



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN *IN VITRO* A
PERMETRINA Y MALATIÓN EN LOS
GENES *IGH* Y *MLL***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

PEDRAZA MELÉNDEZ ANGÉLICA ITZEL

ASESOR EXTERNO:

M EN C MARÍA DEL PILAR NAVARRETE MENESES

CO-ASESOR INTERNO:

M EN C BERTHA MOLINA ÁLVAREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto de la exposición in vitro a permetrina y malatión en los genes IGH y MLL.

Que presenta la pasante: Angélica Itzel Pedraza Meléndez

Con número de cuenta: 412012703 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	M. en C. Bertha Molina Alvarez	
SECRETARIO	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco los apoyos económicos que hicieron posible la realización de este trabajo:

Fondo Sectorial de Investigación para la Educación

SEP-CONACYTCB-2012-01/183467

Fondos Federales 2013 del Instituto Nacional de Pediatría (2013/001)

Fundación Miguel Alemán 2012

Beca de tesis de licenciatura y posgrado primera promoción 2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los miembros del Instituto Nacional de Pediatría que participaron en el desarrollo de este trabajo:

Al departamento de Investigación en Genética Humana, en especial al Laboratorio de Genética y Cáncer, en donde se realizó este trabajo.

A mi asesora M en C María del Pilar Navarrete Meneses que me permitió participar en su proyecto, por ser una gran maestra, los consejos y la amistad que me brindó a lo largo de este proceso.

A mi co-asesora M en C Bertha Molina Álvarez por su asesoría y apoyo durante este camino.

A la Dra. Patricia Pérez Vera por aceptarme en su laboratorio, por todo lo que me enseñó y la orientación que me brindó cuando llegué.

A la Dra. Consuelo Salas Labadía que me apoyó cuando fue necesario, a resolver dudas y darme consejos que fueron de mucha ayuda.

También quiero agradecer al resto de los miembros del laboratorio de Genética y Cáncer: Dafné, Vero, Chío, Adri, Meche, Daniel, Juan Carlos y Alex, por el apoyo que me brindaron.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar este trabajo a todas las personas que me apoyaron durante este largo proceso:

Principalmente a mis papás Mario y Angélica que, gracias a su ejemplo, confianza y apoyo incondicional he podido lograr mis metas.

A mis hermanos Ivonne y Mario Alberto que, aunque a veces son un poco molestos me han ayudado en todo lo que he necesitado.

A mis abuelitos por sus consejos y palabras de aliento.

A mis tías Julia, Lety y Araceli, que me han dado alojamiento y me han ayudado cuando lo he necesitado.

Al resto de mi familia por apoyarme.

A mis amigas de la universidad Kari, Sandi y Marisol, con quienes compartí muy buenos momentos y aprendí muchas cosas.

ÍNDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	3
1. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	3
2. Gen <i>MLL</i> (<i>Mixed Lineage Leukemia</i>) en LLA	7
3. Gen <i>IGH</i> (<i>Immunoglobulin Heavy Locus</i>) en LLA	12
4. Generalidades de los plaguicidas	15
4.1 Asociación entre la exposición a plaguicidas y desarrollo de leucemia	18
III. Justificación	22
IV. Objetivo	24
V. Hipótesis	24
VI. Metodología	25
1. Población de estudio	25
2. Cultivo de linfocitos	25
3. Tratamiento	26
4. Viabilidad	26
5. Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH)	27
6. Criterios de análisis de FISH	29
7. Índice mitótico	30
8. Análisis estadístico	31
VII. Resultados	32
1. Viabilidad	32
1.1 Ensayo de viabilidad por el método de exclusión por azul de tripano	32
1.2 Ensayo de viabilidad por citometría de flujo	33
2. Índice mitótico	34
3. Análisis del gen <i>MLL</i> con FISH	35
4. Análisis del gen <i>IGH</i> con FISH	43
VIII. Discusión	51
1. Viabilidad e índice mitótico	52
2. Análisis del gen <i>MLL</i> con FISH	54
3. Análisis del gen <i>IGH</i> con FISH	60
IX. Conclusiones	66
X. Referencias	68
Anexos	77

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Alteraciones genéticas presentes en LLA	5
FIGURA 2. Representación esquemática del gen y la proteína MLL	9
FIGURA 3. <i>Fusion Partner Genes</i> de <i>MLL</i> presentes en LLA de niños	11
FIGURA 4. Representación esquemática del gen <i>IGH</i>	13
FIGURA 5. Estructura química de la permetrina	17
FIGURA 6. Fórmula estructural del malatión	18
FIGURA 7. Diseño de la sonda de FISH para el gen <i>IGH</i> (VYSIS)	28
FIGURA 8. Diseño de la sonda de FISH para el gen <i>MLL</i> (VYSIS)	28
FIGURA 9. Viabilidad evaluada con el método de exclusión por azul de tripano	33
FIGURA 10. Viabilidad evaluada por citometría de flujo	34
FIGURA 11. Índice mitótico	35
FIGURA 12. Células totales con alteraciones en <i>MLL</i> (numéricas+estructurales)	37
FIGURA 13. Células con alteración en el número de copias de <i>MLL</i>	38
FIGURA 14. Células con alteraciones estructurales en <i>MLL</i>	39
FIGURA 15. Patrones de alteraciones en el gen <i>MLL</i> en células en interfase	41
FIGURA 16. Patrones de alteraciones en el gen <i>MLL</i> en metafase	42
FIGURA 17. Células en metafase con alteraciones en <i>MLL</i>	43
FIGURA 18. Células totales con alteraciones en <i>IGH</i> (numéricas+estructurales)	45
FIGURA 19. Células con alteración en el número de copias de <i>IGH</i>	46
FIGURA 20. Células con alteraciones estructurales en <i>IGH</i>	47
FIGURA 21. Patrones de alteraciones en el gen <i>IGH</i> en células en interfase	48
FIGURA 22. Patrones de alteraciones en el gen <i>IGH</i> en metafase	49
FIGURA 23. Células en metafase con alteraciones en <i>IGH</i>	50

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Número de células sin alteración, con alteraciones numéricas y estructurales en el gen <i>MLL</i> , detectado en cada condición de tratamiento.	36
TABLA 2 Número de células sin alteración, con alteraciones numéricas y estructurales en el gen <i>IGH</i> , detectado en cada condición de tratamiento.	44

ABREVIATURAS

BCR. *Breakpoint Cluster Region*

DMSO. Dimetilsulfóxido

EPA. *Environmental Protection Agency*

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FISH. Hibridación *in situ* con fluorescencia

FPGs. Fusion Partner Genes

IARC. Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

IGH. *Immunoglobulin Heavy Locus*

LLA. Leucemia Linfobástica Aguda

LLA-B. Leucemia Linfoblástica Aguda de células B

LLA-T. Leucemia Linfoblástica Aguda de células T

LMA. Leucemia Mieloide Aguda

MLL. *Mixed Lineage Leukemia*

NHEJ. Unión de extremos no homólogos

OMS. Organización Mundial de la Salud

Ph. Cromosoma Filadelfia

RE. Receptores estrogénicos

TCR. Receptor de células

I. RESUMEN

Introducción: La Leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más común en niños y adolescentes menores de 15 años. Es un desorden maligno de células progenitoras linfoides, que se origina a partir de alteraciones en ciertos genes que llevan a las células progenitoras linfoides a la transformación leucémica. Los genes *IGH* y *MLL* se encuentran dentro de los más frecuentemente alterados en LLA y en otros tipos de cáncer hematopoyético. La LLA es una enfermedad multifactorial que se ha asociado con la exposición a ciertos factores ambientales, como los plaguicidas. En estudios epidemiológicos se ha sugerido una asociación entre la exposición a plaguicidas y el desarrollo de cáncer hematopoyético, sin embargo, hace falta evidencia experimental que demuestre si estos agentes puedan inducir daños genes asociados directamente con el desarrollo de cáncer hematopoyético, como *IGH* y *MLL*. **Objetivo:** Analizar *in vitro* si la exposición continua a bajas concentraciones de permetrina y malatión induce alteraciones en los genes *IGH* y *MLL* en linfocitos humanos por medio de hibridación *in situ* con fluorescencia, para determinar su capacidad de inducir daño en genes asociados a cáncer hematopoyético. **Metodología:** A partir de sangre periférica de dos donadores sanos, se separaron células mononucleares y se realizaron por triplicado cultivos que se expusieron a los agentes a estudiar. Se incluyeron 6 condiciones de exposición: sin tratamiento, 0.4% dimetilsulfóxido (DMSO), 0.1 μM permetrina, 0.2% etanol, 0.1 μM malatión y 1 μM etopósido. Los agentes se administraron a las 0, 24 y 48 h, al transcurrir las 72 h se realizó una prueba de viabilidad con azul de tripano y citometría de flujo con 7AAD, y se llevó a cabo la cosecha. Posteriormente se realizó la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para el análisis de los genes *IGH* y *MLL*. **Resultados/Discusión:** Se observó daño a nivel numérico y estructural en los genes *IGH* y *MLL* inducido por concentraciones bajas de permetrina y malatión. Se observó afectada levemente la viabilidad celular, pero no se alteró significativamente el índice mitótico. Ambos plaguicidas causaron daño estructural significativo en *IGH* y *MLL*. Sin embargo, se encontró mayor daño estructural en el

gen *MLL* por la exposición a malatión, y mayor daño estructural en el gen *IGH* por la exposición a permetrina. Así mismo se observó una mayor variación en el número de copias en el gen *IGH* por la exposición a permetrina. Adicionalmente se encontraron una mayor cantidad de metafases con alteración en el gen *IGH* por la exposición a permetrina. **Conclusiones:** Se observó *in vitro* que la exposición continua a bajas concentraciones de los insecticidas permetrina y malatión, induce daño en los genes *IGH* y *MLL* en linfocitos de sangre periférica. Los rearrreglos identificados en estos genes fueron detectados en células en interfase, así como en células en metafase, sugiriendo que las células son capaces de proliferar a pesar de portar daño en genes que potencialmente conducen al desarrollo de cáncer hematopoyético.

II. INTRODUCCIÓN

1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)

En 2012, en la región de América Latina y el Caribe, aproximadamente 29 mil niños y adolescentes menores a 15 años fueron diagnosticados con cáncer, siendo la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) el tipo más común ¹. En México, en el 2015 se reportaron 2,038 casos de leucemia en niños y adolescentes, representando el 59.4% de todas las enfermedades malignas. En ese año la incidencia de pacientes con LLA fue de 79.8/1,000,000 de niños de 0 a 18 años, siendo la más común ². Por lo que esta enfermedad es considerada como un problema de salud.

La LLA es un desorden maligno de células progenitoras linfoides, que proliferan de forma descontrolada y alteran la hematopoyesis normal, por lo que se observa un aumento de los linfocitos inmaduros en la médula ósea ³. La LLA se clasifica de acuerdo al linaje celular afectado, en LLA de precursores B y en LLA de precursores T. En niños, la frecuencia de las LLA-B (80%) es mucho mayor a la de las LLA-T ⁴.

Las causas de la LLA no han sido completamente elucidadas, ya que se trata de una enfermedad multifactorial ⁵. Aproximadamente el 5% de los casos de LLA se asocian con la presencia de síndromes genéticos, tales como el síndrome de Down, el síndrome de Bloom y la anemia de Fanconi, éstos dos últimos caracterizados por presentar fragilidad cromosómica ^{3,6}. Estudios de asociación del genoma completo

(*Genomewide*) han identificado variantes polimórficas en genes como *ARID5B*, *CEBPE*, *GATA3*, *IKZF1*, que están asociadas con un incremento en el riesgo de desarrollar LLA ⁷. El factor hereditario es raro, sólo juega un papel pequeño sobre el origen de este padecimiento, un ejemplo son las mutaciones germinales raras en genes como *PAX5* y *ETV6* ⁶.

Se han asociado algunos factores ambientales, como la exposición a radiación ionizante, con un mayor riesgo de presentar LLA ⁸. Otro factor ambiental asociado es la exposición ocupacional y no ocupacional a plaguicidas, solventes y otros productos químicos ^{9,10}. En diversos estudios epidemiológicos se ha encontrado una asociación entre estos factores y el desarrollo de cáncer ¹¹⁻¹³. Adicionalmente, fármacos como la fenitoína y algunos quimioterapéuticos como el etopósido, se han visto implicados en el desarrollo de algunos tipos de cáncer ^{14,15}. Los agentes relacionados con el desarrollo de leucemia son diversos, sin embargo, la mayoría de estos carecen de evidencia biológica suficiente que sustente el efecto de estos agentes sobre las células hematopoyéticas y el desarrollo de la LLA.

Se sabe que la LLA se origina a partir de alteraciones genéticas que llevan a las células progenitoras linfoides T o B a la transformación leucémica ³ (**FIGURA 1**). Estas alteraciones genéticas incluyen cambios cromosómicos numéricos como la aneuploidía, así como rearrreglos cromosómicos estructurales como las translocaciones, que conducen a la desregulación de la expresión génica o llevan a

la formación de proteínas quiméricas ¹⁶. Muchas de estas alteraciones están asociadas significativamente con el pronóstico de la LLA, y se utilizan en la estratificación del riesgo de los pacientes. Por ejemplo, la hiperdiploidía alta y reordenamiento *ETV6-RUNX1*, se asocian con un resultado favorable, mientras que la baja hipodiploidía y reordenamiento del gen *MLL* están asociados con un mal pronóstico en niños y adultos ¹⁷.

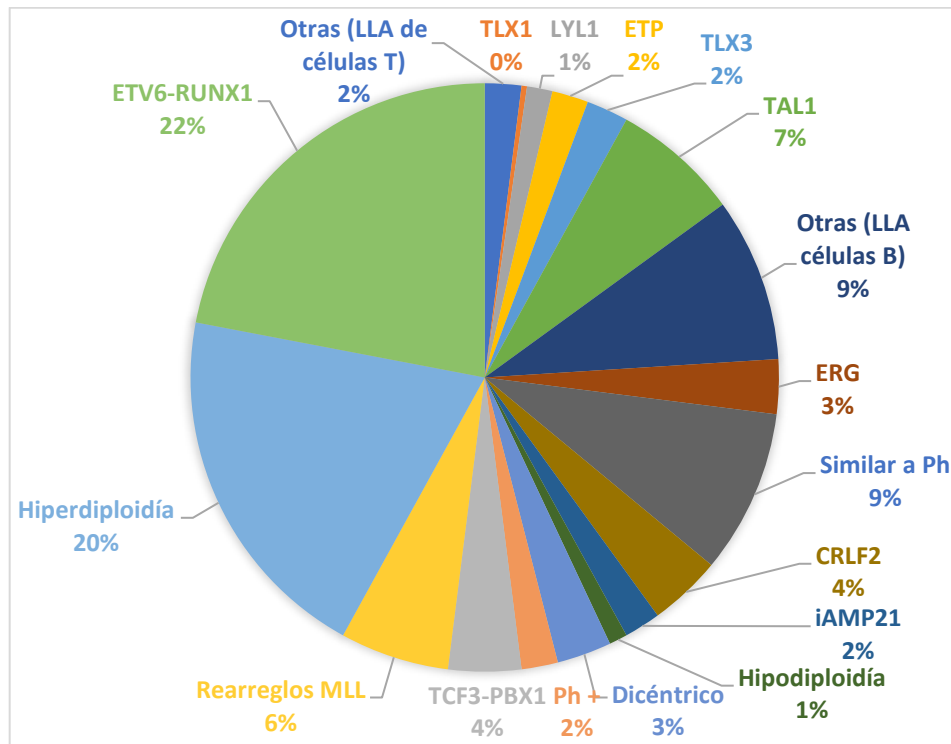


FIGURA 1. Alteraciones genéticas presentes en la LLA ¹⁷. * Ph+= Cromosoma Filadelfia

En la LLA-B, alteraciones numéricas como la hiperdiploidía alta con más de 50 cromosomas se presenta en el 20-30% de los casos, en los que se observa la ganancia no aleatoria de al menos cinco cromosomas (frecuentemente X, 4, 6, 10,

14, 17, 18, y 21). La hipodiploidía con menos de 44 cromosomas, se encuentra en aproximadamente el 1-3% de los casos. Por otro lado, las alteraciones estructurales como las translocaciones cromosómicas y rearrreglos intracromosómicos, se presentan en el 75% de los casos. Estas alteraciones se han sugerido como los posibles eventos iniciadores de la leucemogénesis ^{18,19}.

Existen dos clases funcionales de translocaciones cromosómicas, la primera clase reubica a ciertos oncogenes en regiones reguladoras de genes transcritos activamente, causando una desregulación de la expresión ¹⁶. Algunos ejemplos son los genes *C-MYC*, *CRLF2* (*cytokine receptor-like factor 2*) y *EPOR* (*erythropoietin receptor*), los cuales se rearrreglan quedando bajo el control del potenciador del gen *IGH*, alterando su nivel de expresión en LLA-B. Otro ejemplo es la yuxtaposición de factores de transcripción *TLX1* y *TLX3* con el loci del receptor de células T (TCR) en LLA de células T. La segunda clase de translocaciones conduce al rearrreglo de dos genes que fusionados codifican para una proteína quimérica. Ejemplos de esta clase incluyen la translocación t(12;21)(p13;q22), que lleva a la fusión de dos factores de transcripción hematopoyéticos (*ETV6-RUNX1*), esta alteración es observada en el 25% de niños con LLA-B. Otros ejemplos relevantes son la translocación t(9;22)(q34;q11), que resulta en el cromosoma Filadelfia (Ph), que codifica a *BCR-ABL1*, una tirosina cinasa activa; así como los rearrreglos que involucran a la gen *Mixed lineage leukemia* (*MLL*, *KMT2A*), que se fusiona con múltiples genes creando proteínas quiméricas que conducen a la transformación leucémica ¹⁶⁻¹⁸.

Las explicaciones posibles para la recurrencia de ciertos puntos de ruptura en genes y sitios específicos en leucemia son: 1) que los propios BCR (*Breakpoint Cluster Regions*) son especialmente vulnerables a rupturas, 2) que las rupturas y translocaciones ocurren aleatoriamente en todo genoma, y sólo aquellos que dan una ventaja clonal conducen a la enfermedad ²⁰. Los rearrreglos cromosómicos conducen a la interrupción de genes que regulan la hematopoyesis normal y el desarrollo linfoide, a través del silenciamiento de genes supresores de tumor, o a la activación de oncogenes ¹⁷. En LLA-B uno de los genes que con frecuencia se encuentra alterado es el gen *MLL*, especialmente en niños; el cual está asociado con mal pronóstico. Otro gen de importancia es *IGH*, ya que rearrreglos que involucran a este gen contribuyen al desarrollo de la leucemia.

2. GEN *MLL* (*MIXED LINEAGE LEUKEMIA*) EN LLA

El gen *Mixed Lineage Leukemia* (*MLL* ó *KMT2A*), se ubica en la región cromosómica 11q23, y es un blanco frecuente de translocaciones cromosómicas y rearrreglos génicos en leucemia infantil y leucemia inducida por tratamiento quimioterapéutico en adultos. Las translocaciones cromosómicas que involucran 11q23 dan como resultado la fusión del gen *MLL* con diferentes genes asociados, dando lugar a la producción de nuevas proteínas quiméricas ²¹.

El gen *MLL* humano consta de 37 exones y codifica un coactivador transcripcional que tiene un rol esencial en la regulación de la expresión génica durante el

desarrollo temprano y la hematopoyesis (**FIGURA 2**). La proteína nuclear resultante es de 3,969 aminoácidos y se procesa por la endopeptidasa Taspasa 1 en dos fragmentos, MLL-C de 180 kDa y MLL-N de 320 kDa. Los dos fragmentos de proteína resultantes se ensamblan en complejos multiproteicos que regulan la transcripción de genes blanco-específicos, incluyendo varios de los genes homeóticos *HOX*. La función de MLL no sólo es crucial para el mantenimiento de células troncales y procesos del desarrollo, sino también para las células diferenciadas, porque el complejo MLL mantiene la "memoria de la transcripción" y por lo tanto garantiza la "identidad de tejido" ^{22,23}.

La proteína MLL tiene múltiples dominios conservados con funciones implicadas en la regulación transcripcional mediada por cromatina (**FIGURA 2**). Los dominios incluyen: a) tres asas AT de unión a DNA, b) un dominio rico en cisteína CXXC con homología a DNA metiltransferasas (DNMT), que permite la unión selectiva a islas CpG no metiladas y es esencial para el reconocimiento de genes blanco, c) cuatro dominios PHD (*plant homeodomain*), los cuales median interacciones entre proteínas, d) un bromo dominio (BD), que reconoce residuos de lisina acetilados, e) un dominio de transactivación (TAD), que recluta al coactivador CBP (*CREB binding protein*), f) un motivo Win de interacción con WDR5, que facilita la formación del complejo MLL, g) un dominio SET carboxi terminal altamente conservado, que tiene actividad metiltransferasa, h) dos dominios ricos en fenilalanina y tirosina, uno amino terminal FYRN y otro carboxi terminal FYRC, estos permiten la re asociación de los fragmentos MLL-N y MLL-C, formando así un complejo estable ²⁴⁻²⁷ (**FIGURA 2**).

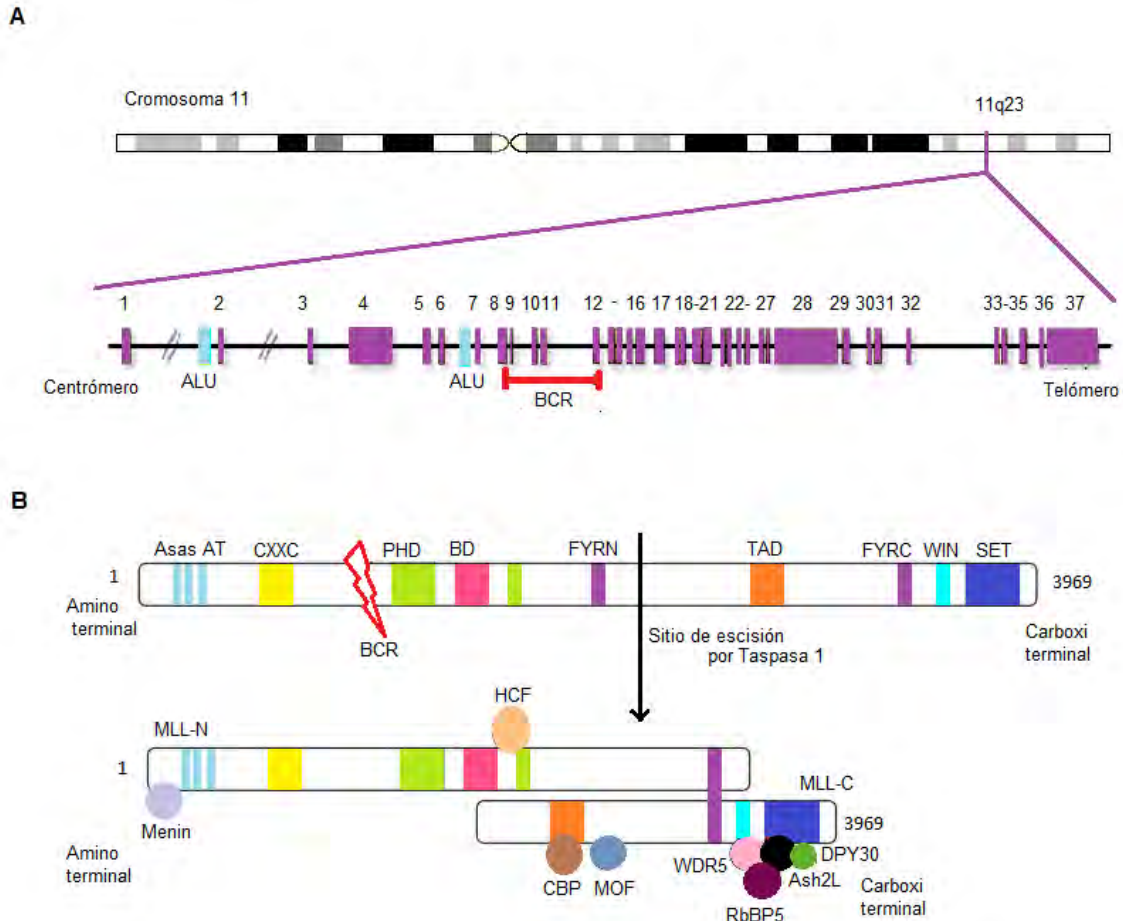


FIGURA 2. Representación esquemática del gen y proteína MLL^{23,26}. A) El gen *MLL* se ubica en el cromosoma 11 en la banda 11q23. Consta de 37 exones y tiene dos secuencias de repetidos ALU. El BCR (color rojo) se encuentra entre los exones 8 y 12. B) La proteína MLL, de 3969 aminoácidos, tiene diversos dominios: tres asas AT (azul), dominio CXXC (amarillo), cuatro dominios PHD (verde), bromo dominio (rosa), un dominio de transactivación (naranja), un motivo Win (acuamarina), un dominio SET carboxi terminal (azul rey), un FYRN y FYRC. (morado). La proteína MLL es procesada por la Taspasa 1 y da lugar a dos fragmentos MLL-N Y MLL-C, los cuales se re asocian por medio de FYRN Y FYRC.

El complejo multiproteico MLL media tanto la metilación de Lys-4 (K4) del complejo histona H3 (H3K4me), así como la acetilación de Lys-16 (K16) de la histona H4 (H4K16ac). Tiene una actividad débil de metiltransferasa por sí misma, y requiere otro componente del complejo MLL1/MLL para obtener la actividad completa de metiltransferasa. También promueve la apoptosis inducida por PPP1R15A, juega un papel crítico en el control de la expresión génica circadiana, y es esencial para

la activación transcripcional mediada por el heterodímero CLOCK-ARNTL/BMAL1²³. La proteína MLL se expresa en células hematopoyéticas progenitoras y troncales y regula la transcripción de genes homeóticos *HOX*, los cuales regulan el desarrollo de tejidos, por lo que esta proteína se encuentra expresada ampliamente en el embrión en desarrollo²⁸.

Las alteraciones en el gen *MLL* son frecuentes en LLA. Se observan aproximadamente en el 6% de los casos totales de LLA, en el 70% de los niños con LLA menores a un año y en el 30% de adultos que desarrollan leucemia secundaria a tratamiento con inhibidores de la DNA topoisomerasa II²⁹. Las alteraciones en el gen *MLL* incluyen deleciones, duplicaciones internas en tándem y fusiones con otros genes; en estas últimas se generan proteínas quiméricas por la interacción con otros genes, denominados *fusion partner genes* (FPGs), reemplazando así los dominios de represión transcripcional y de señalización nuclear ubicados en el extremo N-terminal de la proteína MLL, por los extremos C-terminales de los genes de fusión³⁰. Hasta la fecha, se han reportado más de 80 FPGs de *MLL*.

Se ha postulado que las proteínas de fusión MLL participan en la leucemogénesis mediante el aumento de la expresión de sus genes blanco, incluyendo los genes *HOX*; este mecanismo es crítico para el desarrollo de las leucemias relacionadas con el gen *MLL*. Otro mecanismo descrito para estas proteínas de fusión es el

aumento de la expresión de la tirosina cinasa FLT3, como otro evento que favorece el desarrollo de leucemia ^{30,31}.

Los mecanismos propuestos para explicar la alta incidencia de rearrreglos en *MLL* incluyen la recombinación entre elementos Alu, las rupturas causadas por los inhibidores de la DNA topoisomerasa II, y los errores en la reparación de rupturas de doble cadena por unión de extremos no homólogos (NHEJ) ³². Los puntos de ruptura en *MLL* que se observan en las leucemias de *novo* se concentran en el BCR en la región centromérica, mientras que en las leucemias de infantes y secundarias a tratamiento lo hacen en el BCR en la región telomérica. Los genes de fusión más frecuentes son: *MLL-AF9* por la translocación t(9;11)(p22;q23), *MLL-AF4* por t(4;11)(q21;q23) y *MLL-ENL* por t(11;19)(q23;p13.3); *MLL-AF4* se ve con mayor frecuencia en LLA en niños ^{28,30} (**FIGURA 3**).

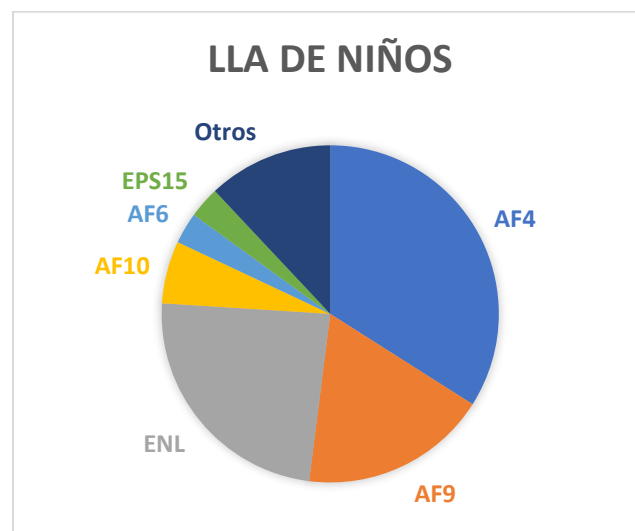


FIGURA 3. *Fusion partner genes* presentes en LLA de niños ²⁸. En niños los más comunes son *AF4*, *ENL* y *AF9*.

Estudios epidemiológicos y genéticos han sugerido que rearrreglos del gen *MLL* pueden resultar de la exposición transplacentaria y no transplacentaria a agentes inhibidores de la DNA topoisomerasa II. Se han descrito diversos agentes capaces de inhibir a esta enzima, por ejemplo los bioflavonoides, metabolitos del benceno, medicamentos como el metamizol, quimioterapéuticos como el etopósido y algunos plaguicidas ^{10,13,33,34}. Se ha sugerido que la exposición a estos agentes puede ocurrir durante el desarrollo embrionario, llevando a la alteración de las células fetales ²⁰. Alteraciones en el gen *MLL* son frecuentes en la LLA neonatal, que se presenta en el primer año de vida, así como en la LLA secundaria al tratamiento quimioterapéutico. El diagnóstico de las LLA con rearrreglo es importante debido a que está asociada a mal pronóstico tanto en niños como adultos. Otro de los genes de gran importancia es *IGH*, ya que translocaciones en este gen están presentes en LLA en adolescentes y adultos jóvenes, así como en otros tipos de cáncer hematopoyético.

3. GEN *IGH* (*Immunoglobulin Heavy Locus*) EN LLA

El gen *Immunoglobulin Heavy Locus* (*IGH*) se ubica en la región cromosómica 14q32 y codifica para las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Las alteraciones en este gen definen una característica genética que es frecuente entre los adolescentes y adultos jóvenes con LLA. Aunque se ha asociado con un resultado adverso en los adultos, no es un factor pronóstico independiente en niños y adolescentes ³⁵. Es importante destacar que ninguna de las translocaciones de *IGH* por si sola es suficiente para la aparición del fenotipo neoplásico, es necesaria

la activación simultánea de oncogenes sinérgicos y la pérdida de funciones de genes supresores de tumores ³⁶.

Las inmunoglobulinas reconocen antígenos extraños e inician respuestas inmunitarias tales como la fagocitosis y el sistema del complemento. Cada molécula de inmunoglobulina consta de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. La región del gen *IGH* representa la organización de la línea germinal del locus de las cadenas pesadas. El locus incluye los segmentos V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante) ³⁷ (**FIGURA 4**). El locus *IGH* contiene 27 *IGHD* genes, 6 *IGHJ* genes, y 38-46 *IGHV* genes funcionales ³⁸.

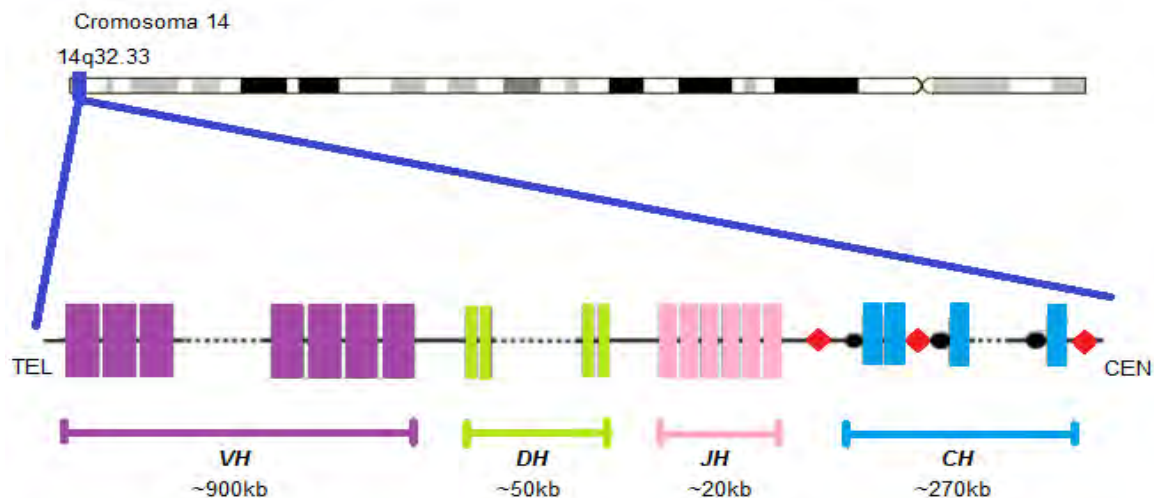


FIGURA 4. Representación esquemática del gen *IGH* ³⁶. El gen *IGH* se localiza en la región telomérica del cromosoma 14, en 14q32.33. Se compone por una región variable *VH* (morado) de aproximadamente 900kb, de diversidad *DH* (verde) de aproximadamente 50kb y de unión *JH* (rosa) de aproximadamente 20kb, estas regiones por medio de recombinación producen una unidad VDJ funcional. La región constante *CH* está representada de color azul y los potenciadores (*enhancers*) de color rojo.

Durante el desarrollo de los linfocitos B, un evento de recombinación a nivel de DNA une a un sólo segmento D con un segmento J; este gen D-J parcialmente reordenado se une entonces a un segmento V. El V-D-J reordenado se transcribe con la región constante IGHM; esta transcripción codifica una cadena pesada mu. Más tarde en el desarrollo de las células B se genera un RNA pre-mensajero V-D-J-C μ -C δ , que por *splicing* codifica una cadena pesada mu o delta. Las células B maduras en los ganglios linfáticos experimentan recombinación, de manera que el gen V-D-J se lleva a proximidad de uno de los genes IGH γ , IGH α o IGH ϵ y cada célula expresa la cadena pesada gamma, alfa o épsilon. La recombinación de muchos segmentos V diferentes con varios segmentos J proporciona una amplia gama de reconocimiento de antígenos ³⁷⁻³⁹.

En general, los rearrreglos en *IGH* se observan en aproximadamente 2% a 3% de todos los casos de LLA-B ^{16,36}. La principal característica de las translocaciones que involucran a *IGH* es la desregulación de un oncogén mediante la yuxtaposición con el potenciador de *IGH* dando como resultado una sobre expresión del oncogén ⁴⁰. En la LLA se observa con frecuencia la translocación t(X;14)(p22;q32) o t(Y;14)(p11;q32) que lleva a la yuxtaposición del gen *CRLF2*, que codifica para el receptor de citocinas tipo II, con el potenciador de *IGH*. El rearrreglo *CRLF2-IGH* es la alteración de *IGH* más frecuente en LLA. Otra alteración común en LLA que involucra a *IGH* es la translocación, t(6;14)(p22;q32), que involucra al factor inhibidor de la transcripción *ID4*. Otras translocaciones que involucran al gen *IGH* son: t(14;19)(q32;q13) (*IGH-CEBPA*), que incluyen a cinco miembros de la familia de

proteínas de unión a potenciador, o *CEBP* (*CCAAT/enhancer binding protein*); t(14;19)(q32;p13) (*IGH-EPOR*), que involucra al gen del receptor de eritropoyetina (*EPOR*) y las translocaciones restantes de *IGH* parecen ser esporádicas e involucran a varios genes más ^{36,40,41}.

Además de los reordenamientos de *IGH*, las deleciones se observan en el 14-21% de los pacientes con mieloma múltiple y en el 13-33% de los pacientes con leucemia linfocítica crónica; se ha sugerido que estas deleciones pueden ocurrir en la región 5' de la región variable ⁴².

Las alteraciones en los genes, *MLL* e *IGH* son de gran relevancia en la etiología de la LLA. Sin embargo, no son exclusivas de esta enfermedad. Rearreglos en *MLL* son frecuentes en otros tipos de leucemia como la Leucemia Mieloide Aguda, y rearreglos en *IGH* son comunes en Linfoma. Se ha sugerido que ciertos agentes ambientales puedan inducir daño en éstos, y otros genes; conduciendo potencialmente al desarrollo de leucemias o linfomas ⁴³⁻⁴⁸. Entre los agentes que se han identificado como potenciales causales de daño en éstos y otros genes, se encuentran los plaguicidas ^{43-45,49,50}.

4 GENERALIDADES DE LOS PLAGUICIDAS

Se le llama plaguicida a cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a controlar una plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas y de

animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal ⁵¹. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima, que cerca de tres millones de personas sufren cada año de envenenamientos agudos y severos por exposición a los plaguicidas, de los cuales unos veinte mil pueden morir. También existen evidencias de la capacidad de algunos plaguicidas de inducir cáncer, así como de los efectos reproductivos y neurológicos nocivos que tienen, los cuales pueden tardar años en manifestarse ⁵².

Anteriormente los plaguicidas más utilizados eran los organoclorados, pero debido al tiempo tan prolongado necesario para eliminarse del organismo y del medio ambiente, así como por los efectos nocivos que causan, han dejado de utilizarse ⁵². Actualmente, dentro de los insecticidas más usados se encuentran los piretroides y los organofosforados, ya que éstos no se bio-acumulan y se consideran menos tóxicos. La permetrina y el malatión pertenecen a estos grupos de insecticidas que actualmente son ampliamente utilizados en múltiples actividades por el humano.

La permetrina (3-fenoxibencil (1*RS*)-*cis,trans*-3-(2,2-diclorovinil)-2,2 dimetil ciclopropano carboxilato) es un plaguicida sintético de amplio espectro perteneciente al grupo químico de los piretroides (**FIGURA 5**), cuyo mecanismo de acción es la neurotoxicidad, alterando los canales de sodio de las membranas de las células nerviosas que regulan la repolarización ⁵³. La permetrina es un piretroide de Tipo I y se usa principalmente para matar y repeler una amplia gama de insectos.

Este plaguicida se usa ampliamente en el sector agropecuario, solo o mezclado con otros insecticidas sintéticos. En varios países además se utiliza como repelente de insectos, para lo cual se recomienda volatilizar este compuesto químico sobre mosquiteros y ropas. Frecuentemente se indica para erradicar parásitos dérmicos como los piojos y los causantes de la escabiasis, y para el control del dengue en combinación con otros plaguicidas ⁵⁴.

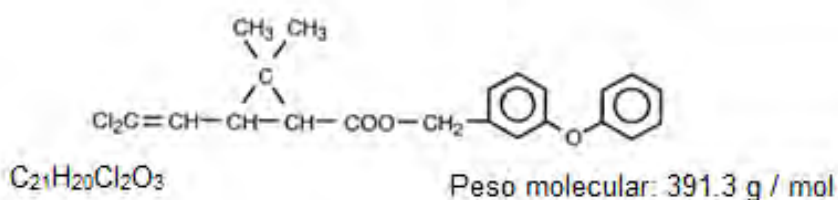
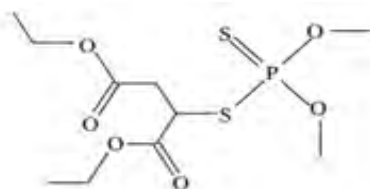


FIGURA 5. Estructura química de la permetrina ⁵³. La permetrina es un piretroide sintético de peso molecular de 391.3 g/mol.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) considera a la permetrina como no clasificable como carcinógeno por falta de evidencia biológica ⁵⁵. Sin embargo, la EPA (*Environmental Protection Agency*) la clasifica en el grupo C, como “posible carcinógeno para el humano” ⁵³. Adicionalmente, estudios epidemiológicos han sugerido que existe una asociación entre la exposición a permetrina con el desarrollo de leucemia, principalmente en niños ¹¹.

Por otro lado, el malatión (2-[(dimetoxifosforotioil)sulfanil]butanodioato de dietilo) (**FIGURA 6**) es un plaguicida organofosforado de amplio espectro, el cual inhibe irreversiblemente a la acetilcolinesterasa, llevando a la acumulación de acetilcolina

y a neurotoxicidad aguda a dosis altas ¹². El malatión es ampliamente utilizado en cosechas agrícolas, en productos almacenados, en jardines domésticos, perímetros de construcción y en diversos productos para el hogar. Además, el malatión se usa para matar pulgas en animales domésticos y para tratar pediculosis en el humano. Se aplica principalmente en aerosoles ^{56,57}.



$C_{10}H_{19}O_6PS_2$

Peso molecular: 330.36g/mol

FIGURA 6. Fórmula estructural del malatión ⁵⁶. El malatión pertenece a los organofosforados y tiene un peso molecular de 330.36g/mol.

Estudios epidemiológicos han sugerido una asociación entre el riesgo de cáncer hematológico, como linfomas y la exposición a éste y otros insecticidas organofosforados ^{12,58}. La IARC, recientemente ha clasificado al malatión en el grupo 2A de “probable carcinógeno para humanos” ⁵⁹.

4.1 ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS Y EL DESARROLLO DE LEUCEMIA

Existen diversos estudios epidemiológicos que sugieren que existe un mayor riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer por la exposición a plaguicidas ¹¹. En meta-análisis se ha planteado que existe una asociación significativamente positiva,

aunque débil, entre la exposición ocupacional a los plaguicidas y todos los cánceres hematopoyéticos ^{11,12}. Sin embargo, en estos estudios no se especificó el tipo de plaguicida involucrado. Adicionalmente, en otro estudio, se encontró que la exposición a plaguicidas piretroides, se asoció con el desarrollo de mieloma múltiple en adultos. Sin embargo, el número de individuos fue muy bajo, por lo que el resultado fue tomado con reserva ⁶⁰. Otro estudio independiente asoció al piretroide permetrina, con el riesgo de desarrollar LLA en niños ⁶¹.

Sin embargo, los estudios epidemiológicos tienen ciertas limitaciones, incluyendo la falta de datos suficientes sobre la exposición, ya que se basan en cuestionarios, por lo que hay una definición poco clara del grado y tipo de exposición ^{11,12,33}. Adicionalmente, aunque existen asociaciones epidemiológicas entre los plaguicidas y el desarrollo de cáncer, son limitados los estudios que demuestren *in vitro* e *in vivo* el papel de los plaguicidas en la inducción de daño en genes involucrados en el desarrollo de cánceres hematopoyéticos, como leucemia y linfoma. Algunos de los estos estudios que han analizado el efecto de los plaguicidas sobre genes asociados a cáncer se mencionan a continuación.

En un reporte de caso se describió un recién nacido con leucemia congénita con rearreglo en el gen *MLL*, cuya madre reportó haber estado expuesta antes y durante el embarazo a permetrina, debido a que padecía aracnofobia. En este estudio se sugirió que la permetrina fue capaz de atravesar la barrera placentaria e inducir

daño en gen *MLL* en el feto en desarrollo. En este mismo trabajo se incluyó un estudio *in vitro* en el que se demostró por *southern blot* que la exposición a 50 µM de permetrina induce ruptura en el gen *MLL* en la línea celular BV173 ⁴³.

En un estudio adicional realizado en población filipina, se analizaron hijos de trabajadores expuestos a propoxur y cipermetrina. Se detectó la presencia de los plaguicidas en el meconio mediante cromatografía de gas, y adicionalmente se buscó en células del cordón umbilical la fusión génica *RUNX1/RUNX1T1*, la cual es característica de la leucemia mieloide aguda (LMA). Los niveles de los plaguicidas detectados en meconio correlacionaron con la presencia de la fusión oncogénica en células de cordón umbilical, por lo que se sugirió que los plaguicidas son capaces de inducir alteraciones genéticas asociadas a leucemia ⁴⁴.

En otro estudio realizado en granjeros expuestos a plaguicidas se caracterizó la translocación t(14;18), que involucra a los genes *IGH* y *BCL2*. Esta translocación es la más común en linfoma folicular. Se encontró que la exposición a plaguicidas está asociada con el incremento de translocaciones encontradas en los granjeros, y el tiempo de exposición también resultó ser un factor importante que conlleva al desarrollo de cáncer ⁴⁹.

Por otro lado, se reportó en un estudio *in vitro* que la exposición a permetrina y malatión induce daño estructural y numérico en los genes *IGH* y *MLL* de linfocitos

de sangre periférica de individuos sanos. En este trabajo se estudió el efecto de una exposición aguda a los plaguicidas (200 μ M, 24h) ⁴⁶. Sin embargo, no se estudió el efecto de la exposición a concentraciones bajas y continuas de estos plaguicidas. En un estudio independiente, se analizó *in vitro* el efecto leucemogénico de clorpirifós, otro organofosforado, en células troncales y progenitoras hematopoyéticas (CD34+) de hígado fetal humano. Se encontró que la exposición a 10 μ M de clorpirifós induce disminución de la viabilidad, inhibición de la proliferación, así como rupturas de doble cadena del DNA y rearrreglos en el gen *MLL* ⁴⁵.

Adicionalmente, se ha evaluado en estudios *in vitro* la genotoxicidad del malatión y la permetrina, y se ha sugerido que son capaces de inducir aberraciones cromosómicas, micronúcleos, intercambio de cromáticas hermanas y daño al DNA (ensayo cometa) ⁶²⁻⁶⁸. Sin embargo, entre los diferentes estudios se han llegado a encontrar resultados no concordantes, por lo que se han considerado no completamente concluyentes. Por otro lado, son pocos los estudios enfocados en genes específicos involucrados en el desarrollo de la leucemia, esto resulta importante para poder establecer si la exposición a plaguicidas está involucrada en la etiología de la LLA.

III. JUSTIFICACIÓN

La potencial exposición de niños y adultos a insecticidas como permetrina y malatión ha causado preocupación, ya que se ha sugerido a nivel epidemiológico que estos compuestos están asociados con el desarrollo de leucemias y linfomas ^{11-13,33,60,61}. En estudios que han evaluado la genotoxicidad de estos agentes, se ha sugerido que inducen aberraciones cromosómicas, micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas, así como daño al DNA (ensayo cometa) ⁶²⁻⁶⁸. Sin embargo, se considera que la información obtenida no es suficiente ya que en algunos estudios se han obtenido resultados contradictorios y por lo tanto se consideran no concluyentes; por lo que hacen falta estudios adicionales.

Adicionalmente, son muy escasos los estudios que han analizado si estos insecticidas son capaces de inducir daño específico en ciertos genes, asociados a cáncer hematopoyético. Por lo que resulta muy relevante realizar una investigación que determine si insecticidas de amplio uso, como la permetrina y el malatión son capaces de inducir daño en genes asociados a cáncer hematopoyético, como *IGH* y *MLL*. En el Laboratorio de Genética y Cáncer del Instituto Nacional de Pediatría, recientemente en un estudio se ha encontrado que ambos insecticidas causan daño en genes relacionados con la LLA en linfocitos de sangre periférica, esto se ha observado con una exposición aguda (24h) y a concentraciones altas (200 µM) ⁴⁶. Sin embargo, resulta importante investigar el efecto en una exposición crónica y a

una concentración biológicamente relevante, como la detectada en individuos expuestos.

En el presente trabajo se evaluó si la exposición continua a concentraciones bajas de permetrina y malatión induce daño en los genes *IGH* y *MLL* de linfocitos de sangre periférica de donadores sanos. Se determinó el daño a estos genes mediante la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia.

IV. HIPÓTESIS

Si la exposición continua a bajas concentraciones de permetrina y malatión induce alteraciones en los genes *IGH* y *MLL* en linfocitos humanos, se encontrará un incremento significativo de alteraciones estructurales y/o numéricas en células en interfase y metafase.

V. OBJETIVO

Analizar *in vitro* si la exposición continua a bajas concentraciones de permetrina y malatión induce alteraciones en los genes *IGH* y *MLL* en linfocitos humanos por medio de hibridación *in situ* con fluorescencia, para determinar su capacidad de inducir daño en genes asociados con cáncer hematopoyético.

VI. METODOLOGÍA

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se trabajó a partir de muestras de sangre periférica de dos individuos sanos, no fumadores, de 24 y 30 años de edad que aceptaron participar en el estudio mediante la firma de una carta de consentimiento informado. **(Anexo 1)**

2. CULTIVO DE LINFOCITOS

Se tomaron aproximadamente 40 ml de sangre periférica con heparina como anticoagulante. De esta muestra se realizó una separación de células mononucleares por gradiente de densidad con *Lymphoprep*®. A partir de las células obtenidas se montaron cultivos por triplicado de cada tratamiento con 3.3×10^6 células en 5 ml de medio RPMI 1640 con L-glutamina, y suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% piruvato de sodio, 1% aminoácidos no esenciales y 0.2 ml de fitohemaglutinina. Los cultivos fueron incubados por 72hrs a 37°C y 5% CO₂, y se administraron con el tratamiento correspondiente cada 24hrs comenzando desde las 0hrs. Después de las 72hrs se tomó aproximadamente 0.4×10^6 células para realizar el ensayo de viabilidad por citometría de flujo y 100µl para determinar la viabilidad por exclusión de azul de tripano. El material restante se usó para la cosecha. Se agregó 0.2ml de colchicina por cultivo por 90 min a 37°C, posteriormente se hipotonizaron las células con KCL 0.075M por 20 min a 37°C, y finalmente se fijaron con metanol y ácido acético glacial en proporciones 3:1. Con

las células en interfase y metafase fijadas se realizó la preparación de las laminillas por goteo y con vapor de agua.

3. TRATAMIENTO

Los cultivos fueron expuestos a permetrina (SIGMA 98.3% pureza) y malatión (SIGMA 98.6% pureza) al inicio del cultivo (0h) y cada 24h por 72 horas a concentraciones de 0.1µM. Así mismo se incluyeron DMSO al 0.4% (SIGMA) y etanol al 0.2% (MERCK) como controles negativos, ya que se utilizaron para disolver la permetrina y el malatión, respectivamente. También se incluyeron cultivos sin tratamiento. Como control positivo se utilizó etopósido a concentración de 1 µM. Los controles se aplicaron en los mismos tiempos en los que se aplicaron los insecticidas (0, 24 y 48h). Las concentraciones utilizadas se escogieron con base en lo reportado en la literatura ⁶²⁻⁶⁸ y lo encontrado en individuos expuestos ^{54,58,69-71}.

4. VIABILIDAD

La viabilidad fue evaluada a las 0h y 72h. Se realizó mediante exclusión con azul de tripano así como por citometría de flujo con 7AAD. Para la determinación con azul de tripano se tomaron 5µl de la muestra y 45µl de azul de tripano, y se contaron 100 células, de las cuales se consideraron como muertas aquellas que se observan teñidas de color azul y vivas aquellas que permanecieron sin color. Mientras que para determinar la viabilidad por el ensayo de citometría de flujo se tomaron 0.4×10^6

células por cada tratamiento y se realizó un lavado con FACS Buffer. Las células se resuspendieron en 50µL FACS buffer y se les agregó 5µL de 7AAD. Posteriormente se analizaron en el citómetro de flujo FACSAria usando el software FACSDiva. Los datos se analizaron con el software FlowJo.

5. HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)

Esta técnica permite detectar secuencias únicas de DNA, regiones cromosómicas o incluso cromosomas completos en preparaciones citológicas. La hibridación se realiza usando sondas marcadas con fluorocromos complementarias a la secuencia de interés ^{72,73}.

El uso de esta técnica permite la detección de alteraciones numéricas (alteración en el número de copias) y estructurales (rupturas y rearrreglos) tanto en metafase como interfase, por lo que es una buena opción para analizar el daño que pueden causar agentes como los plaguicidas sobre genes específicos.

Con las laminillas previamente elaboradas se realizó la hibridación con la sonda de ruptura de doble color *IGH* (VYSIS LSI *IGH* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe), que está diseñada para detectar la ruptura del locus de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (*IGH*) en 14q32. Esta sonda consta de dos fragmentos, una porción de aproximadamente 827kb de la región *IGHV* marcada con un fluorocromo

de espectro verde y la otra de aproximadamente 282kb que abarca la región IGH 3' que está marcada con un fluorocromo de espectro rojo ⁷⁴ (**Figura 7**).

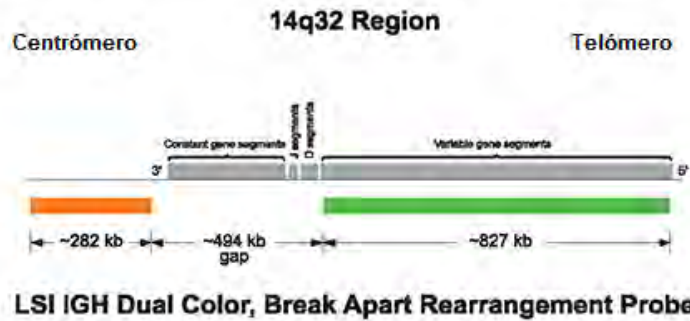


FIGURA 7. Diseño de la sonda Dual Color Break Apart para el gen *IGH* (VYSIS), con la que se realizó el ensayo de FISH ⁷⁴.

También se realizó hibridación con la sonda de ruptura de doble color *MLL* (VYSIS LSI *MLL* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe), la cual está diseñada para detectar reordenamientos en 11q23, que involucran al gen *MLL*. Consiste en una porción centromérica de 384kb de la región BCR marcada con un fluorocromo de espectro verde y la región telomérica de 256kb de la región BCR marcada con un fluorocromo de espectro rojo ⁷⁵ (**Figura 8**).

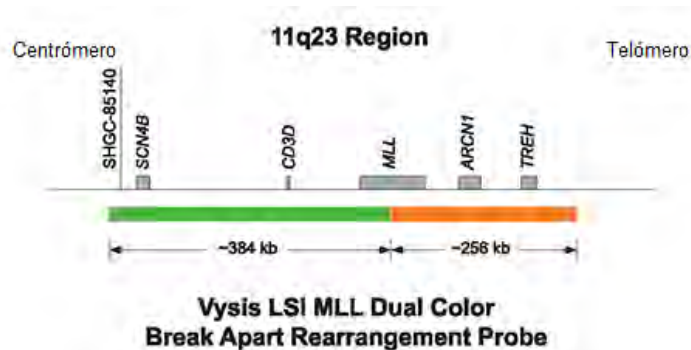


FIGURA 8. Diseño de la sonda Dual Color Break Apart para el gen *MLL* (VYSIS), con la que se realizó el ensayo de FISH ⁷⁵.

Se maduraron las laminillas con solución salina de citratos (2XSSC) durante 30 min a 37°C. Después se realizó una deshidratación con una serie de etanoles al 70%, 85% y 100%, durante 2 min en cada uno, a temperatura ambiente. Para la desnaturalización de la muestra se utilizó formamida al 70% en 2XSSC por 2 min a 72°C, seguido de una deshidratación con una serie de etanoles fríos al 70%, 85% y 100%, durante 2 min cada uno. Las sondas se desnaturalizaron en una mezcla con buffer de hibridación a 72°C por 5 min. La hibridación se llevó a cabo en una cámara húmeda a 37°C por 24hrs en oscuridad. Posteriormente se realizaron 2 lavados, uno con 0.3% NP-40 / 0.4XSSC a 72°C por 40 seg y el segundo con 0.1% NP-40 / 2XSSC a temperatura ambiente por 1 min. Finalmente se realizó una contra tinción con DAPI (2,4-diaminofenilindol) en mezcla con Vectashield (Vector).

6. CRITERIOS DE ANÁLISIS DE FISH

Por cada triplicado de tratamiento de ambos donadores se realizaron hibridaciones para ambos genes (6 repeticiones por condición de tratamiento, 3 de cada donador). Se analizaron 500 núcleos en interfase y 30 metafases, por cada laminilla (6 laminillas por condición de tratamiento). El análisis se realizó en un microscopio Carl Zeiss que cuenta con un filtro de triple color "DAPI/GREEN/ORANGE", así como con los filtros individuales "ORANGE" y "GREEN". Para la adquisición de imágenes se utilizó el programa Isis.

Solamente se consideraron campos que presentaran una hibridación adecuada (mayor al 80%) y homogénea, en el que las células tuvieran una buena morfología y no estuvieran superpuestas. Se consideró que el gen (*MLL* ó *IGH*) no presentaba alteración, cuando se observó una señal de color amarillo, como consecuencia de la colocación de las señales verde y roja, mientras que, se consideró ruptura, si había separación de las señales roja y verde. Se consideraron células normales aquellas que presentaron dos señales amarillas (fusiones de verde y roja), y se registraron como portadoras de ruptura clásica aquellas células con una señal amarilla (alelo normal), una verde y una roja (alelo roto). Se consideró ruptura cuando la señal roja y la verde se encontraron separadas por una distancia mayor al diámetro de una señal. Adicionalmente, se tomaron en cuenta otros patrones de señales anormales, como la alteración en el número de copias. Todos los patrones alterados fueron corroborados mediante filtros individuales. Para el análisis de las 30 metafases, se contabilizaron aquellas que estuvieran completas o no estuvieran muy dispersas y que presentaran una hibridación adecuada.

7. ÍNDICE MITÓTICO

A partir de las laminillas que se usaron para el análisis de FISH se determinó el número de metafases en 100 células analizadas. Se consideraron 4 determinaciones por tratamiento. El índice mitótico se calculó usando la siguiente fórmula: # metafases / # total de células analizadas.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó mediante el software SPSS versión 16.0. Los resultados de los estudios de los genes *IGH* y *MLL* con FISH se analizaron mediante la prueba de U-Mann Whitney de una cola. Se hicieron comparaciones entre los ensayos sin tratamiento y con cada disolvente (sin tratamiento vs DMSO, sin tratamiento vs etanol), así como entre cultivos con disolventes y plaguicidas (DMSO vs permetrina, etanol vs malatión). Se consideró significancia estadística con una $p \leq 0.05$.

VII. RESULTADOS

1. VIABILIDAD

1.1 Ensayo de viabilidad por el método de exclusión por azul de tripano

Se realizó el ensayo de exclusión por azul de tripano a las 0 y 72 h de cultivo, para determinar la viabilidad en los cultivos sin tratamiento, con disolventes y con plaguicidas. Se observó una viabilidad de 100% en la muestra sin tratamiento, seguida de las muestras con los disolventes DMSO ($80\% \pm 1.5$) y etanol ($79\% \pm 9.883$), esta disminución fue estadísticamente significativa (U-Mann Whitney, $p=0.0145$ en ambos). En el caso de los plaguicidas se encontró una disminución mayor en malatión ($72\% \pm 2.944$), seguido de permetrina ($75\% \pm 5.909$) y etopósido ($81\% \pm 5.831$), encontrándose una disminución significativa solo en los cultivos con permetrina y etopósido (U-Mann Whitney, $p=0.014$ en ambos). En todos los casos la viabilidad se mantuvo arriba del 70% (**FIGURA 9**).

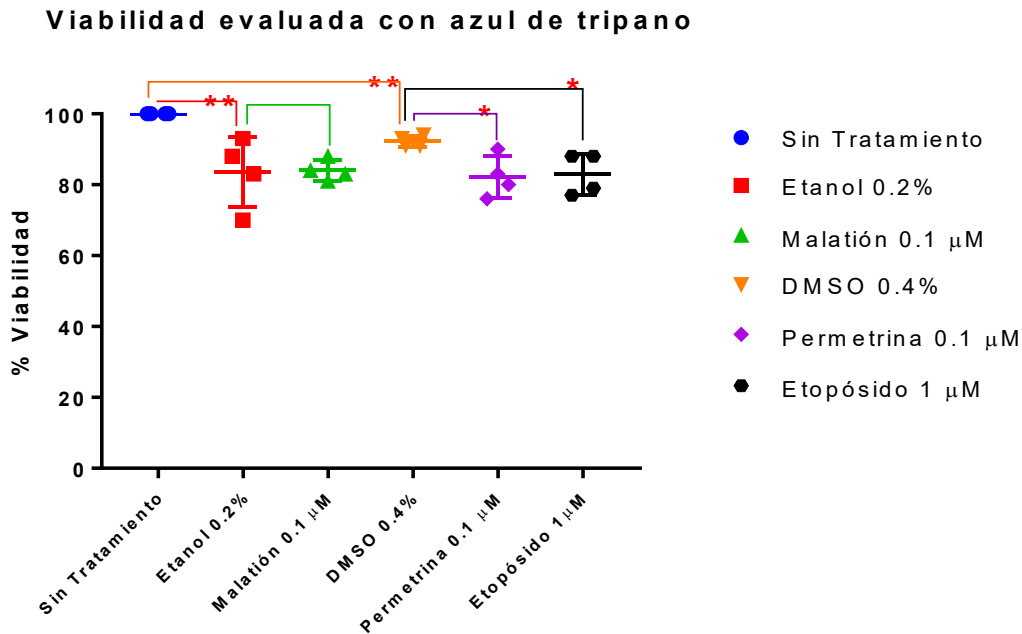


FIGURA 9. Viabilidad evaluada con el método de exclusión por azul de tripano. Viabilidad de los cultivos sin tratamiento, con disolventes y con plaguicidas. Se compararon los ensayos no tratados y los disolventes, así como los disolventes y su agente. U-Mann Whitney, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

1.2 Ensayo de viabilidad por citometría de flujo

Otro método que se utilizó para evaluar la viabilidad de los cultivos fue la citometría de flujo utilizando 7-AAD. Se hicieron determinaciones a las 0 y 72 h de cultivo. Al inicio del cultivo, la viabilidad fue de 100%. En general, se obtuvieron mayores porcentajes de viabilidad en comparación con el método de azul tripano. A las 72 h, en los cultivos tratados con disolventes se observó una viabilidad de $91\% \pm 2.828$ con etanol, y de $94\% \pm 0.707$ con DMSO. En los cultivos con plaguicidas se encontró un porcentaje de viabilidad de $82\% \pm 1.414$ con malatión y de $89\% \pm 0.707$ con permetrina (**FIGURA 10**).

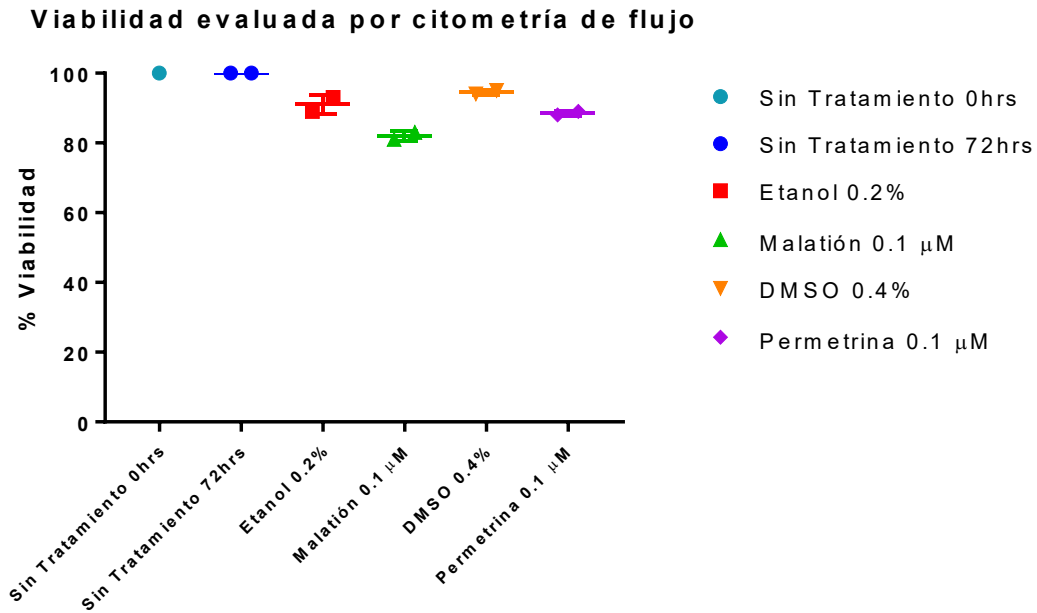


FIGURA 10. Viabilidad evaluada por citometría de flujo. Viabilidad de los cultivos sin tratamiento, con disolventes y con plaguicidas, evaluada a las 0 y 72 h.

2. ÍNDICE MITÓTICO

En los cultivos sin tratamiento se obtuvo el índice mitótico más alto (0.065 ± 0.019), seguido del tratamiento con DMSO (0.053 ± 0.010). En el tratamiento con malatión se obtuvo un valor de 0.050 ± 0.014 , mientras que en el de etanol se obtuvo 0.048 ± 0.015 . El valor más bajo se detectó en cultivos con permetrina (0.045 ± 0.006). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (**FIGURA 11**).

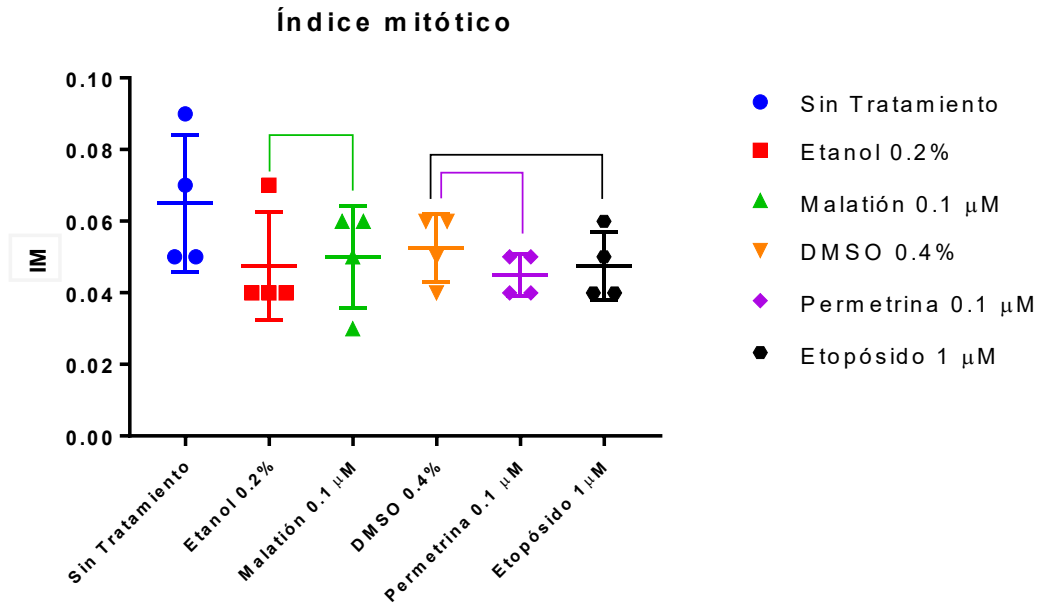


Figura No. 11. Índice mitótico. Índice mitótico de los cultivos no tratados, con disolventes y con plaguicidas.

3. ANÁLISIS DEL GEN *MLL* CON FISH

Para el análisis del gen *MLL* se analizaron 500 células en interfase y 30 metafases. Se realizaron 6 repeticiones por cada una de las condiciones de tratamiento (3 por donador). En la **TABLA 1** se muestran el número de células sin alteración, con alteraciones numéricas y estructurales, así como los patrones de daño, para cada uno de los tratamientos de ambos donadores.

TABLA 1 Número de células sin alteración, con alteraciones numéricas y estructurales en el gen *MLL* detectado en cada condición de tratamiento.

Tratamiento Repetidos	Sin tratamiento							Etanol 0.2%						Malatión 0.1µM						DMSO 0.4%						Permetrina 0.1µM						Etopósido 1µM					
	I	II	III	IV	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	
Células sin alteración	492	496	493	493	496	498	495	493	478	483	494	495	490	476	466	461	487	482	479	479	492	493	494	491	494	472	478	474	484	478	476	484	475	477	485	486	
Promedio	494.7							488.8						475.2						490.5						477.0						481.4					
Alteración numérica																																					
1F	3	1	3	4	1	2	3	4	7	7	4	1	6	7	16	12	5	3	3	6	3	4	3	2	2	14	9	15	7	7	7	4	7	15	3	5	
3F	2	1	1	1	2			1		3		2	2	3	4	3	3	5	2	2	3	1		3	1	3	1	2	6	7	7	3	6	3	3	2	
4F									3								2	6	3						1		1			2	1	1	1		1	1	
5F																										1											
Total de células con alteración numérica	5	2	4	5	3	2	3	5	10	10	4	3	8	10	20	15	10	14	8	8	6	5	3	5	4	17	12	17	13	16	15	8	14	18	7	8	
Promedio	3.4							6.7						12.8						5.2						15.0						11.0					
Alteración estructural																																					
1F,1Famp								1						1																							
1F,1V,1R								2						4						4	1	1	1	2	1	1	2	3	1	1	1	1	2	1	1	1	2
2F,1R	3	1	2	1				1	9	3	1	1	11	5	13	1	1	7	6			1	1	2	3	2	4	1	2	3	2	4	1	2	4		
1F,1V							1					1			1	1						1		3										1			
2F,1V		1	1	1	1		2		1	2			1	2	2	4	1	1	3	6			1	1		1	2		2	2	3	2	2	2	1		
1F,1R											1				2				2		1		1			1	1	2			1	2	3	1	3		
2F,1V,1R										1																	1	2									
3F,1R																		1								1	1								1		
4F,1R																		1																			
2F,2R															1	2														1							
1F,2V,2R										1																											
Total de células con alteración estructural	3	2	3	2	1	0	2	2	12	7	2	2	2	14	14	24	3	4	13	13	2	2	3	4	2	11	10	9	3	6	9	8	11	5	8	6	
Promedio	1.8							4.5						12.0						4.3						8.0						7.6					
Total de células alteradas	8	4	7	7	4	2	5	7	22	17	6	5	10	24	34	39	13	18	21	21	8	7	6	9	6	28	22	26	16	22	24	16	25	23	15	14	
Promedio	5.3							11.2						24.8						9.5						23.0						18.6					
Total analizadas	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	

Se muestra el número de células normales y alteradas de 500 analizadas. Se analizaron seis repeticiones por condición de tratamiento (3 de cada individuo). Los datos sombreados mostraron diferencia significativa (U-Mann Whitney, $p < 0.05$). Se compararon los ensayos no tratados y los disolventes, así como los disolventes y su agente. El color amarillo representa patrones con un evento estructural, el anaranjado con un evento estructural y uno numérico y el rojo dos eventos estructurales y uno numérico. F= Fusión (Señal normal, amarilla) V= Verde (Señal verde) R= Rojo (Señal roja).

En los cultivos sin tratamiento se observó el menor número total de células alteradas (5.3 células de 500 analizadas), que incluye tanto alteraciones numéricas (alteración en el número de copias) como estructurales. En el caso de los disolventes, se encontró un aumento significativo del número total de células alteradas (etanol $p=0.036$, DMSO $p=0.036$), en comparación con los no tratados. El tratamiento en el que se detectó el mayor número total de células con alteraciones (numéricas + estructurales) fue el tratado con malatión (24.8 células de 500 analizadas), seguido del tratado con permetrina (23.0 células de 500 analizadas), y etopósido (18.6 células de 500 analizadas), este aumento fue significativo (malatión $p=0.013$, permetrina $p=0.002$, etopósido $p=0.015$) (**FIGURA 12**).

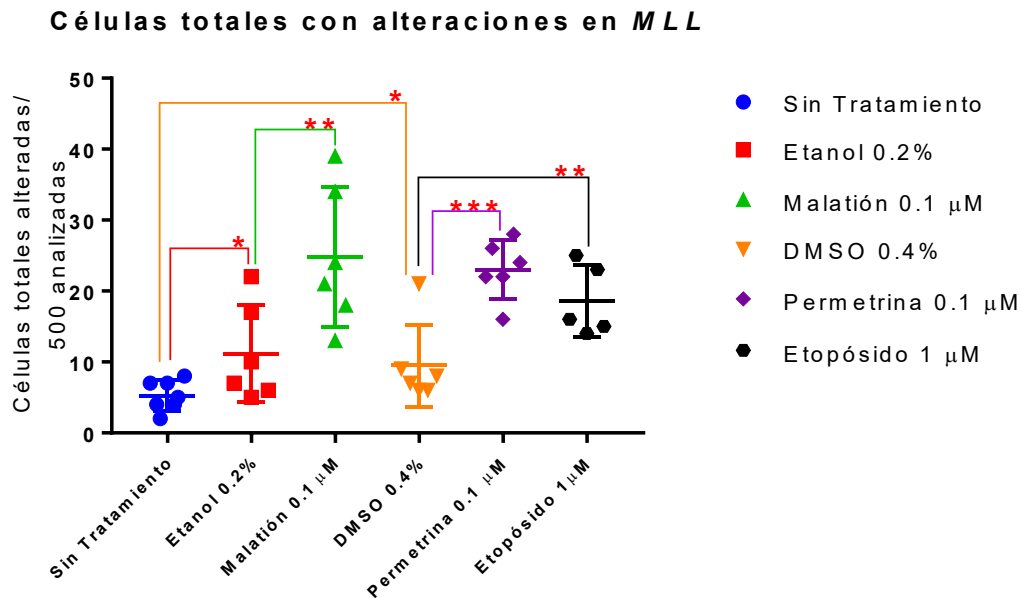


FIGURA 12. Células totales con alteraciones en *MLL* (numéricas + estructurales). Células totales alteradas (alteraciones numéricas más estructurales) en los cultivos tratados con insecticidas o disolventes. Se compararon los ensayos no tratados y los disolventes, así como los disolventes y su agente. U-Mann Whitney, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$

Se analizó por separado el tipo de alteración, dividiendo alteraciones numéricas de estructurales. Dentro de las alteraciones numéricas, el tratamiento en el que se detectó mayor número de células alteradas fue permetrina (15 células de 500 analizadas), seguido del tratamiento con malatión (12.8 células de 500 analizadas), y etopósido (11 células de 500 analizadas). El patrón de señales más común en los cultivos fue en el que se encontró una sola señal amarilla (“1F” una fusión), que se observó hasta 16 veces en un cultivo expuesto a malatión (**FIGURA 15**). Se encontró un número significativamente mayor de células con alteración en el número de copias en los cultivos expuestos a plaguicidas en comparación con los disolventes (permetrina $p=0.001$, malatión $p=0.013$). Sin embargo, también se encontró que los cultivos tratados con disolventes tuvieron un aumento significativo en la cantidad de células con alteraciones numéricas, con respecto al control no tratado (etanol $p=0.025$, DMSO $p=0.037$) (**FIGURA 13**).

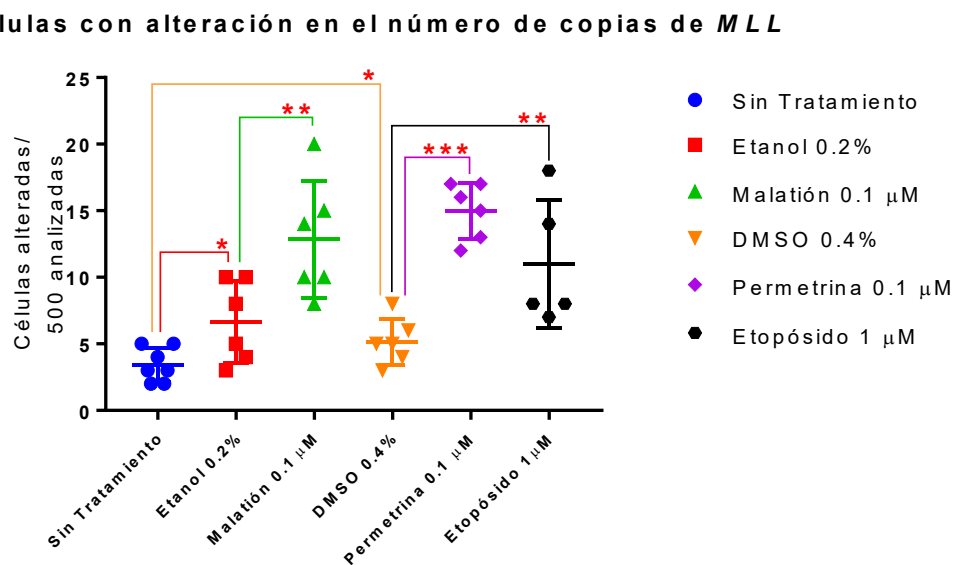


FIGURA 13. Células con alteración en el número de copias de *MLL*. Células con alteraciones numéricas (1F, 3F, 4F, 5F) en los cultivos tratados con insecticidas y disolventes. Se compararon los ensayos no tratados y los disolventes, así como los disolventes y su agente. U-Mann Whitney, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$

En cuanto a las alteraciones estructurales, no se encontraron diferencias significativas entre los disolventes (etanol y DMSO) y el control sin tratamiento. Se detectó el mayor número de células con alteración estructural en cultivos expuestos a malatión (12.8 células de 500 analizadas), elevándose significativamente en comparación con su disolvente ($p=0.013$). En los casos de permetrina y etopósido el número fue similar, 8 y 7.6 respectivamente, y de igual forma al ser comparadas con su disolvente DMSO se encontró que el incremento fue significativo (permetrina $p=0.047$, etopósido $p=0.041$, respectivamente) (**FIGURA 14**). Se encontró una alta variedad de diferentes patrones de fluorescencia, reflejando que además de la ruptura clásica, en la que se observa la señal roja y verde por separado, ocurrieron una serie de combinaciones de daño, sugerido por la detección de rearrreglos más complejos y que implicaron más de un evento. Algunos de los patrones encontrados se muestran en la **FIGURA 15**. Se observó una mayor diversidad en los patrones de daño de los cultivos expuestos a permetrina y malatión (**TABLA 1**).

Células con alteraciones estructurales en *MLL*

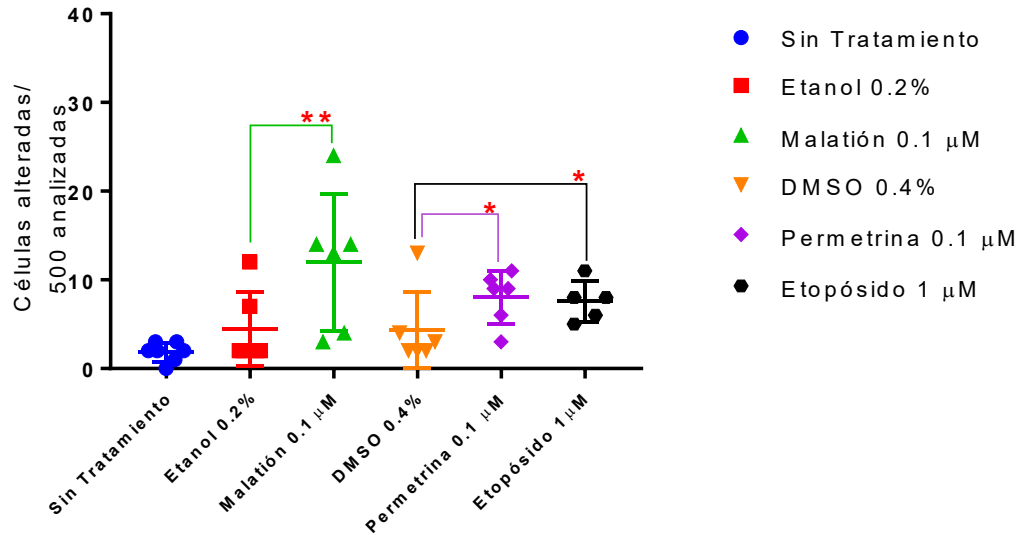


FIGURA 14. Células con alteraciones estructurales en *MLL*. Células con alteraciones estructurales en los cultivos tratados con insecticidas y disolventes. Se compararon los ensayos no tratados y los disolventes, así como los disolventes y su agente. U-Mann Whitney, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

La clasificación de los patrones de fluorescencia de acuerdo a la complejidad del daño se muestra en la **TABLA 1**, en donde la sección de color amarillo abarca los rearrreglos que implicaron un solo evento estructural, en el de color naranja se encuentran los que involucraron un evento estructural y un evento numérico, y en el rojo un evento numérico y dos eventos estructurales. De acuerdo con esto, las células expuestas a malatión presentaron un mayor número de rearrreglos con un evento estructural (**TABLA 1**).

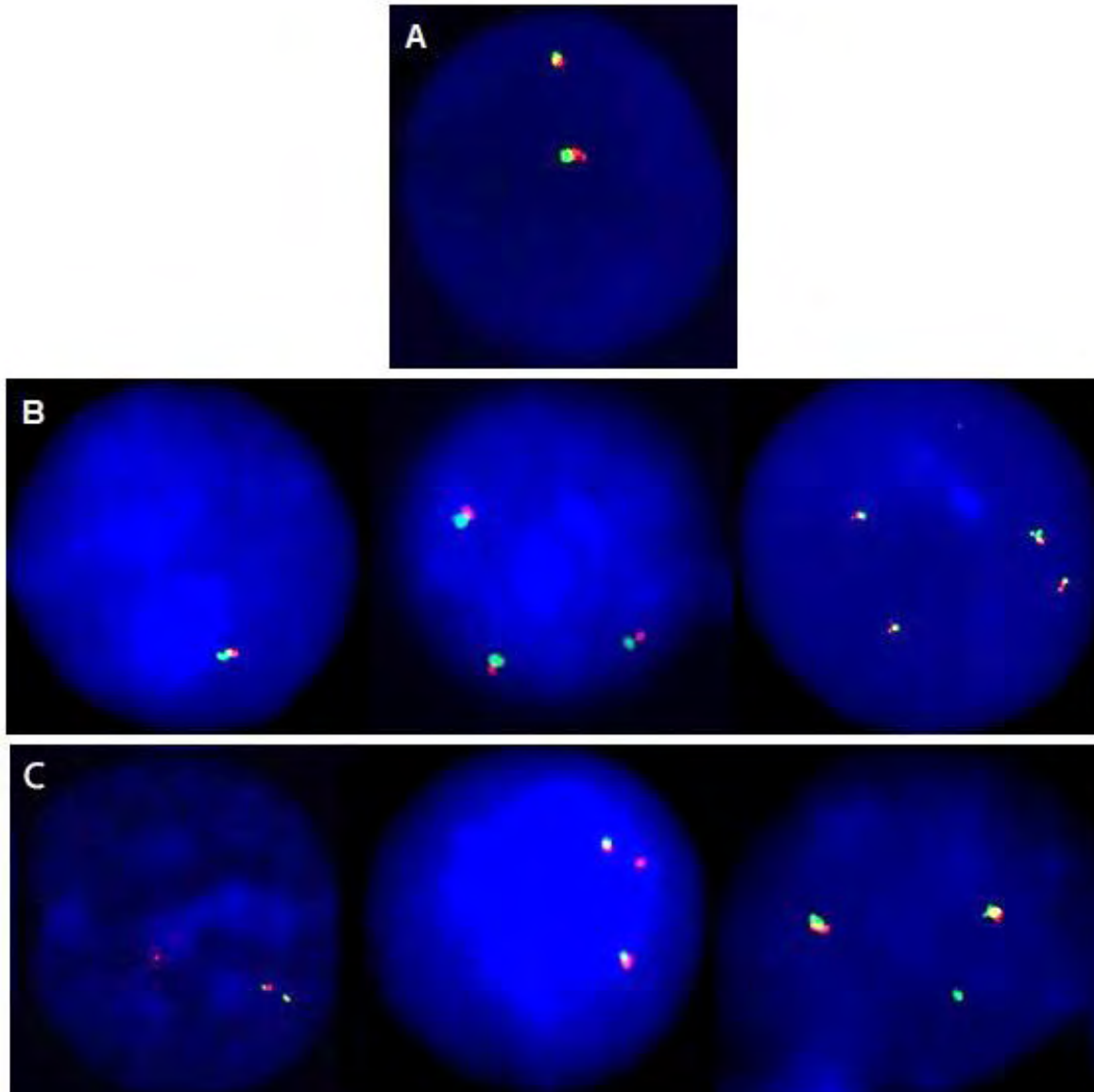


FIGURA 15. Patrones de alteraciones en el gen *MLL* en células en interfase. Patrones de alteraciones numéricas y estructurales en el gen *MLL* en células expuestas a plaguicidas. A) Célula normal 2F (dos señales amarillas fusionadas); B) Células con alteraciones numéricas 1F, 3F, 4F; C) Células con alteraciones estructurales: 1F1V1R ruptura clásica (una señal amarilla, una verde y una roja), 2F1R (dos señales amarillas y una roja), 2F1V (dos señales amarillas y una verde).

Adicionalmente se llevó a cabo el análisis de metafases. En cultivos expuestos a permetrina se detectó el mayor número de metafases alteradas (3 metafases alteradas de 180 analizadas). (FIGURA 16). El patrón más frecuentemente

detectado fue el de la delección de la sonda verde, aunque también se hallaron otros que sugieren inversión, translocación y trisomía (**FIGURA 17**).

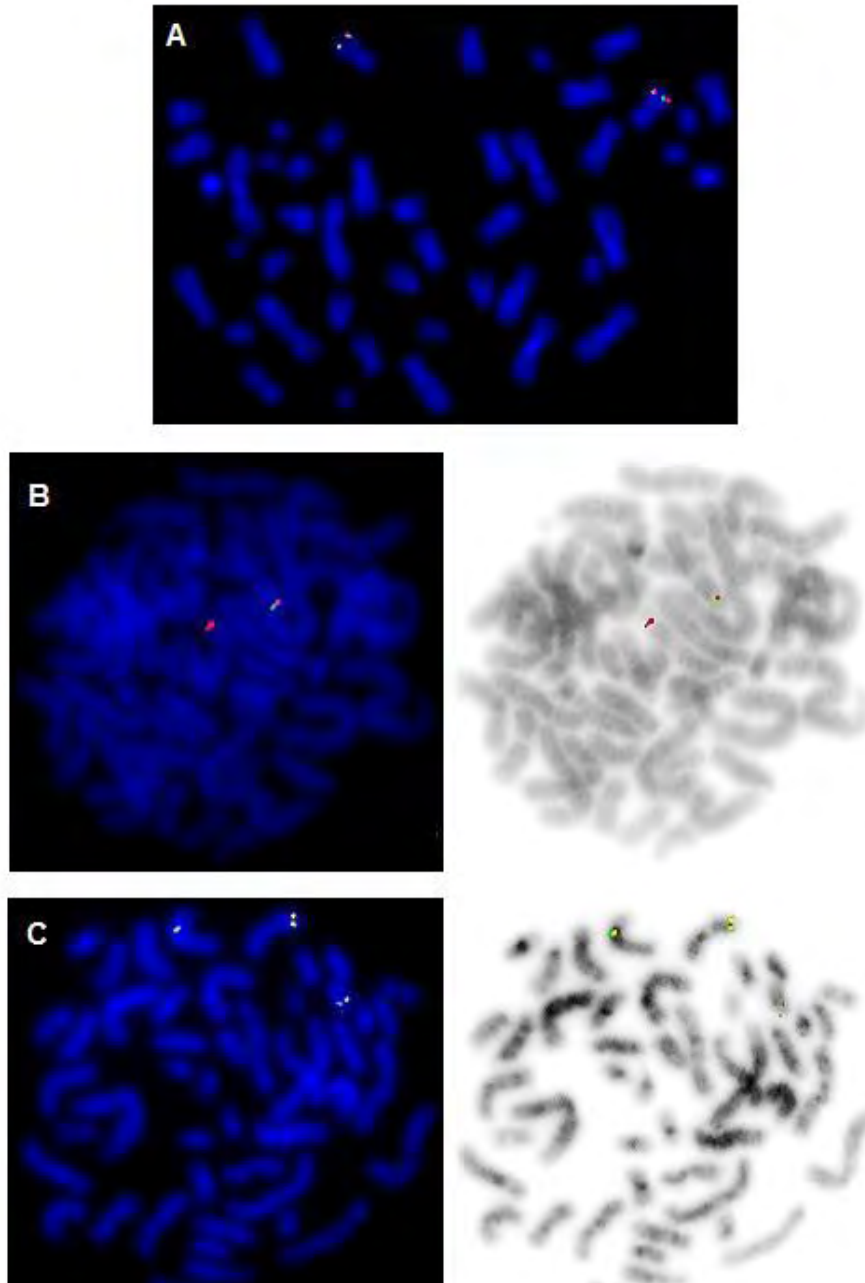


FIGURA 16. Patrones de alteraciones en el gen *MLL* en metafase. Patrones de alteraciones en el gen *MLL* en células en metafase expuestas a plaguicidas. A) Célula normal con dos cromosomas 11 normales con señales amarillas; B) Célula alterada con un cromosoma 11 con señal normal amarilla y un cromosoma 11 con probable delección intersticial que involucra a *MLL*; C) Célula con tres cromosomas 11 con señal normal amarilla, que sugiere aneuploidía.

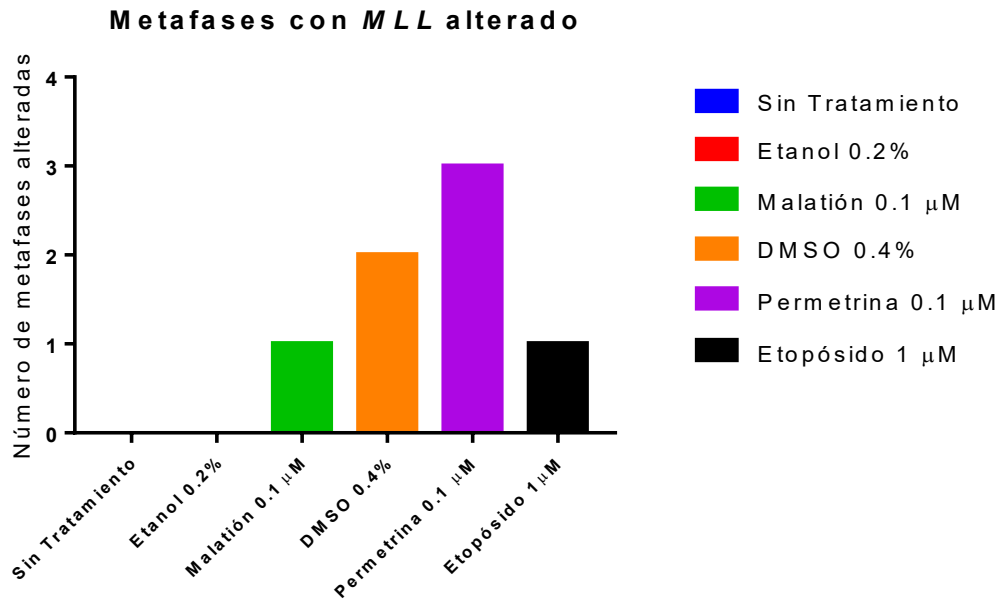


FIGURA 17. Células en metafase con *MLL* alterado. Metafases alteradas detectadas en cultivos expuestos a insecticidas y disolventes. Se muestra el número total de metafases alteradas por condición de tratamiento. (Número de metafases alteradas de 180 analizadas)

4. ANÁLISIS DEL GEN *IGH* CON FISH

El análisis del gen *IGH* se llevó a cabo de la misma forma que como se describió previamente para el gen *MLL*. En la **TABLA 2** se muestra el número de células sin alteración, con alteraciones numéricas (desviación en el número de copias) y estructurales (rupturas y rearrreglos), así como los patrones de daño, detectado en cada uno de los tratamientos. En los cultivos sin tratamiento se detectó el menor número total de células alteradas (12.8 células alteradas de 500 analizadas). En el caso de los disolventes, el número de células alteradas fue muy parecido al de los cultivos sin tratamiento y no se encontró diferencia significativa en ningún caso (total de células alteradas, alteraciones numéricas, alteraciones estructurales) (**TABLA 1 y 2**).

TABLA 2 Número de células sin alteración, con alteraciones numéricas y estructurales en el gen *IGH* detectado en cada condición de tratamiento.

Tratamiento Repetidos	Sin tratamiento					Etanol 0.2%						Malatión 0.1µM						DMSO 0.4%						Permetrina 0.1µM						Etopósido 1µM					
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	V	VI	
Células sin alteración	485	487	492	482	490	482	496	485	485	484	485	483	471	473	480	476	477	491	488	483	490	488	484	467	468	477	471	479	471	482	474	476	469	476	
Promedio	487.2					486.2						476.7						487.3						472.2						475.4					
Alteración numérica																																			
1F	2	1	1	6		3		4		2	2	3	10	10	3	2	5	2	8	6	4	5	3	7	6	7	8	5	6	4	4	3	6	3	
3F	1		3		1			1		2							2	2	1			1	1	3	1	1		2		2	1		2	1	
4F	1											1			1	1								1				2		1	2				
Total de células con alteración numérica	4	1	4	6	1	3	0	5	0	4	2	3	11	10	4	3	7	4	9	6	4	6	4	10	8	8	8	5	10	6	6	5	8	4	
Promedio	3.2					2.3						6.3						5.5						8.2						5.8					
Alteración estructural																																			
1F,1V,1R	9	6	1	4	6	13	1	2	10	5	10	8	8	10	8	9	7	4	2	8	3	3	8	11	12	5	8	10	8	6	10	11	9	9	
2F,1R		2		3				2	2	3		2	1	2		3	6	1		3		1		7	4		3	2	4	3			3	3	
1F,1V		1	1	1	1				1	1			1	1	2	1	1				1			2		4	1			1	1		2	2	
2F,1V	2	3	1	3	2	2		1	1		2	1	2	1	3	1	1		1			1	1	3	4	2	5		3		7	5	3		
1F,1R			1	1			3	4		3	1	1	2	1	3	6	1				2	2	2			3	3	4	4	1	1	3	5	6	
2F,1V,1R									1			1	1												1										
3F,1V														1																					
1V,1R																										1							1		
2F,2R														1																			1		
2F,2V																																			
2V,1R																1																			
2V,2R																																			
1V,2R													1																						
2F,2V,1R												1																							
1F,2V,1R																									2			1							
1F,1V,2R																																			
1F,1V,3R						1								2																					
Total de células con alteración estructural	11	12	4	12	9	15	4	10	15	12	13	14	18	17	16	21	16	5	3	11	6	6	12	23	24	15	21	16	19	12	20	19	23	20	
Promedio	9.6					11.5						17.0						7.2						19.7						18.8					
Total de células alteradas	15	13	8	18	10	18	4	15	15	16	15	17	29	27	20	24	23	9	12	17	10	12	16	33	32	23	29	21	29	18	26	24	31	24	
Promedio	12.8					13.8						23.3						12.7						27.8						24.6					
Total analizadas	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	

Se muestra el número de células normales y alteradas de 500 analizadas. Se analizaron seis repeticiones por condición de tratamiento (3 de cada individuo). Los datos sombreados mostraron diferencia significativa (U-Mann Whitney, $p < 0.05$). Se compararon los ensayos no tratados y los disolventes, así como los disolventes y su agente. El color amarillo representa patrones con un evento estructural, el anaranjado con un evento estructural y uno numérico y el rojo dos eventos estructurales y uno numérico. F= Fusión (Señal normal, amarilla) V= Verde (Señal verde) R= Rojo (Señal roja)

El tratamiento en el que se detectó el mayor número de células totales alteradas fue permetrina (27.8 células alteradas/500 analizadas), seguido de los tratamientos con etopósido (24.6 células alteradas/500 analizadas) y malatión (23.3 células alteradas/500 analizadas); los cuales mostraron diferencia significativa al compararlos contra los respectivos controles (permetrina $p=0.001$, etopósido $p=0.002$, malatión $p=0.002$) (**FIGURA 18**).

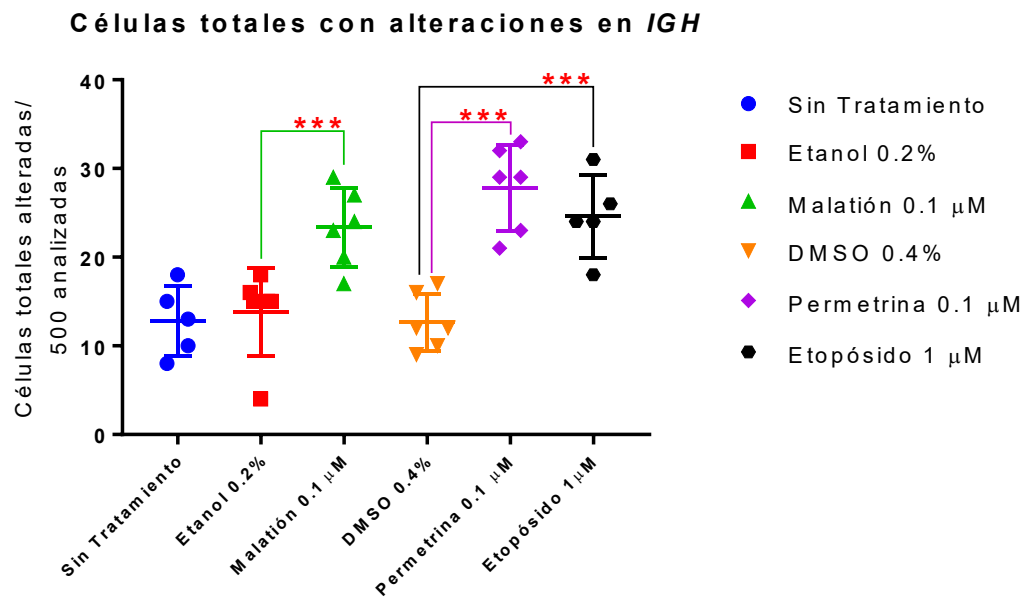


FIGURA 18. Células totales con alteraciones en IGH (numéricas + estructurales). Células totales alteradas en los cultivos tratados con insecticidas y disolventes. Se compararon los ensayos no tratados y los disolventes, así como los disolventes y su agente. U-Mann Whitney, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$

Con respecto a las alteraciones numéricas (desviación en el número de copias), el tratamiento con el que se detectó mayor número de células con pérdida o ganancia de copias de *MLL*, fue permetrina (8.2 células alteradas de 500 analizadas), seguido del tratamiento con malatión (6.3 células alteradas de 500 analizadas) y etopósido (5.8 células alteradas de 500 analizadas). De igual forma que con el análisis de *MLL*,

el patrón más común fue en el que se detectó una sola señal amarilla (una fusión, 1F), que refleja la pérdida de una copia de *IGH* (TABLA 2). En la FIGURA 21 se muestran los patrones de alteraciones numéricas observadas en los cultivos. El incremento de las alteraciones numéricas de los cultivos expuestos a permetrina y malatión fue significativo al compararse con sus disolventes (permetrina $p=0.032$, malatión $p=0.032$). (FIGURA 19)

Células con alteración en el número de copias de *IGH*

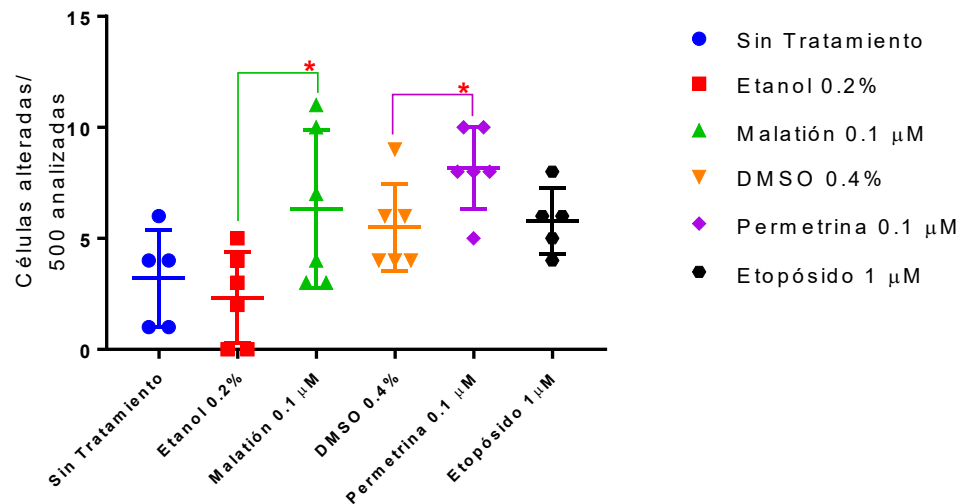


FIGURA 19. Células con alteración en el número de copias de *IGH*. Células con alteraciones numéricas (1F, 3F, 4F) en los cultivos expuestos a insecticidas y disolventes. Se compararon los ensayos no tratados y los disolventes, así como los disolventes y su agente. U-Mann Whitney, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$

En cuanto a las alteraciones estructurales, los tratamientos con plaguicidas tuvieron un número similar entre sí. El tratamiento con permetrina mostró el mayor número células alteradas (19.7 células alteradas de 500 analizadas), seguido de etopósido (18.8 células alteradas de 500 analizadas) y malatión (17 células alteradas de 500 analizadas). Se encontró que el incremento de las células con alteración estructural en *IGH* fue significativo en los tres casos (permetrina $p=0.001$, etopósido $p=0.002$,

malatión $p=0.004$) (**FIGURA 20**). Se observó mayor variedad en los patrones de daño en los cultivos tratados con malatión. Se observó un mayor número de patrones de alteraciones estructurales y de mayor complejidad en el gen *IGH* al compararlos con los encontrados en el gen *MLL* (**TABLA 1 y 2**). Algunos de los patrones encontrados se muestran en la **FIGURA 21**.

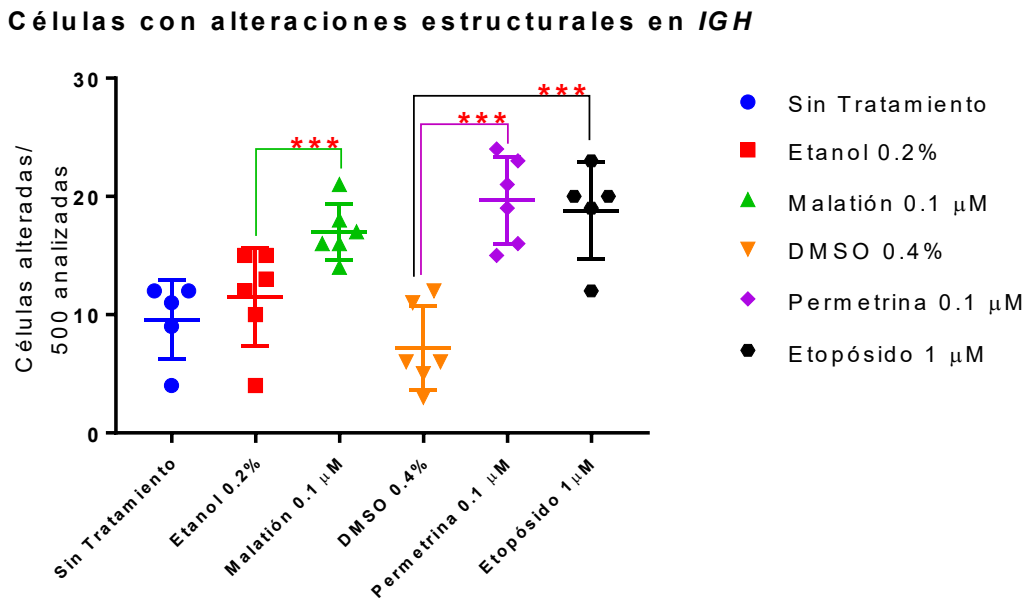


FIGURA 20. Células con alteraciones estructurales en *IGH*. Células con alteraciones estructurales en los cultivos expuestos a insecticidas y disolventes. Se compararon los ensayos no tratados y los disolventes, así como los disolventes y su agente. U-Mann Whitney, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$

Adicionalmente, se detectó un mayor número de metafases con alteración en el gen *IGH*, en comparación con *MLL*. El tratamiento con el que se detectó el mayor número de metafases alteradas fue permetrina, con el que se llegaron a observar hasta 7 metafases anormales de 180 analizadas. Se detectaron más del doble de metafases alteradas en cultivos expuestos a permetrina en comparación con el DMSO; sin embargo, esto no mostró diferencia significativa (U-Mann Whitney,

p=0.066) (**FIGURA 22**). El patrón más frecuentemente observado fue la delección terminal de *IGH*, aunque también se detectaron otros como delección intersticial, monosomía, y rearrreglos más complejos como inversión más delección (**FIGURA 23**).

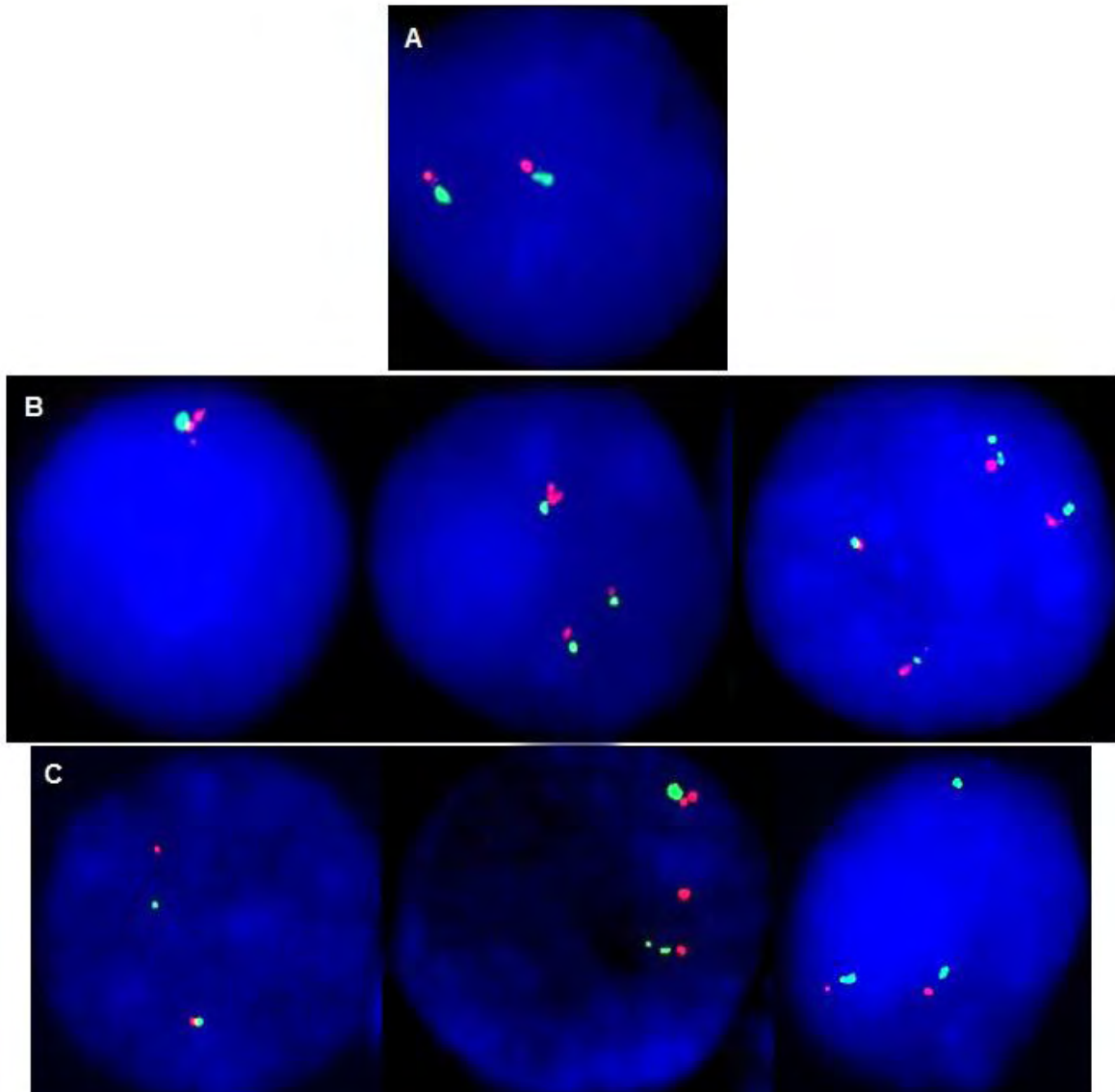


FIGURA 21. Patrones de alteraciones en el gen *IGH* en células en interfase. Patrones de alteraciones numéricas y estructurales en el gen *IGH* en células expuestas a plaguicidas. A) Célula normal 2F (dos señales amarillas); B) Células con alteraciones numéricas 1F, 3F, 4F; C) Células con alteraciones estructurales: 1F1V1R ruptura clásica (una señal amarilla, una verde y una roja), 2F1R (dos señales amarillas y una roja), 2F1V (dos señales amarillas y una verde).

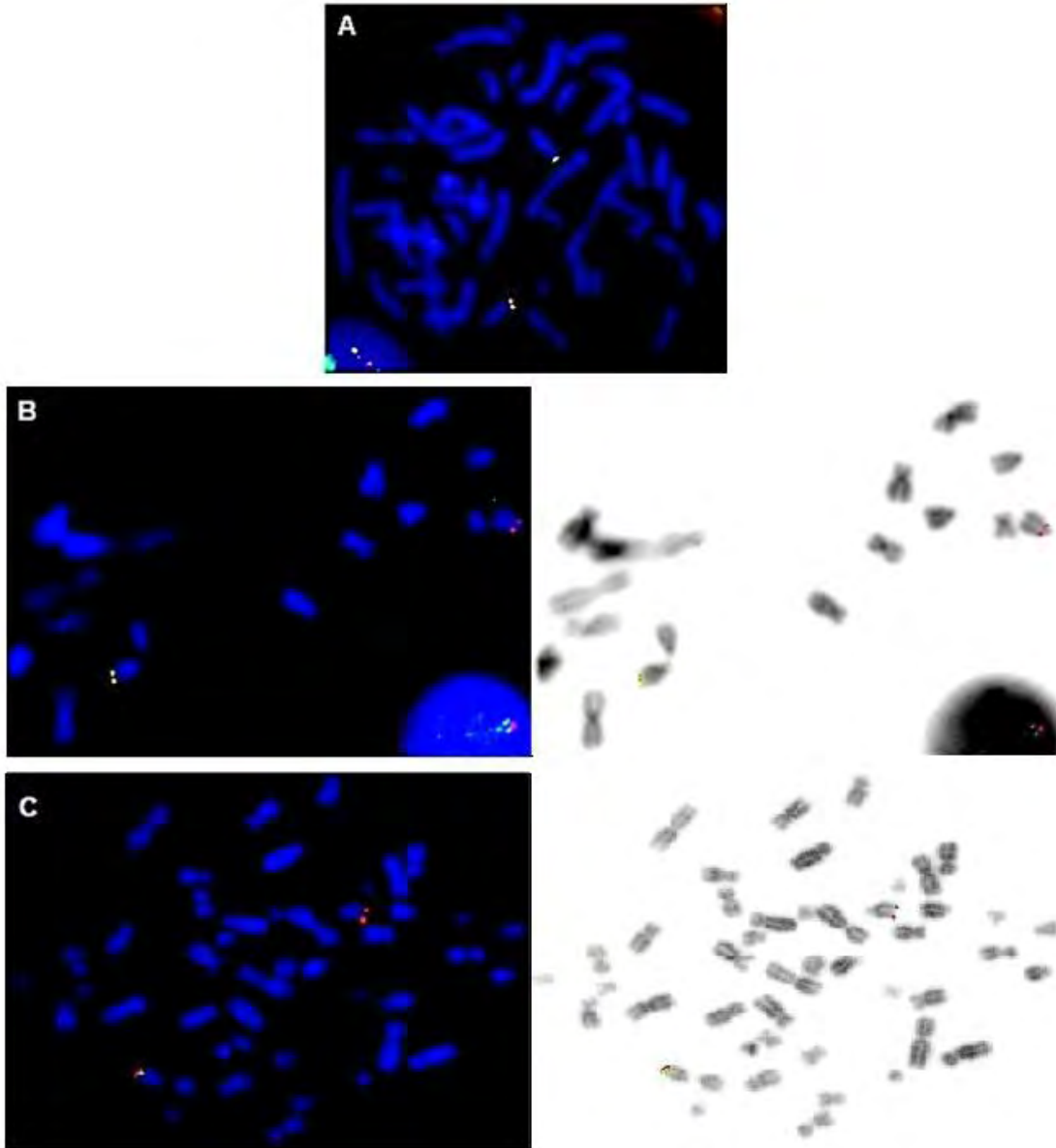


FIGURA 22. Patrones de alteraciones en el gen *IGH* en metafase. Patrones de alteraciones en el gen *IGH* en células en metafase expuestas a plaguicidas. A) Célula normal con dos cromosomas 14 con señales normales amarillas; B) Célula con un cromosoma 14 con señal normal amarilla y un cromosoma 14 con probable inversión y delección de *IGH*; C) Célula con un cromosoma 14 normal con señal amarilla y un cromosoma 14 con delección terminal de *IGH*.

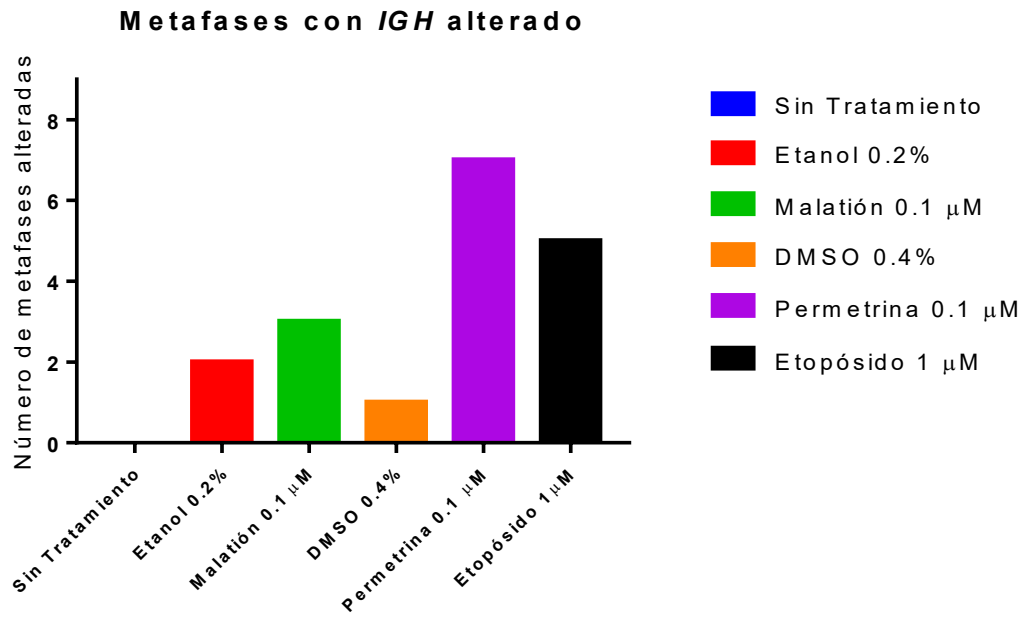


FIGURA 23. Células en metafase con *IGH* alterado. Células en metafase con alteraciones en *IGH* en los cultivos expuestos a insecticidas y disolventes. Se muestra el número total de metafases alteradas por condición de tratamiento. (Número de metafases alteradas de 180 analizadas)

VIII. DISCUSIÓN

En México los plaguicidas son ampliamente utilizados en diversos sectores como el agropecuario, doméstico, industrial, forestal, salud pública, entre otros ⁷⁶. Según datos de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) se estima que en México en el 2014 se usaron 32,406 toneladas de insecticidas ⁷⁷. Siendo el sector agropecuario el principal consumidor de estos productos, y usándose en diversos cultivos de consumo alimenticio.

Adicionalmente son ampliamente usados en salud pública para tratar la pediculosis y la escabiasis ⁷⁸, y también son fundamentales para controlar vectores de enfermedades, como la malaria, el dengue y el Zika ^{79,80}. Por lo que cualquier individuo está potencialmente expuesto a estos agentes.

De acuerdo al Registro Nacional de Cáncer en Niños y Adolescentes 2005-2010, del total de los casos de cáncer reportados en menores de 20 años, el 34.4% tuvieron un reporte de exposición a químicos, y de éstos, el 52.7% reportaron exposición a plaguicidas ⁸¹. Lo cual, junto con otros estudios epidemiológicos, sugiere una posible relación entre la exposición a plaguicidas y el desarrollo de cáncer ¹¹⁻¹³. A pesar de que a nivel epidemiológico se ha sugerido una asociación entre la exposición a plaguicidas y el desarrollo de cáncer hematopoyético, principalmente en niños, existen pocos estudios que analicen los efectos de los

plaguicidas en genes específicos que conducen al desarrollo de cáncer ^{43,45,46,49}. Por lo que este trabajo busca aportar información acerca del efecto de dos plaguicidas ampliamente utilizados, permetrina y malatión, en dos genes (*IGH* y *MLL*) comúnmente involucrados en el desarrollo de leucemia y otros tipos de cáncer hematopoyético.

La mayoría de los estudios que han analizado la genotoxicidad de los plaguicidas, han utilizado concentraciones altas (25-1800 μM) ^{62-65,67,68}, sin embargo, es importante considerar concentraciones más cercanas a lo encontrado en humanos expuestos. Por lo que para este estudio se incluyeron concentraciones bajas (0.1 μM), las cuales son similares a lo reportado en individuos expuestos ^{54,58,69-71}.

1. VIABILIDAD E ÍNDICE MITÓTICO

Para determinar la viabilidad se realizó el método de exclusión por azul de tripano, el cual se basa en la capacidad que tienen las células vivas de evitar que el colorante permee, ya que presentan membrana celular íntegra ⁸². Se encontró que las células expuestas a los disolventes tuvieron una viabilidad similar (79% etanol y 80% DMSO), y significativamente menor en comparación contra las no tratadas (100%). Previamente se ha determinado que tanto DMSO como etanol tienen un efecto citotóxico en altas concentraciones, causando deshidratación, inhibición de la proliferación, interacción con la membrana, entre otros efectos ⁸³. Mientras que a

concentraciones bajas (0-0.5%), como las usadas en este estudio, (0.2% etanol y 0.4% DMSO) su efecto es mínimo.

En cuanto a los plaguicidas, el porcentaje de viabilidad fue menor que de los disolventes, sin embargo, el malatión no tuvo una disminución significativa. Los plaguicidas tienen un efecto citotóxico sobre las células provocando daño que las pueda llevar a la muerte. Debido a que provocan estrés oxidativo entre otros efectos

84,85.

Aunque se encontró una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad de algunos cultivos, el porcentaje, en promedio se mantuvo cerca del 80%. Por lo que no se observó una caída tan drástica en la viabilidad. Adicionalmente, se debe considerar es que con el ensayo de azul de tripano se pueden tener falsos positivos; debido a que cualquier modificación en la membrana celular permite que el azul de tripano pueda permear y por lo tanto teñir a la célula de color azul, haciendo difícil el análisis de ese tipo de células.

Por lo tanto, para corroborar los resultados obtenidos por el método de exclusión por azul de tripano se realizó una tinción con 7AAD y se determinó la viabilidad por citometría de flujo. El 7AAD se une selectivamente a las regiones G-C del DNA, cuando una célula está muerta permite que el 7AAD permee y se una al DNA, por lo que fluoresce, permitiendo su identificación a través del citómetro de flujo ⁸⁶. La

tendencia de los resultados con este ensayo y con el de exclusión por azul de tripano fue parecida, aunque en general con la tinción de 7AAD, se obtuvieron valores más altos, y los plaguicidas fueron los que tuvieron los porcentajes más bajos; sin embargo, nunca menores a 80%.

Otra forma de observar el efecto citotóxico es mediante el índice mitótico, el cual muestra qué tanto se dividen las células. En todos los cultivos analizados se encontraron células en división. Aunque se observó una disminución en los cultivos expuestos, no fue significativa. En conjunto, considerando los tres ensayos, se observó un efecto citotóxico leve, ya que se observa muerte, pero no al grado de evitar la división celular y de disminuir drásticamente la población celular. Adicionalmente, se debe tomar en consideración que los disolventes utilizados también tuvieron cierto efecto sobre la viabilidad, por lo que resulta difícil atribuir todo el posible efecto citotóxico únicamente a los plaguicidas.

2 ANÁLISIS DEL GEN *MLL* CON FISH

El gen *MLL* presentó daño tanto numérico (número de copias) como estructural en todos los cultivos. El cultivo sin tratamiento fue el que presentó el menor número de células alteradas, como se esperaba. Se encontró un incremento significativo del total de células alteradas de los cultivos tratados a los plaguicidas, mostrando un efecto genotóxico sobre las células expuestas. Aunque los cultivos expuestos a malatión fueron los que presentaron el mayor número de células alteradas totales,

no se observó en el caso de las alteraciones del número de copias, ya que fue superado por los cultivos expuestos a permetrina

Las alteraciones del número de copias en el gen *MLL* fueron las más comunes, observándose un mayor número que de las alteraciones estructurales. En el caso de los cultivos expuestos a permetrina, la cantidad de alteraciones en el número de copias fue casi el doble que las estructurales. Por el contrario, los cultivos tratados con malatión presentaron cantidades similares de alteraciones en el número de copias y estructurales. Esto podría sugerir que la permetrina, además de inducir rupturas en el gen *MLL*, actúa como agente aneuploidógeno, ya que se encuentra diferencia significativa con respecto al DMSO ($p=0.001$). Sin embargo, esto debe tomarse con reserva ya que también se encontró diferencia significativa entre el disolvente y los cultivos sin tratamiento, aunque con un valor de p mucho mayor ($p=0.037$). Adicionalmente, el posible efecto aneuploidógeno de la permetrina debe ser comprobado con estudios adicionales, por ejemplo, mediante el uso de sondas de FISH que detecten regiones centroméricas. En un estudio previo se reportó que la permetrina tiene este efecto, pero a una concentración elevada ($200 \mu\text{M}$), al ser evaluado con sondas centroméricas ⁴⁶.

Ambos plaguicidas mostraron un incremento significativo de las alteraciones estructurales. Sin embargo, el malatión mostró el mayor incremento. En cuanto a la complejidad de los patrones de daño, fue similar en ambos. El patrón que se

esperaba obtener en mayor proporción es la ruptura clásica (1F,1V,1R); sin embargo, el que más se repitió con ambos insecticidas fue 2F,1R (2 Fusiones, 1 señal roja) en células en interfase. Este patrón de daño se podría explicar de varias formas, una de ellas es que la ruptura no se da en el BCR sino desplazado hacia el extremo 3' o 5' lo que daría como resultado la separación de la señal roja en dos, una más grande que otra. Esto ya ha sido reportado previamente, en donde se observaron casos en que se presentan rupturas fuera del BCR. Otra explicación es que ocurra una ruptura cromatídica seguida de separación espacial de la cromátida hermana rota, por lo que se observarían las dos señales normales y una roja⁸⁷. Otro patrón similar es el de 2F,1V (2 Fusiones, 1 señal verde), este tendría una explicación similar a las mencionadas anteriormente. Estos posibles mecanismos ya han sido sugeridos previamente⁸⁷.

También se presentaron con frecuencia patrones como 1F,1R y 1F,1V. El posible mecanismo de formación de estos patrones sería por una deleción intersticial o terminal. Para que se observe la ausencia de la señal roja (1F,1V), tendría que ocurrir una deleción terminal, debido a que la sonda roja se encuentra en la región telomérica, siendo más factible que se dé esta forma. A diferencia del patrón 1F,1R, en donde la ausencia de la sonda verde se daría por una deleción intersticial; la cual requeriría dos puntos de ruptura.⁸⁷ Además, se presentaron otros patrones más complejos, los cuales sugieren que ocurrió más de un evento. Este tipo de daño ha sido previamente reportado en exposiciones de concentraciones altas de estos mismos plaguicidas⁴⁶ y en células tratadas con etopósido^{15,87,88}

Adicionalmente, se analizaron 30 metafases por cada cultivo. Se encontraron muy pocas metafases alteradas, siendo los cultivos expuestos a permetrina los que presentaron el mayor número de metafases alteradas (3). El hecho de encontrar metafases alteradas nos indica que, a pesar del daño que tiene la célula es capaz de dividirse y dar lugar a células hijas con daño. Por lo que, si el daño ocurre en una célula como las progenitoras linfoides y es capaz de dividirse para dar lugar a células hijas con alteraciones, potencialmente podría conducir al desarrollo de LLA.

Se esperaba encontrar la translocación clásica, en donde hay un cromosoma 11 normal y otros dos derivados, cada uno con una señal roja o verde. Sin embargo, los patrones que se encontraron fueron otros, como delección de la sonda verde, una inversión y una trisomía. Hasta el momento, no se tiene conocimiento de reportes previos en donde se haya analizado si la exposición a agentes induce daño en el gen *MLL* en células en metafase, por lo que estos resultados son muy relevantes. El encontrar una célula con trisomía 11 es importante, debido a que nos da un indicativo de que el agente es capaz de generar aneuploidías. Este efecto concuerda con lo observado en células en interfase, en donde se observó una alta desviación en el número de copias de *MLL* por la exposición a permetrina.

Se han hecho diversos estudios en los cuales se ha evaluado el daño genotóxico de los insecticidas, pero son pocos los que estudian genes específicos como *MLL*, y el mecanismo por el cual ocurre. Este gen es susceptible a rupturas debido a que

el BCR es rico en AT, contiene secuencias repetitivas Alu, LINE y MER, tiene sitios de reconocimiento de escisión de la DNA topoisomerasa II, así como un andamio y una región de unión a matriz (SAR / MAR) ¹⁵. Esto lo hace susceptible a rupturas por diversos agentes.

Uno de los mecanismos propuestos es que los insecticidas inhiban a la DNA topoisomerasa II. La inhibición de esta enzima por agentes como el etopósido conlleva a la formación de un complejo entre la enzima, el agente (plaguicida, droga, quinona, etc.) y el DNA, bloqueando así la reunión y como consecuencia generando rupturas de doble cadena del DNA ⁸⁹. El gen *MLL*, al tener un sitio de reconocimiento para esta enzima, es un blanco para la formación del complejo que lleva a la ruptura. Ya se ha reportado previamente que otros organofosforados como el clorpirifós son capaces de inhibir a la DNA topoisomerasa II y generar rupturas en el gen *MLL* ⁴⁵. Por lo que debe evaluarse si malatión y permetrina, que son capaces de inducir rupturas en el gen *MLL*, lo hacen a través de la inhibición de la DNA topoisomerasa II.

Se ha planteado la hipótesis de que algunas células pueden escapar del proceso de muerte celular y, por lo tanto, transformar el daño del DNA, inducido por apoptosis, en translocaciones leucémicas. Este proceso se daría en dos pasos, primero una degradación del DNA mediada por nucleasas apoptóticas. El BCR de *MLL* sería uno de los primeros blancos de las nucleasas. Posteriormente la

detención por un *checkpoint* permitiría que se lleve a cabo una reparación de las rupturas por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ), y así lograr la supervivencia de la célula. Sin embargo, esto da como resultado posibles errores en la reparación, originándose rearrreglos ⁹⁰. Esta sería una explicación para la formación de rearrreglos en respuesta a la exposición a agentes que provoquen muerte celular y no sea precisamente por la acción de una enzima en particular ^{89,90}.

Por otro lado, también se ha visto que el tratamiento con estrógenos promueve rupturas en el BCR del gen *MLL*. Esto mediante dos vías principales, la primera es que las rupturas pueden estar mediadas a través de los receptores de estrógenos (RE), que se expresan en células hematopoyéticas y que participan en la regulación de la hematopoyesis normal. Estos RE también están involucrados en la configuración de la estructura de la cromatina, fenómenos epigenéticos y, posiblemente, en la reparación del daño al DNA. Los RE se unen a las acetiltransferasas de histonas en el núcleo y se asocian a la matriz nuclear. Tras la asociación con la matriz nuclear, el RE altera el balance dinámico de las acetiltransferasas y desacetilasas de histonas, provocando así una alteración en la cromatina ^{47,91,92}. Se ha encontrado que *MLL* tiene un sitio promotor crítico, que es una región que puede ser un sitio activo para la remodelación de la cromatina, por lo que los RE tendrían un efecto en este sitio. También se sugiere que estos RE pueden interactuar con cofactores de vías de reparación de DNA, lo que obstaculiza la correcta reparación ^{47,92}.

La segunda vía, en donde los estrógenos catecol son metabolizados por peroxidasas, generando semiquinonas y quinonas, las cuales tienen el potencial de formar aductos de DNA y estrés oxidativo ⁴⁷. Las quinonas resultantes son análogas a los metabolitos del benceno y los flavonoides genisteína y quercetina que han sido reportados como inhibidores de la enzima DNA topoisomerasa II, y estos se han visto implicados en la inducción de daño en el gen *MLL* y en la asociación con el desarrollo de leucemia ^{47,93}. Debido a que permetrina y malatión han demostrado tener actividad estrogénica podrían causar daño al gen *MLL* mediante un mecanismo parecido al mencionado anteriormente ^{92,94}.

3 ANÁLISIS DEL GEN *IGH* CON FISH

El gen *IGH*, al igual que *MLL*, presentó daño tanto en el número de copias como estructural en todos los cultivos. En este gen se observó una mayor diversidad y complejidad en los patrones de daño, que en *MLL*. Siendo el tratamiento con malatión el que presentó mayor variedad y complejidad.

En general se observó un mayor número de alteraciones en el gen *IGH* en comparación con *MLL*. Sin embargo, este efecto se encontró en todas las muestras, incluyendo a las no tratadas. Es posible que esto se deba a falsos positivos debido a que la sonda tiene un mayor tamaño y en ocasiones se fragmenta. Sin embargo, tampoco se puede descartar que el gen *IGH* sea más susceptible a rupturas que *MLL* ⁷⁴; de hecho las comparaciones estadísticas sugieren que *IGH* es más

susceptible al efecto de los plaguicidas en comparación con *MLL*. En el caso del ensayo con *IGH*, no se encontraron diferencias estadísticas entre los disolventes (etanol y DMSO) y los cultivos no tratados, por lo que el efecto observado en *IGH* es totalmente atribuible a la exposición a malatión y permetrina.

El cultivo sin tratamiento presentó el menor número total de células alteradas. Los cultivos expuestos a permetrina presentaron el mayor incremento, incluso por arriba del control positivo. A diferencia de lo observado en el caso del gen *MLL*, se encontró que las alteraciones estructurales fueron las más recurrentes en todos los cultivos. El incremento de las alteraciones estructurales en los cultivos expuestos a los plaguicidas fue significativo. Los cultivos con mayor número de alteraciones estructurales fueron los expuestos a permetrina, y la cantidad de alteraciones estructurales fueron más del doble que en las numéricas. En el caso de los expuestos a malatión y etopósido también se superó por más del doble las alteraciones estructurales a las de alteraciones en el número de copias. Lo que nos sugiere que el gen *IGH* es más susceptible a rearrreglos estructurales que a variación del número de copias. En estudios realizados en agricultores expuestos a plaguicidas se ha encontrado recurrencia de células con fusiones *IGH-BCL2*, y se sugiere que los plaguicidas podrían inducir rupturas en los genes que por eventos posteriores conducen a la fusión oncogénica ^{49,95 96}. Sin embargo, no se ha especificado qué clase de insecticidas en particular, tengan este efecto.

La ruptura clásica (1F,1V,1R) fue la alteración estructural en interfase más común en todos los cultivos. Sin embargo, en metafase no se encontraron translocaciones clásicas, y se detectaron otros rearrreglos que involucraron ruptura del gen. Otros de los patrones más comunes en interfase fueron 2F,1V y 2F,1R en los que al igual que en *MLL*, una de las explicaciones para su formación es que la ruptura del gen no ocurre en el BCR, sino que se desplaza hacia el extremo 3' o 5' ¹⁵. También puede ocurrir cuando una de las cromátidas hermanas sufre ruptura y se separa ocasionando que las señales no colocalicen adecuadamente, produciendo el patrón de 2F y una señal roja o verde ⁸⁷.

Al realizar el análisis de las metafases, se encontró una mayor cantidad de alteraciones, en comparación con lo encontrado en el análisis del gen *MLL*. La variedad y complejidad de patrones también fue mayor. El patrón más recurrente fue el de la deleción de la sonda verde, en el que al estar la sonda verde en la región telomérica, sugiere una deleción terminal. Estudios han sugerido que deleciones de la región variable (sonda verde) pueden ser resultado de la pérdida de DNA que acompaña a la recombinación VDJ, y esta puede o no activar algún oncogén ⁴².

También se observaron otros patrones más complejos como una inversión paracéntrica (ya que se detecta la señal roja abajo del centrómero y no en la parte terminal del brazo 14q), que involucró deleción de la porción terminal del gen *IGH*. En este caso, probablemente ocurrió una ruptura en 14q32 (generando la pérdida

de la porción terminal de *IGH*) y en otra región cercana al centrómero, seguida de inversión del fragmento roto y reunión con una región cercana al centrómero (**FIGURA 22**). Al igual que en las células en interfase, los cultivos que tuvieron la mayor cantidad de metafases alteradas fueron los expuestos a permetrina.

En cuanto a las alteraciones en el número de copias, se encontró que los insecticidas permetrina y malatión inducen significativamente este tipo de evento en *IGH*. El tratamiento que presentó el mayor aumento fue la permetrina. Lo que sugiere un efecto aneuploidógeno, como se había también sugerido con el análisis de *MLL*. El efecto aneuploidógeno de la permetrina ya ha sido previamente reportado en un estudio donde se observó que este insecticida genera pérdidas y ganancias de los cromosomas 12, 14/22 y 18 ⁴⁶. Los patrones encontrados en este trabajo fueron 1F, 3F, 4F, siendo 1F el patrón más común. Las posibles explicaciones a este patrón son la pérdida de un cromosoma 14 o la delección del gen.

Se desconoce el mecanismo por el cual los insecticidas estudiados inducen daño en gen *IGH*. Un mecanismo posible es a través de la producción de especies reactivas de oxígeno. Diversos estudios han visto que permetrina y malatión causan estrés oxidativo. Los radicales libres de oxígeno y nitrógeno causan daño a lípidos, proteínas y DNA, lo que deriva en daño citotóxico y genotóxico. De manera general los radicales libres son capaces de alterar la estructura del DNA, dañando a las

bases púricas y pirimídicas ^{84,85}. Sin embargo, falta mayor información para determinar si este daño afecta mayormente a ciertos genes o regiones específicas del genoma. En el presente estudio, se detectó que ambos genes (*IGH* y *MLL*) se dañan de manera diferente y en diferente grado por la exposición a los insecticidas.

Los resultados obtenidos de ambos genes mostraron que, a una baja concentración y en una exposición continua, los plaguicidas permetrina y malatión son capaces de inducir daño en los genes *IGH* y *MLL*. Siendo *IGH* el que presentó mayor número de alteraciones; sin embargo en un estudio donde se analizaron ambos genes y los insecticidas permetrina y malatión en una exposición aguda, se encontró que el gen *MLL* fue el que presentó mayor daño ⁴⁶. Esto sugiere que *IGH* es más susceptible a sufrir mayor daño por la exposición a concentraciones bajas de los plaguicidas.

Los genes analizados son importantes en el desarrollo de LLA, por lo que el daño en estos genes podría representar el inicio del desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, aún se deben estudiar otros tipos celulares que modelen de una mejor manera la etiología de la LLA, como células troncales y progenitoras hematopoyéticas.

Adicionalmente, el presente estudio no involucra al metabolismo; esto resulta de gran interés ya que se ha visto que los metabolitos de estos agentes también tienen efecto. Resulta además de gran importancia evaluar el efecto de estos insecticidas

a nivel *in vivo* en modelos animales y probar diferentes tiempos de exposición, para ver si el efecto se incrementa o se da una reparación adecuada del daño. También se tiene que estudiar más a fondo el mecanismo de inducción de daño y determinar si existen sitios en el genoma que presenten mayor susceptibilidad a daño por estos agentes.

Este estudio aporta información acerca del efecto de bajas concentraciones de los plaguicidas malatión y permetrina en dos genes involucrados en el desarrollo de cáncer hematológico. Mediante el ensayo de FISH, fue posible realizar un análisis célula por célula, detectando una gran diversidad de daño que involucró alteraciones numéricas y estructurales. Además, en este trabajo se analizaron metafases, lo cual aporta información relevante acerca de la capacidad de las células de dividirse a pesar del daño que portan en genes que potencialmente pueden dirigir el desarrollo de leucemia.

IX. CONCLUSIONES

- Se observó que la exposición continua *in vitro* a bajas concentraciones (0.1µM 72h) de los insecticidas permetrina y malatión, en linfocitos de sangre periférica, induce daño en los genes *IGH* y *MLL*, implicados en la etiología de la LLA y otros cánceres hematopoyéticos.
- A concentración baja (0.1µM) ambos plaguicidas afectan levemente la viabilidad celular; observándose que un alto porcentaje de células se conservan vivas y mantienen la capacidad de proliferar.
- Se encontró que ambos insecticidas inducen daño estructural en los genes estudiados. Encontrándose mayor daño estructural en el gen *MLL* tras la exposición a malatión, y se encontró mayor daño en el gen *IGH* por la exposición a permetrina.
- De manera general, se identificó mayor cantidad y complejidad de daño en el gen *IGH* en comparación con *MLL*.
- Ambos insecticidas, principalmente la permetrina, inducen desviaciones en el número de copias de estos genes.
- Los rearrreglos identificados en estos genes fueron detectados en células en interfase, así como en células en metafase, sugiriendo que las células son capaces de proliferar a pesar de portar daño en genes que potencialmente conducen al desarrollo de cáncer hematopoyético.
- Las concentraciones utilizadas son similares a las detectadas en individuos expuestos a estos agentes, por lo que resulta de gran interés conocer si en estos individuos hay una mayor recurrencia de daño en éstos y/o en otros genes, así como el posible mecanismo por el que actúan estos agentes.

- Este estudio aporta evidencia biológica que apoya las observaciones epidemiológicas que sugieren que existe una asociación entre la exposición a plaguicidas y el desarrollo de leucemia y linfoma.

X. REFERENCIAS

1. Mitchell, C. OPS OMS | Nueva publicación de la OPS/OMS busca contribuir a la detección temprana del cáncer infantil. *Pan American Health Organization / World Health Organization* Recuperado el, 20 de Abril de 2017, de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10414%3A2015-new-pahowho-publication-gives-guidance-on-early-diagnosis-of-childhood-cancer&catid=740%3Apress-releases&Itemid=1926&lang=es.
2. Rivera-Luna, R., Velasco-Hidalgo, L., Zapata-Tarrés, M., Cárdenas-Cardos, R. & Aguilar-Ortiz, M. R. (2017). Current outlook of childhood cancer epidemiology in a middle-income country under a public health insurance program. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **34**, 43–50 .
3. Pui, C.-H., Robison, L. L. & Look, A. T. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* **371**, 1030–1043.
4. Bhojwani, D., Yang, J. J. & Pui, C.-H. (2015). Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr. Clin. North Am.* **62**, 47–60 .
5. Sánchez Ortega, M. A. O., Osnaya Ortega, M. L. & Rosas Barrientos, J. V. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Med. Interna México* **23**, 26–33 .
6. Lee, P., Bhansali, R., Izraeli, S., Hijjiya, N. & Crispino, J. D. (2016). The biology, pathogenesis and clinical aspects of acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome. *Leukemia* **30**, 1816–1823.
7. Treviño, L. R. *et al.* (2009). Germline genomic variations associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **41**, 1001–1005.
8. Gknation. Acute Lymphoblastic Leukemia. (2015). Recuperado el 20 de Abril de 2017, de: <https://www.lls.org/leukemia/acute-lymphoblastic-leukemia>.
9. Hoffmann, W. *et al.* (2008). Population-based research on occupational and environmental factors for leukemia and non-Hodgkin's lymphoma: The Northern Germany Leukemia and Lymphoma Study (NLL). *Am. J. Ind. Med.* **51**, 246–257.

10. Buffler, P. A., Kwan, M. L., Reynolds, P. & Urayama, K. Y. (2005). Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest.* **23**, 60–75.
11. Ntzani, E. E., Ntritsos G, C. M., Evangelou, E. & Tzoulaki, I. (2013). Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects. *EFSA Support. Publ.* **10**.
12. Bonner, M. R. *et al.* (2007). Malathion Exposure and the Incidence of Cancer in the Agricultural Health Study. *Am. J. Epidemiol.* **166**, 1023–1034.
13. Soldin, O. P. *et al.* (2009). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia and Exposure to Pesticides. *Ther. Drug Monit.* **31**, 495–501.
14. Baldwin, E. L. & Osheroff, N. (2005). Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **5**, 363–372.
15. Sung, P. A., Libura, J. & Richardson, C. (2006). Etoposide and illegitimate DNA double-strand break repair in the generation of MLL translocations: new insights and new questions. *DNA Repair* **5**, 1109–1118.
16. Hunger, S. P. & Mullighan, C. G. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1541–1552.
17. Inaba, H., Greaves, M. & Mullighan, C. G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* **381**, 1943–1955.
18. Roberts, K. G. & Mullighan, C. G. (2015). Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 344–357.
19. Mrózek, K., Harper, D. P. & Aplan, P. D. (2009). Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **23**, 991–v.
20. Greaves, M. F. & Wiemels, J. (2003). Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 639–649.
21. de Boer, J., Walf-Vorderwülbecke, V. & Williams, O. (2013). In focus: MLL-rearranged leukemia. *Leukemia* **27**, 1224–1228.
22. Marschalek, R. (2015). MLL leukemia and future treatment strategies. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **348**, 221–228.

23. Weizman Institute of Sciences. KMT2A Gene - GeneCards | KMT2A Protein | KMT2A Antibody. *Gene Cards - Human Gene Database*. Recuperado el 22 de Abril de 2017, de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KMT2A>.
24. ExPASy, B. R. P. Motifs on sequence Q03164 [UniProtKB/Swiss-Prot. *PROSITE* Recuperado el 22 de Abril de 2017, de: <http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/ScanView.cgi?scanfile=546052220463.scan.gz>.
25. KMT2A - Histone-lysine N-methyltransferase 2A - Homo sapiens (Human) - KMT2A gene & protein. *UniProt* Recuperado el 22 de Abril de 2017, de: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q03164>.
26. Cosgrove, M. S. & Patel, A. (2010). Mixed lineage leukemia: a structure-function perspective of the MLL1 protein. *FEBS J.* **277**, 1832–1842.
27. Hsieh, J. J.-D., Ernst, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Korsmeyer, S. J. (2003). Proteolytic Cleavage of MLL Generates a Complex of N- and C-Terminal Fragments That Confers Protein Stability and Subnuclear Localization. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 186–194.
28. Krivtsov, A. V. & Armstrong, S. A. (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 823–833.
29. Yokoyama, A. (2015). Molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. *Int. J. Hematol.* **101**, 352–361.
30. Ballabio, E. & Milne, T. A. (2012). Molecular and Epigenetic Mechanisms of MLL in Human Leukemogenesis. *Cancers* **4**, 904–944.
31. Chowdhury, T. & Brady, H. J. M. (2008). Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia. *Blood Cells. Mol. Dis.* **40**, 192–199.
32. Harper, D. P. & Aplan, P. D. (2008). Chromosomal Rearrangements Leading to MLL Gene Fusions: Clinical and Biological Aspects. *Cancer Res.* **68**, 10024–10027.
33. Hernández, A. F. & Menéndez, P. (2016). Linking Pesticide Exposure with Pediatric Leukemia: Potential Underlying Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **17**.
34. Le, H. *et al.* (2009). Rearrangements of the MLL Gene are Influenced by DNA Secondary Structure, Potentially Mediated by Topoisomerase II Binding. *Genes. Chromosomes Cancer* **48**, 806–815.

35. Zerrouki, R., Benhassine, T., Bensaada, M., Lauzon, P. & Trabzi, A. (2016). The complex translocation (9;14;14) involving IGH and CEBPE genes suggests a new subgroup in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Genet. Mol. Biol.* **39**, 7–13.
36. Dyer, M. J. S. (2010). Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers? *Blood* **115**, 1490–1499.
37. IGH immunoglobulin heavy locus [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Recuperado el 27 de Abril de 2017, de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3492>.
38. Sudhakar, N., Rajkumar, T., Rajalekshmy, K. R. & Nancy, N. K. (2017). Characterization of clonal immunoglobulin heavy (IGH) V-D-J gene rearrangements and the complementarity-determining region in South Indian patients with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Res.* **52**, 55–61.
39. Matsuda, F. *et al.* (1998). The Complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus. *J. Exp. Med.* **188**, 2151–2162.
40. Moorman, A. V. *et al.* (2012). IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 3100–3108.
41. Russell, L. J. *et al.* (2014). IGH @ Translocations Are Prevalent in Teenagers and Young Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia and Are Associated With a Poor Outcome. *J. Clin. Oncol.* **32**, 1453–1462.
42. Huh, J., Mun, Y. C., Yoo, E. S., Seong, C. M. & Chung, W. S. (2015). Submicroscopic Deletions of Immunoglobulin Heavy Chain Gene (IGH) in Precursor B Lymphoblastic Leukemia with IGH Rearrangements. *Ann. Lab. Med.* **35**, 128–131.
43. Borkhardt, A., Wilda, M., Fuchs, U., Gortner, L. & Reiss, I. (2003). Congenital leukaemia after heavy abuse of permethrin during pregnancy. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **88**, F436–F437.
44. Lafiura, K. M. *et al.* (2007). Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21). *Pediatr. Blood Cancer* **49**, 624–628.

45. Lu, C. *et al.* (2015). Chlorpyrifos Induces MLL Translocations Through Caspase 3-Dependent Genomic Instability and Topoisomerase II Inhibition in Human Fetal Liver Hematopoietic Stem Cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **147**, 588–606.
46. Navarrete-Meneses, M. P. *et al.* (2017). "Exposure to the insecticides permethrin and malathion induces leukemia and lymphoma-associated gene aberrations in vitro". *Toxicol. In Vitro* **44**, 17–26.
47. Schnyder, S. *et al.* (2009). Estrogen treatment induces MLL aberrations in human lymphoblastoid cells. *Leuk. Res.* **33**, 1400–1404.
48. van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S. B. *et al.* (2007). Dietary flavonoids induce MLL translocations in primary human CD34+ cells. *Carcinogenesis* **28**, 1703–1709.
49. Roulland, S. *et al.* (2004). Characterization of the t(14;18) **BCL2-IGH** Translocation in Farmers Occupationally Exposed to Pesticides. *Cancer Res.* **64**, 2264–2269.
50. Alexander, F. E. *et al.* (2015). Transplacental Chemical Exposure and Risk of Infant Leukemia with MLL Gene Fusion. *Cancer Res.* **61**, 2542–2546.
51. Pesticides 101 | Pesticide Action Network. *Pesticide Action Network*. Recuperado el 2 de mayo de 2017, de: <http://www.panna.org/pesticides-big-picture/pesticides-101>.
52. Cristán Frías, A. *et al.* (2000). *Características de peligrosidad ambiental de plaguicidas*.
53. Cox, C. (1998). Permethrin | Insecticide Fact sheet. *JPP* **18**.
54. Permethrin. *IARC Monogr.* **53**, 331–349
55. IARC Monographs- Classifications. *International Agency for Research on Cancer*. Recuperado el 2 de Mayo de 2017, de: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php.
56. Cox, C. (2003). Malathion | Insecticide Fact sheet. *J. Pestic. Reform* **23**.
57. Gervais, J. A., Luukinen, B., Buhl, K. & Stone, D. Malathion Technical Fact Sheet. *National Pesticide Information Center* (2009). Recuperado el 4 de Mayo de 2017, de: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/malatech.html>.
58. Malathion. *IARC Monogr.* **112**, 124

59. Guyton, K. Z. *et al.* (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* **16**, 490–491.
60. Alavanja, M. C. R. & Bonner, M. R. (2012). Occupational Pesticide Exposures and Cancer Risk: A Review. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **15**, 238–263.
61. Ding, G. *et al.* (2012). Pyrethroid Pesticide Exposure and Risk of Childhood Acute Lymphocytic Leukemia in Shanghai. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 13480–13487.
62. Tisch, M., Schmezer, P., Faulde, M., Groh, A. & Maier, H. (2002). Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* **259**, 150–153.
63. Titenko-Holland, N. *et al.* (1997). Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutat. Res.* **388**, 85–95.
64. Pluth, J. M., Nicklas, J. A., O'Neill, J. P. & Albertini, R. J. (1996). Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro malathion exposure. *Cancer Res.* **56**, 2393–2399.
65. Błasiak, J., Jałoszynski, P., Trzeciak, A. & Szyfter, K. (1999). In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat. Res.* **445**, 275–283.
66. Sundaramoorthy, R., Velusamy, Y., Balaji, A., Mukherjee, A. & Chandrasekaran, N. (2016). Comparative cytotoxic and genotoxic effects of permethrin and its nanometric form on human erythrocytes and lymphocytes in vitro. *Chem. Biol. Interact.* **257**, 119–124.
67. Turkez, H. & Aydin, E. (2013). The genoprotective activity of resveratrol on permethrin-induced genotoxic damage in cultured human lymphocytes. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **56**, 405–411
68. Undeğer, U. & Başaran, N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch. Toxicol.* **79**, 169–176.
69. Channa, K. *et al.* (2012). Regional variation in pesticide concentrations in plasma of delivering women residing in rural Indian Ocean coastal regions of South Africa. *J. Environ. Monit. JEM* **14**, 2952–2960.

70. Sharma, A. K., Tiwari, U., Gaur, M. S. & Tiwari, R. K. (2016). Assessment of malathion and its effects on leukocytes in human blood samples. *J. Biomed. Res.* **30**, 52–59.
71. Leng, G., Kühn, K. H. & Idel, H. (1997). Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: applications and limitations. *Sci. Total Environ.* **199**, 173–181.
72. Lakatošová, M. & Holečková, B. (2007). Fluorescence in situ hybridisation. *Biologia (Bratisl.)* **62**, 243–250.
73. Levsky, J. M. & Singer, R. H. (2003). Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J. Cell Sci.* **116**, 2833–2838.
74. Vysis FISH Chromosome Search - Chromosome 14 | Abbott Molecular. Recuperado el 4 de Mayo de 2017, de: <https://www.molecular.abbott/int/en/chromosome/14>.
75. Vysis FISH Chromosome Search - Chromosome 11 | Abbott Molecular. Recuperado el 4 de Mayo de 2017, de: <https://www.molecular.abbott/int/en/chromosome/11.html>.
76. Alatorre Eden-Wynter, Gallága Solórzano, R. del C., Conde Moo, P. del C. & Rosales Castillo, J. A. (2016). Catálogo de Plaguicidas 2016.
77. FAO.org. FAOSTAT. Pesticide used in Mexico. Recuperado el 7 de Julio de 2017, de : <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>.
78. Devore, C. D., Schutze, G. E. & Diseases, T. C. on S. H. and C. on I. (2015). Head Lice. *Pediatrics* **135**, e1355–e1365.
79. van den Berg, H. *et al.* (2012). Global Trends in the Use of Insecticides to Control Vector-Borne Diseases. *Environ. Health Perspect.* **120**, 577–582.
80. Kawada, H. *et al.* (2014). Insecticidal and repellent activities of pyrethroids to the three major pyrethroid-resistant malaria vectors in western Kenya. *Parasit. Vectors* **7**, 208.
81. Secretaría de Salud & Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Perfil epidemiológico del cáncer en niños y adolescentes en México. Recuperado el 10 de Julio de 2017, de: https://epidemiologiatlax.files.wordpress.com/2012/10/p_epi_del_cancer_en_nic3b1osyad_olescentes_mexico.pdf.

82. Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **Appendix 3**, Appendix 3B.

83. Jamalzadeh. *et al.* (2016). Cytotoxic Effects of Some Common Organic Solvents on MCF-7, RAW-264.7 and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Avicenna J. Med. Biochem.* **4**.

84. Moore, P. D., Yedjou, C. G. & Tchounwou, P. B. (2010). Malathion-Induced Oxidative Stress, Cytotoxicity and Genotoxicity in Human Liver Carcinoma (HepG2) Cells. *Environ. Toxicol.* **25**, 221–226.

85. Wang, X. *et al.* (2016). Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environ. Res.* **149**, 86–104.

86. Zemruski, N. C. L., Stache, V., Haefeli, W. E. & Weiss, J. (2012). 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal. Biochem.* **429**, 79–81.

87. Glukhov, S. I. *et al.* (2013). The Broken MLL Gene Is Frequently Located Outside the Inherent Chromosome Territory in Human Lymphoid Cells Treated with DNA Topoisomerase II Poison Etoposide. *PLoS ONE* **8**.

88. Libura, J., Slater, D. J., Felix, C. A. & Richardson, C. (2005). Therapy-related acute myeloid leukemia-like *MLL* rearrangements are induced by etoposide in primary human CD34⁺ cells and remain stable after clonal expansion. *Blood* **105**, 2124–2131.

89. Betti, C. J. *et al.* (2005). Cleavage of the *MLL* gene by activators of apoptosis is independent of topoisomerase II activity. *Leukemia* **19**, 2289–2295.

90. Gole, B. & Wiesmüller, L. (2015). Leukemogenic rearrangements at the mixed lineage leukemia gene (*MLL*)—multiple rather than a single mechanism. *Front. Cell Dev. Biol.* **3**.

91. Sun, J.-M., Chen, H. Y. & Davie, J. R. (2001). Effect of Estradiol on Histone Acetylation Dynamics in Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 49435–49442.

92. Chen, H. *et al.* (2002). Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health A* **65**, 1419–1435.

93. Lindsey, R. H., Bender, R. P. & Osheroff, N. (2005). Effects of benzene metabolites on DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha: 1,4-hydroquinone is a topoisomerase II poison. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 761–770.

94. Taxvig, C. *et al.* (2013). In vitro - in vivo correlations for endocrine activity of a mixture of currently used pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **272**, 757–766.
95. Chiu, B. C. *et al.* (2006). Agricultural pesticide use and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **108**, 1363–1369.
96. Garry, V. F. *et al.* (1996). Pesticide applicators with mixed pesticide exposure: G-banded analysis and possible relationship to non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* **5**, 11–16.

ANEXOS

ANEXO 1. Carta de consentimiento informado

Ciudad de México a ____ de _____ de 2016

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

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

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

Atentamente,

Donador

Firma

Testigo

Firma

Testigo

Firma
