



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

**“LA DESMETILACIÓN DEL SATÉLITE 2 SE ASOCIA CON LA PRESENCIA DE
ERRORES EN LA SEGREGACIÓN DE LOS CROMOSOMAS 1 Y 16 EN CÉLULAS
SOMÁTICAS ADULTAS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

Diddier Giovanni Prada Ortega

Director de Tesis: Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo
Comité tutor: Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez
Dr. Alfonso Dueñas González

MÉXICO D.F.

Noviembre, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

“Eppur si mouve ”

Galileo Galilei

Agradecimientos

A Dios, por darme la fortaleza, la sabiduría y el amor que necesitaba para iniciar, mantenerme y superar los obstáculos,

A México, por darme la posibilidad, la infraestructura necesaria y rodearme de personas que me permitieron realizar uno de mis sueños más grandes,

A la UNAM, por ser una de las mejores universidades del mundo, por su arte, su ciencia y su amor a la libertad, que se demuestra en cada uno de sus rincones y en cada uno de sus estudiantes y docentes,

*A mi tutor y amigo, el **Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo**, por su buen carácter y su paciencia. Por su ayuda incondicional, por estar dispuesto a conseguir todo lo necesario con tal de lograr las metas comunes. Por escuchar, por su perseverancia, por su manera de instruir y de ser. Por su sabiduría y por no limitarse en sus enseñanzas tanto en ciencia como en muchas otras áreas de la vida. Por su libertad en la búsqueda de la verdad y por ser un gran ejemplo de persona,*

Al Dr. Fabio Salamanca Gómez, por su apoyo académico, su fuerte ánimo y carácter, por su alegría y por su forma de ser, que me inspiró a seguir en la búsqueda de la ciencia aplicada a la medicina cuando se está en un país lejano al natal,

Al Dr. Alfonso Dueñas González, por sus orientaciones durante mi proceso de formación,

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) porque me apoyaron con infraestructura y con la beca, respectivamente, que me permitió dedicarme tiempo completo a mis estudios doctorales,

A las instituciones que dieron los apoyos financieros otorgados para la realización del proyecto: PAPIIT 213311, PAPIIT IN221708 y CONACYT 45875-M y 83959.

Agradecimientos a título personal:

Al Instituto Nacional de Cancerología, en el cual viví, trabajé, me formé y pude terminar mi proyecto doctoral. El INCan, además de ser una de las mejores instituciones de Latinoamérica para el tratamiento del cáncer, me permitió conocer gente invaluable e interactuar con profesionales de la más alta calidad científica y humana,

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, que ha sido un apoyo incondicional durante todo el proceso, en especial a su directora, la Dra. Patricia Ostrosky Shejet, a quién le profeso una gran admiración por su capacidad de liderazgo y su gran trayectoria científica.

Y quisiera agradecer inmensamente a las siguientes personas:

*A mi maestra, testigo de mi boda, madrina de mi hijo, pero sobretodo mi gran amiga **M. en I.B.B. Clementina Castro Hernández**, por su corazón inmenso, por su apoyo en las buenas y en las malas, por sus consejos, por su tiempo, por su bondad en la manera de enseñar y de corregir, por su apoyo y sus enseñanzas en todo el trabajo que realicé y por la alegría y generosidad que irradia dondequiera que va,*

A mi hijo, por ser una fuente de inspiración y de alegría y por tenerme paciencia mientras no estaba con él.

A mi madre, por quererme tanto y por darme los valores que me permitieron seguir por el camino del bien,

A mi esposa Nora, por su amor incondicional, su paciencia, su respeto y por los sueños que juntos hemos compartido y que estamos haciendo realidad,

A mi papá por su enseñanzas, y por su sabiduría y porque ya no es el mismo que compartía diálogos, historias y filosofías,

A mi hermano por ser mi modelo a seguir durante toda mi vida, por ser un buen hermano mayor y por quererme tanto,

A mis sobrinitos Danielito y Avril, por darle fortaleza a mi hermano e integridad a mi familia y a mi cuñada Yujeiri Figueroa por su paciencia con mi hermano,

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio de Carcinogénesis: Alejandro López Saavedra, Marco Andonegui Elguera, Rodrigo Cáceres Gutiérrez, Iván Santander, Aurea Jasso, Diego Adrian Oliva Rico, Eunice Fabián Morales, Miguel Santibáñez Andrade, Rodrigo González Barrios de la Parra, Fernanda Cisneros Soberanis, José de la Luz Díaz Chávez, Elena Aréchaga, Ernesto Soto-Reyes, Julia Mendoza, Lucy Tapia, Sarahí Ortíz, Elena Pérez Monroy, Illiana Alcalá y Yair Alfaro Mora.

A mis amigos, el Dr. Fidias E. León Sarmiento MD-PhD, y el Dr. Felix Recillas Targa, que me han motivado durante toda mi formación como científico,

A mi amigo Lisandro Sánchez Hernández, por compartir grandes momentos de alegría que siempre recordaré, además de su ayuda en la ejecución de este proyecto,

A mis abuelas, tíos y primos de las familias Ortega Guerrero y Prada Cárdenas, que los recuerdo siempre con mucho cariño,

También quisiera agradecer a Patricia de la Torre, quién me apoyó de sobremanera con la obtención de las secuencias para este proyecto,

Finalmente a todas las personas que han cruzado mi camino y que me han hecho más agradable esta etapa tan importante de mi vida, MUCHAS GRACIAS!!

Dedicatorias:

A mí siempre querido amigo Carlitos Hesselbart Márquez. Mil gracias por tu alegría, tu entusiasmo, tus consejos, tu energía infinita, tu apoyo cada vez que lo requeríamos y tus enseñanzas. Nos dejaste un gran ejemplo de vida. Lo bueno es que en el cielo deben estar disfrutando de tu "minimal". Estoy seguro que algún día nos encontraremos nuevamente. Un abrazo y cuida desde allá a todos tus amigos

ÍNDICE

RESUMEN	15
ABSTRACT	17
INTRODUCCIÓN	19
Aneuploidía e inestabilidad cromosómica	19
Causas de la aneuploidía	21
Causas conocidas de aneuploidías.....	22
Alteraciones en la maquinaria de la segregación cromosómica	22
Alteración en el control del ciclo celular	25
Proteínas del centrosoma.....	26
Respuesta al daño al DNA.....	27
Inestabilidad telomérica	29
Punto de monitoreo de la mitosis	29
Otras proteínas asociadas a aneuploidías	31
Consecuencias de la aneuploidía	32
Aneuploidías y cáncer	33
Epigenética en la regulación de la estabilidad cromosómica	35
Metilación del DNA	37
Establecimiento de los patrones de metilación del DNA en mamíferos.....	39
Maquinaria de la metilación del DNA.....	43
DNMT1	44
DNMT3	46
DNMT2	48
Funciones de la metilación del DNA	49

Alteraciones en la metilación del DNA en enfermedades en seres humanos.....	50
Cáncer	50
Metilación del DNA en las regiones pericentroméricas.....	52
Epigenética y estabilidad cromosómica	54
Modificación en la metilación del DNA e inestabilidad cromosómica.....	55
Factores genéticos	55
Sustancias químicas	56
Dieta y disminución en el aporte de grupos metilo.....	58
Envejecimiento.....	59
Alteraciones en la metilación del DNA y la inducción de inestabilidad cromosómica...	60
JUSTIFICACIÓN	62
RELEVANCIA E IMPACTO	62
HIPÓTESIS	63
DISEÑO EXPERIMENTAL	63
OBJETIVO GENERAL	64
Objetivos específicos.....	65
MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
Cultivo celular y tratamiento químico.....	66
Obtención de metafases	66
Técnica de inmunodetección indirecta contra 5-metilcitosinas	66
Análisis de imágenes	67
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente de los cromosomas 1, 9, 16 y Y	68
Análisis de los patrones de metilación específicos en las regiones repetidas (satélite 2) de las regiones pericentroméricas	69

Inmunofluorescencia contra las DNMTs	72
Detección de las DNMTs y α -tubulina por medio de la técnica de Western-blot	73
RESULTADOS	75
El tratamiento con 5-azaC se asoció a una pérdida progresiva en la metilación pericentromérica y a la inducción de errores en la segregación de cromosomas que contienen el satélite 2	75
Las secuencias repetidas presentan menores porcentajes de conversión con las técnicas tradicionales de bisulfito de sodio.....	79
El satélite 2, localizado en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1 y 16, muestra una desmetilación importante asociada a la inestabilidad cromosómica en células humanas adultas.....	82
La exposición a 5-azaC afecta la expresión de la DNMT3A pero no de la DNMT1 ni de la DNMT3B en linfocitos humanos.....	85
DISCUSIÓN	87
Aneuploidías	87
La desmetilación pericentromérica se asocia con errores en la segregación cromosómica	88
Desmetilación y su efecto sobre la estabilidad cromosómica	90
Técnica de bisulfito de sodio, modificaciones e impacto sobre los patrones de metilación de secuencias repetidas.....	91
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	95
Glosario.....	100
Abreviaturas	110
BIBLIOGRAFÍA	113
Anexos.....	127
I. Componentes de la segregación y la estabilidad cromosómica	127
II. Periodicidad de la distancia entre citosinas en el satélite 2	156

III. Artículo

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células somáticas adultas (linfocitos humanos) binucleadas con errores en la segregación cromosómica.	20
Figura 2. Metafase proveniente de la línea celular de cáncer colorectal SW480 mostrando el fenómeno de endorreducción 23	23
Figura 3. Unión merotética de los centrómeros 24	24
Figura 4. Anormalidades nucleares observadas en linfocitos humanos expuestos a radiación 28	28
Figura 5. Inestabilidad cromosómica en cáncer 33	33
Figura 6. Célula de cáncer de ovario con aneuploidía para el cromosoma 1 y para el cromosoma 9 34	34
Figura 7. Modificaciones epigenéticas en el DNA de mamíferos 35	35
Figura 8. Modificaciones epigenéticas en las histonas de los mamíferos 36	36
Figura 9. Generación y mantenimiento de los patrones de metilación en mamíferos durante la embriogénesis y el desarrollo temprano 40	40
Figura 10. Diseño experimental..... 64	64
Figura 11. La 5-azacitidina (5-azaC) induce hipometilación pericentromérica y errores en la segregación en linfocitos humanos 76	76
Figura 12. Patrones de Metilación en Metafase..... 77	77
Figura 13. La 5-azacitidina (5-azaC) induce errores en la segregación en linfocitos humanos .. 78	78
Figura 14. Bases químicas de la reacción de bisulfito de sodio 80	80
Figura 15. La reacción de bisulfito de sodio difiere entre secuencias únicas y secuencias repetidas en linfocitos humanos 81	81
Figura 16. DNA tratado con bisulfito de sodio mostrando conversiones incompletas en DNA de linfocitos humanos..... 81	81
Figura 17. Conversión incompleta de citosinas no-CpG en secuencias repetidas tipo Alu en linfocitos humanos y en células HeLa..... 82	82

Figura 18. La 5-azacitidina induce desmetilación del satélite 2 y es más intensa a 72 h de exposición en linfocitos humanos	83
Figura 19. Patrones de metilación del satélite 2 en todos los puntos experimentales	84
Figure 20. Expresión de las DNA metiltransferasas en linfocitos humanos expuestos a 5-azaC y sus controles	85
Figura 21. Encurvamiento de los cromosomas hacia la cromátida desmetilada, proveniente de linfocitos humanos tratados con 5-azaC	98
Figura 22. Metilación aberrante observada en linfocitos humanos después de varios ciclos de desmetilación	98

INTRODUCCIÓN

La segregación cromosómica

La transmisión del material genético es un proceso esencial para la vida. Durante el ciclo celular, la división es un momento clave, pues se garantiza la generación de una nueva célula con características idénticas a las de su progenitora. La distribución del material genético ocurre específicamente durante la mitosis, la cual consiste en la separación de las cromátidas de cada cromosoma (segregación cromosómica) y posterior migración de estas hacia los polos opuestos de cada una de las células hijas. Cualquier alteración en la adecuada segregación cromosómica puede derivar en aneuploidías, las cuales tienen una gran relevancia en la generación de anomalías fenotípicas, las cuales se asocian a múltiples enfermedades en humanos.

RESUMEN:

Título: La desmetilación del satélite 2 se asocia con la presencia de errores en la segregación de los cromosomas 1 y 16 en células somáticas adultas.

Antecedentes: La aneuploidía tiene un profundo impacto sobre la salud humana, principalmente en cáncer, infertilidad, en abortos y en síndromes congénitos, sin embargo, se desconocen profundamente las causas de esta alteración.

Hipótesis: Las células somáticas adultas presentan aneuploidías en presencia de desmetilación pericentromérica.

Materiales y Métodos: Se utilizaron linfocitos humanos, tratados con 5-azacitidina y se evaluaron los patrones de metilación en metafase, los errores en la segregación cromosómica y la aneuploidía de los cromosomas 1, 9, 16 y Y. Se llevó a cabo la reacción de bisulfito de sodio sobre secuencias repetidas contenidas de las regiones pericentroméricas (satélite 2) y evaluamos las principales DNA metiltransferasas mediante Western-blot e inmunofluorescencia.

Resultados: Encontramos que los linfocitos humanos expuestos a 5-azacitidina (5-azaC) presentaron desmetilación pericentromérica y errores en la segregación en los cromosomas con satélite 2 en sus regiones pericentroméricas (cromosomas 1 y 16), más no de cromosomas con otras secuencias metilables (cromosomas 9 y Y, con satélite 3). Mediante un abordaje de bisulfito de sodio más urea encontramos que la desmetilación de las secuencias repetidas de las regiones pericentroméricas (satélite 2) se asocia con la

aneuploidía de los cromosomas 1 y 16. Adicionalmente, identificamos que esta desmetilación se asoció con una disminución en la DNMT3A.

Conclusión: La metilación del satélite 2, localizado en las regiones pericentroméricas es importante para la prevención de los errores en la segregación de los cromosomas 1 y 16 en células somáticas adultas.

ANTECEDENTES

Aneuploidía e inestabilidad cromosómica

La alteración en el número cromosómico que conduce a un complemento cromosómico desbalanceado o que no corresponde a un múltiplo exacto del número haploide, se considera como aneuploidía.¹ Se sabe que la presencia de un contenido cromosómico diferente al haploide en las células, le puede conferir características fenotípicas dependientes del material genético ganado o perdido y por ende, le puede conferir heterogeneidad fenotípica a un grupo celular.² Desde el punto de vista clínico, la aneuploidía está presente en varias condiciones patológicas en seres humanos, como son los abortos, la infertilidad, los síndromes congénitos y en las enfermedades neoplásicas.

En el caso en que la aneuploidía ocurra en las células germinales, esta puede derivar en abortos, donde se sabe que el 50% de ellos se deben a anormalidades cromosómicas, principalmente trisomías, pero también ocurren triploidías, monosomías, tetraploidías y anormalidades cromosómicas estructurales.³

Si este fenómeno ocurre en células somáticas adultas, se pueden activar mecanismos que llevan a la célula a apoptosis,⁴ sin embargo, si persiste la aneuploidía, este fenómeno puede contribuir a la generación de heterogeneidad celular, la cual está asociada a la inducción de procesos neoplásicos y en células cancerosas establecidas, permite la aparición de eventos como la quimioresistencia.⁵ Sabemos que la aneuploidía influye sobre el comportamiento clínico de las enfermedades neoplásicas, se asocia con un menor grado de diferenciación, contribuye a un pobre pronóstico,⁶ y por lo tanto,

sugiere una enfermedad más severa.⁷ Estudios recientes, prospectivos, de 10 años de seguimiento, han evidenciado que en cáncer cervico-uterino, la presencia de aneuploidía es un mejor factor pronóstico que la presencia de ganglios linfáticos metastásicos, lo que pudiera convertir a la aneuploidía en un marcador temprano de malignidad.⁸ Sin embargo, también se ha planteado que la aneuploidía pueda actuar de forma tanto oncogénica como supresora de tumores, dependiendo de los tejidos afectados, haciendo más complejo el análisis de este fenómeno.⁹

Por otra parte, recientemente también se ha planteado a la aneuploidía como un proceso que contribuye a la aparición de deterioro cognitivo e incluso a neuropatías asociadas al envejecimiento.¹⁰

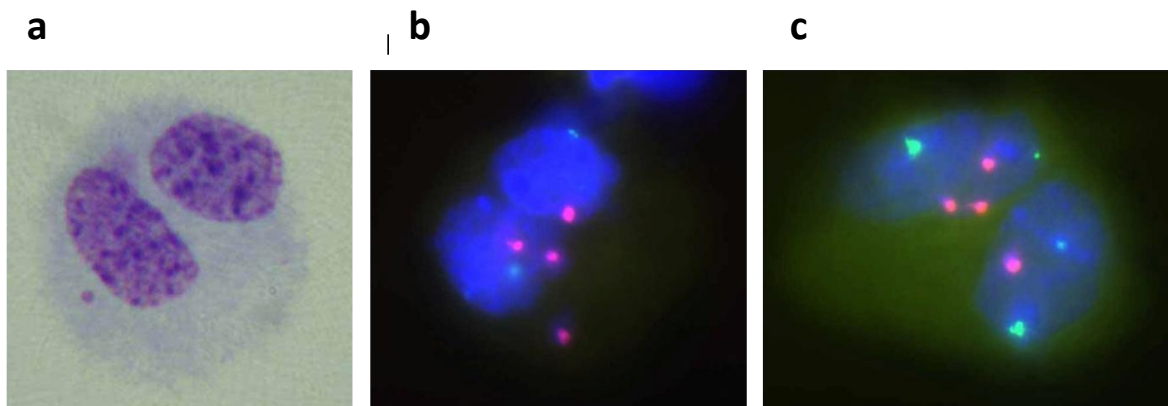


Figura 1. Células somáticas adultas (linfocitos humanos) binucleadas con errores en la segregación cromosómica. a. Tinción con hematoxilina y eosina. b. FISH contra los cromosomas 16 (rojo) y Y (verde). c. Fenómeno de no-disyunción del cromosoma 1 (rojo). El cromosoma 9 se observa en verde.

Aunque la aneuploidía es tan importante, tanto desde el punto de vista celular, como clínico, las causas y los procesos subyacentes en la generación de las células aneuploides son poco conocidos, y su conocimiento resultaría vital para diseñar

estrategias que eviten o prevengan que ocurra este fenómeno, así como sus consecuencias.

Causas de la aneuploidía

A pesar de que la aneuploidía y los errores en la segregación cromosómica se encuentran presentes en alrededor del 90% de los tumores sólidos (lo cual se ha corroborado recientemente en estudios genómicos masivos),¹¹ las causas de esta anomalía son en su mayoría desconocidas. Se han sugerido como causas de la aneuploidía a alteraciones en los genes encargados de controlar la segregación cromosómica, pero también se cree que los errores en el ensamblaje del cinetocoro, en los centrosomas y las mutaciones juegan un papel fundamental en la generación de este fenómeno, entre otras.¹² Alteraciones en las marcas epigenéticas en estructuras claves para la segregación cromosómica, como las regiones pericentroméricas y el centrómero no han sido estudiadas a profundidad y pueden ser de gran relevancia, dado el papel que juegan en el establecimiento del huso mitótico y del cinetocoro.¹³

Muchos trabajos han sugerido la posibilidad de una causa genética de la aneuploidía,¹⁴ sin embargo, los estudios no han sido concluyentes. En la mayoría de los genes involucrados en la segregación cromosómica no se han reportado mutaciones,¹⁴ pero sí una expresión génica alterada,¹⁵ por lo cual se han planteado nuevas hipótesis, entre ellas el llamado “Origen Epigenético de la Aneuploidía”.¹ Una cuestión importante a mencionar, es que el genoma humano y el de muchas especies, se organiza en múltiples niveles, que van desde el nucleosoma hasta los cromosomas, los cuales son más que una

simple organización de genes. De hecho, el genoma humano contiene una gran cantidad de DNA repetido que forma grandes arreglos, los cuales son incapaces de codificar proteínas, como son las secuencias satélites, las secuencias repetidas (*Alu*, LINE, SINE, etc.), los centrómeros, etc., y que pueden llegar a jugar un papel muy importante en la estabilización y organización del genoma, y están implicados en la adecuada segregación cromosómica y en la prevención de la inestabilidad genómica.

La inducción de aneuploidía ha sido asociada también con defectos en la segregación cromosómica, resultante de alteraciones en el huso mitótico, en la amplificación de los centrosomas, en la no-separación de cromátidas y/o por inestabilidad en los telómeros, entre otros.¹⁶

Por otra parte, otros investigadores han sugerido que un punto de monitoreo disfuncional sea la causa de la inadecuada distribución de cromosomas a las células hijas en las células cancerosas. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que, en líneas celulares con inestabilidad cromosómica importante, existe un retraso importante en la mitosis y en la anafase cuando existe una mala alineación en la placa metafásica, lo que sugiere un punto de monitoreo de mitosis funcional en este tipo de células.¹⁷

Causas conocidas de aneuploidías

Alteraciones en la maquinaria de la segregación cromosómica

La aneuploidía puede ocurrir como resultado de divisiones aberrantes producto de husos multipolares. Este proceso ha sido planteado que puede ser causado también por

fenómenos de poliploidización, la cual puede provenir de defectos en la citocinesis, fusiones célula-célula, o células que se saltan la mitosis (endorreduplicación) (Figura 2).¹⁸

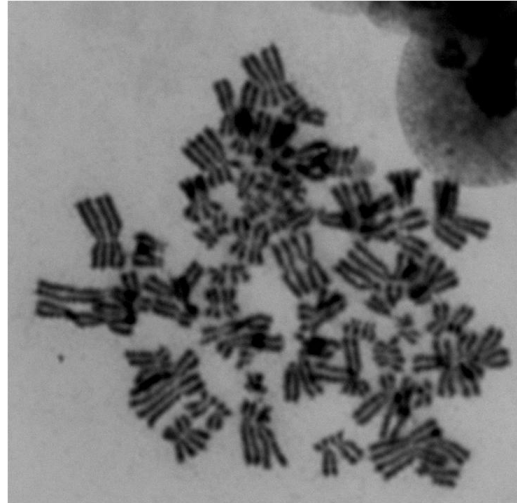


Figura 2. Metafase proveniente de la línea celular de cáncer colorectal SW480 mostrando el fenómeno de endorreduplicación.

La poliploidización puede ocurrir por defectos en la duplicación, en la maduración o en la segregación de los centrosomas.¹⁹ En la gran mayoría de los casos, la división de celular con husos mitóticos multipolares produce células hijas aneuploides. Dentro de las causas genéticas subyacentes, ya sea de la poliploidización o de la generación de defectos en el ciclo del centrosoma, se han descrito amplificaciones en STK15/aurora cinasa A,²⁰ así como inactivaciones en p53, RB y BRCA1.²¹⁻²²

Los defectos en la cohesión de los cromosomas también pueden contribuir a la aneuploidía en células somáticas. La resolución de la cohesión de las cromátidas al inicio de la anafase depende de la separasa, una proteasa que inhibe a la securina (también identificada como PTTG119). La inactivación de la securina u homólogos de la separasa en

levaduras de gemación (Pds1p y Esp1p) o de fisión (Cut2p y Cut1p) resultan en pérdidas cromosómicas.²³⁻²⁴ De forma interesante, las células cancerosas en las cuales se ha quitado la securina, muestran altos niveles de inestabilidad cromosómica y de forma interesante, las células que sobre-expresan securina causan tumores en ratones desnudos.²⁵

La aneuploidía también puede ocurrir por la unión inapropiada de los cromosomas a los husos mitóticos. Las uniones merotéticas, en la cual un cinetocoro se une simultáneamente a los microtúbulos que provienen de ambos polos (Figura 3), puede ser una causa importante de aneuploidía.²⁶ Este tipo de uniones aberrantes se han observado al inhibir los mecanismos que corrigen los errores en la unión entre los microtúbulos y los cromosomas, que incluyen modificaciones en la aurora cinasa B, la borealina, la survivina y proteínas de la placa interna del centrómero (INCENP).²⁷

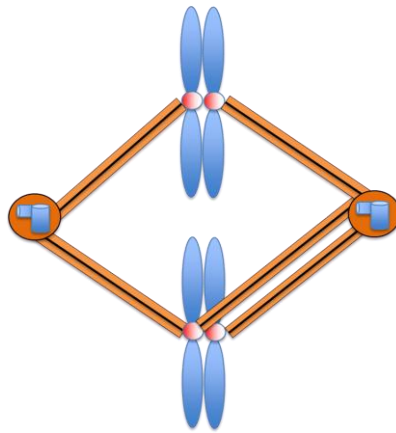


Figura 3. Unión merotética de los centrómeros.

En cáncer colorectal, donde cerca del 90% de los tumores muestran inestabilidad cromosómica, las mutaciones en APC pueden ser una causa importante de

aneuploidías.²⁸⁻²⁹ Las formas truncadas de APC pueden generar dos efectos: Pueden fallar en degradar la β -catenina (un componente de la vía Wnt),³⁰ pero también pueden causar inestabilidad cromosómica afectando la estabilidad de las uniones cromosoma-microtúbulo.³¹ Esto puede conducir a errores en la segregación cromosómica durante la anafase. Paradójicamente, las líneas celulares de cáncer colorectal con APC mutado presentan cariotipos estables,³² lo que implica que existe un punto de monitoreo funcional para detener el avance prematuro a la anafase, así como uniones adecuadas para apagar el punto de monitoreo e iniciar la anafase. Las uniones cromosoma-microtúbulo inestables que producen un punto de monitoreo crónicamente activado pueden provocar muerte celular a través de una vía que no está muy definida, pero que en algunos casos, pueden derivarse en apoptosis.³³⁻³⁴

Alteración en el control del ciclo celular

El gen de susceptibilidad al retinoblastoma (*RB1*) es un regulador clave de la proliferación celular y participa principalmente en la entrada o salida del ciclo celular en G1/S.³⁵ Este gen fue uno de los primeros genes supresores identificados y su producto (pRB) se encuentra inactivado en la mayoría de cánceres,³⁶ en algunos casos, de forma epigenética.³⁷ Se sabe que en el retinoblastoma, la progresión de la enfermedad se correlaciona con la presencia de aneuploidía y de inestabilidad genómica.³⁸ Se ha probado que los cultivos celulares Rb-/- o modelos celulares con Rb inactivado, presentan un elevado número de células aneuploides y que tienden a aumentar en ploidía a medida que las células se dividen.³⁹ Por otra parte, estudios globales realizados para identificar las vías que conducen a la inestabilidad cromosómica en cáncer han encontrado que 10 de 20

genes con mayor correlación con inestabilidad cromosómica son blancos claves de E2F y son marcadores subrogados de la inactivación de pRB.⁴⁰ Recientemente, Manning y colaboradores, han demostrado que la depleción de pRB en células epiteliales primarias no transformadas, induce errores en la segregación cromosómica a niveles comparables con los de un tumor con inestabilidad cromosómica. Este cambio ocurrió a pesar de tener un punto de monitoreo intacto y centrosomas normales. Este mismo trabajo demostró que la ausencia de pRB induce descondensación centromérica y cohesión de las cromátidas hermanas, generando una disfunción centromérica durante la mitosis. Las células aneuploides resultantes se mantuvieron viables y capaces de tener divisiones celulares posteriores.³⁸ Estos resultados pudieran explicar porque las células con mutaciones en RB presentan inestabilidad cromosómica.

Otros estudios usando fibroblastos embrionarios de ratón, donde se ha inactivado tanto a RB1, como a p107 y p130 (proteínas de control de G1/S), muestran un arresto prolongado en G2. Sin embargo, al adicionar sustancias mutagénicas, se ha encontrado que estas células muestran gran cantidad de daño genómico, como rupturas de cromátidas, defectos en la cohesión de cromátidas, que conducen a aneuploidía en las generaciones subsecuentes.⁴¹

Proteínas del centrosoma

Proteínas del centrosoma, como Aurora A, pueden contribuir a la aneuploidía y usualmente se sobre-expresan en líneas celulares de cáncer. La sobreexpresión de Aurora A se asocia con la amplificación del centrosoma y la posterior generación de células

poliploides que contienen múltiples centrosomas. Esta misma sobreexpresión también genera errores en los puntos de monitoreo, que derivan en mitosis arrestadas, células con citocinesis incompleta y están relacionados con la resistencia al taxol asociada a multinucleación.⁴²

Estudios con lesiones pre-invasivas han mostrado también defectos en el centrosoma, además de anormalidades en el huso mitótico, correlacionadas con una alta tasa de progresión a cáncer. Igualmente, lesiones de bajo grado se han asociado con una baja prevalencia de defectos en el centrosoma. Por otra parte, amplificaciones en el centrosoma han sido detectadas en células de carcinomas *in situ*, indicando que estas alteraciones pueden ocurrir tempranamente en el proceso de transformación neoplásica.⁴³ La amplificación del centrosoma puede estar asociada con proteínas como el complejo Cdk2/ciclina E, el cual es inhibido por p21. Así, la sobreexpresión de la ciclina E o la inhibición de p21 puede resultar en la amplificación del centrosoma⁴⁴ y por lo tanto con alteraciones en la segregación cromosómica.

Respuesta al daño al DNA

Las alteraciones en la respuesta al daño al DNA y a los rompimientos de doble cadena pueden conducir a alteraciones genéticas o a inestabilidad cromosómica, como por ejemplo, después de la exposición a radiación ionizante (Figura 4).

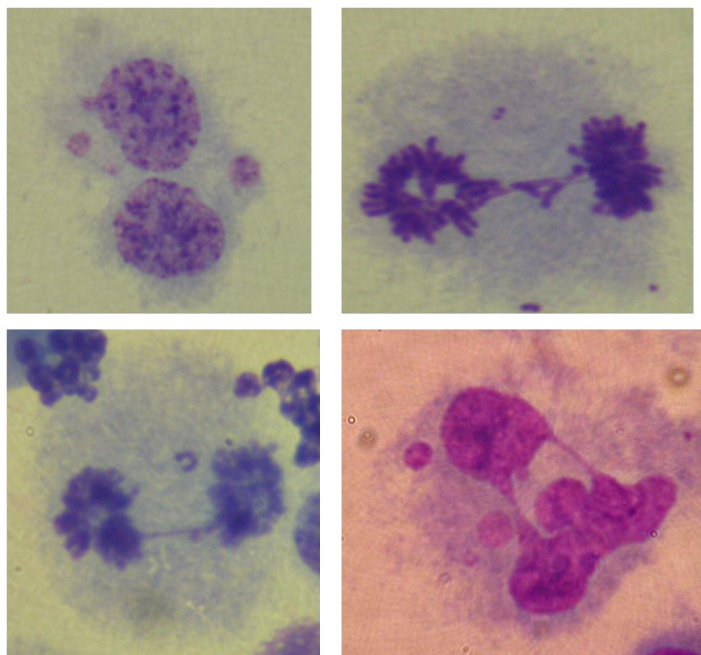


Figura 4. Anormalidades nucleares observadas en linfocitos humanos expuestos a radiación ionizante.

Se sabe que defectos en la respuesta celular al rompimiento de doble hélice pueden resultar en mutaciones genéticas, amplificaciones génicas y aberraciones cromosómicas, las cuales están asociadas con la generación de células cancerosas.⁴⁵ Por ejemplo, la activación de ATR (un gen que codifica para una proteína que pertenece a la familia de cinasas PI3/PI4) culmina en arresto del ciclo celular, apoptosis y en alteraciones en la reparación del DNA. Se ha remostrado que ATR es un factor crítico en el mantenimiento de la integridad cromosómica y su inhibición conduce a inestabilidad cromosómica y a la sobreexpresión de sitios frágiles. ATM y ATR funcionan como moléculas clave en la respuesta al daño al DNA, con una fuerte influencia sobre el control de los puntos de monitoreo del ciclo celular, sobre la reparación del DNA, sobre el mantenimiento de los telómeros y en la apoptosis.⁴⁶ Muchos otros genes específicos de

respuesta al daño al DNA y mutaciones heredadas en genes como en la histona H2AX,⁴⁷ mre11A, CHEK1, BRCA1 y 2, han sido asociados con la generación de inestabilidad cromosómica y se han demostrado que causan predisposición a la generación de tumores mediante la iniciación de este fenómeno.⁴⁸

Inestabilidad telomérica

Algunos experimentos sugieren que los telómeros cortos juegan un papel importante en la generación de inestabilidad cromosómica, como ha ocurrido en células inmortalizadas negativas para telomerasa, los cuales tienden a desarrollar poblaciones celulares tetraploides.⁴⁹ Por otra parte, un trabajo realizado por Gonzalo y colaboradores, ha mostrado un importante papel de las regiones subtelo méricas en la estabilidad del telómero y han encontrado que modificaciones en estas regiones están relacionadas con fenómenos de inestabilidad cromosómica.⁵⁰

Recientemente, Martínez-A y colaboradores, han discutido esta hipótesis clásica y han postulado que la mayoría de los carcinomas (los tumores más frecuentes) presentan rompimientos a nivel de las regiones pericentroméricas, que pudieran ser “capturadas” por los telómeros, y que solamente un menor porcentaje de fusiones cromosómicas son atribuibles a erosiones teloméricas o a rupturas azarosas.⁵¹

Punto de monitoreo de la mitosis

Las alteraciones en el punto de monitoreo de mitosis en células cancerosas han sido demostradas *in vitro*, en donde se sabe que estas células son incapaces de mantener

un arresto mitótico cuando se exponen a sustancias que afectan el huso mitótico, lo que resulta en índices mitóticos bajos cuando se comparan con células diploides estables.^{14,52} Las exploraciones exhaustivas de mutaciones en los genes asociados al punto de monitoreo de mitosis, han fallado en demostrar su presencia en más de 100 líneas celulares de cáncer,⁵³ así como en tumores,⁵⁴ por lo que se cree, que si existe alteración en esta alteración, pudiera deberse a otros factores, como por ejemplo, alteraciones en la expresión de estos genes.⁵⁵

Se sabe que en varios tipos de tumores, existe una elevada expresión de Bub1 y en ocasiones, se correlaciona con un pobre pronóstico. Recientemente Ricke, y colaboradores, demostraron que la sobreexpresión de Bub1 en ratones conduce a aneuploidías con números cromosómicos cercanos al número diploide, así como a la formación de tumores. Dicha alteración ocurre por errores en el alineamiento y por rezago cromosómico. La sobreexpresión de Bub1 condujo a una actividad aberrante de Bub1 cinasa y a la activación de la Aurora B cinasa. Al suprimir la actividad de la Aurora B cinasa, ya sea de forma farmacológica o por sobreexpresión de BubR1, se corrigen los errores en la segregación cromosómica inducidos por la sobreexpresión de Bub1. De forma interesante, los ratones transgénicos que sobre-expresan Bub1 desarrollaron varios tipos de tumores espontáneos y mostraron una mayor formación de linfomas dependientes de Myc. Este grupo planteó entonces que Bub1 tiene propiedades oncogénicas y sugirió que Aurora B es un blanco muy importante, a través del cual Bub1 puede conducir a la aneuploidización y a la tumorigenesis.⁵⁶

La sobreexpresión de la Aurora cinasa A (AURKA) se asocia de forma importante con la transformación neoplásica en varios tipos de tumores y se sabe que su expresión desregulada conduce a inestabilidad cromosómica y posiblemente también contribuya a la progresión del cáncer.⁵⁷ Scagliotti y colaboradores, evaluaron la expresión de AURKA en muestras de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas y lo compararon contra el tejido adyacente no canceroso. Se encontró que la expresión de AURKA se encontraba aumentada en los tejidos tumorales comparados con el tejido pulmonar sano. Dicho aumento ocurrió principalmente en los cánceres moderada y pobremente diferenciados, así como en los adenocarcinomas, comparado con el tipo histológico bronquioalveolar no invasivo. Esta diferencia no tuvo impacto sobre la supervivencia de los pacientes.⁵⁷

A partir del papel tan importante que juega AURKA en el control y la progresión del ciclo celular, se han desarrollado inhibidores de AURKA que pueden impedir el avance en el ciclo celular de las células cancerosas.⁵⁸

Otras proteínas asociadas a aneuploidías

Otros genes que controlan la segregación de los cromosomas, como hZW10, ILCH y hROD, han sido identificados como genes que juegan un papel importante en la estabilización de estructuras implicadas en la segregación cromosómica y su disfunción pudiera contribuir al proceso de aneuploidización.⁵⁹

Consecuencias de la aneuploidía

En los seres humanos, la aneuploidía tiene diferentes consecuencias dependiendo del tipo celular afectado. Si las células embrionarias llegan a ser afectadas por aneuploidías, esto puede tener como consecuencia abortos espontáneos. De hecho, se estima que cerca del 20% de los abortos espontáneos son secundarios a aneuploidías, los cuales ocurren principalmente en el primer trimestre del embarazo y en mujeres mayores a 35 años. Embriones aneuploides pueden llegar a ser individuos viables cuando se afectan los cromosomas sexuales y cromosomas como el 13, el 18 y el 21, pero presentan defectos físicos y funcionales importantes tanto al nacimiento como después de este, como infertilidad, retardo mental y muerte temprana en la mayoría de los casos. Los embriones que contienen aneuploidías que involucran a cromosomas con una mayor cantidad de genes, como el cromosoma 1, el 2, el 11 u otros, no pueden llegar a generar individuos viables, probablemente por el desbalance génico tan severo que ocurre al interior de las células. Fenómenos similares de asociación de aneuploidías y viabilidad de los organismos, dependientes de la cantidad de genes involucrados en los cromosomas afectados, se han reportado también en modelos animales no humanos.⁶⁰

Si la aneuploidía ocurre en células somáticas, esta puede derivarse en apoptosis⁶⁰ o en la supervivencia de las células en un contexto fenotípico desbalanceado, dependiente de las regiones ganadas o perdidas.² Se sabe que la presencia de aneuploidías e inestabilidad cromosómica está fuertemente asociada con la generación, agresividad y resistencia de las células cancerosas.⁶¹

Aneuploidías y cáncer

Los tumores sólidos pueden ser altamente aneuploides, con cariotipos que varían entre 40 y 60 cromosomas, pero ocasionalmente exceden los 70 cromosomas.¹⁷ En algunos casos, estos números elevados de cromosomas se segregan de forma adecuada y el cariotipo muestra pocas variaciones en el tiempo.¹⁸ En otros casos, las células aneuploides son genéticamente inestables y frecuentemente sufren errores en la segregación de cromosomas completos (Figura 5-6).⁶² Las modificaciones en el contenido cromosómico de las células causa cambios fenotípicos que contribuyen a la evolución del tumor y contribuyen de forma importante a la quimioresistencia.² De la misma manera, se sabe que las células metastásicas presentan cariotipos diferentes al observado en los tumores primarios.⁶³

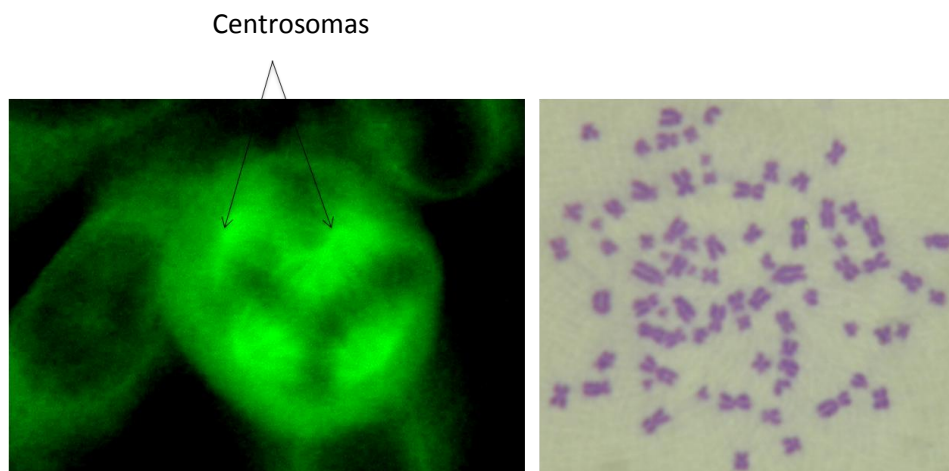


Figura 5. Inestabilidad cromosómica en cáncer. Izquierda: Huso mitótico multipolar. Célula HeLa transfectada con tubulina acoplada a GFP (del inglés, *Green Fluorescent Protein*). Fotografía cordialmente donada por el M. en C. Alejandro López-Saavedra. Derecha: Metafase de células HeLa conteniendo 72 cromosomas.

Estas alteraciones en la segregación cromosómica en las células tumorales aneuploides con inestabilidad cromosómica sugieren que existen alteraciones en la fidelidad de la mitosis y se presume también que los errores en la segregación cromosómica causan niveles elevados de aneuploidía en las células tumorales.¹⁶ Los defectos tanto en el ensamblaje del huso mitótico (husos bipolares) como en el punto de monitoreo de mitosis se han identificado en algunas líneas celulares con inestabilidad cromosómica.^{14,64} Como lo hemos mencionado previamente, las causas de la inestabilidad cromosómica y de la aneuploidía son desconocidas, sin embargo, desde nuestro punto de vista, cualquier elemento involucrado en la maquinaria de la segregación cromosómica, como de la estabilidad cromosómica puede jugar algún papel en el origen de la aneuploidía.

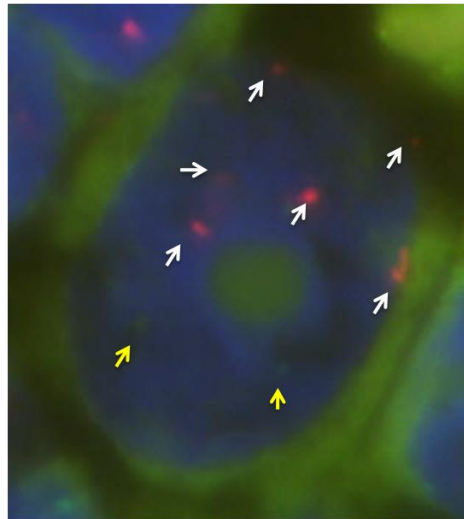


Figura 6. Célula de cáncer de ovario con aneuploidía para el cromosoma 1 (rojo) (flechas blancas) y para el cromosoma 9 (verde) (flechas amarillas). Sondas dirigidas contra las regiones pericentroméricas.

Epigenética en la regulación de la estabilidad cromosómica

El término epigenética fue acuñado por Conrad Waddington en la década de los 40's para tratar de explicar porqué las variaciones genotípicas no siempre conducían a cambios fenotípicos y porqué los genes interactúan con el ambiente para modificar un fenotipo. Hoy por hoy, su definición más usada tiene que ver con los cambios fenotípicos que no dependen de la secuencia génica,⁶⁵ definición que se olvida del efecto que tienen las modificaciones epigenéticas sobre la gran mayoría del genoma, como las regiones de heterocromatina, los retrotransposones, etc. A partir de la definición clásica de epigenética, esta se divide en dos grandes modificaciones: La metilación del DNA (Figura 7) y las modificaciones covalentes de las histonas (Figura 8),⁶⁵ de las cuales abordaremos principalmente la metilación del DNA, que fue la modificación epigenética estudiada en el transcurso de este proyecto. Otras modificaciones, como la hidroximetilcitosina, han sido descritas, pero se sabe poco de ellas y se mencionará más adelante (Figura 7).

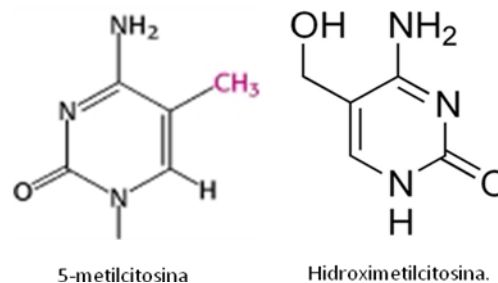


Figura 7. Modificaciones epigenéticas en el DNA de mamíferos.

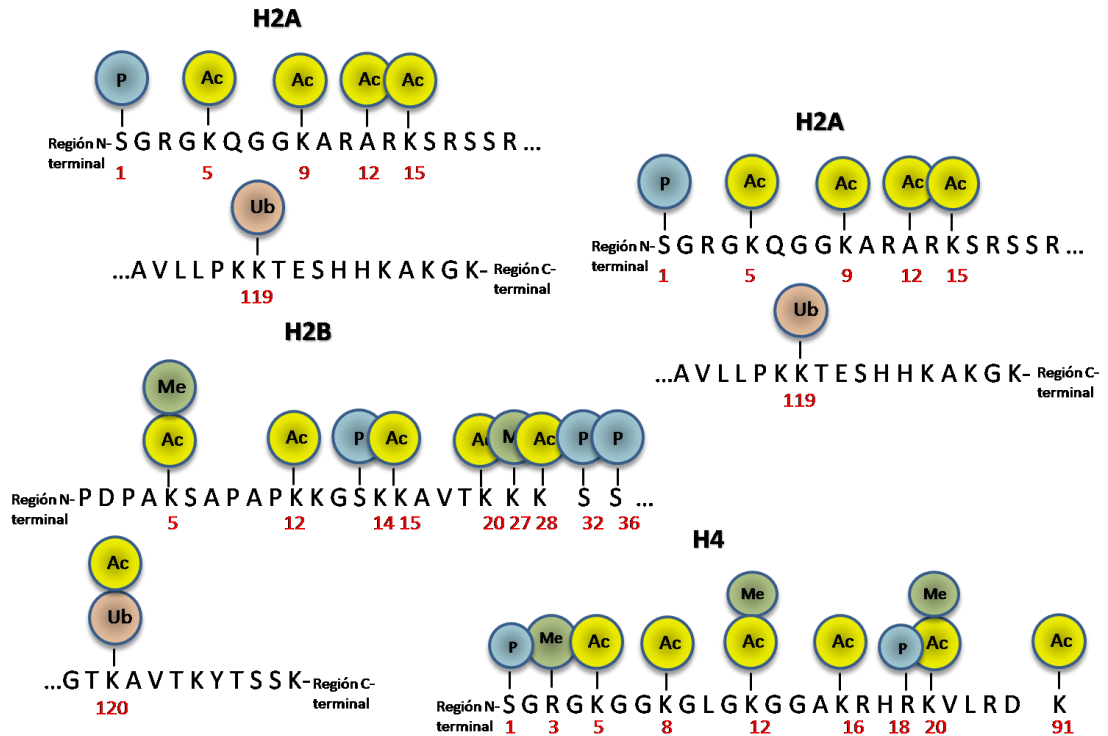


Figura 8. Modificaciones epigenéticas en las histonas de los mamíferos. P=Fosforilación, Me=Metilación, Ac=Acetilación, Ub=Ubiquitinación.

Una definición más completa, desde el punto de vista molecular y mecánico de la epigenética, pudiera ser la propuesta por Allis y colaboradores, como: “la suma de todas las alteraciones en la cromatina que colectivamente establecen y propagan los diferentes patrones de expresión génica (transcripción) y silenciamiento en el mismo genoma”.⁶⁶

Una modificación epigenética descrita recientemente es la 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) (Figura 7), la cual es producto de la modificación de la 5-metilcitosina por las oxigenasas dependientes de Fe(II) y 2-oxoglutarato, TET1, TET2 y TET3, modificación que ha sido detectada en neuronas y que al parecer juega algún papel en la auto-renovación y en la especificación de masa en las células embrionarias.⁶⁷

Otros factores de los cuales existe evidencia que son capaces de inducir o interactuar con la maquinaria epigenética son algunos ncRNAs (RNAs no codificantes), microRNAs, piRNAs, etc., pero evidentemente son mecanismos, no modificaciones epigenéticas de las células, por lo que no profundizaremos en ellos.

Todos los factores epigenéticos tienen como función el establecimiento y mantenimiento de los diferentes estados de organización de la cromatina en todo el genoma, como por ejemplo la formación de la eucromatina y la heterocromatina e intervienen en prácticamente todos los procesos celulares, tanto fisiológicos como patológicos.

Metilación del DNA

La metilación del DNA es una modificación covalente que ocurre en sitios específicos. En bacterias, se asocia con la identificación de hebras particulares y también con la distinción entre DNA replicado y no replicado y ocurre principalmente en adeninas, pero también en citosinas. En eucariontes, la metilación del DNA ocurre específicamente en las citosinas, a nivel del carbono 5 y se asocia con múltiples funciones, entre las que se encuentran el control de la transcripción, la inactivación de secuencias de retrotransposones, la regulación de la impronta génica, el silenciamiento del cromosoma X inactivo, etc., todas ellas asociadas a la compactación de la cromatina y a la represión transcripcional. Recientemente se ha encontrado, mediante abordajes epigenómicos, que la metilación puede estar presente no sólo en regiones transcripcionalmente silentes, como se ha comentado previamente, sino que por el contrario, puede enriquecerse en el

cuerpo de los genes en varios tipos celulares, mostrando una mayor metilación los exones que los intrones, acompañando también una clara depleción en los límites exón-intrón, lo que ha postulado que la metilación del DNA cumple alguna función en el procesamiento transcripcional de los genes.⁶⁸

En organismos mamíferos, la metilación del DNA ocurre a nivel del carbono 5 de las citosinas, y ocurre en el 2-7% de estas. La mayoría de los grupos metilo en células somáticas adultas se encuentran en dinucleótidos CG y alrededor del 70% de los sitios CG se encuentran metilados⁶⁹ y de hecho, ambas citosinas de esta secuencia palindrómica se encuentran metiladas.

Existen regiones del genoma, denominadas islas CpG, las cuales se presentan con una concentración de CGs superior al resto del genoma. Estas islas se encuentran frecuentemente en las regiones 5'- de los genes y usualmente no están metiladas. Se sabe que cerca del 60-70% de los genes tienen islas CpG en sus promotores.⁷⁰ En caso de metilarse de forma aberrante, se sabe que puede ocurrir un efecto de silenciamiento sobre estos genes.⁷¹ Este mecanismo al parecer también está presente en las regiones promotoras de algunos microRNAs.⁷² Estudios recientes han asociado a estas islas CpG con proteínas como Cpf1, que al parecer, protegen de la metilación a estos sitios y por lo tanto permiten una actividad transcripcional persistente en dichos genes.⁷³

Estudios recientes realizados por el grupo de Feinberg y colaboradores han mostrado también que existen regiones cercanas a las islas CpG, las cuales denominó "*CpG shores*", o "bordes CpG", las cuales pueden metilarse de forma diferencial y se

asocian a diferenciación tisular y de tumores. Estas regiones se encuentran adyacentes a las islas CpG y al parecer su estado de metilación está directamente relacionado con la expresión de los genes que se encuentran río abajo, de forma más importante que la metilación de las islas CpG.⁷⁴

Establecimiento de los patrones de metilación del DNA en mamíferos

La metilación del DNA es esencial para el desarrollo normal de los mamíferos, como es evidenciado en los modelos animales *knock-out* para cualquiera de las DNA-metiltransferasas (DNMTs), los cuales mueren tempranamente durante el desarrollo embrionario.⁷⁵

Los genomas de los organismos mamíferos están metilados en sitios específicos, resultando en lo que se ha denominado un “patrón de metilación”, que contribuye de forma muy importante a la organización de la cromatina y a patrones de expresión específicos de cada línea celular. Este patrón lleva información epigenética y se conserva (relativamente) entre individuos de la misma especie y dentro de sus linajes celulares, pero es diferente entre los tipos celulares del mismo organismo.⁷⁶ Existe una denominación diferente para la metilación de grandes regiones y dominios de DNA, que involucran desde cientos a miles de pares de bases, la cual se ha denominado como “nivel de metilación”, dada su contribución en la metilación global de un grupo celular o tejido.

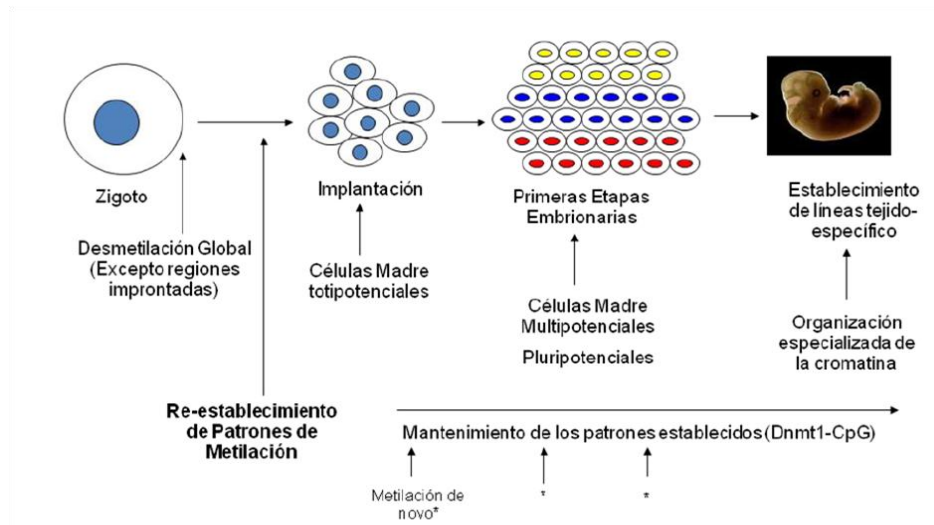


Figura 9. Generación y mantenimiento de los patrones de metilación en mamíferos durante la embriogénesis y el desarrollo temprano.

En mamíferos, se sabe que ocurre una reprogramación de la información epigenética en las células germinales y en el embrión previo a la implantación (Figura 9).⁷⁷

En comparación con la metilación de los genomas de las células somáticas, los espermatozoides maduros y los óvulos en mamíferos están altamente metilados.⁷⁸ Durante la maduración de las células germinales masculinas y femeninas, un ciclo de reprogramación ocurre tempranamente en el desarrollo de estas, notablemente un proceso de desmetilación global. La re-metilación de la línea germinal tiene lugar tardíamente en la gametogénesis. Esta reprogramación es necesaria para borrar marcas epigenéticas adquiridas, las cuales pueden haberse modificado por factores ambientales y por el envejecimiento, y que pudiera interferir en la renovación de los organismos.⁷⁹

En la fertilización, se sabe que también ocurre un abatimiento de los patrones de metilación del DNA existentes para que ocurra un nuevo ciclo de desarrollo. Dicha

desmetilación en los cigotos se evaluó usando anticuerpos anti-5-metilcitosina, los cuales mostraron que inicialmente ocurre una desmetilación de uno de los juegos de cromosomas antes de los primeros clivajes del embrión.⁸⁰ El origen de esta diferencia se descubrió examinando el cigoto previo a la fusión de los pronúcleos paterno y materno.⁸¹ Inicialmente, tanto el genoma materno como el paterno se encuentran metilados de forma equivalente. Unas pocas horas después de la fertilización, ocurre una pérdida dramática de la metilación exclusivamente en el genoma paterno de forma activa, ya que no existe replicación en este periodo. Justo después de la fertilización, también se reemplazan las protaminas por histonas y ocurre la desmetilación activa del genoma, la cual se completa antes de que comience la replicación del DNA.⁸² Se cree que más de la mitad de la metilación se pierde durante este periodo, para remetilarse de forma dependiente de las DNMT3A y 3B.⁶⁶ Dicha desmetilación hoy se sabe que ocurre, al menos en parte, por la vía de reparación por escisión de bases, donde la familia de deaminasas AID/Apobec convierten las 5-metilcitosinas a timinas, seguido por una reparación de malos alineamientos G/T por la DNA glicosilasa MBD4 o TDG.⁸³

El genoma materno también sufre una desmetilación global. Dicha desmetilación del genoma materno ocurre, al parecer, por un mecanismo pasivo, el cual resulta probablemente por la falta de metilación de mantenimiento durante los primeros ciclos de replicación celular, asociada a la ausencia en núcleo de la DNMT1 (la llamada hemimetilasa o enzima de mantenimiento).⁸⁴ La desmetilación de la fertilización ocurre en genes *“housekeeping”* o genes constitutivos y en secuencias repetitivas a través de todo el

genoma. De manera muy interesante, los genes improntados y las secuencias retrovirales están exentas de este proceso de desmetilación.⁸⁵

Luego, se inicia una cascada de re-metilación en el DNA de diferentes extensiones al tiempo de la implantación, dependiendo de las líneas que van a ser embrionarias o extraembrionarias.⁸⁶ Esta restauración de la metilación es dependiente de la metilación *de novo* y posteriormente mantenida por la DNMT1 en las líneas somáticas (Figura 9).

Un estudio muy interesante de análisis del metiloma en células madre no diferenciadas y su respectiva contraparte diferenciada, publicado por Lister y colaboradores, han mostrado que antes de la diferenciación, ocurre una intensa metilación en un contexto no-CG, la cual está aumentada en el cuerpo del gen y además existe una depleción de esta marca epigenética en sitios potenciadores o “*enhancers*” y sitios de unión a proteínas en células madre embrionarias. Dicha modificación disminuye posterior a la diferenciación, la cual está asociada a una disminución en las enzimas denominadas metiladoras *de novo*, como la DNMT3A, -3B y el factor regulador, la DNMT3L.⁸⁷

Los patrones de metilación muestran una aparente constancia al evaluar las células somáticas, sin embargo, ocurren ciertos cambios locales en secuencias específicas. Por ejemplo, las islas CpG de uno de los cromosomas X llegan a metilarse durante la inactivación.⁸⁸ Este proceso es esencial para evitar escapes en el silenciamiento del cromosoma inactivado. La pérdida programada de metilación del DNA durante la diferenciación también está implicada en la activación de ciertos genes. Por ejemplo, el

gen de la interleucina-2 (en ausencia de replicación) pierde metilación CpG en su promotor de tal manera que llega a expresarse durante la diferenciación de células T.⁸⁹ Esta desmetilación es esencial para la activación del gen y es una parte importante dentro del programa de diferenciación de las células T.

Maquinaria de la metilación del DNA

Aunque la maquinaria necesaria para que ocurra y se mantenga la metilación del DNA pudiera incluir a las modificaciones pos-traduccionales de las histonas, siRNAs (del inglés, *short interference RNAs*), RNAs no codificantes (ncRNAs) y algunas otras proteínas. Dado el enfoque de este estudio, nos concentraremos únicamente en las enzimas encargadas de la transferencia del grupo metilo a las citosinas.

Las DNA-metiltransferasas, o DNMTs, catalizan la transferencia de grupos metilo al DNA a partir de SAM (S-adenosil-metionina), el cual se considera el donador universal de grupos metilo.⁹⁰ Los mamíferos expresan tres familias de DNMTs: la DNMT1, -2 y -3.⁷⁹ Todas ellas usan SAM como fuente de grupo metilo, siendo transferido al carbono 5 de las citosinas en el DNA. Todas las DNMTs de mamífero presentan una estructura común del dominio catalítico, el cual se asemeja a las metiltransferasas de procariontes y difieren principalmente en su región regulatoria N-terminal.

DNMT1

La DNMT1 se caracteriza por un gran dominio N-terminal, con funciones regulatorias y un dominio pequeño C-terminal catalítico. Este dominio regulatorio presenta diferentes *motifs* que le confieren la habilidad a esta enzima de interactuar con otras proteínas, como el represor transcripcional Dmap1,⁹¹ y con PCNA⁹² en focos de replicación y contiene un dominio de unión rico en cisteína similar al visto en las proteínas HRX.⁹³ Esta región estaría involucrada en la interiorización de la enzima al núcleo, así como en la regulación catalítica. Esta enzima se localiza en los focos de replicación durante la fase S y es excluida del núcleo y almacenada en el citoplasma en zigotos.⁸⁴ La función vital de la DNMT1 se demuestra en ratones deficientes para esta, los cuales mueren a mitad de la gestación con niveles significativamente reducidos de metilación en el DNA.⁹⁴

La DNMT1 también está involucrada en el control del ciclo celular, interactuando con PCNA, con la orquilla de replicación y con p21^{WAF1}, un inhibidor de ciclinas dependientes de cinasas.⁹² La región N-terminal también interactúa con Rb y reprime la transcripción de promotores de respuesta, como E2F1.⁹⁵ También la DNMT1 puede interactuar con metiltransferasas de histonas y con proteínas que se unen al DNA, con HP1 y con las DNMT3A y DNMT3B.⁹⁶ Todas estas interacciones sugieren una complicada red de conexiones entre esta enzima y muchas proteínas involucradas en la regulación génica y en la señalización epigenética que media, tanto funciones dependientes de la metilación del DNA, como independientes de esta en diferentes estadios celulares.

La DNMT1 presenta un alta expresión en células somáticas adultas y se cree que es responsable del mantenimiento de los patrones de metilación a través de su interacción con UHRF1⁹⁷ en genes tejido-específico, satélites yuxtacentroméricos y en regiones improntadas, aunque esta metilación de mantenimiento debe ser complementada por las demás DNMTs.⁹⁸ Se sabe que la DNMT1 tiene preferencia 40 veces superior por DNA hemimetilado sobre el DNA desmetilado,⁹⁹ razón por la cual se le conoce como la “hemimetilasa”. Dicho proceso es esencial para mantener los patrones de metilación durante la proliferación celular, y cualquier error, incluyendo las alteraciones en la maquinaria de la metilación y/o en la biodisponibilidad de grupos metilo, puede generar importantes cicatrices en el epigenoma, que se pueden mantener durante toda la vida del organismo. Esto se ha demostrado con el uso de agentes desmetilantes, cuyos cambios en los patrones de metilación pueden conservarse aún en ausencia de la sustancia durante muchos ciclos celulares.¹⁰⁰ También se ha demostrado que la DNMT1 está implicada en la generación de metilación *de novo*.¹⁰¹

Varias isoformas de la DNMT1 han sido reportadas, como la DNMT1o, la cual es una forma corta de la enzima que se expresa en células germinales y que se ha encontrado en ovocitos y en embriones durante la preimplantación, sin embargo, se desconoce su papel en estas etapas. Otra isoforma generada por *splicing* es la DNMT1b, la cual se expresa de forma escasa en células somáticas, a un 2-5% de los niveles de la DNMT1, pero al igual que la isoforma anterior, se desconocen sus funciones.

DNMT3

La familia de la DNMT3 fue identificada mediante EST (de inglés, *expressed sequence tag*) por su homología con las metiltransferasas bacterianas. Está conformada principalmente por la DNMT3A y -3B, las cuales están estrechamente relacionadas, pero son codificadas por genes diferentes, los cuales están localizados en las regiones cromosómicas 2p23 y 10q11.2, respectivamente. La arquitectura general de estas se asemeja a la DNMT1 únicamente en su región C-terminal.

Estudios *in vitro* han mostrado que las DNMT3 tienen preferencia por dinucleótidos CGs, sin importar si el DNA está hemimetilado, por lo que se les denomina como metiladoras *de novo*.¹⁰² Su actividad *de novo* se ha detectado tanto *in vivo* como *in vitro* en sistemas episomales estables que sobre-expresan estas enzimas.¹⁰³ La ausencia de estas enzimas en ratones ha demostrado que son esenciales para el desarrollo.⁷⁵ La estructura de la DNMT3A y -3B es bastante similar y existen estudios que sugieren un papel cooperativo entre estas,⁹⁸ aunque no del todo, pues cuando falta alguna de ellas, como ocurre en el síndrome ICF (una enfermedad de origen genético caracterizada por inmunosupresión, inestabilidad centromérica y anormalidades faciales), que es producto de una mutación de la DNMT3B, se observan efectos importantes sobre el adecuado desarrollo de los individuos afectados.¹⁰⁴

Ambas DNA metiltransferasas *de novo* presentan isoformas, producto principalmente de *splicing* o procesamiento alternativo. Existe la DNMT3A2, la cual carece de 223 aminoácidos, se expresa durante la embriogénesis y se localiza en la cromatina. La

DNMT3B1 y la DNMT3B2, por sus características estructurales, se consideran que son enzimáticamente activas. La DNMT3B3 carece del *motif* IX, por lo cual se considera como inactiva. Las isoformas DNMT3B4 y DNMT3B5 son proteínas truncadas que carecen de los *motifs* IX y X y también se consideran inactivas. Aunque en algunas de estas isoformas se ha demostrado función, ya sea como inhibidora o reguladora de la metilación, tanto a nivel embrionario,¹⁰⁵ como en ciertas condiciones patológicas,¹⁰⁶ se desconoce su función tanto en condiciones normales como patológicas.

Recientemente se ha descrito que la mayoría de las isoformas de las DNA metiltransferasas *de novo* pueden interactuar entre sí y alterar la capacidad de generar metilación en varios modelos *in vitro*.¹⁰⁷

Estas enzimas también pueden interactuar con otras proteínas como Suv39H1 (una metiltransferasa de histonas 3 en las lisina 9) y HDACs (del inglés, *histone deacetylases*). La DNMT3A también actúa como un co-represor de p53 sin usar su capacidad metiladora. Igualmente pueden sufrir modificaciones como sumoylación (modificación postraduccional caracterizada por la adición de proteínas SUMO).¹⁰⁸ La DNMT3B se ha reportado como sobre-expresada en varios tumores, mientras que la DNMT3A sólo ocasionalmente, por lo que se ha sugerido un papel de la DNMT3B en el proceso neoplásico. Incluso, existen reportes *in vivo* de la generación de tumores asociados a hipermetilación de genes supresores de tumores asociado a la sobreexpresión de esta enzima en ratones *Apc*^{MIN/+}.¹⁰⁹ Se sabe que la DNMT3A y -3B se anclan de forma estable a los nucleosomas que contienen altos niveles de DNA metilado en células somáticas.¹¹⁰

Igualmente, se ha encontrado recientemente que la metilación del DNA asociada a los nucleosomas es esencial para regular los niveles de la DNMT3A y -3B.¹¹¹

El tercer miembro de esta familia es la DNMT3L, con una clara homología estructural con la DNMT3A y DNMT3B. Presenta un patrón de expresión similar a las DNMT3B y DNMT3A y se expresa abundantemente durante la gametogénesis y en estadios embrionarios. Esta enzima no tiene el sitio catalítico, sin embargo, que sabe que cumple un papel regulatorio sobre la metilación *de novo*.¹⁰⁵ En experimentos *in vitro* se ha visto que esta proteína estimula la actividad de la DNMT3A en células humanas.¹¹² Estudios en ratones deficientes de la DNMT3L, han demostrado que se induce un cambio importante en los patrones de metilación en las células germinales y se asoció a infertilidad.¹¹³ Existen evidencias que sugieren que la DNMT3L mejora la metilación *de novo* y aumenta la reactividad con SAM.¹¹⁴

DNMT2

Su gen está conservado entre eucariontes, incluso en aquellos con escasa metilación como *Schizosaccharomyces pombe*. Esta proteína carece de una región regulatoria N-terminal, se expresa escasamente en células humanas adultas y de ratón, y se ha reportado sobreexpresión de esta en algunas células cancerosas.¹¹⁵ Se ha demostrado una escasa actividad metiladora de la DNMT2 tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo que se considera que no es fundamental para establecer o mantener los patrones de metilación.¹¹⁶

Funciones de la metilación del DNA

Se ha propuesto que la metilación del DNA ha evolucionado como un posible sistema generalizado de represión en los genomas más complejos,¹¹⁷ y a partir de allí se ha descubierto que la metilación del DNA es uno de los principales participantes en los dos procesos que violan el principio de igualdad génica: la impronta génica y la inactivación del cromosoma X. Ambos fenómenos comparten características como presentar un centro de control *cis-acting*, la regulación a distancia y la metilación diferencial del DNA. El hallazgo reciente de metilación en el cuerpo de los genes por varios grupos ha cambiado un poco la perspectiva de la metilación como una marca de cromatina cerrada.^{68,118}

La metilación del DNA presenta una gran variedad de funciones en los mamíferos, la mayoría de ellas asociadas a la compactación de la cromatina, como son la represión génica, el control de la diferenciación celular y el desarrollo, el mantenimiento de la pluripotencialidad, la impronta génica, la inactivación del cromosoma X y se ha asociado a la preservación de la integridad cromosómica. Además, la metilación del DNA está asociada al silenciamiento de retrovirus endógenos y la supresión de la recombinación entre cromosomas homólogos.

Aunque todos estos procesos son importantes para el normal funcionamiento celular en eucariontes y el desarrollo adecuado de los mamíferos, profundizaremos únicamente en el papel de la metilación del DNA sobre la adecuada estabilidad y segregación cromosómica, después de comentar algunos detalles importantes de la metilación del DNA y su impacto en la salud humana.

Alteraciones en la metilación del DNA en enfermedades en seres humanos

La lista de enfermedades en seres humanos asociadas a alteraciones en la metilación del DNA es bastante larga, donde podríamos destacar al síndrome ICF, al síndrome de Rett, síndrome del X frágil, a ciertas enfermedades autoinmunes, y otras, pero dada la importancia de la metilación del DNA en el origen, progresión y agresividad de esta y de la importancia de la estabilidad cromosómica en este padecimiento, nos avocaremos a comentar la importancia de la metilación del DNA en el cáncer.

Cáncer

El cáncer es un grupo complejo de enfermedades que se caracterizan por la presencia de una proliferación aumentada y no controlada de células en un tejido determinado. En cáncer se han reportado múltiples alteraciones, donde coexisten alteraciones genéticas y epigenéticas.

Las principales aberraciones en la metilación observadas en cáncer caen dentro de las siguientes dos categorías: metilación aberrante, (llamada también hipermetilación), la cual ocurre principalmente a nivel de las islas CpGs y “*shores*” y ha sido profundamente estudiada en promotores de genes supresores de tumores; e hipometilación global del genoma, la cual ocurre principalmente sobre secuencias repetidas.

La primera, conduce al silenciamiento génico y adquiere una gran relevancia cuando esta afecta a los genes supresores de tumores. Actualmente se sabe que son muchos los genes afectados por este silenciamiento en neoplasias en seres humanos, al

punto de considerarla hoy por hoy, como una marca común de todas las neoplasias.¹¹⁹ Algunos ejemplos de estos son hMLH1, BRCA1, and MGMT, el gen de adherencia celular y E-cadherina. Estas aberraciones en cáncer han sido propuestas para ser usadas como biomarcadores de células cancerosas y aún como factores pronósticos y predictivos de supervivencia en pacientes con cáncer. Igualmente, se ha propuesto “el fenotipo metilador”, que corresponde a modificaciones específicas dentro de un tipo de tumor. Esta hipermetilación aberrante de genes supresores de tumores ha llevado a buscar agentes terapéuticos que revierten este fenómeno aberrante, algunos de ellos con éxito.¹²⁰

Al mismo tiempo que las islas CpG se hipermetilan, se sabe que el genoma de las células cancerosas sufre de hipometilación global. Las células malignas pueden llegar a presentar un 60% menos 5-metilcitosinas que su contraparte normal¹²¹ y dicha desmetilación ocurre en el cuerpo de los genes y en regiones repetitivas del genoma. Esta hipometilación puede contribuir a la inestabilidad cromosómica, a la reactivación de elementos transposones y a la pérdida de la impronta génica, así como favorecer la pérdida de la heterocigosidad. Un ejemplo del papel de la pérdida de la impronta génica por la hipometilación global en cáncer, ha sido demostrada para el locus H19/IGF2 ubicado en la región cromosómica 11p15 en ciertos tumores de la infancia.¹²²

Todos estos resultados han sido replanteados recientemente, dado que Feinberg y colaboradores han retado la idea de la hipermetilación de supresores en las islas CpG. Ellos comentan que, a partir de estudios epigenómicos, son muchas las regiones génicas que se hipermetilan e hipometilan en cáncer, principalmente en las regiones denominadas

diferencialmente metiladas (DMRs) y ha planteado que las regiones que determinan diferencias entre un tejido canceroso y uno normal son los “*CpG shores*” y regiones aún más proximales y también plantea que las regiones hiper e hipometiladas son equivalentes en número y al parecer se modifican de manera aleatoria.⁷⁴ Este mismo grupo ha planteado que estas regiones cDMRs (del inglés *cancer-specific differentially DNA-methylated regions*) pueden distinguir, tanto células cancerosas como normales, así como distinguir entre diferentes tipos de tejido, recalando la importancia de la metilación para la diferenciación tisular. Al parecer la hipometilación de estos cDMRs está relacionada con la pérdida de límites alrededor de las islas CpG y sería responsable de la desmetilación de alrededor de la mitad del genoma y contribuiría de forma muy importante a la heterogeneidad de las células cancerosas.¹²³

Metilación del DNA en las regiones pericentroméricas

Basados en hallazgos del síndrome ICF (Inmunodepresión, inestabilidad centromérica, anormalidades faciales), Ehrlich y colaboradores reportaron una relación interesante entre la hipometilación del satélite 2 (presente en las regiones pericentroméricas) y la inducción de una reorganización significativa de la heterocromatina constitutiva pericentromérica.¹²⁴ Esta enfermedad se caracteriza por una descondensación de la cromatina juxtacentromérica de los cromosomas 1 y 16 e hipometilación del DNA satélite. En la mayoría de los casos, esta enfermedad se asocia a mutaciones en la DNMT3B. Las células somáticas de estos pacientes muestran hipometilación pericentromérica, reordenamientos cromosómicos como cromosomas multirradiados, isocromosomas, rupturas de cromosomas, descondensación de

centrómeros y la formación de micronúcleos, los cuales contienen preferencialmente a los cromosomas 1, 9 y 16. Se han reportado también alteraciones en ciertos genes involucrados en vías pro y anti apoptóticas, óxido nítrico, NF- κ B (factor nuclear kappa-B) y de TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) no asociados a hipometilación en sus promotores, lo que sugiere alteraciones en la expresión génica por efectos en *trans* asociados a la hipometilación de los satélites 2 en 1qh y 16qh.¹²⁵ Las células de los pacientes con ICF presentan desmetilación de secuencias *Alu*,¹²⁶ de los satélites 2 y 3, localizados preferencialmente en las regiones pericentroméricas¹²⁷ e hipometilación de las islas CpG en genes localizados en el cromosoma X inactivo y en repeticiones no satélite D4Z4 y NBL2.¹²⁸

Se sabe que las alteraciones epigenéticas en la heterocromatina pericentromérica inician una dinámica dependiente de HP-1 que altera la función de esta heterocromatina y alteran la adecuada progresión hacia la mitosis.¹²⁹ Se ha postulado que para poder generar la metilación de las regiones pericentroméricas se requiere previamente de una trimetilación de la lisina 9 en la histona H3(H3K9), un proceso mediado por la histona metiltransferasa SUV39H1.¹³⁰ La sobreexpresión experimental de esta histona metiltransferasa incrementa la trimetilación en la H3K9 y se asocia también con defectos en la progresión de la mitosis y alteraciones en la segregación cromosómica.¹³¹ Además, ratones con ausencia de Suv39h no muestran trimetilación en la heterocromatina pericentromérica y muestran una importante inestabilidad genómica y predisposición a cáncer.¹³²

La desmetilación pericentromérica ha sido descrita en varios tipos de cánceres, incluyendo hepatocarcinoma,¹³³ cáncer de mama,¹³⁴ urotelial¹³⁵ y de ovario;¹³⁶ siendo esta condición asociada a una mayor heterogeneidad celular, peores características histopatológicas y aun peor pronóstico, lo que sugiere una importante aportación de la metilación pericentromérica al fenotipo celular en cáncer.

Recientemente se ha descrito que en el síndrome de Down, un síndrome caracterizado a nivel cromosómico por la aneuploidía del cromosoma 21 (trisomía), al parecer existe una recombinación específica durante la meiosis II en ovocitos en mujeres de edad avanzada (la cual se asocia con desmetilación), la cual involucra a las regiones pericentroméricas y que pudiera estar asociada a la mala segregación de este cromosoma durante el desarrollo de las células germinales de la madre.¹³⁷

Epigenética y estabilidad cromosómica

Hoy por hoy, se acepta que la expresión génica y la funcionalidad de los cromosomas se afectan de manera muy importante por marcas epigenéticas a nivel de la cromatina. Estas marcas ocurren tanto en el DNA como en las histonas de los genomas de eucariontes y son relativamente estables a través de múltiples divisiones celulares y no afectan la secuencia del DNA.

Los cambios epigenéticos juegan un papel muy importante en la diferenciación celular, permitiendo a las células el mantenimiento diferencial de la expresión génica en diversos tejidos a pesar de contener el mismo material genético. La información epigenética es también esencial para la formación de heterocromatina, la cual está

organizada de forma muy compleja (llamada “de orden superior”), es poco accesible a la transcripción y a la maquinaria de recombinación y forma arreglos de nucleosomas altamente estructurados. Estas características de heterocromatina dependen de marcas epigenéticas que incluyen modificaciones post-traduccionales de histonas como la metilación de la lisina 9 en la histona H3 (H3K9), la metilación de la lisina 27 (H3K27) en la histona H3 y de la metilación del DNA. Aunque por mucho tiempo el DNA repetitivo contenido en el genoma, componente importante de la heterocromatina, se consideró por algunos autores como DNA chatarra,¹³⁸ evidencias recientes indican que la heterocromatina juega un papel muy importante en la estabilidad cromosómica, así como las marcas epigenéticas de este DNA para lograr una estructuración de los cromosomas y una funcionalidad adecuada de estos durante la interfase y la mitosis.

Modificación en la metilación del DNA e inestabilidad cromosómica

Una de las características de algunas marcas epigenéticas como la metilación del DNA, es que pueden ser modificables por factores genéticos (en casos muy puntuales) y ambientales, los cuales han sido asociados con la inducción de inestabilidad cromosómica y con la generación de aneuploidías.

Factores genéticos

En el ya mencionado síndrome ICF se sabe que las mutaciones en la DNMT3B no sólo afectan la actividad de la enzima, sino también su afinidad por el factor regulador DNMT3L.¹³⁹ A pesar de la alta frecuencia de múltiples formas de inestabilidad cromosómica observada en estos pacientes, no se ha reportado cáncer en ellos,

probablemente debido a su corta supervivencia (aproximadamente de 10 años de edad), falleciendo principalmente por infecciones secundarias a su inmunosupresión.¹²⁴ Recientemente, Ley y colaboradores también analizaron 281 pacientes con leucemia mielocítica aguda y encontraron que un porcentaje muy alto de ellos (22.1%) presentaron mutaciones en la DNMT3A, asociada a una mayor inestabilidad cromosómica y a un peor pronóstico.¹⁴⁰

Sustancias químicas

Algunas sustancias químicas, como el cadmio, el níquel y el arsenito de sodio han sido categorizados como carcinógenos humanos,¹⁴¹ afectando marcas epigenéticas y generando inestabilidad genómica por diferentes mecanismos.

El cloruro de cadmio induce aneuploidía en fibroblastos humanos embrionarios MRC-5,¹⁴² así como en modelos animales.¹⁴³ El cadmio es capaz de inhibir tanto las DNMTs de mamíferos como las bacterianas *in vitro* y *ex vivo*¹⁴⁴ de una manera no competitiva, indicando una interacción con el dominio que se une al DNA, probablemente en el residuo de cisteína en el centro activo de las DNMTs.¹⁴⁵ Estas alteraciones se han asociado a la generación de hipometilación global, lo cual probablemente esté contribuyendo a la proliferación anormal inducida por este metal.¹⁴⁶ La exposición prolongada a cadmio induce signos de transformación celular, como morfología celular alterada, aumento de la capacidad de invasión y aumento en la tasa de crecimiento, acompañada de hipometilación del DNA y aumento de la actividad en las DNMTs.¹⁴⁷

La exposición a arsénico inorgánico, el cual interfiere con el metabolismo normal de los grupos metilo, reprime la expresión de la DNMT1 y la DNMT3A.¹⁴⁸ El arsenito de sodio genera hipometilación del DNA y cambia los patrones de metilación después de la exposición aguda,¹⁰⁰ los cuales se mantienen alterados a través de muchos ciclos celulares aún en ausencia de la sustancia. Además, el arsenito es capaz de inducir sobreexpresión de c-myc en células TRL-1215, asociado a hipometilación, un fenómeno fuertemente correlacionado con la capacidad maligna de estas células.¹⁴⁹ Estudios en seres humanos expuestos a arsénico han encontrado significativa hipermetilación de p53 y de p16 en sus regiones promotoras.¹⁵⁰ De la misma manera, nuestro grupo ha encontrado previamente que el arsenito de sodio es capaz de generar una inestabilidad cromosómica importante en células humanas y dicho daño es reducido con S-adenosil-metionina, el donador de grupos metilo para las DNA metiltransferasas y para otras metiltransferasas.¹⁵¹

Los componentes níquelados son potentes carcinógenos humanos y en roedores¹⁵² y producen inestabilidad cromosómica y aneuploidía en células de mamíferos.¹⁵³ El potencial carcinogénico del níquel se asocia con la generación de estrés oxidativo, daño al DNA y efectos epigenéticos que generan silenciamiento de genes. Este metal es un inhibidor de la actividad de las DNMTs *in vitro* e *in vivo* e induce una desmetilación del DNA de forma temprana. Tardíamente ocurre una elevación en los niveles de metilación global.¹⁵⁴ Los componentes de níquel solubles en agua son capaces de inducir silenciamiento génico por metilación del DNA como resultado de la metilación *de novo*, siendo uno de los primeros modelos de carcinogénesis epigenética. Exposiciones a corto plazo (1 a 3 días) a partículas de níquel cristalinas son capaces de silenciar

epigenéticamente genes blanco ubicados cerca a regiones heterocromáticas.¹⁵⁵ Un efecto similar ha sido encontrado en levaduras, donde el níquel es capaz de silenciar al gen URA-3, ubicado cerca a elementos de silenciamiento teloméricos.¹⁵⁶ Recientemente, se descubrió que este cambio se asociaba a otras modificaciones epigenéticas, como una disminución en la acetilación de H3 y H4, así como un incremento en la di-metilación en H3K9.¹⁵⁷

Dieta y disminución en el aporte de grupos metilo

Los folatos son importantes donadores de grupos metilo para la metilación del DNA. Hace más de dos décadas que se descubrió que las células de pacientes con deficiencias de folatos y vitamina B12 presentaban anomalías cromosómicas que persistían hasta 12 meses después de la recuperación clínica.¹⁵⁸ Un estudio con mujeres pos-menopáusicas en quienes se dio una dieta con disminución moderada de folatos, se encontró un aumento en la frecuencia de errores en la segregación cromosómica en sus linfocitos de sangre periférica, asociada con una disminución en la metilación global del DNA.¹⁵⁹ De manera similar, la ingesta de folatos y vitamina B12 se ha asociado a una menor frecuencia de micronúcleos en personas jóvenes.¹⁶⁰ Recientemente se ha sugerido que la deficiencia de ácido fólico puede incrementar no solamente la frecuencia de micronúcleos sino también de yemas nucleoplásmicas y puentes nucleoplásmicos en cultivos celulares expuestos a déficits de folatos, sugiriendo que esta condición puede jugar un papel importante en la iniciación de los ciclos B/F/B (ciclos de ruptura/fusión/puentes de anafase), claves en la generación de inestabilidad cromosómica.¹⁶¹ De hecho, algunos autores han sugerido que la depleción de folatos

puede ser un factor asociado con la generación de inestabilidad cromosómica, y se ha postulado que esta modificación pueda llegar a ser aún más importante que mutaciones en los genes BRCA1 o -2 en el proceso carcinogénico.¹⁶²

Envejecimiento

Otro factor al que invariablemente están expuestos los organismos es el envejecimiento celular, el cual se sabe que altera factores como la capacidad regenerativa de los tejidos. En el envejecimiento celular se sabe que existen alteraciones epigenéticas y citogenéticas, así como errores en la segregación cromosómica, sin embargo, la correlación entre estos hallazgos ha sido poco explorada. Desde inicio de la década de los 80's se sabe que las células primarias (no-malignas) pierden metilación global a medida que envejecen y que las células malignas o cancerosas, por el contrario, mantienen constantes sus niveles de metilación.¹⁶³ Las razones por las cuales las células normales pierden metilación global a medida que envejecen son inmensamente desconocidas. Por otra parte, se sabe que el envejecimiento aumenta la posibilidad de encontrar células aneuploides en seres humanos y un ejemplo claro de este fenómeno es el síndrome de Down, en donde existe un riesgo incrementado asociado a la edad materna.¹⁶⁴

De la misma manera, se sabe que ratones mutantes con bajos niveles de BUBR1, una proteína del punto de monitoreo de mitosis localizada en el cinetocoro y que inhibe a APC/C, desarrollan aneuploidía, como es de esperarse, pero además, muestran una gran variedad de síntomas progeroides, como menor sobrevivencia, cifosis dorsal, cataratas, pérdida de la grasa subcutánea y menor capacidad de reparación de heridas.¹⁶⁵

Aunque parece clara la relación entre el envejecimiento, alteraciones en la metilación del DNA y la generación de aneuploidías, no hay estudios claros que vinculen estos factores independientes.

Alteraciones en la metilación del DNA y la inducción de inestabilidad cromosómica

Aunque son muchos los factores involucrados en la estabilidad cromosómica, incluyendo varias modificaciones epigenéticas, nos concentraremos en mostrar las evidencias que correlacionan las alteraciones en la metilación del DNA con la generación de alteraciones cromosómicas.

Se sabe que las células con niveles reducidos de metilación en el DNA, inducido de manera exógena, son más susceptibles a presentar pérdidas, ganancias o reordenamientos cromosómicos.¹⁶⁶ Igualmente, experimentos desarrollados con células madre embrionarias han mostrado que al inactivar la DNMT3B, se generan múltiples formas de inestabilidad cromosómica, incluyendo rupturas, fusiones cromosómicas y aneuploidías. Esta hipometilación también se encontró asociada a senescencia prematura y/o a inmortalización espontánea.¹⁶⁷ Se sabe también que la hipometilación, en células germinales masculinas, también resulta en la generación de anormalidades meióticas.¹⁶⁸ Por otra parte, sustancias desmetilantes del DNA como la 5-azacitidina (5-azaC), un análogo de la citidina y su derivado, la 5-aza-2 deoxicitidina, inducen incrementos progresivos en la formación de micronúcleos.¹⁶⁹ Estas sustancias son capaces de generar aberraciones cromosómicas como deleciones, rupturas cromosómicas, formación de isocromosomas y traslocaciones.¹⁷⁰ En algunos casos, se ha encontrado que estas

sustancias inducen descondensación y apareamiento entre la heterocromatina constitutivas de los cromosomas 1, 9 y 16, involucrando en el 90% de los casos a las regiones pericentroméricas;¹⁷¹ también pueden generar figuras denominadas cromosomas multirradiados y son capaces de generar un retardo en la separación de los centrómeros,¹⁶⁹ generar exclusión preferencial de los cromosomas 1, 9 y 16, así como de otros cromosomas en los micronúcleos de las células expuestas durante cortos periodos de exposición,¹⁷² así como generar desenrollamiento y recombinación de la heterocromatina constitutiva que contienen el satélite 2 y 3, sin involucrar el satélite alfa.¹⁷³

Por otra parte, la hipometilación inducida por la 5-azaC, la etionina y la 9-b-D-arabinofuranosil-adenina incrementa la generación de intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero, sin embargo, el significado de este fenómeno es desconocido.¹⁷⁴ Los intercambios ocurren únicamente después de un segundo ciclo posterior a la exposición a la sustancia, sugiriendo que el evento clave para que estos cambios ocurran es la desmetilación de la hebra parental. Los intercambios de cromátidas hermanas persisten aún después de quitar la sustancia desmetilante, lo cual pudiera estar asociado al mecanismo celular de mantenimiento de la metilación asociado a la DNMT1 (hemimetilación).¹⁷⁵

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la desmetilación de las regiones pericentroméricas se asocia con la generación de células aneuploides en células somáticas adultas y los mecanismos involucrados en la generación de dicha desmetilación.

Objetivos específicos

1. Cultivar linfocitos primarios de individuos, varones, jóvenes, sanos y someterlos a 5-azaC, a dosis previamente establecidas para lograr un efecto desmetilante¹⁷⁶ y evaluar su viabilidad durante los periodos de experimentación, 24 (72h de cultivo), 48 (96h de cultivo) y 72h (120h de cultivo) de tratamiento, luego de 48h de proliferación.
2. Establecer la presencia de errores en la segregación de cromosomas mediante la técnica de obtención de micronúcleos (MN) con citocinesis bloqueada
3. Identificar en los micronúcleos a los cromosomas con regiones altamente metiladas, en presencia del agente desmetilante 5-azaC, en los periodos de experimentación mencionados previamente.
4. Establecer y caracterizar los patrones de metilación en metafase, durante los periodos de experimentación establecidos en respuesta a la 5-azaC.
5. Establecer y caracterizar los patrones de metilación del satélite 2, pertenecientes a las regiones pericentroméricas, en presencia del agente desmetilante en todos los periodos de experimentación.

6. Comparar diferentes modificaciones a las técnicas moleculares de análisis de los patrones de metilación para determinar su eficiencia para secuencias repetidas en un modelo de células humanas adultas con niveles normales de metilación.
7. Determinar la expresión de las principales DNMTs en respuesta al agente desmetilante en los periodos de experimentación.

HIPÓTESIS

La metilación de las regiones pericentroméricas en células somáticas adultas le confiere estabilidad a estas regiones y previene la aparición de fenómenos de aneuploidía. En presencia de un agente desmetilante, se afecta dicha estabilidad y se presentan errores en la segregación cromosómica. De la misma manera, los cambios en los patrones de metilación inducidos químicamente se correlacionan con modificaciones en la maquinaria de la metilación del DNA.

JUSTIFICACIÓN

Las alteraciones en la segregación cromosómica juegan un papel muy importante en patologías como cáncer, síndromes congénitos y abortos. Sin embargo, las causas y los procesos subyacentes a la generación de aneuploidías son en su mayoría desconocidos. Se sabe que algunas alteraciones en la metilación del DNA pueden llegar a afectar la segregación cromosómica. Igualmente se sabe que las regiones pericentroméricas de las células somáticas adultas, las cuales son de gran importancia para la segregación cromosómica, están intensamente metiladas. Se sabe también que la adecuada organización de los patrones de metilación en las células adultas es importante para la adecuada expresión génica, sin embargo, se desconoce si existe un patrón de metilación del DNA en las regiones pericentroméricas y si existen errores en la segregación cromosómica derivadas de cambios en estos patrones de metilación del DNA a nivel de estas regiones.

RELEVANCIA E IMPACTO

Los hallazgos de este estudio tendrán gran relevancia para entender el papel de la metilación pericentromérica en células somáticas adultas sobre la adecuada estabilidad cromosómica, lo cuales asocia con la generación de heterogeneidad celular en un tejido y podría contribuir al proceso de carcinogénesis, así como a otras enfermedades en seres humanos. Los hallazgos derivados de este estudio permitirán generar estrategias que prevengan los errores en la segregación cromosómica y por lo tanto, llegar a prevenir el efecto de la aneuploidía en células somáticas adultas. Además, dada la relevancia de la aneuploidía, así como de las alteraciones epigenéticas en etapas tempranas de la

carcinogénesis, los hallazgos de este proyecto podrían derivarse en el hallazgo de marcadores tempranos de enfermedad en células adultas.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para poder responder a la pregunta principal de nuestro proyecto, el cual hace referencia a la existencia de patrones de metilación específicos en las regiones pericentroméricas y a la manera en que se modifican en respuesta a ciertas sustancias químicas, usamos un modelo de linfocitos humanos expuestos de forma prolongada a 5-azaC (Figura 10). Para evaluar la presencia de errores en la segregación de cromosomas específicos, usamos una técnica de FISH sobre células binucleadas, las cuales permiten observar la presencia de alteraciones en la segregación cromosómica durante la última división celular. Para evaluar la metilación de las regiones pericentroméricas usamos dos abordajes diferentes, uno citogenético y otro molecular, los cuales permiten visualizar cambios sobre cromosomas metafásicos y en secuencias específicas, respectivamente.

Para evaluar la maquinaria de metilación del DNA y su modificación en el modelo planteado, usamos inmunofluorescencia y Western-blot.

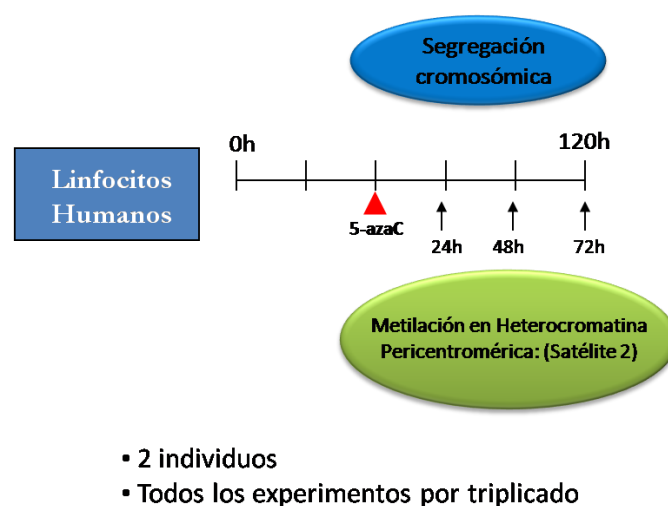


Figura 10. Diseño experimental

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cultivo celular y tratamiento químico

Se cultivaron linfocitos de 2 individuos, varones, sin evidencia de enfermedad, en medio RPMI (Gibco), suplementado con suero bovino fetal al 10% (Hyclone), con aminoácidos no esenciales (Sigma) y L-glutamina (Gibco). Los linfocitos en cultivo fueron estimulados con fitohemaglutinina (Gibco) y luego de 48h de proliferación se cambió el medio de cultivo y se iniciaron los tiempos experimentales y la exposición a 5-azaC. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. El medio fue cambiado y las células fueron tratadas con 5-azaC, a concentraciones finales de 10µM (Sigma-Aldrich).¹⁷⁶ Los tiempos de experimentación fueron de 24, 48 y 72 h de exposición a 5-azaC, correspondientes a 72, 96 y 120 h de cultivo.

Obtención de metafases

Para la obtención de metafases, los linfocitos fueron incubados con Colcemid (Gibco) 1h antes de la cosecha. Los cultivos fueron procesados de acuerdo a protocolos convencionales.¹⁰⁰ Brevemente, después de 30min de incubación con solución hipotónica (0.075M KCl) a 37°C, las células fueron fijadas con solución de Metanol: Ácido Acético, en relación 3:1 y goteadas sobre laminillas frías y limpias.

Técnica de inmunodetección indirecta contra 5-metilcitosinas

Para la inmunodetección contra 5-metilcitosinas (5-MC) sobre cromosomas metafásicos, usamos protocolos descritos previamente.¹⁷⁷ Las laminillas fueron irradiadas

con LUV usando una lámpara germicida (UVP Modelo XX-15S 244nm) sumergidas en una solución de PBS (del inglés, *phosphate buffered saline*) a una distancia de 35cm a 4°C durante 1h. Las laminillas se sumergieron en PBS – 0.3% BSA (del inglés, *bovine serum albumine*) fracción V (Sigma) – 0.1% Tween20 por una hora, a temperatura ambiente. El anticuerpo monoclonal contra 5-metilcitosinas (Calbiochem) se adicionó a las laminillas radiadas, siendo diluido en PBS-BSA a una dilución 1:1000 e incubado durante 60min en una cámara húmeda a 37°C. Luego de dos lavados cuidadosos en PBS, se adicionó el anticuerpo secundario, IgG anti-ratón conjugado con fluoresceína (Calbiochem) y se incubó durante 60min. Luego de un corto lavado en PBS, las laminillas fueron montadas con una solución anti-desvanecimiento con DAPI (Vectashield H-1200). Las laminillas se analizaron usando un microscopio de luz UV Carl Zeiss equipado con una lámpara de mercurio de 100W, con filtros intercambiables.

Análisis de imágenes

Las fotografías fueron procesadas usando el software Adobe Photoshop CS. La inmunodetección y los patrones de metilación en metafase fueron llevadas a cabo en imágenes no procesadas; 50 metafases de tres experimentos independientes, analizando cada tiempo de experimentación de cada uno de los experimentos. Los patrones de metilación en metafase y la pérdida de señales de las regiones pericentroméricas fueron analizados usando el software Axiovision 4.6.

Hibridación *in situ* fluorescente de los cromosomas 1, 9, 16 y Y

Los cultivos de linfocitos fueron tratados con citocalasina B (Sigma) para obtener células binucleadas, basados en los criterios del ensayo de micronúcleos.¹⁷⁸ Brevemente, 24h posterior a la adición de citocalasina B, se prefijaron las células con solución de metanol/ ácido acético 3:1 y posteriormente se lavaron con esta misma solución fijadora hasta obtener un pellet limpio. La suspensión de células se goteó sobre laminillas frías, las cuales se tiñeron con hematoxilina/eosina y se analizaron bajo microscopio de luz Leyca. Se cuantificaron 1000 células binucleadas y se determinaron la cantidad de micronúcleos de acuerdo a los criterios de Fenech y colaboradores.¹⁷⁸ Sólo se tomaron en cuenta los micronúcleos que presentaban menos de un tercio del tamaño del núcleo principal, que no encimaran el núcleo y que tuvieran bordes diferentes al núcleo principal.

La hibridación *in situ* fluorescente se llevó a cabo sobre laminillas con células binucleadas de acuerdo a protocolos establecidos por Lemieux y colaboradores.¹⁷⁹ Usamos sondas dirigidas contra las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1 (Aquarius), 9 (Aquarius), 16 (Aquarius) y Y (Aquarius). El cromosoma Y se usó como control interno, dado que contiene grandes regiones de heterocromatina metilada no pericentromérica.¹⁷⁷ La desnaturalización fue llevada a cabo a 75°C y la hibridación a 37°C durante toda la noche en una cámara húmeda. Las laminillas se contra-tiñeron con DAPI (Vectashield H-1200). Las células binucleadas fueron analizadas para evaluar la presencia de errores en la segregación en tres experimentos independientes, usando un microscopio de LUV Axioscop 2 mot plus (Zeiss). Las fotografías de las laminillas fueron procesadas usando el software Adobe Photoshop CS software. Se contabilizaron 500 células

binucleadas en laminillas codificadas para evaluar la formación de MN en cada tiempo de experimentación para cada experimento. Los micronúcleos se clasificaron en dos categorías: MN (+) y MN (-) para cada una de las sondas usadas. Para restringir el conteo a la primera mitosis después del tratamiento y excluir artefactos técnicos, se analizaron solamente aquellas células binucleadas con el número correcto de señales de hibridación. Para asegurarnos que los micronúcleos contuvieran cromosomas completos, usamos sondas dirigidas contra regiones pericentroméricas para los cromosomas 1, 9 y 16.

Para el análisis estadístico de los errores en la segregación se realizó la prueba estadística de t de Student. El análisis estadístico fue llevado a cabo con el software MiniTab14. Los valores críticos se determinaron usando una probabilidad de 0.05 de error tipo I.

Análisis de los patrones de metilación específicos en las regiones repetidas (satélite 2) de las regiones pericentroméricas

Se extrajo el DNA de los cultivos de células somáticas adultas mediante la técnica de fenol/cloroformo. Posteriormente, el DNA extraído se sometió a 4 tipos de reacciones de bisulfito de sodio para evaluar la eficiencia en la conversión de citosinas no metiladas en DNA de linfocitos humanos (elevado comparado contra las células cancerosas).¹⁶³

Evaluamos la técnica de conversión de bisulfito de sodio convencional;¹⁸⁰ la técnica modificada;¹⁸¹ un kit comercial de conversión con bisulfito (EZ methylation kit) y un protocolo de bisulfito más urea.¹⁸² El protocolo convencional descrito por Frommer y colaboradores, consiste en la exposición durante un periodo de 8-12 h a bisulfito de sodio

3.1M, durante 16h a 50 °C.¹⁸⁰ El protocolo modificado de Wernecke y colaboradores usa DNA digerido con enzimas de restricción, concentraciones de 2.8M de bisulfito de sodio y la reacción química es llevada a cabo a 55°C durante 16 horas.¹⁸¹ Comparamos los resultados con el kit EZ DNA methylation kit (ZYMO RESEARCH, USA). Por último, comparamos estos datos con los obtenidos mediante la reacción de bisulfito de sodio (2.6M) más urea, llevando la reacción química de 95°C a 55°C durante 20 ciclos. Evaluamos la eficiencia de las reacciones, tanto en secuencias repetidas como en algunas secuencias únicas en DNA proveniente de linfocitos humanos.

Se comparó el porcentaje de metilación en citosinas no CpG en secuencias repetidas tipo satélite 2 en DNA producto de linfocitos cultivados *in vitro* y se compararon por lo menos 10 clonas provenientes del mismo periodo de cultivo (24 h) con cada una de las reacciones. De la misma manera se determinó la eficiencia de la conversión en secuencias no repetidas (Shank-3, DAPK, E-cadherina). Para amplificación de estos fragmentos se usaron los siguientes *primers*: Satélite 2: *Primers silvestres*: sat2-384U (5'-ATGGAAATGAAAGGGGTCATCATCT-3') y sat2-781L (5'-ATTGAGTCCATTCGATGATTCCAT-3'). *Primers modificados* (Primera ronda): sat2biup-1f (5'-TTGAATGGAAATGAAAGGGGTTATTA-3') y sat2biup-2r (5'-C[G/A]AATCCATTC[G/A]ATAATTCCATTCC-3'). Segunda ronda: st2biup-3f (5'-TGGAAATGAAAGGGGTTATTATTTA-3') y st2biup-4r (5'-AATCCATTCCATTCCATTCCATTC[G/A]ATA-3'). Aproximadamente 200 ng de DNA convertido con bisulfito de sodio se usó en una reacción de 100 µl con 200µM de MgCl₂, 0.5µM de cada primer y 1.25U de Taq polimerasa; la reacción de PCR se llevó a cabo

usando las siguientes condiciones en un termociclador 2729 (Applied Biosystems): 95°C por 5 min, un ciclo, luego 95°C, un minuto, 65°C, un minuto, 72°C, 2 minutos, durante 30 ciclos, seguido de 72°C por 7 minutos, un solo ciclo. Shank-3: Primers silvestres: ShWTF (5'- GGTCGCGCGTTATGGAGGTTT-3'). ShWTR (5'-AAACGACGCTATAAAATTTCCGCTTC-3').
Ciclaje:95°C, 5 min, un ciclo, luego 95°C, un minuto, 53°C, un minuto, 72°C, 1 minuto, durante 30 ciclos, seguido de 72°C, 7 minutos, un solo ciclo. Primers modificados: ShBSPF (5'- GGTCGCGCGTTATGGAGGTTT-3'). ShBSPR (5'- AAACRACRCTATAAAATTTCCRCTTC-3').
Ciclaje: 95°C, 5 min, un ciclo, luego 95°C, un minuto, 50°C, un minuto, 72°C, 1 minuto, durante 30 ciclos, seguido de 72°C, 7 minutos por un solo ciclo. DAPK: Primers silvestres: DWTF (5'-GGACAGCCGGACCGAGCCAACGCC-3'). DWTR (5'- CCCTCCCAAACGCCGA-3').
Ciclaje :95°C, 5 minutos, un ciclo, luego 95°C, un minuto, 64°C, un minuto, 72°C, 1 minuto, durante 30 ciclos, seguido de 72°C, 7 minutos, un solo ciclo. Primers modificados: DBSPF (5'-GGATAGTYGGATTGAGTTAAYGTT-3'), DBSPR (5'- CCCTCCCAAACRCCRA-3').95°C, 5 minutos, un ciclo, luego 95°C, un minuto, 49°C, un minuto, 72°C, 1 minuto, durante 30 ciclos, seguido de 72°C, 7 minutos, un solo ciclo. E-caderina: Primers silvestres: EWTF (5'- CCAGGCTAGAGGGTCACCGCGT-3'). DWTR (5'-TGGCTGAGGGTTCCACCTGCCGGCC-3').
Ciclaje : 95°C, 5 minutos, un ciclo, luego 95°C, un minuto, 62°C, un minuto, 72°C, 1 minuto, durante 30 ciclos, seguido de 72°C, 7 minutos, un solo ciclo. Primers modificados: ECADBSPF (5'-CCAGGCTAGAGGGTCACYGYGT-3'); ECADBSPR (5'- TRRCTRARRRTTCCACCTRCCRRCC-3').
Ciclaje: 95°C, 5 minutos, un ciclo, luego 95°C, un minuto, 58°C, un minuto, 72°C, 1 minuto, durante 30 ciclos, seguido de 72°C, 7 minutos un solo ciclo.

Los fragmentos fueron amplificados, ligados a un vector y clonados, para posteriormente ser llevados a secuenciación, obteniendo por lo menos 10 clones de cada grupo experimental.

Adicionalmente, con la técnica más eficiente (bisulfito más urea), se determinó el patrón de metilación del satélite 2 en el modelo de linfocitos humanos expuestos a 5-azacitidina y en sus controles, en los periodos de cultivo de 24, 48 y 72 horas. Se determinaron la cantidad de sitios CpG metilados en el fragmento amplificado y se determinaron las diferencias estadísticas entre los grupos usando la prueba de Mann-Whitney.

Inmunofluorescencia contra las DNMTs

Para la detección de las enzimas DNA-metiltransferasas, usamos la técnica de inmunofluorescencia y el análisis digital de imágenes. Usamos anticuerpos contra las principales DNMTs, así: DNMT1 (New England Biolabs); DNMT3A (IMGENEX), DNMT3B (IMGENEX). Usamos el respectivo anticuerpo secundario IgG conjugado a fluoresceína (Calbiochem). Las células se fijaron en metanol al 100%, se permeabilizaron con Tritón 0.1% por 15min, se bloquearon con albúmina al 5% y se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1h a temperatura ambiente. Las laminillas se lavaron en PBS y luego se les adicionó el anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína. Luego de 1h a temperatura ambiente, las laminillas se lavaron y contra-tiñeron con DAPI. 100 células interfásicas de cada experimento y de cada tiempo de experimentación fueron analizadas con el software Axiovision 4.6 y se realizaron las respectivas densitometrías de cada

núcleo. Los resultados se compararon con la prueba de Mann-Whitney, usando el software MiniTab14.

Detección de las DNMTs y α -tubulina por Western-blot

Las células fueron lavadas dos veces con PBS y posteriormente se expusieron a solución de lisis (Cell Signaling), adicionada con ortovanadato y coctel de inhibidores de proteasas (Sigma), 10 μ l por cada mililitro de solución de lisis. Se mezclaron con pipeta vigorosamente y posteriormente, las células fueron centrifugadas a 14000rpm por 20min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se tomaron 5 μ l de muestra, adicionada con colorante Bradford y se cuantificó en espectrofotómetro DU®530 (Beckman Coulter) obteniendo por regresión lineal a partir de la absorbancia, la concentración de las muestras experimentales y estas se almacenaron a -70°C.

Se cargaron 2 μ g de proteína por carril, siendo sometidas a electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF Immobilion Transfer (Millipore). Posteriormente se bloquearon con leche baja en grasa al 3% en buffer salino con Tris a pH 7.5 (TBS). La membrana se lavó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y fue incubada con los anticuerpos primarios: DNMT1 (New England Biolabs), DNMT3A (IMGENEX), DNMT3B (IMGENEX), los cuales fueron diluidos en albúmina al 3% a concentración 1:100 y dejados toda la noche a 4°C. Posterior a la incubación, se lavaron con solución TBS-Tween20 varias veces y luego fueron expuestos a incubación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa anti-ratón (Zymed) en dilución 1:1000 por 1h. Las membranas se expusieron al sustrato HRP quimio-luminiscente

(Immobilon Western, Millipore), y posteriormente fueron reveladas con películas fotográficas (Hyperfilm ECL, Amersham). Las imágenes obtenidas de las películas fueron evaluadas para la cuantificación de la expresión de proteínas usando el software Scion Image for Windows. La hibridación contra la proteína α -tubulina (Zymed) se usó como control de carga y de calidad de la proteína.

RESULTADOS.

El tratamiento con 5-azaC se asoció a una pérdida progresiva en la metilación pericentromérica y a la inducción de errores en la segregación de cromosomas que contienen el satélite2.

Llevamos a cabo una inmunodetección indirecta contra 5-metilcitosinas sobre cromosomas metafásicos para detectar grandes bloques de regiones metiladas en linfocitos humanos, como las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9 y 16. Se cuantificó la presencia de metafases con 6 puntos pericentroméricos, correspondientes a las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9 y 16; 2 puntos por cada cromosoma, en 50 metafases con 46 cromosomas, después de 24, 48 y 72 h de tratamiento con 5-azaC y en sus respectivos controles no tratados, en tres experimentos independientes. Los resultados mostraron una pérdida progresiva de la presencia de metilación pericentromérica en células tratadas, comparado con los controles (Figura 11). Solamente 50, 25 y 17% de las metafases contenían todas las regiones pericentroméricas metiladas en los grupos tratados con 5-azaC a las 24, 48 y 72 h respectivamente.

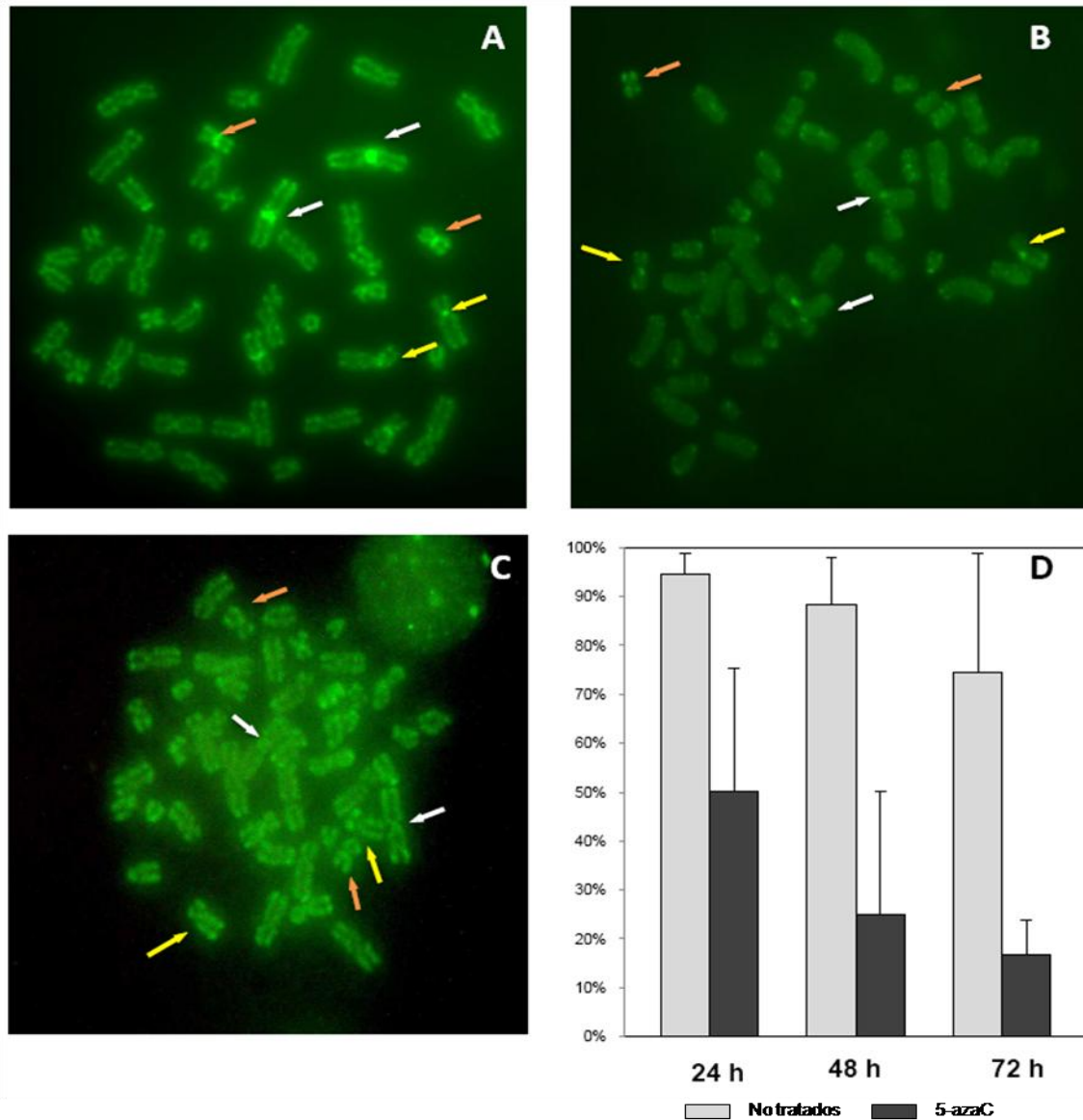


Figura 11. La 5-azacitidina (5-azaC) induce hipometilación pericentromérica en linfocitos humanos. a. Patrón de metilación cromosómica en linfocitos humanos proliferados *in vitro* durante 48 h (no tratados). B y C. Metafases de linfocitos humanos a las 72 h de tratamiento con 5-azaC. Los bloques de heterocromatina pericentromérica altamente metilada están señalados con flechas y fueron observados en los cromosomas 1 (flechas blancas), 9 (flechas amarillas) y 16 (flechas naranjas). D. Porcentaje de metafases con 6 bloques de regiones pericentroméricas metiladas en linfocitos tratados durante 24, 48 y 72 h con 5-azaC. Se contaron 50 metafases que contenían 46 cromosomas y 6 bloques de regiones pericentroméricas metiladas. Las barras representan el promedio y las respectivas desviaciones estándar producto de tres experimentos independientes. Las columnas grises representan a los grupos tratados (gris oscuro) y no tratados (gris claro).

Además, se observaron también patrones de metilación cromosómicos diferenciales en cada periodo experimental (Figura 12).

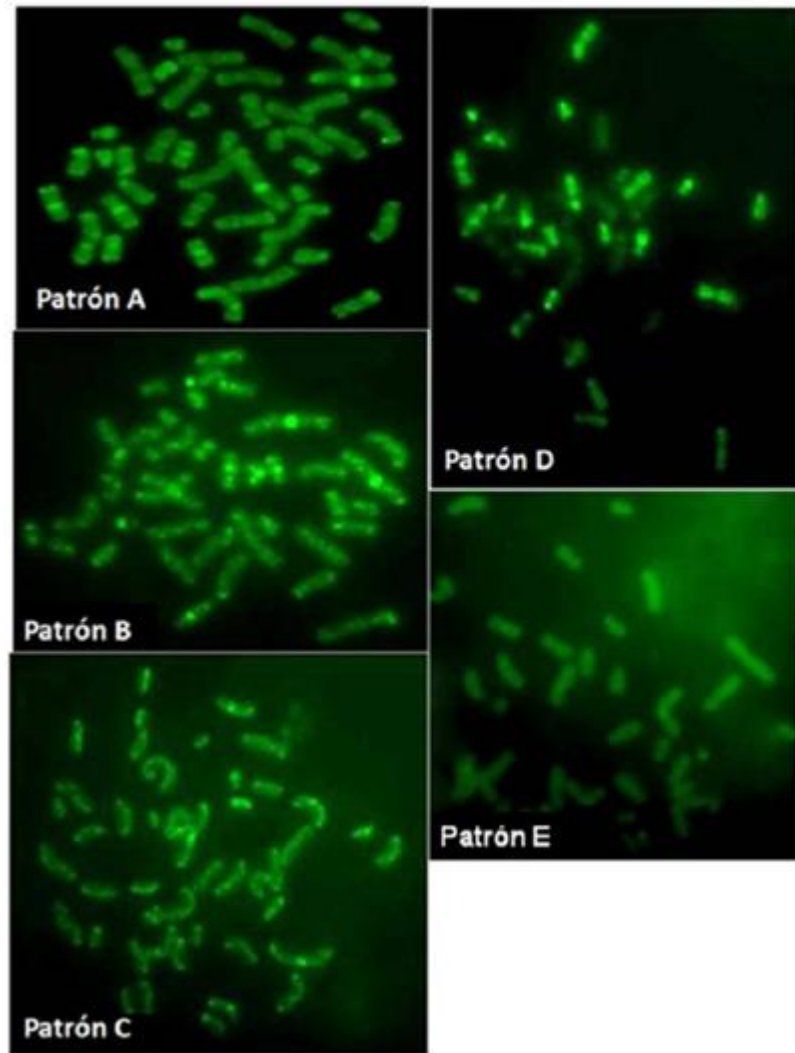


Figura 12. Patrones de Metilación en Metafase. Patrón A, caracterizado por metilación simétrica de cromátidas y presencia de grandes bloques de heterocromatina pericentromérica metilada, visto principalmente en controles a 24 y 48h. Patrón B, con presencia de puntos irregulares en ambas cromátidas, visto principalmente en tratados a 24h y en controles a 72h. Patrón C, presencia de una cromátida metilada y la otra hipometilada, visto en tratados a 48h de tratamiento. Patrón D, caracterizado por metafases que contenían cromosomas hipermetilados e hipometilados, visto a las 72h de tratamiento. Patrón D, Metafases hipometiladas, vistas ocasionalmente en todos los periodos de tratamiento con 5-azaC. Flechas blancas: regiones pericentroméricas altamente metiladas.

De la misma manera, la 5-azaC indujo la formación de micronúcleos (MN) de forma progresiva a través de los periodos experimentales, con un considerable incremento a las 72 h de tratamiento (Figura 13). El análisis con sondas FISH dirigido contra las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9 y 16 mostró diferencias significativas en los errores de segregación de los cromosomas 1 y 16 en los grupos tratados con 5-azaC, a las 48 y 72 h de tratamiento comparado con los controles ($p < 0.05$).

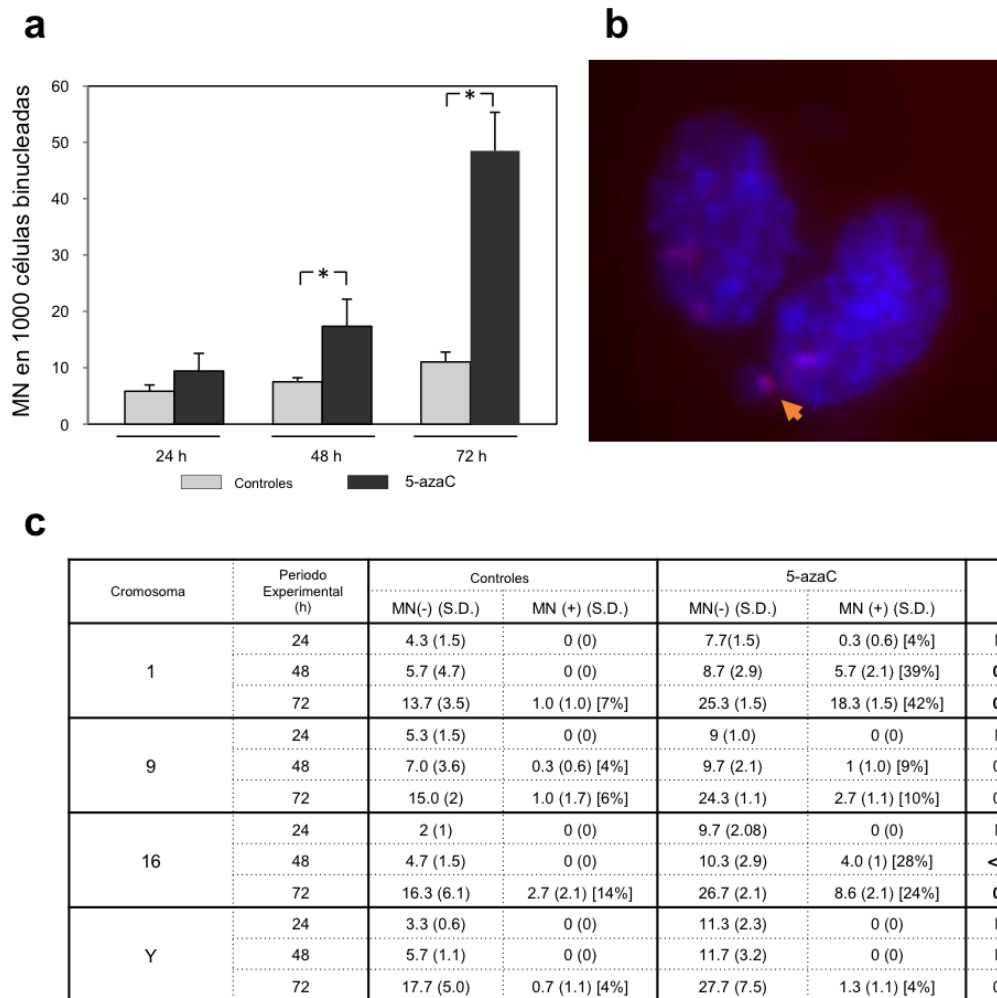


Figura 13. La 5-azacitidina (5-azaC) induce errores en la segregación en linfocitos humanos. a. Presencia de micronúcleos en células binucleadas expuestas a 5-azaC y sus respectivos controles en tinción con hematoxilina-eosina. b. Célula binucleada con

micronúcleo positivo para el cromosoma 1. c. Errores en la segregación de cromosomas 1, 9, 16 y Y detectados mediante FISH en linfocitos tratados con 5-azaC durante 24, 48 y 72 h. Los valores de p corresponden a las diferencias estadísticas en el número de MN positivos, comparando grupos tratados contra no tratados. Se contaron 500 células binucleadas en cada experimento, en tres experimentos independientes. MN (-): Micronúcleo negativo para el cromosoma respectivo. MN (+): Micronúcleo positivo para el cromosoma respectivo; S.D.: Desviación estándar. N/A: No disponible. * Señala diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. El valor de porcentaje en el grupo de 5-azaC corresponde al porcentaje de los MN positivos del total de MN obtenidos.

El cromosoma Y, un cromosoma con grandes regiones de heterocromatina metilada no pericentromérica, no mostró diferencias en cuanto errores en la segregación entre los grupos tratados y los controles. El cromosoma 9, el cual contiene principalmente satélite-3 en sus regiones pericentroméricas tampoco presentó errores en la segregación cromosómica inducidos por 5-azaC en ninguno de los periodos experimentales (Figura 13).

Las secuencias repetidas presentan menores porcentajes de conversión con las técnicas tradicionales de bisulfito de sodio

Evaluamos la eficiencia de varios tipos de reacciones de bisulfito de sodio para determinar los patrones de metilación en las secuencias repetidas contenidas en las regiones pericentroméricas de los cromosomas con errores en la segregación cromosómica (satélite 2, contenido en los cromosomas 1y 16). Esta técnica consiste en convertir las citosinas no metiladas mediante una reacción química con el bisulfito de sodio, la cual no ocurre en las citosinas metiladas, permitiendo ver cambios puntuales en los patrones de metilación de las secuencias evaluadas (Figura 14).

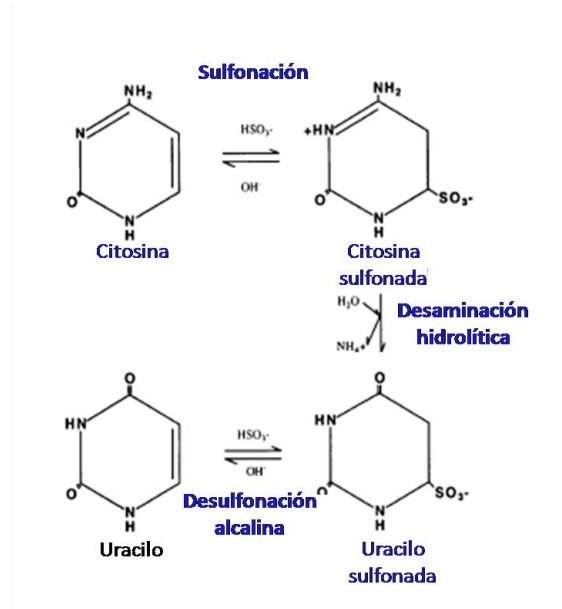


Figura 14. Bases químicas de la reacción de bisulfito de sodio.

Encontramos que tanto el protocolo tradicional,¹⁸⁰ como el modificado,¹⁸¹ así como el kit comercial de conversión con bisulfito (EZ methylation kit, ZYMO RESEARCH), en secuencias únicas, generó conversiones cercanas al 100%, pero resultaron insuficientes para inducir la conversión química de las citosinas no metiladas en secuencias repetidas altamente metiladas tipo satélite 2, provenientes de linfocitos humanos (Figura 15-17). Por otra parte, mediante la técnica de bisulfito con urea, obtuvimos tasas de conversión de citosinas no metiladas superiores al 97% en esta misma secuencia (Figura 18).

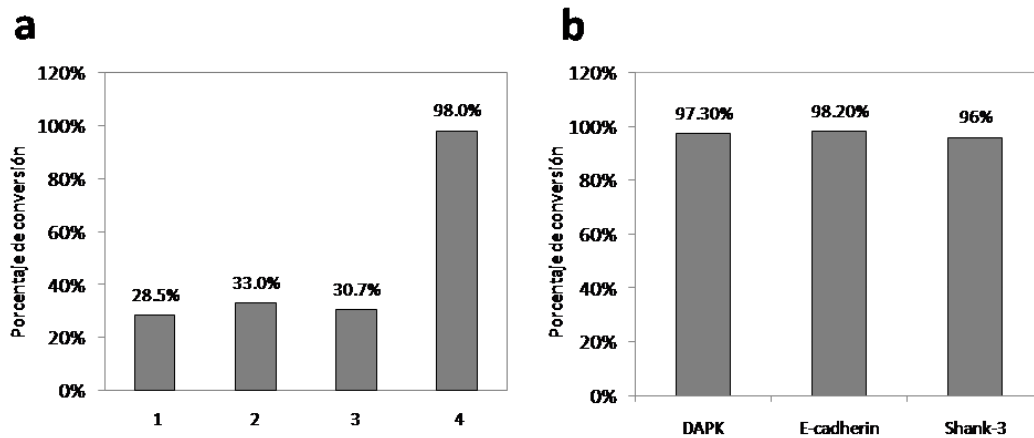


Figura 15. La reacción de bisulfito de sodio difiere entre secuencias únicas y secuencias repetidas en linfocitos humanos. a. Comparación de las tasas de conversión entre tres diferentes conversiones con bisulfito de sodio sobre secuencias repetidas (satélite 2) en linfocitos humanos. 1. Protocolo tradicional. 2. Protocolo modificado. 3. EZ methylation kit (ZYMO). 4. Bisulfito más urea. b. Tasas de conversión de la reacción de bisulfito de sodio modificada en secuencias únicas: DAPK, E-caderina y Shank-3.

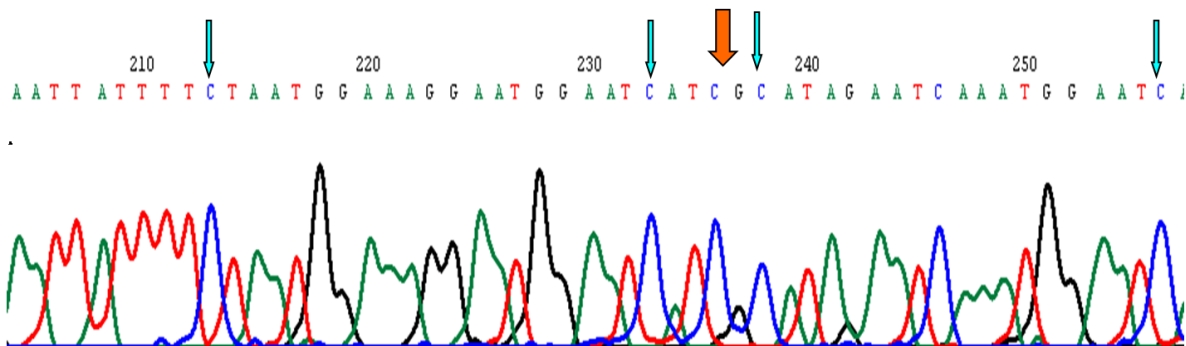


Figura 16. DNA tratado con bisulfito de sodio (protocolo modificado de Warnecke y colaboradores, 2002) mostrado conversiones incompletas en DNA de linfocitos humanos. En flechas verdes se observan las citosinas no-CpG que debieron convertirse luego de la exposición a bisulfito de sodio. La flecha naranja muestra el sitio CpG que efectivamente se debe resistir a la conversión con bisulfito de sodio.

En otras regiones repetidas del genoma (secuencias Alu), también observamos una resistencia relativa a la conversión con el protocolo de bisulfito de sodio modificado sobre DNA de linfocitos humanos (Figura 18).

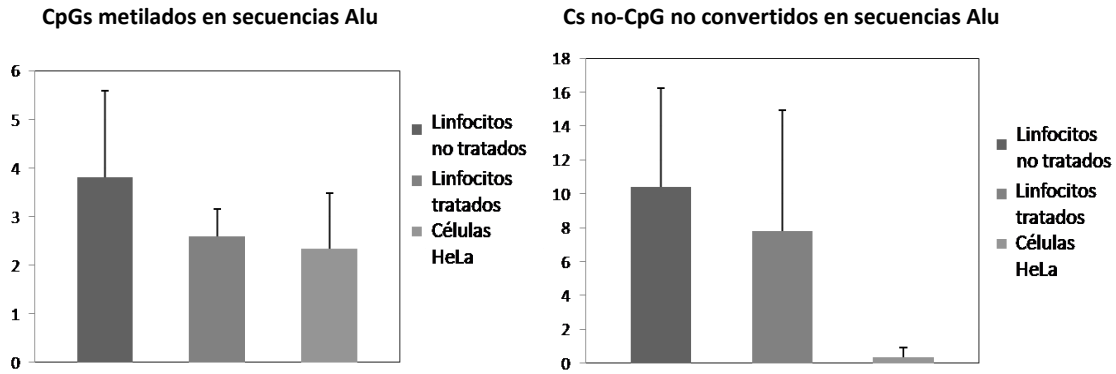


Figura 17. Conversión incompleta de citosinas no-CpG en secuencias repetidas tipo Alu en linfocitos humanos y en células HeLa. El eje de las Y corresponde a la media de citosinas no convertidas con la reacción de bisulfito.

El satélite 2, localizado en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1 y 16, muestra una desmetilación importante asociada a la inestabilidad cromosómica en células humanas adultas.

Dado que la eficiencia en todos los puntos experimentales mediante la técnica de bisulfito de sodio más urea fue superior al 95% (Figura 19), evaluamos el comportamiento de los patrones de metilación en el satélite 2 en el modelo experimental y encontramos una desmetilación importante en los grupos expuestos a 5-azaC, comparado con los controles, con diferencias estadísticamente significativas a 72 h de experimentación ($p < 0.05$) (Figura 18).

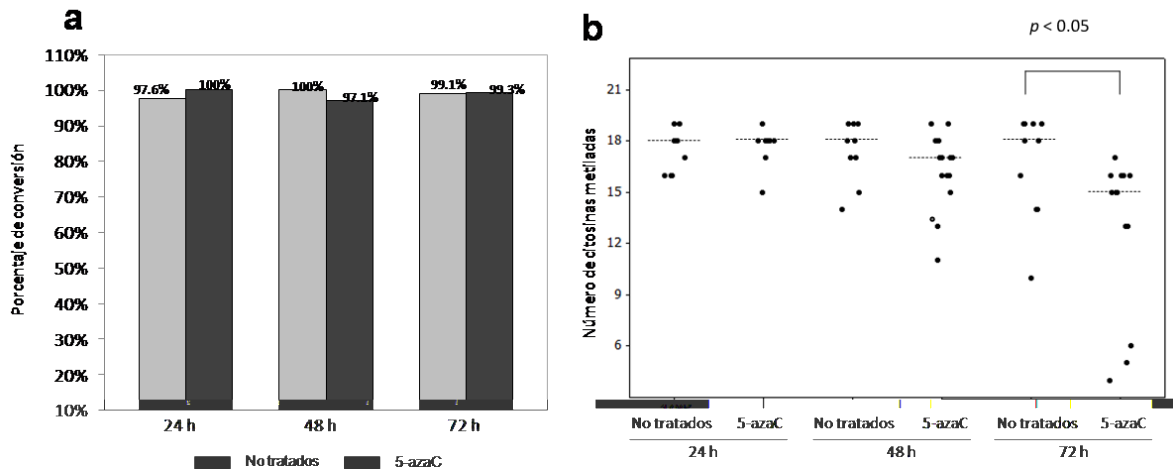


Figura 18. La 5-azacitidina induce desmetilación del satélite 2 y es más intensa a 72 h de exposición en linfocitos humanos. a. Porcentaje de conversión de citosinas no metiladas en el satélite 2 en linfocitos humanos mediante la técnica de bisulfito de sodio más urea. b. Metilación de citosinas en linfocitos tratados con 5-azaC y sus controles en los tiempos de experimentación (24, 48 y 72 h). Las líneas punteadas de la figura b representan la mediana de los valores obtenidos.

En el periodo correspondiente a las 24 h de exposición a 5azaC, los datos sugieren que no existe una desmetilación importante. A las 48 h, aunque la desmetilación es más evidente, no alcanzó significancia estadística. Adicionalmente, al analizar los resultados de la metilación, clona por clona, no encontramos un patrón de desmetilación específico entre clonas, sugiriendo que la desmetilación inducida por 5-azaC pudiera llegar a ser azarosa en este modelo celular (Figura 19).

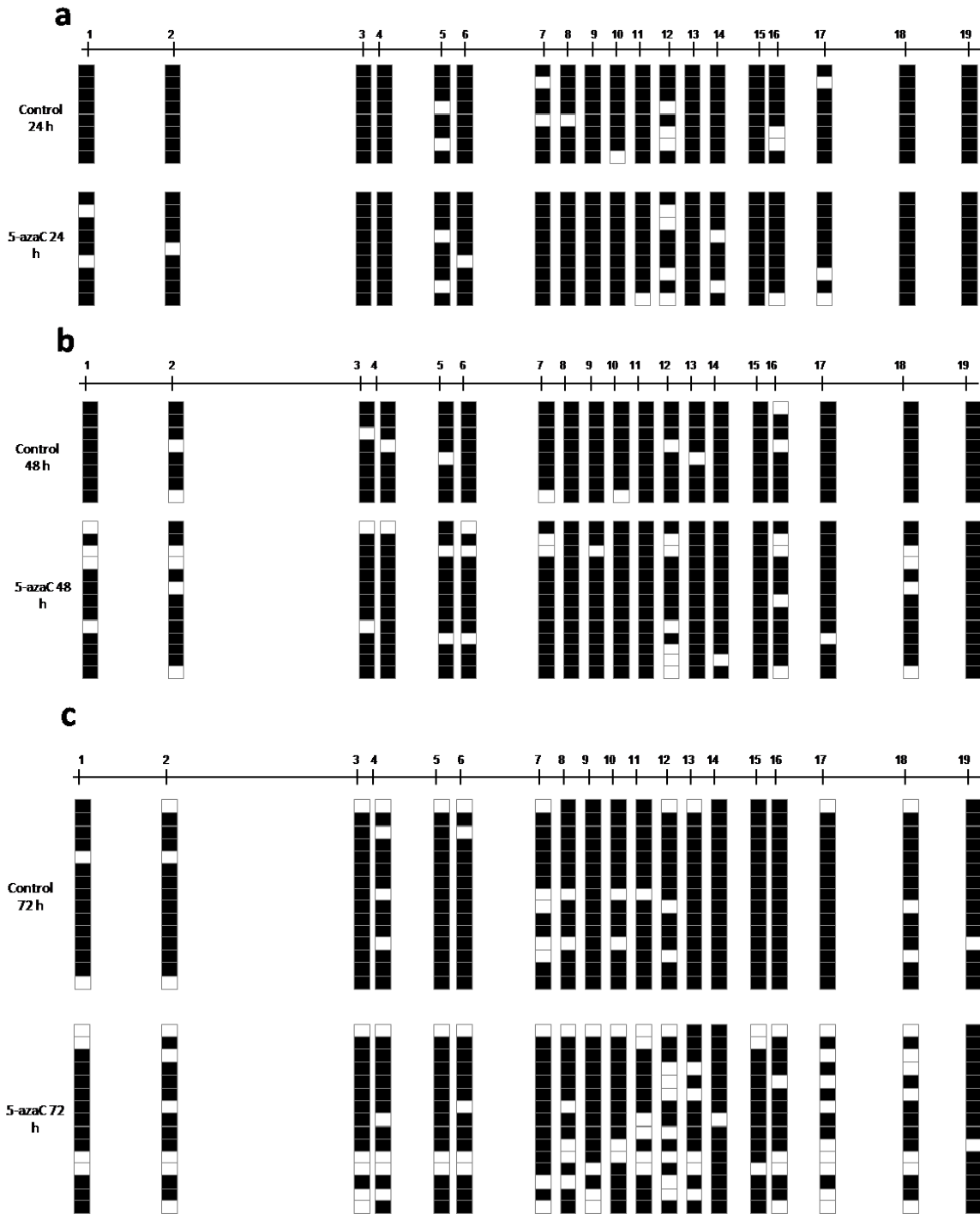


Figura 19. Patrones de metilación del satélite 2 en todos los puntos experimentales. A. 24h. B. 48h. C. 72h. Cada línea representa cada una de las clonas secuenciadas.

La exposición a 5-azaC afecta la expresión de la DNMT3A pero no de la DNMT1 ni de la DNMT3B en linfocitos humanos

Analizamos la presencia de las principales DNA metiltransferasas en seres humanos, la DNMT1, DNMT3A y DNMT3B en el mismo modelo de linfocitos. El análisis de Western-blot no mostró diferencias en cuando a la DNMT1 ni a la DNMT3B tanto en grupos controles como en linfocitos tratados con 5-azaC. Sin embargo, la DNA metiltransferasa *de novo* DNMT3A mostró una tendencia a estar disminuida en los grupos tratados con 5-azaC. El análisis densitométrico mostró una reducción del 18, 16 y 12% a las 24, 48 y 72 h respectivamente, aunque estos hallazgos no fueron estadísticamente significativos (Figura 20).

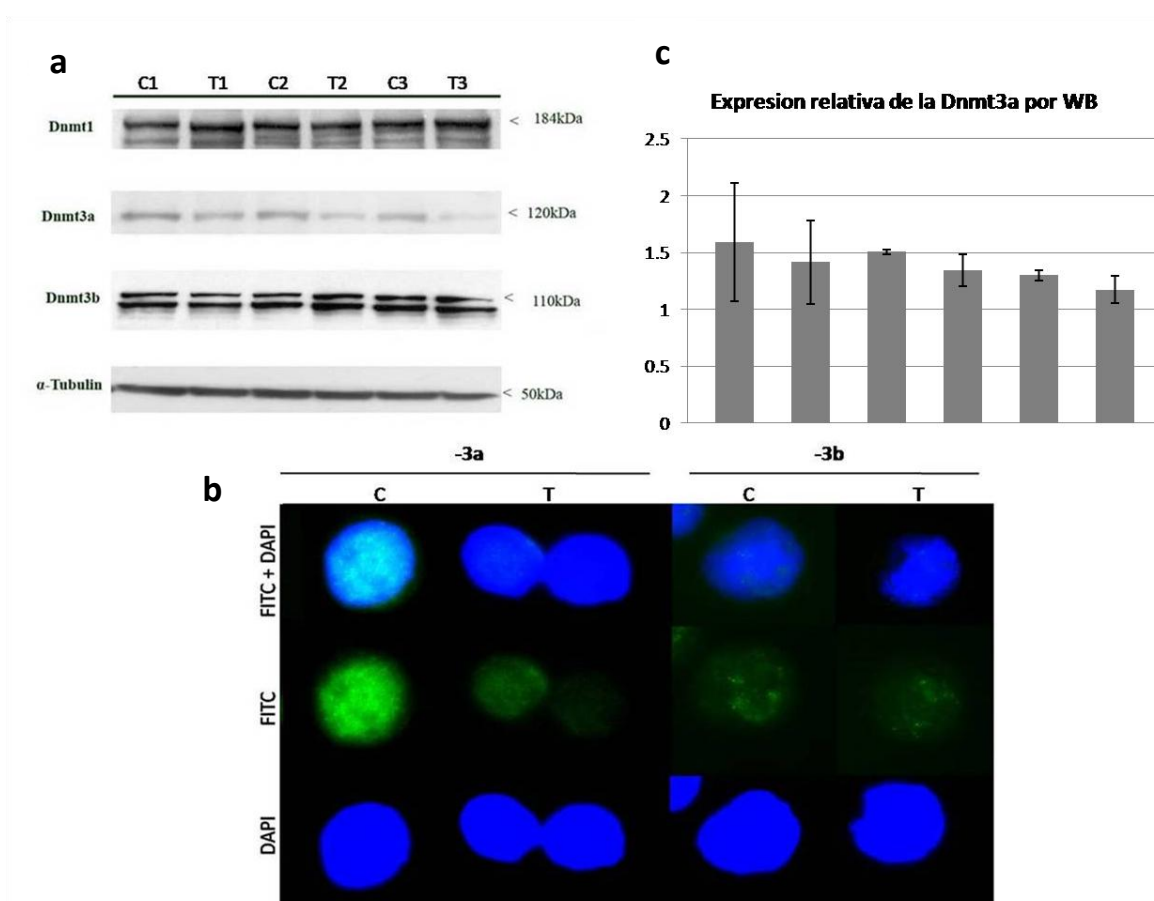


Figura 20. Expresión de las DNA metiltransferasas en linfocitos humanos expuestos a 5-azaC y sus controles. A. Western-Blot de la DNMT1, DNMT3A and DNMT3B. Se usó la α -tubulina como control de carga. B. Inmunofluorescencia de la DNMT3A y DNMT3B en linfocitos humanos a 24 h de experimentación. C. Expresión relativa de la DNMT3A. C= Control. T= Tratado con 5-azaC.

La inmunolocalización de las DNMTs *de novo*, DNMT3A y DNMT3B confirmaron las observaciones del Western-blot, indicando nuevamente que la DNMT3A estaba alterada en los grupos tratados con 5-azaC a las 24 h de tratamiento (Figura 26B), con una mediana de 805 UD (unidades de densitometría) (IC 95%: 774-835) para los grupos controles contra 690 UD (IC 95% 671-710) en los grupos tratados ($p < 0.01$). Dicha disminución se observó también a las 48 y 72 h, con una mediana de 1157 para los controles (IC 95%: 1114-1201) y de 1017 (IC 95%: 968-1066) para las células tratadas a las 48 h ($p < 0.01$) y una mediana de 935 UD (IC 95%: 918-952) para el grupo control y de 727 (IC 95%: 709-748) para las células tratadas a las 72 h ($p < 0.0001$). Estos datos sugieren una depleción progresiva de la DNMT3A en linfocitos humanos en respuesta a la 5-azaC. No encontramos diferencias en la expresión de la DNMT3B en los grupos controles vs. tratados.

DISCUSIÓN

Aneuploidías

Las causas de los fenómenos de inestabilidad cromosómica y de aneuploidías son poco conocidas, sin embargo, sabemos de su presencia en algunas condiciones patológicas, como en abortos, síndromes congénitos y en cáncer. La aneuploidía ha sido reportada en lesiones pre-malignas, como adenomas colorrectales¹⁸³ y en el esófago de Barrett,¹⁸⁴ sugiriendo que es un evento temprano dentro de la carcinogénesis, sin embargo, sabemos muy poco de los fenómenos causantes de la aneuploidía en células adultas y se ha sugerido como un evento clave dentro del proceso carcinogénico, dada la importancia de la aneuploidía en la generación de heterogeneidad fenotípica a nivel celular dentro de un tejido y dada también la importancia de la heterogeneidad en la supervivencia de las células cancerosas.⁶³

Se han propuesto algunos mecanismos como responsables de la aneuploidía, como por ejemplo la formación de uniones merotéticas, mutaciones o expresión aberrante de los genes del punto de monitoreo de mitosis, etc. De hecho, cuando se modifica la expresión de los genes responsables del punto de monitoreo de mitosis, como MAD2 y BUBR1, es posible ver fenómenos de aneuploidía, tanto en modelos *in vitro* como en modelos animales.¹⁸⁵ Estos resultados han sido controversiales, porque estudios recientes han mostrado en células cancerosas con un grado importante inestabilidad cromosómica, un correcto alineamiento de los cromosomas en metafase y un retardo en la anafase, lo que sugiere un punto de monitoreo funcional.¹⁷

Durante muchos años se ha sabido que las alteraciones epigenéticas están relacionadas con múltiples formas de inestabilidad cromosómica, sin embargo, usualmente no se consideran a los factores epigenéticos como importantes contribuyentes de la aneuploidía en mamíferos ni de sus consecuencias.¹²

La desmetilación pericentromérica se asocia con errores en la segregación cromosómica

En nuestro estudio hemos evaluado los patrones de metilación en el satélite 2, el cual está localizado en las regiones pericentroméricas en linfocitos humanos y hemos encontrado una asociación entre desmetilación de esta región con la presencia de errores en la segregación de cromosomas.

Ciertas evidencias señalaban previamente una relación entre la inestabilidad cromosómica y la desmetilación pericentromérica en mamíferos. Una de ellas proviene del síndrome ICF, una enfermedad caracterizada múltiples formas de inestabilidad cromosómica e hipometilación de regiones específicas generadas, al parecer, por mutaciones en la DNMT3B.¹⁸⁶⁻¹²⁵

La segunda evidencia proviene de las enfermedades neoplásicas, las cuales están estrechamente relacionadas con inestabilidad cromosómica. Se estima que el 90% de las neoplasias sólidas presentan aneuploidías y se ha descrito hipometilación pericentromérica en varios tipos de cánceres, incluyendo cáncer de mama¹³⁴, tumores de Wilms¹³⁶, tumores de ovario,¹³⁶ hepatocarcinoma¹³³ y en carcinomas uroteliales.¹³⁵

La hipometilación pericentromérica en estos cánceres se ha correlacionado con una menor diferenciación histológica, una mayor invasividad, pérdida de la heterocigosidad y un peor pronóstico en los individuos afectados, sugiriendo un papel importante de la metilación pericentromérica sobre las características fenotípicas de las células cancerosas, dependientes posiblemente de la inestabilidad cromosómica asociada, aunque esta hipótesis no ha sido probada aún.

Las causas de la hipometilación pericentromérica y de otras secuencias repetitivas del genoma en las células cancerosas son inmensamente desconocidas, sin embargo, estos cambios están asociados con activación de retrotransposones, cambios en los patrones de expresión génica,¹²³ pérdida de la impronta génica e inestabilidad cromosómica.¹⁸⁷

En nuestro estudio, se observó una desmetilación progresiva en las regiones pericentroméricas de las células tratadas con 5-azaC en todos los periodos experimentales (24, 48 y 72 h) y una ligera disminución en los linfocitos no tratados en el último periodo de experimentación (120 h de cultivo). También se observaron errores en la segregación cromosómica en las células tratadas en cada periodo experimental y en los controles en el último periodo de experimentación. El análisis estadístico de los errores en la segregación de cromosomas específicos mostró una asociación entre el tratamiento y la presencia de aneuploidía que involucraba a los cromosomas con satélite 2 en sus regiones pericentroméricas, como el 1 y el 16 pero no a los cromosomas con otros tipos de satélites, como el cromosoma 9 y el cromosoma Y. El cromosoma Y se usó como control

interno, dado que contiene regiones heterocromáticas altamente metiladas no pericentroméricas.¹⁷⁷

La desmetilación de las secuencias satélites se sabe que puede llegar tener consecuencias importantes, como por ejemplo, se ha reportado que la desmetilación del satélite 3 y el centrómero,¹⁸⁸⁻¹⁸⁹ puede llegar a activar la transcripción de estas regiones de heterocromatina.

Desmetilación y su efecto sobre la estabilidad cromosómica

La sustancia desmetilante usada, la 5-azaC, es un potente agente desmetilante conocido y ha sido utilizada en muchos modelos para demostrar el efecto de la desmetilación del DNA sobre procesos celulares. Aunque su vida media es relativamente corta (6 h), nosotros hemos observado un efecto a largo plazo sobre la metilación pericentromérica. De forma interesante, los mayores efectos sobre la segregación cromosómica inducidos con 5-azaC ocurrieron en el último periodo experimental, sugiriendo una acumulación de daño en las células tratadas. Estudios similares han encontrado que las alteraciones en los patrones de metilación pueden mantenerse aún en ausencia de la sustancia desmetilante y hasta después de muchos ciclos celulares.¹⁰⁰ Así mismo, nosotros observamos cambios importantes en los patrones de metilación cromosómica tardíos, los cuales pudieran tener una alta relevancia en la inducción de heterogeneidad celular que acompaña a la aneuploidía y que pudieran contribuir en un proceso carcinogénico.

Otros estudios han encontrado la formación de micronúcleos en células humanas tratadas con 5-azaC, los cuales contenían no sólo a los cromosomas 1 y 16, sino también a los cromosomas 6, 9, 15, 20 y Y, sin embargo, estos estudios evaluaron solamente efectos a corto plazo (7 h) y fue llevado a cabo sobre células mononucleadas, siendo posible atribuir estos resultados al efecto clastogénico de esta sustancia.¹⁹⁰

Para evitar esta posibilidad, nosotros evaluamos los linfocitos humanos mediante la técnica de citocinesis bloqueada durante las últimas 24 h de cultivo, permitiendo la evaluación de los errores en la segregación en el último periodo de división celular, durante por lo menos tres divisiones celulares consecutivas. También, para evitar la posibilidad de detectar fragmentos cromosómicos, usamos sondas dirigidas contra las regiones pericentroméricas, lo que resulta en la detección de cromosomas completos.¹⁹¹

Nuestros resultados sugerían un papel importante de la metilación pericentromérica en aquellos cromosomas con satélite 2 altamente metilado, para asegurar una adecuada segregación, por lo que decidimos evaluar los patrones específicos de metilación en dicha secuencia.

Técnica de bisulfito de sodio, modificaciones e impacto sobre los patrones de metilación de secuencias repetidas

Decidimos evaluar los patrones de metilación del DNA en el satélite 2 mediante una técnica que nos permitiera detectar cambios puntuales sobre la metilación de las citosinas de estas regiones repetidas, por lo que usamos la técnica de bisulfito de sodio más urea y secuenciación.

El satélite 2 es una secuencia repetida localizada preferencialmente sobre las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1 y 16 y se le considera como una de las secuencias más abundantes en el genoma, con una organización de alto orden de repetidos en tándem, considerándose que representa hasta el 2% del genoma.¹⁹² Dada la complejidad de su composición y de su organización, estas regiones no han sido estudiadas previamente, incluso en grandes y recientes estudios epigenómicos.^{68,87} El satélite 2 se compone de repeticiones de 23 a 25 pb de una secuencia consenso y se considera una región con una baja tasa de transcripción. El satélite 2 contiene diferentes niveles de metilación en cada tejido, de tal manera que los fibroblastos muestran un 69% de metilación, los espermatozoides un 29% y las líneas linfoblastoides derivadas de pacientes con ICF muestran un 20% de metilación en sus regiones pericentroméricas.¹²⁷

La secuenciación de DNA posterior a la reacción de bisulfito de sodio, a pesar de haber sido descubierta hace más de 30 años, continúa siendo el estándar de oro para los análisis de metilación del DNA para cualquier tipo celular.¹⁹³

La técnica consiste en la conversión de citosinas no metiladas a uracilos a través de una desaminación hidrolítica, conservando intactas las citosinas metiladas mediante una reacción química mediada por el bisulfito de sodio. Dicha reacción se lleva a cabo sobre DNA de cadena sencilla a pH 5.0. Esta técnica, denominada “conversión con bisulfito” ha sido probada en múltiples organismos y en diversos tipos celulares. Esta reacción química puede generar falsos positivos en caso de conversiones incompletas de citosinas no metiladas.

Aunque se han adicionado varias modificaciones a la técnica original para mejorar la eficiencia y disminuir las conversiones incompletas, la base de la conversión con bisulfito sigue siendo la misma. Dentro de las modificaciones reportadas se encuentran: la reducción del tamaño del DNA mediante enzimas de restricción,¹⁹⁴ la introducción de múltiples pasos de desnaturalización durante la conversión,¹⁹⁴ llevar a cabo la reacción química con formamida¹⁹⁵ e incluso desarrollar la reacción a 0°C,¹⁹⁶ entre otras. Otra de las modificaciones reportadas a la técnica es la adición de urea previa a la exposición química con bisulfito de sodio y modificaciones a las temperaturas durante la desnaturalización del DNA. Dicha técnica ha sido probada para secuencias únicas por Paulin y colaboradores,¹⁸² pero otros grupos han discutido su eficiencia, dado que no han encontrado una mejoría en función del tiempo requerido para lograr una desaminación completa de las citosinas no metiladas, por lo que esta técnica ha caído en desuso.¹⁹⁷⁻¹⁹⁸ Este tratamiento al parecer no afecta el estado de metilación de las citosinas en el DNA, o la reacción normal del bisulfito sobre los residuos de citosinas¹⁸² y a pesar de las críticas recibidas ha sido usado por otros grupos.¹⁹⁹

Nosotros hemos encontrado que tanto el protocolo tradicional,¹⁸⁰ como el modificado,¹⁸¹ así como un kit comercial de conversión con bisulfito (EZ methylation kit), generan conversiones completas en secuencias únicas pero resultan insuficientes para inducir la conversión química de las citosinas no metiladas en secuencias repetidas altamente metiladas tipo satélite 2, provenientes de linfocitos humanos. De forma similar, encontramos que secuencias repetidas tipo Alu también pueden presentar resistencia a la conversión mediante las técnicas convencionales. Por lo tanto, para lograr una conversión

superior al 95% hemos llevado a cabo la técnica de bisulfito con urea,¹⁸² donde el DNA es tratado químicamente con urea durante la reacción de bisulfito y posteriormente es sometido a ciclaje de temperaturas (95°C-55°C; 20 ciclos) para mejorar la exposición de las cadenas sencillas al bisulfito de sodio. Mediante esta técnica obtuvimos tasas superiores al 97% de conversión de citosinas no metiladas en secuencias repetidas altamente metiladas, provenientes de linfocitos humanos en más de 80 clonas no redundantes.

Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de alta eficiencia de modificación con bisulfito más urea en secuencias repetidas en células con niveles normales o elevados de metilación global, como ocurre con las células somáticas adultas, lo cual puede ser relevante para ser usado como técnica diagnóstica en patologías donde se vea afectada estas regiones¹²⁵ y por lo tanto, con una potencial aplicabilidad clínica.

Pocos son los estudios que han evaluado la metilación del satélite 2 en linfocitos humanos, y aquellos que lo han llevado a cabo han descartado las clonas que presenten conversión incompleta de citosinas no CpG, sesgando los resultados obtenidos.¹²⁷ Existen otros reportes de metilación en sitios no-CpG en mamíferos²⁰⁰⁻²⁰¹ (incluso en cáncer),²⁰²⁻²⁰³ los cuales, bajo la luz de nuestros resultados, valdría la pena corroborarlos en un abordaje similar al nuestro (bisulfito más urea) para poder confirmar su existencia.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En nuestro estudio, hemos correlacionado la desmetilación pericentromérica con la inducción de aneuploidía y hemos encontrado que la desmetilación inducida por 5-azaC se asocia con la presencia de errores en la segregación cromosómica de los cromosomas 1 y 16, pero no de los cromosomas 9 y Y, y proponemos que esta modificación pudiera estar relacionada con una disminución en la DNMT3A y posiblemente con su conformación estructural sobre el satélite 2.

Aunque la desmetilación pericentromérica se ha descrito previamente, este es el primer trabajo de asociación entre alteraciones en la metilación pericentromérica con la generación de errores en la segregación cromosómica en células somáticas adultas. De forma interesante, en células HeLa, una línea celular derivada de adenocarcinoma de cérvix con un alto grado de inestabilidad cromosómica y aneuploidía, con una moda de 76-80 cromosomas por metafase,²⁰⁴ observamos una escasa metilación en el satélite 2, lo que fortalecería nuestros hallazgos en células humanas adultas.

La asociación observada de errores en la segregación por desmetilación están acordes con otros estudios que usaron exposiciones a corto plazo a 5-azaC,²⁰⁵ y con estudios realizados mediante FISH sobre líneas linfoblastoides provenientes de pacientes con el síndrome ICF,²⁰⁶ lo que sugiere que la metilación del satélite 2 juega un papel muy importante en la estabilidad cromosómica y en la prevención de los errores en la segregación cromosómica en células somáticas adultas.

La metilación del DNA, aunque ha sido una de las modificaciones epigenéticas más estudiada, tienen aún un gran futuro, pues se desconocen muchos de los mecanismos que inician, mantienen y modifican los patrones de metilación y que modifican la estructura de la cromatina y puedan llegar a influenciar la expresión génica y la estabilidad de la heterocromatina. Además, existen estudios recientes que ha retado la idea de la metilación del DNA como una marca de cromatina compactada y silenciada.⁶⁸

Es importante continuar estudiando el efecto de las modificaciones epigenéticas sobre la estabilidad cromosómica en células humanas adultas. Recientemente se publicó un estudio, donde se encontró que las mutaciones en la DNMT3A, la misma enzima que nosotros encontramos alterada en nuestro modelo experimental, está mutada en el 22.1% de una cohorte de 281 pacientes con leucemia mieloide aguda.¹⁴⁰ De manera interesante, los pacientes que presentaron mutaciones presentaron mayor grado de alteración citogenética, sugiriendo un efecto importante de las modificaciones en la metilación del DNA sobre la estabilidad cromosómica en estos pacientes.

Es necesario continuar también con el estudio de los patrones de metilación en metafase, usando sustancias como la tricostatina, dado su papel como modificador de la acetilación de las histonas y su efecto secundario sobre la metilación del DNA,²⁰⁷ así como su efecto sobre la estabilidad cromosómica y sobre la adecuada segregación cromosómica. Igualmente, es importante determinar si los efectos observados sobre los patrones de metilación a corto y a mediano plazo son similares con otras sustancias que alteren de otra manera, los patrones de metilación del DNA.

Otras regiones de heterocromatina que requieren mayor estudio son las regiones subteloméricas, las cuales comparten varias características con las regiones de heterocromatina pericentromérica. Aunque no era el objetivo de nuestro estudio, pudimos llegar a notar que estas regiones pueden presentar hipermetilación en respuesta a algunas sustancias químicas, como la etionina. Estas regiones se sabe que juegan un papel importante en la estabilidad cromosómica, evitando las asociaciones teloméricas y evitando el inicio de ciclos de ruptura/re-asociación/ruptura de cromosomas, asociados con la generación de inestabilidad cromosómica en cáncer.

Igualmente, otro de los factores que debe ser estudiado es la presencia de isoformas de las DNA metiltransferasas, algunas de las cuales han sido evidenciadas en nuestro modelo experimental. Se sabe que la prácticamente todas las DNMTs presentan isoformas, y se sabe también que la presencia de estas puede llegar a competir con las isoformas mayores, alterando los patrones de metilación normales.²⁰⁸ Se tienen pocos datos acerca del papel que puedan llegar a tener estas isoformas en la generación de hipometilación de regiones repetidas en cáncer y en la generación de patrones de metilación aberrante.

Algunas formas de inestabilidad cromosómica que observamos durante nuestro estudio, como son los cromosomas radiados y cromosomas encurvados inducidos por 5-azaC, también merecen mayor estudio (Figura 21 y 22).

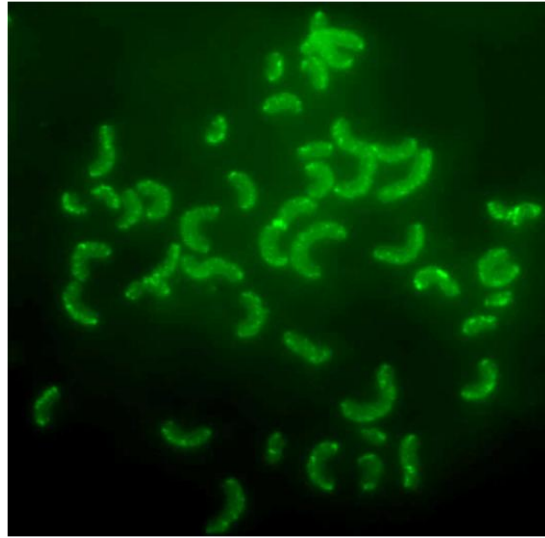


Figura 21. Encurvamiento de los cromosomas hacia la cromátida desmetilada proveniente de linfocitos humanos tratados con 5-azaC.

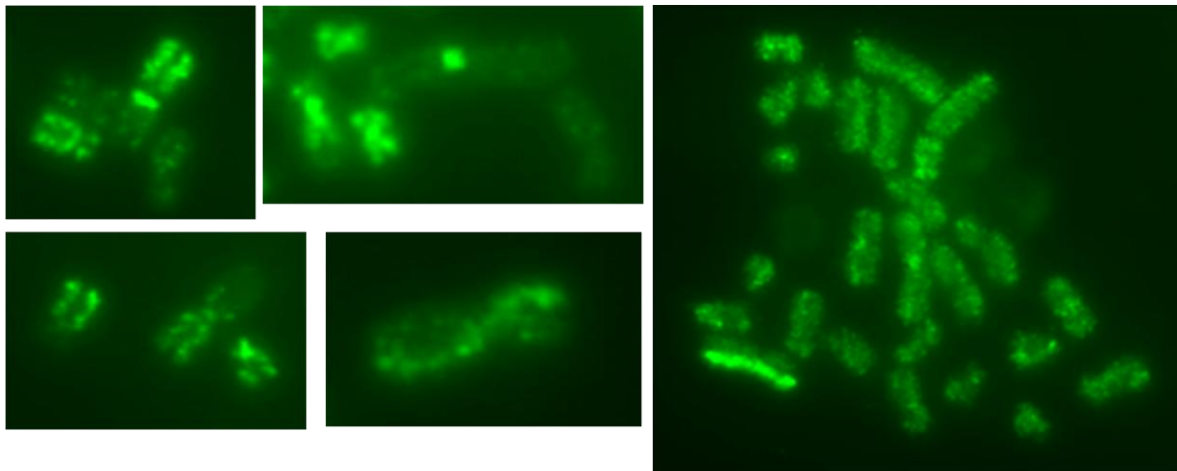


Figura 22. Metilación aberrante observada en linfocitos humanos después de varios ciclos de desmetilación.

Otra área de gran importancia como una continuación de este trabajo es la de interacciones de proteínas con las regiones de heterocromatina, como por ejemplo HP1 y proteínas del cinetocoro con DNA metilado en las regiones de heterocromatina, las cuales

podrían ser fundamentales para la prevención de la generación de errores en la segregación cromosómica.

Otro proyecto interesante a realizar, como continuación de los experimentos realizados, es la comprobación *in vitro* del efecto de la DNMT3A humana sobre cromatina artificial con patrones conocidos de distancias entre citosinas CG y del efecto que tiene el patrón de distancia observado en el satélite 2 sobre la adecuada metilación de esta enzima, con y sin modificaciones en las histonas, lo que podría sacar a la luz los mecanismos asociados a la generación de la metilación *de novo*, los cuales son inmensamente desconocidos.

Igualmente, un proyecto que evalúe los patrones de metilación pericentromérica en líneas de cáncer con inestabilidad cromosómica podría llevar a encontrar marcadores de susceptibilidad para la generación aneuploidías y de heterogeneidad celular, la cual se sabe, contribuye a la malignidad de las células cancerosas.

ANEXO I. Componentes de la segregación y la estabilidad cromosómica

La segregación cromosómica

La transmisión del material genético es un proceso esencial para la vida. Durante el ciclo celular, la división es un momento clave, pues se garantiza la generación de una nueva célula con características idénticas a las de su progenitora.

La distribución del material genético ocurre específicamente durante la mitosis, la cual consiste en la separación de las cromátidas de cada cromosoma (segregación cromosómica) y posterior migración de estas hacia los polos opuestos de cada una de las células hijas (Figura 1).

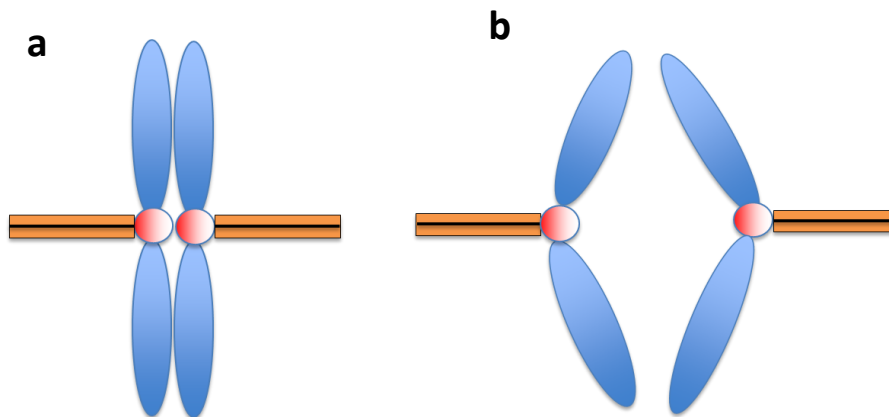


Figura 1. Separación de cromátidas durante la mitosis. a. Alineamiento de cromátidas hermanas durante la metafase. b. Separación de las cromátidas a partir del centrómero.

Se requieren dos procesos para lograr una adecuada segregación: por una parte se requiere de la maquinaria de segregación cromosómica, donde participan los microtúbulos, los centrosomas, los cinetocoros, las cohesinas, las separasas, un adecuado funcionamiento del punto de monitoreo de mitosis y muchas otras proteínas. Por otra

parte, se requiere de una adecuada estabilidad del material genético, estructurado en cromosomas, los cuales dependen de una adecuada organización de los telómeros, de los centrómeros, de las cohesinas, así como de las regiones pericentroméricas y subteloméricas y de la adecuada organización de la cromatina en todo el genoma.

En la transición de metafase a anafase, la cohesión entre cromátidas hermanas se pierde, tanto por acción catalítica como por el movimiento físico que le imprimen los microtúbulos y permite que cada una de las cromátidas se mueva hacia los polos opuestos de la célula por acción de los microtúbulos del huso mitótico. La separación prematura de las cromátidas puede llevar a errores en la segregación cromosómica y a aneuploidía en las células hijas.

La maquinaria de segregación cromosómica

Muchos de los mecanismos involucrados en la segregación cromosómica han sido descubiertos en levaduras y en *Drosophila*, sin embargo, se sabe que muchos de ellos se encuentran altamente conservados o son muy similares en mamíferos.

Para que ocurra una adecuada segregación cromosómica se requiere de una compleja maquinaria de microtúbulos, que se conectan a estructuras específicas, denominadas cinetocoros, para poder separar las cromátidas hermanas. Durante el proceso de segregación cromosómica las cromátidas hermanas se separan a partir del centrómero y posteriormente son liberadas completamente durante la anafase, luego de que las cohesinas se degradan (Figura 1).

Cinetocoros y otras proteínas del centrómero

Una estructura esencial para la segregación cromosómica son los cinetocoros. Los cinetocoros son complejos proteicos que se ensamblan en el centrómero de cada cromátida hermana y se ligan a las partes libres de 20-25 microtúbulos que emanan de los husos mitóticos (llamados fibras k), los cuales median la unión entre los cromosomas y los microtúbulos. Sin embargo, más allá de ser un simple *linker*, el cinetocoro provee una conexión física, controla el posicionamiento de los cromosomas, regula su unión a los microtúbulos, activa el punto de monitoreo de la mitosis (del cual hablaremos más adelante) y retrasa la progresión hacia la mitosis hasta que se logre la bi-orientación adecuada (es decir, la orientación de las cromátidas a cada uno de los polos).²¹⁰ De acuerdo a estudios proteómicos realizados sobre cromosomas de vertebrados, se estima que el cinetocoro contiene más de 100 proteínas, además de las 125 proteínas conocidas del centrómero, lo que posiciona al cinetocoro es una de las subestructuras celulares más complejas.²¹¹

Los cinetocoros están conformados por dos regiones: una interna, la cual se asocia fuertemente al DNA centromérico, la cual persiste durante todo el ciclo celular e interactúa con CENP-A y contiene además otras proteínas auxiliares. La región externa, interactúa con los microtúbulos y posee varios componentes que se ensamblan durante cada división celular. La placa externa se forma cuando la envoltura nuclear desaparece durante la mitosis.

La primera proteína en ser ensamblada en el cinetocoro es CENP-A (Cse4), la cual es una isoforma de la histona H3. Esta proteína se requiere para la incorporación de las proteínas de la región interna del cinetocoro como CENP-C, CENP-H y CENP/MIS6. Algunos de los componentes se mantienen como elementos estables de la región externa del cinetocoro desde la profase hasta la anafase, como ocurre con Ndc80, KNL/KBP, y proteínas MIS y CENP-F.

El centrosoma, los microtúbulos y el huso mitótico

En células humanas, la separación de los centrosomas, así como la formación de un huso mitótico bipolar es esencial para una correcta segregación cromosómica. Los microtúbulos son estructuras filamentosas que se reorganizan durante la mitosis para conectar los cromosomas con los polos opuestos dentro de una célula. Los sitios donde se organizan estos microtúbulos se denominan centros organizadores de los microtúbulos o MTOCs. La cohesión centromérica se resiste a las fuerzas ejercidas por los microtúbulos del huso mitótico hacia los polos, lo que genera tensión entre los cinetocoros de las cromátidas hermanas. Esta tensión estabiliza la unión entre los microtúbulos y el cinetocoro, a través de un mecanismo que involucra a Aurora B.

Los centrosomas son los organelos que sirven como centro organizadores de microtúbulos. Se cree que estos organelos han evolucionado solamente en la línea metazoaria de las células eucariontes. Aunque los centrosomas juegan un papel eficiente durante la mitosis, se sabe que no son organelos esenciales. Durante la interfase, los centrosomas se mantienen unidos por proteínas conocidas como C-Nap1 y rootletinas. Al

inicio de la mitosis, estas proteínas (llamadas *linkers*) se fosforilan y se alejan de los centrosomas por intervención de la cinasa Nek2A, la cual se regula por dos componentes de la vía Hippo: Mst2 cinasa y la proteína de sostén hSav1. Recientemente, Mardin y colaboradores,²¹² reportaron que las cinasas *Polo-like*, funciona rio arriba de la cinasas Mst2-Nek2A en la disyunción de los centrosomas mediante la fosforilación de Mst2. La ausencia de fosforilación de Mst2 promueve el ensamblaje del complejo Nek2A-PP1γ-Mst2, en donde PP1γ interactúa con la cinasa de Nek2A. Por otra parte, la fosforilación por parte de Plk1 de Mst2 previene la unión de PP1γ a Mst2-Nek2A, permitiendo la actividad de Nek2A para promover la disyunción del centrosoma. Este grupo propone que la disyunción de los centrosomas se regula por Plk1, el cual induce un balance entre la interacción de Nek2A y PP1γ en la unión de los centrosomas. Se sabe también que la cinasa Polo/Cdc5 fosforila los residuos de serina en los sitios de corte de Scc1 cercanos, de tal manera que la fosforilación facilita la actividad de corte de esta enzima.²¹³

Posterior a la segregación cromosómica, los centriolos pierden su estrecha organización ortogonal, la cual permite la duplicación posterior de los centrosomas en la fase S del ciclo celular. Se sabe que la separasa está involucrada en la pérdida de la unión de los centriolos, sin embargo, pocos estudios han evaluado el proceso detrás de esta separación. Stemmann y colaboradores han postulado a las cohesinas como el factor que mantiene unidos no sólo a las cromátidas sino también a los centrosomas. Este grupo encontró que se induce, tanto una separación prematura de cromátidas hermanas, como una pérdida de la unión de los centriolos por la activación de separasas ectópicas o por la depleción de Sgo1 (shugoshina1, protector de las cohesinas). Estos eventos se suprimen

por la expresión de Scc1 que no permite su clivaje o por la inhibición de la vía de la profase. Cuando se reemplaza Scc1 por un Scc1 que permite su clivaje, las proteasas específicas inician el des-ensamblaje de los centriolos. De la misma manera, la separación de los centriolos puede ser inducida mediante el clivaje de un Smc3 artificial. Por lo tanto, se considera que los ciclos del centrosoma y de los cromosomas muestran características muy similares y se coordinan entre sí por el uso de complejos de anillos de cohesinas.²¹⁴

Se sabe que pequeñas cantidades de Scc1 se mantienen asociadas a los centrómeros en células humanas incluso hasta la metafase, y se cortan cantidades similares durante la anafase, donde desaparece de los centrómeros.²¹⁵ Otros experimentos han mostrado que la cohesión de las cromátidas hermanas en los brazos de los cromosomas se pierde gradualmente después de que los centrómeros se han separado y las cromátidas hermanas se mueven hacia los polos opuestos de las células.²¹⁶

Microtúbulos

Los microtúbulos son componentes fundamentales del esqueleto de la célula y juegan un papel crucial en la segregación cromosómica. Se trata de polímeros de alfa y beta tubulina altamente dinámicos, que sirven de soporte a muchas otras proteínas, como la cinesina y la dineina. Los monómeros de tubulina se polimerizan extremo a extremo cuando una subunidad de un dímero de alfa tubulina tiene contacto con otra de beta tubulina. Se ha postulado que en el protofilamento existen extremos negativos y extremos positivos, presentando extremos positivos solamente con subunidades beta y en el otro sólo subunidades alfa. La elongación ocurre en el extremo denominado como positivo.

Durante la segregación cromosómica los microtúbulos se encuentran en un estado altamente dinámico de polimerización y despolimerización, que tiene como objetivo proveer suficiente fuerza a la conglomeración de los cromosomas durante el alineamiento de estos durante la metafase.²¹⁷ Los microtúbulos son blanco de sustancias químicas como los taxanos (paclitaxel o docetaxel) u otros medicamentos como la vincristina, usados para bloquear la proliferación de las células cancerosas, dada la importancia de la elevada proliferación celular para la generación de tumores.

El punto de monitoreo de la mitosis

El punto de monitoreo de mitosis es un mecanismo de control del ciclo celular, que asegura la adecuada segregación cromosómica a través de la restricción que genera sobre moléculas que actúan en la separación de las cromátidas. Inicialmente, se postuló como componentes del punto de monitoreo a MAD1 (del inglés, *mitotic-arrest deficiency*), MAD2, BUB1 (*budding uninhibited by benzimidazole*), BUB3y MAD3 (BUBR1). Estos genes está conservados en todos los eucariontes y constituyen la vía del punto de monitoreo de la mitosis (PMM).²¹⁸ Este punto de monitoreo tiene como blanco a CDC20 un co-factor del complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) (Figura 2). El PMM regula negativamente la capacidad de CDC20 para activar el APC/C contra sus sustratos: ciclina B y securina, evitando su destrucción por el proteosoma 26S. La securina es un inhibidor de la separasa, una proteína clave en la mantener unidas las cromátidas y cuya destrucción es clave para llevara a cabo la anafase. Por otra parte, la proteólisis de la ciclina B inactiva la cinasa mitótica maestra CDK1, la cual promueve la salida de la mitosis.²¹⁸

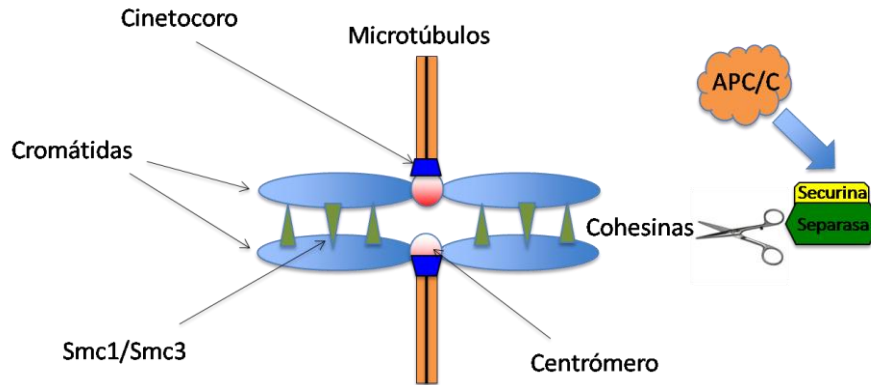


Figura 2. Liberación de la separasa para la degradación de las cohesinas y posterior separación de las cromátidas.

Durante la mitosis, el punto de monitoreo previene la anafase hasta que todos los cromosomas están adecuadamente unidos al huso mitótico, correctamente alineados y bajo la misma tensión por parte de los microtúbulos. Para lograr la adecuada segregación, los dos cinetocoros en las cromátidas hermanas deben estar unidas a ambos polos del huso en una orientación bipolar. Este procedimiento asegura que cada célula hija reciba sólo una copia de cada cromosoma.

El complejo del punto de monitoreo de la mitosis (PMM), que contiene a tres de las proteínas del punto de monitoreo, MAD2, BUBR1/Mad3, BUB3, así como CDC20 ha surgido recientemente como el efector principal del PMM. Este complejo se une a APC/C y parece que lo inhabilita para ejercer su actividad ubiquitin-ligasa sobre la securina y sobre la ciclina B.²¹⁹

Otras proteínas que juegan un papel en el punto de monitoreo de la mitosis son MAD1, Aurora B (Ipl en *S. cerevisiae*), el complejo ROD (del inglés, *rough deal*)-ZW10 (del

inglés, *zeste white-10*)-ZWILCH (RZZ), p31^{comet} y varias proteínas cinasas activadas durante la mitosis, como CDK1-ciclina B, NEK2 y PLK1, entre otras.²¹⁸

Las Aurora cinasas también juegan un papel esencial en la inducción de un adecuado alineamiento de cromosomas, durante la segregación y la citocinesis durante la progresión de la división celular. La Aurora A funciona durante la profase y es requerida para el adecuado funcionamiento de los centrosomas. La Aurora B funciona en la unión del huso mitótico al centrómero y la Aurora C funciona en líneas germinales y se conoce poco acerca de su función. De hecho, tanto la aurora A como la Aurora B se encuentran frecuentemente sobre-expresadas en una gran cantidad de cánceres en seres humanos.²²⁰ Varias de las cinasas que pertenecen a esta familia se activan durante la fase G2/M del ciclo celular. Por lo tanto, se cree que la familia de las Aurora cinasas son esenciales para el alineamiento de los cromosomas, para la segregación, para la maduración de los centrosomas, para la formación del huso mitótico y para la citocinesis durante la mitosis, por lo que son indispensables para la división celular y la adecuada segregación del material genético a las células hijas.⁵⁸

BUB1, BUB3, BUBR1 y MAD2

Recientemente, Wei y colaboradores, evaluaron el papel de los principales componentes del punto de monitoreo de mitosis (BUB3, BUBR1 y MAD2) en embriones en la etapa de pre-implantación, usando modelos de sobreexpresión y de inhibición. Este grupo encontró que la ausencia de los componentes del punto de monitoreo de mitosis genera una aceleración de la transición metafase-anafase durante el primer clivaje de

células e induce la formación de micronúcleos, mal alineamiento de cromosomas y aneuploidía, la cual se asoció con una menor implantación de los embriones y retrasos en el desarrollo. Más aún, en presencia de nocodazol, los embriones carentes de proteínas del punto de monitoreo de mitosis no presentaron arresto mitótico como era de esperarse, lo que sugiere que las proteínas del punto de monitoreo de mitosis juegan un papel clave en la progresión del ciclo celular en etapas tempranas del desarrollo embrionario.²²¹

BUB1, o cinasa treonina/serina del punto de monitoreo de mitosis, es una enzima que se une al cinetocoro y juega un papel clave en el establecimiento del punto de monitoreo de mitosis y en la segregación de cromosomas.

CUEDC2

Gao y colaboradores, han encontrado que una proteína denominada CUEDC2, la cual contiene un dominio CUE, promueve la inactivación del punto de monitoreo de mitosis y libera a APC/C (complejo promotor de la anafase) de su inhibición sobre el punto de monitoreo. CUEDC2 se fosforila durante mitosis por Cdk1 y dicho cambio causa un retraso dependiente del punto de monitoreo de la transición anafase-metafase. CUEDC2 fosforilada se une a Cdc20, el activador de APC/C y promueve la liberación de Mad2 de APC/C-Cdc20 y por lo tanto la activación de APC/C. La sobreexpresión de CUEDC2 induce una activación temprana de APC/C y conduce a errores en la segregación cromosómica y a aneuploidía. De forma interesante, CUEDC2 se sobre-expresa en varios tipos de tumores. Por lo tanto, este grupo concluye que CUEDC2 es un regulador clave de la progresión de la

mitosis y que su desregulación puede contribuir al desarrollo de inestabilidad cromosómica en cáncer.²²²

Activación del punto de monitoreo

Varios tipos de daños pueden activar el punto de monitoreo de la mitosis, como por ejemplo, la despolimerización de los microtúbulos, la presencia de cromosomas dicéntricos (con dos centrómeros, Figura 3), errores en la segregación del centrómero, alteraciones en las proteínas del cinetocoro, mutaciones en el DNA centromérico, o alteraciones en las proteínas motoras durante la mitosis.

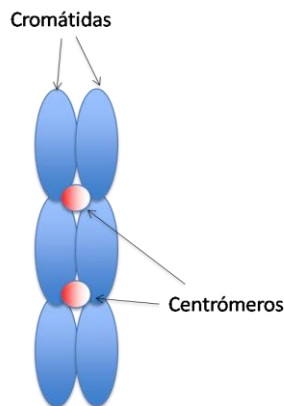


Figura 3. Esquema de un cromosoma dicéntrico.

Estabilidad de los cromosomas para una segregación adecuada

Para permitir la adecuada distribución de material genético a las células hijas no sólo se requiere de una maquinaria que atraiga dicho material, como se ha mencionado previamente, sino que además, se requiere de cromosomas adecuadamente condensados y estructuralmente estables para soportar la acción mecánica inducida a través de los microtúbulos sobre los cinetocoros. Las estructuras que más sobresalen en la generación

de esta “estabilidad cromosómica” son los centrómeros, las regiones pericentroméricas, los telómeros, las regiones subteloméricas y proteínas de cohesión, como las cohesinas y las condensinas, así como todos los componentes que organizan la cromatina, entre otras.

Centrómero y las regiones pericentroméricas

Los centrómeros, así como las regiones pericentroméricas, son estructuras claves en las células eucariontes para asegurar la segregación cromosómica adecuada durante cada ciclo celular.

Centrómeros

Los centrómeros son las regiones cromosómicas responsables de la segregación durante la mitosis. Dado que es la estructura que es atraída de forma primaria por los microtúbulos a través del cinetocoro, el centrómero es responsable de llevar todo el contenido genético de cada cromosoma al lado opuesto de la célula.

Los centrómeros son dominios de heterocromatina diferenciados, los cuales se presentan una vez en cada cromosoma y dirigen la segregación cromosómica tanto en mitosis como en meiosis mediante el ensamblaje del cinetocoro. Estos son genéticamente distintos entre organismos y no están determinados por la secuencia del DNA, pero sí por la composición y la organización de la cromatina que subyace en ellos.²²³ Los organismos denominados “monocéntricos”, como los vertebrados, los hongos y la mayoría de las plantas, tienen un centrómero único y ensamblan un solo cinetocoro. Los organismos

“holocéntricos” como los nematodos y algunas plantas, ensamblan el cinetocoro en la totalidad de un cromosoma.

En la mayoría de los eucariontes, la identidad del centrómero está determinada epigenéticamente por la presencia de la variante de histonas H3 del centrómero, o CenH3, llamada CENP-A en seres humanos. La manera como CENP-A se incorpora al centrómero y posteriormente se hereda durante el ciclo celular se considera que ocurre utilizando mecanismos epigenéticos.²²⁴

La proteína nucleosomal CENP-A/CenH3 juega un papel muy importante en la determinación del centrómero en todas las especies y ensambla directamente una gran cantidad de proteínas asociadas al centrómero en vertebrados (CENP-T/W). El complejo CENP-T/W se ensambla mediante mecanismos de intercambio durante la fase S tardía y G2. Este complejo se requiere para la mitosis en cada ciclo celular y no se mantiene entre generaciones celulares. Prendergast y colaboradores han propuesto que los componentes del CENP-A y H3-CENP-T/W del centrosoma son complejos especializados para el centrómero y para el cinetocoro respectivamente y que interactúan cuando son requeridos durante la segregación cromosómica.²²³

Muy recientemente se ha determinado por primera vez la estructura del centrómero acoplada a CENP-A. Tachiwana y colaboradores han determinado que en los nucleosomas con la secuencia canónica del satélite alfa, el DNA se enrolla alrededor del octámero de histonas, el cual contiene dos H2A, dos H2B, dos H4 y dos CENP-A en una orientación hacia la izquierda. Sin embargo, a diferencia del nucleosoma con la H3

canónica, con CENP-A son visibles únicamente las 121 bases centrales del DNA en un nucleosoma. En esta estructura, las 13 bases de los extremos son visibles externamente y la hélice alfa N de CENP-A es más corta que la de H3, la cual se sabe que es importante para la orientación del DNA. Este análisis también reveló que CENP-A contiene dos aminoácidos extras (Arg80 y Gly 81) en el asa 1, los cuales quedan completamente expuestos al solvente en la reacción usada. Por lo tanto, esta asa 1 de CENP-A puede funcionar como estabilizador del dominio centromérico de cromatina, posiblemente actuando como un sitio de unión para otros factores que actúen en *trans*.²²⁵

El DNA centromérico se replica durante la fase S, sin embargo, a diferencia del ensamblaje de las histonas canónicas, que ocurre durante la fase S (acoplado a la replicación), el depósito de CENP-A ocurre durante un momento estricto durante la telofase y G1 temprano.²²⁴ Estudios realizados por Dunleavy y colaboradores, han mostrado que las variantes de histonas H3.1 y H3.3 se depositan también durante la fase S en los dominios centroméricos y que existe una reducción de H3.3, más no de la H3.1 en los centrómeros en G1 comparado con la fase S, lo que sugiere un modelo de reemplazo, donde tanto la H3.1 como la H3.3 se depositan en la fase S y existe un “*placeholder*”, es decir un marcador de localización, el cual pudiera ser reemplazado por CENP-A en G1.²²⁴

Modificaciones epigenéticas en el centrómero

Son muchas las modificaciones epigenéticas que están asociadas a la generación de heterocromatina en el genoma, incluyendo el centrómero. Fue Earnshaw y Migeon quienes postularon por primera vez la posibilidad de modificaciones epigenéticas de los

centrómeros,²²⁶ luego de observar que dos centrómeros colocados en un cromosoma dicéntrico diferían en su capacidad para dirigir la segregación cromosómica en la presencia o ausencia de proteínas centroméricas. Posteriormente, se han identificado factores epigenéticos para el adecuado funcionamiento del centrómero en *Saccharomyces cerevisiae*,²²⁷ *Candida albicans*,²²⁸ *S. pombe*²²⁹ y en el *Homo sapiens*.²³⁰

Se sabe que en los centrómeros de organismos como los seres humanos, los ratones, las moscas y ciertas levaduras, los nucleosomas que contiene la histona canónica H3 están dimetilados en la lisina 4 (H3K4me2), una modificación asociada con la presencia de eucromatina. Esta modificación se cree que es importante para la organización del centrómero,²³¹ de hecho la depleción de la H3K4me2 resulta en la ausencia de reclutamiento de la proteína de reconocimiento de unión (HJURP, del inglés, *Holliday junction recognition protein*) y por ende, una falta de reclutamiento de CENP-A.²³²

A nivel de la heterocromatina pericentromérica, las histonas H3 y H4 presentan metilación en la lisina 9 (H3K9me2), 2 (H3K2me3),⁶³ y lisina 20 (H4K20me3)²³³⁻²³⁴ y estas modificaciones al parecer sirven para reclutar proteínas como cohesinas²³⁵ y para mantener la estructura de la cromatina pericéntrica. De forma interesante, se sabe que la pérdida de las modificaciones heterocromáticas en la lisina 20 (H4K20me3) genera una función centromérica inadecuada, fenómeno que se ha observado en células cancerosas humanas.²³⁶

De forma interesante también se ha descubierto recientemente que la acetilación juega un papel muy importante en la adecuada segregación cromosómica. Se sabe que,

además de la metilación (la cual se correlaciona con el silenciamiento de la cromatina), las histonas centroméricas carecen de acetilación, la cual se asocia con transcripción. La hipoacetilación de las histonas y la metilación del DNA en el centromero²³⁷ alteran las interacciones químicas de las histonas y el DNA y definen una región particular, que contribuye a las características del centrómero, así como a la cohesión de las cromátidas.

Van Damme y colaboradores, a partir de la observación de que la N-Aces abundante en eucariontes y aumenta de forma significativa desde eucariontes inferiores hasta los más evolucionados, analizaron los grados de acetilación N-terminal para tratar de evaluar la importancia de esta modificación química. Este grupo evaluó la presencia de las acetiltransferasas N-terminal (NATs) en eucariontes complejos. Este grupo encontró que estas NATs localizaban metioninas (Met) y lisinas (Lys) y así como otras proteínas que iniciaban con metionina, y lo denominaron Naa60p y a su actividad como NatF. Se encontró que hNAA60 indujo acetilación diferentes sitios Met de inicio en levaduras en su región N-terminal y aumentó los niveles globales de acetilación, llegando a niveles similares a los vistos en eucariontes superiores. Al inhibir la actividad de la NAA60 se asoció con la generación de errores en la segregación cromosómica, lo que sugiere que posiblemente esta proteína sea un regulador importante en la segregación cromosómica.²³⁸

En relación con el papel de la acetilación sobre la función del centrómero, Choy y colaboradores, han caracterizado la acetilación de la H4 en los centrómeros de *S. cerevisiae* y han determinado las consecuencias de su modificación sobre la segregación cromosómica. Este grupo observó bajos niveles de lisina monoacetilada y tetraacetilada

en la H4 (H4K16Ac) en los centrómeros. También observaron bajos niveles de acetilación H4K16Ac en regiones asociadas con Cse4p (CENP-A en seres humanos). En su modelo experimental, la inhibición de las histonas desacetilasas mediante nicotinamida indujo letalidad en cepas mutantes para Cse4 y para hhf1-20 (importantes para la formación del cinetocoro) y se aumentó la presencia de H4K16Ac. La sobreexpresión de la acetilación de H4K16Ac mediada por Sas2 aumentó la tasa de errores en la segregación cromosómica y también indujo una mayor letalidad en las cepas mutantes. De la misma forma, la delección de la desacetilasa SIR2 o un mutante catalítico sir2-H364Y resultó en mayores tasas de pérdidas cromosómicas comparado con las células silvestres. Más aún, mutantes H4K16Q mostraron mayores de pérdidas cromosómicas comparado con la H4K16R no acetilable que las células silvestres. Por lo tanto, este trabajo sugiere que la H4 hipoacetilada centromérica se encuentra conservada entre los centrómeros de los eucariontes y que la hipoacetilación de la H4K16 juega un papel importante en la adecuada segregación cromosómica.²³⁹

Otra marca epigenéticas que se han caracterizado recientemente a nivel de centrómero es la fosforilación de la treonina 3. Tian y colaboradores, han mostrado recientemente que la fosforilación de la treonina 3 en la histona H3 ocurre principalmente en mitosis en varios tipos celulares provenientes de seres humanos, principalmente durante la profase hasta la metafase y se desfosforila completamente en telofase. Dicha marca ocurrió principalmente en la cromatina centromérica, de forma similar que la treonina 11 fosforilada de H3, la cual se restringe al centrómero. Este hallazgo sugiere que

este tipo de modificación de histonas pudiera llegar a participar en el ensamblaje de los cinetocoros, así como servir de señal para otras proteínas del cinetocoro.²⁴⁰

La haspina es una cinasa de histonas, la cual se encuentra conservada desde *S. pombe* hasta los seres humanos, la cual fosforila la histona H3 en la treonina 3 (H3T3ph) durante la mitosis, generando un sitio de unión en la cromatina para el complejo pasajero de la mitosis (CPC, del inglés *chromosomal passenger complex*, donde participan Aurora B, INCENP (proteína centromérica interna) y Survivina/BIR) en el centrómero para regular la segregación cromosómica. H3T3ph se focaliza en la región interna del centrómero durante la prometáfase. Además, se ha encontrado que la unión de CPC a las proteínas shugoshinas contribuye a la localización de Aurora B en el centrómero. Para que ocurra el reclutamiento de las shugoshinas (proteínas que protegen a las cohesinas) en el centrómero, se requiere de la fosforilación de la histona H2A en la treonina120 (H2AT120ph) por parte de la cinasa del cinetocoro BUB1.²⁴¹

Wang y colaboradores, han reportado que la Aurora B fosforila a la haspina para promover la generación de H3T3ph y que la actividad de la aurora cinasa B se requiere para localización cromosómica de CPC, sugiriendo una fuerte asociación entre Aurora B y las funciones de la haspina durante la mitosis. Este grupo también propone que la actividad de la Aurora B inicia una retroalimentación de CPC-Haspina-H3T3ph que promueve la generación de H3T3ph sobre la cromatina. Así mismo, este grupo plantea la posibilidad de que la vía de Bub1-shugoshina-CPC suministra una señal que acelera la retroalimentación de CPC-Haspina-H3T3ph específicamente al centrómero para producir la acumulación ya conocida de CPC en estas regiones.²⁴¹

Regiones pericentroméricas

Las regiones pericentroméricas son regiones de heterocromatina localizadas junto al centrómero en todos los cromosomas (Figura 4). Algunas de estas regiones presentan múltiples modificaciones epigenéticas que garantizan su estado de compactación. Se desconoce mucho acerca de su función, sin embargo, en los últimos años se ha visto que las regiones pericentroméricas juegan un papel importante en la segregación cromosómica adecuada.

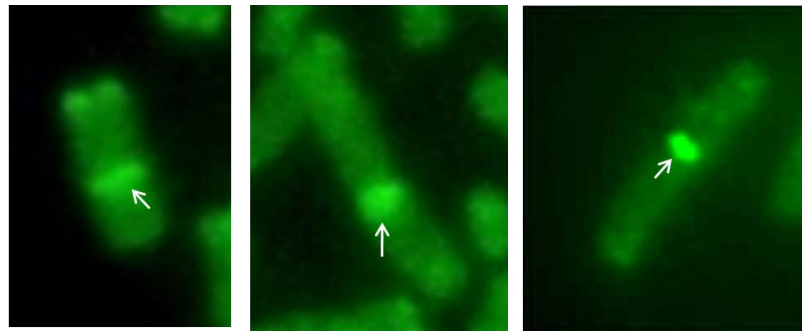


Figura 4. Metilación de las regiones pericentroméricas en linfocitos humanos.

Las regiones pericentroméricas están caracterizadas por contener DNA altamente repetitivo, principalmente los satélites clásicos 2 y 3, los cuales son escasamente transcritos y se encuentran altamente metilados. Estas regiones contienen grandes cantidades de heterocromatina constitutiva y están localizados principalmente en los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos 1, 9 y 16 y en los brazos cortos de algunos cromosomas acrocéntricos, como el 13, 14, 15, 21 y 22, difiriendo en el número de repetidos entre estos.¹⁹²

Estudios de Ng y colaboradores, han encontrado que las regiones pericentroméricas podrían jugar algún papel en la bi-orientación de los cromosomas. Se sabe que la adecuada segregación cromosómica depende de la unión de los cinetocoros sobre los cromosomas bi-orientados hacia los polos opuestos. Este grupo indujo mutaciones en levaduras en reguladores de la bi-orientación de los cromosomas (en *ipl1-321*) y los resultados mostraron que uno de los mutantes se separó prematuramente en las regiones pericentroméricas, en un proceso asociado a la unión de un factor de carga de la cohesina *Scs2* en el centrómero. De forma interesante, este grupo encontró que *Mcm21* (proteína involucrada en el mantenimiento de cromosomas y que une subunidades del cinetocoro que están en contacto con el DNA centromérico y las subunidades de los microtúbulos) resultó ser esencial para la bi-orientación. Al unir de forma artificial las regiones pericentroméricas, *Mcm21* no fue necesario para la bi-orientación, asociado a la disminución de la actividad de *lpl1*. Por lo tanto, este grupo concluyó que las regiones pericentroméricas contribuyen a la bi-orientación de los cromosomas a través de sus cinetocoros.²⁴²

Telómeros y regiones subteloméricas

Telómeros

Los telómeros están conformados por repeticiones de TTAGGG localizadas en los extremos de los cromosomas. Su nombre se deriva del griego *telos* o “final” y *meros* que significa “parte”. Durante cada división celular, debido a la replicación semi-conservativa incompleta, la telomerasa, la cual se encuentra presente principalmente en células

germinales, células madre y en algunos tipos de células blancas, debe mantener la longitud de los telómeros para evitar la aparición de recombinaciones homólogas (HR, del inglés, *homologous recombinations*) y no homólogas (NHEJ, del inglés, *non-homologous end joining*) entre cromosomas.

En las células adultas, se requieren de telómeros funcionales para una adecuada segregación y para el mantenimiento de los cromosomas durante las divisiones mitóticas. Actualmente, se cree que la pérdida de la longitud del telómero en células adultas juega un papel importante en la senescencia y en la prevención de la aparición de células cancerosas.

Los telómeros de las células eucariontes terminan en una proyección 3' de DNA de cadena sencilla, la cual contiene múltiples proteínas de unión tanto a la hebra sencilla, como a DNA de doble cadena. Para la protección y el mantenimiento de los telómeros en seres humanos se requiere de la función de dos factores relacionados: TRF1 y TRF2, así como muchas otras proteínas, incluyendo muchas de las proteínas pertenecientes a la maquinaria de reparación. Otros componentes del sistema de reparación NHEJ al parecer también están implicados en la protección de los telómeros.²⁴³ La alteración en la función de las proteínas del telómero están asociadas con la generación de cromosomas dicéntricos (Figura 3) y fusiones entre finales de cromosomas. Tanto en células senescentes como en células tumorales, la presencia de cromosomas dicéntricos se correlacionan con la presencia de telómeros críticamente cortos.²⁴³

La presencia de telómeros disfuncionales permite la supervivencia de células con inestabilidad cromosómica y es característica de las células tumorales. Dichas células usan la activación de la telomerasa como un mecanismo para mantener la longitud de los telómeros, aunque también se ha descrito otro mecanismo denominado ALT (del inglés, *alternative mechanism of telomere lengthening*).²⁴³ A diferencia de las células normales, los telómeros de las células tumorales tienden a formar agregados.²⁴⁴

Existen muchas otras proteínas y moléculas que contribuyen a la protección de los telómeros para evitar su fusión y por ende evitan la inestabilidad cromosómica. Nuage, una marca de las células germinales de *Drosophila*, también conocido como el cuerpo cromatoide en mamíferos, es un organelo específico de la línea germinal que se ha encontrado asociado a la vía de los piRNAs (RNA que interactúa con Piwi). Los piRNAs son RNA específicos de gónadas que tienen de 23-29 nucleótidos en longitud y protegen de fenómenos de inestabilidad genética evitando la expresión de retrotransposones deletéreos. Estudios recientes en *Drosophila* han encontrado que esta vía también participa también en la protección de los telómeros.²⁴⁵

Se sabe que varias subunidades de proteínas llamadas ORC (complejos de reconocimiento de origen), en seres humanos, así como en otros organismos como *Drosophila* y *Xenopus*, las cuales se asocian con HP1, son cruciales para la organización de regiones de heterocromatina en los telómeros y participan en la segregación cromosómica. Estas proteínas ORC se asocian con las “proteínas asociadas a ORC” (proteínas implicadas en la iniciación de la replicación durante S), llamadas ORCA/LRWD1 en sitios con silenciamiento transcripcional, acopladas a marcas de metilación de lisinas y

localizan también a la proteína de heterocromatina HP1. A partir del estudio de estas moléculas, se asume que tanto la replicación como la organización y el mantenimiento de la estructura de los cromosomas son eventos muy bien coordinados y dependen de proteínas como ORC.²⁴⁶ Orc2, una proteína del complejo ORC, también se localiza sobre los cinetocoros durante la mitosis en células humanas.²⁴⁷ En levaduras se sabe que Orc2 está implicada en la cohesión de las cromátidas hermanas y su ausencia induce la activación del punto de monitoreo de mitosis.²⁴⁸ Otros componentes del complejo ORC (como por ejemplo Orc5 en *S. pombe*) también están implicados en la cohesión de las cromátidas.²⁴⁹

Otra molécula interesante es Pot1, una proteína de ligación a los telómeros en la hebra sencilla, la cual se encuentra conservada desde levaduras hasta los seres humanos. Su delección causa una pérdida inmediata de los telómeros. Rqh1, un homólogo de WRN, una helicasa de seres humanos, también juega un papel muy importante en la estabilidad genómica, interactúa con Pot1 y juntos favorecen una adecuada segregación cromosómica. En su ausencia, existen proteínas que pueden mantener los telómeros, mediante recombinación de homólogos mediado por Rad51.²⁵⁰

Regiones subteloméricas

Las regiones subteloméricas, como su nombre lo indica, son las regiones adyacentes a los telómeros y al parecer, también contribuyen a la estabilidad del telómero y por ende a la adecuada segregación cromosómica y a la estabilidad genómica. Estas regiones contienen tanto secuencias repetidas como únicas. Es más, se considera que las

regiones subteloméricas contienen las secuencias únicas más distantes del centrómero. Recientemente se ha postulado que estas regiones juegan un papel importante en el retardo mental idiopático y en las anomalías congénitas múltiples.²⁵¹

Las regiones teloméricas y subteloméricas contienen modificaciones epigenéticas características de heterocromatina, como la presencia de di y trimetilación de la lisina 9 (H3K9me3) por SUV39H1 y 2, trimetilación de la lisina 20 en la H4 por SUV420H1 y 2 y por la presencia de proteínas de la familia de Rb, así como por la unión de CBX1, CBX2, CBX3 (análogos de HP1).²⁵² Estas regiones también presentan altos niveles de metilación del DNA.⁵⁰

Gonzalo y colaboradores, han encontrado que las DNA-metiltransferasas, encargadas de establecer los patrones de metilación, juegan un papel clave en el mantenimiento de los telómeros, a través de la inducción de metilación en las regiones subteloméricas. Las células madre embrionarias de ratón deficientes para la DNMT1, DNMT3A y DNMT3B muestran telómeros elongados, asociados a la presencia de desmetilación de sus regiones subteloméricas, sin afectar otras marcas epigenéticas como H3K9me3 y H4K20me3. Este fenómeno se asoció con un aumento en la presencia de recombinaciones teloméricas.⁵⁰

Estudios recientes han mostrado que ciertos remodeladores de cromatina como Fun30 (Fft3), son esenciales para mantener una adecuada estructura tanto en los centrómeros como en las regiones subteloméricas. Este grupo ha descrito que Fft3 se localiza con elementos *insulators* o aisladores e inhibe el ensamblaje de la eucromatina en

dominios de cromatina silentes. En ausencia de este, las modificaciones de histonas que corresponden a eucromatina invaden los centrómeros y las regiones subteloméricas, causando alteraciones en la expresión génica y defectos severos en la segregación cromosómica, por lo que se asume que estas proteínas protegen a las regiones de heterocromatina.²⁵³

De forma interesante, Ishii y colaboradores, han encontrado que cuando se realiza una delección de los centrómeros en levaduras, los sobrevivientes muestran neocentrómeros adquiridos, los cuales se originan en las regiones subteloméricas o son rescatados por fusiones teloméricas con otros cromosomas. Estos hallazgos sugieren que las modificaciones epigenéticas que dominan la formación del centrómero y que se asemejan a las de las regiones subteloméricas, pueden llegar a ser usadas como señales de generación del cinetocoro.²⁵⁴

Otros mecanismos

Cohesinas

Las cohesinas, como su nombre lo describe, son complejos proteicos que unen a las cromátidas hermanas, las cuales las mantienen unidas hasta que se presenten las condiciones adecuadas para la segregación simétrica hacia las células hijas.²⁵⁵ El complejo de las cohesinas está compuesto por 4 subunidades: Smc1, Smc3p, Scc1 (o Mcd1p) y Scc3. Tanto Smc1 y Smc3 pertenecen a la familia de proteínas para el mantenimiento estructural de los cromosomas (SMC, del inglés, *structural maintenance of chromosomes*), las cuales constituyen un grupo de ATPasas altamente conservadas y que forman un

heterodímero (Smc1p/Smc3p). Scc1p es un homólogo de Rad21, involucrado en reparación del DNA en *S. pombe*. Estas cuatro proteínas son esenciales y su mutación produce una separación prematura de cromátidas hermanas. En levaduras, las cohesinas se unen preferencialmente a los brazos de los cromosomas pero también es muy abundante en los centrómeros.²⁵⁶

Las cohesinas aparean a las cromátidas hermanas formando un anillo de tres partes, compuesto por Scc1-Smc1-Smc3 alrededor de ellas. En mitosis, las cohesinas son removidas de los brazos de los cromosomas por fosforilación dependiente de la vía de la profase. Las cohesinas centroméricas se protegen por la shugoshina 1 y por la fosfatasa 2A (Sgo1-PP2A9 y sólo se abre en anafase por un clivaje de Scc1 dependiente de la separasa).²¹⁴ La Shugoshina (Sgo1) evita la liberación de las cohesinas durante la profase, para lo cual Sgo1 debe ser inactivada durante el inicio de la anafase, así como Pds1p (la securina de *S. cerevisiae*, en mamíferos se conoce como PDS1). De hecho, tanto Pds1 como Sgo1 son sustratos de APC/C en vertebrados.²⁵⁷

Las fuerzas de separación de las cromátidas pueden generar una separación asincrónica de las cromátidas, un fenómeno conocido como “fatiga de la cohesión”. Daum y colaboradores, han reportado que este fenómeno no se bloquea mediante la inhibición de Plk1, una cinasa esencial para la “vía de la profase”, en la cual se liberan las cohesinas de los cromosomas o por depleción de la separasa, una proteasa que normalmente induce la separación de las cromátidas en anafase. La fatiga de la cohesión se inhibe mediante el uso de agentes despolimerizantes de los microtúbulos y mediante el aumento artificial de los niveles de cohesinas en células mitóticas. En células que padecen fatiga de

la cohesión, las proteínas se mantienen asociadas a las cromátidas separadas.²⁵⁵ Por lo tanto, se cree que en células detenidas o arrestadas en metafase, la fuerza generada por las interacciones entre microtúbulos y cinetocoros pueden, con el tiempo, romper la cohesión de las cromátidas hermanas. Esta “fatiga de la cohesión” puede generar una separación asincrónica de las cromátidas hermanas en metafase y por lo tanto, un fenómeno de inestabilidad cromosómica.²⁵⁵

Desde las observaciones clásicas de citología, se sabe que las cromátidas hermanas se unen fuertemente en las regiones de heterocromatina, lo que sugiere que la heterocromatina pudiera favorecer el reclutamiento de cohesinas. Se sabe que Swi6 (el homólogo de HP1 en *S. pombe*) se une a la H3K9me y promueve la unión de las cohesinas a los repetidos centroméricos en *S. pombe*.²³⁵

Cuando ocurre una disminución en los niveles de cohesinas, se genera la separación prematura de las cromátidas hermanas, así como defectos en la estabilidad cromosómica en la placa metafásica y deslocalización de las proteínas del complejo pasajero cromosómico, el cual contiene a Aurora B.²⁵⁸

La mayoría de las proteínas y de la maquinaria involucrada en la segregación cromosómica se encuentra conservada evolutivamente (incluyendo a las cohesinas) y en vertebrados, la mayoría de las moléculas de cohesinas son liberadas durante la profase, independientemente de la presencia de APC/C, en un procesos dependiente de PLK1 y Aurora B.²⁵⁹

Las nucleoporinas y la envoltura nuclear

La envoltura nuclear separa el citoplasma del núcleo en células eucariontes interfásicas y los complejos de poros nucleares median el intercambio de macromoléculas entre estos dos compartimentos. Estas estructuras se desensamblan durante la profase y las proteínas de los poros nucleares se distribuyen dentro del citoplasma mitótico. Estas proteínas, denominadas nucleoporinas, se sabe que también participan en el ensamblaje del huso mitótico, en la organización del cinetocoro e interactúan con las proteínas del punto de monitoreo de mitosis, por lo que se sospecha que juegan un papel clave durante la segregación cromosómica. Además, las nucleoporinas tienen que ver con eventos mitóticos tempranos y tardíos, como el posicionamiento de los centrosomas y la citocinesis.²⁶⁰

Condensinas

Las condensinas son complejos proteicos que juegan un papel clave en el ensamblaje de los cromosomas y en la segregación, y están compuestos por los complejos de condensina I y II. Los dos complejos comparten los mismos pares de subunidades centrales, denominados SMC2 y SMC4, las cuales pertenecen a una gran familia de ATPasas, conocidas como proteínas SMC (del inglés, *structural maintenance of chromosomes*). Cada uno de los complejos también contiene diferentes grupos de subunidades regulatorias no-SMC.

Estudios recientes han mostrado que las condensinas participan en la remoción de las cohesinas de las cromátidas hermanas, en el llamado desencadenamiento de las cromátidas hermanas por las topoisomerasas y en la reconfiguración estructural de los

cromosomas mitóticos.²⁶¹ Otros grupos han planteado también que el anillo de las condensinas enrolla al DNA y que su ausencia induce alteraciones en regiones cromosómicas distales al centrómero. De esta manera, las condensinas forman asociaciones dentro de los brazos de las cromátidas que le dan rigidez suficiente en los cromosomas, necesaria para la segregación.²⁶²

Recientemente también se demostró, en modelos de *Drosophila*, que la helicasa Vasa específica de línea germinal, la cual contiene una caja DEAD, promueve la segregación cromosómica mediante la facilitación de la localización cromosómica de Barren (Barr), un componente de la condensina I. Las funciones en mitosis de Vasa están mediadas por Aubergina y Spindle-E, los cuales son dos componentes de la vía de RNA que interactúa con Piwi.²⁶³

Securinas

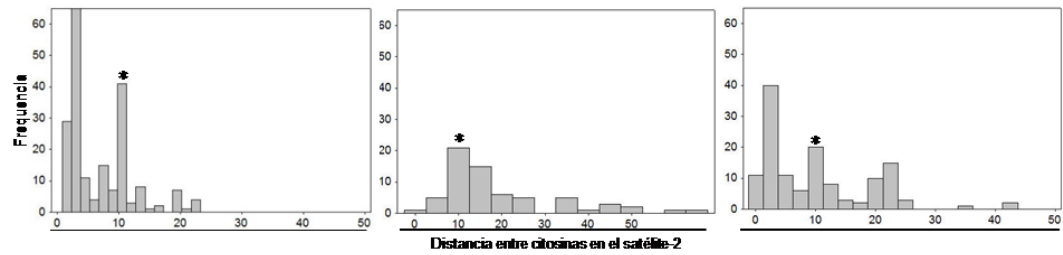
Las securinas regulan la cohesión de las cromátidas, dado que se unen e inhiben a la proteasa separina o separasa (Esp1p). Cuando se inicia la anafase, el complejo promotor de la anafase (APC/C o ciclosoma) degrada la securina. La degradación de la securina libera la separasa y degrada los anillos de cohesinas que unen las dos cromátidas hermanas, promoviendo su separación.²⁶⁴

ANEXO II. Periodicidad de la distancia entre citosinas en el satélite 2

El satélite 2 muestra una periodicidad de 10 pb entre citosinas CpG, entre citosinas no-CG y entre citosinas todas las citosinas

Basados en los resultados obtenidos con la DNMT3A, y algunas evidencias publicadas en la literatura durante el desarrollo del presente proyecto^{114,265} en los cuales se hace una relación entre la DNMT3A, la metilación *de novo* y una dependencia de estas hacia un patrón de distancia entre citosinas de 8-10 pb para generar patrones de metilación, decidimos evaluar las distancias existentes dentro de todas las clonas publicadas para el satélite-2 humano (L12216.1, X83396.1, X83395.1, AF361743.1, AF361742.1, AF361741.1, AF361740.1, AF361739.1, AF361738.1, AF361737.1, AF361736.1, AF361735.1, AF361734.1, AF361733.1, AF361732.1, AF361731.1, AF361730.1, AF361729.1, AF361728.1, AF361727.1, AF361726.1, AF361725.1, AF361724.1, AF361723.1, AF361722.1, AF361721.1, AF361720.1, AF361719.1, AF361718.1, AF361717.1, AF361716.1, AF361715.1, AF361714.1, AF361713.1, AF361712.1, AF361711.1, AF361710.1, AF361709.1, AF361708.1, AF361707.1, AF361706.1, AF361705.1, AF361704.1, AF361703.1, AF051684.1, X72623.1, M20263.1). El análisis reveló una importante frecuencia de distancia de 10 pb entre citosinas CpG (31.5%), como ha sido reportado para otras secuencias, pero también encontramos una presencia elevada de esta frecuencia de distancia entre citosinas no-CG y entre citosinas CpG y no-CG dentro del satélite 2 (Figura 1).

a



b

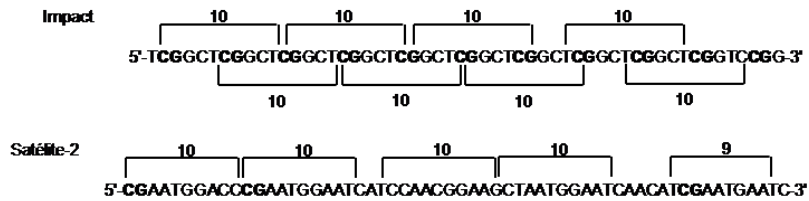


Figura 1. La distancia de 10 pb está sobre-representada en el satélite 2. a. Los histogramas de distancia entre citosinas (pares de bases) entre citosinas en el satélite-2. A la izquierda: frecuencia de distancias en pares de bases entre todas las citosinas; En el medio: frecuencia de distancias en pares de bases entre las citosinas CpG; A la derecha, distancia en pares de bases entre citosinas no-CG. Los asteriscos remarcan la distancia observada de 10 pb. b. Modelo de organización de las citosinas en otras regiones genómicas. En la parte superior: secuencia y organización de regiones diferencialmente metiladas (DMRs, del inglés, *Differentially Methylated Regions*) del gen improntado *Impact*. En la parte inferior: Modelo de organización de las citosinas CpG y no-CG en el satélite 2.

Periodicidad de la distancia entre citosinas en el satélite 2

A partir de los modelos descritos para regiones improntadas y en algunos casos, para algunas plantas, se sabe que la DNMT3A y la DNMT3L son capaces de formar un heterotetrámero que contiene dos sitios activos separados por distancias específicas, que corresponden a una distancia entre 8-10 dinucleótidos en una hélice de DNA.^{114,265} De hecho, se sabe que el espaciamento de 8 a 10 pb sobre los dinucleótidos CpG se encuentra sobre-representado a través de todo el genoma humano, lo que sugiere un nuevo mecanismo para la metilación *de novo*.²⁶⁶ La distribución de las citosinas en las

regiones diferencialmente metiladas (DMRs) también presentan una ocurrencia periódica de 9.5 pb, indicando una posible relación con estos mecanismos de metilación.¹¹⁴

Siguiendo con esta idea, la evaluación de distancias entre citosinas mostró una alta frecuencia de la distancia 10 pb, sugiriendo que el satélite 2 puede ser metilado por mecanismos similares a los comentados previamente para las células madre embrionarias y para las DMRs.

Glosario

5-azacitidina (5aza-C): Análogo químico de la citidina, presente en el DNA y el RNA. Se cree que la incorporación en el DNA de la 5-azaC atrapa a las DNMTs y por ende induce desmetilación pasiva. Fue sintetizado en los 70's y es usado actualmente para el tratamiento de algunas neoplasias hematológicas.

Alu: Secuencias de DNA originalmente caracterizadas por la acción de la endonucleasa Alu. Son los elementos móviles más abundantes del genoma (usualmente denominados como retrotransposones).

Aneuploidía: Anormalidad en la división de material genético, caracterizado por la segregación inadecuada de cromosomas completos, dejando a la célula con un número cromosómico diferente al número haploide. Incluyen las pérdidas y/o ganancias cromosómicas.

Carcinogénesis: Proceso en el cual se genera una célula con proliferación no controlada, invasión a tejido circundante, capacidad de neo-vascularización y migración a tejidos diferentes a los de su linaje.

Centrosoma: Organelo que sirve como centro organizador de microtúbulos. Fue descubierto por Boveri en 1888. Se compone de dos centriolos organizados ortogonalmente, rodeados por material pericentriolar.

Cinetocoro: Complejo proteico que se ensambla en centrómero durante la división celular y permite la unión de los microtúbulos y del huso mitótico a los cromosomas y que se genere la segregación de estos.

Citosina: Es una de las 5 bases nitrogenadas del genoma y se encuentra en el DNA y en el RNA. Es un derivado pirimidínico.

CpG ratio: Relación de citosinas CG en un fragmento determinado en relación con la cantidad de citosinas y guaninas.²⁰⁹ La fórmula para determinar el CpG ratio es: $(\#CpGs * \#pb) / (\#Cs * Gs)$. Se ha usado para caracterizar a los promotores de acuerdo a este índice, como promotores de alta densidad, con densidad intermedia y pobres en CpGs.

Cromatina: Es un complejo de DNA y proteínas (histonas y no histonas). Se encuentra en el núcleo de las células eucariontes y dentro del nucleoide en las células procariontes. Las principales proteínas que componen la cromatina son las histonas.

Cromosomas multirradiados: Aberraciones cromosómicas, donde es posible observar más de dos cromátidas unidas por el centrómero.

DAPI: 4,6.diamino-2-fenilindole. Tinción fluorescente que se une al DNA.

Desmetilación: Hace referencia a la pérdida de los grupos metilo y en el DNA ocurre de manera activa durante la embriogénesis y la gametogénesis y pasivamente en múltiples procesos, como por ejemplo en el envejecimiento.

Diferenciación celular: Hace referencia a la especialización celular que ocurre durante la embriogénesis, donde un grupo totipotencial se divide en grupos de células con funciones específicas.

DNMT: DNA-metiltransferasas. Enzimas responsables de transferir el grupo metilo de SAM al carbono 5 de las citosinas.

Dominio Proteico: Es una parte de la secuencia de una proteína, con una estructura que puede funcionar y existir independientemente del resto de la proteína. Cada dominio forma una estructura tridimensional y a veces se puede doblar y ser suficientemente estable.

Epigenética: Suma de todas las modificaciones en la cromatina, que colectivamente establecen y propagan los diferentes patrones de expresión génica (transcripción) y el silenciamiento en el mismo genoma.

Errores en la segregación: Hace referencia a anomalías que involucran la segregación de los cromosomas a las células hijas, que pueden derivarse en la pérdida o ganancia de cromosomas completos.

Fenotipo metilador: Son los cambios en los patrones de metilación que ocurren en las células cancerosas y que afectan, usualmente a genes supresores de tumores. Estos se han asociado a un peor pronóstico en varios tipos de cánceres.

Folatos: Formas estables de la vitamina B9. Existen naturalmente en algunos alimentos como verduras y leguminosas y pueden ser tomados como suplementos alimenticios.

Gen: En la unidad de la herencia en un organismo vivo. Está compuesto de DNA que codifica para un RNA que se transforma en proteína y que tiene una función dentro de una célula u organismo.

Genes supresores de tumores: Hace referencia a genes que codifican para proteínas que regulan el ciclo celular y cuyas alteraciones en su secuencia o en su expresión se asocian a fenómenos de proliferación celular aumentada.

Hemimetilación: Hace referencia a la metilación en sólo una de las hebras, usualmente la parental. También ha sido usado como término para definir a los cromosomas donde sólo una de las cromátidas está metilada.

Heterocromatina: Son aquellas regiones de cromatina que no son transcripcionalmente activas, que forman grandes bloques de DNA e histonas y que contienen marcas epigenéticas características. Se divide en heterocromatina constitutiva y facultativa. La primera es aquella que siempre permanecerá en estado silente y un ejemplo de esta es el centrómero. La facultativa es aquella heterocromatina que en un momento dado puede cambiar su conformación y generar expresión de sus secuencias, siendo el mejor ejemplo el cromosoma X inactivo.

Heterocromatinización: Es el proceso de formación de heterocromatina, el cual usualmente ocurre después de cada síntesis de DNA en ciertas regiones. Su formación al parecer depende de las modificaciones epigenéticas sobre las histonas.

Hipometilación global: Término que nació con la medición de metilación global en el DNA mediante HPLC, donde se encontró que las células cancerosas presentaban menor nivel de citosinas metiladas comparado con las contrapartes no cancerosas. Posteriormente se descubrió que este fenómeno ocurría principalmente en regiones repetidas y retrotransposones.

Housekeeping genes: También llamados genes constitutivos. Son genes vitales para el funcionamiento continuo de la célula en varios tejidos, por lo que siempre deben estar expresados. Se considera que dicha expresión no se modifica con el ciclo celular, aunque esta afirmación es continuamente puesta en duda.

Impronta génica: Fenómeno de expresión diferencial de los alelos paterno y materno en una misma célula.

Inestabilidad cromosómica: Fenómeno descrito para las células cancerosas, donde se sabe que coexisten en un mismo tejido, células con diferente cantidad de material cromosómico y constantemente ocurren ganancias y pérdidas de cromosomas en dichas células, así como aberraciones estructurales en los cromosomas que van generando hijas con diferente cantidad y contenido de material genético.

Islas CpG: Son regiones genómicas que contienen una mayor frecuencia de dinucleótidos CG. En mamíferos contienen entre 300 a 3000 pares de bases en su longitud y se encuentran en cerca del 70% de los promotores de los genes. Usualmente no se encuentran metiladas.

Isocromosomas: Aberración cromosómica caracterizada por la presencia de, ya sea, o brazos largos o brazos cortos, formando un cromosoma, generando un mismo patrón de bandas G a los dos lados del centrómero.

Isoforma: Es una versión de una proteína con pequeñas diferencias en su secuencia y en su estructura. Las isoformas de una proteína pueden ser producidas a partir de genes diferentes pero relacionados, o pueden ser producidas por el mismo gen por un mecanismo denominado *splicing* alternativo.

Maquinaria de metilación del DNA: Son aquellas proteínas que dirigen, orquestan y mantienen la metilación en las citosinas del genoma.

Merotélica, unión: hace referencia a uniones que ocurren cuando un cinetocoro se liga simultáneamente a los microtúbulos que provienen de ambos polos.

Metafase: Etapa de la mitosis en las células eucariontes en la cual los cromosomas condensados se alinean en una línea ecuatorial antes de separar las cromátidas hacia las células hijas.

Metilación *de novo*: Es aquella metilación sobre hebras de DNA sintetizadas que se genera sin la presencia de una hebra parental metilada.

Metilación: Adición de un grupo metilo (CH₃-) en un sustrato.

Micronúcleo: Cuerpo nuclear de menor tamaño que el núcleo principal de una célula. Usualmente son producto de cromosomas completos o fragmentos de cromosomas que no se incorporan en las células hijas durante una división celular.

Modificaciones post-traduccionales: Modificaciones que sufren los aminoácidos de las proteínas después que estas han sido sintetizadas.

Motifs: Elementos estructurales pequeños que son reconocidos en muchas proteínas.

Nucleosoma: Unidades repetidas de organización de las fibras de cromatina dentro de los cromosomas, la cual consiste en alrededor de 150 pares de bases del DNA y dos moléculas de cada una de las siguientes histonas: H2A, H2B, H3 y H4.

Palindrómica: Secuencias de ácidos nucleicos que son idénticas a su hebra complementaria cuando cada una es leída en la dirección correcta (5'-3').

Patrón de Metilación: Modificación específica de metilación de citosinas en una secuencia o en un genoma completo.

Pérdida de la heterocigosidad: Fenómeno asociado a la pérdida de la función de uno de los alelos, cuando el otro ya se encuentra afectado y se asocia principalmente a genes supresores de tumores y/o a oncogénesis.

Pericentromérico: Alrededor del centrómero.

Poliploidía: Fenómeno celular en el cual existen más de dos paquetes completos (*sets*) de cromosomas homólogos y se denominan de acuerdo al número de sets que contenga en el núcleo (triploidías, tetraploidías, pentaploidías, etc.).

Primer: Secuencia de oligonucleótidos que reconocen un fragmento de una secuencia de interés.

Punto de monitoreo: Hace referencia a puntos cruciales dentro del ciclo celular, donde se evalúa la evolución del ciclo y se tiene la capacidad de detener la progresión de este para reparar los daños encontrados o para enviar a la célula a la muerte en caso de que el daño no se pueda reparar.

Reacción de bisulfito de sodio: Reacción química donde el DNA se expone a bisulfito de sodio para sulfonar las citosinas no metiladas y luego modificarla químicamente para sea más parecida a los uracilos que a las citosinas y por ende sea secuenciada como timina, permitiendo una visualización de los patrones de metilación citosina por citosina.

Recombinación: La recombinación genética es el proceso mediante el cual una hebra del material genético, usualmente DNA, se rompe y se une a otra molécula de DNA. La recombinación en eucariontes usualmente ocurre durante la meiosis como entrecruzamientos entre cromosomas pareados, lo que conduce a que la descendencia tenga diferentes combinaciones de genes de sus padres y pueda producir nuevos alelos quiméricos.

Regiones subteloméricas: Regiones adyacentes a los telómeros que contienen heterocromatina con secuencias diferentes a las teloméricas e intensas modificaciones epigenéticas, como DNA metilado e histonas con lisinas trimetiladas.

Replicación del DNA: Hace referencia a la generación de una hebra de DNA idéntica a la hebra parental, logrando así una réplica del genoma de la célula madre.

Retrotransposones: Secuencias repetidas, insertadas en el genoma, que tienen la capacidad de retrotranscribirse y luego insertarse en otra región del genoma. Existen en gran cantidad dentro del genoma y aunque tienen estructura similar, la gran mayoría no tiene toda la capacidad de retrotranscribirse y luego insertarse en otros sitios.

S-adenosil-metionina (SAM): Molécula conformada por un azufre, metionina y adenosina, la cual contiene un grupo metilo altamente reactivo, por lo que es el donador de grupos metilo más importante de la naturaleza y es usado para metilar DNA, RNA, proteínas, fosfolípidos, etc.

Satélite 2: Secuencias repetidas en tanda (llamado en *tandem*) que conforman grandes regiones de heterocromatina, como las regiones pericentroméricas. Tienen gran cantidad de citosinas metiladas y otras modificaciones epigenéticas como trimetilación de las lisinas 9 en la histona H3.

Síndromes Congénitos: Anormalidades que acompañan al individuo afectado desde su nacimiento y usualmente involucra malformaciones o disfunción de diversos órganos.

Síndrome ICF: Síndrome clínico caracterizado por inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales, el cual es causado usualmente por mutaciones en la DNMT3B, con desmetilación de varias regiones del genoma, incluyendo las regiones pericentroméricas.

Splicing: Modificación natural del mRNA que ocurre después de la transcripción, en la cual secuencias son removidas y las demás son unidas nuevamente, para generar un RNA maduro.

Sumoylación: Modificación postraduccional caracterizada por la adición de proteínas SUMO (*small ubiquitin-like modifier*)

Transcripción: Proceso mediante el cual la célula expresa su genoma y lo convierte en moléculas transportadoras de la información genética, el mRNA.

Tricostatina: Componente orgánico que se usa como anti-fúngico y que inhibe selectivamente a las histona-desacetilasas, alterando la estructura de la cromatina por la persistencia de grupos acetilo de las histonas.



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)
**Mutation Research/Fundamental and Molecular
Mechanisms of Mutagenesis**

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molmut
Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Rapid communication

Satellite 2 demethylation induced by 5-azacytidine is associated with missegregation of chromosomes 1 and 16 in human somatic cells

Diddier Prada, Rodrigo González, Lisandro Sánchez, Clementina Castro, Eunice Fabián, Luis A. Herrera*

Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2011
Received in revised form 14 October 2011
Accepted 14 October 2011
Available online xxx

Keywords:

Pericentromeric chromatin
Aneuploidy
Bisulfite plus urea
Chromosome instability

ABSTRACT

Satellite sequences are an important part of the pericentromeric regions in mammalian genomes; they play a relevant role in chromosome stability and DNA hypomethylation of these sequences has been reported in ICF syndrome and in some cancers that are closely associated with chromosomal abnormalities. Epigenetic modifications of satellite sequences and their consequences have not been extensively studied in human cells. In the present work, we evaluated satellite 2 methylation patterns in human lymphocytes exposed to 5-azacytidine (5-azaC) and assessed the relationship between these patterns and chromosome missegregation. Human lymphocytes were exposed to 10 μ M 5-azaC for 24, 48, and 72 h. Segregation errors were evaluated in binucleate cells using FISH against pericentromeric regions of chromosomes 1, 9, and 16. DNA methylation patterns were evaluated by immunodetection, and by bisulfite plus urea conversion and sequencing. We have identified that 5-azaC induced missegregation of chromosomes 1 and 16, which have highly methylated satellite 2, after 72 h of exposure. Chromosome methylation patterns showed a notable decrease in pericentromeric methylation. Bisulfite conversion and sequencing analysis demonstrated demethylation of satellite 2 associated to 5-azaC exposure, principally after 72 h of treatment. This change occurred in a non-specific pattern. Our study demonstrates an association between loss of satellite 2 DNA methylation and chromosome loss in human lymphocytes.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aneuploidy, the abnormal distribution of chromosomes in daughter cells that modifies the standard haploid content, is an anomalous process that is associated with human diseases, such as congenital syndromes and spontaneous abortions, and has been extensively associated with various cancers. Chromosome gains or losses are strongly associated to direct modifications in gene expression, affecting cellular phenotypes [1]. It is known that 90% of solid tumors contain aneuploid cells, and this phenomenon has been associated with chemoresistance, more severe illnesses and worse prognoses, suggesting an important contribution of abnormal chromosomal content to phenotypic aggressiveness in cancer cells [2]. Despite the importance of aneuploidy in the origin of human diseases, its causes are largely unknown. Recently, pathways associated with the generation of aneuploid cells have been described, including mitotic checkpoint defects, sister chromatid-cohesion defects, merotelic attachments, and multipolar mitotic

spindles [3]. However, the causes of activation or initiation of these pathways have not yet been clarified.

Some evidence has suggested an important role of DNA methylation in maintaining chromosome stability and ensuring the correct distribution of chromosomes to daughter cells. In embryonic stem cells, the inactivation of Dnmt3b, a *de novo* methyltransferase, is associated with hypomethylation, aneuploidy, polyploidy, chromosome breaks, and chromosome fusions [4]. Demethylating substances, such as 5-azacytidine (5-azaC) and 5-aza-2' deoxycytidine, also induce chromosome missegregation, deletions, chromosome breaks, isochromosome formation, translocations, undercondensation of pericentromeric regions, and somatic pairing between the constitutive heterochromatin of chromosomes 1, 9, and 16 [5] suggesting an important role of DNA methylation in the correct compaction and distribution of chromosomes in each cell cycle.

Human diseases such as the ICF syndrome (immunodeficiency, centromeric region instability, and facial anomalies), cancer, or premature aging, involve alterations in the heterochromatin structure induced by epigenetic modifications, which can induce chromosome instability [6–10]. The ICF syndrome is the only known genetic disease in humans that involves mutations in Dnmt3b, which encodes an enzyme that methylates *de novo* cytosine residues in DNA. Though not all ICF patients possess Dnmt3b

* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, P.O. Box 70-228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico.
Tel.: +52 55 5628 0425; fax: +52 55 5628 0432.

E-mail address: herreram@biomedicas.unam.mx (L.A. Herrera).

mutations, cells from patients with Dnmt3b mutations are characterized by DNA hypomethylation in certain portions of the genome, most notably satellite 2, as well as by multiple forms of chromosomal instability and chromosomal aberrations such as isochromosomes, decondensation of pericentromeric regions, multibranched chromosomes, chromosome breaks, and micronuclei (MN) formation [11].

The pericentromeric region is important for chromosome segregation because of its localization near the centromere. This region contains high levels of DNA methylation and is composed of repetitive sequences (i.e., satellites 2 and 3) that have not been extensively studied because of their complexity. Satellite 2 is composed of basic repeats of 23–26 bp containing frequent GGAAT and ATC sequences and a less abundant CGAAT sequence that can be methylated. It is concentrated in megabase-sized regions near the centromeres of chromosomes 1 and 16 [12], and is considered the major sequence of the long heterochromatic region adjacent to the centromere of chromosome 1 [13]. Pericentromeric hypomethylation has been reported in some cancers [14] and is associated with a worse prognosis. Some studies have also reported a fragile site within the pericentromeric heterochromatin (1cen-1q12) that has been associated with chromosome translocations in several types of cancer [15], but the reasons for this susceptibility remain unknown. Analyses performed in breast adenocarcinomas, non-neoplastic breast tissues, and normal somatic tissue have demonstrated that malignant tumors show hypomethylation at satellite 2 as compared with non-neoplastic breast tissue samples and normal controls, and these differences have not been reported in centromeric satellite DNA [16].

To date, the role of pericentromeric methylation patterns on the generation of aneuploidy and chromosome instability in human somatic cells remains poorly studied. Thus, we aimed to analyze DNA methylation patterns on satellite 2, its modification in response to 5-azaC, and its association with missegregation after various cell cycles in human somatic cells. We observed a progressive loss of pericentromeric methylation associated with missegregation of chromosomes containing satellite 2 (chromosomes 1 and 16) on its pericentromeric regions but not of chromosomes with other satellite sequences (chromosomes 9 and Y).

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatment

Peripheral blood lymphocytes from two young men were cultured in RPMI medium (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, USA), 1% non-essential amino acids (Sigma, USA), and 1% L-glutamine (Gibco, USA). Lymphocytes were stimulated with phytohaemagglutinin (Gibco, USA), and after 48 h of proliferation, the medium was changed to a treatment with freshly prepared 5-azaC at a final concentration of 10 μ M [17] (Sigma, USA). Cultures were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified incubator. Cells were harvested after 24, 48, and 72 h of exposure to 5-azaC, corresponding to 72, 96, and 120 h of culture, respectively.

2.2. Immunodetection of 5-methylcytosines (5mC) and image analysis

For metaphase preparations, lymphocytes were incubated with colcemid (0.2 μ g/ml; Gibco, USA) for 1 h before the cells were harvested. Cultures were processed according to conventional air-drying protocols. Briefly, after 30 min of incubation in hypotonic solution (0.075 M KCl) at 37 °C, the cells were fixed in cold 3:1 methanol:acetic acid solution and dropped onto clean, cold slides. For immunodetection of 5mC, we used previously described protocols [18]. The slides were irradiated under a germicidal lamp (UVP Model XX-15S 244 nm) in phosphate-buffered saline (PBS) at a distance of 25 cm at 4 °C for 1 h. The slides were immersed in PBS with 0.3% bovine serum albumin fraction V (BSA) and 0.1% Tween 20 for 1 h at room temperature. A monoclonal antibody against 5mC (Calbiochem, USA) was added to the slides after dilution in PBS–BSA (1:1000), which were then incubated for 60 min in a humid chamber at 37 °C. After two careful rinses in PBS–BSA, the anti-mouse IgG antibody conjugated to FITC (Calbiochem, USA) was added as the secondary antibody and incubated for 60 min. After a brief wash in PBS, the slides were mounted in anti-fade solution with DAPI and analyzed using a UV Carl

Zeiss microscope equipped with an HBO 100 W mercury lamp and a suitable filter. Immunodetection and metaphasic methylation pattern analysis were carried out using non-processed images of 50 metaphases with 46 non-overlapping chromosomes; three independent experiments were performed. The methylation pattern in metaphase and the loss of signals from large blocks of pericentromeric methylation in metaphase were determined using Axiovision Rel. 4.6 software. Because three chromosomes were considered for the analysis of pericentromeric heterochromatin methylation (chromosomes 1, 9, and 16), a total of six signals per metaphase was considered as normal.

2.3. Analysis of the methylation pattern on satellite 2 DNA in human lymphocytes exposed to 5-azaC

Genomic DNA from lymphocytes was purified using the proteinase K/phenol/chloroform method. Purified DNA (2 μ g) was denatured by the addition of 1/9 vol of freshly prepared 3 M sodium hydroxide and incubated for 15 min at 37 °C. Denatured DNA was treated with a sodium bisulfite plus urea solution, and hydroquinone to final concentrations of 5.36 M, 3.44 M and 0.5 mM, respectively. The reaction was subjected to 20 cycles of 55 °C for 15 min followed by denaturation at 95 °C for 30 s in a PCR machine.

To amplify a ~400-bp region of satellite 2, we used a previously reported protocol [19] with some modifications. To amplify unmethylated DNA, primers sat2-384U (5'-ATGGAATGAAAGGGTTCATCT-3') and sat2-781L (5'-ATTCGAGTCCATTCGATGATTCAT-3') were used. To amplify bisulfite-converted DNA, we used degenerate primers for methylated and unmethylated sequences. The first round of polymerase chain reaction (PCR) was performed using primers sat2biup-1f (5'-TTGAATGGAATGAAAGGGTTATTA-3') and sat2biup-2r (5'-C[G/A]AATCCATTC[G/A]ATAATTCATCC-3'). The resulting PCR product was purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, USA) to remove primers and then eluted. Second dilutions of the primary amplification product were used for the second round of PCR with primers st2biup-3f (5'-TGAAATGAAAGGGTTATTATTA-3') and st2biup-4r (5'-AATCCATTCATTCATTCATTC[G/A]ATA-3'). Approximately 200 ng of converted DNA was used in a 100- μ l reaction with 200 μ M dNTPs, 2 mM MgCl₂, 0.5 μ M each primer, and 1.25 U Taq polymerase; the PCR was performed under the following conditions in a 2720 thermal cycler (Applied Biosystems): 95 °C for 5 min for one cycle, and then 95 °C for 1 min, 65 °C for 1 min, 72 °C for 2 min for 30 cycles, followed by 72 °C for 7 min for one cycle.

The PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit and ligated into vector pTZ57R/t from the InsTAClone PCR cloning kit (Fermentas, USA), and the ligation products were introduced into *Escherichia coli* via thermal conditions using standard protocols. Colonies containing the fragment of interest were selected for sequencing using the vector primer M13 to amplify the inserts. We analyzed all the complete sequences from at least 10 clones on each experimental point. Statistical differences between the groups were determined using the Mann–Whitney U test. Differences with *p* values less than 0.05 were considered significant.

2.4. Micronuclei detection, and fluorescence *in situ* hybridisation of chromosomes 1, 9, 16, and Y on binucleate cells

Lymphocytes cultures were treated with cytochalasin B (Sigma, USA) to obtain binucleate cells. Cells were fixed in cold 3:1 methanol:acetic acid solution and dropped onto clean, cold slides and counterstained with hematoxylin–eosin staining. Binucleate cells were analyzed for missegregation in three independent experiments using a light microscope (Leyca). One-thousand binucleate cells were analyzed on coded slides for MN induction. MN were scored only if they were no larger than one-third of the diameter of the main nucleus, did not overlap the main nucleus, and had distinct borders. Also, fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) was performed according to conventional protocols. We used probes against the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 1, 9, 16, and Y (Aquarius, USA). Denaturation was performed at 75 °C, and hybridisations were carried out at 37 °C overnight in a humid chamber; slides were counterstained with DAPI (Vectashield H-1200, USA). Binucleate cells were analyzed for missegregation in three independent experiments using a UV Carl Zeiss microscope. A minimum of 500 binucleate cells were analyzed on coded slides for MN induction. MN were classified into two categories, MN(+) and MN(–), to probe for each chromosome. Three independent experiments were performed, and statistical analyzes comparing untreated and treated samples were conducted using a *t*-test.

3. Results and discussion

Epigenetic alterations have been described as a cause of some forms of chromosomal instability. However, these alterations are not currently considered as a major contributor in chromosomal instability and aneuploidy in mammals [3]. In fact, key components of chromosome segregation, such as centromeres and CENP-A linkage, are most probably directed by epigenetic changes than by DNA sequences [20].

In the present study, we have used immunofluorescence detection of 5mC to determine DNA methylated regions in metaphase chromosomes (Fig. 1). The results show a progressive loss of methylated pericentromeric heterochromatin blocks in treated cells compared with untreated controls (Fig. 1A–C). Only 50%, 25%, and 17% of metaphases showed all six methylated pericentromeric heterochromatin blocks after 24, 48, and 72 h of treatment with 5-azaC, respectively (Fig. 1D).

Since pericentromeric heterochromatin is composed of repetitive sequences, among them satellite 2, we further analyzed DNA methylation patterns of satellite 2 using sodium bisulfite conversion and sequencing (Fig. 2). Sodium bisulfite conversion has been tested in multiple organisms and diverse cellular types; however, the incomplete conversion of unmethylated cytosines, especially in repetitive sequences, may generate false positive results. Many modifications have been added to the original technique for improving its efficiency and to decrease false

positive rates. Some of these modifications include fragmentation of DNA using restriction enzymes [21], introduction of multiple steps of denaturalization during conversion [21], to perform the reaction in presence of formamide [22], to perform reaction at 0°C [23], and the addition of urea to the chemical mixture [24].

In a preliminary analysis we found that, in comparison with conventional bisulfite conversion procedures, and some reported modifications [25,26], the use of bisulfite conversion in the presence of urea resulted in a highly efficient bisulfite conversion in repetitive sequences from human lymphocytes, which can be relevant to be used in any repetitive sequence in genomes (data not shown). Based on these results, we decided to evaluate DNA methylation patterns on satellite 2 by sodium bisulfite plus urea and sequencing. We found intense satellite 2 methylation in untreated lymphocytes (>90%). After the treatment with 5-azaC we observed some degree of demethylation in cytosines from the region studied,

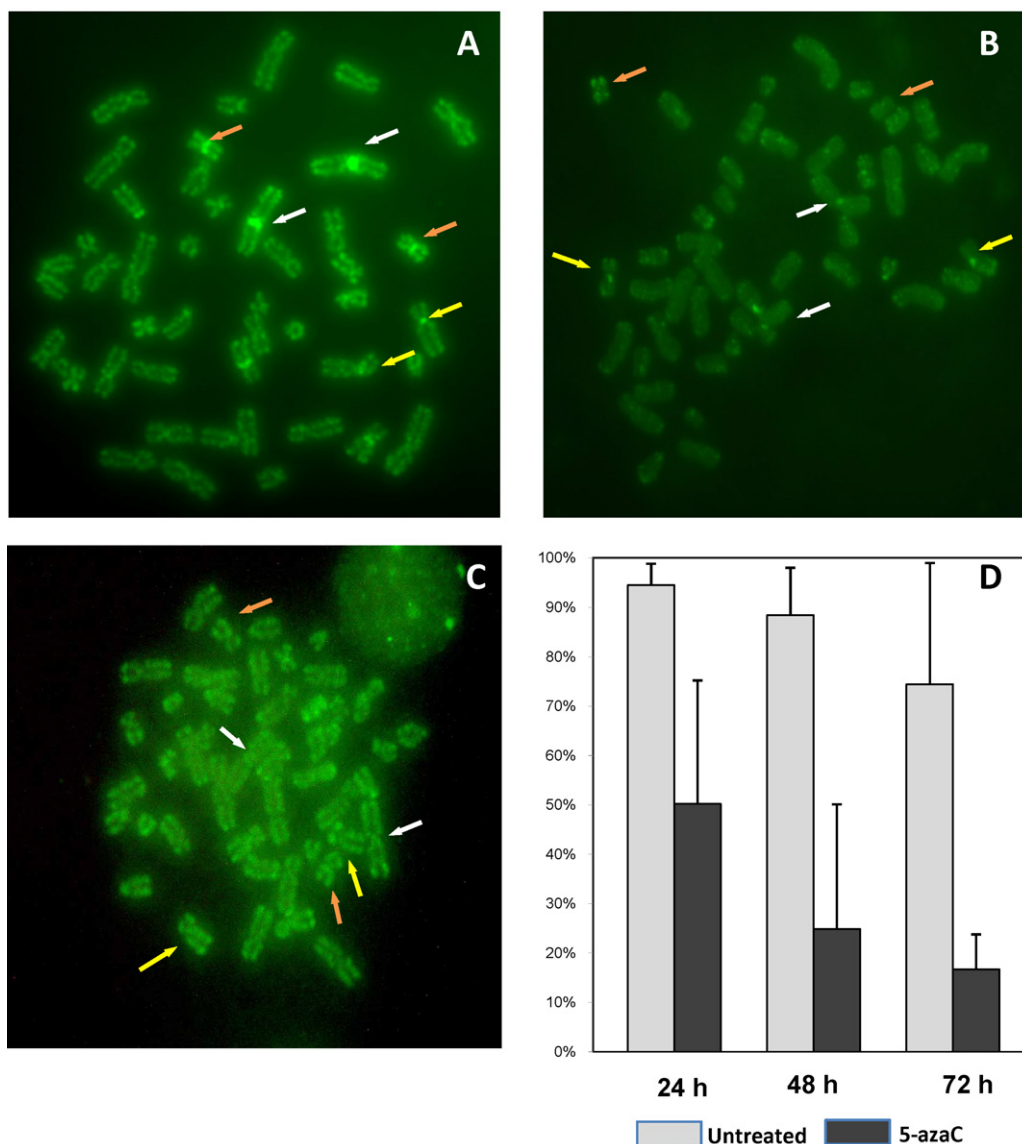


Fig. 1. Immunodetection of 5-methylcytosines (5mC) in the pericentromeric region of chromosomes 1, 9 and 16 from human lymphocytes treated with 5-azacytidine (5-azaC). DNA methylation patterns of metaphase chromosomes from human lymphocytes cultured for 24, 48 and 72 h with or without 5-azaC. Blocks of methylated pericentromeric heterochromatin were observed in chromosomes 1 (white arrows), 9 (yellow arrows), and 16 (orange arrows). (A) Metaphase from untreated lymphocytes cultures with six blocks of pericentromeric regions positive for 5mC antibody; (B and C) metaphases from lymphocytes cultures after 72 h of treatment with 5-azaC; and (D) percentage of metaphases with six blocks of pericentromeric methylated regions corresponding to chromosomes 1, 9, and 16 in human lymphocytes treated for 24, 48, and 72 h with 5-azaC. Fifty metaphases with six blocks of pericentromeric regions positive for 5mC antibody were counted in three independent experiments. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

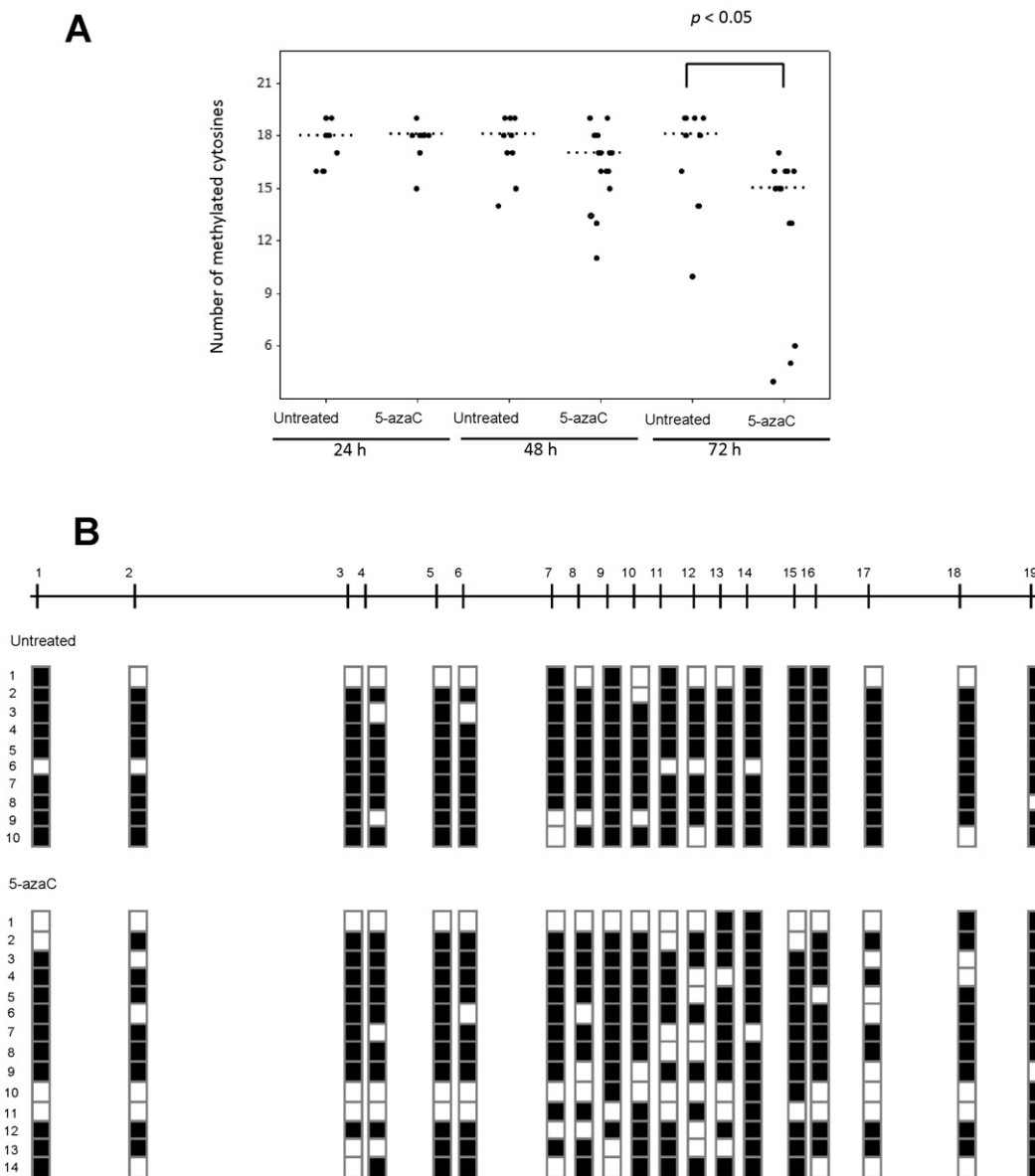


Fig. 2. Analysis of the methylation pattern on satellite 2 DNA in human lymphocytes exposed to 5-azacytidine (5-azaC). Genomic DNA from lymphocytes was purified, denatured, and converted with a sodium bisulfite plus urea solution. A ~400-bp region of satellite 2, was amplified and sequenced. The complete sequences from at least 10 clones on each experimental point were analyzed. Statistical differences between the groups were determined using the Mann–Whitney *U* test. Differences with *p* values less than 0.05 were considered significant. (A) Methylated cytosines in the satellite 2 analyzed region, lines represent the median number of methylated CpG sites. (B) Determination of the methylation status of every CpG site within the amplified satellite 2 region. Black boxes represent methylated CpGs, and white boxes represent non-methylated CpGs. Every line represents a non-redundant sequenced clone.

however, it was statistically significant only after 72 h of treatment (68%) (Fig. 2A).

The partial correlation between the DNA methylation results observed with the 5mC immunodetection and with the sequencing analysis could be attributed to differences among both techniques. In the immunodetection procedure, the antibody used is directed against 5mC located within any chromosomal region, not only against those located within the satellite 2, whereas the sequencing analysis was performed in a sequence specific manner by amplifying a ~400-bp region of satellite 2.

The analysis of non-redundant clones showed a heterogeneous pattern of methylation (Fig. 2B), with some clones affected on its whole extension and others with scarce loss of methylation. For instance, a bimodal distribution can be observed in clones for the 72 h treatment with 5-azaC (Fig. 2A). Since ligation and cloning after bisulfite conversion lead to the analysis from one PCR fragment, this

result suggests that demethylation may not occur evenly in a cell culture after exposure to a demethylating agent, some cells being more vulnerable than others.

5-azaC induced MN formation in a progressive manner throughout the experiment, with a considerable increase observed at 72 h (Fig. 3A). FISH against the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 1 (Fig. 3B) and 16 showed significant differences in the number of positive MN after 48 and 72 h of treatment compared with controls ($p < 0.05$), whereas chromosome Y, a chromosome with large regions of non-pericentromeric methylated heterochromatin [18], did not display differences between untreated and treated lymphocytes. Chromosome 9, which contains highly methylated satellite 3 in pericentromeric regions, did not show statistical differences compared with untreated lymphocytes (Fig. 3C). Strikingly, a larger effect on chromosome segregation was observed in the last period of experimentation,

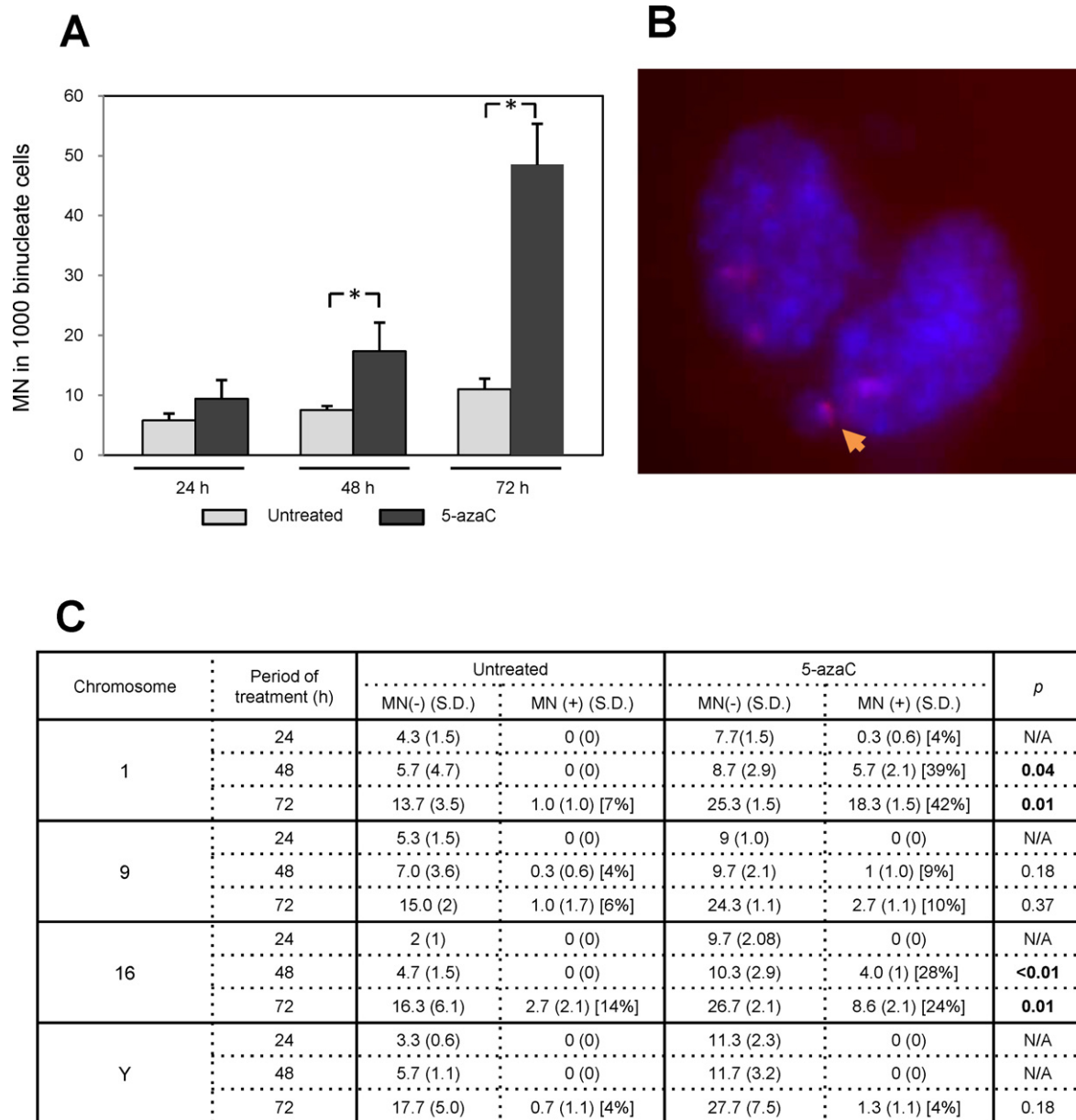


Fig. 3. Micronuclei detection, and fluorescence *in situ* hybridisation of chromosomes 1, 9, 16, and Y on binucleate cells. (A) Frequency of micronuclei (MN) in 1000 human binucleate lymphocytes treated for 24, 48 and 72 h with 5-azacytidine (5-azaC). Asterisks indicate time periods with statistical differences between treated and untreated cell cultures. (B) Binucleate cell with a micronucleus positive for chromosome 1 (arrow). (C) Missegregation of chromosomes 1, 9, 16, and Y detected by FISH in human lymphocytes exposed to 5-azaC, as assessed by the number of MN observed in binucleate cells treated for 24, 48, and 72 h. Micronuclei were classified into two categories, MN(+) and MN(-), to probe for each chromosome. Three independent experiments were performed, and statistical analyzes comparing untreated and treated samples were conducted using a *t*-test. *p* values correspond to statistical differences in the number of positive MN comparing treated with untreated cells. Five hundred binucleate cells were counted in each experiment. MN(-), micronuclei negative for any probed chromosome; MN(+), micronuclei positive for the respective chromosome; S.D., standard deviation; [% of MN(+)]; N/A, not available.

suggesting an accumulation of damage after treatment with 5-azaC. Previous studies have found MN formation in human cells exposed to 5-azaC containing not only chromosomes 1 and 16 but also chromosomes 6, 9, 15, 20 and Y. However, these studies have evaluated only the short-term effects of exposure to 5-azaC (7 h), and therefore, these results could be attributed to a clastogenic effect of this substance on highly methylated regions [27]. Since there was a number of MN negative for the probed chromosomes, we cannot conclude that 5-azaC affects the segregation of chromosomes with a high degree of satellite 2 sequence only. Nevertheless, it is important to mention that from the analyzed chromosomes, we did observe significant differences between treated and controls only in

those chromosomes containing satellite 2 in their pericentromeric region (i.e., chromosomes 1 and 16).

There has been a discussion on the fate of MN-bearing cells, in general it was accepted that MN will disappear after the next mitotic division resulting in the loss of the genetic material. However, a very elegant study has demonstrated, by time-lapse microscopy that MN-bearing cells will go into apoptosis more frequently than cells with a normal nucleus, without causing multipolar mitosis [28]. Nevertheless, micronucleated cells resulted in a higher rate from the division of MN-bearing cells than from cells with normal nucleus [28], which suggest a higher chromosomal instability in MN-bearing cells.

In conclusion, we did correlate changes in the DNA methylation pattern in a pericentromeric heterochromatin region with the induction of aneuploidy in human lymphocytes, and we found that satellite 2 demethylation induced by 5-azaC is associated with mis-segregation of chromosomes 1 and 16, but not chromosomes 9 and Y. Previous studies using cancer cells [14,29,30] and cells from patients with ICF syndrome [11] have noted the coincidence of satellite 2 hypomethylation and chromosome instability but could not prove that hypomethylation caused the instability since chromosome instability was already present at the time the cells were examined. In the present study we were able to induce demethylation and directly observe the concomitant initiation of chromosome instability.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México [grant number 83959]; and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) [grant number PAPIIT IN213311]. Diddier Prada was a fellow of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, and received a grant from the Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM. Authors gratefully thank the assistance of Patricia de la Torre in samples sequencing.

References

- [1] C. Gao, K. Furge, J. Koeman, K. Dykema, Y. Su, M.L. Cutler, A. Werts, P. Haak, G.F. Vande Woude, Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 8995–9000.
- [2] H. Rajagopalan, C. Lengauer, Aneuploidy and cancer, *Nature* 432 (2004) 338–341.
- [3] A.J. Holland, D.W. Cleveland, Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 478–487.
- [4] J.E. Dodge, M. Okano, F. Dick, N. Tsujimoto, T. Chen, S. Wang, Y. Ueda, N. Dyson, E. Li, Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17986–17991.
- [5] R. Hernandez, A. Frady, X.Y. Zhang, M. Varela, M. Ehrlich, Preferential induction of chromosome 1 multibranching figures and whole-arm deletions in a human pro-B cell line treated with 5-azacytidine or 5-azadeoxycytidine, *Cytogenet. Cell Genet.* 76 (1997) 196–201.
- [6] S. Schuffenhauer, O. Bartsch, M. Stumm, T. Buchholz, T. Petropoulou, S. Kraft, B. Belohradsky, G.K. Hinkel, T. Meitinger, R.D. Wegner, DNA, FISH and complementation studies in ICF syndrome: DNA hypomethylation of repetitive and single copy loci and evidence for a trans acting factor, *Hum. Genet.* 96 (1995) 562–571.
- [7] A.T. Sumner, A.R. Mitchell, P.M. Ellis, A FISH study of chromosome fusion in the ICF syndrome: involvement of paracentric heterochromatin but not of the centromeres themselves, *J. Med. Genet.* 35 (1998) 833–835.
- [8] S. Lim, E. Metzger, R. Schüle, J. Kirfel, R. Buettner, Epigenetic regulation of cancer growth by histone demethylases, *Int. J. Cancer* 127 (2010) 1991–1998.
- [9] A.H. Peters, D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schöfer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia, T. Jenuwein, Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability, *Cell* 107 (2001) 323–337.
- [10] D.K. Shumaker, T. Dechat, A. Kohlmaier, S.A. Adam, M.R. Bozovsky, M.R. Erdos, M. Eriksson, A.E. Goldman, S. Khuon, F.S. Collins, T. Jenuwein, R.D. Goldman, Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 8703–8708.
- [11] M. Ehrlich, The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease, *Clin. Immunol.* 109 (2003) 17–28.
- [12] M. Jeanpierre, Human satellites 2 and 3, *Ann. Genet.* 37 (1994) 163–171.
- [13] I. Tagarro, A.M. Fernandez-Peralta, J.J. Gonzalez-Aguilera, Chromosomal localization of human satellites 2 and 3 by a FISH method using oligonucleotides as probes, *Hum. Genet.* 93 (1994) 383–388.
- [14] H. Tsuda, T. Takarabe, Y. Kanai, T. Fukutomi, S. Hirohashi, Correlation of DNA hypomethylation at pericentromeric heterochromatin regions of chromosomes 16 and 1 with histological features and chromosomal abnormalities of human breast carcinomas, *Am. J. Pathol.* 161 (2002) 859–866.
- [15] D.S. Rupa, L. Hasegawa, D.A. Eastmond, Detection of chromosomal breakage in the 1cen-1q12 region of interphase human lymphocytes using multicolor fluorescence in situ hybridization with tandem DNA probes, *Cancer Res.* 55 (1995) 640–645.
- [16] K. Jackson, M.C. Yu, K. Arakawa, E. Fiala, B. Youn, H. Fiegl, E. Muller-Holzner, M. Widschwendter, M. Ehrlich, DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers, *Cancer Biol. Ther.* 3 (2004) 1225–1231.
- [17] F. Poirier, P. Bourin, D. Bladier, R. Joubert-Caron, M. Caron, Effect of 5-azacytidine and galectin-1 on growth and differentiation of the human B lymphoma cell line bl36, *Cancer Cell Int.* 1 (2001) 2.
- [18] M. Bensaada, H. Kiefer, G. Tachdjian, J.M. Lapierre, V. Cacheux, A. Niveleau, P. Metzger, Altered patterns of DNA methylation on chromosomes from leukemia cell lines: identification of 5-methylcytosines by indirect immunodetection, *Cancer Genet. Cytogenet.* 103 (1998) 101–109.
- [19] K.M. Hassan, T. Norwood, G. Gimelli, S.M. Gartler, R.S. Hansen, Satellite 2 methylation patterns in normal and ICF syndrome cells and association of hypomethylation with advanced replication, *Hum. Genet.* 109 (2001) 452–462.
- [20] B.E. Black, L.E. Jansen, D.R. Foltz, D.W. Cleveland, Centromere identity, function, and epigenetic propagation across cell divisions, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75 (2010) 403–418.
- [21] T. Rein, H. Zorbas, M.L. DePamphilis, Active mammalian replication origins are associated with a high-density cluster of mCpG dinucleotides, *Mol. Cell Biol.* 17 (1997) 416–426.
- [22] G. Zon, M.A. Barker, P. Kaur, S. Groshen, L.W. Jones, S.A. Imam, V.L. Boyd, Formamide as a denaturant for bisulfite conversion of genomic DNA: bisulfite sequencing of the GSTP1 and RARB2 genes of 43 formalin-fixed paraffin-embedded prostate cancer specimens, *Anal. Biochem.* 392 (2009) 117–125.
- [23] R. Feil, J. Charlton, A.P. Bird, J. Walter, W. Reik, Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulfite genomic sequencing, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 695–696.
- [24] R. Paulin, G.W. Grigg, M.W. Davey, A.A. Piper, Urea improves efficiency of bisulfite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 5009–5010.
- [25] M. Frommer, L.E. McDonald, D.S. Millar, C.M. Collis, F. Watt, G.W. Grigg, P.L. Molloy, C.L. Paul, A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 1827–1831.
- [26] P.M. Warnecke, C. Stirzaker, J. Song, C. Grunau, J.R. Melki, S.J. Clark, Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing, *Methods* 27 (2002) 101–107.
- [27] M. Guttenbach, M. Schmid, Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures, *Exp. Cell Res.* 211 (1994) 127–132.
- [28] K. Utani, Y. Kohno, A. Okamoto, N. Shimizu, Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress, *PLoS One* 5 (2010) e10089.
- [29] G.Z. Qu, P.E. Grundy, A. Narayan, M. Ehrlich, Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16, *Cancer Genet. Cytogenet.* 109 (1999) 34–39.
- [30] N. Wong, W.C. Lam, P.B. Lai, E. Pang, W.Y. Lau, P.J. Johnson, Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with q-arm copy gain in human hepatocellular carcinoma, *Am. J. Pathol.* 159 (2001) 465–471.

The Epigenetic Origin of Aneuploidy

Luis A. Herrera*, Diddier Prada, Marco A. Andonegui and Alfonso Dueñas-González

Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer (UIBC)-Instituto Nacional de Cancerología (INCan)-Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBM)-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

Abstract: Theodore Boveri, eminent German pathologist, observed aneuploidy in cancer cells more than a century ago and suggested that cancer cells derived from a single progenitor cell that acquires the potential for uncontrolled continuous proliferation. Currently, it is well known that aneuploidy is observed in virtually all cancers. Gain and loss of chromosomal material in neoplastic cells is considered to be a process of diversification that leads to survival of the fittest clones. According to Darwin's theory of evolution, the environment determines the grounds upon which selection takes place and the genetic characteristics necessary for better adaptation. This concept can be applied to the carcinogenesis process, connecting the ability of cancer cells to adapt to different environments and to resist chemotherapy, genomic instability being the driving force of tumor development and progression. What causes this genome instability? Mutations have been recognized for a long time as the major source of genome instability in cancer cells. Nevertheless, an alternative hypothesis suggests that aneuploidy is a primary cause of genome instability rather than solely a simple consequence of the malignant transformation process. Whether genome instability results from mutations or from aneuploidy is not a matter of discussion in this review. It is most likely both phenomena are intimately related; however, we will focus on the mechanisms involved in aneuploidy formation and more specifically on the epigenetic origin of aneuploid cells. Epigenetic inheritance is defined as cellular information—other than the DNA sequence itself—that is heritable during cell division. DNA methylation and histone modifications comprise two of the main epigenetic modifications that are important for many physiological and pathological conditions, including cancer. Aberrant DNA methylation is the most common molecular cancer-cell lesion, even more frequent than gene mutations; tumor suppressor gene silencing by CpG island promoter hypermethylation is perhaps the most frequent epigenetic modification in cancer cells. Epigenetic characteristics of cells may be modified by several factors including environmental exposure, certain nutrient deficiencies, radiation, etc. Some of these alterations have been correlated with the formation of aneuploid cells *in vivo*. A growing body of evidence suggests that aneuploidy is produced and caused by chromosomal instability. We propose and support in this manuscript that not only genetics but also epigenetics, contribute in a major fashion to aneuploid cell formation.

Received on: January 29, 2008 - Revised on: February 26, 2008 - Accepted on: February 26, 2008

Key Words: Aneuploidy, cancer, epigenetics, chromosome instability.

INTRODUCTION

Chromosome number is transmitted with a high rate of fidelity to daughter cells in each cell division. Deviation from normal chromosome number leading to an unbalanced chromosome complement or to any chromosome number that is not an exact multiple of the haploid number is referred to as aneuploidy. In humans, aneuploidy has different clinical consequences depending on the cell type affected. If germinal cells are affected, aneuploidy is responsible for nearly 20% of spontaneous abortions, most frequently within the first semester, affecting mainly women aged >35 years. Nonetheless, aneuploidy affecting certain combinations of sex chromosomes and small chromosomes such as 13, 18, and 21 may be present in products that survive to gestation, although with birth defects, abnormal development, infertility, mental retardation, and early death in some cases. If aneuploidy occurs in somatic cells, it could result in apoptosis or

chromosomal instability, the latter strongly associated with generation, aggressiveness, and resistance of cancer cells [1].

The causes of aneuploidy and chromosomal instability remain largely unknown. Many experiments support the hypothesis of a genetic cause of aneuploidy and chromosomal instability; notwithstanding this, it is important to point out that the human genome is contained in chromosomes, whose structure is more than a simple array of genes, and one that determines chromosomal behavior during mitosis and meiosis, distribution of genes to daughter cells a direct consequence of this behavior. In fact, the human genome contains a large proportion of DNA that forms highly repeated short DNA sequences incapable of coding for proteins; this may play a role in the stabilization and normal functioning of chromosomes that can be implicated in the normal segregation process and in prevention of genomic instability.

It is now accepted that gene expression and chromosome biology are largely affected by epigenetic marks within chromosomes. These marks occur in the chromatin of eukaryotic genomes, are present in both DNA and the associated histones, and are stable throughout rounds of cell divi-

*Address correspondence to this author at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, P.O. Box 70-228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., México; Tel: (+52) (55) 5628-0425; E-mail: herreram@biomedicas.unam.mx

sion but do not involve changes in the organism's underlying DNA sequence. Epigenetic changes play a role in the cellular differentiation process, allowing cells to maintain differential gene expression stably despite containing the same genomic material. Epigenetic information is also essential for the formation of heterochromatin, which is highly compacted, not so accessible to transcription and recombination machinery as are other chromosome regions, and forms structured nucleosome arrays. These characteristics of heterochromatin depend on epigenetic marks that include post-translational modifications of histones and DNA methylation. Although for some time the repetitive DNA contained in heterochromatin was considered as "junk", recent evidence indicates that heterochromatin can also play important roles during chromosome segregation. Therefore, epigenetics is not only important for genome expression, but also for its correct segregation during mitosis and meiosis.

Here, we review the role of DNA methylation in chromosome stability and the impact of modifications on this epigenetic mark in correct chromosome segregation, with special emphasis on cancer cells. This is not only because the majority of experiments have been carried out either in tumor cells or in cancer cell lines, but also due to the importance of aneuploidy and epigenetics in carcinogenesis. Currently, it is well known that aneuploidy is observed in virtually all cancers. **Gain and loss of chromosomal material in neoplastic cells is considered a process of diversification that leads to survival of the fittest clones.** Cancer, on the other hand, involves both global and gene-specific hypomethylation and hypermethylation, as well as widespread chromatin modifications [2].

THE CLASSIC CONCEPT OF THE ORIGIN OF ANEUPLOIDY

Induction of aneuploidy has been associated with defects in chromosome segregation resulting from mitotic spindle alterations, centrosome amplifications, cell-cycle checkpoint defects, non-separation of chromatids, and telomere stability, among others. The classical point of view is that these alterations are induced mainly by mutations in some genes that control chromosome segregation. More than 100 genes are expected to cause chromosomal instability when mutated in eukaryotic cells, including genes involved in **telomere metabolism, chromatid cohesion, spindle assembly and dynamics, cell-cycle regulation, DNA repair, and checkpoint controls** [3]. However, some important genes are not mutated in aneuploid cells, but are expressed aberrantly [4].

Centrosome proteins such as Aurora kinases may contribute to aneuploidy and usually are overexpressed in cancer cell lines. Aurora A overexpression is associated with centrosome amplification and generation of polyploid cells containing multiple centrosomes. Aurora A overexpression also overrides the spindle assembly checkpoint, resulting in arrested mitosis with incomplete cytokinesis and leading to taxol resistance-associated multinucleation [5].

Studies with pre-invasive lesions found a high frequency of centrosome defects in addition to spindle abnormalities, correlated with a high rate of progression to cancer [6]. In the same way, low prevalence of centrosome defects was associated with low-grade lesions. Also, centrosome amplifi-

cations have been detected in *in situ*-stage breast carcinoma cells, indicating that these may develop early in the neoplastic process [6]. Centrosome amplification can be associated with diverse genes. For instance, centrosome duplication is controlled by Cdk2/cyclin E complex, which is inhibited by p21. Thus, overexpression of cyclin E or p21 inhibition results in centrosome amplification; moreover, dysfunction of p53, a positive p21 regulator, has the same outcome [7]. Plk1 is necessary for centrosome maturation, is overexpressed in many tumors, and correlates with poor prognosis [8].

Failure in the DNA damage response and double-strand break repair can lead to genetic alteration or chromosomal instability. Similarly, defects in cellular response to double-strand breakage result in genetic mutations, gene amplification, and chromosomal aberrations, and are associated with cancer [9]. For example, ATR activation culminates in cell-cycle arrest, apoptosis, and in DNA repair alteration. ATR has been shown to be a critical factor in the maintenance of chromosomal integrity, and its inhibition leads to chromosomal instability and overexpression of fragile sites. ATM and ATR function as key molecules in the DNA damage response, with a strong influence on the control of cell-cycle checkpoints, DNA repair, telomere maintenance, and apoptosis [10]. Many other specific DNA damage response genes and hereditary mutations in genes such as histone H2AX [11], mre11A, CHEK1, BRCA1, and -2 have been associated with chromosomal instability, and have been shown to cause tumor predisposition by initiating chromosomal instability [12-13].

Some experiments suggest that short telomeres could possess a key role in chromosomal instability, as observed in telomerase-negative immortalized cells, which tend to develop a tetraploid cell population [14]. Polyploidization is an event occurring concurrently with gradual loss of individual chromosome copies. Some preneoplastic lesions, such as Barrett's esophagus [15] and ulcerative colitis [16], have a high frequency of tetraploid cells. In fact, it has been suggested that some aneuploid cancer cells develop through a tetraploid intermediate [17].

The function of the spindle checkpoint is to ensure that all chromosomes are correctly aligned in metaphase cells and properly attached to the mitotic spindle before chromosome separation can proceed. Chromosomally instable cancer cells in tissue culture do not arrest in metaphase when incubated with microtubule-disrupting agents, most likely due to an abnormal mitotic checkpoint. Spindle checkpoint defects also have been demonstrated in head and neck cancer cell lines [18]. Spindle checkpoint gene mutations were initially reported in colon and pancreatic cancer, as well as in a single breast cancer cell line [19]. However, further analyses revealed that mutations in these genes are rather uncommon; therefore, chromosomal instability in tumors is due to other factors. Subsequent investigations have demonstrated aberrant expression of spindle checkpoint genes (over- and sub-expression) rather than chromosomal instability-related mutations [4, 20-22]. Mutations and control of chromosome segregation genes such as hZW10, -ILCH, and hROD have also been identified as playing a role in the stabilization of this structure, and their dysfunction might contribute to the aneuploidy process [13].

DNA METHYLATION AND INDUCTION OF CHROMOSOMAL INSTABILITY

Although there are several important elements involved in the generation and maintenance of epigenetic marks, we will focus on DNA methylation and its contribution to chromosome stability. Excellent reviews on the elements that make up the DNA methylation machinery have been published recently. Nevertheless, we consider it important to describe briefly some of the most relevant characteristics of this process.

DNA methylation is the covalent attachment of a methyl group from S-adenosyl-methionine (SAM) to carbon 5 of the cytosine ring [23]. It is one of the best studied factors involved in cellular epigenetics and is considered an important gear in the chromatin compaction and maintenance process. In constitutive heterochromatin, DNA methylation is directed by post-translational modifications of histones and completed by proteins, such as methyl-binding proteins, which are characterized by a chromodomain that binds specifically to methylated DNA and recruits enzymatic complexes, e.g., histone deacetylases. This model has been extensively reviewed elsewhere [24] and is currently used to explain the perpetuation of epigenetic modifications that derive in constitutive heterochromatin region formation. In facultative heterochromatin and in maintenance methylation, the epigenetic signal lies in the parental strand and corresponds to a methylated cytosine [25].

The enzymes directly involved in DNA methylation are known as DNA-methyltransferases, or Dnmts. Mammals in general express three families of Dnmts: Dnmt1; -2, and -3 [26-27]. All mammalian Dnmts known to date possess a common catalytic domain that is characterized by 10 conserved amino acid motifs implicated in the catalytic function. Dnmt1 and -3 enzymes contain a large N-terminal regulatory domain responsible for the differential function between them.

Dnmt1 is highly expressed in somatic differentiated cells and is responsible for generation of methylation patterns in many daughter cells after differentiation. In other words, this enzyme is responsible for DNA methylation perpetuation in promoter regions of tissue-specific genes, juxtacentromeric satellites, and imprinting control regions, although its work in maintenance methylation may be complemented by the remaining Dnmts [28]. This enzyme recognizes an asymmetric specific methylated sequence for transferring the methyl group to the newly incorporated cytosine. Hemimethylation is an essential process to maintain DNA methylation patterns during cell proliferation, because any mistake—including alterations in methylation machinery and/or methyl group bioavailability—could generate important scarring in the epigenome. It has been shown, with the use of demethylating *de novo* agents, that hypomethylating stress may induce changes in the methylation pattern that can be conserved even in absence of the substance.

Dnmt3a, -b, and -L generate methylation, establish the methylation pattern, and are highly expressed in embryonic stage [29]. DNA methylation is conserved throughout a long time period and many cell cycles [30]. An important component of this cascade of events comprises proteins with a chromodomain, called Methyl-CpG-binding proteins, which interact with either histone deacetylases or histone methyltransferases and other enzymatic complexes to create a compacted chromatin [31].

It is important to emphasize genome structures in somatic cells that are normally DNA methylated. Some of these structures are involved in the process of chromosome segregation and genome stabilization. In our laboratory, we have found that this pattern of methylation, which involves important chromosomal structures, changes with response to chemical compounds (Fig. 1), with important consequences in the segregation process (unpublished results).

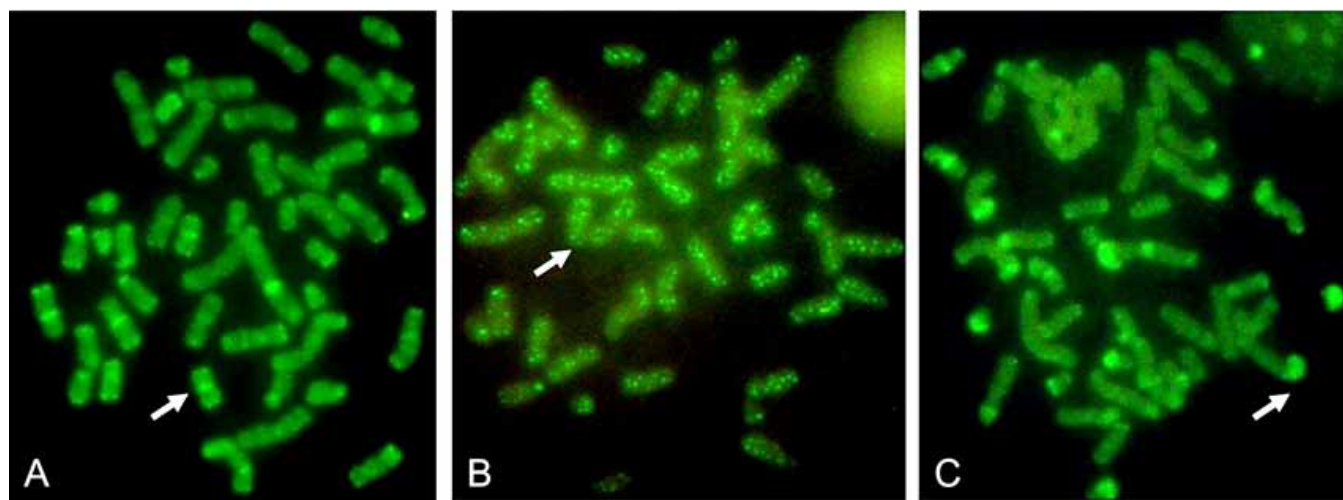


Fig. (1). Chromosome methylation patterns of human lymphocytes treated with ethionine or colchicine. Methylation patterns were revealed using a FITC-5methyl-cytosine antibody. A) Normal pattern; B) cells treated with colchicine; C) cells treated with ethionine. Methylation (arrows) is localized in pericentromeric and in some subtelomeric areas in control cultures, while the methylation pattern is localized along the chromosomes in colchicine-treated cells, or in subtelomeric areas in ethionine-treated cells.

DNA Methylation and Chromosome Instability

Cells with reduced DNA methylation levels appear to be more susceptible to undergoing chromosomal loss, gain, or rearrangement, probably because hypomethylation reduces chromosomal stability [32]. Experiments performed with embryonic stem cells show that cells suffered global DNA hypomethylation after Dnmt3b inactivation, generating chromosomal instability characterized by aneuploidy, polyploidy, and some forms of chromosomal aberrations such as chromosomal breaks and fusions. DNA hypomethylation was also associated with premature senescence or spontaneous immortalization [33].

Global hypomethylation in male germ cells may also result in meiotic abnormalities [34-35]. DNA demethylating drugs such as 5-azacytidine, a cytidine analogue [36], and its derived 5-aza-2' deoxycytidine, induce progressive increase in micronuclei formation. These demethylating substances lead to chromosomal aberrations such as deletions, chromosome breaks, isochromosome formation, and translocations [37]. In some cases, these substances induce undercondensation and somatic pairing among the constitutive heterochromatin of chromosomes 1, 9, and 16, 90% of these involving pericentromeric regions [38], figures denominated multi-branched chromosomes, and delay in the centromere separation sequence [39], generating preferential exclusion of chromosomes 1, 9, and 16 in micronuclei [40-41], as well as uncoiling and recombination in classical satellite-containing constitutive heterochromatin, but not in alpha satellite [42].

5-azacytidine, ethionine, and 9-b-D-arabinofuranosyladenine-induced hypomethylation increases sister chromatid exchange (SCE) formation in mammalian cells [43]. SCEs occur only after a second cell cycle following the demethylating pulse, indicating that the key event comprises demethylation of the old parental DNA strand. SCE persisting for many cell cycles after removal of the demethylating pulse may be due to methylation maintenance mechanisms [44].

At our laboratory, we have found that in cells exposed to aneugenic compounds, the chromosomal pattern of methylation changes, with an important reduction of the pericentromeric normal methylation that has been correlated with aneuploid cell formation. Changes in the methylation pattern of chromosomes has been previously described in Epstein-Barr virus-transformed monocytes [45] and in sodium arsenite-treated immortalized cells [46]; nonetheless, its relationship with aneuploidy has not been evaluated.

DNA Methylation in Sub-Telomeric and Telomeric Regions

Telomeres are nucleoproteic structures at the end of chromosomes that consist of tandem repeats of the TTAGGG sequence, which is bound by associated proteins [47]. Telomere length is regulated by telomerase, a reverse transcriptase, by alternative telomere lengthening and by histone modifications and sub-telomeric methylation [48]. Telomere function is also controlled by proteins such as TRF1, -2, POT1, TIN2, and Rap1, a mammalian telomeric core complex that forms and protects the telomere [49]. Mammalian telomeres contain histone modifications such as the H3K9 di- and trimethylation produced by histone-methyltransferases

Suv39h1 and -2 [50], trimethylation of H4K20 by Suv420h1 and -2, and the retinoblastoma family of proteins, as well as the binding of CBX1, -3, and -5 [51].

Sub-telomeric regions are rich in repetitive DNA, have a high density of CpG sequences, and are methylated in human somatic cells [52] observed by cytogenetic methods [53]. The short arms of acrocentric chromosomes 13, 14, 15, 21, and 22 correspond to high concentrations of methylated CCGG repeats at the end of the chromosomes [54]. When epigenetic changes are lost, telomere elongation takes place, suggesting that a compacted chromatin state is fundamental for controlling telomere length. Lack of Dnmts also increases telomeric recombination, indicating that DNA methylation protects the genome from illegitimate recombination between repetitive sequences of telomeres. Loss of methyl groups in telomeres by knock-out of the Dnmt3b has been correlated with the presence of SCE in stem cells [48].

Recent reviews analyze the mechanisms implicated in telomere dysfunction-associated chromosome instability formation [49] and the importance of this phenomenon in the stability of the genome; nonetheless, the significance of methylation patterns in sub-telomeric regions in chromosomal instability induction has not been studied yet in depth. Nevertheless, in experiments with ICF cell lines the model of functional depletion of one of the de novo enzymes, Dnmt3b, demonstrate telomeric associations and clonal telomeric rearrangements between chromosomes and anaphase bridges. These are increased by the presence of short dysfunctional telomeres among various chromosomes [55], suggesting that sub-telomeric methylation may be mediated by Dnmt3b.

Sodium arsenite, a substance associated with DNA demethylation, generates nucleoplasmic bridges and Breakage/Fusion/Bridge (B/F/B) cycles, as well as telomeric associations and dicentric chromosomes, conferring a selective advantage on proliferation associated with an aneuploid state [46].

The DNA methylation inhibitor 5-azacytidine has also been able to induce telomeric fusions. Cancer cells commonly possess telomere instability [49, 55-56], and tumor cell lines have lost telomeres at a high rate (10^{-6} events per cell per generation). In tumor cell lines, telomere loss often results in sister chromatid fusion followed by B/F/B cycles [57] lasting for many generations. This inability to terminate B/F/B cycles is likely to contribute to the chromosome instability resulting from telomere loss in human tumor cells. Also, telomere function loss and cell-cycle control disruption are capable of triggering extensive chromosomal instability in colon cancer cells [58]. However, loss of sub-telomeric methylation in cancer and its role in the perpetuation of chromosomal instability in cancer cells has not been studied to date.

DNA Methylation at Pericentromeric Regions

Pericentromeric regions, the areas surrounding the centromere, are characterized by highly repetitive DNA segments termed classical satellites 2 and 3, which are mainly non-transcribed and highly methylated. These regions contain large amounts of methylated constitutive heterochro-

matin and are located at metacentric and sub-metacentric chromosomes 1, 9, and 16, and in the short arms of some acrocentric chromosomes such as 13, 14, 15, 21, and 22. Based on ICF syndrome findings, Ehrlich found a relationship between satellite 2 hypomethylation and induction of centromeric decondensation [59]. Pericentromeric region hypomethylation is associated with the induction of a significant reorganization of constitutive pericentromeric heterochromatin [60] and can be clearly observed in cells from patients with ICF syndrome [61].

Somatic cells from patients with ICF exhibit hypomethylated pericentromeric regions associated with chromosomal rearrangements, centromere under-condensation, and the formation of micronuclei preferentially containing chromosomes 1, 9, and 16 [32]. Defects in pericentromeric epigenetic heterochromatin modifications initiate a dynamic HP1-dependent response that rescues pericentromeric heterochromatin function and is essential for viable progression through mitosis [62].

Efficient DNA methylation of pericentromeric sequences requires previous trimethylation H3K9 (histone 3 lysine 9) by Suv39h histone methyltransferases [63]. Experimentally induced Suv39h1 overexpression increases trimethylation at H3K9, and is associated with defects in mitotic progression and chromosome segregation [64]. However, mice lacking Suv39h do not exhibit trimethylation at H3K9 within pericentromeric heterochromatin, but rather present increased genomic instability and cancer predisposition [65]. Pericentromeric regions have also been found hypomethylated in some cancers, including hepatocarcinoma, breast, urothelial, and ovarian cancer, and this condition was associated with poor prognosis [66-67].

Chromosome Instability and Aneuploidy Induced by Factors Modifying Epigenetic Marks

One characteristic of epigenetic marks is that they can be modified by genetic and environmental factors, which also induce chromosome instability and aneuploidy. For instance, the ICF syndrome (Immunodeficiency, Centromeric instability, Facial abnormalities), is a rare genetic disease in which some mutations in the Dnmt3b gene have been detected. These mutations not only affect the activity of the enzyme, but also reduce affinity by Dnmt3L [68]. Cells from patients with ICF syndrome present repetitive Alu sequence demethylation [69], satellites 2 and 3 preferentially at pericentromeric regions [70], and hypomethylation of the CpG island of genes located at the inactive X chromosome and of non-satellite DNA repeats D4z4 and NBL2 [71]. These cells also present multiple chromosomal aberrations such as isochromosomes, multibranched chromosomes, and breaks. In addition to the high frequency of chromosomal instability observed in patients with ICF, they do not develop cancer at a higher frequency than the general population, most likely due to their short life span (survival to 10 years of age) [61].

Chemical substances such as cadmium, nickel, and sodium arsenite have been categorized as human carcinogens [72], affecting epigenetic marks by different mechanisms. Cadmium chloride induces aneuploidy in MRC-5 human cells [73-74], as well as in other animal models [75-76]. Cadmium inhibits both mammalian and bacterial Dnmt *in*

vitro and *ex vivo* [77-78] in a non-competitive manner, indicating an interaction with the DNA binding domain, probably at the cysteine residue in the active center of Dnmts [79]. This induces DNA hypomethylation early in the cell cycle. Prolonged exposure to cadmium induces signs of cell transformation such as altered cell morphology, increased invasiveness, and increased growth rate accompanied by DNA hypermethylation and enhanced Dnmt activity [78].

Exposure to inorganic arsenic, which interferes with normal methyl-group metabolism, represses expression of DNA methyltransferase genes Dnmt1 and -3a [80]. Sodium arsenite generates hypomethylation and changes in chromosome methylation patterns after acute exposure [46] that are maintained throughout several cell cycles without the substance. Also, arsenic-induced results in c-myc overexpression in TRL 1215 cells is probably associated with many other changes, such as hypomethylation, which is strongly correlated with malignant capacity [81]. Studies in exposed humans found significant DNA hypermethylation of p53 and -16 promoter regions in arsenic-exposed persons [82].

Nickel compounds are potent human and rodent carcinogens [83] and produce chromosome instability and aneuploidy in mammalian cells [84]. The carcinogenic potential of nickel compounds is thought to involve oxidative stress, genomic DNA damage, and epigenetic effects, including gene silencing. Nickel is a DNA methyltransferase activity inhibitor *in vitro* and *in vivo* and induces an initial DNA methylation decrease but with a rebound elevation of total DNA methylation [85]. Water-insoluble nickel compounds induce gene silencing by DNA methylation as a result of *de novo* methylation, being one of the first models of possible epigenetic carcinogenesis [86]. Short-term exposure of cells to crystalline nickel particles (1-3 days) silences, epigenetically, target genes placed near heterochromatin. A similar effect was found in yeast cells, in which nickel was able to silence the URA-3 gene while it is placed near a telomere silencing element [87-88]. Recently, it was discovered that this change was associated with a decrease in histone H3 and -4 acetylation, as well as an increase in histone H3K9 dimethylation, and that nickel decreased histone demethylase activity [89].

Folates are important methyl-group donors for DNA methylation. Nearly two decades ago, it was observed that cells from patients with folate and B₁₂ vitamin deficiencies have chromosomal abnormalities that persisted up to 12 months after hematological remission [90]. A study with postmenopausal women in whom moderate folate depletion was induced with a folate-deficient diet demonstrated increased chromosome missegregation frequency in their peripheral blood lymphocytes associated with a decrease on DNA methylation [91]. Similarly, a 3-month 700- μ g folate and 7- μ g vitamin B₁₂ supplementation was associated with a lower frequency of micronuclei in young persons [92]. Recently, it has been suggested that folic acid deficiency may increase not only micronuclei, but also the frequency of nuclear budding and nucleoplasmic bridges, suggesting that folate depletion plays a role in B/F/B cycle initiation [93]. Indeed, some authors have pointed out that folate depletion may be a factor associated with chromosomal instability induction more importantly than mutations in genes such as

BRCA1 or -2 [94]. Nevertheless, other group, working with human erythrocytes, reported that folate supplementation did not reduce chromosome missegregation frequency [95].

CONCLUSIONS

The molecular basis of heritable epigenetics and its effects on gene expression have been studied in a variety of organisms and associated with several human diseases. Although it is known that epigenetic marks influence chromatin structure, the potential role of epigenetics in the control of chromosome stability and segregation is still poorly understood. DNA methylation, one of the most important epigenetic marks, influences chromatin dynamics in chromosome areas that are essential for chromosome stability and segregation, such as sub-telomeric and pericentromeric regions, either directly or indirectly through its influence on histone acetylation and histone methylation. The mammalian pattern of DNA methylation acquired during embryogenesis is maintained stably but is potentially affected by the environment; these changes can affect chromosome behavior resulting in alterations in chromosome segregation. The evidence presented strongly suggest an important role of epigenetic marks in the control of chromosome segregation and integrity. Also, considering the importance of aneuploidy in the generation of human pathologies it is important to perform additional investigative efforts to obtain better understanding of the genetic and epigenetic mechanisms that control chromosome integrity and segregation.

REFERENCES

- [1] Gollin, S.M. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin. Cancer Biol.* **2005**, *15*: 33-42.
- [2] Feinberg, A.P. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* **2007**, *447*: 433-440.
- [3] Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **1998**, *396*: 643-649.
- [4] Yuan, B., Xu, Y., Woo, J.H., Wang, Y., Bae, Y.K., Yoon, D.S., Wersto, R.P., Tully, E., Wilsbach, K., Gabrielson, E. Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*: 405-410.
- [5] Anand, S., Penrhyn-Lowe, S., Venkataraman, A.R. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* **2003**, *3*: 51-62.
- [6] Pihan, G.A., Wallace, J., Zhou, Y., Doxsey, S.J. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res.* **2003**, *63*: 1398-1404.
- [7] D'Assoro, A.B., Lingle, W.L., Salisbury, J.L. Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* **2002**, *21*: 6146-6153.
- [8] Takai, N., Hamanaka, R., Yoshimatsu, J., Miyakawa, I. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene* **2005**, *24*: 287-291.
- [9] Zhou, B.B., Elledge, S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **2000**, *408*: 433-439.
- [10] Smith, L., Liu, S.J., Goodrich, L., Jacobson, D., Degnin, C., Bentley, N., Carr, A., Flaggs, G., Keegan, K., Hoekstra, M., Thayer, M.J. Duplication of ATR inhibits MyoD, induces aneuploidy and eliminates radiation-induced G1 arrest. *Nat. Genet.* **1998**, *19*: 39-46.
- [11] Bassing, C.H., Suh, H., Ferguson, D.O., Chua, K.F., Manis, J., Eckersdorff, M., Gleason, M., Bronson, R., Lee, C., Alt, F.W. Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* **2003**, *114*: 359-370.
- [12] Weaver, Z., Montagna, C., Xu, X., Howard, T., Gadina, M., Brodie, S.G., Deng, C.X., Ried, T. Mammary tumors in mice conditionally mutant for *Brcal* exhibit gross genomic instability and centrosome amplification yet display a recurring distribution of genomic imbalances that is similar to human breast cancer. *Oncogene* **2002**, *21*: 5097-5107.
- [13] Wang, Z., Cummins, J.M., Shen, D., Cahill, D.P., Jallepalli, P.V., Wang, T.L., Parsons, D.W., Traverso, G., Awad, M., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Goldberg, M.L., Karess, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Lengauer, C. Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Res.* **2004**, *64*: 2998-3001.
- [14] der-Sarkissian, H., Bacchetti, S., Cazes, L., Londono-Vallejo, J.A. The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. *Oncogene* **2004**, *23*: 1221-1228.
- [15] Reid, B.J., Haggitt, R.C., Rubin, C.E., Rabinovitch, P.S. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterology* **1987**, *93*: 1-11.
- [16] Levine, D.S., Rabinovitch, P.S., Haggitt, R.C., Blount, P.L., Dean, P.J., Rubin, C.E., Reid, B.J. Distribution of aneuploid cell populations in ulcerative colitis with dysplasia or cancer. *Gastroenterology* **1991**, *101*: 1198-1210.
- [17] Storchova, Z., Pellman, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2004**, *5*: 45-54.
- [18] Minhas, K.M., Singh, B., Jiang, W.W., Sidransky, D., Califano, J.A. Spindle assembly checkpoint defects and chromosomal instability in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **2003**, *107*: 46-52.
- [19] Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **1998**, *392*: 300-303.
- [20] Doak, S.H., Jenkins, G.J., Parry, E.M., Griffiths, A.P., Baxter, J.N., Parry, J.M. Differential expression of the MAD2, BUB1 and HSP27 genes in Barrett's oesophagus-their association with aneuploidy and neoplastic progression. *Mutat. Res.* **2004**, *547*: 133-144.
- [21] Wu, C.W., Chi, C.W., Huang, T.S. Elevated level of spindle checkpoint protein MAD2 correlates with cellular mitotic arrest, but not with aneuploidy and clinicopathological characteristics in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **2004**, *10*: 3240-3244.
- [22] Wassmann, K., Benezra, R. Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2001**, *11*: 83-90.
- [23] Costello, J.F., Plass, C. Methylation matters. *J. Med. Genet.* **2001**, *38*: 285-303.
- [24] Fuks, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, *15*: 490-495.
- [25] Vertino, P.M., Issa, J.P., Pereira-Smith, O.M., Baylin, S.B. Stabilization of DNA methyltransferase levels and CpG island hypermethylation precede SV40-induced immortalization of human fibroblasts. *Cell Growth Differ.* **1994**, *5*: 1395-1402.
- [26] Brenner, C., Fuks, F. DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2006**, *301*: 45-66.
- [27] Hermann, A., Gowher, H., Jeltsch, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*: 2571-2587.
- [28] Rhee, I., Jair, K.W., Yen, R.W., Lengauer, C., Herman, J.G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Baylin, S.B., Schuebel, K.E. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* **2000**, *404*: 1003-1007.
- [29] Bird, A.P., Wolffe, A.P. Methylation-induced repression: belts, braces, and chromatin. *Cell* **1999**, *99*: 451-454.
- [30] Schübeler, D., Lorincz, M.C., Cimbora, D.M., Telling, A., Feng, Y.Q., Bouhassira, E.E., Groudine, M. Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*: 9103-9112.
- [31] Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., Wolffe, A.P. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* **1998**, *19*: 187-191.
- [32] Tuck-Muller, C.M., Narayan, A., Tsien, F., Smeets, D.F., Sawyer, J., Fiala, E.S., Sohn, O.S., Ehrlich, M. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet. Cell Genet.* **2000**, *89*: 121-128.
- [33] Dodge, J.E., Okano, M., Dick, F., Tsujimoto, N., Chen, T., Wang, S., Ueda, Y., Dyson, N., Li, E. Inactivation of *Dnmt3b* in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*: 17986-17991.

- [34] Bourc'his, D., Bestor, T.H. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* **2004**, *431*: 96-99.
- [35] Hata, K., Kusumi, M., Yokomine, T., Li, E., Sasaki, H. Meiotic and epigenetic aberrations in Dnmt3L-deficient male germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* **2006**, *73*: 116-122.
- [36] Von Hoff, D.D., Slavik, M., Muggia, F.M. 5-Azacytidine. A new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia. *Ann. Intern. Med.* **1976**, *85*: 237-245.
- [37] Lavia, P., Ferraro, M., Micheli, A., Olivieri, G. Effect of 5-azacytidine (5-azaC) on the induction of chromatid aberrations (CA) and sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat. Res.* **1985**, *149*: 463-467.
- [38] Hernandez, R., Frady, A., Zhang, X.Y., Varela, M., Ehrlich, M. Preferential induction of chromosome 1 multibranching figures and whole-arm deletions in a human pro-B cell line treated with 5-azacytidine or 5-azadeoxycytidine. *Cytogenet. Cell Genet.* **1997**, *76*: 196-201.
- [39] Rodriguez, M.J., Lopez, M.A., Garcia-Orad, A., Vig, B.K. Sequence of centromere separation: effect of 5-azacytidine-induced epigenetic alteration. *Mutagenesis* **2001**, *16*: 109-114.
- [40] Fauth, E., Scherthan, H., Zankl, H. Frequencies of occurrence of all human chromosomes in micronuclei from normal and 5-azacytidine-treated lymphocytes as revealed by chromosome painting. *Mutagenesis* **1998**, *13*: 235-241.
- [41] Guttenbach, M., Schmid, M. Exclusion of specific Human Chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine Treatment of lymphocyte culture. *Exp. Cell. Res.* **1994**, *211*: 127-132.
- [42] Kokalj-Vokac, N., Almeida, A., Viegas-Pequignot, E., Jeanpierre, M., Malfroy, B., Dutrillaux, B. Specific induction of uncoiling and recombination by azacytidine in classical satellite-containing constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell Genet.* **1993**, *63*: 11-15.
- [43] Albanesi, T., Polani, S., Cozzi, R., Perticone, P. DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells *in vitro*. *Mutat. Res.* **1999**, *429*: 239-248.
- [44] Perticone, P., Palitti, F., Cozzi, R., D'Erme, M., Bona, R. Persistence of azacytidine-induced SCEs and genomic methylation in CHO cells *in vitro*. *Mutat. Res.* **1990**, *245*: 211-215.
- [45] Habib, M., Fares, F., Bourgeois, C.A., Bella, C., Bernardino, J., Hernandez-Blazquez, F., de Capoa, A., Niveleau, A. DNA global hypomethylation in EBV-transformed interphase nuclei. *Exp. Cell Res.* **1999**, *249*: 46-53.
- [46] Sciandrello, G., Caradonna, F., Mauro, M., Barbata, G. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogenesis* **2004**, *25*: 413-417.
- [47] Blackburn, E.H. Switching and signaling at the telomere. *Cell* **2001**, *106*: 661-673.
- [48] Gonzalo, S., Jaco, I., Fraga, M.F., Cehn, T., Li, E., Esteller, M., Blasco, M.A. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*: 416-424.
- [49] Bailey, S., Murnane, J.P. Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nuc. Ac. Res.* **2006**, *34*: 2408-2417.
- [50] Garcia-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A.H., Jenuwein, T., Blasco, M.A. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat. Genet.* **2004**, *36*: 94-99.
- [51] Garcia-Cao, M., Gonzalo, S., Dean, D., Blasco, M.A. A role for the Rb family of proteins in controlling telomere length. *Nat. Genet.* **2002**, *32*: 415-419.
- [52] Brock, G.J., Charlton, J., Bird, A. Densely methylated sequences that are preferentially localized at telomere-proximal regions of human chromosomes. *Gene* **1999**, *240*: 269-277.
- [53] Bensaada, M., Kiefer, H., Tachdjian, G., Lapierre, J.M., Cacheux, V., Niveleau, A., Metzzeu, P. Altered patterns of DNA methylation on chromosomes from leukemia cell lines: identification of 5-methylcytosines by indirect immunodetection. *Cancer Genet. Cytogenet.* **1998**, *103*: 101-109.
- [54] de Lange, T., Shiue, L., Myers, R.M., Cox, D.R., Naylor, S.L., Killery, A.M., Varmus, H.E. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell Biol.* **1990**, *10*: 518-527.
- [55] Gisselsson, D., Shao, C., Tuck-Muller, C.M., Sogorovic, S., Pals-son, E., Smeets, D., Ehrlich, M. Interphase chromosomal abnormalities and mitotic missegregation of hypomethylated sequences in ICF syndrome cells. *Chromosoma* **2005**, *114*: 118-126.
- [56] Meeker, A.K., Hicks, J.L., Iacobuzio-Donahue, C.A., Montgomery, E.A., Westra, W.H., Chan, T.Y., Ronnett, B.M., De Marzo, A.M. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*: 3317-3326.
- [57] Fouladi, B., Sabatier, L., Miller, D., Pottier, G., Murnane, J.P. The relationship between spontaneous telomere loss and chromosome instability in a human tumor cell line. *Neoplasia* **2000**, *2*: 540-554.
- [58] Pantic, M., Zimmermann, S., El Daly, H., Opitz, O.G., Popp, S., Boukamp, P., Martens, U.M. Telomere dysfunction and loss of p53 cooperate in defective mitotic segregation of chromosomes in cancer cells. *Oncogene* **2006**, *25*: 4413-4420.
- [59] Ehrlich, M. DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J. Nutr.* **2002**, *132*: 2424S-2429S.
- [60] Ma, Y., Jacobs, S.B., Jackson-Grusby, L., Mastrangelo, M.A., Torres-Betancourt, J.A., Jaenisch, R., Rasmussen, T.P. DNA CpG hypomethylation induces heterochromatin reorganization involving the histone variant macroH2A. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*: 1607-1616.
- [61] Ehrlich, M. The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin. Immunol.* **2003**, *109*: 17-28.
- [62] Zhang, R., Liu, S.T., Chen, W., Bonner, M., Pehrson, J., Yen, T.J., Adams, P.D. HP1 proteins are essential for a dynamic nuclear response that rescues the function of perturbed heterochromatin in primary human cells. *Mol. Cell Biol.* **2007**, *27*: 949-962.
- [63] Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., Peters, A.H. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.* **2003**, *13*: 1192-1200.
- [64] Melcher, M., Schmid, M., Aagaard, L., Selenko, P., Laible, G., Jenuwein, T. Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*: 3728-3741.
- [65] Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., Jenuwein, T. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **2001**, *107*: 323-337.
- [66] Nakagawa, T., Kanai, Y., Ushijima, S., Kitamura, T., Kakizoe, T., Hirohashi, S. DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. *J. Urol.* **2005**, *173*: 243-246.
- [67] Qu, G., Dubeau, L., Narayan, A., Yu, M.C., Ehrlich, M. Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat. Res.* **1999**, *423*: 91-101.
- [68] Xie, Z.H., Huang, Y.N., Chen, Z.X., Riggs, A.D., Ding, J.P., Gowher, H., Jeltsch, A., Sasaki, H., Hata, K., Xu, G.L. Mutations in DNA methyltransferase DNMT3B in ICF syndrome affect its regulation by DNMT3L. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*: 1375-1385.
- [69] Miniou, P., Bourc'his, D., Molina-Gomes, D., Jeanpierre, M., Viegas-Pequignot, E. Undermethylation of Alu sequences in ICF syndrome: molecular and *in situ* analysis. *Cytogenet. Cell Genet.* **1997**, *77*: 308-313.
- [70] Hassan, K.M., Norwood, T., Gimelli, G., Gartler, S.M., Hansen, R.S. Satellite 2 methylation patterns in normal and ICF syndrome cells and association of hypomethylation with advanced replication. *Hum. Gen.* **2001**, *109*: 452-462.
- [71] Kondo, T., Bobek, M.P., Kuick, R., Lamb, B., Zhu, X., Narayan, A., Bourc'his, D., Viegas-Pequignot, E., Ehrlich, M., Hanash, S.M. Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: hypomethylation of non-satellite DNA repeats D4Z4 and NBL2. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*: 597-604.
- [72] Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*: 1161-1208.
- [73] Seoane, A.I., Guerci, A.M., Dulout, F.N. Malsegregation as a possible mechanism of aneuploidy induction by metal salts in MRC-5 human cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **2002**, *40*: 20020-6.
- [74] Guerci, A., Seoane, A., Dulout, F.N. Aneuploidic effects of some metal compounds assessed by chromosome counting in MRC-5 human cells. *Mutat. Res.* **2000**, *469*: 35-40.
- [75] Bouilly, K., Gagnaire, B., Bonnard, M., Thomas-Guyon, H., Renault, T., Miramand, P., Lapègue, S. Effects of cadmium on ane-

- uploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *78*: 149-156.
- [76] Loumbourdis, N.S. Hepatotoxic and nephrotoxic effects of cadmium in the frog *Rana ridibunda*. *Arch. Toxicol.* **2005**, *79*: 434-440.
- [77] Poirier, L.A., Vlasova, T.I. The prospective role of abnormal methyl metabolism in Cadmium toxicity. *Environm. Health Perspect.* **2002**, *110*: 793-795.
- [78] Takiguchi, M., Achanzar, W.E., Qu, W., Li, G., Waalkes, M.P. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp. Cell Res.* **2003**, *286*: 355-365.
- [79] Adams, R.L.P. Eukariotic DNA methyltransferases-structure and function. *Bioessays* **1995**, *17*: 139-145.
- [80] Reichard, J.F., Schnekenburger, M., Puga, A. Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *352*: 188-192.
- [81] Chen, H., Liu, J., Zhao, C.Q., Diwan, B.A., Merrick, B.A., Waalkes, M.P. Association of c-myc overexpression and hyperproliferation with arsenite-induced malignant transformation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2001**, *175*: 260-268.
- [82] Chanda, S., Dasgupta, U.B., Guhamazumder, D., Gupta, M., Chaudhuri, U., Lahiri, S., Das, S., Ghosh, N., Chatterjee, D. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol Sci.* **2006**, *89*: 431-437.
- [83] Biggart, N.W., Costa, M. Assessment of the uptake and mutagenicity of nickel chloride in salmonella tester strains. *Mutat. Res.* **1986**, *175*: 209-215.
- [84] Ohshima, S. Induction of genetic instability and chromosomal instability by nickel sulfate in V79 Chinese hamster cells. *Mutagenesis* **2003**, *18*: 133-137.
- [85] Lee, Y.W., Klein, C.B., Kargacin, B., Salnikow, K., Kitahara, J., Dowjat, K., Zhitkovich, A., Christie, N.T., Costa, M. Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Mol. Cell Biol.* **1995**, *15*: 2547-2557.
- [86] Lee, Y.W., Broday, L., Costa, M. Effects of nickel on DNA methyltransferase activity and genomic DNA methylation levels. *Mutat. Res.* **1998**, *415*: 213-218.
- [87] Yan, Y., Kluz, T., Zhang, P., Chen, H.B., Costa, M. Analysis of specific lysine histone H3 and H4 acetylation and methylation status in clones of cells with a gene silenced by nickel exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2003**, *190*: 272-277.
- [88] Costa, M., Davidson, T.L., Chen, H., Ke, Q., Zhang, P., Yan, Y., Huang, C., Kluz, T. Nickel carcinogenesis: epigenetics and hypoxia signaling. *Mutat. Res.* **2005**, *592*: 79-88.
- [89] Chen, H., Ke, Q., Kluz, T., Yan, Y., Costa, M. Nickel ions increase histone H3 lysine 9 dimethylation and induce transgene silencing. *Mol. Cell Biol.* **2006**, *26*: 3728-3737.
- [90] Das, K.C., Mohanty, D., Garewal, G. Cytogenetics in nutritional megaloblastic anaemia: prolonged persistence of chromosomal abnormalities in lymphocytes after remission. *Acta Haematol.* **1986**, *76*: 146-154.
- [91] Titenko-Holland, N., Jacob, R.A., Shang, N., Balaraman, A., Smith, M.T. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. *Mutat. Res.* **1998**, *417*: 101-114.
- [92] Fenech, M., Aitken, C., Rinaldi, J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* **1998**, *19*: 1163-1171.
- [93] Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* **2006**, *600*: 58-66.
- [94] Beetstra, S., Salisbury, C., Turner, J., Altree, M., McKinnon, R., Suthers, G., Fenech, M. Lymphocytes of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation carriers, with or without breast cancer, are not abnormally sensitive to the chromosome damaging effect of moderate folate deficiency. *Carcinogenesis* **2006**, *27*: 517-524.
- [95] Abramsson-Zetterberg, L., Durling, L.J., Yang-Wallentin, F., Rytter, E., Vessby, B. The impact of folate status and folic acid supplementation on the micronucleus frequency in human erythrocytes. *Mutat. Res.* **2006**, *603*: 33-40.

BIBLIOGRAFÍA

1. Herrera, L.A., Prada, D., Andonegui, M.A. & Duenas-Gonzalez, A. The epigenetic origin of aneuploidy. *Curr Genomics* **9**, 43-50 (2008).
2. Gao, C., *et al.* Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8995-9000 (2007).
3. Nagaishi, M., *et al.* Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J Obstet Gynaecol Res* **30**, 237-241 (2004).
4. Castedo, M., *et al.* Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* **23**, 4362-4370 (2004).
5. Siavoshian, S., *et al.* Cloning of a human cancer cell line (NSCLC-N6) and comparative study of the clones in vitro. *Anticancer Res* **18**, 193-200 (1998).
6. Chelidonis, G., *et al.* DNA ploidy, E-cadherin, beta-catenin expression and their clinicopathologic significance in imprints of non-small cell lung cancer. *Anal Quant Cytol Histol* **31**, 332-339 (2009).
7. Duensing, A. & Duensing, S. Centrosomes, polyploidy and cancer. *Adv Exp Med Biol* **676**, 93-103 (2010).
8. Susini, T., *et al.* DNA Ploidy is Stronger Than Lymph Node Metastasis as Prognostic Factor in Cervical Carcinoma: 10-Year Results of a Prospective Study. *Int J Gynecol Cancer* (2011).
9. Weaver, B.A., Silk, A.D., Montagna, C., Verdier-Pinard, P. & Cleveland, D.W. Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell* **11**, 25-36 (2007).
10. Faggioli, F., Vijg, J. & Montagna, C. Chromosomal aneuploidy in the aging brain. *Mech Ageing Dev* (2011).
11. Beroukhi, R., *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899-905 (2010).
12. Holland, A.J. & Cleveland, D.W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 478-487 (2009).
13. Gopalakrishnan, S., Sullivan, B.A., Trazzi, S., Della Valle, G. & Robertson, K.D. DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate DNA methylation and the histone code at centromeric regions. *Hum Mol Genet* **18**, 3178-3193 (2009).
14. Cahill, D.P., *et al.* Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**, 300-303 (1998).
15. Yuan, B., *et al.* Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clin Cancer Res* **12**, 405-410 (2006).
16. Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-649 (1998).
17. Thompson, S.L. & Compton, D.A. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J Cell Biol* **180**, 665-672 (2008).
18. Storchova, Z. & Pellman, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 45-54 (2004).
19. Nigg, E.A. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* **2**, 815-825 (2002).
20. Zhou, H., *et al.* Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* **20**, 189-193 (1998).
21. Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S. & Vande Woude, G.F. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* **271**, 1744-1747 (1996).
22. Deng, C.X. Roles of BRCA1 in centrosome duplication. *Oncogene* **21**, 6222-6227 (2002).

23. McGrew, J.T., Goetsch, L., Byers, B. & Baum, P. Requirement for ESP1 in the nuclear division of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **3**, 1443-1454 (1992).
24. Yamamoto, A., Guacci, V. & Koshland, D. Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **133**, 85-97 (1996).
25. Zhang, X., *et al.* Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* **13**, 156-166 (1999).
26. Cimini, D., *et al.* Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol* **153**, 517-527 (2001).
27. Gassmann, R., *et al.* Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* **166**, 179-191 (2004).
28. Kaplan, K.B., *et al.* A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **3**, 429-432 (2001).
29. Fodde, R., *et al.* Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* **3**, 433-438 (2001).
30. Fodde, R., Smits, R. & Clevers, H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 55-67 (2001).
31. Green, R.A. & Kaplan, K.B. Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol* **163**, 949-961 (2003).
32. Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**, 623-627 (1997).
33. Shin, H.J., *et al.* Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer Cell* **4**, 483-497 (2003).
34. Taylor, S.S. & McKeon, F. Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* **89**, 727-735 (1997).
35. Sage, J. & Straight, A.F. RB's original CIN? *Genes Dev* **24**, 1329-1333 (2010).
36. Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330 (1995).
37. De La Rosa-Velazquez, I.A., Rincon-Arango, H., Benitez-Bribiesca, L. & Recillas-Targa, F. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res* **67**, 2577-2585 (2007).
38. Manning, A.L., Longworth, M.S. & Dyson, N.J. Loss of pRB causes centromere dysfunction and chromosomal instability. *Genes Dev* **24**, 1364-1376 (2010).
39. Amato, A., Lentini, L., Schillaci, T., Iovino, F. & Di Leonardo, A. RNAi mediated acute depletion of retinoblastoma protein (pRb) promotes aneuploidy in human primary cells via micronuclei formation. *BMC Cell Biol* **10**, 79 (2009).
40. Carter, S.L., Eklund, A.C., Kohane, I.S., Harris, L.N. & Szallasi, Z. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* **38**, 1043-1048 (2006).
41. van Harn, T., *et al.* Loss of Rb proteins causes genomic instability in the absence of mitogenic signaling. *Genes Dev* **24**, 1377-1388 (2010).
42. Anand, S., Penrhyn-Lowe, S. & Venkitaraman, A.R. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* **3**, 51-62 (2003).
43. Pihan, G.A., Wallace, J., Zhou, Y. & Doxsey, S.J. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* **63**, 1398-1404 (2003).
44. D'Assoro, A.B., Lingle, W.L. & Salisbury, J.L. Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* **21**, 6146-6153 (2002).

45. Zhou, B.B. & Elledge, S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439 (2000).
46. Smith, L., *et al.* Duplication of ATR inhibits MyoD, induces aneuploidy and eliminates radiation-induced G1 arrest. *Nat Genet* **19**, 39-46 (1998).
47. Bassing, C.H., *et al.* Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* **114**, 359-370 (2003).
48. Weaver, Z., *et al.* Mammary tumors in mice conditionally mutant for Brca1 exhibit gross genomic instability and centrosome amplification yet display a recurring distribution of genomic imbalances that is similar to human breast cancer. *Oncogene* **21**, 5097-5107 (2002).
49. der-Sarkissian, H., Bacchetti, S., Cazes, L. & Londono-Vallejo, J.A. The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. *Oncogene* **23**, 1221-1228 (2004).
50. Gonzalo, S., *et al.* DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **8**, 416-424 (2006).
51. Martinez, A.C. & van Wely, K.H. Centromere fission, not telomere erosion, triggers chromosomal instability in human carcinomas. *Carcinogenesis* **32**, 796-803 (2011).
52. Thompson, S.L., Bakhoun, S.F. & Compton, D.A. Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol* **20**, R285-295 (2010).
53. Barber, T.D., *et al.* Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3443-3448 (2008).
54. Wood, L.D., *et al.* The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* **318**, 1108-1113 (2007).
55. Wassmann, K. & Benezra, R. Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 83-90 (2001).
56. Ricke, R.M., Jeganathan, K.B. & van Deursen, J.M. Bub1 overexpression induces aneuploidy and tumor formation through Aurora B kinase hyperactivation. *J Cell Biol* **193**, 1049-1064 (2011).
57. Lo Iacono, M., *et al.* Aurora Kinase A expression is associated with lung cancer histological subtypes and with tumor de-differentiation. *J Transl Med* **9**, 100 (2011).
58. Kelly, K.R., *et al.* Targeting Aurora Kinases in Cancer Treatment. *Curr Drug Targets* (2011).
59. Wang, Z., *et al.* Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Res* **64**, 2998-3001 (2004).
60. Torres, E.M., Williams, B.R. & Amon, A. Aneuploidy: cells losing their balance. *Genetics* **179**, 737-746 (2008).
61. Gollin, S.M. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin Cancer Biol* **15**, 33-42 (2005).
62. Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2545-2550 (1997).
63. Kuukasjarvi, T., *et al.* Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* **57**, 1597-1604 (1997).
64. Lingle, W.L., *et al.* Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1978-1983 (2002).
65. Rodriguez-Paredes, M. & Esteller, M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* **17**, 330-339 (2011).
66. Allis D, J.T., Reinberg D. Overview and Concepts in Epigenetics. 24-56 (2007).
67. Ito, S., *et al.* Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**, 1129-1133 (2010).

68. Laurent, L., *et al.* Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res* **20**, 320-331 (2010).
69. Ehrlich, M., *et al.* Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* **10**, 2709-2721 (1982).
70. Saxonov, S., Berg, P. & Brutlag, D.L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1412-1417 (2006).
71. Tazi, J. & Bird, A. Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* **60**, 909-920 (1990).
72. Toyota, M., *et al.* Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* **68**, 4123-4132 (2008).
73. Thomson, J.P., *et al.* CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature* **464**, 1082-1086 (2010).
74. Doi, A., *et al.* Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* **41**, 1350-1353 (2009).
75. Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. & Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257 (1999).
76. Byun, H.M., *et al.* Epigenetic profiling of somatic tissues from human autopsy specimens identifies tissue- and individual-specific DNA methylation patterns. *Hum Mol Genet* **18**, 4808-4817 (2009).
77. Rideout, W.M., 3rd, Eggan, K. & Jaenisch, R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* **293**, 1093-1098 (2001).
78. Reik, W., Dean, W. & Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093 (2001).
79. Hermann, A., Gowher, H. & Jeltsch, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2571-2587 (2004).
80. Rougier, N., *et al.* Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev* **12**, 2108-2113 (1998).
81. Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. & Haaf, T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**, 501-502 (2000).
82. Oswald, J., *et al.* Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* **10**, 475-478 (2000).
83. Zhu, J.K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet* **43**, 143-166 (2009).
84. Carlson, L.L., Page, A.W. & Bestor, T.H. Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. *Genes Dev* **6**, 2536-2541 (1992).
85. Lucifero, D., Mann, M.R., Bartolomei, M.S. & Trasler, J.M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* **13**, 839-849 (2004).
86. Monk, M., Boubelik, M. & Lehnert, S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* **99**, 371-382 (1987).
87. Lister, R., *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**, 315-322 (2009).

88. Wolf, S.F., Jolly, D.J., Lunnen, K.D., Friedmann, T. & Migeon, B.R. Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2806-2810 (1984).
89. Bruniquel, D. & Schwartz, R.H. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol* **4**, 235-240 (2003).
90. Fontecave, M., Atta, M. & Mulliez, E. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* **29**, 243-249 (2004).
91. Rountree, M.R., Bachman, K.E. & Baylin, S.B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* **25**, 269-277 (2000).
92. Chuang, L.S., *et al.* Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* **277**, 1996-2000 (1997).
93. Bestor, T.H. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J* **11**, 2611-2617 (1992).
94. Li, E., Bestor, T.H. & Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915-926 (1992).
95. Robertson, K.D., *et al.* DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **25**, 338-342 (2000).
96. Kim, G.D., Ni, J., Kelesoglu, N., Roberts, R.J. & Pradhan, S. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J* **21**, 4183-4195 (2002).
97. Avvakumov, G.V., *et al.* Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* **455**, 822-825 (2008).
98. Rhee, I., *et al.* CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* **404**, 1003-1007 (2000).
99. Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R.D. & Roberts, R.J. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* **274**, 33002-33010 (1999).
100. Sciandrello, G., Caradonna, F., Mauro, M. & Barbata, G. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogenesis* **25**, 413-417 (2004).
101. Jair, K.W., *et al.* De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Res* **66**, 682-692 (2006).
102. Gowher, H. & Jeltsch, A. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites. *J Mol Biol* **309**, 1201-1208 (2001).
103. Hsieh, C.L. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* **19**, 8211-8218 (1999).
104. Ehrlich, M. The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin Immunol* **109**, 17-28 (2003).
105. Sakai, Y., Suetake, I., Shinozaki, F., Yamashina, S. & Tajima, S. Co-expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a2 and Dnmt3L in gonocytes of mouse embryos. *Gene Expr Patterns* **5**, 231-237 (2004).
106. Gopalakrishnan, S., *et al.* A novel DNMT3B splice variant expressed in tumor and pluripotent cells modulates genomic DNA methylation patterns and displays altered DNA binding. *Mol Cancer Res* **7**, 1622-1634 (2009).
107. Van Emburgh, B.O. & Robertson, K.D. Modulation of Dnmt3b function in vitro by interactions with Dnmt3L, Dnmt3a and Dnmt3b splice variants. *Nucleic Acids Res* **39**, 4984-5002 (2011).

108. Kang, E.S., Park, C.W. & Chung, J.H. Dnmt3b, de novo DNA methyltransferase, interacts with SUMO-1 and Ubc9 through its N-terminal region and is subject to modification by SUMO-1. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 862-868 (2001).
109. Linhart, H.G., *et al.* Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. *Genes Dev* **21**, 3110-3122 (2007).
110. Jeong, S., *et al.* Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. *Mol Cell Biol* **29**, 5366-5376 (2009).
111. Sharma, S., De Carvalho, D.D., Jeong, S., Jones, P.A. & Liang, G. Nucleosomes containing methylated DNA stabilize DNA methyltransferases 3A/3B and ensure faithful epigenetic inheritance. *PLoS Genet* **7**, e1001286 (2011).
112. Chedin, F., Lieber, M.R. & Hsieh, C.L. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16916-16921 (2002).
113. Oakes, C.C., La Salle, S., Smiraglia, D.J., Robaire, B. & Trasler, J.M. A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 228-233 (2007).
114. Jia, D., Jurkowska, R.Z., Zhang, X., Jeltsch, A. & Cheng, X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* **449**, 248-251 (2007).
115. Okano, M., Xie, S. & Li, E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **26**, 2536-2540 (1998).
116. Kunert, N., Marhold, J., Stanke, J., Stach, D. & Lyko, F. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* **130**, 5083-5090 (2003).
117. Bird, A.P. Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet* **11**, 94-100 (1995).
118. Ball, M.P., *et al.* Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol* **27**, 361-368 (2009).
119. Esteller, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* **16 Spec No 1**, R50-59 (2007).
120. Candelaria, M., *et al.* A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. *Ann Oncol* **18**, 1529-1538 (2007).
121. Esteller, M., *et al.* DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* **10**, 3001-3007 (2001).
122. Plass, C. & Soloway, P.D. DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur J Hum Genet* **10**, 6-16 (2002).
123. Hansen, K.D., *et al.* Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet* **43**, 768-775 (2011).
124. Ehrlich, M. DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J Nutr* **132**, 2424S-2429S (2002).
125. Ehrlich, M., *et al.* ICF, an immunodeficiency syndrome: DNA methyltransferase 3B involvement, chromosome anomalies, and gene dysregulation. *Autoimmunity* **41**, 253-271 (2008).
126. Miniou, P., Bourc'his, D., Molina Gomes, D., Jeanpierre, M. & Viegas-Pequignot, E. Undermethylation of Alu sequences in ICF syndrome: molecular and in situ analysis. *Cytogenet Cell Genet* **77**, 308-313 (1997).

127. Hassan, K.M., Norwood, T., Gimelli, G., Gartler, S.M. & Hansen, R.S. Satellite 2 methylation patterns in normal and ICF syndrome cells and association of hypomethylation with advanced replication. *Hum Genet* **109**, 452-462 (2001).
128. Kondo, T., *et al.* Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: hypomethylation of non-satellite DNA repeats D4Z4 and NBL2. *Hum Mol Genet* **9**, 597-604 (2000).
129. Zhang, R., *et al.* HP1 proteins are essential for a dynamic nuclear response that rescues the function of perturbed heterochromatin in primary human cells. *Mol Cell Biol* **27**, 949-962 (2007).
130. Lehnertz, B., *et al.* Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* **13**, 1192-1200 (2003).
131. Melcher, M., *et al.* Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol Cell Biol* **20**, 3728-3741 (2000).
132. Peters, A.H., *et al.* Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**, 323-337 (2001).
133. Wong, N., *et al.* Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with q-arm copy gain in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* **159**, 465-471 (2001).
134. Tsuda, H., Takarabe, T., Kanai, Y., Fukutomi, T. & Hirohashi, S. Correlation of DNA hypomethylation at pericentromeric heterochromatin regions of chromosomes 16 and 1 with histological features and chromosomal abnormalities of human breast carcinomas. *Am J Pathol* **161**, 859-866 (2002).
135. Nakagawa, T., *et al.* DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. *J Urol* **173**, 243-246 (2005).
136. Qu, G., Dubeau, L., Narayan, A., Yu, M.C. & Ehrlich, M. Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat Res* **423**, 91-101 (1999).
137. Ghosh, S., Feingold, E. & Dey, S.K. Etiology of Down syndrome: Evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction, and maternal age across populations. *Am J Med Genet A* **149A**, 1415-1420 (2009).
138. Ohno, S. & Yomo, T. The grammatical rule for all DNA: junk and coding sequences. *Electrophoresis* **12**, 103-108 (1991).
139. Xie, Z.H., *et al.* Mutations in DNA methyltransferase DNMT3B in ICF syndrome affect its regulation by DNMT3L. *Hum Mol Genet* **15**, 1375-1385 (2006).
140. Ley, T.J., *et al.* DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **363**, 2424-2433 (2010).
141. Valko, M., Morris, H. & Cronin, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**, 1161-1208 (2005).
142. Seoane, A.I., Guerci, A.M. & Dulout, F.N. Malsegregation as a possible mechanism of aneuploidy induction by metal salts in MRC-5 human cells. *Environ Mol Mutagen* **40**, 200-206 (2002).
143. Bouilly, K., *et al.* Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol* **78**, 149-156 (2006).
144. Poirier, L.A. & Vlasova, T.I. The prospective role of abnormal methyl metabolism in cadmium toxicity. *Environ Health Perspect* **110 Suppl 5**, 793-795 (2002).
145. Adams, R.L. Eukaryotic DNA methyltransferases--structure and function. *Bioessays* **17**, 139-145 (1995).

146. Huang, D., Zhang, Y., Qi, Y., Chen, C. & Ji, W. Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation. *Toxicol Lett* **179**, 43-47 (2008).
147. Takiguchi, M., Achanzar, W.E., Qu, W., Li, G. & Waalkes, M.P. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp Cell Res* **286**, 355-365 (2003).
148. Reichard, J.F., Schnekenburger, M. & Puga, A. Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun* **352**, 188-192 (2007).
149. Chen, H., *et al.* Association of c-myc overexpression and hyperproliferation with arsenite-induced malignant transformation. *Toxicol Appl Pharmacol* **175**, 260-268 (2001).
150. Chanda, S., *et al.* DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol Sci* **89**, 431-437 (2006).
151. Ramirez, T., Stopper, H., Hock, R. & Herrera, L.A. Prevention of aneuploidy by S-adenosyl-methionine in human cells treated with sodium arsenite. *Mutat Res* **617**, 16-22 (2007).
152. Biggart, N.W. & Costa, M. Assessment of the uptake and mutagenicity of nickel chloride in salmonella tester strains. *Mutat Res* **175**, 209-215 (1986).
153. Ohshima, S. Induction of genetic instability and chromosomal instability by nickel sulfate in V79 Chinese hamster cells. *Mutagenesis* **18**, 133-137 (2003).
154. Lee, Y.W., *et al.* Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Mol Cell Biol* **15**, 2547-2557 (1995).
155. Lee, Y.W., Broday, L. & Costa, M. Effects of nickel on DNA methyltransferase activity and genomic DNA methylation levels. *Mutat Res* **415**, 213-218 (1998).
156. Yan, Y., Kluz, T., Zhang, P., Chen, H.B. & Costa, M. Analysis of specific lysine histone H3 and H4 acetylation and methylation status in clones of cells with a gene silenced by nickel exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* **190**, 272-277 (2003).
157. Chen, H., Ke, Q., Kluz, T., Yan, Y. & Costa, M. Nickel ions increase histone H3 lysine 9 dimethylation and induce transgene silencing. *Mol Cell Biol* **26**, 3728-3737 (2006).
158. Das, K.C., Mohanty, D. & Garewal, G. Cytogenetics in nutritional megaloblastic anaemia: prolonged persistence of chromosomal abnormalities in lymphocytes after remission. *Acta Haematol* **76**, 146-154 (1986).
159. Titenko-Holland, N., Jacob, R.A., Shang, N., Balaraman, A. & Smith, M.T. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. *Mutat Res* **417**, 101-114 (1998).
160. Fenech, M., Aitken, C. & Rinaldi, J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* **19**, 1163-1171 (1998).
161. Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* **600**, 58-66 (2006).
162. Beetstra, S., *et al.* Lymphocytes of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation carriers, with or without breast cancer, are not abnormally sensitive to the chromosome damaging effect of moderate folate deficiency. *Carcinogenesis* **27**, 517-524 (2006).
163. Wilson, V.L. & Jones, P.A. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* **220**, 1055-1057 (1983).
164. Warburton, D. Biological aging and the etiology of aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* **111**, 266-272 (2005).
165. Baker, D.J., *et al.* BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet* **36**, 744-749 (2004).

166. Tuck-Muller, C.M., *et al.* DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet* **89**, 121-128 (2000).
167. Dodge, J.E., *et al.* Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J Biol Chem* **280**, 17986-17991 (2005).
168. Hata, K., Kusumi, M., Yokomine, T., Li, E. & Sasaki, H. Meiotic and epigenetic aberrations in Dnmt3L-deficient male germ cells. *Mol Reprod Dev* **73**, 116-122 (2006).
169. Rodriguez, M.J., Lopez, M.A., Garcia-Orad, A. & Vig, B.K. Sequence of centromere separation: effect of 5-azacytidine-induced epigenetic alteration. *Mutagenesis* **16**, 109-114 (2001).
170. Lavia, P., Ferraro, M., Micheli, A. & Olivieri, G. Effect of 5-azacytidine (5-azaC) on the induction of chromatid aberrations (CA) and sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat Res* **149**, 463-467 (1985).
171. Hernandez, R., Frady, A., Zhang, X.Y., Varela, M. & Ehrlich, M. Preferential induction of chromosome 1 multibranching figures and whole-arm deletions in a human pro-B cell line treated with 5-azacytidine or 5-azadeoxycytidine. *Cytogenet Cell Genet* **76**, 196-201 (1997).
172. Fauth, E., Scherthan, H. & Zankl, H. Frequencies of occurrence of all human chromosomes in micronuclei from normal and 5-azacytidine-treated lymphocytes as revealed by chromosome painting. *Mutagenesis* **13**, 235-241 (1998).
173. Kokalj-Vokac, N., *et al.* Specific induction of uncoiling and recombination by azacytidine in classical satellite-containing constitutive heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet* **63**, 11-15 (1993).
174. Albanesi, T., Polani, S., Cozzi, R. & Perticone, P. DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells in vitro. *Mutat Res* **429**, 239-248 (1999).
175. Perticone, P., Palitti, F., Cozzi, R., D'Erme, M. & Bona, R. Persistence of azacytidine-induced SCEs and genomic methylation in CHO cells in vitro. *Mutat Res* **245**, 211-215 (1990).
176. Poirier, F., Bourin, P., Bladier, D., Joubert-Caron, R. & Caron, M. Effect of 5-azacytidine and galectin-1 on growth and differentiation of the human b lymphoma cell line bl36. *Cancer Cell Int* **1**, 2 (2001).
177. Bensaada, M., *et al.* Altered patterns of DNA methylation on chromosomes from leukemia cell lines: identification of 5-methylcytosines by indirect immunodetection. *Cancer Genet Cytogenet* **103**, 101-109 (1998).
178. Fenech, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol Med* **111**, 3-32 (2005).
179. Lemieux, N., Dutrillaux, B. & Viegas-Pequignot, E. A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* **59**, 311-312 (1992).
180. Frommer, M., *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1827-1831 (1992).
181. Warnecke, P.M., *et al.* Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* **27**, 101-107 (2002).
182. Paulin, R., Grigg, G.W., Davey, M.W. & Piper, A.A. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res* **26**, 5009-5010 (1998).

183. Judson, H., *et al.* Relationship between point gene mutation, chromosomal abnormality, and tumour suppressor gene methylation status in colorectal adenomas. *J Pathol* **210**, 344-350 (2006).
184. Chaves, P., *et al.* Chromosomal analysis of Barrett's cells: demonstration of instability and detection of the metaplastic lineage involved. *Mod Pathol* **20**, 788-796 (2007).
185. Jeganathan, K., Malureanu, L., Baker, D.J., Abraham, S.C. & van Deursen, J.M. Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *J Cell Biol* **179**, 255-267 (2007).
186. Hansen, R.S., *et al.* The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14412-14417 (1999).
187. Shvachko, L.P. Alterations of constitutive pericentromeric heterochromatin in lymphocytes of cancer patients and lymphocytes exposed to 5-azacytidine is associated with DNA-hypomethylation. *Exp Oncol* **30**, 230-234 (2008).
188. Erukashvily, N.I., Donev, R., Waisertreiger, I.S. & Podgornaya, O.I. Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells. *Cytogenet Genome Res* **118**, 42-54 (2007).
189. Wong, N.C., *et al.* Permissive transcriptional activity at the centromere through pockets of DNA hypomethylation. *PLoS Genet* **2**, e17 (2006).
190. Guttenbach, M. & Schmid, M. Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures. *Exp Cell Res* **211**, 127-132 (1994).
191. Fenech, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* **455**, 81-95 (2000).
192. Jeanpierre, M. Human satellites 2 and 3. *Ann Genet* **37**, 163-171 (1994).
193. Darst, R.P., Pardo, C.E., Ai, L., Brown, K.D. & Kladd, M.P. Bisulfite sequencing of DNA. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 7**, Unit 7 9 1-17 (2010).
194. Rein, T., Zorbas, H. & DePamphilis, M.L. Active mammalian replication origins are associated with a high-density cluster of mCpG dinucleotides. *Mol Cell Biol* **17**, 416-426 (1997).
195. Zon, G., *et al.* Formamide as a denaturant for bisulfite conversion of genomic DNA: Bisulfite sequencing of the GSTP1 and RARbeta2 genes of 43 formalin-fixed paraffin-embedded prostate cancer specimens. *Anal Biochem* **392**, 117-125 (2009).
196. Feil, R., Charlton, J., Bird, A.P., Walter, J. & Reik, W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res* **22**, 695-696 (1994).
197. Hayatsu, H., Tsuji, K. & Negishi, K. Does urea promote the bisulfite-mediated deamination of cytosine in DNA? Investigation aiming at speeding-up the procedure for DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 69-70 (2006).
198. Hayatsu, H., Negishi, K., Shiraishi, M., Tsuji, K. & Moriyama, K. Chemistry of bisulfite genomic sequencing; advances and issues. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 47-48 (2007).
199. Ehrich, M., *et al.* Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15785-15790 (2005).
200. Deobagkar, D.D. & Chandra, H.S. The inactive X chromosome in the human female is enriched in 5-methylcytosine to an unusual degree and appears to contain more of this modified nucleotide than the remainder of the genome. *J Genet* **82**, 13-16 (2003).
201. Franchina, M. & Kay, P.H. Evidence that cytosine residues within 5'-CCTGG-3' pentanucleotides can be methylated in human DNA independently of the methylating system that modifies 5'-CG-3' dinucleotides. *DNA Cell Biol* **19**, 521-526 (2000).

202. Kouidou, S., *et al.* Non-CpG cytosine methylation of p53 exon 5 in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* **50**, 299-307 (2005).
203. Malone, C.S., *et al.* CmC(A/T)GG DNA methylation in mature B cell lymphoma gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10404-10409 (2001).
204. Macville, M., *et al.* Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res* **59**, 141-150 (1999).
205. Ji, W., *et al.* DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *Mutat Res* **379**, 33-41 (1997).
206. Gisselsson, D., *et al.* Interphase chromosomal abnormalities and mitotic missegregation of hypomethylated sequences in ICF syndrome cells. *Chromosoma* **114**, 118-126 (2005).
207. Januchowski, R., Dabrowski, M., Ofori, H. & Jagodzinski, P.P. Trichostatin A down-regulate DNA methyltransferase 1 in Jurkat T cells. *Cancer Lett* **246**, 313-317 (2007).
208. Saito, Y., *et al.* Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10060-10065 (2002).
209. Weber, M., *et al.* Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* **39**, 457-466 (2007).
210. Gestaut, D.R., Cooper, J., Asbury, C.L., Davis, T.N. & Wordeman, L. Reconstitution and functional analysis of kinetochore subcomplexes. *Methods Cell Biol* **95**, 641-656 (2010).
211. Ohta, S., *et al.* The protein composition of mitotic chromosomes determined using multiclassifier combinatorial proteomics. *Cell* **142**, 810-821 (2010).
212. Mardin, B.R., Agircan, F.G., Lange, C. & Schiebel, E. Plk1 controls the Nek2A-PP1gamma antagonism in centrosome disjunction. *Curr Biol* **21**, 1145-1151 (2011).
213. Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupart, M.A. & Nasmyth, K. Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* **105**, 459-472 (2001).
214. Schockel, L., Mockel, M., Mayer, B., Boos, D. & Stemmann, O. Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat Cell Biol* (2011).
215. Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R. & Hirano, T. Identification and characterization of SA/Scp3p subunits in the Xenopus and human cohesin complexes. *J Cell Biol* **150**, 405-416 (2000).
216. Gimenez-Abian, J.F., *et al.* Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr Biol* **14**, 1187-1193 (2004).
217. DeLuca, J.G. Kinetochore-microtubule dynamics and attachment stability. *Methods Cell Biol* **97**, 53-79 (2010).
218. Musacchio, A. & Salmon, E.D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-393 (2007).
219. Sudakin, V., Chan, G.K. & Yen, T.J. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* **154**, 925-936 (2001).
220. Grundy, M., Seedhouse, C., Russell, N.H. & Pallis, M. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein in acute myeloid leukaemia cells treated with the Aurora-B kinase inhibitor barasertib-hQPA. *BMC Cancer* **11**, 254 (2011).
221. Wei, Y., *et al.* Spindle Assembly Checkpoint Regulates Mitotic Cell Cycle Progression during Preimplantation Embryo Development. *PLoS One* **6**, e21557 (2011).
222. Gao, Y.F., *et al.* Cdk1-phosphorylated CUEDC2 promotes spindle checkpoint inactivation and chromosomal instability. *Nat Cell Biol* (2011).

223. Prendergast, L., *et al.* Premitotic Assembly of Human CENPs -T and -W Switches Centromeric Chromatin to a Mitotic State. *PLoS Biol* **9**, e1001082 (2011).
224. Dunleavy, E.M., Almouzni, G. & Karpen, G.H. H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G(1) phase. *Nucleus* **2**, 146-157 (2011).
225. Tachiwana, H., *et al.* Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature* (2011).
226. Earnshaw, W.C. & Migeon, B.R. Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma* **92**, 290-296 (1985).
227. Mythreye, K. & Bloom, K.S. Differential kinetochore protein requirements for establishment versus propagation of centromere activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **160**, 833-843 (2003).
228. Mishra, P.K., Baum, M. & Carbon, J. Centromere size and position in *Candida albicans* are evolutionarily conserved independent of DNA sequence heterogeneity. *Mol Genet Genomics* **278**, 455-465 (2007).
229. Folco, H.D., Pidoux, A.L., Urano, T. & Allshire, R.C. Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science* **319**, 94-97 (2008).
230. Morris, C.A. & Moazed, D. Centromere assembly and propagation. *Cell* **128**, 647-650 (2007).
231. Dunleavy, E., Pidoux, A. & Allshire, R. Centromeric chromatin makes its mark. *Trends Biochem Sci* **30**, 172-175 (2005).
232. Verdaasdonk, J.S. & Bloom, K. Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 320-332 (2011).
233. Martens, J.H., *et al.* The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J* **24**, 800-812 (2005).
234. Peters, A.H., *et al.* Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* **12**, 1577-1589 (2003).
235. Nonaka, N., *et al.* Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* **4**, 89-93 (2002).
236. Fraga, M.F., *et al.* Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* **37**, 391-400 (2005).
237. Zhang, W., Lee, H.R., Koo, D.H. & Jiang, J. Epigenetic modification of centromeric chromatin: hypomethylation of DNA sequences in the CENH3-associated chromatin in *Arabidopsis thaliana* and maize. *Plant Cell* **20**, 25-34 (2008).
238. Van Damme, P., *et al.* NatF Contributes to an Evolutionary Shift in Protein N-Terminal Acetylation and Is Important for Normal Chromosome Segregation. *PLoS Genet* **7**, e1002169 (2011).
239. Choy, J.S., Acuna, R., Au, W.C. & Basrai, M.A. A Role for Histone H4K16 Hypoacetylation in *Saccharomyces cerevisiae* Kinetochore Function. *Genetics* (2011).
240. Tian, X., *et al.* Thr 3 phosphorylated histone H3 concentrates at centromeric chromatin at metaphase. *Biochem Biophys Res Commun* **401**, 618-623 (2010).
241. Wang, F., *et al.* A Positive Feedback Loop Involving Haspin and Aurora B Promotes CPC Accumulation at Centromeres in Mitosis. *Curr Biol* **21**, 1061-1069 (2011).
242. Ng, T.M., Waples, W.G., Lavoie, B.D. & Biggins, S. Pericentromeric sister chromatid cohesion promotes kinetochore biorientation. *Mol Biol Cell* **20**, 3818-3827 (2009).
243. Mathieu, N., Pirzio, L., Freulet-Marriere, M.A., Desmaze, C. & Sabatier, L. Telomeres and chromosomal instability. *Cell Mol Life Sci* **61**, 641-656 (2004).

244. Amiel, T., *et al.* Telomere aggregates in amniocytes with karyotype of balanced chromosomal rearrangements. *Hereditas* **147**, 90-93 (2010).
245. Pek, J.W. & Kai, T. Non-coding RNAs enter mitosis: functions, conservation and implications. *Cell Div* **6**, 6 (2011).
246. Chakraborty, A., Shen, Z. & Prasanth, S.G. "ORCanization" on heterochromatin: Linking DNA replication initiation to chromatin organization. *Epigenetics* **6**, 665-670 (2011).
247. Prasanth, S.G., Prasanth, K.V., Siddiqui, K., Spector, D.L. & Stillman, B. Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *EMBO J* **23**, 2651-2663 (2004).
248. Shimada, K. & Gasser, S.M. The origin recognition complex functions in sister-chromatid cohesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **128**, 85-99 (2007).
249. Kato, H., *et al.* *Schizosaccharomyces pombe* Orc5 plays multiple roles in the maintenance of genome stability throughout the cell cycle. *Cell Cycle* **7**, 1085-1096 (2008).
250. Takahashi, K., *et al.* Fission yeast Pot1 and RecQ helicase are required for efficient chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **31**, 495-506 (2011).
251. Balikova, I., *et al.* Subtelomeric imbalances in phenotypically normal individuals. *Hum Mutat* **28**, 958-967 (2007).
252. Garcia-Cao, M., Gonzalo, S., Dean, D. & Blasco, M.A. A role for the Rb family of proteins in controlling telomere length. *Nat Genet* **32**, 415-419 (2002).
253. Stralfors, A., Walfridsson, J., Bhuiyan, H. & Ekwall, K. The FUN30 chromatin remodeler, Fft3, protects centromeric and subtelomeric domains from euchromatin formation. *PLoS Genet* **7**, e1001334 (2011).
254. Ishii, K., *et al.* Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere dysfunction. *Science* **321**, 1088-1091 (2008).
255. Daum, J.R., *et al.* Cohesion fatigue induces chromatid separation in cells delayed at metaphase. *Curr Biol* **21**, 1018-1024 (2011).
256. Tanaka, K., Hao, Z., Kai, M. & Okayama, H. Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism. *EMBO J* **20**, 5779-5790 (2001).
257. Salic, A., Waters, J.C. & Mitchison, T.J. Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* **118**, 567-578 (2004).
258. Vass, S., *et al.* Depletion of Drad21/Sccl in *Drosophila* cells leads to instability of the cohesin complex and disruption of mitotic progression. *Curr Biol* **13**, 208-218 (2003).
259. Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B.H. & Peters, J.M. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol* **151**, 749-762 (2000).
260. Chatel, G. & Fahrenkrog, B. Nucleoporins: Leaving the nuclear pore complex for a successful mitosis. *Cell Signal* (2011).
261. Cuylen, S. & Haering, C.H. Deciphering condensin action during chromosome segregation. *Trends Cell Biol* (2011).
262. Cuylen, S., Metz, J. & Haering, C.H. Condensin structures chromosomal DNA through topological links. *Nat Struct Mol Biol* (2011).
263. Pek, J.W. & Kai, T. DEAD-box RNA helicase Belle/DDX3 and the RNA interference pathway promote mitotic chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011).
264. Ciosk, R., *et al.* An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* **93**, 1067-1076 (1998).
265. Jurkowska, R.Z., *et al.* Formation of nucleoprotein filaments by mammalian DNA methyltransferase Dnmt3a in complex with regulator Dnmt3L. *Nucleic Acids Res* **36**, 6656-6663 (2008).

266. Glass, J.L., Fazzari, M.J., Ferguson-Smith, A.C. & Greally, J.M. CG dinucleotide periodicities recognized by the Dnmt3a-Dnmt3L complex are distinctive at retroelements and imprinted domains. *Mamm Genome* **20**, 633-643 (2009).

Abreviaturas

µg: microgramo

5-azaC: 5-azacitidina

5-MC: 5-metilcitosinas

Ciclos B/F/B: Ciclos de puentes, fusión y ruptura. Del inglés *bridge/fusion/breakage*.

CpG: Dinucleótido Citosina: Guanina acomodado de forma palindrómica en ambas hebras.

C-terminal: Carbono terminal.

DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindole.

DMRs: del inglés, *differentially methylated regions* o regiones metiladas de manera diferencial entre los alelos.

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNMTs: DNA-metiltransferasas

E. coli : *Escherichia coli*

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente

h: horas

H3 y H4: Histonas 3 y 4

H3K9: Lisina 9 Histona H3

HDACs: Desacetilasas de histonas

HP1: Proteína heterocromática 1

HRP quimio-luminiscente: Peroxidasa de rábano quimioluminiscente.

ICF: Síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica, anomalías faciales

kDa: kilodaltones

LUV: Luz ultravioleta

M: Molar

MBD: Dominio ligador a citosinas metiladas

min: Minutos

MN (-): Micronúcleos negativos para sondas FISH

MN (+): Micronúcleos positivos para sondas FISH

MN: Micronúcleos

mRNA: RNA mensajero

NF- κ B: Factor nuclear kappa-B

ng: Nanogramos

no-CpG: Citosinas que no están junto a guaninas

N-terminal: Amino terminal

pb: pares de bases

PBS: Del inglés, *phosphate buffered saline*. Buffer salino de fosfato.

PCNA: del inglés, *Proliferating cell nuclear antigen*. Antígeno nuclear de proliferación celular.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Rb: Retinoblastoma

RNA: Ácido ribonucleico

RPM: Revoluciones por minuto.

RT-PCR: Retrotranscripción y reacción de la cadena de la polimerasa

SAM: S-adenosil-metionina

SDS: Sulfato laurel de sodio. Del inglés, *sodium dodecyl sulfate*.

TNF-a: Factor de necrosis tumoral alfa.

Tris-EDTA: Tris: tris-hidroximetil amino metano. EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

UD: Unidades de densitometría