38</b>	<b>97</b>	<b>50</b>	<b>37</b>	<b>60</b>	<b>35</b>	<b>43</b>	<b>86</b>	<b>76</b>	<b>72</b>
<i>Promedio</i>	39.3			58.0			75.7			61.7			48.5		39.5		78.0		
<b>Alteración estructural</b>																			
1F,1Famp			1		2	2	11	3	1	2	4	1	1	3			12	5	3
1F,1V,1R	7	2	2	1	3		4	3		4		3	1	1		2	1	1	
2F,1R			4	3	1	4	8	5	4	15	8	11	7	11	6	4	12	6	2
1F,1V								1		2							1		
2F,1V				1		2	3	3		2	1	2	2	2	10	3	2	1	4
1F,1R							1	1						8	1		1	1	
2F,1V,1R									1			1						1	
3F,1R																			
4F,1R																			
3F,1V,1R																			
1V,1R																			
2F,2R								4											
1F,2R																	1		
2F,1V,2R										1									
1Famp,1R																			
1F, 2V,1R																			
3F, 2R																			
1Famp,2F,1V																			
<b>Total de células con alteración estructural</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>27</b>	<b>21</b>	<b>5</b>	<b>26</b>	<b>13</b>	<b>18</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>24</b>	<b>10</b>	<b>29</b>	<b>15</b>	<b>10</b>
<i>Promedio</i>	5.3			6.3			17.7			19.0			14.0		17.0		18.0		
<b>Total de células alteradas</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>66</b>	<b>35</b>	<b>95</b>	<b>63</b>	<b>120</b>	<b>99</b>	<b>61</b>	<b>64</b>	<b>110</b>	<b>68</b>	<b>48</b>	<b>77</b>	<b>59</b>	<b>53</b>	<b>115</b>	<b>91</b>	<b>82</b>
<i>Promedio</i>	44.7			64.3			93.3			80.7			62.5		56.0		96.0		
<b>Total de células analizadas</b>	749	1111	1125	883	1126	1080	659	1123	1115	1152	715	920	1173	1256	929	1065	1266	1152	1084

Se muestran el número de células normales y alteradas ajustado a 1000 analizadas. En las Tablas 7 y 8 se detalla el significado de las abreviaturas de cada patrón de alteración. En los recuadros sombreados se muestran los grupos en los que se encontró una  $p \leq 0.05$ , mediante la prueba de U-Mann Whitney.

**Tabla 4.** Número de células normales y con daño numérico o estructural detectado en cultivos tratados con permetrina. Ensayo para establecer la concentración con mayor efecto (muestra del donadorl):

Tratamiento Repetidos n=3	Sin tratamiento			DMSO 0.4%			Permetrina 100µM			Permetrina 200µM			Permetrina 300µM			Etopósido 1µM		Etopósido 10µM		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	I	II	III
Células sin alteración	966	966	934	987	934	941	888	935	881	887	906	921	912	920	945	941	947	885	909	918
<i>Promedio</i>	955.3			954.0			901.3			904.7			925.7			944.0		904.0		
Alteración numérica																				
1F	11	17	45	6	34	35	68	31	43	43	34	48	39	40	26	18	34	38	46	31
3F	16	10	3	7	1	9	5	6	5	12	2	3	2	5	5	17	4	15	4	5
4F			2		1		2		1	12	2		4	2	5				2	3
5F																				
1Famp		5	9		23	4	24	18	49	22	35	18	30	24	10		5	32	24	33
Total de células con alteración numérica	27	32	59	13	59	48	99	55	98	89	73	69	75	71	46	35	43	86	76	72
<i>Promedio</i>	39.3			40.0			84.0			77.0			64.0			39.0		78.0		
Alteración estructural																				
1F,1Famp			1		3		2	3	6	7	2	3	5	2				12	5	3
1F,1V,1R	7	2	2			3	2		3	5	2	1				2		1	1	
2F,1R			4		3	7	2	5	12	5	13	4	6	6	7	6	4	12	6	2
1F,1V							1			2								1		
2F,1V					1	1	3	2	2	5	1	1	2	1	1	10	3	2	1	4
1F,1R									1							8	1		1	1
2F,1V,1R							2					1			1				1	
3F,1R																				
4F,1R																				
3F,1V,1R																				
1V,1R																				
2F,2R											2									
1F,2R																		1		
2F,1V,2R																				
1Famp,1R											1									
1F, 2V,1R							1													
3F, 2R																				
1Famp,2F,1V																				
Total de células con alteración estructural	7	2	7	0	7	11	13	10	21	24	21	10	13	9	9	24	10	29	15	10
<i>Promedio</i>	5.3			6.0			14.7			18.3			10.3			17.0		18.0		
Total de células alteradas	34	34	66	13	66	59	112	65	119	113	94	79	88	80	55	59	53	115	91	82
<i>Promedio</i>	44.7			46.0			98.7			95.3			74.3			56.0		96.0		
Total de células analizadas	749	1111	1125	968	1091	696	1058	1135	825	1093	1276	1124	831	1108	1062	929	1065	1266	1152	1084

Se muestra el número de células normales y alteradas ajustado a 1000 analizadas. En las Tablas 7 y 8 se detalla el significado de las abreviaturas de cada patrón de alteración. En los recuadros sombreados se muestran los grupos en los que se encontró una  $p \leq 0.05$ , mediante la prueba de U-Mann Whitney.



**Figura 7.** Número de células alteradas (daño numérico y estructural) detectado en cultivos expuestos a insecticidas. Ensayo para establecer la concentración con mayor efecto (muestra de donador I). Se presenta el promedio de tres experimentos y desviación estándar (excepto para malatión 300 µM y etopósido 1 µM, que se hicieron por duplicado; U-Mann Whitney, \*  $p \leq 0.05$ )

## 6.2 Ensayos con muestras de ambos donadores (I y II).

Concentración seleccionada: 200  $\mu$ M

### 6.2.1 Viabilidad celular

El mayor porcentaje de células viables fue observado en los cultivos sin tratamiento (88.3%), seguido por los obtenidos con los disolventes etanol y DMSO (85.2% y 80.7%, respectivamente) (Tabla 5 y Figura 8). El tratamiento con insecticidas generó una disminución en la viabilidad celular, siendo significativa únicamente con malatión (U-Mann Whitney,  $p=0.026$ ).

### 6.2.2 Índice Mitótico

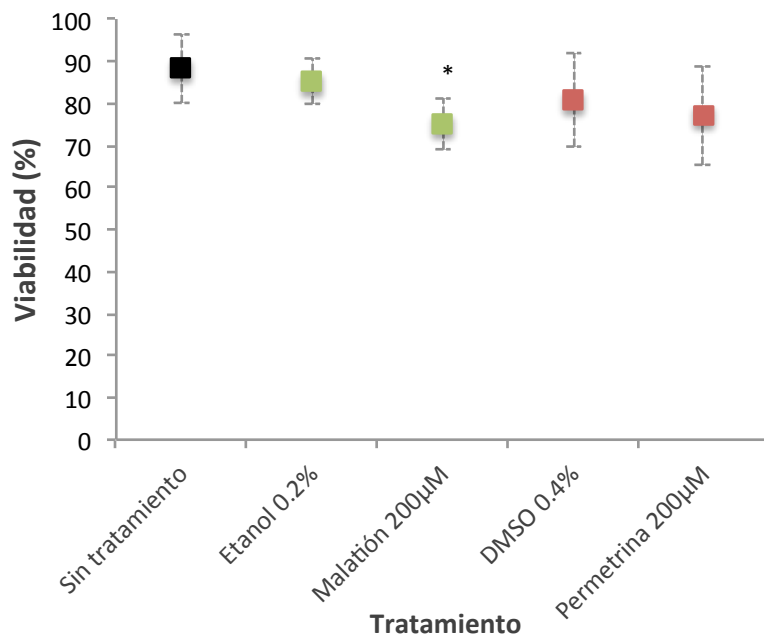
El IM más alto fue encontrado en los cultivos sin tratamiento (2.7), este porcentaje disminuyó con el resto de los tratamientos (controles e insecticidas); sin embargo no se encontró diferencia significativa en ningún caso; U-Mann Whitney,  $p>0.05$ ) (Tabla 5 y Figura 8b).

**Tabla 5.** Viabilidad e Índice Mitótico de cultivos tratados con insecticidas. Ensayos con el esquema de tratamiento seleccionado (muestras de ambos donadores):

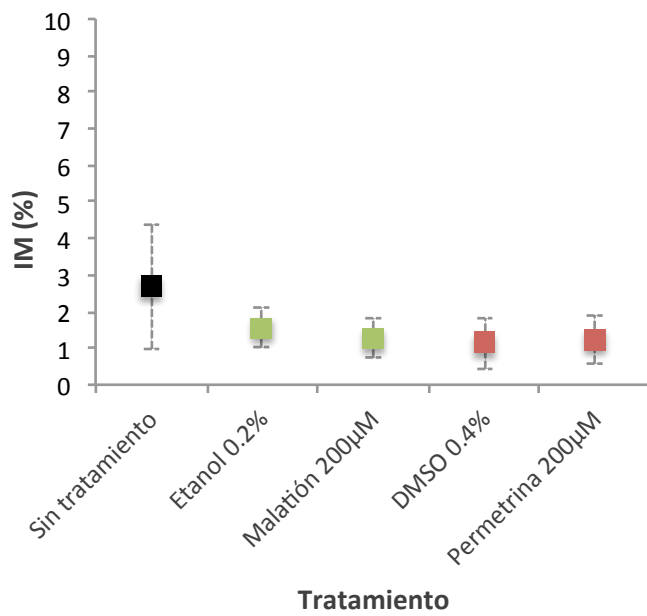
Tratamiento	Viabilidad % $\pm$ D.E.	IM % $\pm$ D.E.
Sin tratamiento	88.3 $\pm$ 8.3	2.7 $\pm$ 1.7
Etanol 0.2%	85.2 $\pm$ 5.6	1.6 $\pm$ 0.5
DMSO 0.4%	80.7 $\pm$ 11.0	1.1 $\pm$ 0.7
Malatión 200 $\mu$ M	75.0 $\pm$ 6.2 *	1.3 $\pm$ 0.5
Permetrina 200 $\mu$ M	77.2 $\pm$ 11.8	1.2 $\pm$ 0.7

Se muestra el promedio de seis y cinco experimentos para viabilidad eIM, respectivamente

DE, desviación estándar \* $p\leq 0.05$  U-Mann Whitney



**Figura 8a.** Viabilidad de los cultivos tratados con insecticidas. Ensayos con muestras de ambos donadores. U-Mann Whitney, \*  $p=0.026$



**Figura 8b.** Índice mitótico de los cultivos tratados con insecticidas. Ensayos con muestras de ambos donadores.

### 6.2.3 Análisis del gen *MLL* por medio de FISH

En la **Tabla 6** se muestran los resultados de los experimentos con ambos donadores. Para cada condición de tratamiento se analizaron mil células y se obtuvieron 6 repeticiones (3 por donador). Se muestra el número de células: a) sin alteración, b) con alteración de tipo numérica y/o estructural, c) con daño únicamente numérico o d) únicamente estructural.

El mayor número de células sin daño (940) se encontró en los cultivos sin tratamiento. No se encontró diferencia significativa entre los cultivos expuestos a disolventes (etanol o DMSO) y los no tratados, en ninguno de los parámetros analizados. El número de células con daño numérico tendió a aumentar con la exposición a malatión, aunque no mostró diferencia estadística. Sin embargo, se encontró que la exposición a este insecticida duplicó significativamente (U-Mann Whitney,  $p=0.03$ ) el número de células con daño estructural (14.3) en comparación con el control (7.2) (**Tabla 6, Figura 9**).

El tratamiento con permetrina (**Tabla 6**) incrementó significativamente el número total de células alteradas (93.7) (con daño numérico y/o estructural) (U-Mann Whitney,  $p=0.004$ ). Al analizar por separado el tipo de daño, se encontró que se elevó significativamente el número de células con daño numérico (79.5) ( $p=0.02$ ) y el daño estructural (14.2) ( $p=0.047$ ) (**Tabla 6, Figura 9**). Cabe mencionar, que se observaron valores de alteración similares a los obtenidos con el etopósido (células con daño numérico=78; con daño estructural=18) (**Tabla 4, Figura 9**).

Adicionalmente, se encontró que la exposición a permetrina aumentó de manera significativa la diversidad y heterogeneidad de daño. Con este agente se observó mayor número de patrones diferentes de daño (5), en comparación con el DMSO (2.5) (U-Mann Whitney,  $p=0.009$ ) (**Figura 10**). En la **Figura 11** se muestran algunas imágenes de los patrones de daño en *MLL* encontrados en células expuestas a insecticidas, algunos de ellos se han reportado en estudios previos <sup>36,62</sup>.

Además de la ruptura clásica, se detectaron patrones adicionales en los que, si bien no es posible conocer con precisión el mecanismo de formación, es claro que son patrones más complejos en cuya formación tuvo que haber ocurrido más de un evento. En las **Tablas 10 y 11** se describen los patrones de alteraciones encontrados y se presenta la nomenclatura de acuerdo al International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 2013 (ISCN 2013) <sup>63</sup>. Se consideró que presentaban daño numérico aquellos patrones que no involucraron separación de las señales en rojo y verde; es decir, aquellos en los que se observó un número de señales amarillas diferente de dos y que no mostraron señales rojas o verdes independientes. Por el contrario, se consideró la presencia de daño estructural en los patrones en los que además de señales amarillas, se observaron señales rojas y/o verdes individuales, ya que esto representa la ruptura del gen.

Adicionalmente, se propusieron posibles mecanismos de formación y se calculó el probable número de eventos que ocurrieron en cada caso; siempre se consideró el mecanismo de formación más simple. Este análisis se realizó en un intento por clasificar los diversos patrones de daño de acuerdo a su complejidad y con base en lo referido en la literatura <sup>62,63</sup>; sin embargo, no es posible definir con certeza los mecanismos que llevaron a su formación.

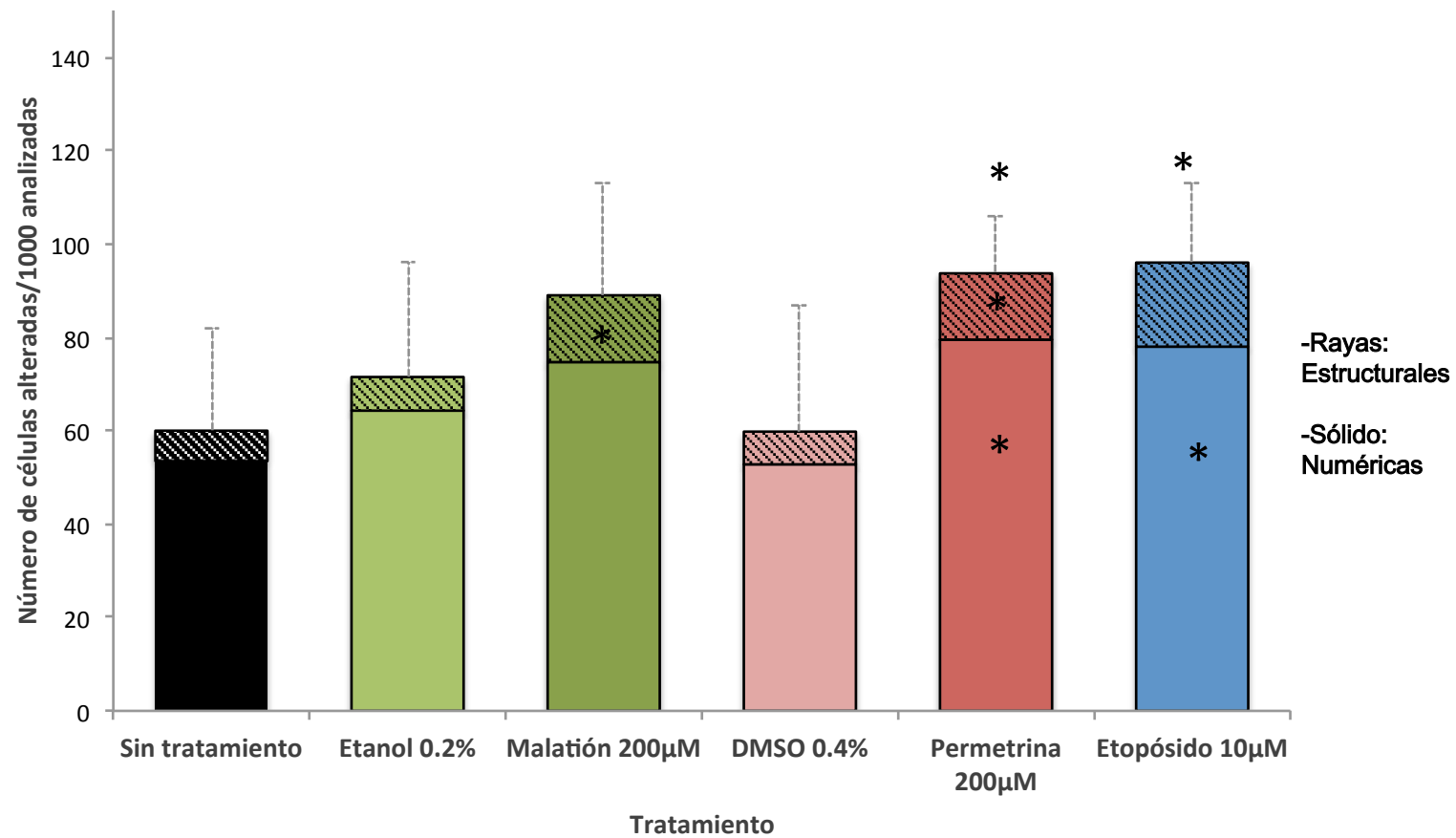


Considerando esta clasificación, se puede observar que los cultivos expuestos a los insecticidas mostraron mayor número de células con patrones de daño complejos, en los que además de un evento estructural, ocurrieron eventos adicionales (**Tabla 6, renglones en anaranjado, rojo y lila**). En el caso de la permetrina, este efecto fue más evidente.

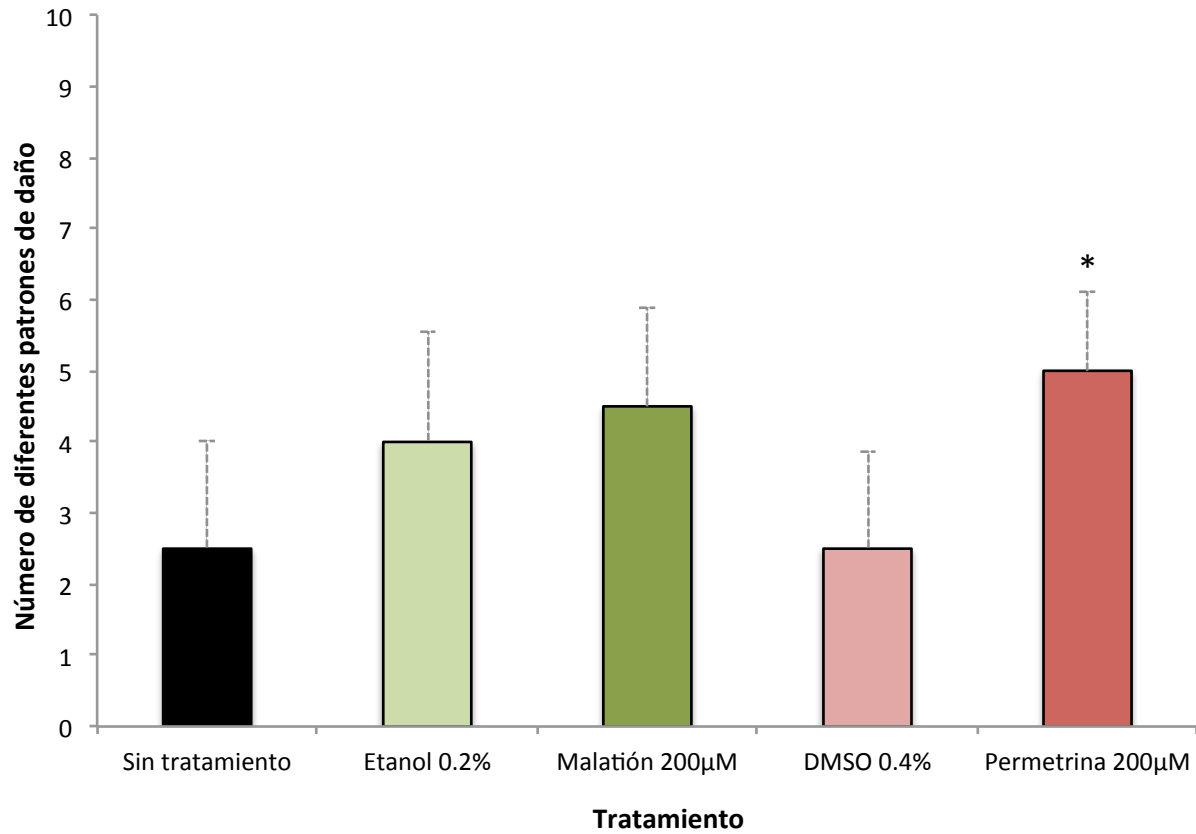
**Tabla 6.** Número de células normales, con daño numérico y estructural detectado en cada cultivo tratado con malatión y permetrina. Ensayos con muestras de ambos donadores.

Tratamiento Repetidos n=6	Sin tratamiento						Etanol 0.2%						Malatión 200µM						DMSO 0.4%						Permetrina 200µM					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
Células sin alteración	966	966	934	938	911	925	965	905	937	932	936	896	936	890	932	897	881	930	987	934	941	922	908	949	887	906	921	900	918	906
<i>Promedio</i>			940.0						928.5						911.0						940.2						906.3			
<b>Alteración numérica</b>																														
1F	11	17	45	28	52	45	13	35	33	27	31	69	27	49	28	55	79	54	6	34	35	36	49	24	43	34	48	42	50	64
3F	16	10	3	4	5	6	10	8	4	20	7	7	4	6	6	10	6	4	7	1	9	6	15	7	12	2	3	22	10	11
4F			2	1	2			3	3	1		3				1	5	4		1		1	3	3	12	2		2	1	1
5F																		1												
1Famp		5	9	20	25	15	7	43	15	10	19	18	7	42	16	24	17	4		23	4	19	21	12	22	35	18	20	12	11
<b>Total de células con alteración numérica</b>																														
<i>Promedio</i>	27	32	59	53	84	66	30	89	55	58	57	97	38	97	50	90	107	66	13	59	48	63	88	46	89	73	69	86	73	87
			53.5						64.3						74.7						52.8						79.5			
<b>Alteración estructural</b>																														
1F,1Famp			1	3	1	6		2	2	1	2	3		2	4	1	2	3		3		3	2		7	2	3	3	1	2
1F,1V,1R	7	2	2	1			1	3		2		1	4		3	1	3	1			3	3	2	1	5	2	1	3	2	
2F,1R			4	2	4	2	3	1	4	2	3	1	15	8	11	3	3	1		3	7	4		2	5	13	4	3	2	4
1F,1V													2												2					
2F,1V				2			1		2	2		2	2	1	2	5	3	2		1	1	5		2	5	1	1		3	1
1F,1R											1																			
2F,1V,1R				1		1				1					1												1			
3F,1R																1														
4F,1R										1																			1	
3F,1V,1R																												2		
1V,1R																												1		
2F,2R																1										2			2	
1F,2R																														
2F,1V,2R													1																	
1Famp,1R																										1				
1F, 2V,1R																														
3F, 2R										1																				
1Famp,2F,1V											1																			
<b>Total de células con alteración estructural</b>																														
<i>Promedio</i>	7	2	7	9	5	9	5	6	8	10	7	7	26	13	18	13	12	4	0	7	11	15	4	5	24	21	10	14	9	7
			6.5						7.2						14.3						7.0						14.2			
<b>Total de células alteradas</b>																														
<i>Promedio</i>	34	34	66	62	89	75	35	95	63	68	64	104	64	110	68	103	119	70	13	66	59	78	92	51	113	94	79	100	82	94
			60.0						71.5						89.0						59.8						93.7			
<b>Total analizadas</b>																														
	749	1111	1125	1071	808	1093	883	1126	1080	1123	1164	941	1152	715	920	1094	666	1012	968	1091	696	1133	607	1046	1093	1276	1124	1127	1181	1038

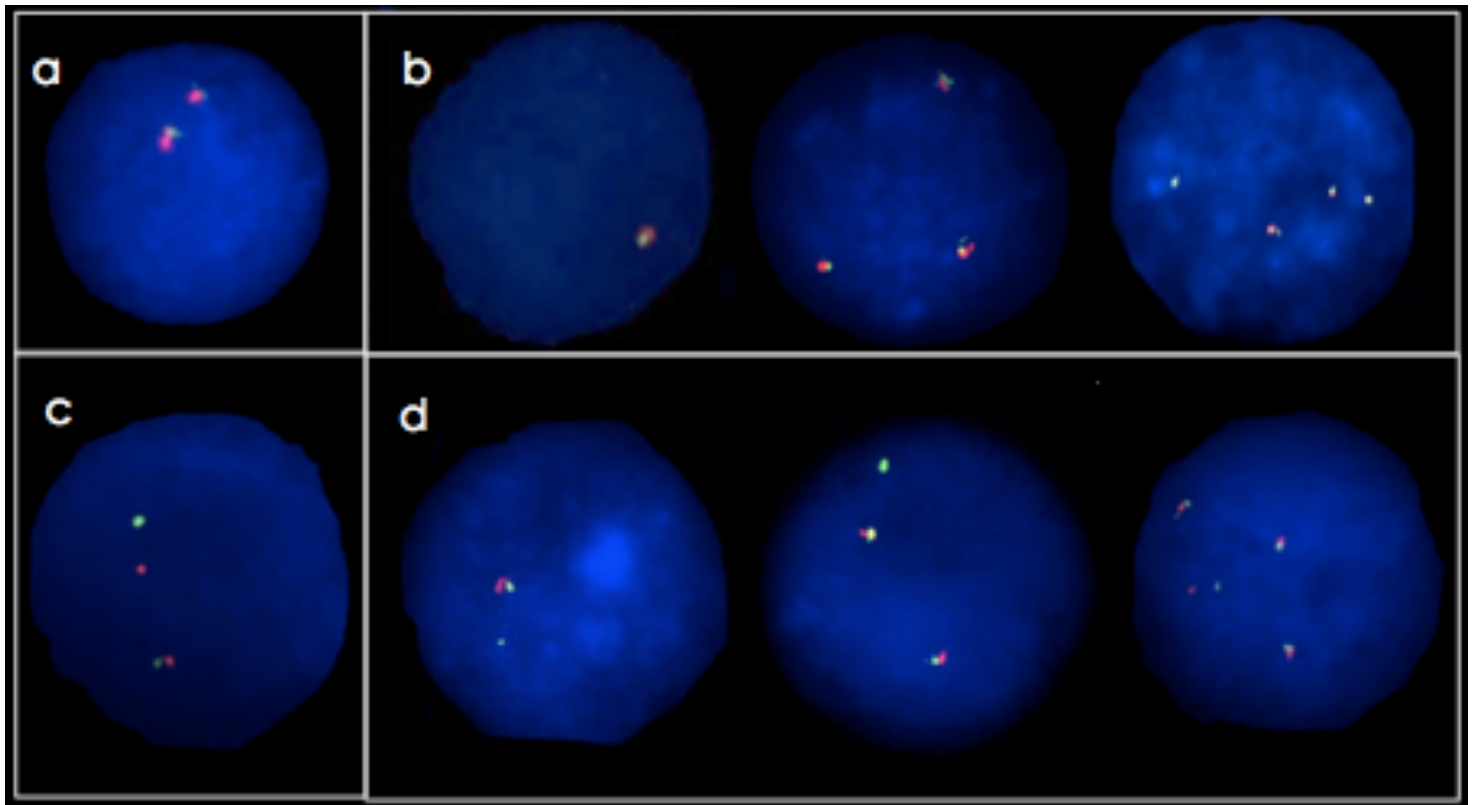
Se muestra el número de células normales y alteradas ajustado a 1000 analizadas. Los datos sombreados y enmarcados en rojo mostraron diferencia significativa respecto al control negativo; U-Mann Whitney,  $p < 0.05$ . Se compararon malatión vs etanol y permetrina vs DMSO. En las Tablas 7 y 8 se detalla el significado de las abreviaturas de cada patrón de alteración. El color amarillo representa patrones con un evento estructural, el anaranjado con un evento estructural más un evento no estructural, el rojo dos eventos estructurales más un evento no estructural y el lila 2 eventos estructurales más dos numéricos



**Figura 9.** Número de células alteradas detectado en los cultivos tratados con malatión y permetrina. Ensayo con muestras de ambos donadores. Se muestra el promedio de seis experimentos; U-Mann Whitney, \*  $p < 0.05$ . Con fines de comparación, se incluyen los resultados obtenidos con etopósido (control positivo)



**Figura 10.** Número de diferentes patrones de daño encontrados en células tratadas con insecticidas. Ensayos con muestras de ambos donadores. Se muestra el promedio de seis experimentos; U-Mann Whitney, \*  $p < 0.05$ .



**Figura 11.** Células expuestas a los insecticidas con diferentes patrones de daño en *MLL*. a) Célula normal (dos señales amarillas, *MLLX2*); b) Alteraciones en el número de copias (células *MLLX1*, *MLLX3* y *MLLX4*); c) Ruptura clásica de *MLL* (1 señal amarilla, 1 verde y 1 roja); d) Diferentes patrones de daño detectados en cultivos tratados con insecticidas (célula con 1 señal amarilla y 1 verde; célula con 2 señales amarillas y 1 verde y célula con 3 señales amarillas, 1 verde y 1 roja).

**Tabla 7.** Patrones de alteraciones numéricas del gen *MLL* detectados con FISH en células en interfase

Descripción ISCN*	Tipo de evento (s)	Resultado	Número estimado de eventos
nuc ish( <i>MLLX1</i> )	1 señal amarilla [1F]	Pérdida de una copia de <i>MLL</i>	1 evento numérico
nuc ish( <i>MLLX3</i> )	3 señales amarillas [3F]	Ganancia de una copia de <i>MLL</i>	1 evento numérico
nuc ish( <i>MLLX4</i> )	4 señales amarillas [4F]	Tetraploidía	1 evento numérico
nuc ish( <i>MLLX5</i> )	5 señales amarillas [5F]	Ganancia de dos copias de <i>MLL</i>	2 eventos numéricos
nuc ish( <i>MLL ampX1</i> )	1 señal amarilla de mayor tamaño [1Famp]	Pérdida de una copia de <i>MLL</i> y amplificación del gen	1 evento numérico/ 1 evento estructural

\*Nomenclatura de acuerdo al ISCN 2013 <sup>63</sup>

**Tabla 8.** Patrones de alteraciones estructurales del gen *MLL* detectados con FISH en células en interfase

Descripción ISCN	Tipo de evento (s)	Resultado	Número estimado de eventos
nuc ish( <i>MLLX2</i> )( <i>MLL ampX1</i> )	1 señal amarilla normal, 1 señal amarilla de tamaño incrementado [1F,1Famp]	Amplificación de una copia del gen	1 evento estructural
nuc ish( <i>MLLX2</i> )(5' <i>MLL</i> sep 3' <i>MLLX1</i> )	1 señal amarilla, 1 señal roja, 1 señal verde [1F,1V,1R]	Ruptura de una copia de <i>MLL</i>	1 evento estructural
nuc ish(5' <i>MLLX2</i> ,3' <i>MLLX3</i> )(5' <i>MLL</i> con 3' <i>MLLX2</i> )	2 señales amarillas, 1 señal roja [2F,1R]	Ruptura de una copia de <i>MLL</i> . Punto de ruptura desplazado hacia 3'	1 evento estructural
nuc ish(5' <i>MLLX2</i> ,3' <i>MLLX1</i> )(5' <i>MLL</i> con 3' <i>MLLX1</i> )	1 señal amarilla, 1 señal verde [1F,1V]	Delección de la porción 3' de una copia de <i>MLL</i>	1 evento estructural
nuc ish(5' <i>MLLX1</i> ,3' <i>MLLX2</i> )(5' <i>MLL</i> con 3' <i>MLLX1</i> )	1 señal amarilla, 1 señal roja [1F,1R]	Ruptura de una copia de <i>MLL</i> , pérdida de la porción 5'	1 evento numérico 1 evento estructural
nuc ish(5' <i>MLLX3</i> ,3' <i>MLLX2</i> )(5' <i>MLL</i> con 3' <i>MLLX2</i> )	2 señales amarillas, 1 señal verde [2F,1V]	Ganancia de una copia de <i>MLL</i> , con delección parcial de una copia del gen	1 evento numérico 1 evento estructural
nuc ish( <i>MLLX3</i> )(5' <i>MLL</i> sep 3' <i>MLLX1</i> )	2 señales amarillas, 1 señal roja, 1 señal verde [2F,1V,1R]	Ganancia de una copia de <i>MLL</i> , con ruptura de una copia del gen	1 evento numérico 1 evento estructural
nuc ish(5' <i>MLLX3</i> ,3' <i>MLLX4</i> )(5' <i>MLL</i> con 3' <i>MLLX3</i> )	3 señales amarillas, 1 señal roja [3F,1R]	Ganancia de una copia de <i>MLL</i> y ruptura del gen con punto de ruptura desplazado hacia 3'	1 evento numérico 1 evento estructural
nuc ish(5' <i>MLLX1</i> ,3' <i>MLLX1</i> )(5' <i>MLL</i> sep 3' <i>MLLX1</i> )	1 señal verde, 1 señal roja [1V,1R]	Pérdida de una copia de <i>MLL</i> . Ruptura de una copia de <i>MLL</i>	1 evento numérico 1 evento estructural
nuc ish(5' <i>MLLX4</i> ,3' <i>MLLX5</i> )(5' <i>MLL</i> con 3' <i>MLLX4</i> )	4 señales amarillas, 1 señal roja [4F,1R]	Tetraploidía. Ruptura de una copia de <i>MLL</i> con punto de ruptura desplazado hacia 3'	1 evento numérico 1 evento estructural
nuc ish( <i>MLLX4</i> )(5' <i>MLL</i> sep 3' <i>MLLX1</i> )	3 señales amarillas, 1 señal verde, 1 señal roja [3F,1V,1R]	Ganancia de dos copias de <i>MLL</i> y ruptura de una copia del gen	2 eventos numéricos 1 evento estructural
nuc ish(5' <i>MLLX2</i> ,3' <i>MLLX4</i> )(5' <i>MLL</i> con 3' <i>MLLX2</i> )	2 señales amarillas, 2 señales rojas [2F,2R]	Dos copias de <i>MLL</i> y ruptura del gen con puntos de ruptura desplazados hacia 3'	2 eventos estructurales
nuc ish(5' <i>MLLX1</i> ,3' <i>MLLX3</i> )(5' <i>MLL</i> con 3' <i>MLLX1</i> )	1 señal amarilla, 2 señales rojas [1F,2R]	Ruptura de una copia de <i>MLL</i> con punto de ruptura desplazado. Ganancia de una copia del gen y delección de la porción 5'	1 evento numérico 2 eventos estructurales
nuc ish(5' <i>MLLX3</i> ,3' <i>MLLX4</i> )(5' <i>MLL</i> con 3' <i>MLLX2</i> )	2 señales amarillas, 1 señal verde, 2 señales rojas, [2F,1V,2R]	Ruptura de una copia de <i>MLL</i> con punto de ruptura desplazado hacia 3'. Ganancia de una copia del gen y posterior ruptura	1 evento numérico 2 eventos estructurales
nuc ish( <i>MLL ampX1</i> )(3' <i>MLLX1</i> )	1 señal amarilla de tamaño incrementado, 1 señal roja [1Famp, 1R]	Amplificación de una copia del gen. Ruptura de una copia de <i>MLL</i> , pérdida de la porción 5'	1 evento numérico 2 eventos estructurales
nuc ish(5' <i>MLLX3</i> ,3' <i>MLLX2</i> )(5' <i>MLL</i> con 3' <i>MLLX1</i> )	1 señal amarilla, 2 señales verdes, 1 señal roja [1F,2V,1R]	Ganancia de una copia de <i>MLL</i> . Ruptura de una copia de <i>MLL</i> con delección de la porción 5'	1 evento numérico 2 eventos estructurales
nuc ish(5' <i>MLLX3</i> ,3' <i>MLLX5</i> )(5' <i>MLL</i> con 3' <i>MLLX3</i> )	3 señales amarillas, 2 señales rojas [3F,2R]	Ganancia de una copia de <i>MLL</i> . Ruptura de dos copias de <i>MLL</i> con punto de ruptura desplazado hacia 3'	1 evento numérico 2 eventos estructurales
nuc ish( <i>MLLX3</i> )( <i>MLL ampX1</i> )(5' <i>MLLX1</i> )	1 señal amarilla de tamaño incrementado, 2 señales amarillas, 1 señal verde [1Famp, 2F,1V]	Ganancia de dos copias de <i>MLL</i> . Amplificación de una copia del gen. Delección de la porción 3' de una copia de <i>MLL</i>	2 eventos numéricos 2 eventos estructurales

\*Nomenclatura de acuerdo al ISCN 2013<sup>63</sup>

## 7. DISCUSIÓN

Los trabajos que asocian el efecto genotóxico de los insecticidas malatión y permetrina, y su capacidad carcinogénica no han sido concluyentes. En la literatura existen reportes con resultados controvertidos, por lo que son necesarios más estudios destinados a definir el posible impacto del uso de estos agentes en el desarrollo de cáncer. La Organización Mundial de la Salud ha clasificado al malatión y a la permetrina como ligera y moderadamente peligrosos, respectivamente <sup>64</sup>; sin embargo la IARC los ha clasificado en el grupo III, por lo que son considerados como no clasificables como carcinógenos <sup>65</sup>.

En México, su uso ha sido autorizado por la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) a nivel urbano, pecuario, industrial, doméstico y agrícola; en éste último, permitiéndose el uso de estos agentes en más de 50 tipos de cultivos <sup>66</sup>. Por otro lado, en el período de 2005 a 2009 la Secretaría de Salud reportó que en nuestro país, más del 50% de los pacientes menores a 20 años que desarrollaron leucemia, estuvo expuesto a plaguicidas. Los estados de la República Mexicana en los que se registró mayor incidencia relativa de cáncer en niños y adolescentes (Baja California, Colima, Sinaloa y Tamaulipas) son algunos de los estados con mayor uso de plaguicidas <sup>5</sup>. Por lo anterior, resulta de gran importancia conocer la posible relación entre la exposición a estos agentes y el desarrollo de cáncer, a fin de establecer medidas que contribuyan a la prevención de esta enfermedad.

Actualmente, son escasos los estudios en donde se investiga el efecto de estos agentes en genes específicos asociados a cáncer; el presente trabajo aporta información sobre las alteraciones inducidas por la exposición a los insecticidas malatión y permetrina en el gen *MLL*, el cual está implicado en el desarrollo de

leucemias agudas. Con este fin se analizó el daño a este gen, así como la viabilidad celular y el IM de linfocitos de sangre periférica expuestos a estos agentes *in vitro*.

El modelo celular del linfocito de sangre periférica ha sido ampliamente usado en ensayos de genotoxicidad, ya que ofrece ventajas como la facilidad en la obtención de la muestra, simplicidad y bajo costo del cultivo, así como el gran número de células que es posible obtener en un tiempo corto. A pesar de que el uso de sangre completa en los cultivos reproduce mejor lo que sucede en condiciones *in vivo*, en algunos estudios, al igual que en este, se ha optado por el uso de células aisladas ya que han mostrado mayor sensibilidad a sufrir daño en el ADN, posiblemente porque en la sangre completa existen otros blancos de estos agentes que podrían alterar su concentración y disponibilidad en el cultivo <sup>49,50,53</sup>.

El esquema de tratamiento inicial (aplicado a la muestra del donador I) se planteó con base en trabajos previos en los que se utilizaron los mismos agentes y el mismo modelo celular. Las concentraciones utilizadas (100, 200 y 300  $\mu\text{M}$ ) se encuentran por arriba de lo que se ha detectado en sangre y orina de personas ocupacionalmente expuestas; sin embargo, para el caso de malatión se refiere que estos valores pueden alcanzarse durante varios episodios de exposición crónica no letal. También se ha documentado que en casos de exposición extrema o envenenamiento se encontraron concentraciones similares o aún mayores a las utilizadas en este estudio<sup>48,50</sup>. Los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* utilizando este intervalo de concentraciones han encontrado efectos genotóxicos tanto positivos como negativos, por lo que se consideran contradictorios <sup>48-50,52,55</sup>.



En el presente trabajo se estudiaron primero tres concentraciones con la muestra de un donador, se encontró mayor efecto de daño estructural en el gen *MLL* con 200  $\mu$ M de cada insecticida, por lo que esta concentración también fue probada en ensayos con muestra de un segundo donador.

## **7.1 Ensayos para establecer la concentración con mayor efecto: Donador I**

### **7.1.1 Viabilidad e IM**

En estos primeros ensayos se encontró disminución en la viabilidad por efecto de la exposición a insecticidas, sin embargo, no se encontró una correlación significativa con la prueba de Spearman. La mínima viabilidad fue observada en los cultivos con el control positivo. En la literatura se ha reportado citotoxicidad a concentraciones mayores a las aquí utilizadas, llegando incluso a haber ausencia de crecimiento en algunos casos <sup>48,49,53</sup>; no obstante se debe considerar que los métodos para determinar viabilidad varían y podrían influir en los resultados.

En los experimentos con permetrina se observó un comportamiento lineal de la viabilidad de tipo concentración-respuesta, se registró menor viabilidad con el aumento en la concentración. En el caso de los ensayos con malatión no se presentó este comportamiento, el porcentaje de células viables decayó en las dos primeras concentraciones (100 y 200  $\mu$ M) sin embargo, en la máxima concentración (300  $\mu$ M) se observó un incremento (**Figura 6a**). Este mismo efecto se detectó con el IM, el cual incrementó en la máxima concentración (**Figura 6b**). En trabajos previos en los que ha observado un comportamiento similar con concentraciones altas de malatión, el efecto se ha atribuido a problemas en la solubilidad de la sustancia en el medio, obteniéndose una

distribución no homogénea en el cultivo <sup>48,50</sup>; aunque esto sólo se refiere en estudios que aplican concentraciones mayores a las utilizadas en este trabajo. Por otro lado, existe un estudio que refiere que el malatión podría tener un efecto mitogénico a concentraciones del orden de 6 mM, sin embargo, este hallazgo fue observado en un tipo celular (línea celular HepG<sub>2</sub>) diferente al linfocito <sup>60</sup>. Si bien los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan lo descrito previamente, el posible efecto mitogénico de este compuesto debe ser reproducido e investigado más a fondo.

En cuanto a los cultivos expuestos a etopósido la viabilidad estuvo entre 75% y 80%, lo que concuerda con trabajos previos que reportan porcentajes de viabilidad arriba del 70% en células expuestas a este agente <sup>67</sup>. No se observó efecto en la proliferación celular, ya que el IM en promedio fue igual que el de los controles; en un trabajo publicado se reportó disminución del IM a concentraciones menores a las utilizadas, sin embargo el tiempo de exposición fue diferente<sup>27</sup>. De manera general, no se observaron cambios estadísticamente significativos en el IM con ningún tratamiento (**Figura 6b**).

### 7.1.2 Daño en el gen *MLL*

El análisis de alteraciones en el gen *MLL* por medio de la metodología de FISH mostró células con daño en todas las muestras, incluso en los controles; sin embargo, la frecuencia y la diversidad de daño fue distinta (**Tablas 3 y 4, Figura 7**). Con base en el certificado de análisis de la casa comercial que produce la sonda *MLL* (Vysis), el porcentaje de células anormales esperado es del 2.5% <sup>59</sup>. En los cultivos no expuestos se encontró un promedio de 95.5% de células normales, este dato es muy cercano a los valores de corte referidos (96%) en un estudio que analiza la médula ósea de individuos normales con la sonda para el gen *MLL* <sup>68</sup>; los autores observaron un patrón de ruptura clásico

(1F,1V,1R) en un porcentaje de 0.8%, que incluso es mayor al valor basal encontrado en este trabajo (0.2%- 0.7%), sin embargo se debe considerar que en el presente estudio se analizaron células mononucleares de sangre periférica y no médula ósea.

En este trabajo se encontraron alteraciones numéricas en un promedio de 3.9% en los cultivos sin tratamiento y las pérdidas de *MLL* fueron el evento numérico más observado. No es posible afirmar con certeza que se trate de eventos numéricos del tipo aneuploidías, ya que también podría tratarse de deleciones; sin embargo fueron consideradas alteraciones numéricas bajo la condición de que para ser agrupadas dentro de las estructurales se requirió observar separación de las señales (en rojo y verde) (**Figura 4**). El porcentaje basal de células con aneuploidías observado (3.9%), se encuentra por debajo de lo reportado previamente en un estudio de aneuploidía del cromosoma 11 (9-13%), en el que analizaron con su respectiva sonda centromérica cultivos de linfocitos de individuos sanos bajo condiciones similares a las de este trabajo<sup>69</sup>.

Con respecto a las alteraciones inducidas por la exposición a insecticidas, con ambos agentes se observó daño numérico y estructural; en general, se encontraron porcentajes mayores de células alteradas con la exposición a permetrina que con malatión (**Tablas 3 y 4**). Con ninguno de los dos plaguicidas se encontró una respuesta relacionada con la concentración, de hecho se encontró un menor número de células alteradas a mayores concentraciones; aunque no se descarta el hecho de que haya existido pérdida de células dañadas por muerte, y que hayan quedado fuera del análisis (**Figura 7**).

Al analizar únicamente células con daño estructural, tampoco se observó un comportamiento monótono, ya que se encontró un pico máximo en la

concentración de 200  $\mu\text{M}$  para ambos insecticidas. Este efecto puede deberse a que ambos agentes son disruptores endócrinos y es común observar curvas concentración-respuesta no monótonas con este tipo de sustancias; este comportamiento se ha reportado ampliamente en ensayos *in vitro* e *in vivo*<sup>70</sup>.

Como se mencionó anteriormente, ambos insecticidas indujeron alteraciones numéricas y estructurales, en el caso de malatión 200  $\mu\text{M}$ , se observó diferencia marginal ( $p=0.05$ ) en el número de células con daño estructural en comparación con el control. En los cultivos expuestos a 200  $\mu\text{M}$  de permetrina, también se observó diferencia marginal en el número total de células alteradas así como en las células con daño numérico con respecto al disolvente. Con esta misma concentración se observó el máximo número de células con alteración estructural (**Tablas 3 y 4**).

Por otro lado, algunos de los patrones de daño observados en cultivos expuestos a insecticidas también fueron detectados en los cultivos expuestos al control positivo (etopósido) el cual se sabe que induce daño en *MLL*<sup>27,38,39,41</sup>. Con este agente se encontró diferencia marginal en el número global de células alteradas en comparación con el disolvente (DMSO) cuando se aplicó en una concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

Con base en los resultados descritos se seleccionó la concentración de 200  $\mu\text{M}$  de cada agente para ser probada con muestra de un segundo donador. Los resultados se discuten a continuación.

## 7.2 Ensayos con el esquema de tratamiento seleccionado (Donadores I y II)

### 7.2.1 Viabilidad e IM

Conjuntando los datos de ambos donadores (n=6) se determinó que existe correlación negativa entre el tratamiento con insecticidas y la viabilidad, aunque sólo fue significativo con malatión (**Figura 8**), lo que sugiere un efecto citotóxico. Sin embargo, los porcentajes de células viables se mantuvieron por arriba del 75%; cabe mencionar que en ningún caso se obtuvo 100% de células viables, lo cual puede ser inherente al proceso de separación de las células mononucleares o al cultivo. En cuanto al IM, el valor máximo observado se encontró en los cultivos no tratados, y disminuyó por el tratamiento tanto con insecticidas como con disolventes. Con todos los agentes probados se obtuvieron IM similares y por debajo del encontrado en cultivos sin tratamiento, aunque no se observó significancia estadística (**Tabla 5, Figura 8b**).

### 7.2.2 Daño en el gen MLL

El gen *MLL* mostró alteraciones numéricas y estructurales en todos los cultivos, en el caso de las muestras sin tratamiento el promedio de células con daño numérico y estructural se mantuvo dentro de los intervalos reportados en trabajos con individuos sanos (Ver apartado 7.1.2) <sup>59,68,69</sup>. No se encontró diferencia estadística entre los cultivos sin tratamiento y los expuestos a los disolventes.

Ambos insecticidas elevaron el número total de células alteradas (con daño numérico y estructural), y fue estadísticamente significativo en los ensayos con

permetrina (**Tabla 6, Figura 9**). De manera general, fueron más frecuentes las alteraciones numéricas que las estructurales.

Al analizar el tipo de daño de manera específica, se encontró que el número de células con daño estructural se duplicó significativamente en los cultivos expuestos a malatión, con respecto al control (**Tabla 6**); este resultado ofrece evidencia del potencial de este insecticida como inductor de alteraciones en genes asociados a leucemia, como *MLL*. Por otro lado, el número de células con daño numérico también se elevó con la exposición a malatión, aunque no mostró significancia estadística. En contraste, en los ensayos con permetrina se detectó un incremento significativo en el número de células con alteración numérica, con respecto al control; este hallazgo resulta de importancia ya que el efecto aneuploidógeno de este agente únicamente se ha referido en un trabajo previo, en donde se detectó que el tratamiento con dosis subagudas de permetrina induce AC numéricas en médula ósea de ratas expuestas al agente<sup>56</sup>; los resultados del presente trabajo concuerdan con lo encontrado *in vivo*. Recientemente, en nuestro laboratorio (datos no mostrados) se ha confirmado mediante el método de FISH utilizando un panel de sondas centroméricas para cuatro cromosomas distintos, que la permetrina induce alteraciones numéricas. Es necesario investigar sobre el mecanismo de formación de estas alteraciones, ya que no existe información al respecto.

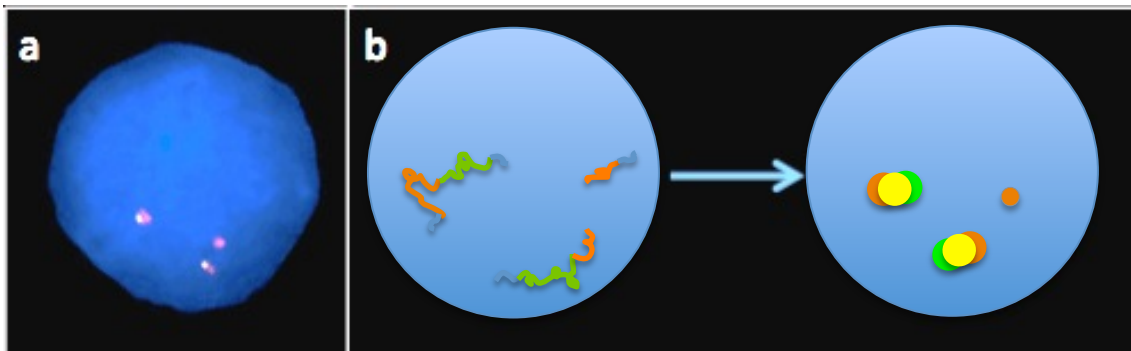
Adicionalmente, al igual que el malatión, la permetrina incrementó significativamente el número de células con daño estructural en comparación con el disolvente (**Tabla 6**). Como se puede observar, la frecuencia de células con alteración estructural fue similar con ambos insecticidas, e incluso fue cercana a lo encontrado con el control positivo (**Figura 9**), el cual fue analizado en la primera parte del estudio (apartado 7.1.2).

Además de incrementar el número de células con alteración estructural, la exposición a permetrina aumentó significativamente la diversidad de daño, registrándose un mayor número de patrones de alteración en comparación con el control (**Figura 10**). Algunos de los patrones observados, ya han sido previamente reportados en trabajos en los que se estudió el efecto de la exposición a etopósido, el cual es un conocido inhibidor de la topoisomerasa II capaz de inducir rupturas en *MLL* <sup>36,62</sup>.

Asimismo, con el aumento en la diversidad de daño se encontró mayor complejidad (**Figura 11**), como se puede observar en la **Tabla 6**, las células expuestas a permetrina mostraron mayor número de patrones de daño que debieron implicar más de un evento (filas en color anaranjado y rojo ), en comparación con el DMSO. La interpretación de estos patrones alterados se muestra en las **Tablas 7 y 8**; resulta importante resaltar este esfuerzo ya que en trabajos previos no se habían propuesto mecanismos para la totalidad de los patrones observados y únicamente se había hecho para los patrones más frecuentes <sup>36</sup>.

Cabe mencionar que se propusieron los mecanismos más simples posibles, para lo cual se planteó la posibilidad de un punto de ruptura alternativo, más desplazado hacia el extremo 3' el cual generaría un fragmento de la sonda roja unido a la sonda verde (1F) y otro fragmento residual rojo (1R) (**Figura 12**). Es factible observar este tipo de ruptura por medio del método de FISH, ya que la sonda tiene un tamaño de 190 kb y si se fragmenta a la mitad genera señales de tamaño suficiente (90 kb) para ser detectados <sup>59</sup>. El planteamiento sugerido se sustenta en estudios en los que se ha demostrado que las rupturas pueden ocurrir hacia el extremo 3' o bien hacia el 5' del BCR <sup>29,37,71</sup>, incluso se refieren casos en los cuales *MLL* presenta rupturas fuera del BCR <sup>24</sup>.

Recientemente, *Glukhov, et. al, 2013* observaron mediante FISH patrones similares (2 señales amarillas más una roja o bien dos amarillas más una verde) (**Figura 12**), y han sugerido como mecanismo de formación la posibilidad de rupturas fuera del BCR <sup>62</sup>. Debido a que se desconoce el mecanismo de acción de los insecticidas utilizados, no se puede descartar la presencia de puntos de ruptura alternativos dentro, o cercanos al BCR. Resulta de gran importancia investigar sobre el mecanismo que genera este patrón (2F, 1R), ya que de acuerdo a lo observado en el presente trabajo y a lo reportado por *Glukhov, et. al, 2013* , parece ser un evento más común de lo esperado. Esto abre camino para plantear nuevas hipótesis respecto a la particular estructura y comportamiento de *MLL*, que lo hace más susceptible a sufrir rupturas en comparación con otros genes.



**Figura 12.** a) Célula con dos señales amarillas y una roja. El posible mecanismo de formación de este patrón se describe en b) Una copia de *MLL* normal y otra copia con punto de ruptura desplazado hacia 3' generando dos señales amarillas y una roja.

Por otro lado, algunos de los patrones más complejos (que implicaron más de un evento) detectados en este trabajo, ya se han observado en estudios de búsqueda de rupturas con la misma metodología inducidas con etopósido, el cual es un agente leucemogénico bien conocido <sup>28,36,62</sup>.



En este trabajo se encontró que la exposición a 200  $\mu\text{M}$  de malatión y permetrina induce alteraciones en *MLL*, esta concentración es en general menor respecto a la mayoría de las concentraciones reportadas como genotóxicas en estudios en los que se analiza daño global al ADN mediante MN, ensayo cometa y AC en linfocitos de sangre periférica (**Tablas 9 y 10**)<sup>48-50,52-55,61,72</sup>; este hallazgo sugiere una mayor susceptibilidad de *MLL* a sufrir alteración en comparación con el resto del genoma. Se refiere que este gen es especialmente vulnerable debido a que presenta sitios de unión al andamio (*SAR*), regiones de hipersensibilidad a DNAsa I, así como secuencias consenso de unión a la ADN topoisomerasa II<sup>71</sup>. Adicionalmente se ha observado la formación de estructuras secundarias (tallo y asa) mediadas por la ADN topoisomerasa II que presentan poca estabilidad y son sensibles al ataque por nucleasas<sup>37</sup>. Sin embargo, la mayor susceptibilidad de *MLL* a sufrir rupturas por la exposición a malatión y permetrina debe ser tomada con reserva, ya que existen diferencias entre este trabajo y los estudios previos, por ejemplo el tipo de ensayo empleado, el tiempo de exposición, la pureza del compuesto, así como variabilidad interindividual de los donadores incluidos en el estudio (**Tablas 9 y 10**)<sup>52-55,61</sup>.

Particularmente se refiere que el malatión induce AC a una concentración mayor (399  $\mu\text{M}$ ) a la usada en este estudio (200  $\mu\text{M}$ ), aunque con un tiempo de exposición menor (0.5 h)<sup>72</sup>; no obstante, mediante un ensayo más sensible como el cometa, no se detectó efecto genotóxico con 1 h de exposición a 25-200  $\mu\text{M}$ . Adicionalmente, utilizando el método de MN se reportó efecto positivo arriba de 200  $\mu\text{M}$  con 48 h de exposición. En este mismo trabajo se determinó que los MN eran mayormente fragmentos cromosómicos y no cromosomas completos. *Pluth, et al.*<sup>48</sup> estudiaron específicamente el gen *HPRT*, y encontraron que el malatión produce daño particularmente a concentraciones

arriba de 1000  $\mu\text{M}$ ; no obstante encontraron indicios de daño con 151  $\mu\text{M}$ , aunque con una desviación estándar muy grande (**Tabla 9**).

En cuanto a la permetrina, mayormente se refiere efecto genotóxico a concentraciones mayores a 200  $\mu\text{M}$  (256-511  $\mu\text{M}$ ) con tiempos de exposición (0.5-72 h) y ensayos diferentes (cometa, AC y MN). *Herrera, et al.*<sup>52</sup> encontraron daño a concentraciones menores a la utilizada (26-128  $\mu\text{M}$ ) mediante el ensayo de MN, aunque utilizaron un tiempo de exposición mayor (48 h), cabe mencionar que no se determinó si los MN correspondían fragmentos o cromosomas completos. Adicionalmente se encontró incremento en ICH con 128  $\mu\text{M}$  por 48 h aunque con marcada variabilidad interindividual. *Barrueco, et al.*<sup>55</sup> también refirieron diferencias interindividuales, ya que detectaron en un individuo incremento en AC desde 192  $\mu\text{M}$  (21 h) y en otro a partir de 256  $\mu\text{M}$  (21 h). Asimismo, *Surrallés, et al.*<sup>53</sup> encontraron daño únicamente en un individuo (256  $\mu\text{M}$ , 48 h) utilizando MN (**Tabla 10**). Las variaciones entre individuos son relevantes y deben ser estudiadas, ya que muestran que hay población con mayor susceptibilidad a la exposición a permetrina.

**Tabla 9.** Reportes previos que evalúan la genotoxicidad de la exposición a malatión *in vitro* en linfocitos de sangre periférica

Referencia	Tiempo de exposición	Ensayo	Resultado
<i>Garry, 1990</i> <sup>72</sup>	0.5 h	AC	<b>Positivo: <u>399</u> <math>\mu\text{M}</math></b>
<i>Titenko, 1997</i> <sup>49</sup>	48 h	MN	<b>Positivo: <u>227-302</u> <math>\mu\text{M}</math></b>
<i>Błasiak, 1999</i> <sup>50</sup>	1 h	Cometa	<b>Negativo: 25, 75, 200 <math>\mu\text{M}</math></b>
<i>Pluth, 1996</i> <sup>48</sup>	60 h	Mutación en el gen <i>HPRT</i>	<b>Positivo: 151, <u>1,362</u> y <u>1,816</u> <math>\mu\text{M}</math></b>

\*Los valores subrayados y en negrita son las concentraciones que son mayores a la usadas en este estudio (200  $\mu\text{M}$ ). ICH: intercambio de cromátidas hermanas; MN: micronúcleos; AC: aberraciones cromosómicas

**Tabla 10.** Reportes previos que evalúan la genotoxicidad de la exposición a permetrina *in vitro* en linfocitos de sangre periférica

Referencia	Tiempo de exposición	Ensayo	Resultado
<i>Herrera, 1992</i> <sup>52</sup>	48 h	ICH	<b>Positivo</b> en individuo I: 128 $\mu\text{M}$ <b>Positivo</b> en individuo II: <b><u>256 <math>\mu\text{M}</math></u></b>
	48 h	MN	<b>Positivo:</b> 26 $\mu\text{M}$ , 64 $\mu\text{M}$ , 128 $\mu\text{M}$
<i>Barrueco, 1994</i> <sup>55</sup>	21 h	AC	<b>Positivo en individuo I:</b> 192 $\mu\text{M}$ - <b><u>256 <math>\mu\text{M}</math></u></b> <b>Positivo en individuo II:</b> <b><u>256 <math>\mu\text{M}</math>-383 <math>\mu\text{M}</math></u></b>
	2 h	AC	<b>Positivo:</b> <b><u>383 <math>\mu\text{M}</math>-511 <math>\mu\text{M}</math></u></b>
<i>Surrallés, 1995</i> <sup>53</sup>	48 h	MN	<b>Negativo:</b> 64 $\mu\text{M}$ - <b><u>256 <math>\mu\text{M}</math></u></b>  *sólo con un individuo positivo: <b><u>256 <math>\mu\text{M}</math></u></b>
<i>Undeger, 2005</i> <sup>54</sup>	0.5 h	Cometa	<b>Positivo:</b> <b><u>511 <math>\mu\text{M}</math></u></b>
<i>Turkez, 2012</i> <sup>61</sup>	72 h	AC	<b>Positivo:</b> <b><u>511 <math>\mu\text{M}</math></u></b>
		MN	<b>Positivo:</b> <b><u>511 <math>\mu\text{M}</math></u></b>

\*Los valores subrayados y en negrita indican las concentraciones que son mayores a la usada en este estudio (200  $\mu\text{M}$ ). ICH: intercambio de cromátidas hermanas; MN: micronúcleos; AC: aberraciones cromosómicas.

Poco se conoce sobre el mecanismo de acción genotóxica de ambos insecticidas. Se refiere que existen algunos plaguicidas inhibidores de la enzima ADN topoisomerasa-II <sup>11</sup>, esto explicaría su capacidad de inducción de rupturas en el gen *MLL*, afectando el equilibrio de ruptura-religamiento normal y llevando a la formación de rupturas preferentemente en la banda 11q23, a causa de la particular arquitectura de la cromatina en este locus. Sin embargo, no se ha comprobado que el malatión y la permetrina inhiban a dicha enzima. Se requieren estudios que analicen esta posibilidad, sin embargo, ambos insecticidas carecen en su estructura de un grupo quinona, que es característico de muchos inhibidores de la ADN-topoisomerasa II <sup>73</sup>.

Otro posible mecanismo de inducción de ruptura en *MLL* es a través de la activación de la apoptosis, ya que este gen es susceptible de sufrir rupturas sitio-específicas por nucleasas apoptóticas que se activan durante este proceso <sup>37,74,75</sup>. Esto es factible especialmente en el caso de malatión, ya que se encontró afectada la viabilidad con 200  $\mu$ M, concentración con la cual también se observó actividad genotóxica. No obstante, se debe tener en cuenta que los resultados, aunque sin significancia estadística, sugieren que existe efecto genotóxico del malatión desde concentraciones menores a 200  $\mu$ M (**Tabla 3**), las cuales posiblemente no sean citotóxicas. El efecto citotóxico del malatión ha sido reportado con concentraciones y tiempos de exposición mayores (227 y 302  $\mu$ M, 48 h)<sup>49</sup> a lo utilizado en el presente trabajo.

Por otro lado, se refiere que la exposición a estrógenos como el estradiol induce rupturas en *MLL* <sup>31,37</sup>, esto plantea la alternativa de que el malatión y la permetrina, que son disruptores endócrinos <sup>51,76,77</sup>, podrían afectar al gen por mecanismos similares. Se ha propuesto que los estrógenos causan alteraciones en *MLL* a través de dos mecanismos principales: a) activación de receptores estrogénicos, los cuales se expresan en células hematopoyéticas y

están implicados en procesos como remodelación de la cromatina y otras modificaciones epigenéticas. *MLL* resulta un blanco ideal ya que en el mismo sitio en donde se detectan las rupturas, se encontró un promotor crítico, lo que indica que es un sitio de remodelación de la cromatina muy activo. b) el metabolismo de los estrógenos de catecol (como estradiol), ya que éstos son procesados por peroxidasas generando semiquinonas y quinonas capaces de formar aductos de ADN además de generar especies reactivas de oxígeno. Adicionalmente las quinonas son agentes capaces de afectar a la ADN topoisomerasa-II y han sido estrechamente asociadas con la inducción de daño en *MLL* <sup>31</sup>.

Por otro lado, también se refiere que tanto el malatión como la permetrina inducen estrés oxidativo; los radicales libres dañan a la célula de diversas formas, a través de los lípidos de la membrana celular y afectando la estructura de las proteínas. Los derivados de los radicales libres son capaces de dañar las bases púricas y pirimídicas así como el esqueleto de ADN. La lesión mayormente implicada en mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento es la generación de la 8-hidroxiguanina <sup>60,61</sup>. Sin embargo, aún quedaría por resolver si estos mecanismos pueden dañar de manera particular a *MLL*, ya que se sabe que el daño que causan es muy extenso.

Finalmente, un aspecto importante a considerar dentro del mecanismo de acción de estos plaguicidas es el efecto epigenético, ya que se ha reportado que ambos agentes alteran tanto la metilación global del ADN como las regiones del promotor de un gran número de genes, por lo que podrían afectar su expresión y en consecuencia diversas funciones, tales como la respuesta al daño al ADN y la reparación, entre otros <sup>78-80</sup>.

De manera general, los resultados encontrados en este modelo de exposición aguda muestran evidencia de que los insecticidas malatión y permetrina inducen daño en el gen *MLL*, el cual al tener una reparación deficiente a través de la recombinación entre sitios del genoma no homólogos, podría generar rearrreglos con potencial leucemogénico; éstos pueden tener diferente impacto en el organismo dependiendo del tipo de célula que sufra el daño y del momento de la vida en el que se encuentre. La generación de alteraciones con potencial oncogénico inducidas por los insecticidas podrían, por lo tanto representar el inicio del desarrollo de la leucemia.

## 8. CONCLUSIONES

Se demostró que la exposición a malatión (200  $\mu$ M) induce daño estructural en el gen *MLL*, y la permetrina (200  $\mu$ M) induce daño numérico y estructural durante la exposición aguda (24 h) de linfocitos humanos a estos agentes. No sólo se incrementó la frecuencia de células con alteración estructural, también se elevó la diversidad y complejidad de las alteraciones encontradas. Adicionalmente, se observó que la permetrina tiene un efecto aneuploidógeno, que no ha sido previamente descrito en ensayos *in vitro*.

Los hallazgos observados son importantes en el contexto del desarrollo de la LLA, ya que el daño estructural detectado es similar al que se encuentra cuando las células se tratan con etopósido, un potente inductor de este tipo de leucemia; en cuanto a las pérdidas y ganancias cromosómicas, éstos son eventos que ocurren comúnmente en los blastos de los pacientes con LLA.

Los resultados obtenidos ofrecen evidencia biológica de la asociación entre la exposición a estos insecticidas y el desarrollo de la LLA, apoyando las observaciones derivadas de los estudios epidemiológicos.



Con base en lo encontrado, es importante investigar sobre el mecanismo por el cual estos insecticidas generan daño en *MLL*. Una posibilidad es que los agentes actúen como disruptores endócrinos, ya que este gen es susceptible a sufrir rupturas por la exposición a estrógenos.

Adicionalmente, es recomendable evaluar concentraciones menores de plaguicidas e incluir modelos de exposición crónica *in vivo*, así como realizar ensayos en otros tipos celulares como son las troncales hematopoyéticas o las troncales embrionarias, ya que se asume que estas células son blanco de lesiones en *MLL*; este tipo de modelo tiene relevancia dado que se ha demostrado que es en la etapa intrauterina cuando se forman las alteraciones que inducen el desarrollo de la LLA de la edad pediátrica.

## 9. REFERENCIAS

1. Pui, C.-H., Evans, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **354**, 166–178 (2006).
2. Wiemels, J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem. Biol. Interact.* **196**, 59–67 (2012).
3. Pui, C.-H., Robison, L. L., Look, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* **371**, 1030–1043 (2008).
4. Rivera-Luna R. Conceptos epidemiológicos del cáncer infantil en México. En: Hemato-oncología Pediátrica. Principios Generales. ETM, 2006.
5. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. Perfil epidemiológico del cáncer en niños y adolescentes en México. SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de cáncer en niños y adolescentes en México. (2010).
6. Rivera-Luna, R. et al. Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *Int. J. Cancer* **132**, 1646–1650 (2013).
7. Lightfoot, T. J., Roman, E. Causes of childhood leukaemia and lymphoma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **199**, 104–117 (2004).
8. Pyatt, D., Hays, S. A review of the potential association between childhood leukemia and benzene. *Chem. Biol. Interact.* **184**, 151–164 (2010).
9. Badham, H. J., Renaud, S. J., Wan, J., Winn, L. M. Benzene-initiated oxidative stress: Effects on embryonic signaling pathways. *Chem. Biol. Interact.* **184**, 218–221 (2010).
10. Pombo-de-Oliveira, M. S., Koifman, S. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **15**, 2336–2341 (2006).
11. Alexander, F. E. et al. Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Res.* **61**, 2542–2546 (2001).

12. Urayama, K. Y. et al. MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers.* **16**, 1172–1177 (2007).
13. Metayer, C. et al. Exposure to herbicides in house dust and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* doi:10.1038/jes.2012.115 (2013).
14. Turner, M. C., Wigle, D. T., Krewski, D. Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Ciência Saúde Coletiva.* **16**, 1915–1931 (2011).
15. Metayer, C., Buffler, P. A. Residential exposures to pesticides and childhood leukaemia. *Radiat. Prot. Dosimetry* **132**, 212–219 (2008).
16. Rudant, J. et al. Household exposure to pesticides and risk of childhood hematopoietic malignancies: The ESCALE study (SFCE). *Environ. Health Perspect.* **115**, 1787–1793 (2007).
17. Borkhardt, A., Wilda, M., Fuchs, U., Gortner, L., Reiss, I. Congenital leukaemia after heavy abuse of permethrin during pregnancy. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal.* **88**, F436–437 (2003).
18. Pui, C.-H., Campana D. Childhood leukemia. In *Abeloff's Clinical Oncology* (ed.) Elsevier Inc: Churchill Livingstone, 2008.
19. Mrózek, K., Harper, D. P., Aplan, P. D. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **23**, 991–1010, v (2009).
20. Armstrong, S. A., Look, A. T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 6306–6315 (2005).
21. Pui, C. H., Crist, W. M., Look, A. T. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* **76**, 1449–1463 (1990).
22. Greaves, M. F., Wiemels, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer.* **3**, 639–649 (2003).
23. Wiemels, J. Chromosomal translocations in childhood leukemia: natural history, mechanisms, and epidemiology. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 87–90. doi:10.1093/jncimonographs/lgn006 (2008).

24. Meyer, C. et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. doi:10.1038/leu.2013.135 (2013).
25. Krivtsov, A. V., Armstrong, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat. Rev. Cancer*. **7**, 823–833 (2007).
26. Chuk, M. K., McIntyre, E., Small, D., Brown, P. Discordance of MLL-rearranged (MLL-R) infant acute lymphoblastic leukemia in monozygotic twins with spontaneous clearance of preleukemic clone in unaffected twin. *Blood*. **113**, 6691–6694 (2009).
27. Brassesco, M. S., Montaldi, A. P., Sakamoto-Hojo, E. T. Preferential induction of MLL (Mixed Lineage Leukemia) rearrangements in human lymphocyte cultures treated with etoposide. *Genet. Mol. Biol.* **32**, 144–150 (2009).
28. Brassesco, M. S. et al. Cytogenetic and molecular analysis of MLL rearrangements in acute lymphoblastic leukaemia survivors. *Mutagenesis*. **24**, 153–160 (2009).
29. Strick, R., Strissel, P. L., Borgers, S., Smith, S. L., Rowley, J. D. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4790–4795 (2000).
30. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S. et al. Dietary flavonoids induce MLL translocations in primary human CD34+ cells. *Carcinogenesis*. **28**, 1703–1709 (2007).
31. Schnyder, S. et al. Estrogen treatment induces MLL aberrations in human lymphoblastoid cells. *Leuk. Res.* **33**, 1400–1404 (2009).
32. Liu, H., Cheng, E. H. Y., Hsieh, J. J. D. MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 1204–1211 (2009).
33. Slany, R. K. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica*. **94**, 984–993 (2009).
34. Harper, D. P., Aplan, P. D. Chromosomal rearrangements leading to MLL gene fusions: clinical and biological aspects. *Cancer Res.* **68**, 10024–10027 (2008).

35. Driessen, E. M. C. et al. Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica*. doi:10.3324/haematol.2012.067983. (2013).
36. Sung, P. A., Libura, J. Richardson, C. Etoposide and illegitimate DNA double-strand break repair in the generation of MLL translocations: new insights and new questions. *DNA Repair*. **5**, 1109–1118 (2006).
37. Le, H. et al. Rearrangements of the MLL gene are influenced by DNA secondary structure, potentially mediated by topoisomerase II binding. *Genes. Chromosomes Cancer*. **48**, 806–815 (2009).
38. Libura, J., Slater, D. J., Felix, C. A., Richardson, C. Therapy-related acute myeloid leukemia-like MLL rearrangements are induced by etoposide in primary human CD34+ cells and remain stable after clonal expansion. *Blood*. **105**, 2124–2131 (2005).
39. Money Penny, C. G., Shao, J., Song, Y., Gallagher, E. P. MLL rearrangements are induced by low doses of etoposide in human fetal hematopoietic stem cells. *Carcinogenesis*. **27**, 874–881 (2006).
40. Blanco, J. G., Edick, M. J., Relling, M. V. Etoposide induces chimeric MLL gene fusions. *FASEB J*. **18**, 173–175 (2004).
41. Bueno, C. et al. Etoposide induces MLL rearrangements and other chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Carcinogenesis*. **30**, 1628–1637 (2009).
42. Vanhees, K., de Bock, L., Godschalk, R. W. L., van Schooten, F. J. & van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S. B. Prenatal exposure to flavonoids: implication for cancer risk. *Toxicol. Sci*. **120**, 59–67 (2011).
43. Robert Krieger (ed). *Haye's Handbook of pesticide toxicology*. 3<sup>a</sup> Ed. University of California: Academic Press, 2010.
44. Martínez-Valenzuela, C. & Gómez-Arroyo S, S. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Int. Contam. Ambient*. **23**, 185–200 (2007).
45. Bolognesi, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res*. **543**, 251–272 (2003).

46. Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A. R. & Battershill, J. M. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*. **21**, 93–103 (2006).
47. Flessel, P., Quintana, P. J., Hooper, K. Genetic toxicity of malathion: a review. *Environ. Mol. Mutagen*. **22**, 7–17 (1993).
48. Pluth, J. M., Nicklas, J. A., O'Neill, J. P., Albertini, R. J. Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro malathion exposure. *Cancer Res*. **56**, 2393–2399 (1996).
49. Titenko-Holland, N. et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutat. Res*. **388**, 85–95 (1997).
50. Błasiak, J., Jałoszynski, P., Trzeciak, A., Szyfter, K. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat. Res*. **445**, 275–283 (1999).
51. Gwinn, M. R., Whipkey, D. L., Tennant, L. B., Weston, A. Differential gene expression in normal human mammary epithelial cells treated with malathion monitored by DNA microarrays. *Environ. Health Perspect*. **113**, 1046–1051 (2005).
52. Herrera, A., Barrueco, C., Caballo, C., de la Peña, E. Effect of permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen*. **20**, 218–222 (1992).
53. Surrallés, J. et al. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res*. **341**, 169–184 (1995).
54. Undeğer, U., Başaran, N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch. Toxicol*. **79**, 169–176 (2005).
55. Barrueco, C., Herrera, A., Caballo, C., de la Peña, E. Induction of structural chromosome aberrations in human lymphocyte cultures and CHO cells by permethrin. *Teratog. Carcinog. Mutagen*. **14**, 31–38 (1994).
56. Institóris, L., Undeğer, U., Siroki, O., Nehéz, M., Dési, I. Comparison of detection sensitivity of immuno- and genotoxicological effects of subacute

- cypermethrin and permethrin exposure in rats. *Toxicology*. **137**, 47–55 (1999).
57. Lafiura, K. M. et al. Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21). *Pediatr. Blood Cancer*. **49**, 624–628 (2007).
58. Le Scouarnec, S., Gribble, S. M. Characterising chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity*. **108**, 75–85 (2012).
59. <http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-mll-dual-color-break-apart-rearrangement-probe.html>.
60. Moore, P. D., Yedjou, C. G., Tchounwou, P. B. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ. Toxicol.* **25**, 221–226 (2010).
61. Turkez, H., Aydin, E. The effects of taurine on permethrin-induced cytogenetic and oxidative damage in cultured human lymphocytes. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **63**, 27–34 (2012).
62. Glukhov, S. I. et al. The Broken MLL Gene Is Frequently Located Outside the Inherent Chromosome Territory in Human Lymphoid Cells Treated with DNA Topoisomerase II Poison Etoposide. *PloS One*. **8**, e75871 (2013).
63. Shaffer, L. G., McGowan-Jordan, J. & Schmid, M. *ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (2013). (Karger Publishers, 2012).
64. [http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard\\_rev\\_3.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_rev_3.pdf).
65. IARC 20. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Occupational Exposures in Insecticide Application, and Some Pesticides; International Agency for Research on Cancer, World Health Organization: Lyon, France, 1991; Vol. 53, pp 329-332.
66. *Catálogo de Plaguicidas*. Secretaria de Salud Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2004).
67. Rojas, E., Mussali, P., Tovar, E., Valverde, M. DNA-AP sites generation by etoposide in whole blood cells. *BMC Cancer*. **9**, 398 (2009).

68. Saxe, D. F., Persons, D. L., Wolff, D. J., Theil, K. S. Validation of fluorescence in situ hybridization using an analyte-specific reagent for detection of abnormalities involving the mixed lineage leukemia gene. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **136**, 47–52 (2012).
69. Mazor, R. et al. Increased levels of numerical chromosome aberrations after in vitro exposure of human peripheral blood lymphocytes to radiofrequency electromagnetic fields for 72 hours. *Radiat. Res.* **169**, 28–37 (2008).
70. Vandenberg, L. N. et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* **33**, 378–455 (2012).
71. Strissel, P. L., Strick, R., Rowley, J. D., Zeleznik-Le, N. J. An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region. *Blood.* **92**, 3793–3803 (1998).
72. Garry, V. F., Nelson, R. L., Griffith, J., Harkins, M. Preparation for human study of pesticide applicators: sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to selected fumigants. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **10**, 21–29 (1990).
73. Wiemels, J. L. et al. A Lack of a Functional NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase Allele Is Selectively Associated with Pediatric Leukemias That Have MLL Fusions. *Cancer Res.* **59**, 4095–4099 (1999).
74. Sim, S. P., Liu, L. F. Nucleolytic cleavage of the mixed lineage leukemia breakpoint cluster region during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 31590–31595 (2001).
75. Betti, C. J. et al. Cleavage of the MLL gene by activators of apoptosis is independent of topoisomerase II activity. *Leukemia.* **19**, 2289–2295 (2005).
76. Chen, H. et al. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **65**, 1419–1435 (2002).
77. Du, G. et al. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicol.* **116**, 58–66 (2010).
78. Zhang, X. et al. DNA methylation alterations in response to pesticide



exposure in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* **53**, 542–549 (2012).

79. Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., Skinner, M. K. Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reprod. Toxicol.* **34**, 708–719 (2012).

80. Manikkam, M., Guerrero-Bosagna, C., Tracey, R., Haque, M. M., Skinner, M. K. Transgenerational actions of environmental compounds on reproductive disease and identification of epigenetic biomarkers of ancestral exposures. *PLoS One.* **7**, e31901 (2012).

## ANEXO 1 Carta de Consentimiento informado

México, D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2012.

Por este medio hago constar que estoy de acuerdo en participar en el proyecto “Efecto del tratamiento con insecticidas en la generación de alteraciones en genes asociados a leucemia linfoblástica aguda y en el potencial de diferenciación del linaje linfoide B”, que se desarrolla en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto Nacional de Pediatría. Estoy de acuerdo en donar una muestra de sangre periférica de 40mL, tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes.

De igual forma, me han informado que a partir de esta muestra se obtendrán células (linfocitos), que se expondrá a insecticidas (permetrina y malatión) y se realizará el análisis de hibridación *in situ* con fluorescencia, con la finalidad de tener un mayor conocimiento del efecto que causan estos agentes sobre los cromosomas/genes.

Manifiesto que es de mi conocimiento, que los resultados que se obtengan de esta investigación serán confidenciales y sólo se utilizarán con fines académicos (presentaciones en reuniones científicas, publicación en revistas especializadas).

Atentamente,

Donador

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_

Testigo

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_

Testigo

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_

## ANEXO 2 Metodología

### *2.1. Cultivo de linfocitos*

Se tomaron aproximadamente 40 ml de sangre periférica heparinizada. A partir de esta muestra se hizo separación de células mononucleadas por gradiente de densidad utilizando Lymphoprep. Se determinó la cuenta celular y se procedió a cultivar por triplicado  $3-4 \times 10^6$  células en 5 ml de medio RPM1 suplementado con 0.1 ml de fitohemaglutinina, 10% de suero fetal bovino y 1% de glutamina. Los cultivos se incubaron por 48 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se les dio el tratamiento correspondiente y se continuó el cultivo por 24 h. Completadas las 72 h de cultivo, se tomaron 50 µL de cada cultivo para el ensayo de viabilidad y se procedió con la cosecha. Se añadieron 0.2 ml de colchicina a cada cultivo durante 90 minutos, posteriormente las células fueron hipotonizadas con KCL y fijadas con ácido acético glacial y metanol absoluto en una proporción 3:1 (Fijador Carnoy).

### *2.2 Tratamiento*

Se utilizaron malatión (SIGMA, pureza 98.6%) y permetrina (SIGMA, pureza 98.3%) disueltos en etanol absoluto (MERCK)(0.2%) y dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA) (0.4%), respectivamente. En los experimentos para establecer el esquema de tratamiento se aplicó malatión o permetrina en concentraciones de 100, 200 y 300 µM. Adicionalmente se incluyeron cultivos sin ningún tratamiento así como 1 y 10 µM de etopósido disuelto en DMSO como control positivo. El tiempo de exposición fue de 24 h, cada cultivo se realizó por triplicado. Con base en los resultados derivados de estos experimentos, se decidió probar la concentración de 200 µM, con un segundo individuo. En la **Tabla 1** se muestran los compuestos y las concentraciones aplicadas, así como el número de repeticiones que se realizaron.

### *2.3. Viabilidad e Índice Mitótico (IM):*

Viabilidad: Se utilizó el método de exclusión con azul tripano, para lo cual se mezclaron 20  $\mu$ L de muestra con 20  $\mu$ L de colorante y se contaron 100 células, se consideraron vivas las que no incorporaron el colorante y muertas aquellas teñidas de azul.

IM: A partir de laminillas teñidas con colorante Giemsa se determinó el número de metafases en 1000 células analizadas. Se calculó el índice mitótico como:  $(\# \text{metafases} / \# \text{total de células analizadas}) \times 100$ .

### *2.4. Hibridación in situ con fluorescencia:*

Para detectar rupturas o desviaciones en el número de copias del gen *MLL*, se utilizó la sonda comercial locus específica 11q23 de doble color (Vysis)<sup>59</sup>, que flanquea la región BCR (breakpoint cluster region) del gen, en la cual se ha observado que caen todos los puntos de ruptura de los rearrreglos en los que éste participa. El extremo centromérico de la sonda que hibrida con BCR está marcado con fluorocromo verde, mientras que el extremo telomérico de la sonda está marcado con fluorocromo rojo (**Figura 3**).

#### *2.4.1 Criterios de análisis:*

Cuando el gen *MLL* no presenta alteraciones se observa como una señal verde/roja o amarilla. Una célula es considerada normal si presenta dos señales amarillas. Por el contrario, cuando existe ruptura del gen la señal roja y verde se encuentran separadas por un espacio mayor al área que ocupa una señal. Adicionalmente, se pueden detectar otros patrones de señal anormales como cambio en el número de copias o señales sencillas que reflejan ruptura del gen (**Figura 4**). Se incluyeron células localizadas en zonas de alta eficiencia de hibridación (más de 80%), con morfología adecuada y que no se

encontraran sobrelapadas. Se realizó el análisis con filtro de triple banda (DAPI/GREEN/ORANGE) y para confirmar se utilizaron filtros individuales (GREEN y ORANGE). Una señal se consideró separada de otra si entre ellas existía un espacio correspondiente al tamaño de una señal, cuando este espacio fue más pequeño se consideraron como una sola señal.

#### *2.4.2 Método FISH:*

- Elaboración de laminillas:

Se hicieron laminillas por goteo y se utilizó vapor de agua.

- Pretratamiento:

Las laminillas se maduraron 30 minutos en solución 2XSSC, durante media hora a 37 °C. Posteriormente se deshidrataron en una serie de etanol al 70%, 85% y 100%, dos minutos en cada uno, a temperatura ambiente.

- Desnaturalización:

La muestra fue desnaturalizada en formamida al 70% en 2XSSC, a 72°C, por dos minutos. Se deshidrató en una serie de etanol frío al 70%, 85% y 100%. La sonda MLL fue desnaturalizada a 72 °C durante 5 minutos.

- Hibridación:

Se realizó durante toda la noche a 37 °C en cámara húmeda y en oscuridad.

- Lavados posthibridación

La laminilla se sometió a dos lavados, uno con NP-40 0.3% a 72 °C durante 40 segundos y otro con NP-40 0.1% a temperatura ambiente por 1 minuto. Se realizó contratinción con DAPI (2, 4, diaminofenilindol) diluido en medio de montaje Vectashield.

- Análisis

Se analizaron aproximadamente 1000 células en interfase por laminilla. Se utilizó un microscopio AXIO Imager (Carl Zeiss) equipado con filtro de triple banda. Los patrones de señal anormales se comprobaron mediante el uso de filtros individuales y se capturaron las imágenes (Isis, Metasystems, Carl Zeiss). El análisis se llevó a cabo como se mencionó anteriormente.