



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LA  
5-AZACITIDINA Y LA 5-AZA-2'-DESOXICITIDINA  
MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN  
LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:**

**RICARDO IVÁN PERAZA VEGA**



**DIRECTORA DE TESIS:  
M. EN C. MARÍA GUADALUPE ORDAZ TÉLLEZ  
2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Peraza Vega Ricardo Iván 56 32 83 69 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 301249070</p>
<p>2. Datos del tutor Ordaz Téllez María Guadalupe</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra Sandra Luz Gómez Arroyo</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra Ana María Salazar Martínez</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dra Angélica Graciela Martínez Hernández</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dra María Elena Calderón Segura</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Evaluación del efecto genotóxico de la 5-azacitidina y la 5-aza-2'-desoxicitidina mediante el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana 44 p 2013</p>

*Dedicado a la memoria de mi mamá  
y de mi entrañable amigo Aldo.*

## **Agradecimientos:**

- A mi papá, mi mamá y mi hermana por estar siempre conmigo y sin quienes esto simplemente no hubiera sido posible, gracias por su apoyo incondicional.
- Al excelente equipo de trabajo del Laboratorio de Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias dirigido por la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz, la Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán y la M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez, gracias por su amistad, apoyo y paciencia.
- A mis sinodales por sus observaciones y comentarios sobre este trabajo.

# Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
METILACIÓN DEL DNA.....	2
METILACIÓN Y CÁNCER .....	3
• <i>Síndromes Mielodisplásicos (MDS)</i> .....	4
• <i>Leucemia (AML, ALL, CML y CLL)</i> .....	5
AGENTES INHIBIDORES DE LA METILACIÓN DEL DNA .....	6
• <i>Azacitidina y Decitabina</i> .....	7
EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS.....	11
• <i>Mecanismos de formación de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (NPB) y brotes nucleares (NBUD)</i> .....	12
METODOLOGÍA ESTANDARIZADA PARA EL ENSAYO DE MN CON LINFOCITOS HUMANOS AISLADOS.....	16
• <i>Criterios de inclusión para células binucleadas</i> .....	16
• <i>Criterios para seleccionar y contar MN</i> .....	17
• <i>Índice de División Nuclear (IDN)</i> .....	19
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
OBJETIVO GENERAL .....	20
OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
<b>MATERIALES Y MÉTODO</b> .....	<b>21</b>
COMPUESTOS.....	21
CONCENTRACIONES .....	21
OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	22
AISLAMIENTO DE LINFOCITOS.....	22
CULTIVO DE LOS LINFOCITOS.....	22
COSECHA DE LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS .....	22
ELABORACIÓN DE LAS PREPARACIONES .....	24
TINCIÓN DE LAS PREPARACIONES .....	24
REGISTRO .....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	24
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS (MN) .....	26
FRECUENCIA DE PUENTES NUCLEOPLÁSMICOS (NPB) .....	30
FRECUENCIA DE BROTES NUCLEARES (NBUD).....	33
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>42</b>

## Resumen

La 5-azacitidina (azacitidina) y la 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) son compuestos análogos a la citidina ampliamente utilizados en el tratamiento contra la leucemia mieloide aguda (LMA) y crónica (LMC). Se trata de agentes capaces de incorporarse al ADN y evitar la metilación de genes relacionados con el desarrollo de LMA y LMC, esto es posible debido a que la azacitidina y la decitabina en su estructura molecular presentan un nitrógeno en lugar de un carbono en la posición 5 del anillo de la citosina. Al ser análogos a la citidina, la enzima metiltransferasa (DNMT) reconoce a estos compuestos como sustratos naturales e inicia la reacción de metilación, sin embargo, debido a la modificación en el anillo de pirimidina se forma una unión covalente entre el compuesto y la DNMT, la reacción de metilación se detiene. Se ha observado que la azacitidina y la decitabina, además de inhibir la metilación del DNA, presentan efectos genotóxicos y citotóxicos pudiendo generar rupturas cromosómicas e incluso interferir en la traducción del RNA y la síntesis de proteínas. En este trabajo se evaluó el efecto genotóxico de estos agentes mediante el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana. Se usaron tres concentraciones de decitabina ( $0.006 \times 10^{-5} \text{M}$ ,  $0.012 \times 10^{-5} \text{M}$  y  $0.025 \times 10^{-5} \text{M}$ ), una sola concentración de azacitidina ( $0.025 \times 10^{-5} \text{M}$ ), un testigo positivo tratado con MMC y un testigo negativo (agua). La sangre se obtuvo de cuatro donadores, dos hombres y dos mujeres entre 20 y 25 años de edad. Los resultados fueron significativos con respecto al testigo negativo ( $p < 0.05$ ). Se concluye, bajo las condiciones de este experimento, que ambos compuestos presentan un elevado potencial genotóxico.

## Introducción

### Metilación del DNA

La metilación del DNA juega un papel importante en la interpretación de la información genética. Se trata de un proceso compartido tanto por células procariontes como eucariontes y funciona como un mecanismo epigenético para modular la expresión genética. La metilación permite modular la estructura de la cromatina, regular la represión transcripcional y es la responsable de la inactivación del cromosoma X y del imprinting genómico. La metilación está relacionada de manera importante con la estabilidad genómica y la carcinogénesis (Goffin y Eisenhauer, 2002).

El genoma eucarionte no está uniformemente metilado, sino que contiene regiones metiladas entremezcladas con dominios no metilados. Durante el proceso de evolución, el dinucleótido CpG ha sido progresivamente eliminado del genoma de los eucariontes superiores y está presente en sólo 5 – 10% de su frecuencia esperada. La metilación de la citosina parece haber jugado un papel muy importante en este proceso, ya que muchos de los sitios CpG desaparecidos representan la conversión a través de la desaminación espontánea de la metilcitosina a uracilo y posteriormente a timina (Leone *et al.* 2002).

Además de las cuatro bases codificantes normales en el DNA (adenina, timina, guanina y citosina), existen otras formas de nucleótidos alternas que son químicamente distintas que se producen por modificaciones enzimáticas posteriores a la síntesis del DNA. En mamíferos, entre el 3 y 5% de los residuos de citosina son transformados a 5-metilcitosina (Holliday y Grigg, 1993).

El proceso de metilación se lleva a cabo por las enzimas metiltransferasas (DNMT), las cuales catalizan la unión covalente de un grupo metilo de un donador S-adenosilmetionina a la posición 5 de la molécula de citosina, predominantemente dentro de las regiones CpG del DNA (Goffin y Eisenhauer, 2002). Estas regiones están conformadas por varios cientos o miles de pares de bases, generalmente se ubican en el extremo 5' de genes

estructurales y pueden llegar a extenderse hacia las regiones codificantes del exón (Holliday y Grigg, 1993).

La metilación de la citosina representa un mecanismo importante para reconocer genes que están activos de los que no lo están en células de vertebrados. La forma metilada de la citosina, 5-metilcitosina, guarda la misma relación con la citosina que la timina con el uracilo y de igual manera no tiene efecto en el apareamiento de las bases. Los patrones de metilación son heredados a las cadenas de DNA hijas durante la replicación mediante a la acción de las enzimas metiltransferasas (DNMT) que utilizan la cadena metilada progenitora como modelo para la metilación de la cadena hija (Alberts *et al.* 2002).

Como producto de la metilación se obtienen varios resultados que incluyen, por ejemplo, la modulación de la estructura de la cromatina, la represión transcripcional, la inactivación del cromosoma X y el imprinting genómico. La metilación es necesaria para el desarrollo embriológico normal. Durante la embriogénesis, hay una desmetilación generalizada inicial del DNA seguida de un patrón adulto de metilación. Después del desarrollo, la metilación del DNA permanece como componente del genoma (Goffin y Eisenhauer, 2002). Se ha demostrado que este proceso se incrementa con la edad y en cultivos celulares *in vitro* (Leone *et al.* 2002).

## Metilación y Cáncer

La asociación entre envejecimiento y el incremento en la incidencia de cáncer ha sido atribuida, entre otros factores, a la acumulación de mutaciones genéticas a lo largo del tiempo de vida. Sin embargo, en los últimos años las alteraciones epigenéticas han sido sujeto de nuevas investigaciones sobre su relación con la aparición de cáncer. Como se ha observado en pacientes ya diagnosticados con cáncer, el envejecimiento conlleva a una hipometilación global junto con una hipermetilación local de promotores de genes específicos (Kurkjian *et al.* 2008). Esto sugiere que los cambios moleculares que se acumulan con la edad son ocasionados, en buena medida, por la contribución de factores ambientales que resultan en cambios de los patrones de metilación del DNA, estos

cambios epigenéticos afectan la conformación del DNA y al mismo tiempo, indirectamente, también alteran la expresión de genes (Griffiths y Gore, 2008).

Se cree que la metilación del DNA contribuye a la iniciación de cáncer y a su progresión mediante la inactivación de la expresión de genes (Baylin *et al.* 1987). La inactivación de genes puede tener serias consecuencias cuando los genes que se inactivan están involucrados en el control del crecimiento celular normal, en la diferenciación celular o en los mecanismos de apoptosis (Holliday y Grigg, 1993). De hecho, los genes supresores de tumores hipermetilados representan un sello distintivo en procesos cancerígenos (Stresemann *et al.* 2006), por ejemplo, el gen *CDKN2A* que codifica para la proteína p16<sup>INK4a</sup>, la cual es una proteína reguladora del ciclo celular, ha sido uno de los genes más estudiados en cuanto a su estado de hipermetilación en procesos cancerígenos (Goffin y Eisenhauer, 2002).

Los mecanismos que regulan las metilaciones normales y aberrantes no han sido comprendidos del todo, ni tampoco los mecanismos por los cuales la metilación interfiere con la transcripción. Estos procesos involucran complejas interacciones entre las distintas DNMT, proteínas de unión metil-CpG (MBDs) y probablemente desmetilasas, así como acetilasas y desacetilasas de histonas (HDAC), factores de transcripción y la estructura de la cromatina (Leone *et al.* 2002).

Se ha demostrado que la metilación de ciertos promotores contribuye a la patogénesis de los síndromes mielodisplásicos.

- **Síndromes Mielodisplásicos (MDS)**

Los síndromes mielodisplásicos (MDS) conforman un grupo de desórdenes de las células troncales caracterizados por una eritropoyesis ineficaz con una variable probabilidad de transformación leucémica. La enfermedad se caracteriza por la presencia de citopenias y es generalmente diagnosticada por medio de un examen de rutina de laboratorio. Los pacientes algunas veces no presentan síntomas, pero pueden sufrir de síntomas

secundarios a causa de su bajo número de linfocitos y eritrocitos, infecciones o enfermedades autoinmunes (Kurkjian *et al.* 2008).

En lo particular, deleciones en el cromosoma 5 están asociadas con un subtipo distinto de MDS conocido como síndrome 5q así como con algunos tipos de leucemias. La metilación del gen supresor de tumores, *RIL*, (ubicado en el cromosoma 5), ha sido identificada en sólo el 6% de los pacientes clasificados como individuos de bajo riesgo a padecer MDS, mientras que se identificó en el 50% de los pacientes con riesgo intermedio – alto. La metilación del gen *CDKN2B* de la proteína  $p15^{INK4b}$  (inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6), ha sido igualmente asociado con casos de leucemia mieloide aguda que se originaron a partir de MDS (Kurkjian *et al.* 2008). También se ha encontrado una hipermetilación del gen de la calcitonina en el 65% de los síndromes mielodisplásicos (Román-Gómez *et al.* 2002).

- **Leucemia (AML, ALL, CML y CLL)**

En la gran mayoría de los estudios sobre leucemia mieloide aguda (AML) se ha encontrado que existe hipermetilación en el sitio CpG 5' dentro del gen de  $p15^{INK4b}$ , lo cual, aunado a que esta metilación aberrante no se encuentra en las células progenitoras de la médula ósea, confirma el papel tan importante que juega la metilación en el desarrollo de AML (Kurkjian *et al.* 2008). De igual manera se ha observado que existe una hipermetilación de los genes *MYOD1*, *PITX2*, *GPR37* y *SDC4* en un importante porcentaje de casos con AML (Toyota *et al.* 2001)

Varios genes han sido identificados por estar aberrantemente metilados en pacientes con leucemia linfocítica aguda (ALL) y se piensa que contribuyen a la proliferación celular y a la resistencia de apoptosis. Algunos de estos genes incluyen aquellos que actúan en el ciclo celular, tales como los genes que codifican para las proteínas p21, p15, y p16, y otros relacionados con la apoptosis, incluyendo *DAPK* y *TMS1* (Kurkjian *et al.* 2008).

A diferencia de lo que ocurre en AML, en la leucemia mieloide crónica (CML) no se ha demostrado una inactivación consistente de  $p15^{INK4b}$ . Sin embargo, se ha estudiado la

metilación del promotor del gen *C-ABL* y de *PDLIM4* en pacientes con CML y parece estar relacionado con la progresión de la enfermedad (Jelinek *et al.* 2011). En pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL), lo que se ha encontrado es una hipometilación global pero con hipermetilación en algunos promotores de genes tales *E-cadherin* y *DXS255* (Kurkjian *et al.* 2008).

Se menciona que la hipermetilación está involucrada en la aparición y desarrollo de leucemias, por ejemplo, durante el desarrollo de CML el promotor *ABL1* del gen *BCR-ABL*, se vuelve significativamente hipermetilado (Leone *et al.* 2002), también se ha encontrado una hipermetilación del gen de la calcitonina en el 65% de los casos de MDS y en el 95% de las leucemias agudas y esta característica está asociada a un resultado clínico desfavorable en ALL, de igual manera, se ha observado que existe una hipermetilación de los genes de p15 y p21 en pacientes con AML, así como en individuos con ALL y CML (Román-Gómez *et al.* 2002).

Además de estos genes, existen otros que frecuentemente se encuentran hipermetilados en AML, lo cual sugiere que puede haber una pérdida importante en los mecanismos de regulación de la metilación normal del DNA, lo cual predispone a múltiples genes a ser sujetos de la hipermetilación (Leone *et al.* 2002)

## Agentes inhibidores de la metilación del DNA

Los patrones de hipermetilación, ya sean normales o aberrantes, necesitan ser mantenidos activamente después de cada división celular. Esto representa un punto particularmente atractivo para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer (Stresemann *et al.* 2006).

Debido al importante papel que juegan las DNMT en la metilación del DNA, se han utilizado como blanco en años recientes en el desarrollo de agentes antineoplásicos inhibidores de estas enzimas para evitar la metilación y de esta forma evitar también el

silenciamiento de genes relacionados con el desarrollo de cáncer y de ser posible inducir un retroceso de la enfermedad (Goffin y Eisenhauer, 2002).

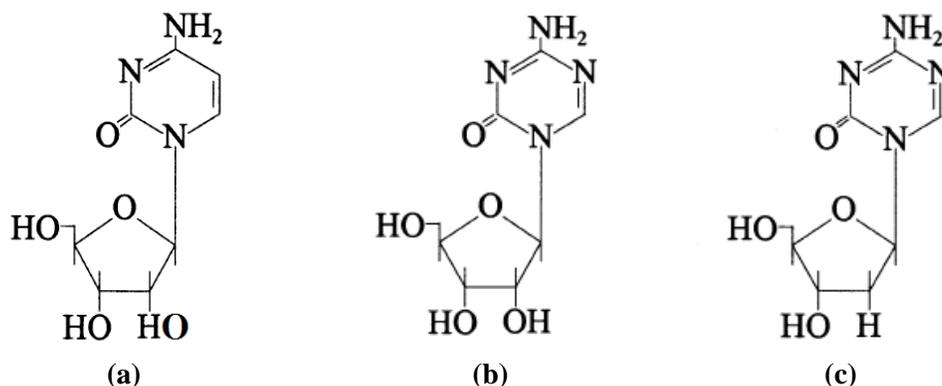
Las células malignas dependen en gran medida de una DNA metiltransferasa endógena específica, la DNMT1, para inducir la hipermetilación en las zonas CpG. Esta enzima, junto con las otras dos DNMTs endógenas humanas, DNMT3a y DNMT3b, puede ser irreversiblemente inhibida mediante la interacción con azanucleósidos modificados en la posición 5' incorporados en el DNA, agotando así a las enzimas y previniendo la metilación de la cadena hija de DNA luego de la replicación (Griffiths y Gore, 2008).

En ciertos estudios, estos inhibidores de DNMT, han logrado detener el crecimiento de líneas celulares cancerígenas y demostrado efectos antitumorales en modelos animales (Goffin y Eisenhauer, 2002). La inhibición de la DNMT resulta en la reactivación de los genes silenciados. Dichos agentes hipometilantes (inhibidores de la metilación) han resultado ser efectivos en pruebas *in vitro* e *in vivo* reduciendo la hipermetilación en pacientes con leucemia, MDS y linfoma. Para este propósito, se han diseñado algunas variaciones moleculares de la citidina, modificadas en la posición 5 del anillo de pirimidina, la cual es la característica responsable de su capacidad para inhibir la DNMT (Christman, 2002). Algunos de estos compuestos son 5-azacitidina (azacitidina), 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina), 1- $\beta$ -D-arabinofuranosil-5-azacitosina (fazarabina) y dihidro-5-azacitidina (DHAC) (Goffin y Eisenhauer, 2002). A continuación se abordan las características de los compuestos utilizados en este trabajo.

- **Azacitidina y Decitabina**

La 5-azacitidina (azacitidina) y la 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) fueron diseñados en 1964 por Sorm y colaboradores (Sorm, 1964). Ambos compuestos difieren de la citidina por la presencia de un nitrógeno en lugar de un carbono en la posición 5 del anillo de la citosina, sin embargo la decitabina también difiere de la citidina por la falta de un oxígeno en la posición 2 del anillo de ribosa (Fig 1). La azacitidina fue originalmente desarrollada como un antimetabolito nucleosídico con una especificidad clínica por la LMA, los

primeros reportes indicaron que induce rupturas cromosómicas y que tiene propiedades mutagénicas (Christman, 2002).

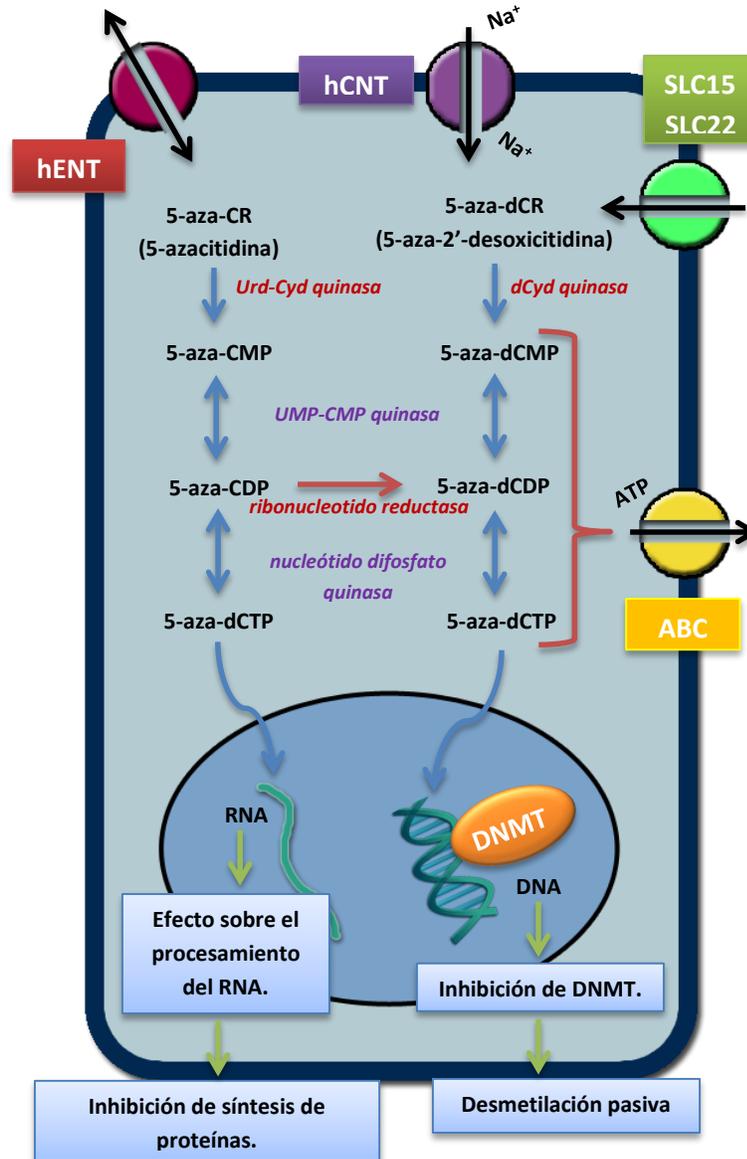


**Figura 1.** (a) Citidina; (b) 5-azacitidina; (c) 5-aza-2'-desoxicitidina.  
(Modificado de Goffin y Eisenhauer, 2002).

Estos agentes actúan previniendo la metilación, para ser efectivos necesitan incorporarse en el DNA, lo cual requiere modificaciones moleculares por medio del metabolismo celular (Goffin y Eisenhauer, 2002). Ambos compuestos utilizan diferentes rutas para su metabolismo debido a la presencia de ribosa en la azacitidina y desoxirribosa en la decitabina. En este contexto, existen tres enzimas que son particularmente importantes: (1) la desoxicitidina quinasa que cataliza la monofosforilación de la decitabina; (2) la uridina-citidina quinasa que lleva a cabo la monofosforilación de la azacitidina y (3) la ribonucleótido reductasa que reduce a la 5-azacitidina difosfato a 5-azadesoxicitidina difosfato (Rius y Lyko, 2011) (Fig. 2) Después de la fosforilación, la azacitidina, puede ser incorporada al DNA o al RNA (Goffin y Eisenhauer, 2002).

Además de la activación metabólica, el transporte a través de la membrana celular representa un factor adicional importante en la respuesta de la célula a estos compuestos. Se han identificado varios transportadores de membrana involucrados en el movimiento de nucleótidos a través de la membrana celular en células humanas. Entre estos se encuentran los transportadores hCNT y hENT producidos por las familias de genes *SLC28* y

SLC29, respectivamente y transportadores de unión a ATP (ATP binding cassettes) de la familia de genes ABC (Rius y Lyko, 2011).



**Figura 2.** Vías celulares para la activación metabólica de los inhibidores de DNMT. Los miembros de las familias de hENT, hCNT, transportadores de oligopéptidos (SLC15), transportadores de aniones y cationes orgánicos (SLC22) regulan la incorporación de análogos de nucleótidos. Dentro de la célula, la 5-azacitidina (5-aza-CR) y la 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-dCR) son metabolizadas por diferentes enzimas antes de su incorporación en el DNA y RNA. Los metabolitos intermedios pueden ser expulsados de la célula por transportadores miembros de la familia ABC. (Modificado de Rius y Lyko, 2011).

La DNMT reconoce a la azacitidina y a la decitabina como sustratos naturales e inicia la reacción de metilación. Sin embargo, la modificación en la posición 5' del anillo de pirimidina en ambos compuestos ocasiona la formación de una unión covalente con la DNMT y la enzima queda atrapada y se degrada (Stresemann *et al.* 2006). La azacitidina presenta citotoxicidad importante y no es un inhibidor específico de DNMT. Debido a su estructura de ribonucleósido, la mayor parte del compuesto se incorpora en el RNA y por lo tanto interfiere con traducción de proteínas (Cihak, 1974).

La decitabina solamente se incorpora en el DNA por lo que presenta una inhibición más eficiente de la DNMT y es 10 veces más citotóxica que la azacitidina en cultivos celulares. A dosis suficientemente bajas para evitar la muerte celular, la incorporación de la azacitidina o decitabina en el DNA de células cultivadas, conduce a una rápida pérdida de actividad de las DNMT porque esta enzima queda unida covalentemente al agente incorporado en el DNA, formando aductos que pueden llegar a ser tóxicos y mutagénicos si no son reparados. Debido a que la enzima queda unida a estos agentes, ya no puede llevar a cabo su papel de metilación, lo cual resulta en una rápida pérdida de la metilación del DNA (Christman, 2002). Se ha demostrado que la desmetilación por estos agentes, permite la re-expresión de genes previamente silenciados así como tener efectos en la diferenciación celular (Bender *et al.* 1998).

La azacitidina y la decitabina han demostrado tener un importante beneficio clínico en el tratamiento de síndromes mielodisplásicos y también se han utilizado para el tratamiento de leucemias mieloides (Rius y Lyko, 2011). Ambos compuestos han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos en Estados Unidos por su prometedora eficacia en desórdenes malignos hematológicos. Durante los primeros años de su uso se observaron altos niveles de toxicidad en pacientes tratados con dosis elevadas, esto limitó la extensión de su empleo, sobre todo en el tratamiento de tumores sólidos. Sin embargo, en los últimos años estos compuestos recobraron interés y la utilización de regímenes a dosis bajas está produciendo resultados positivos con efectos secundarios moderados (Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011). Ambos compuestos son particularmente efectivos cuando se administran a dosis bajas, lo cual es al 10% de la dosis máxima tolerada, se

piensa que esta condición aumenta la actividad de desmetilación del DNA. Sin embargo, no se ha demostrado una relación directa entre la desmetilación del DNA y la respuesta clínica, además actualmente no se han establecido biomarcadores de metilación de DNA precisos que puedan predecir la respuesta de los pacientes al tratamiento (Rius y Lyko, 2011).

Se ha observado que la condensación de la heterocromatina constitutiva de los cromosomas, especialmente los cromosomas 1, 9, 15, 16 y Y, puede ser inhibida al aplicar azacitidina en cultivos de linfocitos, lo cual tiene como consecuencia un aumento en la frecuencia de micronúcleos (Guttenbach y Schmid, 1994), además se ha reportado que la azacitidina es capaz de inducir micronúcleos en células de hámster Sirio (Stopper *et al.* 1993). De igual manera se ha observado que se trata de un agente clastogénico que es capaz de producir aberraciones cromosómicas que son dependientes de la dosis (Stopper *et al.* 1993). El mecanismo de inducción de MN por la azacitidina radica en el efecto desmetilante de este compuesto, el cual ocasiona descondensación de la cromatina y por lo tanto conlleva a una probable ruptura del DNA. La unión covalente DNMT-azacitidina/decitabina forma grandes aductos que requieren procesos de reparación por escisión, una reparación inadecuada puede eventualmente causar rupturas de DNA e inducir micronúcleos al igual que como ocurre con ciertos agentes alquilantes (Morales-Ramirez *et al.* 2008). Otros estudios también han demostrado la capacidad de la decitabina para inducir micronúcleos, incluso a una frecuencia más elevada de lo que se ha reportado para la azacitidina (Stresemann *et al.* 2006).

## El ensayo de Micronúcleos

La integridad genética de las poblaciones humanas se encuentra en constante riesgo debido a la actividad industrial que resulta en la exposición a agentes genotóxicos químicos y físicos. Otros factores que pueden influir en el daño genético incluyen factores relacionados con el estilo de vida, terapias médicas y cambios climáticos. Es importante

por lo tanto poder determinar un nivel aceptable de daño genético en la población humana, para reconocer individuos que puedan ser hipersensibles a ciertos compuestos genotóxicos, para estudiar nuevos productos químicos que son liberados al ambiente para evaluar el nivel de incremento en el daño genético en una población determinada (Fenech, 1993).

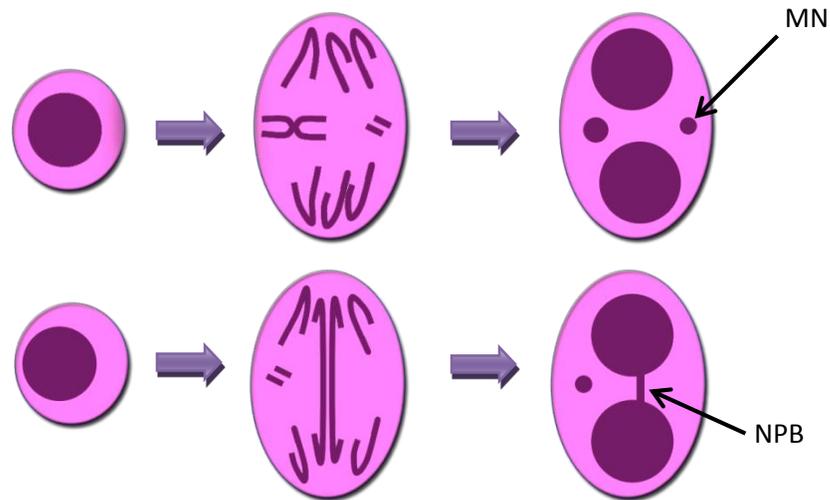
Las anomalías cromosómicas son consecuencia directa del daño a nivel de DNA, por ejemplo, las rupturas cromosómicas pueden ser el resultado de rupturas de doble cadena no reparadas y los rearrreglos cromosómicos pueden resultar luego de un error en la reparación de rupturas en una cadena de DNA. También se ha observado que la pérdida cromosómica y la segregación anómala de los cromosomas son eventos importantes en la aparición de cáncer y son el resultado probable de defectos en el centrómero o también consecuencia de la subcondensación de la estructura cromosómica antes de la metafase (Fenech, 1993).

El análisis de micronúcleos (MN) es una prueba *in vitro* para la evaluación del efecto de determinados agentes genotóxicos. Se trata de una prueba internacionalmente validada, relativamente sencilla de llevar a cabo, se realiza en un corto periodo de tiempo y es una prueba altamente sensible debido al poder estadístico que le confiere el análisis de miles de células (Norppa y Falck, 2003).

- **Mecanismos de formación de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (NPB) y brotes nucleares (NBUD).**

Los dos fenómenos básicos que conducen a la formación de MN en células mitóticas son las rupturas cromosómicas y disfunciones en la segregación de los cromosomas. Los MN se forman a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos, de cromátidas y cromosomas completos o cromátidas que quedaron retrasadas en la anafase y quedan fuera del núcleo de la célula hija en la telofase (Falck *et al.* 2002). Posteriormente, durante la telofase, una cubierta nuclear se forma alrededor de estos fragmentos y cromosomas retrasados que eventualmente se desenrollan y asumen la morfología típica de un núcleo

en interfase con la excepción de que son más pequeños que el núcleo principal de la célula, llegando a tener un tamaño que va de 1/16 a 1/3 del tamaño del núcleo principal, de ahí el término de micronúcleo (Fig. 3) (Fenech, 2000).



**Figura 3.** Formación de micronúcleos (MN) y puentes nucleoplásmicos (NPB) en células con bloqueo de citocinesis por Citocalasina B (Cyt-B) (Modificado de Fenech *et al.* 2011).

Los fragmentos cromosómicos acéntricos se originan de distintas maneras, una de ellas es por la reparación inadecuada de rupturas de doble cadena de DNA que ocasiona intercambios simétricos o asimétricos cromosómicos y cromatídicos así como la aparición de fragmentos cromosómicos o cromatídicos (Fenech *et al.* 2011). Otro mecanismo que induce a la formación de MN a partir de fragmentos acéntricos es a través de reparaciones por escisión que ocurren de manera simultánea en sitios muy próximos y en ambas cadenas del DNA, lo cual ocasiona una ruptura de doble cadena (Fenech *et al.* 2011).

Existen varios mecanismos moleculares por los cuales ocurren anomalías en la segregación de los cromosomas durante la anafase. Uno de ellos es la hipometilación de la citosina en las secuencias de repetición centroméricas y pericentroméricas y la metilación de histonas. Ciertas condiciones, como el síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica, afectan el nivel normal de hipermetilación de las zonas centroméricas, esto

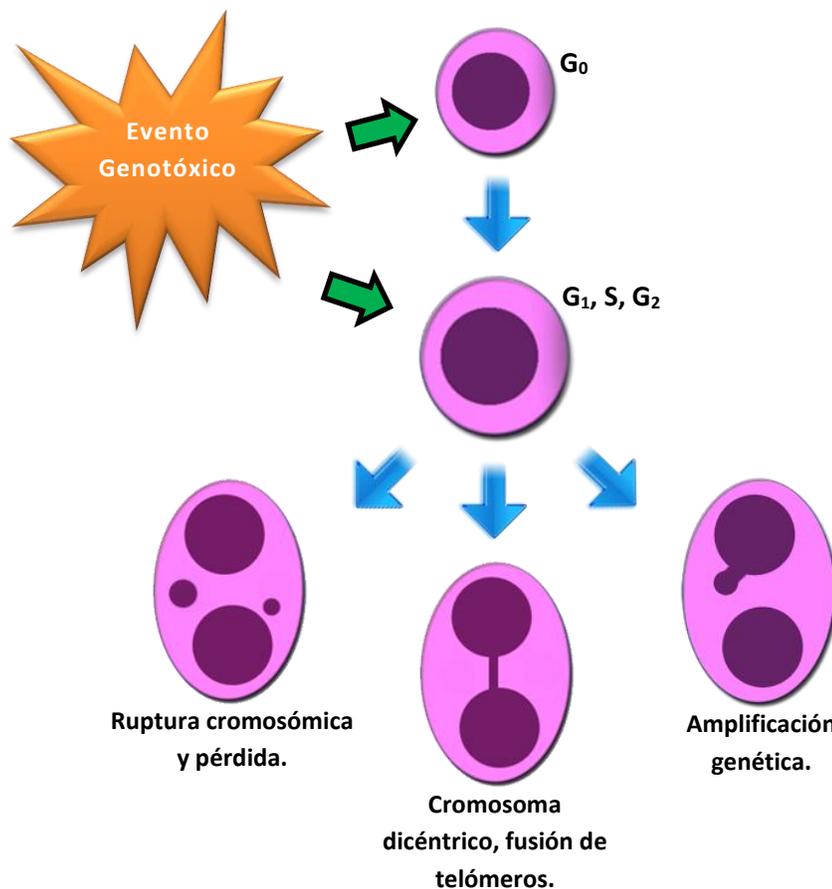
tiene como consecuencia un ensamblaje inadecuado de las proteínas del cinetocoro con el cromosoma, lo cual a su vez genera rezagos en la segregación cromosómica. Dado el papel fundamental que tienen las proteínas del cinetocoro es probable también que ciertas mutaciones en los genes de dichas proteínas afecten el ensamblaje adecuado con el centrómero (Fenech *et al.* 2011).

En un ensayo de MN, frecuentemente pueden observarse puentes nucleoplásmicos (NPB, por las siglas en inglés de *nucleoplasmic bridges*) entre los núcleos de una célula binucleada, estos se forman durante la anafase cuando los centrómeros de cromosomas dicéntricos fueron jalados a polos opuestos de la célula durante la mitosis y se forma un “puente” entre ambos núcleos que posteriormente queda cubierto por la membrana nuclear (Fig. 3), los NPB usualmente se rompen cuando ocurre la citocinesis, sin embargo, pueden acumularse en células tratadas con citocalasina B (Cyt-B). Los cromosomas dicéntricos que dan lugar a los NPB se originan por rupturas cromosómicas y la subsecuente unión de dos fragmentos cromosómicos cada uno con su propio centrómero o por la fusión de telómeros que ocurre como resultado de un ensamblaje inapropiado de la estructura proteica del telosoma, lo cual a su vez ocasiona que el extremo cromosómico quede desprotegido y pueda fusionarse con otro extremo telomérico. Los NPB en las células binucleadas proveen información adicional sobre la genotoxicidad del agente que se está estudiando (Fenech *et al.*, 2000, 2011).

De igual manera, además de MN y NPB, puede observarse la presencia de “botones” o “brotes” nucleares (NBUD por las siglas en inglés de *nuclear buds*) como otra manifestación de eventos de inestabilidad cromosómica y que surgen como resultado de la amplificación de DNA (Fig. 4) (Fenech, 2011). El DNA amplificado puede ser eliminado del cromosoma a través de la recombinación entre regiones homólogas dentro de las secuencias amplificadas formando pequeños círculos de DNA acéntrico y atelomérico conocidos como dobles minutos (Shimizu *et al.* 2000). Este DNA amplificado es localizado en sitios específicos de la periferia del núcleo y es eliminada mediante la formación de “buds” durante la fase S del ciclo celular. Los NBUD se caracterizan por tener la misma

morfología que un MN con la excepción de que se hallan conectados al núcleo celular por un tallo grueso o delgado de material nucleoplásmico (Fenech, 2011).

La combinación de todos estos biomarcadores (MN, NPB y NBUDS), resulta muy útil para evaluar el riesgo de exposición a ciertos compuestos (Fig. 4). El ensayo de MN, desde el año 1998, forma parte de los lineamientos de evaluación de toxicidad genética utilizados por la Agencia para la Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) en Estados Unidos y desde el año 2010 también forma parte del lineamiento 487 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) para evaluar el riesgo que representan algunos compuestos químicos (Kirsch-Volders *et al.* 2011).



**Figura 4.** Posibles resultados durante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (NPB) y brotes nucleares (NBUDS) (Modificado de Fenech, 2007).

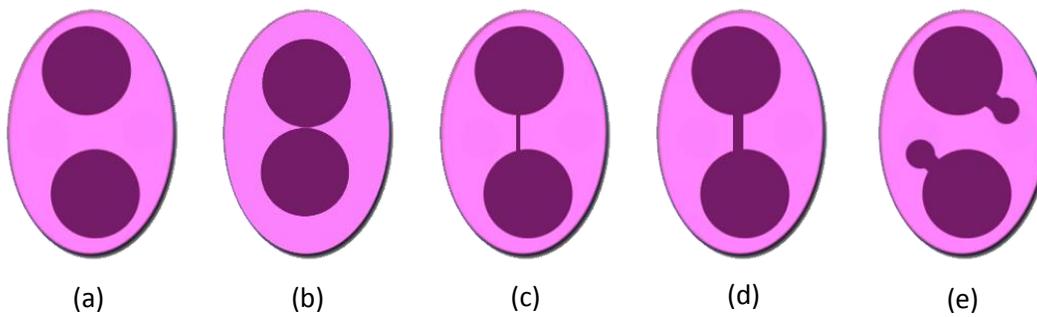
## Metodología estandarizada para el ensayo de MN con linfocitos humanos aislados.

En humanos, la mayoría de los estudios con MN se han llevado a cabo utilizando linfocitos de sangre periférica. La inhibición de la citocinesis mediante el uso de Cyt-B permite el análisis de MN en células binucleadas que han completado su primera división celular *in vitro* (Fenech, 2000). La identificación de estas células binucleadas es importante debido a que los MN se evidencian durante la división celular y la estimación precisa de la frecuencia de MN puede ser sólo obtenida a partir de la primera interfase post-mitótica después de la exposición al agente (Norppa y Falck, 2003). En condiciones de cultivo óptimas (a las 72 horas de estimulación con fitohemaglutinina (PHA) se obtiene del 35 al 60% de células binucleadas (Fenech, 2000).

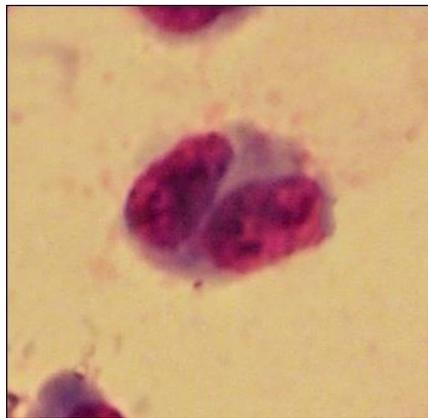
- **Criterios de inclusión para células binucleadas**

Para el registro de las células binucleadas, las células se deben considerar las siguientes características (Figs. 5 y 6):

- a) Las células deben ser binucleadas.
- b) Los dos núcleos de la célula binucleada deben presentar membranas nucleares intactas y estar situados dentro del mismo límite citoplasmático.
- c) Los dos núcleos deben ser aproximadamente del mismo tamaño con el mismo patrón e intensidad de tinción.
- d) Los dos núcleos pueden estar conectados por un delgado puente nucleoplásmico que no sea más grueso que  $\frac{1}{4}$  del diámetro nuclear.
- e) Los dos núcleos pueden estar juntos pero no sobrelapados.
- f) La membrana citoplásmica de la célula binucleada debe estar intacta y distinguible del citoplasma de células adyacentes.



**Figura 5.** Criterios para escoger células binucleadas en el ensayo de MN. (a) Célula binucleada ideal; (b) célula binucleada con núcleos que se tocan pero no se superlapan; (c) célula binucleada con puente delgado; (d) célula binucleada con puente relativamente grueso; (e) célula binucleada con dos NBUD (Modificado de Fenech, 2000).



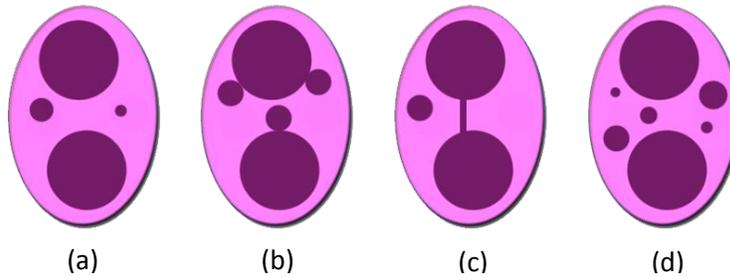
**Figura 6.** Fotografía de una célula binucleada en el microscopio óptico a 40x.

- **Criterios para seleccionar y contar MN**

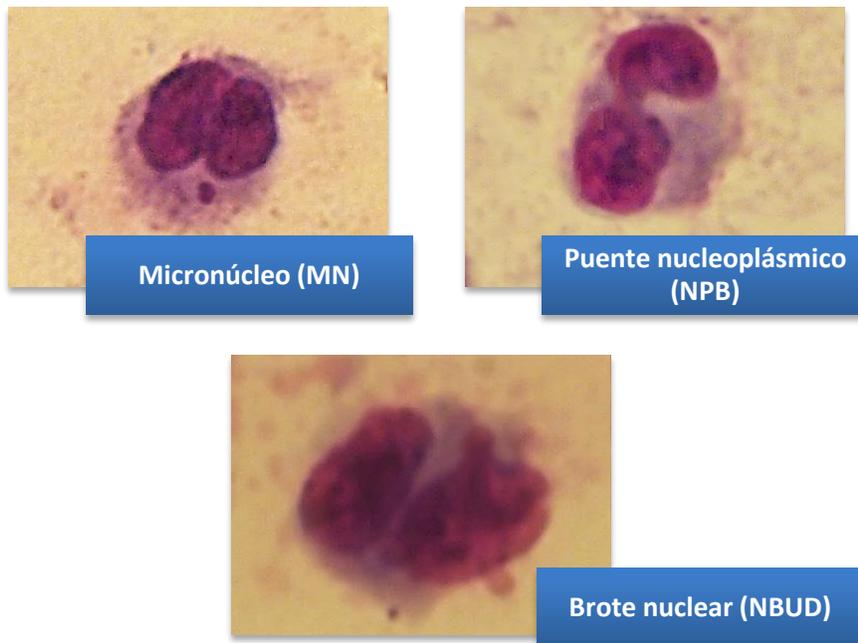
Para la contabilización de MN durante el análisis deben seguirse los siguientes criterios:

- a) El diámetro del MN debe estar dentro de  $1/16$  y  $1/3$  del tamaño del núcleo principal de la célula.
- b) El MN no debe estar conectado al núcleo principal.
- c) El MN puede estar en contacto con el núcleo principal pero no superlapse de modo que el límite del MN sea distinguible (Fig. 7 y 8).

- d) Los MN tienen la misma intensidad de tinción que el núcleo principal, pero ocasionalmente la tinción puede ser más intensa.



**Figura 7.** Apariencia típica y tamaño relativo de MN en células binucleadas: (a) Célula con dos MN; (b) Célula con tres MN que tocan los núcleos principales pero no se superponen; (c) célula con un NPB y un MN; (d) célula con cinco MN de diferente tamaño (Modificado de Fenech, 2000).



**Figura 8.** Fotografías de células binucleadas en el ensayo de MN.

- **Índice de División Nuclear (IDN)**

El IDN proporciona una medida del estado proliferativo de la fracción de células viables, por lo tanto es un indicador del efecto citostático. El IDN se calcula de acuerdo al método de Eastmond y Tucker (1989). Se cuentan 500 células para determinar la frecuencia de células con 1, 2, 3 ó 4 núcleos, y se calcula el IDN usando la siguiente fórmula:

$$IDN = \frac{(M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4)}{N}$$

Donde M1 – M4 representan el número de células con 1-4 núcleos y N es el número total de células viables contadas. El IDN es un parámetro útil para comparar la respuesta mitogénica de los linfocitos y el efecto citostático de los agentes examinados en el ensayo.

El valor más bajo posible para el IDN es 1.0, lo cual ocurre si todas las células viables fallan en dividirse durante el periodo de bloqueo con Cyt-B y son por lo tanto todas mononucleadas. Si todas las células viables completan una división nuclear y por lo tanto son binucleadas, el IDN es de 2.0. El IDN sólo puede ser más alto que 2.0 cuando una proporción sustancial de células viables han completado más de una división nuclear durante la fase de bloqueo con Cyt-B y por lo tanto contienen más de dos núcleos (Fenech, 2007).

## Justificación

La azacitidina (5-azacitidina) y la decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina) son agentes inhibidores de la metilación del DNA de gran interés para la investigación biomédica debido a su utilización en los tratamientos contra ciertos desórdenes mieloproliferativos y síndromes mielodisplásicos como la CML, CLL, ALL, y AML, por lo cual es importante realizar estudios concernientes a la relación dosis – efecto que tienen estos compuestos sobre el DNA que permitan establecer parámetros útiles para desarrollar tratamientos más adecuados y con menos riesgos. El ensayo de micronúcleos permite evaluar el daño al

DNA a nivel cromosómico, mediante el simple uso de criterios morfológicos visibles en las células se pueden determinar procesos de genotoxicidad (ruptura cromosómica, pérdida cromosómica) y citotoxicidad (inhibición de la división celular, necrosis y apoptosis). Por este motivo, dicho ensayo representa una opción adecuada para la evaluación de la genotoxicidad de la azacitidina y la decitabina.

## Hipótesis

Si la azacitidina (5-azacitidina) y la decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina) son compuestos genotóxicos (inducen daño al ADN) y/o citotóxicos (afectan la proliferación celular), en células de linfocitos humanos, esto se verá reflejado como micronúcleos (MN). Entonces la azacitidina y la decitabina incrementarán de manera significativa la frecuencia de MN con respecto al testigo negativo. En cuanto al índice de proliferación celular, este será menor que el testigo negativo.

## Objetivos

### Objetivo general

- Evaluar, a través de la frecuencia de MN, el efecto genotóxico inducido por los compuestos 5-azacitidina y 5-aza-2'-desoxicitidina en células binucleadas de linfocitos humanos.

### Objetivos particulares

- Analizar la variación en la frecuencia de MN de acuerdo a diferentes concentraciones de decitabina.
- Determinar la frecuencia de MN de ocasionados por la azacitidina.
- Evaluar el efecto citotóxico de la azacitidina y la decitabina en linfocitos humanos.

## Materiales y Método

### Compuestos

5-azacitidina (100 mg, Sigma-Aldrich, 320-67-2), 5-aza-2'-desoxicitidina (5 mg, Sigma-Aldrich, 2353-33-5), medio de cultivo RPMI (Gibco, 21870-076), suero fetal bovino (Gibco, 16000-036) (Gibco), PHA (Gibco, 10576-015), Cyt-B, mitomicina C (MMC) (Sigma-Aldrich, 200-008-6), metanol (J.T. Baker, 67-56-1) y ácido acético (Merck, K33486963). Hemacolor® (Merck, 3822 00 00).

### Concentraciones

Durante el comienzo de este trabajo se utilizó una concentración  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  de azacitidina debido a que dicha concentración ya había sido anteriormente empleada por Guttenbach y Schmid en 1994, de igual manera se decidió usar la misma concentración para la decitabina además de una concentración superior y una inferior ( $0.1 \times 10^{-5} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  y  $10 \times 10^{-5} \text{M}$ ). Sin embargo éstas concentraciones resultaron tóxicas y no permitían un análisis adecuado, por lo que se decidió disminuirlas.

En el caso de la 5-azacitidina (azacitidina) se utilizó una sola concentración de  $0.025 \times 10^{-5} \text{M}$ , y con la 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) se utilizaron tres concentraciones diferentes:  $0.025 \times 10^{-5} \text{M}$ ,  $0.0125 \times 10^{-5} \text{M}$  y  $0.006 \times 10^{-5} \text{M}$  (Tabla 1). En todos los casos se usó un testigo positivo con MMC ( $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) y un testigo negativo (agua). Se realizaron dos series experimentales.

Tabla 1. Concentraciones utilizadas para el ensayo de MN en linfocitos humanos.	
Compuesto	Concentración
Azacitidina	$0.025 \times 10^{-5} \text{M}$
Decitabina	$0.006 \times 10^{-5} \text{M}$
	$0.012 \times 10^{-5} \text{M}$
	$0.025 \times 10^{-5} \text{M}$

### **Obtención de la muestra**

Se extrajeron alrededor de 5 ml de sangre periférica de la vena del antebrazo ( en especial las del pliegue del codo) a cuatro donadores sanos, 2 hombres y 2 mujeres, no fumadores, entre 20 y 25 años de edad, con un consentimiento firmado (anexo I). La sangre se colectó en tubos Vacutainer® (BD, 367878) con 0.3 ml de heparina como anticoagulante. La sangre fue extraída en la mañana antes de desayunar. Se realizaron dos series experimentales por cada donador, por lo cual se necesitaron dos extracciones de sangre con un lapso de diferencia entre cada una de no más de un mes.

### **Aislamiento de linfocitos**

La sangre fue centrifugada durante 30 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente, se extrajo la capa de células nucleadas entre los eritrocitos y el plasma usando una pipeta.

### **Cultivo de los linfocitos**

Se añadió 1 ml de los linfocitos aislados en tubos de centrifuga con fondo cónico de 15 ml de capacidad (Corning®) con 4 ml de medio RPMI suplementado con penicilina-estreptomicina (1 ml/100 ml), 0.2 ml de PHA y 1 ml de FBS. Los tubos se incubaron a 37° C por 24 h. Posteriormente se agregó la azacitidina y la decitabina a los tubos correspondientes en las concentraciones indicadas, así como MMC para los tubos de testigo positivo. Después de 20 horas de incubación se añadió 0.2 ml de Cyt-B a todos los tubos y se incubaron durante 28 h.

### **Cosecha de los cultivos de linfocitos**

Todos los cultivos de linfocitos fueron cosechados después de 72 horas de incubación. Los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 1500 rpm, se aspiró el sobrenadante hasta un nivel mínimo, las células fueron resuspendidas y se agregó fijador metanol-ácido acético en proporción 3:1, para nuevamente centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos, descartar sobrenadante, resuspender y añadir fijador, se repitió este paso hasta lograr obtener un sobrenadante transparente (Fig. 9). Posteriormente los tubos se guardaron a 4 °C.

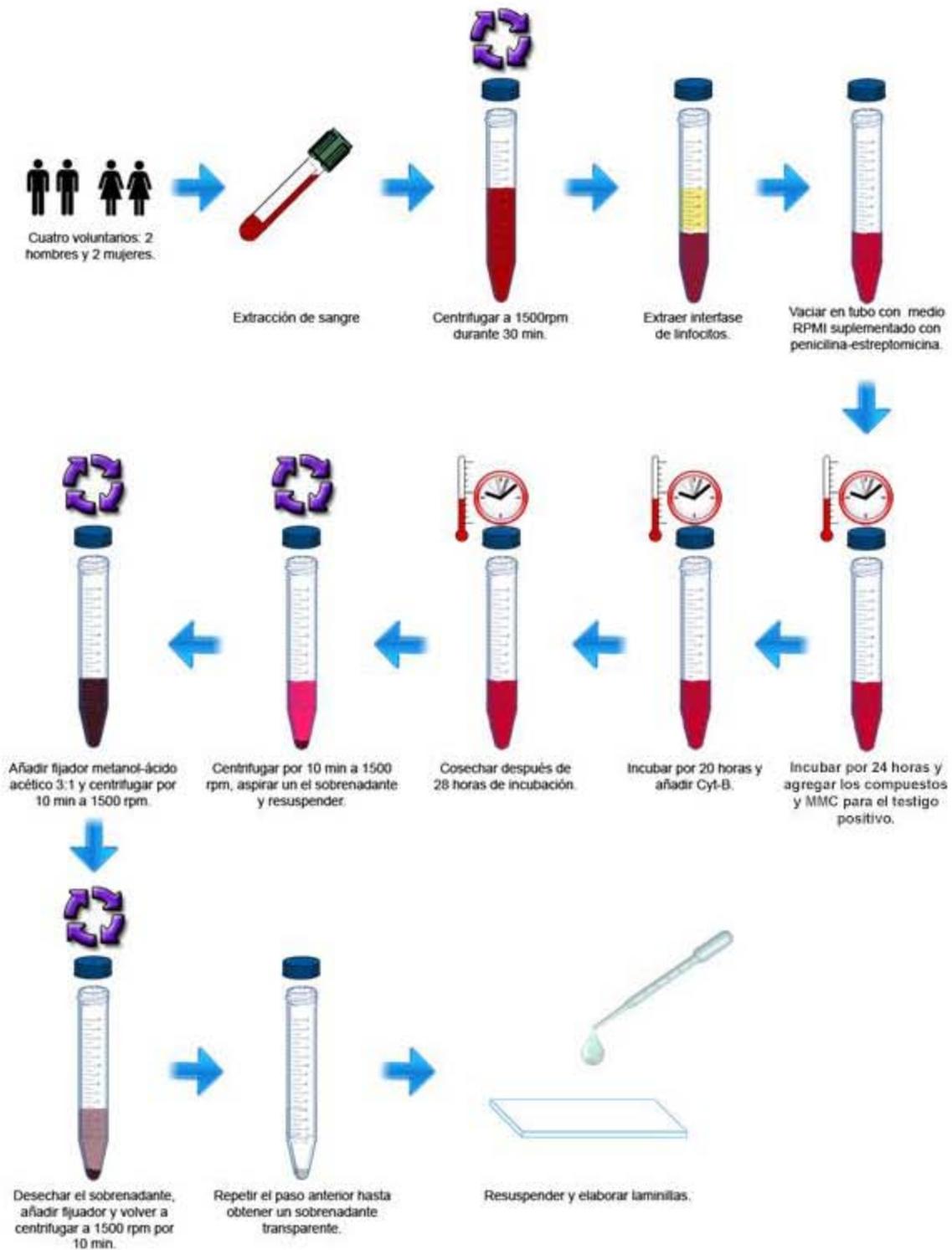


Fig. 9. Esquema general de la metodología utilizada para el cultivo y cosecha de linfocitos.

## Elaboración de las preparaciones

Una vez que se obtuvo el sobrenadante transparente, se realizaron las preparaciones, se concentró el botón celular en un ml de fijador, se resuspendió perfectamente el botón celular y con una pipeta Pasteur se distribuyeron de dos a tres gotas sobre la superficie de un portaobjetos limpio y se dejaron secar durante tres días. Se elaboraron tres laminillas por cada tratamiento.

## Tinción de las preparaciones

Para teñir las laminillas se utilizó Hemacolor® (Merck, 3822 00 00), el “kit” consiste de dos frascos (I y II). El frasco I (hematoxilina) tiñe de color púrpura el núcleo de la célula, mientras que el frasco II (eosina) tiñe de color rosa el citoplasma, esto permite una diferenciación de los núcleos ideal para el análisis. El proceso de tinción consistió en sumergir cada laminilla durante 10 segundos en el frasco I e inmediatamente después sumergirla durante 7 segundos en el frasco II posteriormente la laminilla se enjuaga con agua de la llave y se deja secar.

## Registro

Las laminillas fueron examinadas en un microscopio óptico (Axiostar®) a 40x de aumento. Para cada laminilla se obtuvo la siguiente información:

- a) Para genotoxicidad se analizaron 1000 células binucleadas y se cuantificó:
  - Número de células binucleadas con micronúcleos (MN).
  - Distribución de los micronúcleos en las células binucleadas (1,2,3 MN etc).
  - Número de NPB.
  - Número de NBUD.
- b) Para citotoxicidad
  - Número de núcleos por células (1, 2, 3 ó más)

## Análisis estadístico

Se aplicaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para evaluar si existían diferencias significativas en al menos un tratamiento con respecto a los demás, se estableció un nivel de confianza de 95% ( $p < 0.05$ ). Posteriormente, en los casos en que dichas pruebas

arrojaron resultados significativos, se realizaron pruebas de comparación múltiple de Dunn para averiguar específicamente entre cuáles tratamientos existían diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## Resultados

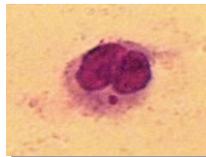
El índice de proliferación celular (CBPI) indica que tanto los testigos como los diferentes tratamientos se encuentran en un intervalo de valores que van de 1.61 a 1.89 (Tabla 2), lo que indica que la mayoría de las células son binucleadas.

**Tabla 2. Índice de proliferación celular con bloqueo de la citocinesis (CBPI)**

Donador	Serie	Testigo negativo (agua)	Testigo positivo [MMC 3µg/ml]	Azacitidina [0.025x10 <sup>-5</sup> M]	Decitabina1 [0.006x10 <sup>-5</sup> M]	Decitabina2 [0.012x10 <sup>-5</sup> M]	Decitabina3 [0.025x10 <sup>-5</sup> M]
M1	1	1.72	1.75	1.66	1.74	1.66	1.63
	2	1.61	1.61	1.65	1.72	1.63	1.69
M2	1	1.75	1.78	1.69	1.62	1.72	1.64
	2	1.72	1.79	1.74	1.88	1.89	1.85
F1	1	1.77	1.76	1.67	1.74	1.68	1.73
	2	1.66	1.78	1.7	1.72	1.73	1.67
F2	1	1.69	1.72	1.75	1.82	1.72	1.67
	2	1.66	1.72	1.72	1.75	1.73	1.72

Un valor de CBPI = 1 indica que ocurrió una división nuclear.

## Frecuencia de micronúcleos (MN)



El intervalo de frecuencia relativa de MN en el testigo negativo (agua) entre los donadores fue de 0.0015 a 0.0055 (Tabla 3). Se observó un incremento notable (12.3 veces) con respecto al testigo positivo (MMC), el cual tiene un intervalo entre los donadores de 0.0185 a 0.0235 (Tabla 3).

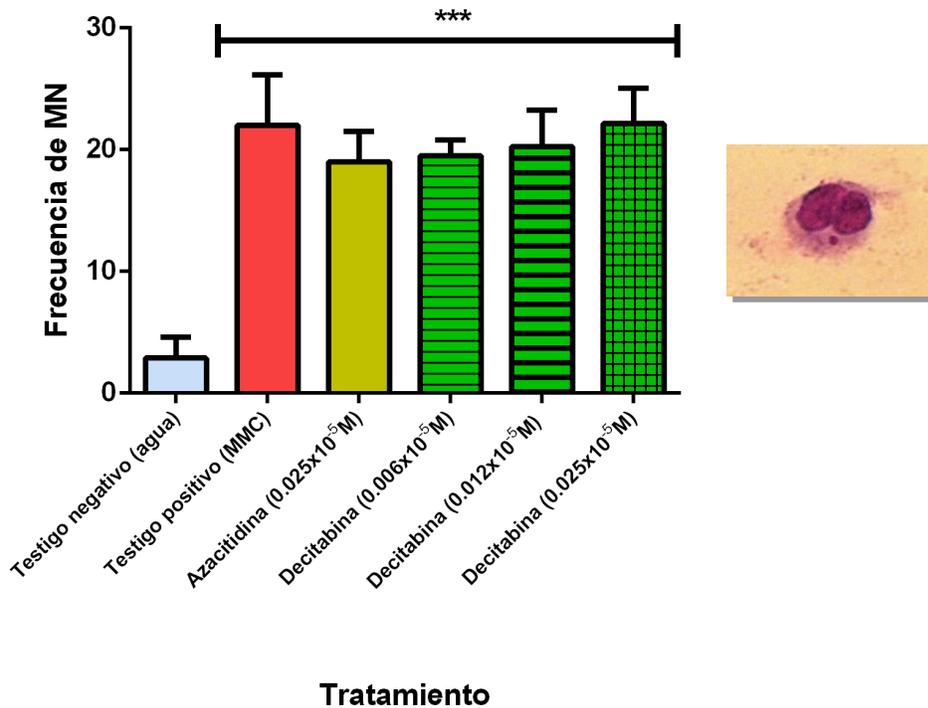
Tabla 3. Frecuencia relativa* de MN						
Donador	Testigo negativo (agua)	Testigo positivo [MMC 3µg/ml]	Azacitidina [0.025x10 <sup>-5</sup> M]	Decitabina1 [0.006x10 <sup>-5</sup> M]	Decitabina2 [0.012x10 <sup>-5</sup> M]	Decitabina3 [0.025x10 <sup>-5</sup> M]
M1	0.002	0.0225	0.019	0.02	0.0205	0.022
M2	0.0025	0.0185	0.017	0.0195	0.0195	0.0205
F1	0.0055	0.0235	0.022	0.02	0.02	0.023
F2	0.0015	0.0235	0.018	0.0185	0.021	0.023

\*La frecuencia relativa se obtuvo sumando las frecuencias absolutas de las series experimentales 1 y 2 por donador para cada tratamiento y dividiendo entre el total de células binucleadas observadas ( $X+X/2000$ ).

Para los compuestos azacitidina y decitabina, en las diferentes concentraciones, se obtuvieron frecuencias de MN dentro del mismo intervalo de frecuencia que MMC (Tabla 3).

Para averiguar si existían diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de MN entre los diferentes tratamientos y el testigo negativo, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Los resultados del análisis estadístico indicaron que sí existen diferencias significativa ( $p < 0.05$ ) entre las medias de la frecuencia de MN,  $X^2(5, N = 48) = 25.908$ ,  $p = 0.00009$ .

Gráfica 1. Frecuencia promedio de MN por tratamiento



Promedio y desviación estándar de MN en cada tratamiento. Se observaron diferencias significativas (\*\*\*) en todos los tratamientos, incluyendo el testigo positivo, con respecto al testigo negativo ( $p < 0.05$ ).

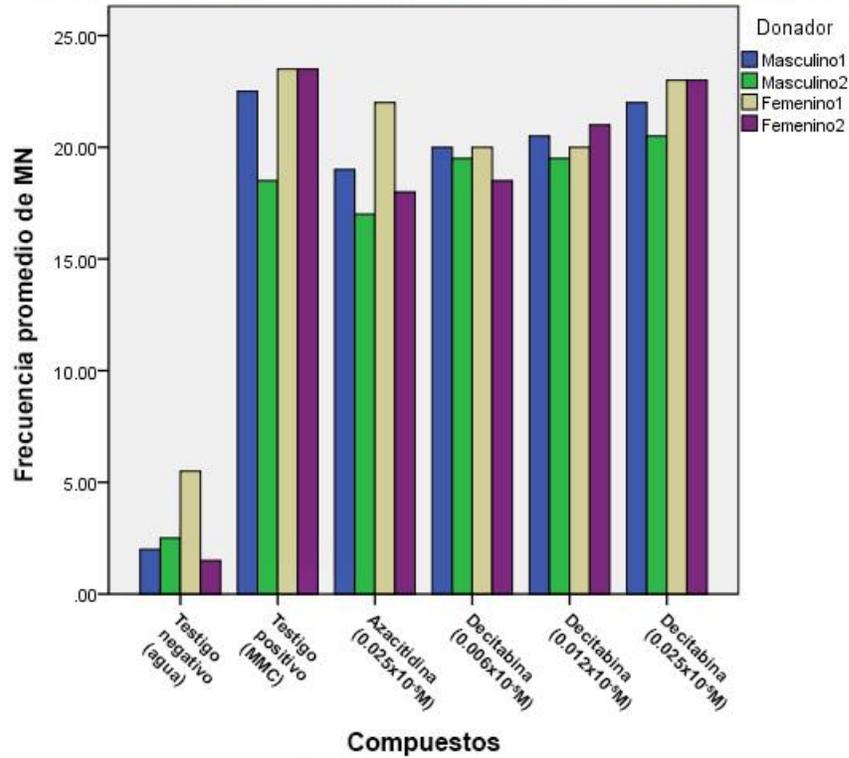
Dado que la prueba de Kruskal-Wallis mostro que existían diferencias significativas en al menos un grupo, se empleó una prueba posterior de comparación múltiple de Dunn para averiguar entre qué grupos se hallaban dichas diferencias. Los resultados de estas pruebas indicaron diferencias significativas entre el testigo negativo y todos los demás tratamientos (Gráfica 1 y Tabla 4).

<b>Tabla 4. Estimación de diferencias estadísticamente significativas* en la frecuencia de MN entre tratamientos</b>					
	<b>Testigo positivo</b>	<b>Azacitidina</b> [0.025x10 <sup>-5</sup> M]	<b>Decitabina1</b> [0.006x10 <sup>-5</sup> M]	<b>Decitabina2</b> [0.012x10 <sup>-5</sup> M]	<b>Decitabina3</b> [0.025x10 <sup>-5</sup> M]
<b>Testigo negativo</b>	+	+	+	+	+
<b>Testigo positivo</b>		-	-	-	-
<b>Azacitidina</b> [0.025x10 <sup>-5</sup> M]			-	-	-
<b>Decitabina1</b> [0.006x10 <sup>-5</sup> M]				-	-
<b>Decitabina2</b> [0.012x10 <sup>-5</sup> M]					-

\*De acuerdo a una prueba de comparación múltiple de Dunn. Esta prueba aplica una corrección del tipo Bonferroni donde el nivel  $\alpha$  corresponde a 0.05 dividido por el número de grupos comparados.

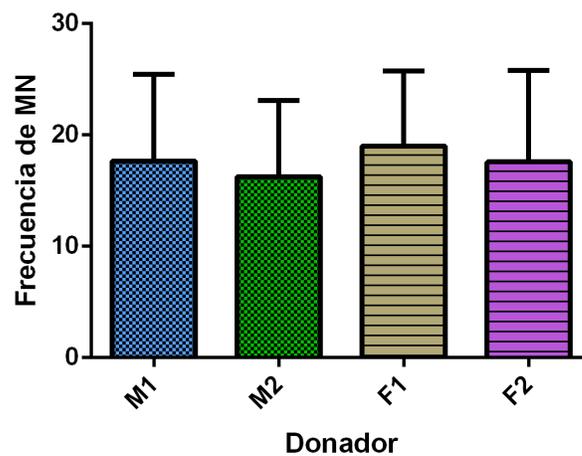
De igual manera se realizó otra prueba de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias significativas en la frecuencia de MN generados por la azacitidina y la decitabina entre los donadores (Gráficas 2 y 3), no se encontraron diferencias significativas,  $X^2(3, N = 48) = 2.598, p = 0.458$ . Tampoco se observaron diferencias en la frecuencia de MN entre las dos series experimentales  $X^2(1, N = 48) = 0.124, p = 0.725$ .

**Gráfica 2. Frecuencia promedio de MN por donador en cada tratamiento**



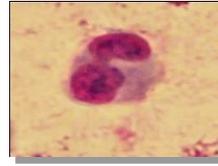
Se muestra la frecuencia de MN promedio de cada donador dentro de cada tratamiento.

**Gráfica 3. Frecuencia promedio de MN por donador**



Todos los donadores presentan frecuencias de MN similares, no se observaron diferencias significativas en ningún caso ( $p < 0.05$ ).

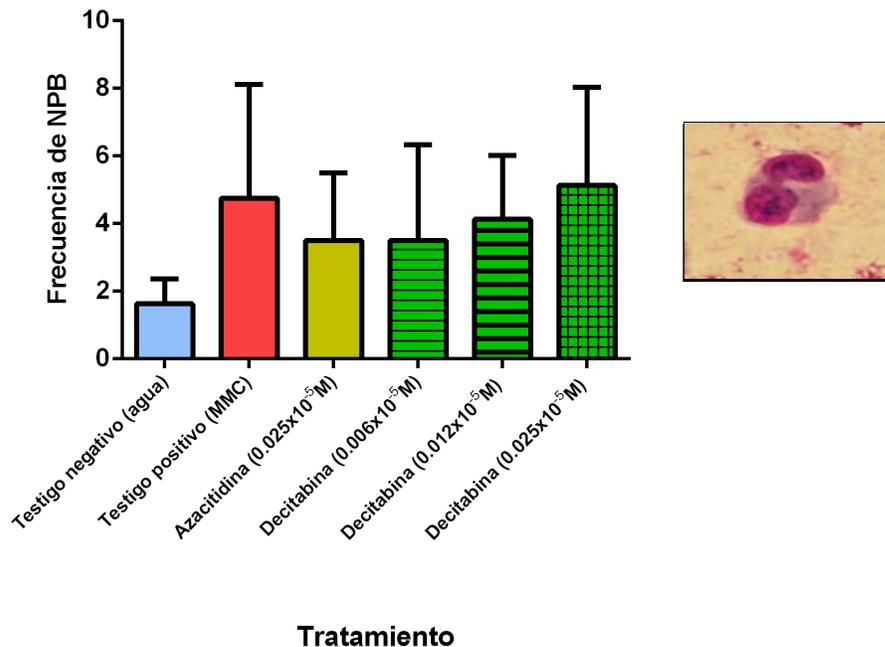
## Frecuencia de puentes nucleoplásmicos (NPB)



Se obtuvo una respuesta muy similar al testigo positivo en la frecuencia de NPB con los tratamientos de azacitidina y decitabina (Gráfica 4).

Para conocer las diferencias en la frecuencia de NPB en los tratamientos usados se realizó, nuevamente, otra prueba Kruskal-Wallis. El resultado no mostró diferencias significativas entre tratamientos,  $\chi^2(5, N = 48) = 9.580, p = 0.088$ .

**Gráfica 4. Frecuencia promedio de NPB por tratamiento**



Promedio y desviación estándar de NPB observados en cada tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre ningún grupo ( $p < 0.05$ ).

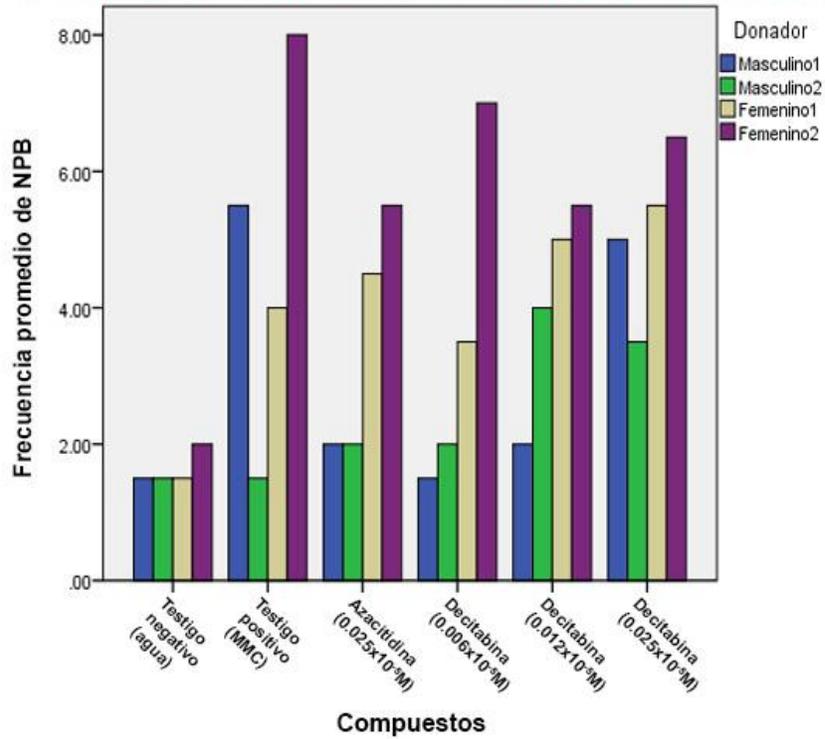
<b>Tabla 5. Frecuencia relativa* de NPB</b>						
<b>Donador</b>	<b>Testigo negativo</b>	<b>Testigo positivo</b>	<b>Azacitidina</b> [0.025x10 <sup>-5</sup> M]	<b>Decitabina1</b> [0.006x10 <sup>-5</sup> M]	<b>Decitabina2</b> [0.012x10 <sup>-5</sup> M]	<b>Decitabina3</b> [0.025x10 <sup>-5</sup> M]
<b>M1</b>	0.0015	0.0055	0.002	0.0015	0.002	0.005
<b>M2</b>	0.0015	0.0015	0.002	0.002	0.004	0.0035
<b>F1</b>	0.0015	0.004	0.0045	0.0035	0.005	0.0055
<b>F2</b>	0.002	0.008	0.0055	0.007	0.0055	0.0065

\*La frecuencia relativa se obtuvo sumando las frecuencias absolutas de las series experimentales 1 y 2 por donador para cada tratamiento y dividiendo entre el total de células binucleadas observadas (X+X/2000).

La frecuencia de NPB en el testigo negativo tuvo un valor promedio de 1.5 NPB excepto en F2 donde presentó un promedio de 2 (Gráficas 5 y 6).

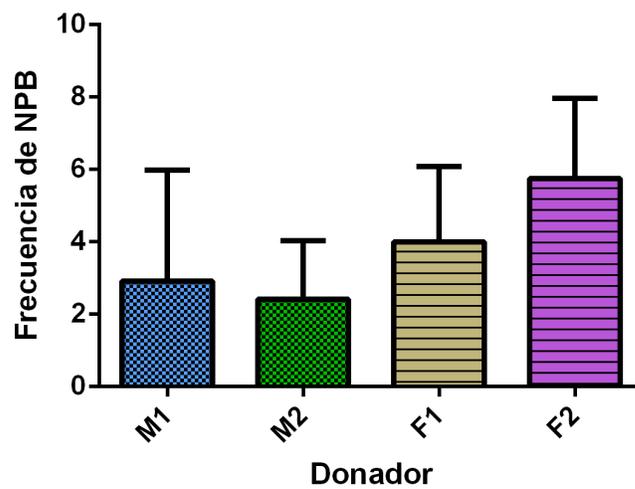
Se realizó otro análisis para evaluar diferencias en la frecuencia de NPB entre los donadores mediante otra prueba de Kruskal-Wallis, se obtuvieron diferencias significativas,  $X^2(3, N = 48) = 12.490, p = 0.006$ . La prueba de comparación múltiple de Dunn arrojó diferencias significativas en la frecuencia de NPB entre el donador Masculino1 vs Femenino2 y Masculino2 vs Femenino2 (Tabla 6).

**Gráfica 5. Frecuencia promedio de NPB por donador en cada tratamiento**



Se muestra la frecuencia promedio de NPB de cada donador dentro de cada tratamiento.

**Gráfica 6. Frecuencia promedio de NPB por donador**



El donador Femenino 2 (F2) presentó la mayor frecuencia de NPB y mostró diferencias significativas con respecto a ambos donadores masculinos (M1 y M2) en cuanto a la frecuencia de NPB ( $p < 0.05$ ).

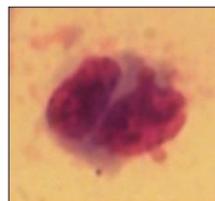
**Tabla 6. Estimación de diferencias estadísticamente significativas\* en la frecuencia de NPB entre donadores**

Comparación	Diferencia
Masculino 1 vs Masculino 2	-
Masculino 1 vs Femenino 1	-
Masculino 1 vs Femenino 2	+
Masculino 2 vs Femenino 1	-
Masculino 2 vs Femenino 2	+
Femenino 1 vs Femenino 2	-

\*De acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Dunn. (+): Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ); (-): Sin diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de NPB entre las dos series experimentales;  $\chi^2(1, N = 48) = 2.480, p = 0.115$ .

### Frecuencia de brotes nucleares (NBUD)



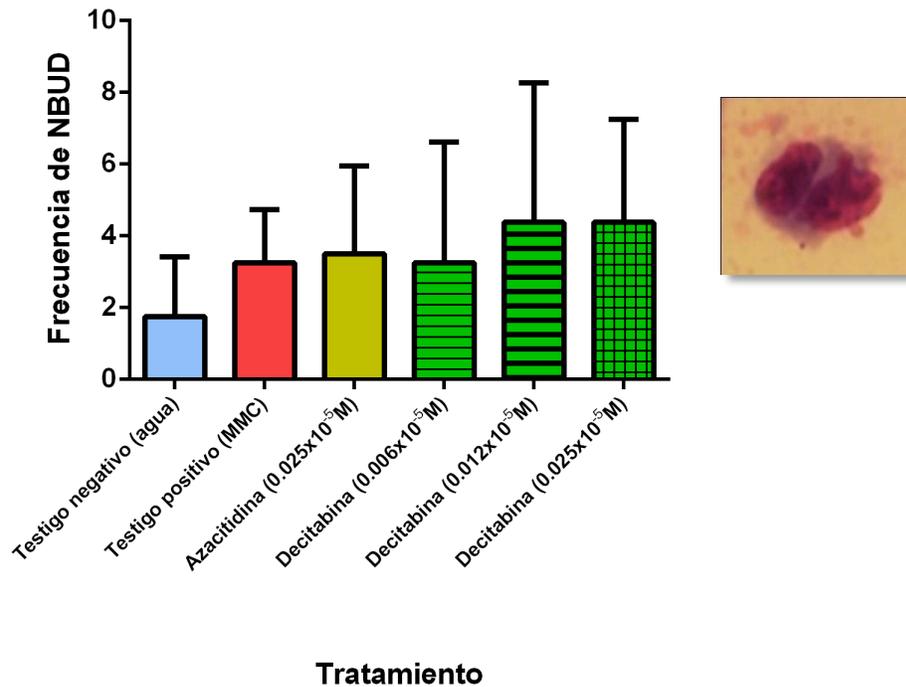
Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias en la frecuencia de NBUD entre los tratamientos (Tabla 7 y Gráfica 7), el análisis no arrojó diferencias significativas  $\chi^2(5, N = 48) = 4.757, p = 0.446$ .

**Tabla 7. Frecuencia relativa\* de NBUD**

Donador	Testigo negativo (agua)	Testigo positivo [MMC 3µg/ml]	Azacitidina [0.025x10 <sup>-5</sup> M]	Decitabina1 [0.006x10 <sup>-5</sup> M]	Decitabina2 [0.012x10 <sup>-5</sup> M]	Decitabina3 [0.025x10 <sup>-5</sup> M]
M1	0.002	0.003	0.002	0.0015	0	0.0015
M2	0.0015	0.002	0.0015	0	0.0025	0.0035
F1	0.0035	0.0045	0.004	0.008	0.0085	0.0075
F2	0	0.0035	0.0065	0.0035	0.0065	0.005

\*La frecuencia relativa se obtuvo sumando las frecuencias absolutas de las series experimentales 1 y 2 por donador para cada tratamiento y dividiendo entre el total de células binucleadas observadas ( $X+X/2000$ ).

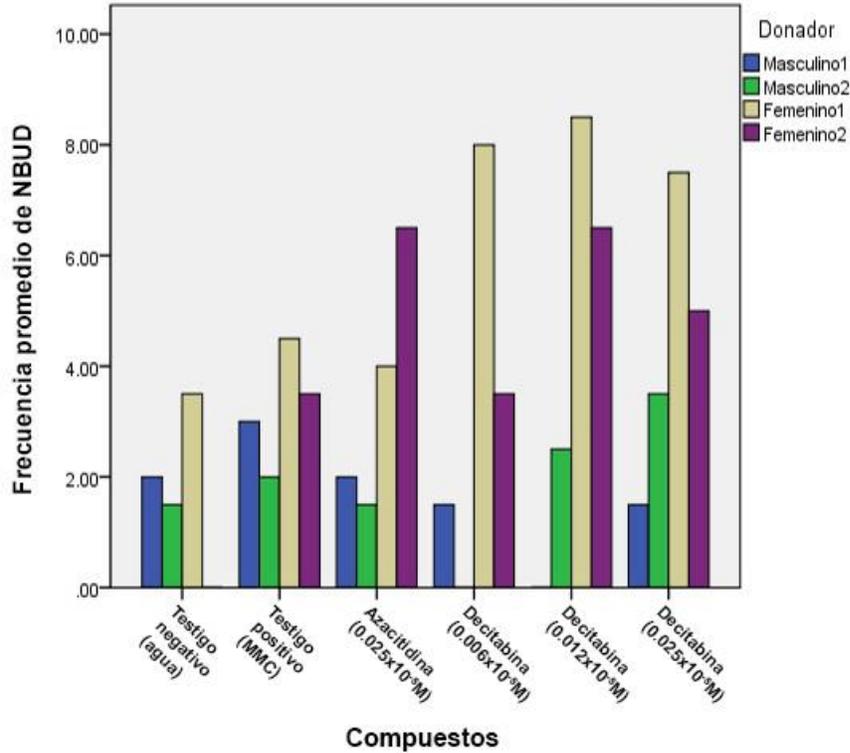
**Gráfica 7. Frecuencia promedio de NBUD por tratamiento**



Promedio y desviación estándar de NBUD observados en cada tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre ningún grupo ( $p < 0.05$ ).

La frecuencia promedio de NBUD en el testigo negativo está en el intervalo de 2 a 3 NBUD (Gráfica 7). Se observa que en el sexo femenino hay una mayor frecuencia de NBUD en el testigo positivo (MMC) así como en los tratamientos con decitabina y azacitidina en comparación con los donadores de sexo masculino. La frecuencia de NBUD es menor en MMC con respecto a los tratamientos de azacitidina y decitabina para el caso del sexo femenino. En el caso del sexo masculino, hay una frecuencia menor tanto en MMC como en los diferentes tratamientos (Gráficas 8 y 9).

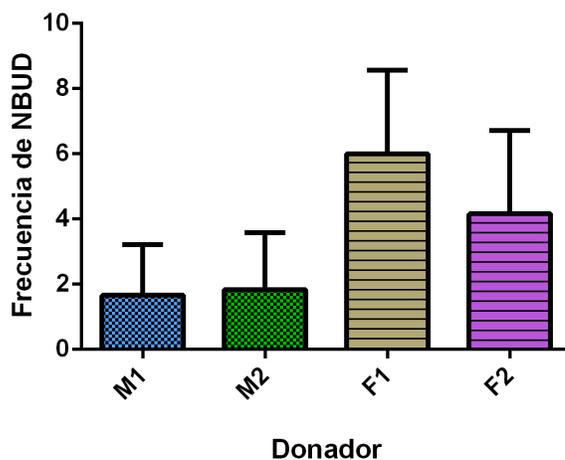
**Gráfica 8. Frecuencia promedio de NBUD por donador en cada tratamiento**



Se muestra la frecuencia promedio de NPB de cada donador dentro de cada tratamiento.

Se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de NBUD generados por la azacitidina y la decitabina entre los donadores, de acuerdo a una prueba Kruskal-Wallis;  $\chi^2(3, N = 48) = 19.451, p = 0.0002$ . La prueba de Dunn arrojó diferencias significativas entre los donadores Masculino1 vs Femenino1, Masculino1 vs Femenino2 y Masculino2 vs Femenino1 (Gráfica 9 y Tabla 8).

### Gráfica 9. Frecuencia promedio de NBUD por donador



Se observó una mayor frecuencia de NBUD en los donadores del sexo femenino con respecto al sexo masculino, dicha diferencia fue significativa en algunos casos (Tabla 8).

**Tabla 8. Estimación de diferencias estadísticamente significativas\* en la frecuencia de NBUD entre donadores**

Comparación	Diferencia
Masculino 1 vs Masculino 2	-
Masculino 1 vs Femenino 1	+
Masculino 1 vs Femenino 2	+
Masculino 2 vs Femenino 1	+
Masculino 2 vs Femenino 2	-
Femenino 1 vs Femenino 2	-

\*De acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Dunn. (+): Diferencias significativas; (-): Sin diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre las dos series experimentales en la frecuencia de NBUD;  $\chi^2(1, N = 48) = 1.409, p = 0.235$ .

## Discusión

La azacitidina y la decitabina son inhibidores de la metilación del DNA y se utilizan ampliamente en la medicina (Goffin y Eisenhauer, 2002). Como se mencionó anteriormente, la concentración de azacitidina ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ) usada en principio en este trabajo fue empleada por Guttenbach y Schmid en 1994, quienes trabajaron con cultivos de linfocitos humanos para identificar cuáles cromosomas se encontraban en los micronúcleos que observaron por medio de la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia. Considerando lo anterior se decidió utilizar la misma concentración ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ) de azacitidina. Para la decitabina también se empleó la concentración de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  y se eligieron dos concentraciones adicionales (una superior y otra inferior) entonces las concentraciones a emplear fueron  $0.1 \times 10^{-5} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ,  $10 \times 10^{-5} \text{M}$ . Sin embargo, tanto la concentración única de azacitidina como las tres diferentes concentraciones de decitabina resultaron ser tóxicas, en consecuencia, se observaron células muy pequeñas así como la formación de agregados celulares que dificultaban el análisis. Por esta razón se decidió disminuir las concentraciones de ambos compuestos hasta obtener células de tamaño normal, con una conservación adecuada del citoplasma y con agregaciones celulares reducidas, esto se logró en las concentraciones de  $0.025 \times 10^{-5} \text{M}$  para azacitidina y  $0.006 \times 10^{-5} \text{M}$ ,  $0.012 \times 10^{-5} \text{M}$ ,  $0.025 \times 10^{-5} \text{M}$  para decitabina. En este trabajo se analizaron los parámetros de frecuencia de MN, NPB y NBUD, así como el índice de proliferación celular (CBPI) en cada tratamiento.

### Azacitidina

Fauth y Scherthan en 1998, observaron que la azacitidina induce la formación de MN y determinaron que la mayoría de los MN están formados por fragmentos cromosómicos. También se ha reportado que la azacitidina tiene un efecto preferencial en las regiones ricas de heterocromatina de los cromosomas 1, 9 y 16 (Viegas-Péquignot y Dutrillaux, 1976; Schmid *et al.* 1984).

Bajo las condiciones de este trabajo se observó una diferencia significativa en la frecuencia de MN en la concentración única de azacitidina con respecto al testigo negativo. Esta respuesta fue similar en ambos sexos. Se ha observado que la azacitidina puede producir picos en la inducción de MN en eritrocitos de ratón luego de 32, 40 y 48 horas posteriores a la exposición, dichos tiempos coinciden con la primera, segunda y tercer divisiones celulares, esto sugiere la participación de distintos tipos de reparación de DNA en la formación de MN (Morales-Ramírez y Vallarino-Kelly, 1999).

La hipótesis más aceptada acerca de la inducción de MN por acción de la azacitidina es que los efectos desmetilantes de este compuesto causan la descondensación de la cromatina (Viegas-Páquignot y Dutrillaux, 1976) y la posterior inducción de rupturas en la cadena de DNA, lo cual ocasiona el rompimiento de cromosomas y la formación de micronúcleos (Guttenbach y Schmid, 1994). Sin embargo, se ha observado la presencia de MN en células humanas en la primera división celular posterior al tratamiento con azacitidina (Sato *et al.* 2004). Morales-Ramírez y colaboradores (2008) sugieren que debido a que la desmetilación del DNA ocurre durante la segunda división celular posterior al tratamiento con azacitidina, la explicación anteriormente mencionada no puede ser la causa para el surgimiento de micronúcleos en la primera división celular y proponen que la unión covalente de la DNMT con los residuos de azacitidina y la subsecuente formación de grandes aductos requieren del mecanismo de reparación por escisión, por lo tanto una reparación errónea de este tipo podría entonces causar rupturas en la cadena de DNA e inducir MN.

### **Decitabina**

Distintos estudios han arrojado información acerca del potencial genotóxico de la decitabina. Cunha y colaboradores en 2002, utilizando la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART por sus siglas en inglés), observaron que el principal efecto genotóxico de la decitabina se debe a su capacidad para inducir recombinación mitótica (81%) (Cunha *et al.* 2002). En 2006, Stresemann y colaboradores observaron que

la decitabina induce MN en células TK6 y HCT116, y que además provoca desmetilación de DNA de manera dependiente de la concentración (Stresemann *et al.* 2006).

Para las concentraciones ( $0.006 \times 10^{-5} \text{M}$ ,  $0.012 \times 10^{-5} \text{M}$  y  $0.025 \times 10^{-5} \text{M}$ ) de la decitabina se encontró una frecuencia de MN significativamente más alta con respecto al testigo negativo. En todas las concentraciones de la decitabina la respuesta a MN es muy similar, lo cual puede explicarse porque probablemente la concentración más baja ( $0.006 \times 10^{-5} \text{M}$ ) podría representar el umbral de acción de este análogo de la citidina para este biomarcador.

En todos los donadores, se notó la presencia de NPB y NBUD inducidos por la azacitidina y la decitabina, estos biomarcadores son indicadores de la producción de cromosomas dicéntricos y de procesos de amplificación genética (Fenech *et al.* 2000, 2011). En el sexo femenino se presentó una mayor frecuencia de NPB y NBUD en comparación con el sexo masculino, es posible que dicha diferencia represente una respuesta preferencial a la azacitidina o a la decitabina por parte del sexo femenino.

Stresemann y colaboradores (2006) reportaron que el mecanismo de acción de la azacitidina y la decitabina es muy similar, sin embargo, se sabe que la decitabina presenta una mayor especificidad por el DNA que la azacitidina, ya que ésta última se incorpora principalmente al RNA (Christman, 2002), por esta razón se esperaría observar un efecto genotóxico mayor en los tratamientos con decitabina. Sin embargo, bajo las condiciones de este experimento, la frecuencia de MN en el tratamiento con azacitidina y los tratamientos con decitabina fue muy similar, no hubo diferencias significativas entre la respuesta a ambos compuestos. Los resultados de genotoxicidad obtenidos apoyan, de alguna manera, que el mecanismo de acción de ambos compuestos es similar tal como lo reportaron Stresemann y colaboradores en 2006.

No se observó una relación dosis-respuesta con la decitabina y por lo tanto no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones con éste compuesto. Probablemente dicha relación sería visible en concentraciones por debajo a  $0.006 \times 10^{-5} \text{M}$ .

Se ha demostrado que los mecanismos de reparación por recombinación, apareamiento erróneo (mismatch repair) y por escisión son requeridos para la reparación del daño al DNA ocasionado por la azacitidina (Hedge *et al.* 1996). Por este motivo se ha sugerido que existen tres mecanismos diferentes por los cuales la azacitidina y la decitabina inducen rompimientos en el DNA y posteriormente MN, los mecanismos involucrados son: (i) falla en la escisión de aductos compuestos por la unión covalente entre la DNMT y el DNA; (ii) falla en la reparación por recombinación y/o por apareamiento erróneo y (iii) una fragilidad cromosómica persistente debido a la desmetilación del DNA y a la descondensación de la cromatina en los sitios CpG (Morales-Ramírez *et al.* 2008).

A pesar de presentar un efecto genotóxico, la azacitidina y la decitabina no modifican el índice de proliferación celular. En la literatura, desde Cihak en 1974 y más recientemente Christman en 2002, se ha reportado un importante efecto citotóxico de estos compuestos, el cual se atribuye a la formación de aductos en el DNA por la unión covalente de las DNMT con éstos análogos de la citidina.

No se obtuvo evidencia estadística que demostrara que hay una diferencia en la frecuencia de NPB o de NBUD con respecto al testigo negativo en los tratamientos con azacitidina y decitabina.

La 5-azacitidina (azacitidina) y la 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina), como se mencionó anteriormente, son compuestos que han sido utilizados en el tratamiento de síndromes mielodisplásicos y leucemia mieloide y linfoblástica. Su acción terapéutica radica en la capacidad que tienen estos agentes para inhibir la actividad de las enzimas encargadas de la transferencia de grupos metilo en el DNA (DNMT), lo cual conlleva a la reactivación y expresión de genes previamente silenciados por causa de la hipermetilación típica que acompaña a este tipo de desórdenes (Rius y Lyko, 2011; Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011). Por lo tanto, es importante hacer notar que dada la capacidad de estos agentes para inhibir la metilación del DNA, también guardan un notable potencial genotóxico y es necesario establecer criterios de uso farmacológico que abarquen el posible daño

colateral que implica la administración de estos compuestos en los tratamientos contra la leucemia y síndromes mielodisplásicos.

## Conclusiones

La azacitidina y la decitabina presentan efecto genotóxico (generador de micronúcleos), en linfocitos de sangre periférica humana.

La azacitidina y la decitabina inducen aumento significativo en la frecuencia de puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares en el sexo femenino con respecto al sexo masculino.

Ambos compuestos tienen un comportamiento muy similar al testigo positivo (MMC) en cuanto a la frecuencia de MN observada.

La azacitidina y la decitabina tienen un efecto similar en la inducción de MN, NPB y NBUD.

## Referencias

- **Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, y P. Walter** (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4ª edición. Nueva York: Garland Science. DNA Repair. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26879/>
- **Baylin, S. B., E. R. Fearon, B. Vogelstein, A. de Bustros, S. J. Sharkis, P. J. Burke, S. P. Staal, y B. D. Nelkin** (1987). Hypermethylation of the 5' region of the calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies. *Blood* 70 (2), 412-417.
- **Bender, C. M., M. M. Pao, y P. A. Jones** (1998). Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Research* 58 (1), 95-101.
- **Christman, J. K.** (2002). 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21 (35), 5483-5495.
- **Cihák, A.** (1974). Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology* 30 (5), 405-422.
- **Cunha, K. S., M. L. Reguly, U. Graf, y H. H. de Andrade** (2002). Somatic recombination: a major genotoxic effect of two pyrimidine antimetabolite chemotherapeutic drugs in drosophila melanogaster. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 514 (1-2), 95-103.
- **Eastmond, D. A. y J. D. Tucker** (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 13 (1), 34-43.
- **Falck, G. C.-M. C., J. Catalán, y H. Norppa** (2002). Nature of anaphase laggers and micronuclei in female cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutagenesis* 17 (2), 111-117.
- **Fauth, E. y H. Scherthan** (1998). Frequencies of occurrence of all human chromosomes in micronuclei from normal and 5-azacytidine-treated lymphocytes as revealed by chromosome painting. *Mutagenesis* 13 (3), 235-241.
- **Fenech, M.** (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 285 (1), 35-44.
- **Fenech, M.** (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research* 455 (1-2), 81-95.
- **Fenech, M.** (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2 (5), 1084-1104.
- **Fenech, M., M. Kirsch-Volders, A. T. Natarajan, J. Surralles, J. W. Crott, J. Parry, H. Norppa, D. A. Eastmond, J. D. Tucker, y P. Thomas** (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26 (1), 125-132.

- **Goffin, J. y E. Eisenhauer** (2002). DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Annals of Oncology* 13 (11), 1699-1716.
- **Griffiths, E. A. y S. D. Gore** (2008). DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Seminars in Hematology* 45 (1), 23-30.
- **Guttenbach, M. y M. Schmid** (1994). Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures. *Experimental Cell Research* 211 (1), 127-132.
- **Hegde, V., R. J. McFarlane, E. M. Taylor, y C. Price** (1996). The genetics of the repair of 5-azacytidine-mediated DNA damage in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular & General Genetics* 251 (4), 483-492.
- **Holliday, R. y G. W. Grigg** (1993). DNA methylation and mutation. *Mutation Research* 285 (1), 61-67.
- **Jelinek, J., V. Gharibyan, M. R. H. Estecio, K. Kondo, R. He, W. Chung, Y. Lu, N. Zhang, S. Liang, H. M. Kantarjian, J. E. Cortes, y J.-P. J. Issa** (2011). Aberrant DNA methylation is associated with disease progression, resistance to imatinib and shortened survival in chronic myelogenous leukemia. *PLoS ONE* 6 (7), e22110+.
- **Kirsch-Volders, M., G. Plas, A. Elhajouji, M. Lukamowicz, L. Gonzalez, K. Vande Loock, y I. Decordier** (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology* 85 (8), 873-899.
- **Kurkjian, C., S. Kummar, y A. J. Murgo** (2008). DNA methylation: Its role in cancer development and therapy. *Current Problems in Cancer* 32 (5), 187-235.
- **Leone, G., L. Teofili, M. T. T. Voso, y M. Lübbert** (2002). DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica* 87 (12), 1324-1341.
- **Lübbert, M.** (2000). DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 249, 135-164.
- **Morales-Ramírez, P. y T. Vallarino-Kelly** (1999). Relationship between the kinetics of micronuclei induction and the mechanism of chromosome break formation by methylnitrosourea in mice *in vivo*. *Mutation Research* 427 (1), 31-38.
- **Morales-Ramírez, P., T. Vallarino-Kelly, y V. L. Cruz-Vallejo** (2008). Mechanisms of DNA breaks induction *in vivo* by 5-azacytidine: paths of micronucleus induction by azaC. *Journal of Applied Toxicology* 28 (3), 254-259.
- **Norppa, H. y G. C.-M. C. Falck** (2003). What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18 (3), 221-233.
- **Rius, M. y F. Lyko** (2011). Epigenetic cancer therapy: rationales, targets and drugs. *Oncogene* 1-9.
- **Rodríguez-Paredes, M. y M. Esteller** (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature Medicine* 17 (3), 330-339.

- **Román-Gómez, J., J. A. A. Castillejo, A. Jiménez, M. G. G. González, F. Moreno, M. d. C. d. e. I. C. Rodríguez, M. Barrios, J. Maldonado, y A. Torres** (2002). 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21 (cip1/waf1/sdi1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99 (7), 2291-2296.
- **Satoh, T., K. Yamamoto, K. F. Miura, y T. Sofuni** (2004). Region-specific chromatin decondensation and micronucleus formation induced by 5-azacytidine in human TIG-7 cells. *Cytogenetic and Genome Research* 104 (1-4), 289-294.
- **Schmid, M., T. Haaf, y D. Grunert** (1984). 5-Azacytidine-induced undercondensations in human chromosomes. *Human Genetics* 67 (3), 257-263.
- **Shimizu, N., T. Shimura, y T. Tanaka** (2000). Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research* 448 (1), 81-90.
- **Sorm, F., A. Pískala, A. Cihák, y J. Veselý** (1964). 5-azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* 20 (4), 202-203.
- **Stopper, H., C. Körber, D. Schiffmann, y W. J. Caspary** (1993). Cell-cycle dependent micronucleus formation and mitotic disturbances induced by 5-azacytidine in mammalian cells. *Mutation Research* 300 (3-4), 165-177.
- **Stresemann, C., B. Brueckner, T. Musch, H. Stopper, y F. Lyko** (2006). Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Research* 66 (5), 2794-2800.
- **Toyota, M., K. J. Kopecky, M.-O. Toyota, K.-W. Jair, C. L. Willman, y J.-P. J. Issa** (2001). Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 97 (9), 2823-2829
- **Viegas-Páquignot, E. y B. Dutrillaux** (1976). Segmentation of human chromosomes induced by 5-ACR (5-azacytidine). *Human Genetics* 34 (3), 247-254.