

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

---

**Tesis Doctoral**

**PREVENCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS POR S-ADENOSIL-L-METIONINA**

**Presenta**

**M. en C. Tzutzuy Ramírez Hernández**

**Tutor**

Dr. Luis A. Herrera Montalvo

**Comité Tutelar**

Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dr. Luis F. Jiménez García



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.

## **Agradecimientos**

Yo, Tzutzuy, una estudiante que piso por primera vez un aula de escuela pública a los 17 años, al ingresar a la Universidad Nacional Autónoma de México, agradezco infinitamente a esta Institución y a su comunidad la educación que me proporcionaron durante la mayor parte de mi enseñanza superior, así como las experiencias vividas cada día, la posibilidad de enfrentarme a la realidad de nuestro país y por mostrarme que todos somos iguales sin importar nuestra clase social.

La presente tesis significa para mí la realización de lo que alguna vez fue un sueño vago cuando a los 15 años observé por primera vez el movimiento celular, al analizar con un microscopio simple el movimiento un tanto cuanto aberrante de los Rotíferos al alimentarse. Además, esta tesis me ha permitido soñar nuevamente, ya que durante mi estancia Doctoral en Alemania comprendí que mi vida habrá de estar ligada por siempre al estudio de la mitosis y el movimiento cromosómico, por lo que ahora el reto será contribuir al entendimiento de la mitosis en el estado normal y patológico.

Hoy, la misma estudiante rechazada en la licenciatura en Investigaciones Biomédicas por “carecer de perfil científico”, presenta una tesis Doctoral en Investigaciones Biomédicas. Los datos obtenidos de esta tesis constituyen 4 artículos científicos internacionales, es por esto que agradezco especialmente a la Facultad de Ciencias, a sus docentes y al Dr. Luis A. Herrera la educación y el apoyo brindado durante mis estudios de Licenciatura, Maestría y Doctorado, así como a la Universidad de Wurzburg y mis colaboradores alemanes por las facilidades ofrecidas durante mi estancia Doctoral.

Agradezco infinitamente a mis Padres pues gracias a ellos hoy sigo viva, gracias por el amor, la comprensión, los valores y la fortaleza que me han inculcado siempre. A mis hermanos gracias porque sin ellos la vida nunca hubiera sido vida, a Eva por darnos la felicidad más grande que tenemos, Alitzel. A la pequeña Alitzel porque para ella Chucho significa mucho más que solo una palabra.

## **Agradezco a**

La Universidad Nacional Autónoma de México la educación que me ha brindado durante mi educación superior.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología así como a la Dirección General de Posgrado por el apoyo brindado durante mis estudios de Posgrado en la UNAM.

A la DAAD y la Universidad de Wurzburg, Alemania, por hacer posible mi estancia doctoral.

### **A los miembros de mi comité Tutelar**

Dra. Ma Eugenia Gonsebatt Bonaparte, IIB, UNAM.

Dr. Luis Felipe Jiménez García, Fac. Ciencias, UNAM.

### **A los miembros del Jurado de exámen de grado**

Presidente: Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas, IFC, UNAM.

Secretario: Dr. Luis A. Herrera Montalvo, IIB, UNAM.

Vocal: Dr. Raymundo Cea Olivares, IQ, UNAM.

Vocal: Dr. Fabio Salamanca Gómez, Fac. Medicina, UNAM.

Vocal: Dra. Sara Frías Vázquez, Fac. Ciencias, UNAM.

Al Instituto Nacional de Cancerología las oportunidades y facilidades ofrecidas durante mis estudios de Docotrado, especialmente al Dr. Alejandro Mohar Betancourt, Dr. Alfonso Dueñas González, el Dr. Luis A. Herrera Montalvo y a la técnico Helena

**Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Carcinogénesis del Dr. Luis A. Herrera Montalvo de la Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM-Instituto Nacional de Cancerología, México.**

## **Agradecimientos especiales**

**Luis A. Herrera Montalvo**, gracias por los más o menos 10 años de múltiples enseñanzas, por ser el tutor más enérgico que he tenido, lo que me ha permitido conducir mis experimentos y el análisis de los mismos con la verdad. Además, por confiar en mí y darme la libertad de poder diseñar mis propios experimentos, por todo esto y por tu paciencia, gracias.

**Luis Felipe Jiménez García**, gracias por ser uno de mis mejores maestros, por inculcar en mí el amor por la biología celular, y además por confiar en que algún día podré hacer biología celular de impacto internacional.

**Prof Dr. Helga Stopper:** Vielen Dank, dass Sie mir gezeigt haben, dass das Wichtigste an einen Studenten, der Student selbst ist und nicht die Daten die er oder sie produziert.

**Robert Hock:** Dankeschön, für die Aufnahme in Deinem Labor, ohne dass Du etwas über mich und meinen Arbeitsstil wusstest. Dank Dir besteht für mich eine Möglichkeit in der Zukunft mit Epigenetik zu arbeiten.

**Jan Brocher:** Danke, dass du dein Leben mit mir teilst und dass du mir gezeigt hast, dass mein kalte Deutschland gar nicht so kalt ist. Dank dir wird mein Herz immer in Deutschland, meiner zweiten Heimat sein. Wie schon Mána gesagt haben: Ohne dich zu leben, ist wie sterben ohne tot zu sein.

**Bernardo Ochoa y Gabriel Elia,** mis mejores amigos, gracias por haber estado conmigo en los momentos más difíciles de mi vida. Aunque estemos en extremos opuestos del mundo siempre los llevo en mi corazón.

**Thomas Fisher und Sascha Just:** Ihr beide wart die besten Arbeitskollegen, die ich je hatte. **Helena,** mil gracias por tu apoyo incondicional.

Mis amados Brasileños, **Neto Abreu, Gustavo Kuhn, Beatriz Poetri** como olvidarlos, vaya que por ustedes la vida siempre fue más fácil.

My dear friends, **Laila, Hannah, Kathrin, Thomas, Berta, Sascha, Paul, Hannes, Martin** and **Bernhard** thanks for your friendship.

Gracias a los niños de mi nuevo lab que alguna vez fue el viejo lab, **Miguel, Marco, Lisanderman, Rox, Trujillón, Rod, Alex, Alfredo, Eunice y Julia.**

**MaryAmparo de la Vega,** mil gracias por ayudarme a comprender quién soy y a aceptarme como soy.

Especial gracias a **todos aquellos** que siempre pusieron o siguen poniendo obstáculos en mi camino, gracias a todos ustedes ahora soy mucho más fuerte y valiente, recuerden que lo que no mata hace más fuerte.

Esta tesis está dedicada a mis padres, Antonio Ramírez Medina y María de la Paz Hernández Sánchez, a mis hermanitos, Ramsés, Hail-lú y Evita, a la pequeña Ali y al amor de mi vida, Jan.

**El futuro le pertenece a aquellos  
que creen en sus sueños.**



## ÍNDICE

**Abreviaturas**

**Resumen**

**Abstract**

**Introducción**

**Planteamiento del problema**

**Diseño experimental**

**Objetivo General**

**Objetivos particulares**

**Hipótesis**

**Material y Métodos**

**Resultados**

**Discusión**

**Conclusiones**

**Referencias**

**ANEXO I:**

Ramirez T., Eastmond D.A. Herrera, L.A. (2007) Non-disjunction events induced by albendazole and its active metabolite, albendazole sulphoxide in human cells. Mutation Res 626: 191-195.

**ANEXO II:**

Ramirez T, Stopper H, Hock, R and Herrera LA. (2007) Prevention of aneuploidy by s-adenosyl-methionine. Mutation Res 617: 16-22.

## ABREVIATURAS

ABZ	Albendazol
ATM	Ataxia telangiectasia mutado
ATP	Trifosfato de adenosilo
NaAsO <sub>2</sub>	Arsenito de sodio
COMT	Centro organizador de microtúbulos
CpG	Secuencias palindrómicas ricas en citosinas-guaninas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	ADN metilo transferasas
EO	Estrés oxidativo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
GAM	Grupo de alta movilidad
HC	Homocisteína
ICF	Inestabilidad centromérica y anomalías faciales
IF	Inmunofluorescencia
IN	Índice nuclear
M	Mitosis
MAT	Metionina adenosil transferasa
MN	Micronúcleo
MT	Microtúbulos
MTHF	Metilentetrahidrofolato
NDZ	Nocodazol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVF	Proteína verde fluorescente

S	Síntesis
SAM	S-adenosil-l-metionina
SAH	S-adenosil-l-homocisteína
SOABZ	Sulfóxido de albendazol
TSA	Tricostatina

## **RESUMEN**

Las aneuploidías representan un problema de salud importante. Cuando estas ocurren en células germinales son las responsables de distintos síndromes en la prole y de abortos espontáneos, en tanto que cuando suceden en células somáticas, se piensa están relacionadas con el desarrollo de enfermedades como el cáncer.

Si bien se conocen las consecuencias biológicas de las aneuploidías, los mecanismos por los cuales se generan aún son poco claros. De manera general se acepta que las aneuploidías se generan ya sea por rezago cromosómico o por eventos de no disyunción, ambos tipos de fenómenos pueden ser inducidos por la exposición a agentes químicos. En el 2003, se demostró que el daño al ADN expresado como micronúcleos (MN) resultado de la exposición a agentes químicos que alteran el citoesqueleto es contrarrestado por la adición del donador universal de grupos metilo, s-adenosil-metionina (SAM).

En la presente tesis se estudiaron los posibles mecanismos por los cuales SAM actúa reduciendo la frecuencia de células micronucleadas, los resultados muestran que SAM reduce la frecuencia de células aneuploides producto del rezago cromosómico, efecto que parece estar relacionado con la promoción de la polimerización de la tubulina por parte de SAM, además de que este promueve la formación de husos mitóticos bipolares aún en presencia de agentes que inducen centrosomas supernumerarios. En cuanto a los cambios en el ciclo celular, SAM tiene la capacidad de promoverla y de contrarrestar los efectos citostáticos de la exposición a arsenito de sodio durante la mitosis, efectos que pueden estar asociados con su capacidad de promover el correcto alineamiento cromosómico, evitando así el arresto en metafase.

SAM mostró la capacidad de participar y regular el estado epigenético de las células tratadas con arsenito de sodio, efecto que muy probablemente puede relacionarse con la regulación de diversos eventos celulares, como la segregación cromosómica.

En conclusión, nuestros datos aportan nuevos e importantes avances para el entendimiento de los mecanismos por los cuales se generan la aneuploidías en células somáticas.

## **ABSTRACT**

Aneuploidy represents an important problem of health. When it occurs on germ cells it causes several syndromes in the offspring, as well as spontaneous abortion. If aneuploidy occurs in somatic cells, it has been related to the development of diseases such as cancer.

Although the biological consequences of aneuploidy are well known, the mechanisms that generate it are so far unclear. In general, it is accepted that aneuploidy is generated by lagging chromosomes or by non-disjunction events, both phenomena could be induced by the exposure to chemical agents. In 2003, a study reported that the exogenous addition of s-adenosyl-methionine (SAM) reduces DNA alterations, expressed as micronuclei (MN), induced by cytoskeleton disrupting agents.

In the present thesis it was studied the possible mechanisms by which SAM could reduce the frequency of MN. Our data demonstrate that SAM reduces the frequency of aneuploid cells result of lagging chromosomes, effect that was related to the promotion of microtubule polymerization in cultures treated with SAM. Furthermore, SAM promotes the formation of bipolar mitotic spindles, even in presence of agents that induced supernumerary centrosomes. In addition, SAM was able to induce cell proliferation and to counteract the cytostatic events induced by sodium arsenite during mitosis, effect that could be related to the ability of SAM to promote the correct chromosome alignment.

SAM is able to regulate chromatin effects induced by sodium arsenite, effect that could be related to several cell processes, such as chromosome segregation.

In conclusion, our data provide new and important data to understand the mechanisms by which aneuploidy is produced in somatic cells.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La aneuploidía es el cambio en el número cromosómico de una célula normal diploide o haploide de un organismo (Hassold y Hunt, 2001). Dicho cambio genético se ha asociado a un incremento en el riesgo de cáncer y defectos en el desarrollo (Li y cols., 2000). Las monosomías y trisomías son las aneuploidías más comunes que son viables, y son reconocidas como la causa de diversas enfermedades genéticas en seres humanos (Straus, 1981). Las consecuencias biológicas de la aneuploidía son bien conocidas, ya que si este fenómeno ocurre en células germinales, el daño puede transmitirse a la siguiente generación, causando defectos en el nacimiento (por ejemplo los síndromes de Down y Turner) o bien generar abortos espontáneos (Pacchierotti y Ranaldi, 2006). Al menos el 15% de las concepciones en seres humanos son aneuploides, aunque la mayoría de los embriones anormales se pierden antes de la implantación, otros después de ésta, y sólo el 0.3-0.5% de los niños nacidos vivos tienen anomalías cromosómicas (Boué y cols., 1975, Lewis, 1997).

Cuando la pérdida o ganancia cromosómica involucra células somáticas se puede causar la muerte celular o bien participar en el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Desde 1914, Boveri señaló la existencia de una relación entre las anomalías cromosómicas numéricas y el cáncer. De hecho este tipo de alteraciones genéticas es común en todos los tumores malignos (Duesberg y cols., 2000; Nabeel y cols., 2002).

Diversos mecanismos se han propuesto para explicar la inducción de aneuploidías en células somáticas, en general se aceptan dos: a) pérdida cromosómica, b) la no disyunción (Cimini y cols., 2001; Matzke y cols., 2003).

Los eventos celulares y moleculares que ocurren durante la formación de células aneuploides aún no se han podido describir, se sugiere que tanto la no disyunción, como el rezago cromosómico se originan por alteraciones en la maquinaria de segregación

cromosómica durante la mitosis o meiosis, según sea el caso de células somáticas o germinales respectivamente (Hassold y cols., 1996).

Las alteraciones en componentes involucrados en la separación de las cromátidas hermanas, así como errores de anclaje de los microtúbulos (MT) a la placa cinetocórica, se han propuesto como algunos de los mecanismos responsables de la no disyunción (Nasmyth, 2002; Cimini y cols., 2001). El retraso de los cromosomas, se sugiere puede originarse por fallas en el punto de monitoreo de la metafase, de tal manera que no se detecte el anclaje de los cromosomas a los MT en el tiempo correcto (Lopes y Sunkel, 2003).

Las alteraciones en los MT durante la migración de las cromátidas hermanas a los polos opuestos en la anafase se han sugerido como posibles inductoras de rezago cromosómico (Parry y cols., 2002), este rezago puede resultar en la formación de micronúcleos (MN), los cuales son fragmentos nucleares que se incorporan al azar en el citoplasma de alguna de las células hijas. Los MN producidos por agentes aneugénicos tienen en su mayoría cromosomas completos en su interior, efecto que se ha analizado ya sea mediante anticuerpos anticinetocoro, (Degrassi y Tanzarella, 1988; Hennig y cols., 1988) o por el uso de una sonda de DNA que detecta regiones centroméricas o pancentroméricas (Eastmond y Pinkel, 1990; Farooqui y cols., 1993, Marshall y cols, 1996).

La aneuploidía puede ocurrir de manera espontánea o como resultado de una exposición a agentes aneugénicos de origen químico, físico o biológico (Parry y cols., 2002). En el caso de la exposición a ciertos compuestos aneugénicos, se sabe que estos alteran ciertas proteínas, como la tubulina, dineína y dinactina, lo que a su vez genera fallas en la migración de los cromosomas (Kirsch-Volders y cols., 2003; Ochi, 2002; Parry y cols., 2002). Otras condiciones que pueden originar aneuploidías en seres

humanos están asociadas con factores metabólicos. Sin embargo, al respecto se ha generado gran controversia, ya que por un lado existen estudios que apoyan este hecho (James y cols., 1999; Hoobs y cols., 2002) en tanto que estudios similares no muestran ningún tipo de asociación significativa entre la inducción de aneuploidías y ciertas deficiencias metabólicas o nutricionales (Hassold y cols., 2001).

### **¿Cómo se pueden evaluar las aneuploidías?**

Las aneuploidías pueden tener un gran impacto sobre la salud humana, por lo que es importante contar con métodos para detectar el potencial de agentes químicos o biológicos capaces de inducir tales cambios. Aunque los métodos más comunes incluyen el conteo metafásico de los cromosomas, inducción de MN con cromosomas completos, el método que se ha utilizado ya desde hace más de una década es la detección de pérdida cromosómica por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en la cual se utilizan sondas de DNA, principalmente, las cuales están marcadas fluorescentemente y además se acoplan por apareamiento de bases con los sitios cromosómicos que contienen la secuencia homóloga (Parry y cols., 1995). Dado que existen varios métodos para evaluar las aneuploidías, es importante elegir el adecuado dependiendo del objetivo del estudio que se realiza. Si bien la formación de MN es una de las metodologías más confiables y prácticas para analizar genotoxicidad en células somáticas (Bonassi y Au, 2002; Parry y cols., 2002), ésta debe combinarse con otras metodologías como FISH para determinar el tipo de daño englobado en el MN, ya que éstos pueden originarse de fragmentos cromosómicos o del rezago de cromosomas completos que ocurre en la anafase durante la división nuclear (Fenech, 2000).

Existen reportes que demuestran que el tratamiento con agentes disruptores de los MT, como colchicina, taxol, albendazol (ABZ), vinblastina (VNB), etc, incrementa

la frecuencia de células con MN más del 80% comparado con el control, y más del 90% de éstos contienen cromosomas completos (Barnes y cols., 2002; Basso y Russo, 2000; Leopardi y cols., 2002; Russo y cols., 1996), por lo que podría considerarse a la prueba de MN como una herramienta de tamizaje rápida y confiable, que nos permite obtener datos de exposición poblacional en corto tiempo.

La combinación de MN con FISH es una herramienta muy poderosa, ya que puede revelar el mecanismo por el cual se generó el daño al DNA. De tal forma que, el empleo de FISH representa grandes ventajas sobre cualquier otro análisis citogenético de evaluación de aneuploidias, ya que nos permiten la detección de los eventos de no disyunción, los cuales ocurren a menores concentraciones a las que ocurre el retraso cromosómico y cuyo análisis ha sido siempre subevaluado debido a falta de metodologías para su detección.

En un estudio realizado por Ramírez y colaboradores, cuyo objetivo fue analizar los eventos de no disyunción inducidos por un antiparasitario ampliamente utilizado en México, el ABZ, y su metabolito activo, el sulfóxido de albendazol (SOABZ), aplicamos la metodología de FISH en linfocitos humanos tratados *in vitro* con diferentes concentraciones de ABZ y SOABZ (Ramírez y cols., 2007). Los resultados obtenidos de este estudio corroboraron el potencial y la sensibilidad de esta metodología para la detección de aneuploidías a bajas dosis. Nuestros datos revelaron que tanto el ABZ como el SOABZ incrementan significativamente la frecuencias de eventos de no disyunción de los cromosomas 1 y 7 a dosis menores a las cuales inducen MN (Ramírez y cols., 2001). Además de un incremento en MN en células mononucleadas, lo que se ha reportado como efecto de agentes que interfieren con el citoesqueleto, esto correlaciona con su capacidad de interferir en la polimerización de la tubulina.

Si bien son indiscutibles los grandes beneficios y el impacto en la salud humana el empleo de este fármaco, nuestros datos sugieren que el uso indiscriminado de este fármaco podría no ser tan inocuo como se había reportado, por lo que se sugieren estudios más detallados acerca de sus efectos adversos, sobre todo en personas con poca carga parasitaria y que reciben dosis similares a las administradas a personas con altos índices de parasitosis.

### **¿Cuáles son las causas de las aneuploidías?**

Las causas de las aneuploidías en los tejidos humanos aún no son claras, sin embargo, se sugiere que la exposición a agentes químicos, físicos o inclusive biológicos pueden causarlas, además, se ha especulado sobre el papel de los micronutrientes como un factor importante en su inducción (James y cols., 1999), así como otro tipo de alteraciones de tipo endógenas, como polimorfismos en genes involucrados en el control de los puntos de monitoreo del ciclo celular.

### **Inducción de aneuploidias por alteraciones en el metabolismo de los grupos metilos**

El metabolismo de los grupos metilo está posiblemente involucrado en la generación de células aneuploides dado que las deficiencias en folatos pueden inducir la desmetilación de la heterocromatina, causando defectos estructurales del centrómero, efecto que puede inducir una distribución anormal de los cromosomas durante la división nuclear (Fenech, 2001). James y colaboradores (James y cols., 1999) encontraron que el metabolismo anormal de los folatos y el polimorfismo en el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa puede ser un factor de riesgo maternal para el síndrome de Down.

El consumo inadecuado de folatos durante la etapa materna y el embarazo, se asocia con un incremento en el riesgo de leucemia en niños resultado de tales embarazos (Thompson, 2001), y estas leucemias frecuentemente involucran las aneuploidías del cromosoma 17 y 21 (Nordgren, 2002). Por lo tanto, es importante el verificar si la deficiencia en folatos incrementa el riesgo de aneuploidía de los cromosomas 17 y 21, ya que podrían ser factores de riesgo para defectos del desarrollo, y algunos tipos de cánceres (Wang y cols., 2004).

La desmetilación de regiones altamente repetitivas en los cromosomas de mamífero puede dar origen a la activación de más de un centrómero y con ello alterar la separación y segregación de los cromosomas dando origen a células aneuploides (Amor y Choo, 2002). El tratamiento con 5-azacitidina (un agente desmetilante del DNA) induce eventos de no disyunción (Foss y cols., 1993). Existe evidencia de que el metabolismo anormal de los folatos, y en general de los grupos metilo, puede permitir el desarrollo de hipometilación genómica y la segregación anormal de los cromosomas (Lucock, 2000). Datos tanto clínicos como experimentales demuestran que la hipometilación del ADN genómico está asociada con la inestabilidad cromosómica y la segregación anormal. El síndrome ICF (Deficiencia inmune, Inestabilidad centromérica y Anormalidades faciales) se caracteriza por la hipometilación pericentromérica (Ji y cols., 1997) y segregación cromosómica anormal (Jeanpierre y cols., 1993). Además, algunos autores han sugerido que la inestabilidad cromosómica, así como la aneuploidía mostrada por los tumores humanos está relacionada en gran proporción con la hipometilación del DNA (Lengauer et al., 1997; Qu et al., 1998). De todos estos y otros estudios se ha derivado la hipótesis que postula que el metabolismo anormal de los grupos metilo está asociado con el incremento en la inducción de aneuploidías.

### **La molécula clave del metabolismo de los grupos metilo, SAM.**

Si bien mucho se habla de la asociación de aneuploidías a las alteraciones en el metabolismo de los grupos metilo, es importante mencionar que una de las moléculas clave en este metabolismo es la s-adenosil-l-metionina (SAM), responsable principalmente de las reacciones de metilación en las células.

La metilación es un proceso durante el cual se donan grupos metilo a moléculas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Lu, 2000), un incremento en la metilación de la citosina en los dinucleótidos CpG, particularmente en las regiones promotoras 5' de los genes de mamíferos, generalmente se asocia con una disminución en la expresión génica (Jones y Laird, 1999).

Las alteraciones en los patrones de metilación del DNA de las células de mamíferos juegan un papel central en la expresión génica específica de tejidos, así como en procesos fisiológicos como el envejecimiento y en la carcinogénesis (Poirier, 1994). Las modificaciones post-transduccionales en las proteínas, como la metilación, pueden alterar la orientación estérica, la carga y la hidrofobicidad de la proteína (Ghosh et al., 1990). Estudios recientes acerca de la función de la metilación de las proteínas han mostrado que este proceso contribuye a la estabilización de estas macromoléculas cuando la célula enfrenta una situación de estrés (Ladino y O'Connor, 1992; Wang et al., 1992). Por otro lado, la metilación de los fosfolípidos de las membranas celulares es una vía alterna para la formación de fosfatidilcolina a partir de fosfatidil-N-monometiletanolamina, además de ser un evento crucial para el mantenimiento de la fluidez de la membrana, y por lo tanto para la regulación de la traducción de señales, el transporte de calcio y la activación de otras moléculas (Turchetti y cols., 2000). Como mencionaba anteriormente, las reacciones de metilación son catalizadas por enzimas

transmetilasas específicas para cada tipo de molécula blanco, sin embargo, hasta el momento sólo se conoce un donador de grupos metilo: SAM.

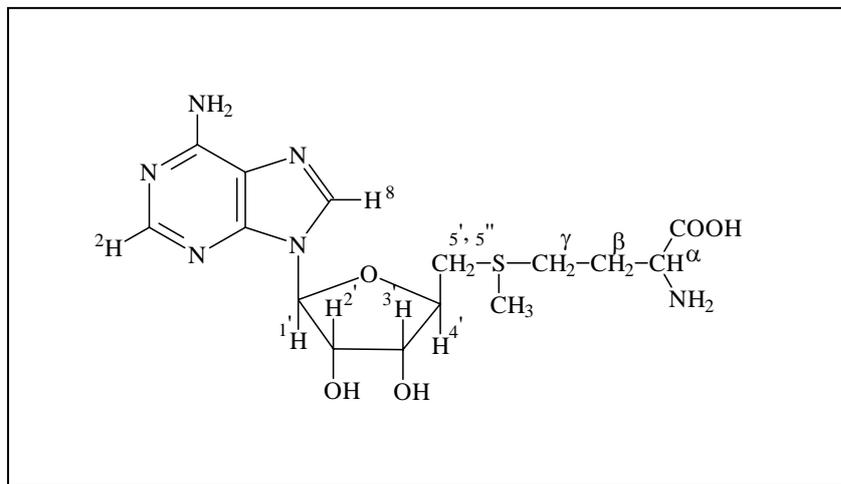
### **¿Qué es la S-adenosil-L-metionina?**

La S-adenosil-L-metionina (Figura 1) es la molécula donadora de grupos metilo, descrita por primera vez en 1953 (Cantoni, 1953). Los sustratos precursores de SAM son la metionina y el adenosilo del ATP, ambos interaccionan en una reacción sintetizada por la metionin adenosil transferasa (MAT).

SAM ha sido considerada como el segundo cofactor más importante después del ATP, ya que participa en diversos procesos bioquímicos, como la transmetilación, la transulfuración y la aminopropilación. En mamíferos es producida en el citoplasma de todas las células, pero son los hepatocitos los que generan más del 70 % del SAM en el organismo (Lu, 2000). La biosíntesis de SAM requiere del grupo adenosilo del ATP y de la metionina como molécula aceptora. Si bien SAM se utiliza en diversos procesos bioquímicos, son los de transmetilación en los que se consume la mayor proporción de esta molécula, por lo que se considera que SAM es de gran importancia en la regulación de la expresión génica, la estabilización de proteínas y la comunicación celular al donar su grupo metilo ya sea al DNA, proteínas histonas y no histonas y a ciertos fosfolípidos de membrana (Chiang et al, 1996; Lu, 2000).

SAM es esencial en diversos procesos celulares, por lo que deficiencias en esta molécula se han asociado al desarrollo de enfermedades neurológicas, hepáticas y cáncer, es por eso que se ha utilizado en el tratamiento de algunos de estos males. Al SAM se le han adjudicado propiedades como antidepresivo, anti-artrítico, además de ser utilizado como medicamento contra la colestasis, cirrosis hepática, migraña y fibromialgia (Chiang et al, 1996; Fetrow y Avila, 2001). SAM se ha utilizado para el

tratamiento de la depresión desde hace más de 40 años, además se le ha considerado como uno de los 25 suplementos alimenticios más importantes (Fetrow y Avila, 2001).



**Figura 1-** Estructura química de la S-adenosil-L-metionina.

Los primeros diez años (1951-1961) del estudio de SAM, se dedicaron básicamente al entendimiento de la bioquímica de su síntesis (Cantoni, 1956) y a los mecanismos y cinética enzimática de las reacciones de transmetilación en moléculas pequeñas (Cantoni, 1960). Además fue también durante este período cuando se descubrió la descarboxilación enzimática de SAM y su papel en la formación de poliaminas (Tabor y cols., 1961). El descubrimiento de la metilación de los fosfolípidos permitió el estudio de SAM en la regulación de la fluidez de las membranas lipídicas (Bremmer y Greenberg, 1961), además se descubrió el papel fundamental de la metilación en las

modificaciones post-transcripcionales del RNA y otros polinucleótidos (Borek y Srinivasa, 1965). La metilación de las proteínas también fue descubierta, y sus repercusiones aún siguen siendo estudiadas, especialmente respecto a la modulación de la transcripción génica (Paik y cols., 1975, Jenuwein y cols., 2005) y se concibió como una visión integral que el proceso de transulfuración va de la mano con el proceso de transmetilación, ya que la generación de glutatión a partir de la homocisteína (HC) necesita que SAM haya donado su grupo metilo durante la transmetilación, y así generar S-adenosil-homocisteína (SAH), para posteriormente convertirse en HC y finalmente esta en cisteína, uno de los tres aminoácidos que conforman la molécula de glutatión (Laster y cols., 1964).

A lo largo de estos 10-15 años la mayoría de las investigaciones se ocupaban del descubrimiento de la gran variedad de reacciones de transmetilación en las cuales SAM estaba involucrada. En 1971, el trabajo de Axelrod abrió el camino para otras investigaciones que correlacionaran los procesos de transmetilación, con los efectos biológicos, ya que demostró que ciertas catecolaminas requieren de la metilación para tener función biológica diferencial, como lo que sucede con la norepinefrina, la cual requiere de la metilación para poder convertirse en epinefrina (Axelrod, 1971; Hirata y Axelrod, 1980). La metilación del DNA es una de las reacciones de transmetilación más relevantes, ya que forma parte de un mecanismo de control de la expresión génica.

### **Síntesis y degradación**

SAM se sintetiza en el citoplasma de todas las células. En los mamíferos son los hepatocitos los que juegan el papel central en el mantenimiento de los niveles de SAM, siendo el hígado el órgano de mayor síntesis y degradación de esta molécula (Lu, 2000).

En él, la síntesis de SAM representa la ruta metabólica preferencial de la metionina ya que más de la mitad de la metionina producida por el organismo es convertida en SAM.

La enzima responsable de la formación de SAM es la MAT, la cual utiliza al ATP como donador y a la metionina como sustrato. En esta reacción, el adenosilo del ATP es transferido a la metionina, formando un ion sulfonio de alta energía que fácilmente puede transferir el grupo metilo que posee, esta reacción es poco común en el sentido de que el átomo de azufre nucleofílico de la metionina ataca el carbono 5' de la ribosa del ATP, liberando trifosfato, en lugar de atacar a uno de los átomos de fósforo, al tiempo que se forma SAM.

Una vez que se ha formado SAM, este puede participar en dos rutas metabólicas, la de descarboxilación o la de transmetilación que conlleva a la de transulfuración y a la regeneración de la metionina al entrar al ciclo de los grupos metilo (Lu, 2000).

En la ruta de la descarboxilación, SAM es una molécula esencial para la formación de las poliaminas, espermina y espermidina ya que es el único donador de grupos aminopropilo, los cuales son añadidos secuencialmente a la putresina, proceso que se lleva a cabo por la descarboxilación de SAM. En este tipo de reacciones, SAM es convertido a SAM descarboxilado que da lugar a la metiltionadenosina. Bajo condiciones normales, esta ruta metabólica gasta no más de 5% del SAM producido al día. Sin embargo, esta puede inducirse bajo condiciones en las cuales se incrementen los requerimientos en las poliaminas, como en la regeneración hepática y en los procesos de hepatocarcinogénesis temprana (Chiang y cols, 1996; Lu, 2000).

SAM es utilizado casi en un 85% en los procesos de transmetilación (Finkelstein y Martin, 2000 y Mudd y Poole, 1975), reacciones en las cuales SAM dona su grupo metilo a una gran variedad de aceptores, una vez que ha donado su grupo metilo, se forma SAH, la cual posteriormente es hidrolizada en HC y esta a su vez puede seguir

dos rutas de degradación, una de ellas es la formación de cistatión y posteriormente de glutatión y así involucrar a SAM en los procesos de transulfuración. La otra ruta consiste en la regeneración de metionina y reiniciar el ciclo de los grupos metilo.

Cuando las concentraciones de SAM son elevadas, la HC se utiliza en la vía de transulfuración. Por el contrario, cuando se tienen niveles bajos de metionina y por tanto concentraciones bajas de SAM, la HC en vez de seguir la ruta a la formación de cisteína, es dirigida al ciclo de metilación para regenerar la metionina por la acción de la metionina-sintetasa, siendo la vitamina B<sub>12</sub> un cofactor de la reacción y el metilen tetrahidrofolato (MTHF), la molécula donadora del grupo metilo (Boulander-Gouaille, 1999).

### **Funciones biológicas de SAM**

Las principales funciones biológicas de SAM están relacionadas con las tres rutas descritas anteriormente. La síntesis de poliaminas, la formación de glutatión y la generación de compuestos metilados. Aunque la reducción de SAM puede teóricamente afectar la síntesis de poliaminas, este no parece ser el caso desde que se inducen enzimas esenciales para la síntesis de poliaminas cuando los niveles de SAM son bajos, siendo este, un mecanismo compensatorio para mantener la síntesis de poliaminas (Thomas y Thomas, 2001). En el caso de los procesos de transulfuración, la importancia de SAM es la de ser el precursor de glutatión, el principal antioxidante celular (Lu, 1999). Los procesos de transmetilación son los más importantes desde el punto de vista de gasto de SAM y de la gran variedad de substratos aceptores, SAM está involucrado en un amplio espectro de procesos celulares, desde la destoxicación de metales, la fluidez de membrana hasta la regulación de la expresión génica (Bottiglieri, 2002).

## **Transmetilación**

Se conoce como transmetilación al paso del grupo metilo de SAM a una gran variedad de moléculas aceptoras, esto se da mediante el ataque nucleofílico de las metiltransferasas sobre el átomo de azufre de SAM. De las primeras moléculas en las que se descubrió este proceso, están las catecolaminas, algunas de las cuales requieren de la metilación para poder realizar su función. A continuación, se describen algunos de los eventos de transmetilación que han sido estudiados con mayor énfasis:

### *a) Metilación de proteínas*

La metilación del extremo amino o carboxilo de la proteína puede conducir la orientación estérica, la carga, hidrofobicidad y provocar un efecto global no sólo en la conformación proteica, sino también en su funcionalidad, es decir, esta modificación post-traducciona l sirve para modular la función de las proteínas, sin alterar su estructura primaria (Stallcup, 2001).

La reacción de metilación de aminácidos más estudiada es la N-metilación de los residuos de arginina, lisina e histidina y la O-metilación de los residuos glutamato e isoaspartato, la COOH- y S- metilación de la cisteína y metionina. Sin embargo, de todas estas reacciones, la más estudiada es la N-metilación de arginina, la cual ocurre en distintas proteínas, muchas de las cuales son de tipo estructural, como las proteínas básicas de la mielina, la nucleolina, fibrilarina, histonas, entre otras, aunque también ocurre en otro tipo de proteínas, como las de choque térmico (Kim y cols., 1998). Esta reacción de metilación se lleva a cabo por la metilasa I, la cual metila el nitrógeno guanidino del residuo de arginina, la reacción genera tres derivados metilados; N<sup>G</sup>-monometilarginina, N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimetilarginina y la N<sup>G</sup>-N<sup>G</sup>-dimetilarginina con la subsiguiente liberación de SAH (Kim y cols., 1998).

Existen diversos ejemplos de la importancia biológica de la metilación de proteínas, por mencionar algunas: las proteínas de choque térmico al encontrarse en un ambiente de estrés celular que propicia la desestabilización de las proteínas, ellas se encuentran metiladas. La metilación reversible de ciertas proteínas de membrana puede estar involucrada en la traducción de señales, como Ras y proteínas relacionadas a las G. La metilación de proteínas también correlaciona con el crecimiento y la diferenciación, en *Escherichia coli*, la metilación de factor de elongación correlaciona con la fase de crecimiento de la bacteria (Kim y cols., 1998).

La metilación de las histonas, que se conoce desde 1967 (Paik y Kim, 1967), es importante para mantener el alto grado de organización de la cromatina (Sewalt y cols., 2002). En seres humanos se descubrió el gen que codifica para la metil transferasa de histona, la cual metila selectivamente a la lisina 9 de la H3, generando afinidad heterocromática por las proteínas HP1, y de esta forma crea subdominios cromosómicos. Este tipo de histonas metiladas se encuentra presente en las regiones de heterocromatina, haciendo una represión génica de tipo local y también formando parte de la heterocromatina (Sewalt y cols., 2002).

Las proteínas del citoesqueleto también son susceptibles de ser metiladas (Schinstine y Iacovitti, 1997; Moephuli y cols., 1997), se ha demostrado que durante la neurulación, tanto los filamentos de actina, como los microtúbulos y los neurofilamentos se encuentran metilados, en este caso, ha sido difícil definir la función de la metilación en estas proteínas, ya que si bien se ha demostrado que la metilación de la histidina 73 de la actina y la lisina 394 de la tubulina no alteran en su totalidad su capacidad de polimerización *in vitro*, no se descarta la posibilidad de que esto sea fundamental para que se asocien con otras proteínas e inclusive para su correcta localización y funcionalidad (Moephuli y cols., 1997)

### *b) Metilación del DNA*

La metilación del DNA genómico en la posición C<sup>5</sup> de las citosinas de las islas CpG (secuencias palindrómicas ricas en citosinas-guaninas que se encuentran en las regiones promotoras de los genes), es un proceso altamente regulado que opera de manera concertada con otros mecanismos reguladores de control de la expresión génica y es la forma predominante de modificación del DNA en plantas y vertebrados (Rizwana y Hahn, 1999; Jeltsch, 2002).

La metilación del DNA está involucrada en un gran número de procesos biológicos, como son: la regulación de la expresión génica tejido específico, la diferenciación celular, el imprinting genómico, la inactivación del cromosoma X, la regulación de la estructura de la cromatina, la duplicación del DNA, la latencia viral, la carcinogénesis y el envejecimiento.

El 3-4% de todas las citosinas en el DNA de los mamíferos están metiladas, muchas de estas citosinas se encuentran en las secuencias de dinucleótidos CpG (Riggs y Jones, 1983; Bird, 1992; Jeltsch, 2002). En el estado de preimplantación ocurre una desmetilación del DNA, lo que trae como resultado un estado de hipometilación del blastocisto, el significado biológico de este fenómeno en las etapas tempranas del desarrollo es aún desconocido, se piensa que es un mecanismo por el cual se eliminan los patrones de metilación específica de los gametos, para la generación de células pluripotenciales en el estado de blastocisto. Poco tiempo después de la implantación, se da una onda de metilación *de novo*, incrementando rápidamente los niveles de metilación genómica durante el desarrollo post-implantación. En tejidos extraembrionarios derivados del trofoectodermo o del endodermo primitivo, los patrones de metilación permanecen bajos durante la gastrulación como si la metilación *de novo* no se hubiera activado en estas células. La metilación *de novo* en ratón también

ocurre durante la diferenciación y maduración de los gametos y probablemente juega un papel crítico en el establecimiento del imprinting genómico de los gametos. El cambio del estado de metilación de genes individuales no siempre sigue la onda de desmetilación o de metilación *de novo* global del DNA (Paulsen y Ferguson-Smith, 2001). Por ejemplo, la metilación diferencial de las islas CpG en las regiones críticas de algunos genes improntados son capaces de escapar el proceso de desmetilación durante el desarrollo de la pre-implantación.

La función de la metilación del DNA en la regulación génica ha sido documentada por numerosos estudios, de los que se ha concluido que ésta correlaciona inversamente a la actividad génica, por ejemplo, la hipermetilación de regiones promotoras correlaciona con una disminución en la expresión génica, como en las islas CpG de los promotores de genes en el cromosoma X inactivo los cuales están altamente metilados; por otro lado la hipometilación de las regiones promotoras coincide con una activación de los genes, como las islas CpG de los mismos genes del cromosoma X, pero ahora del que está activo (Jeltsch, 2002).

La metilación de las islas CpG juega un papel crítico en la carcinogénesis, se han reportado ampliamente las alteraciones locales en la metilación del DNA en un gran número de tumores (Johanning y cols., 2002; Feinberg, 2000). Sin embargo, el vínculo causal entre la metilación del DNA y la actividad génica no ha sido completamente establecido. En ocasiones es poco claro si la metilación del DNA es la causa o la consecuencia del silenciamiento génico y si la metilación del DNA se requiere para el mantenimiento del estado inactivado o reprimido de los genes

Es claro, que la metilación de las citosinas juegan un papel determinante en la tumorigénesis, sin embargo, no sólo por un proceso meramente epigenético, en el cual se desregula la expresión génica, sino que también pueden tener un papel importante en

la mutagénesis del tumor, ya que incrementa la desaminación espontánea de la 5-metilcitosina (Jones y cols., 1992; Gonzalzo y Jones, 1997) e incrementa la afinidad de moléculas reactivas a los sitios metilados CpG (Pfeifer y cols., 2000).

La metilación de las citosinas en el DNA de mamíferos están predominantemente contenidos en regiones simétricas de dinucleótidos CpG, este proceso se lleva a cabo por enzimas conocidas como DNA metil-transferasas (DNMTs), las cuales transfieren el grupo metilo de SAM al C<sup>5</sup> del residuo de citosina en el DNA (Espada y Esteller., 2007; Ducasse y Brown, 2007)

### **SAM como un posible blanco para la acción de agentes xenobióticos**

Además de las reacciones de metilación, durante las cuales se consume más del 80% del SAM intracelular, SAM juega un papel central en la formación de poliaminas así como en reacciones de transulfuración (Chiang y cols., 1996; Guilidori y cols., 1984; Lu, 2000). El grupo aminopropilo de SAM se puede transferir a moléculas como la putresina para formar poliaminas, mientras que en la transulfuración se utiliza el grupo sulfonio de SAM en la formación de taurina y glutatión, un destoxificador importante de radicales libres (Chiang et al., 1996; Evans et al., 1997; Lu, 2000). Por lo que se puede decir que SAM es una molécula esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular.

El número de reacciones en las cuales participa SAM sólo es superado por aquellas que involucran al ATP (Chiang et al., 1996), de manera que es fácil entender que las alteraciones en el metabolismo de SAM pueden resultar en daño celular y por lo tanto en cambios patológicos en los organismos afectados. En los seres humanos se ha sugerido que niveles bajos de SAM pueden estar involucrados en algunas alteraciones hepáticas, como la hepatitis alcohólica aguda y la cirrosis, así como enfermedades

cardiovasculares (Refsum y cols., 1998) y psiquiátricas como la depresión unipolar (Bottiglieri y cols., 1994).

SAM ha sido utilizado como agente antidepresivo durante más de 40 años, en la actualidad, también se utiliza para el tratamiento de osteoartritis, (Barcelo y cols., 1990; Cimino y cols., 1984), desórdenes hepáticos como colestasis, cirrosis alcohólica y hepatotoxicidad inducida por fármacos (Osman y cols., 1993; Varela –Moreiras y cols., 1995).

En animales de experimentación se ha demostrado que SAM tiene un efecto protector contra la hepatocarcinogenicidad inducida por el ácido orótico, este efecto inhibitorio está asociado con un incremento en la apoptosis en los nódulos del carcinoma (Pascale y cols., 1995). SAM reduce la aparición de sitios frágiles en cromosomas de linfocitos de sangre periférica tratados con fluorodesoxiuridina (Zollino y Neri, 1987).

Existen algunos agentes xenobióticos que son capaces de modificar el estado general de metilación de moléculas que componen a las células eucariontes, en especial del DNA (Gebhart y Arutyunyan, 1991), como algunos agentes carcinogénicos, dentro de los que figuran, el benzo( $\alpha$ )pireno, el dimetilbenzantraceno, la aflatoxina B, la nitrosoetilurea, la 5-azacitidina, etc (Poirier, 1994; Poirier y cols., 2003). La acción carcinogénica de algunos metales, como el níquel y el arsénico, se ha sugerido ser mediada por las alteraciones que inducen la metilación del DNA (Mass y Wang, 1997).

Los seres humanos expuestos a compuestos de arsénico utilizan a SAM para metabolizar al arsénico inorgánico en compuestos metilados que son más fácilmente eliminados del organismo (Healy y cols., 1998; Yamanaka y cols., 1997). De manera que tratando de explicar la carcinogenicidad del arsénico, se piensa que las personas expuestas de manera crónica a este elemento utilizan una gran proporción de SAM

durante su destoxificación disminuyendo la biodisponibilidad de SAM y por lo tanto alterando así otros procesos de metilación (Mass y Wang, 1997).

La exposición a compuestos de arsénico induce un estado de hipometilación global del DNA, la cual tiene influencia en la sobre-expresión de oncogenes y potencialmente induce la transformación maligna de las células expuestas (Mass y Wang, 1997; Zhao y cols., 1997).

Si el arsénico disminuye la disponibilidad del SAM en los individuos expuestos crónicamente, un efecto que hasta el momento no ha sido probado, además de generar un estado de hipometilación del DNA afectaría otros procesos biológicos dependientes de la metilación de otras moléculas como fosfolípidos y proteínas. Si lo anterior es cierto, se podría plantear el uso preventivo de SAM exógeno en los individuos que han estado expuestos al arsénico durante períodos prolongados.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

SAM es una molécula esencial para diversas funciones biológicas, las alteraciones en su biodisponibilidad se relacionan con defectos en el funcionamiento celular. La exposición a arsénico reduce los niveles intracelulares de SAM, en un estudio previo que demostró (Ramírez y cols., 2003) que la administración exógena de SAM reducía la frecuencia de daño al DNA, observado como micronúcleos (MN) en células expuestas *in vitro* a arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) y en general a agentes disruptores del citoesqueleto, dichos cambios no se asociaron a alteraciones en los niveles de metilación global del ADN, sin embargo, sugería que los efectos positivos de SAM se podrían deber a su capacidad de interactuar con proteínas que conforman el citoesqueleto, como los microtúbulos (MT).

### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para conocer el mecanismo por el cual SAM reduce la frecuencia de MN, era esencial identificar el tipo de daño reducido, es decir, aquel producto de la pérdida de cromosomas completos, o el resultado de rompimientos cromosómicos. La evaluación de aneuploidías se realizó mediante FISH y los rompimientos cromosómicos se detectaron por inmunofluorescencia (IF) de la fosforilación de la variante de histona H2A.X, además de su colocalización con la cinasa ATM.

Para realizar estos experimentos se planeó utilizar cultivos primarios de fibroblastos humanos (FH). Sin embargo, debido a la disponibilidad del material biológico, se logró únicamente la evaluación de los eventos aneugénicos. En tanto que la evaluación de los rompimientos al ADN de doble cadena, se realizaron en células HepG2. Los experimentos se realizaron al menos por triplicado y cada uno con sus réplicas.

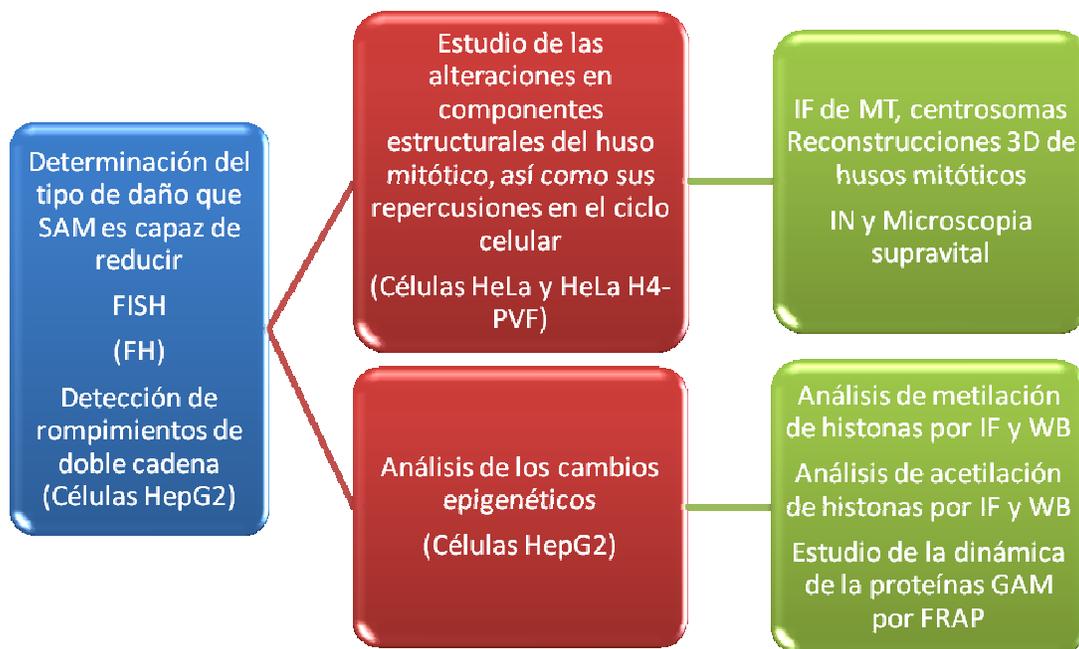
Una vez definido el tipo de daño que SAM reducía, se diseñaron dos estrategias para entender su mecanismo de acción: 1) estudiar dos de los blancos potenciales del citoesqueleto para la acción del NaAsO<sub>2</sub> debido a su alto contenido en grupos sulfidrilo, los MT y los centrosomas, además de correlacionar estos cambios con los posibles efectos en el ciclo celular y 2) el estudio de los cambios epigenéticos inducidos por agentes inductores de aneuploidías.

El estudio de los cambios en células mitóticas se realizó mediante IF de MT y centrosomas en células HeLa. Con el fin de obtener un alto porcentaje de células mitóticas, las células fueron sincronizadas en la fase de síntesis (S). Considerando la gran plasticidad de las células HeLa, además de la gran ventaja que representa su uso futuro para el análisis *in vivo* de la dinámica e interacción proteica, se decidió utilizarlas para estas evaluaciones. Los análisis de estructura y organización de MT como de

centrosomas, se realizaron por microscopia confocal. Los análisis se realizaron al menos en tres experimentos independientes con sus respectivos duplicados.

Se determinaron también los posibles efectos de SAM sobre el ciclo celular, para lo cual se analizó el índice nuclear (IN) y la cinética de transición por mitosis mediante microscopia supravital. La microscopia supravital se realizó con células HeLa-H4, que son células HeLa transfectadas con el vector de la histona 4 (H4) acoplada a la proteína verde fluorescente (PVF).

El análisis de los patrones de metilación y acetilación de histonas, además del estudio de la dinámica de componentes de unión a nucleosomas. Para lo cual, se utilizaron células HepG2 y técnicas de IF, así como el análisis de los niveles protéicos por Western blot. Además del estudio de la dinámica de unión de proteínas que se unen a nucleosomas y que regulan el remodelaje de la cromatina.



Flujograma del diseño experimental.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Investigar los mecanismos por los cuales SAM reduce la frecuencia de células micronucleadas, tratando de entender si reduce de manera selectiva un tipo de daño.

##### **Objetivos Particulares:**

- 1) Evaluar el efecto de SAM sobre la inducción de cromosomas rezagados por el tratamiento con NaAsO<sub>2</sub> mediante MN en combinación con FISH.
- 2) Determinar el efecto de SAM sobre la frecuencia de rompimientos cromosómicos mediante un marcador de rompimientos de cadena doble (histona  $\gamma$ H2A.X) en células expuestas a NaAsO<sub>2</sub>.
- 3) Investigar el posible efecto de SAM sobre las alteraciones en estructuras mayoritarias del huso mitótico provocadas por NaAsO<sub>2</sub>.
- 4) Determinar si SAM tiene algún efecto sobre las alteraciones en la transición a anafase causadas por NaAsO<sub>2</sub>.
- 5) Analizar los posibles efectos del NaAsO<sub>2</sub> sobre el estado de metilación y acetilación de histonas.
- 6) Determinar si el NaAsO<sub>2</sub> es capaz de regular la dinámica de interacción de proteínas de alta movilidad a los nucleosomas.
- 7) Analizar si SAM modifica la respuesta producida por NaAsO<sub>2</sub> en la metilación y acetilación de histonas.

## **5. HIPÓTESIS**

Dado que SAM protege contra la inducción de MN por agentes que alteran la polimerización de la tubulina, será capaz de reducir la frecuencia de MN resultado del rezago cromosómico, además, estos efectos estarán relacionados con la posible protección proveída por SAM durante la formación del huso mitótico, ya sea sobre los microtúbulos (MT) o los centrosomas.

Aunado a ello, considerando el papel de SAM en múltiples reacciones de transmetilación, es probable que participe activamente en el remodelaje de la cromatina o que module los cambios inducidos sobre esta.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

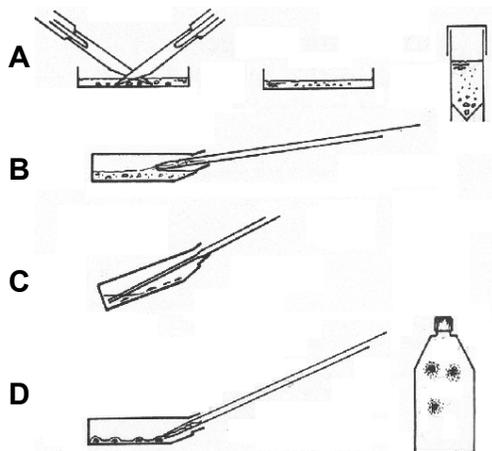
### **1. Cultivo celular**

Para el desarrollo de la presente tesis doctoral se establecieron cultivos primarios a partir de prepucios de bebés sanos, además del empleo de diversas líneas celulares en base a los requerimientos de mi investigación.

#### *1.1 Fibroblastos primarios*

Los cultivos primarios que se utilizaron fueron de FH, los cuales se aislaron de prepucios de niños sanos de entre 1-4 años de edad. Los prepucios se obtuvieron de niños que requirieran circuncisión por prescripción médica, por lo que estos niños no fueron expuestos a ningún procedimiento quirúrgico adicional a causa de este proyecto. Una vez realizada la circuncisión, los prepucios se enjuagaron en solución salina y se colocaron en tubos de 15 ml (Corning) con medio de cultivo DMEM alto en glucosa (Gibco), suplementado con 3% de antibióticos únicamente para su transportación. Una vez en el laboratorio, los prepucios se procesaron para la obtención de los fibroblastos de la siguiente forma (Figura 2): el tejido se cortó cuidadosamente tratando de realizar los cortes con ángulos rectos y sin rasgarlo, de tal forma que se obtuvieran fragmentos menores a 1 mm<sup>3</sup>, evitando la inclusión de vasos sanguíneos. Una vez que el tejido se cortó homogéneamente, este se enjuagó en PBS en varias ocasiones. Posteriormente los fragmentos se resuspendieron en medio de cultivos DMEM alto en glucosa (Gibco) suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco), 1% de L-glutamina (Gibco), 1% de antibióticos y 15 % de suero fetal bovino (SFB, Hyclone). Los fragmentos de tejido se sembraron en botellas de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> (LabTek). Una vez sembrados, se eliminó el exceso de medio de cultivo de tal forma que los fragmentos estuvieran en contacto directo con la botella de cultivo y no flotando.

Los fragmentos se incubaron a 37° C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, la incubación se realizó durante varios días hasta observar los focos celulares creciendo alrededor del tejido (Figura 2), una vez observados estos focos celulares, los fragmentos de tejido se retiraron de las botellas de cultivo y las células adheridas FH fueron tripsinizadas con triplex (Gibco) para volverse a sembrar en nuevas botellas de cultivo e iniciar la propagación. Durante el proceso de propagación, las células se congelaban de manera serial, de tal forma que se lograra la obtención de reservas celulares congeladas desde pasajes jóvenes hasta los pasajes que fueran requeridos para el inicio de los experimentos. Las células que se utilizaron para la realización de los experimentos fueron a partir del 5° pasaje, conservando siempre los pasajes jóvenes únicamente para la propagación celular.



**Figura 2.-** Esquema del procesamiento de los prepucios humanos para la obtención de fibroblastos. A) corte y recolección en tubos para su lavado. B) Siembra en la caja de cultivo, C) eliminación del exceso de medio de cultivo, D) eliminación del fragmento de tejido.

### 1.2. Células HepG2

Estas células derivadas de hepatocarcinoma humano, se cultivaron en medio DMEM bajo en glucosa (Gibco), suplementado con 1% de glutamina (Gibco), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma, Alemania), 1% de antibióticos (Gibco) y 10% de SFB (Gibco). Las células se crecieron en cubreobjetos estériles de 12 mm y se incubaron a 37° C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### *1.3. Células HeLa*

Células derivadas de cáncer de cervix. El cultivo de estas células se realizó en medio de cultivo DMEM-F12 (Gibco), suplementado con 1% de glutamina (Gibco), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma), 1% de antibióticos (Gibco) y 10% de SFB (Gibco).

## **2. Evaluación de la frecuencia de células micronucleadas**

Los FH se cultivaron en laminillas de cultivo de dos pozos (LabTek) y trataron durante la fase logarítmica de crecimiento con NaAsO<sub>2</sub> (5 μM; Sigma), VNB (0.001 μM; Sigma) en presencia o no de SAM (170 nM, Sigma), durante 24 horas de cultivo. Posteriormente al tratamiento, las células se enjuagaron con PBS y fijaron en metanol (-20° C, JT Baker) durante 1 h. Las células se rehidrataron con PBS y enjuagaron con 100% de etanol para evitar la presencia de cristales de PBS en las laminillas. Una vez que las laminillas se secaron, estas se tiñeron con el colorante de Wright (Merck), el cual se basa en el empleo de la eosina y el azul de metileno. La evaluación de la frecuencia de MN se realizó en un microscopio óptico (Leica) y se basó en criterios internacionales (Kirsch-Volders y cols., 2000).

## **3. Hibridación fluorescente *in situ***

### *3.1. Síntesis de la sonda por PCR*

La sonda de DNA que reconoce el centrómero de todos los cromosomas humanos se sintetizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) utilizando los siguientes primers: CENPB MSR 5'-TCC CGT TTC CAA CGA AG-3' y la SOα All Cen 5'- GTT TTG AAA CAC TCT TTT TGT AGA ATC TGC-3'. La reacción se

realizó a 94°C 5 minutos, 30 ciclos de 94°C 30 segundos, 37°C 30 segundos y 72°C 1 minuto. La elongación final del producto se realizó a 72°C 15 minutos.

### *3.2. Marcaje de la sonda por corrimiento de un corte*

El producto de PCR se marcó por un método enzimático basado en la acción de la DNAsa I proveniente de *Escherichia coli*, la cual a bajas concentraciones de la enzima y en presencia de Mg<sup>2+</sup> puede introducir cortes en el esqueleto de DNA.

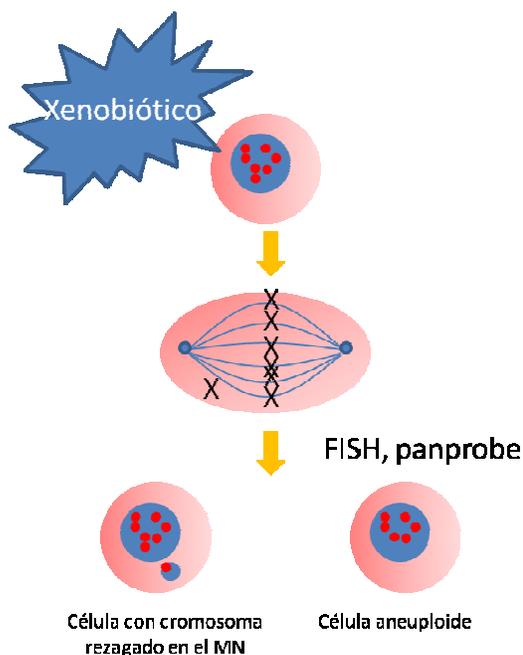
La reacción se llevó a cabo como sigue: A 1 µg de ADN templado (sonda producto de PCR) se le adicionaron 16 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada. Posteriormente se adicionaron 4 µl del reactivo Dig-Nick Translation (Roche, Alemania) el cual contenía glicerol al 50%, 0.25 mM de dATP, 0.25 mM de dCTP, 0.25 mM de dGTP y 0.17 mM de dTTP y 0.08 mM de DIG-11-dUTP, además de 15 U de DNAsa I.

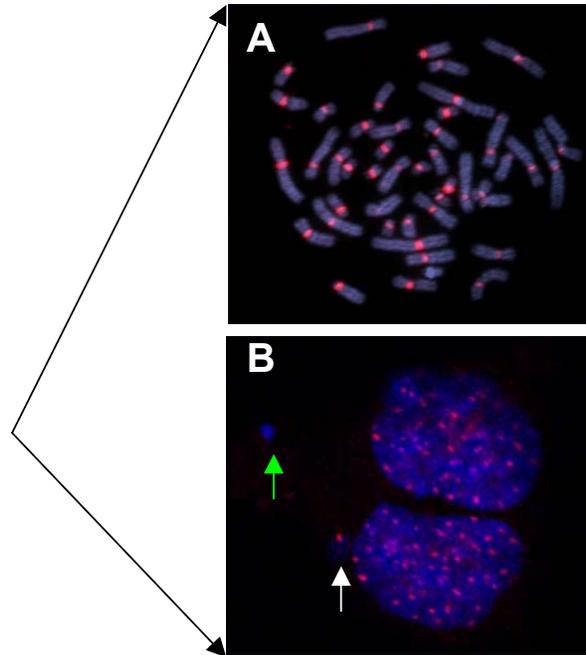
La reacción se incubó 90 minutos a 15° C y posteriormente la actividad de la DNAsa I se inhibió por la adición de 1 µl de una solución 0.5 M de EDTA a pH 8.0 y calentando a 65° C 10 minutos.

### *3.3. Hibridización y detección de la sonda*

Una vez marcada la sonda con bases modificadas que pudieran ser detectadas mediante el uso de anticuerpos, se realizó la hibridización de la misma. La sonda marcada (100 ng) se combinó con una mezcla de hibridización, la cual consistió en: 50% de formamida (Merck), 10% dextran sulfato (Merck), 1x de solución de citrato de sodio (SSC, Merck, Alemania) y 1 µg de Cot-DNA1 (Gibco). La mezcla de hibridización que contenía la sonda marcada se desnaturizó a 70° C 5 minutos y esta se adicionó a laminillas con las células cuyo ADN fue desnaturizado por temperatura (70°C en placa de hibridización). A las laminillas se les adicionó un cubreobjetos y se

sellaron para evitar evaporación de la mezcla de hibridización y estas se incubaron a 37° C durante toda la noche en una cámara húmeda. Al día siguiente, las laminillas se retiraron de la cámara húmeda y se retiró el cubreobjetos durante un enjuague con 2x SSC. Las laminillas se lavaron en 4x SSC con Tween al 0.1 % e incubaron con el anticuerpo anti rodamina-Tritc (Jackson immunoresearch), el cual reconoce DIG-11-dUTP. La incubación se realizó a 37°C en cámara húmeda 1 h. Al cabo de la hora, las laminillas se lavaron en 4x SSC/Tween 0.1% y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (2 mg/ml, Roche, Alemania). Las laminillas se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Axioskop (Zeiss, México). En estas laminillas se cuantificó el número de MN en al menos 1000 células, de estas, los MN que contenían una señal roja proveniente de la fluorescencia del anticuerpo anti rodamina-Tritc (Jackson immunoresearch, EUA), y los MN centrómero positivo se clasificaron como cen+, en tanto que aquellos que no presentaban ninguna señal fluorescente proveniente del anticuerpo, se clasificaron como centrómero negativos o cen -, como se muestra en la figura 3. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad, utilizando una prueba no pareada de t.



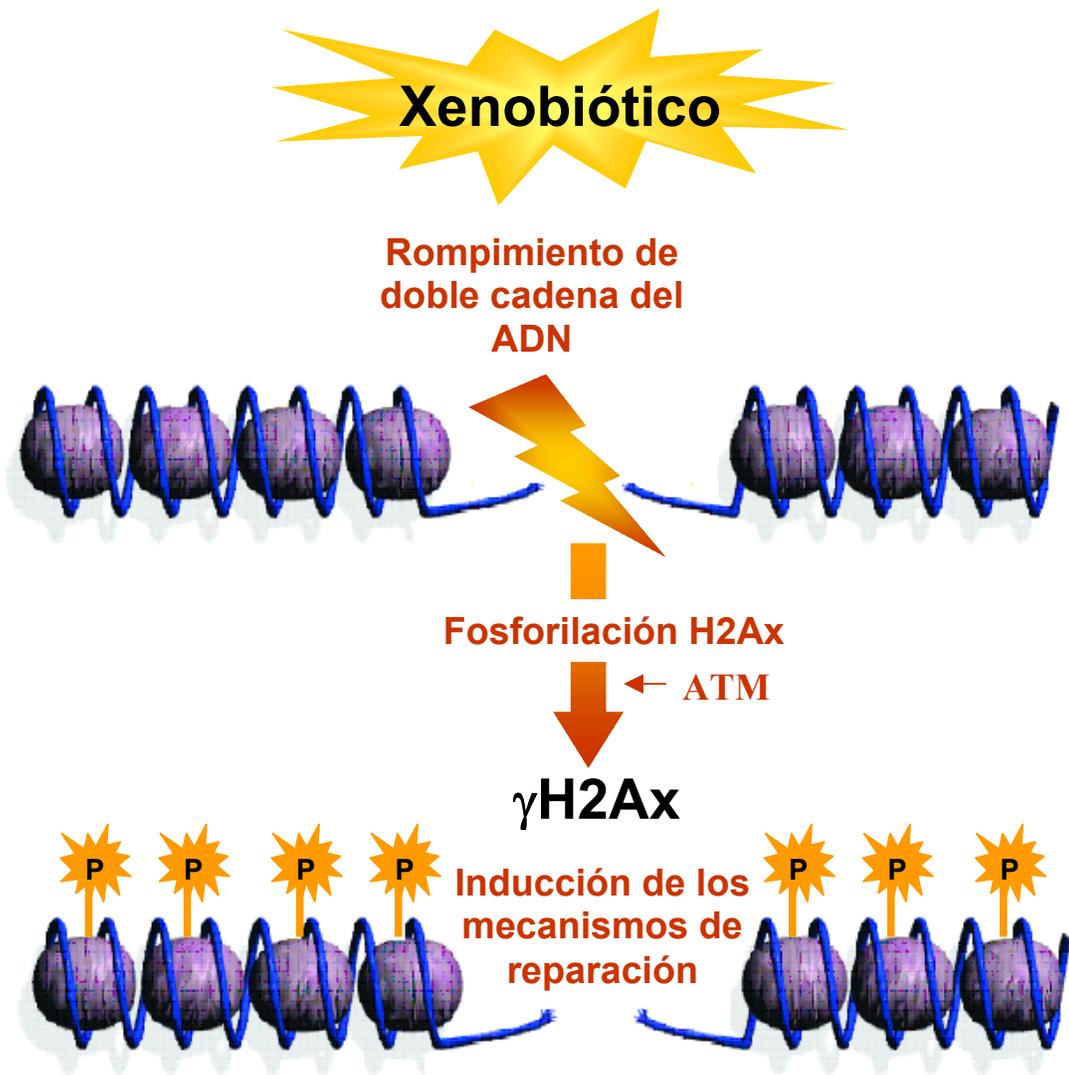


**Figura 3.-** Representación esquemática de la inducción de MN y el uso de FISH para la detección de cromosomas completos dentro de los MN. A) Muestra una metafase en la cual se observa en rojo la señal positiva para la sonda de ADN que detecta el centrómero de los cromosomas. B) Se observa una células binucleada en la que se encuentran dos MN, uno de ellos presentando señal positiva para la sonda centromérica (cen +, indicado por la flecha blanca), en tanto que el otro es cen- (indicado por la flecha verde)

### 3. Evaluación de los rompimientos de cadena doble por inmunodetección de $\gamma$ H2A.X y ATM.

Para realizar la detección rompimientos de doble cadena se utilizó la inmunodetección de la variante fosforilada de la histona H2A.X, la cual se presenta al detectarse un rompimiento de cadena doble en el ADN y marcarse por la fosforilación de la variante de histona H2A.X por acción de ATM, como se ejemplifica en la figura 4.

Las células HepG2 se crecieron en cubreobjetos y trataron con NaAsO<sub>2</sub> (7.5 μM) en presencia o no de SAM (170 nM) durante 24 h. Después del tratamiento, los cubreobjetos se enjuagaron en PBS y fijaron en 2% de formaldehído en PBS. Posteriormente las células fijadas en los cubreobjetos se permeabilizaron con 0.1% de tritón X-100 10 minutos. Se realizó un bloqueo con glicina (100 mM) 10 minutos. Al término del bloqueo, las células se incubaron con los anticuerpos anti γH2A.X (ab1174-50, Abcam), y anti-ATM (200-301-400, Rockland) 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Posteriormente, se lavaron los cubreobjetos con PBS por dos ocasiones, cada una 5 minutos. Después de los lavados, se incubaron los anticuerpos secundarios, FITC-anti ratón y rojo texas anti conejo, a temperatura ambiente en una cámara húmeda 45 minutos. La tinción de los núcleos celulares se realizó con Hoechst-33258. Los cubreobjetos fueron montados en laminillas para su posterior análisis al microscopio. El conteo de los focos de γH2A.X y la proteína ATM se realizó en un microscopio de fluorescencia (Zeiss, Axiophot). La colocalización de ambas proteínas (γH2A.X y ATM) se evaluó mediante microscopía confocal utilizando secciones ópticas. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad, utilizando una prueba de t.



**Figura 4.-** Representación esquemática de la fosforilación de la variante de histona H2A.X por ATM durante los rompimientos de cadena doble en el ADN.

#### 4. Sincronización celular por bloqueo doble con timidina.

Para realizar la sincronización celular en metafase, se utilizaron células HeLa cultivadas en medio DMEM-F12 suplementado como se describe en 1.3. Una vez en cultivo, con el fin de sincronizar las células, estas se trataron con timidina (2 mM, Sigma) durante 16 h, al término de este tiempo, las células se lavaron en varias ocasiones con PBS y se les adicionó medio de cultivo libre de timidina. Las células se dejaron crecer 8 h. Después de las 8 horas de cultivo se adicionó timidina por segunda ocasión (16 h), el medio se retiró y las células fueron lavadas con PBS. Se adicionó medio de cultivo nuevamente y las células se procesaron de acuerdo al experimento a realizar, como se explica más adelante.

## **5. Ensayos de polimerización de microtúbulos**

### *5.1. Análisis de los husos mitóticos*

Las células HeLa sincronizadas mediante el método del bloqueo doble con timidina, se trataron con  $\text{NaAsO}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ), en presencia o no de SAM (170 nM). Las células se incubaron a 37°C hasta observar la presencia de células metafásicas. Una vez observada la presencia de células en metafase, estas se extrajeron de las botellas de cultivo (25  $\text{cm}^3$ , LabTek) mediante agitación y se colectaron en tubos cónicos (15 ml, Corning). Posteriormente, se centrifugaron y el botón celular se fijó con metanol (-20°C, JT Baker). Una vez fijadas las células, estas se gotearon sobre cubreobjetos para realizar la IF de algunos componentes del huso mitótico: centrosomas y MT. Las células se permeabilizaron con tritón X-100 (0.1% en PBS) 15 minutos a 4° C. Se realizó un bloqueo de 1 hora con PBT (1x PBS+ 2% albúmina + 0.1% Tween 20). Después del bloqueo, las células se lavaron en dos ocasiones con PBS y se incubaron con los anticuerpos para centrosomas, se adicionó anti- $\gamma$  tubulina (Santa Cruz, EUA, 1:500) y para MT se adicionó anti  $\beta$ -tubulina-marcado con fluoresceína (Sigma,

Alemania; 1:500), esta incubación se realizó durante 1 hora, al término, se realizaron dos lavados en PBS de 5 minutos cada uno y se adicionó el anticuerpo secundario para detectar el anti  $\gamma$ -tubulina, para lo cual se utilizó anti-cabra rojo texas (Jackson Immunoresearch, EUA; 1:1000) durante 1 hora. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron en tres ocasiones con PBS (cada una por 5 minutos) y los núcleos celulares se tiñieron con Hoechst (Hoechst, 5  $\mu$ g/ml). Las células mitóticas se analizaron mediante microscopia confocal con un equipo Leica TCS-SP2/AOBS.

### *5.2. Polimerización de MT de extractos de ovocitos de *Xenopus laevis**

Los huevos de la rana *Xenopus laevis* se obtuvieron mediante la inducción a ovulación con coriogonadotropina (5,000 unidades) dos días previos a la realización de los experimentos. En cada ocasión se estimularon 2 ranas y los huevos colectados se procesaron como se explica a continuación: los huevos se colectaron en tubos cónicos de 50 ml (Corning) y tratados con cisteína (2%, pH 7.8) con el fin de eliminar la cápside protéica que cubre a los huevos. Una vez eliminada esta cápside, los huevos se enjuagaron en 4x MMR (NaCl 1M, KCl 20 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, Hepes 20 mM y EDTA 1 mM). Posteriormente estos se activaron durante 2 segundos en una cámara de choque eléctrico (12 V). Los huevos de mala calidad se eliminaron y el resto se enjuagó en un buffer que contenía 250 mM de sacarosa, 50 mM de KCl, 1 mM de DTT, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ g/ml de ciclohexamida y 5  $\mu$ g/ml de citocalasina B. Una vez enjuagados, los huevos se centrifugaron 10 minutos a 3000 g a 4°C, de tal forma que se obtuvieron tres fases, de las cuales se extrajo la fase media, que era la fase que contenía el extracto citosólico. Con el extracto se realizaron alícuotas de 20  $\mu$ l, las cuales se guardaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Para realizar los experimentos de polimerización de MT *in vitro*, se descongelaron alícuotas de extracto protéico de huevos de *Xenopus*, estas se incubaron 1 hora a 21° C con NaAsO<sub>2</sub> (10 µM), SAM (170 nM) y la combinación en presencia de un centro organizador de MT (COMT). Como COMT se utilizaron centrosomas de células humanas o cromatina de esperma de *Xenopus laevis* (1 x10<sup>6</sup> espermatozoides). Después del tratamiento, los extractos se centrifugaron en cubreobjetos de 12 mm a 13 000 rpm 30 minutos a 12°C. Inmediatamente después de la centrifugación, los cubreobjetos se fijaron en metanol (-20° C, JT Baker) 30 minutos. Al término de la fijación, se adicionó el anticuerpo anti- β tubulina acoplado a fluoresceína (Sigma, 1:500) 30 minutos. Después de la incubación, los cubreobjetos se lavaron cuidadosamente con PBS y se adicionó Hoechst (5 µg/ml) para teñir la cromatina de esperma. La polimerización de los MT se analizó por microscopia de fluorescencia y se cuantificó el número de ásteres interfásicos formados alrededor de la cromatina de esperma, así como la calidad de los mismos.

## **6. Análisis de ciclo celular**

### *6.1. Microscopía de células vivas*

Para este propósito se utilizaron células HeLa transfectadas con el vector que contenía el inserto de la secuencia que codifica para la histona H4 asociado al gen de la proteína verde fluorescente, por lo que estas células se denominaron HeLa H4-EGFP.

Estas células se sincronizaron con el protocolo de bloqueo doble de timidina y tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (10 µM), SAM (170 nM) y la combinación. La microscopía de células vivas se realizó en células mitóticas utilizando un microscopio confocal Leica TCS-SP2/AOBS con cámara de temperatura a 37° C y una atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> al 5%. Las secciones ópticas se realizaron cada minuto durante 2-8 horas.

## *6.2. Análisis del índice mitótico*

Con el fin de analizar el cambio en la transición de G<sub>2</sub>/M se evaluó el índice mitótico en células HeLa después de ser liberadas del segundo bloqueo con timidina. Por lo que las células se crecieron en cubreobjetos y sincronizadas con el bloqueo doble de timidina, y tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (10 μM), SAM (170 nM) o la combinación. A las 8, 10 y 12 horas después del tratamiento se fijaron cubreobjetos en metanol (-20° C, JT Baker), se enjuagaron en PBS en dos ocasiones y los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst (5 μg/ml). La evaluación del índice mitótico se realizó en 1000 células, de las cuales se contabilizó el número de metafases con respecto al número de células interfásicas.

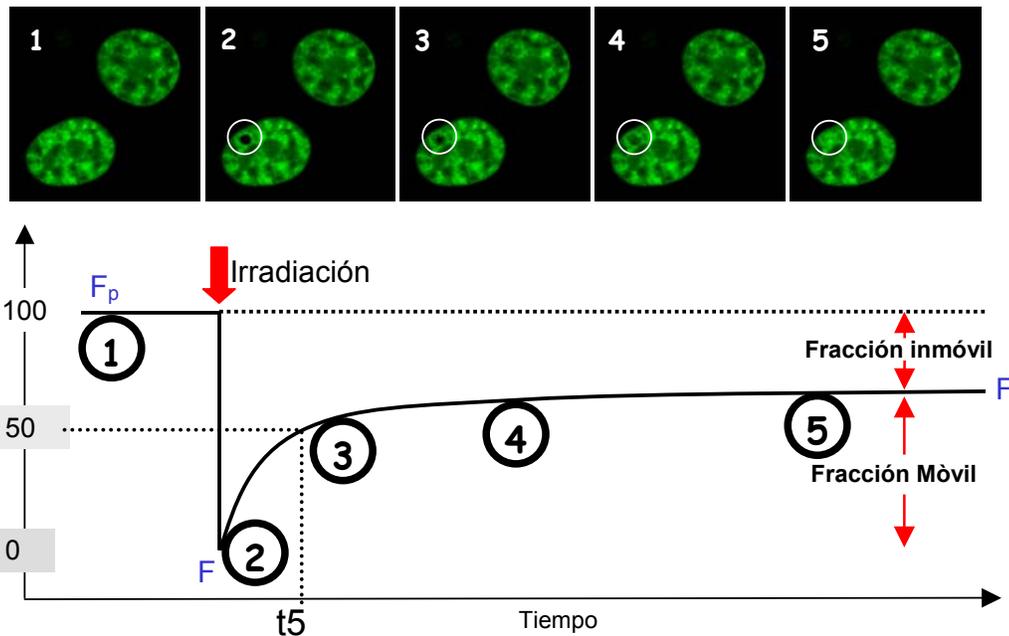
## **7. Análisis de estrés oxidativo por citometría de flujo.**

Para evaluar la inducción de estrés oxidativo (EO), se utilizó una metodología fluorométrica directa, basada en el uso de 2', 7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Cuando este compuesto se adiciona a células intactas, el DCFH-DA cruza la membrana celular y dentro de la célula se hidroliza por esterasas intracelulares en un compuesto no fluorescente llamado diclorofluoresceína no fluorescente (DCFH). Sin embargo, en presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO), DCFH es oxidado a un compuesto altamente fluorescente llamado diclorofluoresceína fluorescente (DCF). Por lo que la fluorescencia intracelular puede ser utilizada como un índice para cuantificar de manera global la producción de ERO en las células. Utilizando esta metodología se detectó la fluorescencia emitida mediante la citometría de flujo. Para realizar esta evaluación, células HeLa fueron crecidas en botellas de cultivo y cultivadas como se refiere en 1.3. Las células se trataron con DCFH-DA (20mM) 15 minutos previos al

tratamiento con NaAsO<sub>2</sub>. Las botellas de cultivo se cubrieron de la luz y trataron con diversas concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> (10, 25, 50, 100 y 500 μM) a 30 minutos, 1, 2 y 4 horas. Las células se despegaron del sustrato con tripsina (Triple express, Gibco) y se colectaron en tubos cónicos de 15 ml (Corning, EUA) e inmediatamente colocadas en hielo. Las células se lavaron en dos ocasiones con PBS. Posteriormente el botón celular se resuspendió en 1 ml de albúmina al 1% en PBS y se adicionaron 10 μl de yoduro de propidio (100 μg/ml). Las mediciones se realizaron en un citómetro de flujo BD LSR con un total de 20 000 eventos por tratamiento. Los datos fueron procesados con el programa Cell Quest (Becton Dickinson).

#### **8. Transfección, expresión de proteínas de alta movilidad, GAM y análisis de la recuperación de la fluorescencia después del irradiación (FRAP).**

Para realizar estos experimentos se utilizaron células HepG2, las cuales fueron transfectadas con efectina (Quiagen, Alemania) y 400 ng de los plásmidos de interés (GAM N1-PVF, GAM N2-PVF y GAM A1a-PVF), para el posterior análisis *in vivo* de recuperación de la fluorescencia. Para los experimentos de recuperación de la fluorescencia después de la irradiación láser, se utilizaron los parámetros reportados en (Harrer y cols., 2004). Durante este proceso, las células son analizadas utilizando un escaneo serial con un láser de argón (Objetivo:HCX PI APO lbd.BI 63x1.4 aceite). Posteriormente se evalúa cada segundo el porcentaje de recuperación de la fluorescencia, como se ejemplifica en la figura 5 y de acuerdo a parámetros ya publicados (Phair y Misteli 2000). Para comparar intensidades de fluorescencia, los parámetros se normalizaron con respecto a las células control y se eligieron regiones de interés, denominadas ROIs (10 μm<sup>2</sup>), estos ROIs fueron utilizados para calcular las diferencias relativas de fluorescencia empleando el programa Leica FRAP wizard.



**Figura 5.-** Representación gráfica de la recuperación de la fluorescencia después de la irradiación con el láser de argón. 1) Fluorescencia inicial, 2) abatimiento de la fluorescencia por la irradiación, 3) recuperación del 50% de la fluorescencia de la fracción móvil 4) fase de recuperación cerca de la meseta y 5) recuperación máxima de la fluorescencia después de la irradiación.

### 9. Evaluación de muerte celular por citometría de flujo

Las células HepG2 se incubaron en botellas de cultivo de 25 ml, al obtener el 50% de confluencia estas se trataron con diferentes concentraciones de  $\text{NaAsO}_2$  (7.5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ). A las 24 horas de tratamiento se evaluó la muerte celular mediante citometría de flujo y utilizando la detección de anexina V marcada con fluoresceína (Roche) y la de yoduro de propidio (Sigma). Para lo cual, las células se colectaron en tubos de 15 ml (Corning) y centrifugadas a 1100 rpm por 5 min. El botón celular se lavó en dos ocasiones con un buffer de unión (0.1M HEPES, 140 mM NaCl y 25 mM  $\text{CaCl}_2$ ) e incubó durante 20 minutos con 100  $\mu\text{l}$  de la solución de tinción (960  $\mu\text{l}$  de buffer de

unión, 20  $\mu$ l de yoduro de propidio y 20  $\mu$ l de anexina-V-Fluos). Después, se adicionaron 900  $\mu$ l del buffer de unión y el porcentaje de células vivas, apoptósicas (aquellas que daban señal positiva para anexina y que habían incorporado yoduro de propidio) y células necróticas (aquellas que habían incorporado yoduro de propidio únicamente) se evaluó con un citómetro de flujo LBR-BD (Becton Dickinson), utilizando el programa Cell Quest y analizando 20 000 eventos.

#### **10. Inmunodetección por fluorescencia de modificaciones de histonas.**

Las células HepG2 se crecieron en cubreobjetos y se trataron en cultivo con NaAsO<sub>2</sub> (10  $\mu$ M), SAM (170 nM) y la combinación, durante 24 h. Al término del tratamiento, las células se enjuagaron en PBS y fijaron en formaldehído al 2% 10 minutos. Posterior a la fijación, las células se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.1%. Las células se trataron con glicina 100 mM con el fin de bloquear uniones inespecíficas durante la inmunolocalización. Los anticuerpos utilizados fueron de la marca AbCam y se utilizaron como sigue: H3K9 acetilado (ab12178, 1:1000), H3K4 dimetilado (ab7766, 1:500), H3K4 trimetilado (ab8580, 1:1000), H3K9 dimetilado (ab7312, 1:500), H3K9 trimetilado (ab1186, 1:1000), H4K20 trimetilado (ab9053, 1:500) y H3K27 trimetilado (ab6002, 1:200). La inmunolocalización se realizó en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a rojo texas. Los núcleos celulares se tiñeron con 10  $\mu$ l de Hoechst (5 $\mu$ g/ml), los cuales se adicionaron durante 10 minutos. Los cubreobjetos se montaron en laminillas con una solución anti-desvanecimiento (Mowiol, Hoechst).

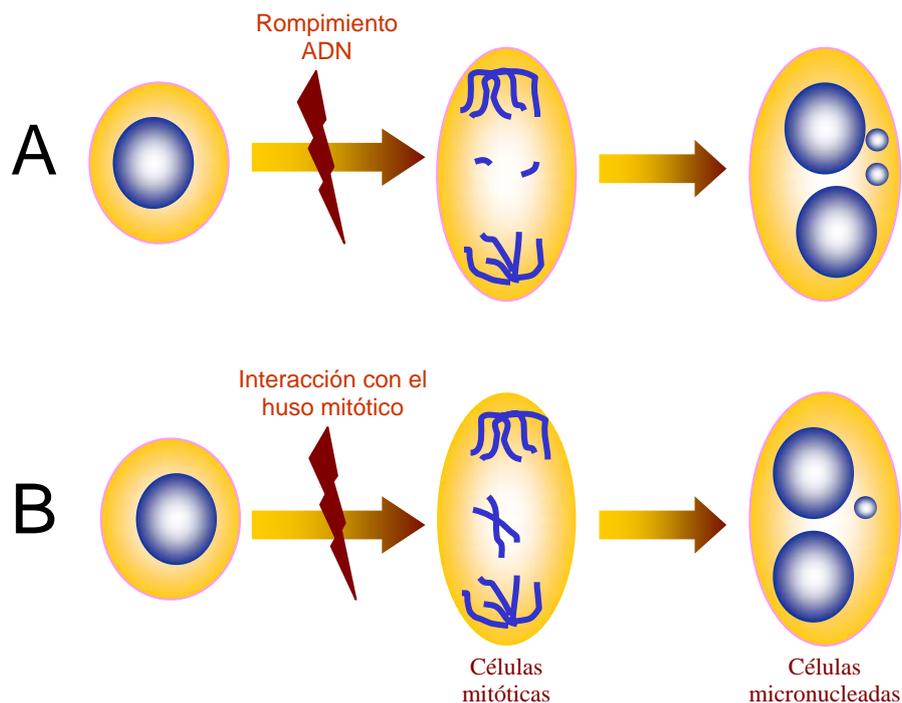
## **11. Preparación de extractos protéicos nucleares para análisis de Western Blot de las modificaciones de histonas.**

Los núcleos celulares se aislaron y contabilizaron de acuerdo a métodos estándar (Luhrs y cols., 2002). Tanto la electroforesis como la transferencia protéica se realizaron de acuerdo a métodos estándar. Para comparar la eficiencia del cargado así como la de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue teñida con Ponceau S. Posteriormente, se bloquearon las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos mediante el uso de una solución 5% de leche libre de grasa disuelta en TBST, este bloqueo se realizó durante 1 hora. Una vez realizado el bloqueo, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con los diferentes anticuerpos en 3% de albúmina, la incubación se realizó a 4° C toda la noche. Los anticuerpos utilizados fueron: H3K9 acetilado (ab12178, 1:10000), H3K4 dimetilado (ab7766, 1:5000), H3K4 trimetilado (ab8580, 1:5000), H3K9 dimetilado (ab7312, 1:5000), H3K9 trimetilado (ab1186, 1:5000), H4K20 trimetilado (ab9053, 1:10000) y H3K27 trimetilado (ab6002, 1:2000). Después de tres lavados en TBST, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa en 5% de leche libre de grasa. La detección del anticuerpo se realizó por quimioluminiscencia.

## 7. RESULTADOS

### Discernir el tipo de daño que es reducido por SAM en presencia de xenobióticos

Dado que existe un reporte en el que se demuestra la eficiencia de SAM para reducir la frecuencia de MN inducida por agentes genotóxicos que interaccionan con el citoesqueleto (Ramírez y cols., 2003), el primer acercamiento para tratar de entender el mecanismo por el cual lo hacía, fue determinar el tipo de daño que era capaz de reducir, es decir el daño resultado de rompimientos cromosómicos o el daño producto de la pérdida de uno o más cromosomas completos (Figura 6), de tal forma que se diseñaron dos estrategias, la evaluación de sus efectos en la reducción de células aneuploides y el análisis de la reducción de rompimientos cromosómicos.

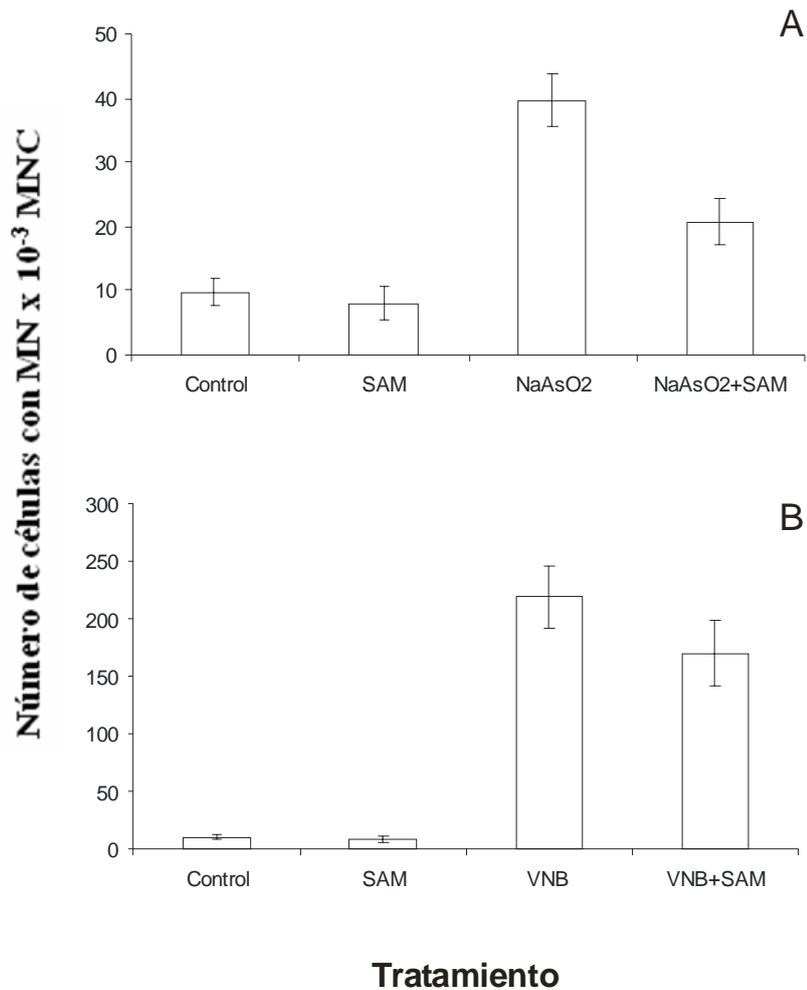


**Figura 6.-** Esquema representativo que ejemplifica los dos tipos de eventos que pueden desencadenar la formación de células micronucleadas A) Eventos de rompimientos cromosómicos o B) Eventos de pérdida de cromosomas completos por interacción con la maquinaria de segregación cromosómica.

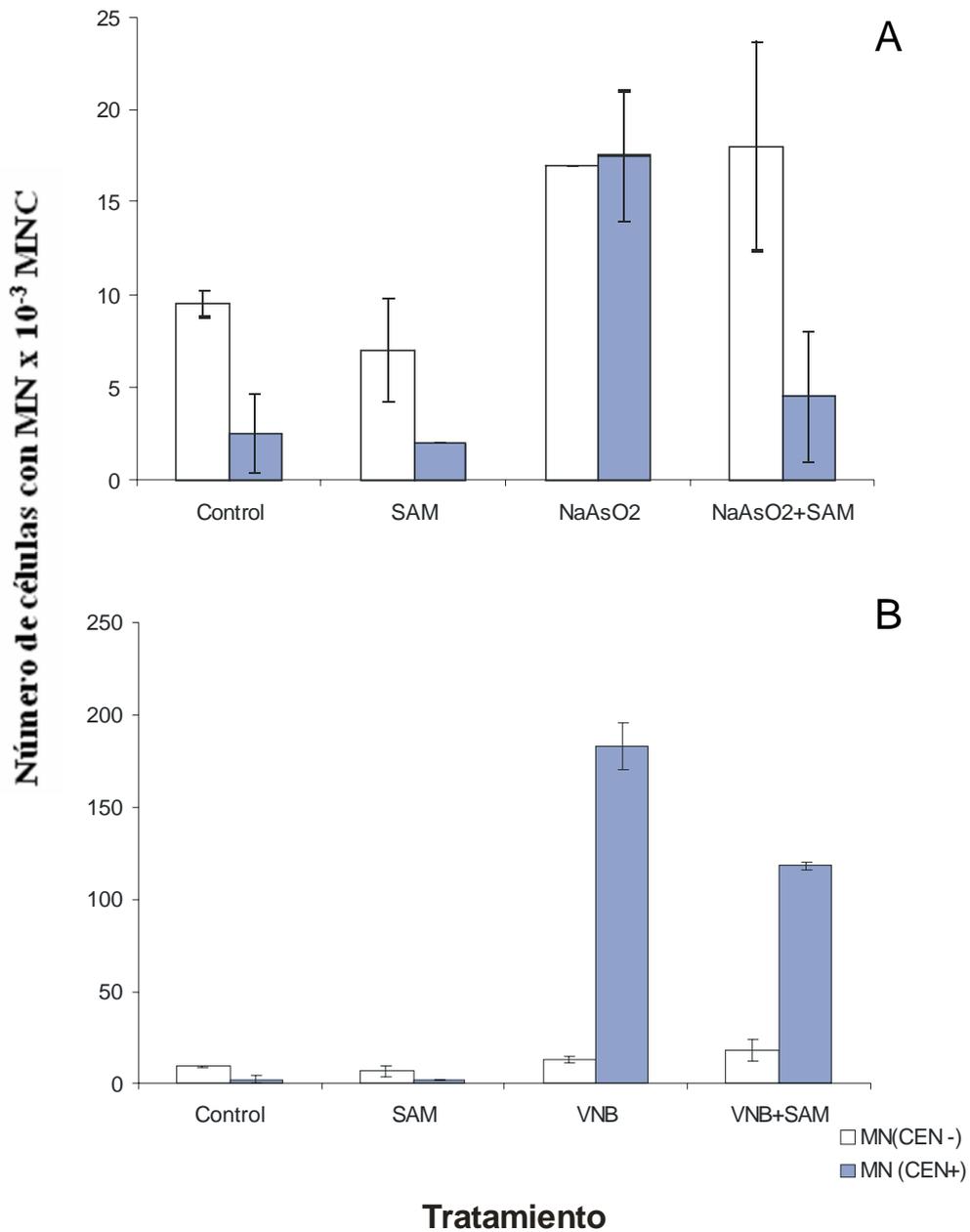
*Reducción de la frecuencia de MN con cromosomas completos por la adición de SAM.*

SAM reduce la frecuencia de MN inducidos por el NaAsO<sub>2</sub> en FH (Figura 7A) de manera similar a lo ya reportado previamente en otros tipos celulares (Ramírez y cols., 2003). Además reduce los MN inducidos por el tratamiento con VNB (Figura 7B).

En la figura 8 se muestra la frecuencia de MN cen + contra los cen - inducidos tanto por NaAsO<sub>2</sub> como por VNB, los datos muestran que en tanto el NaAsO<sub>2</sub> provoca la formación de MN cen- y cen+ en una proporción 1:1 (Figura 8 A). El tratamiento conjunto con SAM revela que únicamente la frecuencia de los MN cen+ son disminuidos significativamente ( $p < 0.0001$ ) en las células expuestas a NaAsO<sub>2</sub>. En el caso del tratamiento con VNB, se observa que casi el 90% de las células micronucleadas presentan centrómero positivo en los MN, efecto que fue significativamente reducido por el tratamiento conjunto con SAM (Figura 8 B). Estos resultados indican que SAM reduce de manera selectiva el potencial aneugénico del NaAsO<sub>2</sub>, pero no así su capacidad clastogénica.



**Figura 7.-** Frecuencia de fibroblastos humanos con micronúcleos (MN) en cultivos tratados con arsenito de sodio (A, NaAsO<sub>2</sub>, 5 μM) o vinblastina (B, VNB, 0.001 μM), con o sin s-adenosil-L-metionina (SAM, 170 nM). Los MN fueron determinados en 1000 células mononucleadas (MNC) p<0.0001.



**Figura 8.-** Frecuencia de células con micronúcleo centrómero positivo (MN) cen+ o MN centrómero negativo (cen-) en cultivos tratados con arsenito de sodio (A, NaAsO<sub>2</sub>, 5 μM) o vinblastina (B, VNB, 0.001 μM) con o sin s-adenosil-1-metionina (SAM, 170 nM), p<0.0001.

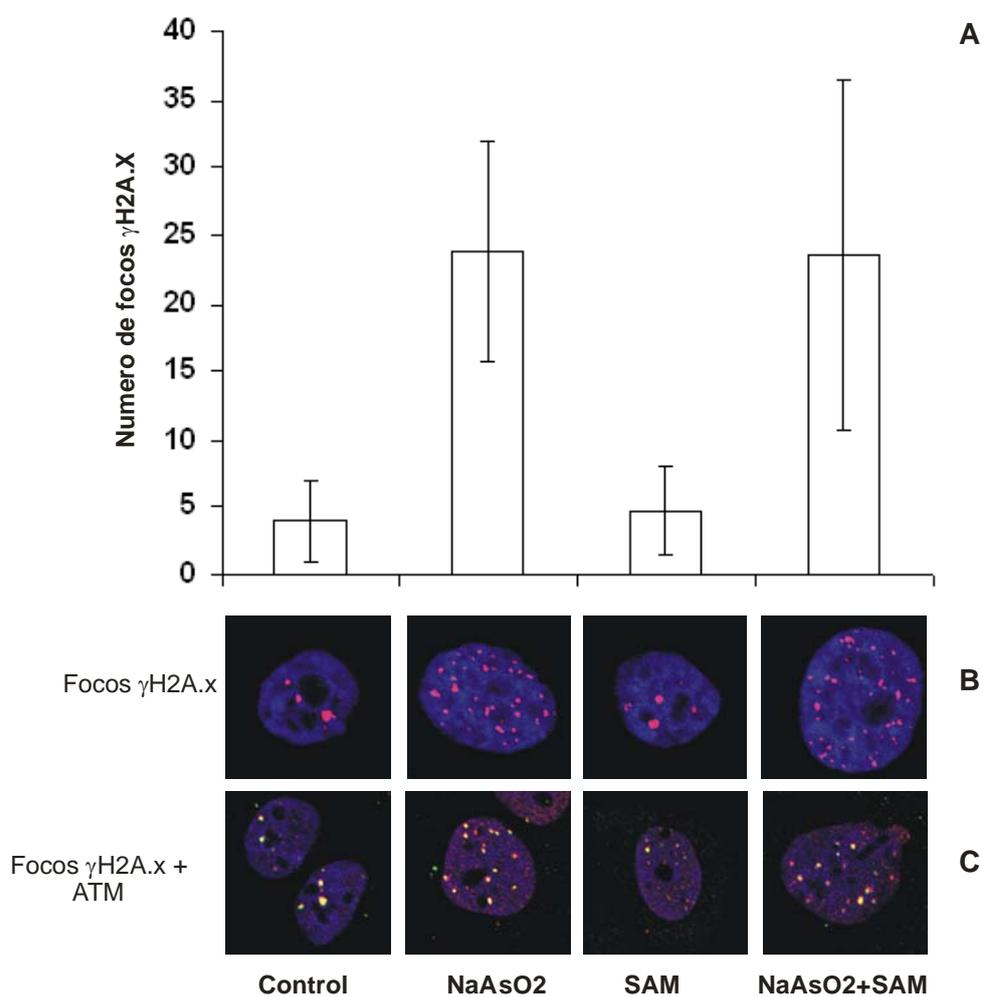
*SAM no protege contra la inducción de rompimientos de doble cadena inducidos por NaAsO<sub>2</sub>.*

La fosforilación de la variante de histona H2A.X ( $\gamma$ H2A.X) se ha reportado como un indicador de rompimientos de cadena doble (Mukherjee et al., 2006). Por lo que se utilizó la detección de un anticuerpo que reconoce la versión fosforilada de H2A.X ( $\gamma$ H2A.X) con el fin de cuantificar los rompimientos de cadena doble inducidos por el NaAsO<sub>2</sub>. Además se utilizó la colocalización con la cinasa ATM, la cual fosforila a H2A.X para iniciar la reparación del ADN, para corroborar que los focos de  $\gamma$ H2A.X se debían a un proceso de reparación del ADN más que a la muerte, ya que la presencia de fosforilación de H2A.X puede llevarse a cabo por la DNA cinasa PK durante un proceso apoptótico (Mukherjee y cols., 2006).

El análisis de los focos de  $\gamma$ H2A.X revela que SAM no reduce la proporción de rompimientos de cadena doble (es decir, el número de focos  $\gamma$ H2A.X) inducidos por NaAsO<sub>2</sub>. La figura 9 A muestra la frecuencia de rompimientos de cadena doble, evaluados como el número de focos  $\gamma$ H2A.X. El tratamiento durante 24 h con NaAsO<sub>2</sub> incrementó significativamente el número de rompimientos de cadena doble en células HepG2 ( $p < 0.0001$ ). Un ejemplo de las inmunofluorescencias de  $\gamma$ H2A.X y su colocalización con ATM se puede apreciar en la figura 9. Estos datos revelan que SAM no reduce los efectos clastogénicos de NaAsO<sub>2</sub>.

*El incremento en la proteína  $\gamma$ H2A.X correlaciona con la expresión de ATM.*

Dado que  $\gamma$ H2A.X puede indicar la muerte celular por apoptosis, se decidió investigar si la presencia de esta proteína fosforilada correlacionaba con la presencia de componentes de la maquinaria de reparación del ADN. Los datos de colocalización de la proteína ATM con  $\gamma$ H2A.X muestran 100% de superposición, lo que corrobora que el número de focos de  $\gamma$ H2A.X se incrementó en respuesta a la presencia de rompimientos de cadena doble inducidos por NaAsO<sub>2</sub>.



**Figura 9.-** Análisis de los efectos de SAM sobre la frecuencia de rompimientos de cadena doble inducidos por arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>, 7.5  $\mu$ M) en células HepG2  $p < 0.0001$ . A) Frecuencia de focos de la variante fosforilada de histona H2A.X ( $\gamma$ H2A.X) como un marcador de rompimientos de cadena doble. B) Secciones ópticas

de células HepG2 mostrando la inmunodetección de los focos  $\gamma$ H2A.X (rojo texas) en células tratadas con NaAsO<sub>2</sub>, con o sin s-adenosil-L-metionina (SAM, 170 nM). C) Secciones ópticas de células HepG2 mostrando la colocalización de  $\gamma$ H2A.X (rojo texas) y la cinasa ATM (fluoresceína) en células tratadas con NaAsO<sub>2</sub>, con o sin s-adenosil-L-metionina (SAM, 170 nM). p<0.001

**b) Efectos de SAM sobre el daño provocado por NaAsO<sub>2</sub> sobre componentes de la maquinaria de segregación cromosómica y su relación con alteraciones en el ciclo celular**

*Efectos genotóxicos y sobre la maquinaria de segregación cromosómica del NaAsO<sub>2</sub> en células HeLa*

El NaAsO<sub>2</sub> incrementó la frecuencia de células HeLa con MN (Figura 10), efecto que fue reducido significativamente por la adición de SAM (p<0.0001).

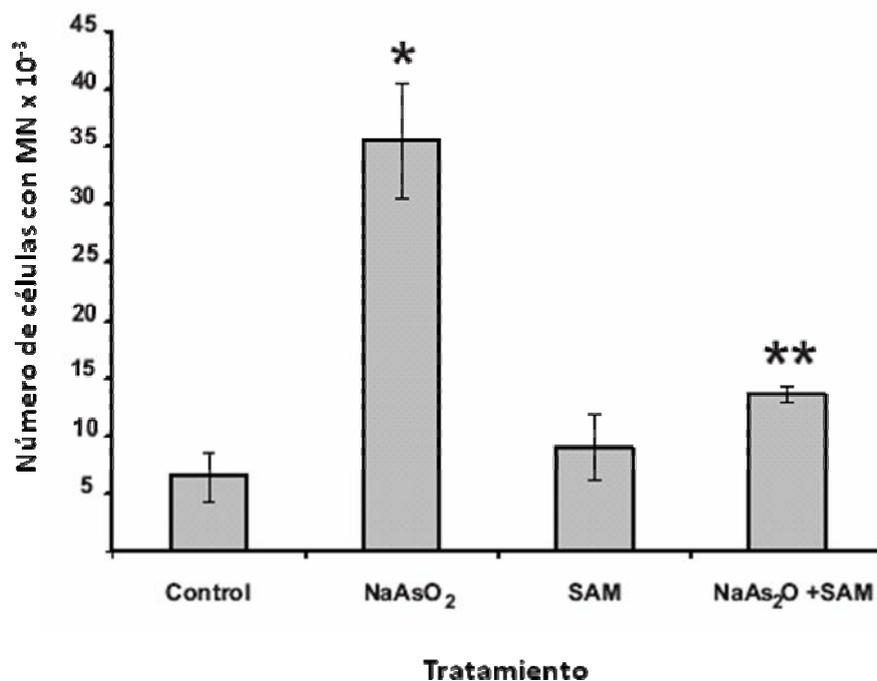
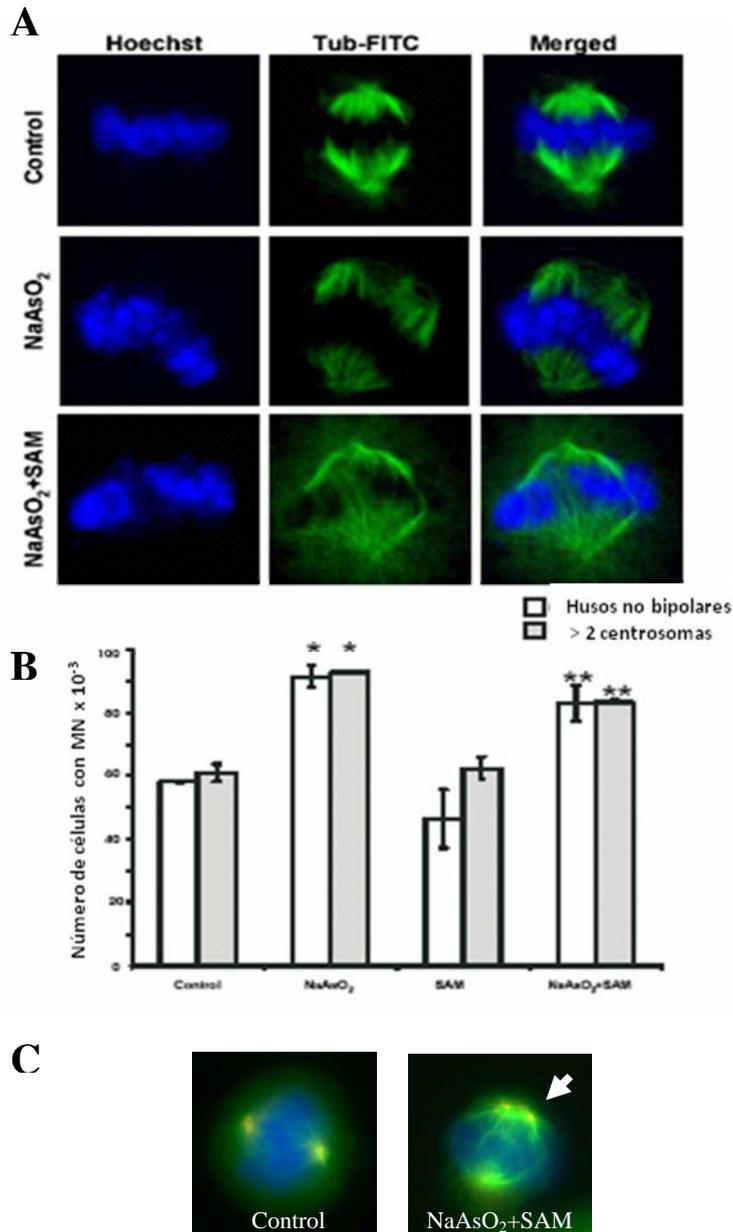


Figura 10.- Frecuencia de células HeLa con micronúcleos (MN) tratadas 24 horas con arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>, 10 μM), s-adenosil-L-metionina (SAM, 170 nM) y la combinación p<0.0001.

Con el fin de discernir el mecanismo por el cual SAM reduce la frecuencia de MN y además de aquellos que poseen cromosomas completos, se investigaron sus efectos sobre las alteraciones en componentes fundamentales de la maquinaria de segregación cromosómica, por lo que se utilizaron dos acercamientos: 1) análisis de estructuras de los husos mitóticos y 2) un modelo acelular de polimerización *in vitro* de MT en extractos de *Xenopus laevis*.

Los datos obtenidos del análisis de células HeLa indican que aunque los MT se organizan en husos mitóticos en presencia de NaAsO<sub>2</sub>, la inmunodetección fluorescente de los centrosomas (γ-tubulina) y de los MT (β-tubulina) revela que este compuesto induce amplificación de centrosomas, efecto que tiene como consecuencia la formación de husos mitóticos multipolares (p<0.01) (Figura 11). La amplificación de los centrosomas correlaciona con la presencia de cromosomas fuera de la placa metafásica, inclusive grupos de cromosomas en los polos del huso mitótico. Sin embargo, la adición de SAM reduce significativamente el número de células con centrosomas supernumerarios (p<0.01).



**Figura 11.-** Evaluación de las aberraciones mitóticas inducidas por arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ,  $10 \mu\text{M}$ ) y el efecto de la s-adenosil-L-metionina (SAM,  $170 \text{ nM}$ ) sobre estas. A) El ADN está marcado con DAPI (azul), la IF de los MT marcados con fluoresceína (verde, Tub-FITC) y la sobreposición de las secciones ópticas. B) Frecuencia de aberraciones centrosómicas y husos mitóticos multipolares con respecto a los distintos tratamientos,  $p < 0.01$ . C) Figuras representativas de las células control y las tratadas con la combinación  $\text{NaAsO}_2 + \text{SAM}$ , donde se puede apreciar los MT (Verde, Tub-FITC) y

en el centrosoma (Rojo,  $\gamma$ -Tub-TxRed), el punto en donde se sobreponen la secciones ópticas se observa en amarillo (flecha).

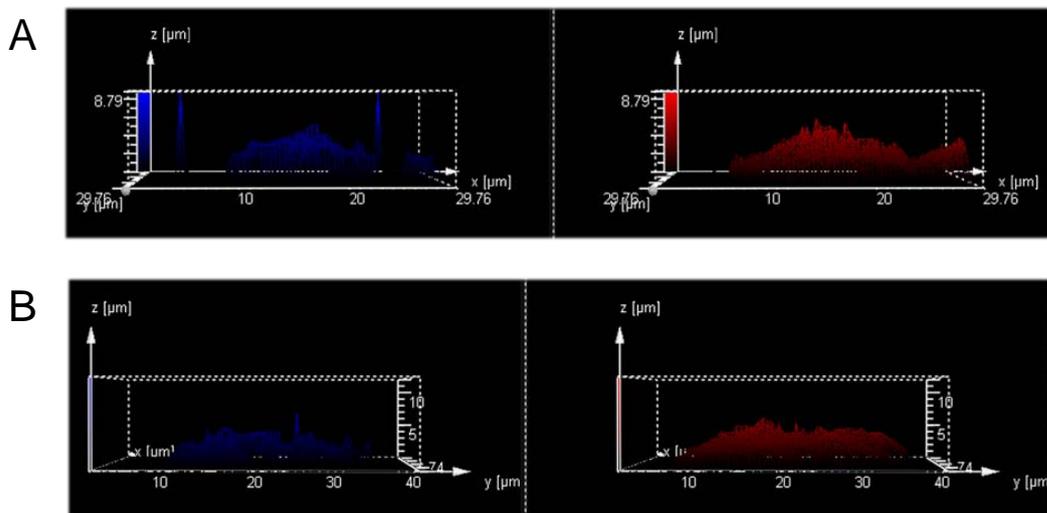
Tratando de entender si la inducción de rezago cromosómico era un evento debido a un problema estérico, es decir, que el  $\text{NaAsO}_2$  al interactuar con los MT redujera el tamaño de los husos mitóticos, de tal forma que no existiera suficiente espacio para que se permitiera la correcta alineación e inclusive segregación de los cromosomas, por lo se evaluaron las longitudes y amplitudes máximas de los husos mitóticos en células tratadas con  $\text{NaAsO}_2$ , además se utilizaron como controles otros dos agentes aneugénicos clásicos, la VNB y el nocodazol (NDZ). Los datos obtenidos de estos análisis no muestran diferencias significativas con respecto al tamaño de los husos, como se observa en la figura 13, en donde se aprecia una tendencia a la reducción en cuanto a la amplitud de los husos mitóticos, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Tratando de realizar una evaluación más exacta del tamaño de los husos mitóticos, se realizaron una serie de reconstrucciones tridimensionales (3D) de mitades de husos mitóticos para determinar la existencia de alteraciones tanto en la topología como en el tamaño de los mismos, un ejemplo de estas reconstrucciones se muestra en la figura 13.

De estos análisis no se encontraron respuestas concretas, dado que sólo existe una tendencia a la reducción del tamaño de los husos mitóticos, sin embargo, dadas las dificultades metodológicas para realizar estas evaluaciones el margen de error fue muy grande, lo que limitó en gran medida esta evaluación, por lo que en el futuro se recomienda el empleo de métodos más exactos.



**Figura 12.-** Evaluación del tamaño aproximado de la máxima longitud y amplitud de los husos mitóticos con respecto a los diferentes tratamientos, arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ,  $10 \mu\text{M}$ ), nocodazol (NDZ,  $0.0001 \mu\text{M}$ ) y vinblastina (VNB,  $0.001 \mu\text{M}$ ).

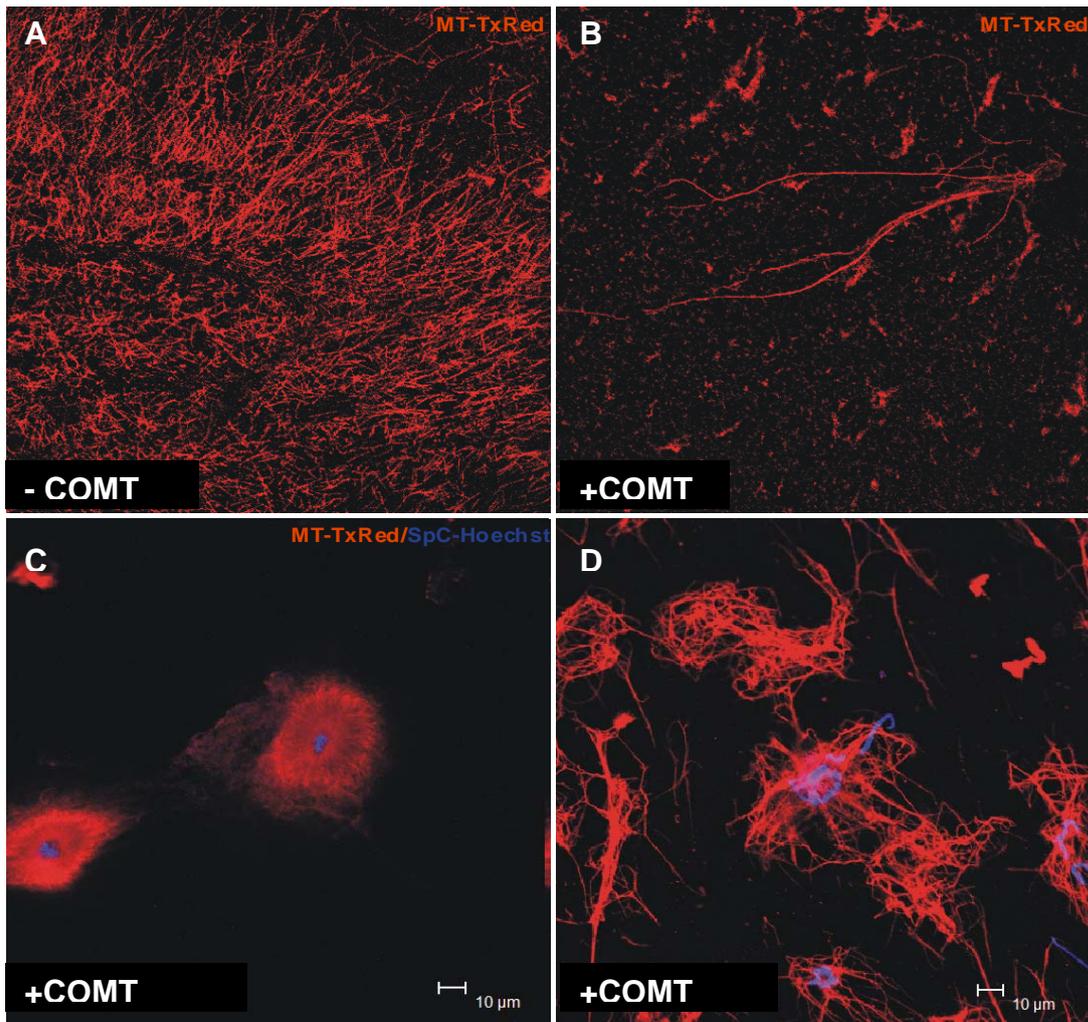


**Figura 13.-** Reconstrucciones tridimensionales (3D) de mitades de husos mitóticos. A) Reconstrucción 3D de una célula control, en azul se observa la reconstrucción de la cromatina (DAPI) y en rojo se observa la reconstrucción de una de las mitades del huso mitótico. B) Reconstrucción 3D de una célula tratada con  $\text{NaAsO}_2$ , en azul se observa la

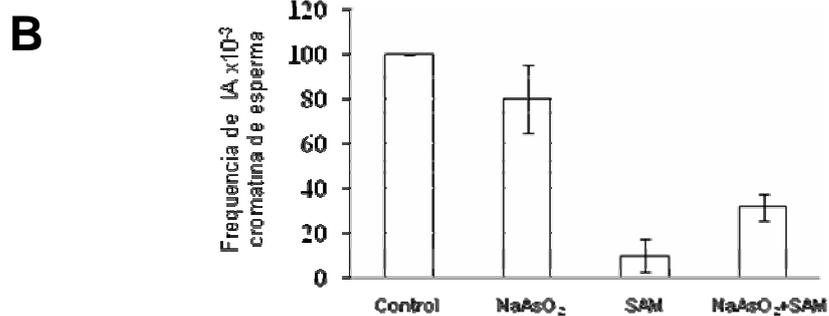
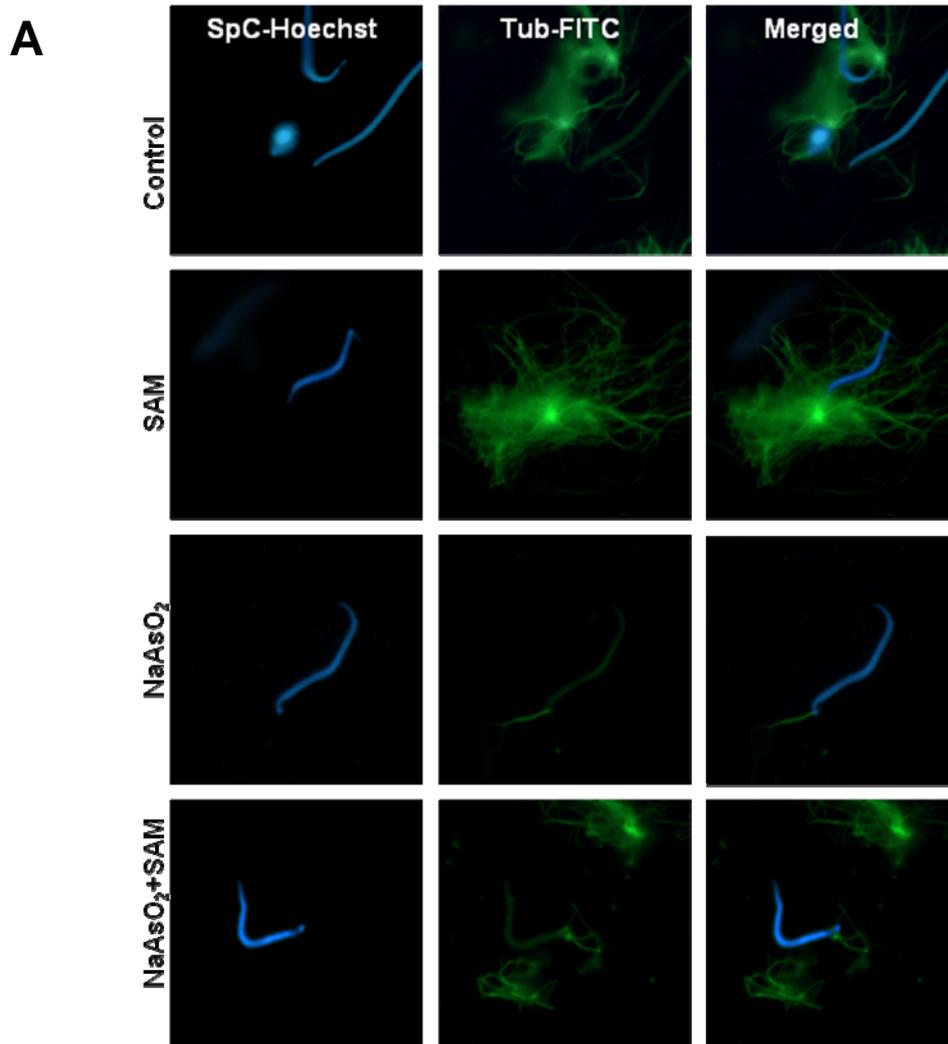
reconstrucción de la cromatina (DAPI) y en rojo se observa la reconstrucción de una de las mitades del huso mitótico.

En cuanto al análisis del modelo acelular, se analizaron varias posibilidades, 1) la polimerización de los MT sin COMT (Figura 14 A), 2) la polimerización dirigida utilizando como COMT a centrosomas humanos (Figura 14 B) y por último 3) la polimerización en la que se utilizaba a la cromatina de esperma como COMT (Figura 14 C). Desafortunadamente, la evaluación sin COMT mostró un margen de error muy grande, de tal forma que solamente se analizaron aquellos extractos en donde un COMT dirigiera la polimerización. El uso de los centrosomas de humano como COMT fue descartado, ya que estos representaban múltiples complicaciones metodológicas no sólo para su aislamiento, sino que también para su mantenimiento durante todo el experimento y al realizar las réplicas del mismo, por lo tanto, se utilizó solamente la cromatina de esperma, la cual funcionó de manera óptima para poder reproducir los resultados cuantas veces fueron necesarias.

De estos análisis se encontró que la polimerización de los MT es inhibida casi en su totalidad por la administración de  $\text{NaAsO}_2$ . No obstante, la combinación con SAM restauró la polimerización de los MT, permitiendo su organización en ásteres interfásicos (Figura 15). Sin embargo, la presencia de cromatina de esperma con ásteres de MT interfásicos es significativamente reducida en comparación con los extractos control y los tratados únicamente con SAM.



**Figura 14.-** Esquemas representativos de la polimerización *in vitro* de MT en extractos interfásicos de *Xenopus laevis*. A) Polimerización inducida sin centro organizador de MT (COMT), B) Polimerización inducida con centrosomas humanos como COMT, C y D) Polimerización de MT tomando como COMT cromatina de esperma, MT (MT-TxRed) y COMT (Hoechst).



**Figura 15.-** Polimerización *in vitro* de MT utilizando como centro organizador de MT (COMT) a la cromatina de espermia. A) cromatina de espermia marcada con Hoechst, MT marcados con fluoresceína (FITC). B) Frecuencia de ásteres interfásicos encontrados en los extractos tratados con NaAsO<sub>2</sub> (10 μM), SAM (170 nM) y la combinación.

### *Análisis del ciclo celular*

Los análisis de microscopia supravital revelan que el tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_2$ , en células sincronizadas con el bloqueo doble de timidina, induce un incremento tiempo dependiente en el porcentaje de células mitóticas (Figura 16 B), las cuales retrasan la transición a anafase, en tanto que, las células tratadas con la combinación  $\text{NaAsO}_2$ -SAM muestran una recuperación en el número de células mitóticas a tiempos más cortos y una completa reducción después de varias horas de tratamiento (Figura 16 C). Dado las dificultades de contabilizar estos efectos por microscopia supravital, se evaluó el índice mitótico con respecto al tiempo después de la sincronización. Los datos corroboran las observación obtenidas por microscopia supravital, ya que las células tratadas con  $\text{NaAsO}_2$  y aquellas tratadas con la combinación muestran un incremento significativo en el número de células mitóticas a las 12 y 14 horas ( $p < 0.0001$ , figura 18 A) con respecto a las células control y las tratadas con SAM. Sin embargo, aquellas tratadas con la combinación tienen una disminución significativa en el número de células mitóticas a estas mismas horas, con respecto a las tratadas únicamente con  $\text{NaAsO}_2$  ( $p < 0.0001$ , Figura 18 A). La figura 17 muestra una representación esquemática del retraso en el ciclo celular inducido por  $\text{NaAsO}_2$  en metafase.

El análisis del índice nuclear (IN) y las figuras mitóticas después de las 24 horas de tratamiento (Figura 18 B) muestra diferencias significativas ( $p < 0.001$ ). Los IN calculados son: control de 1.64,  $\text{NaAsO}_2$  de 1.46, SAM con 1.69 y 1.53 en el caso del tratamiento combinado  $\text{NaAsO}_2$ -SAM. El número de células binucleadas en los cultivos tratados con  $\text{NaAsO}_2$  son menores que aquellos tratados con la combinación, lo que demuestra que  $\text{NaAsO}_2$  reduce el número de células binucleadas. De manera similar, el

NaAsO<sub>2</sub> incrementa el número de células mitóticas después de las 24 horas de tratamiento ( $p < 0.0001$  con respecto al control), efecto que es reducido por la adición de SAM ( $P < 0.001$  con respecto a NaAsO<sub>2</sub>).

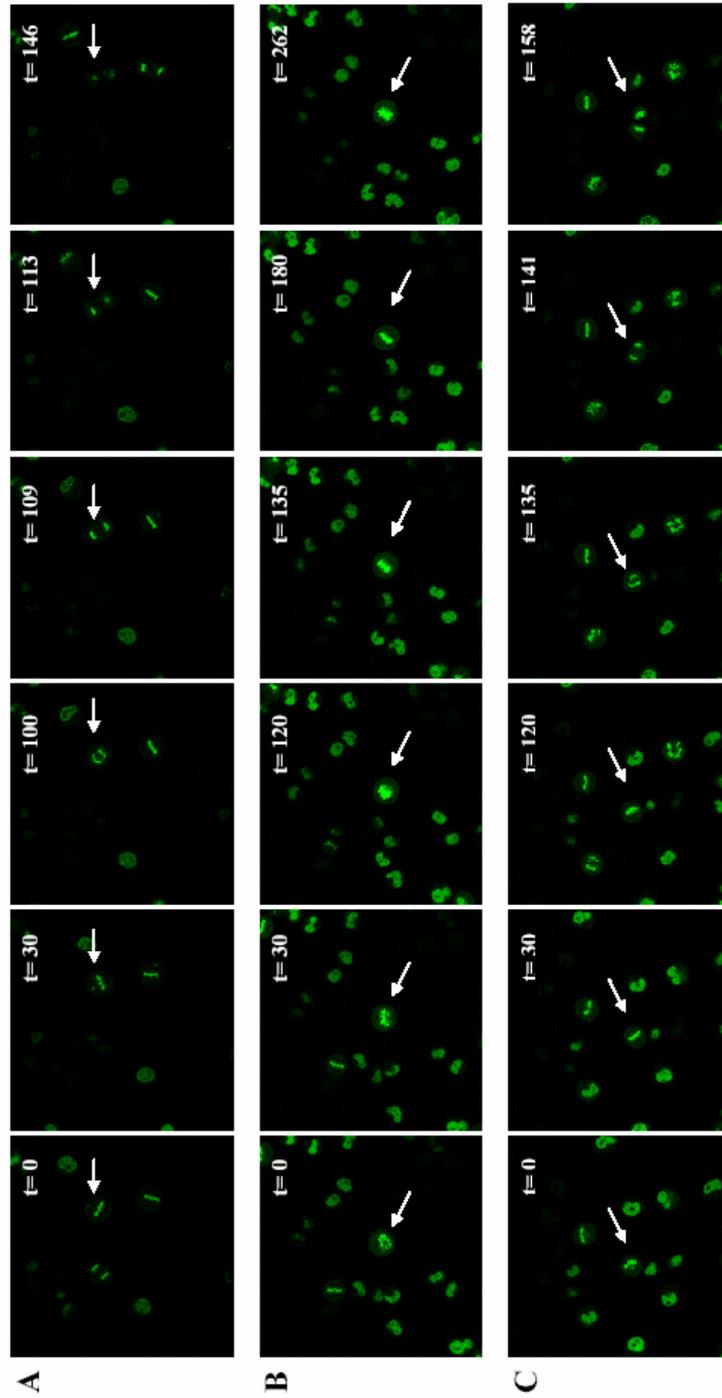
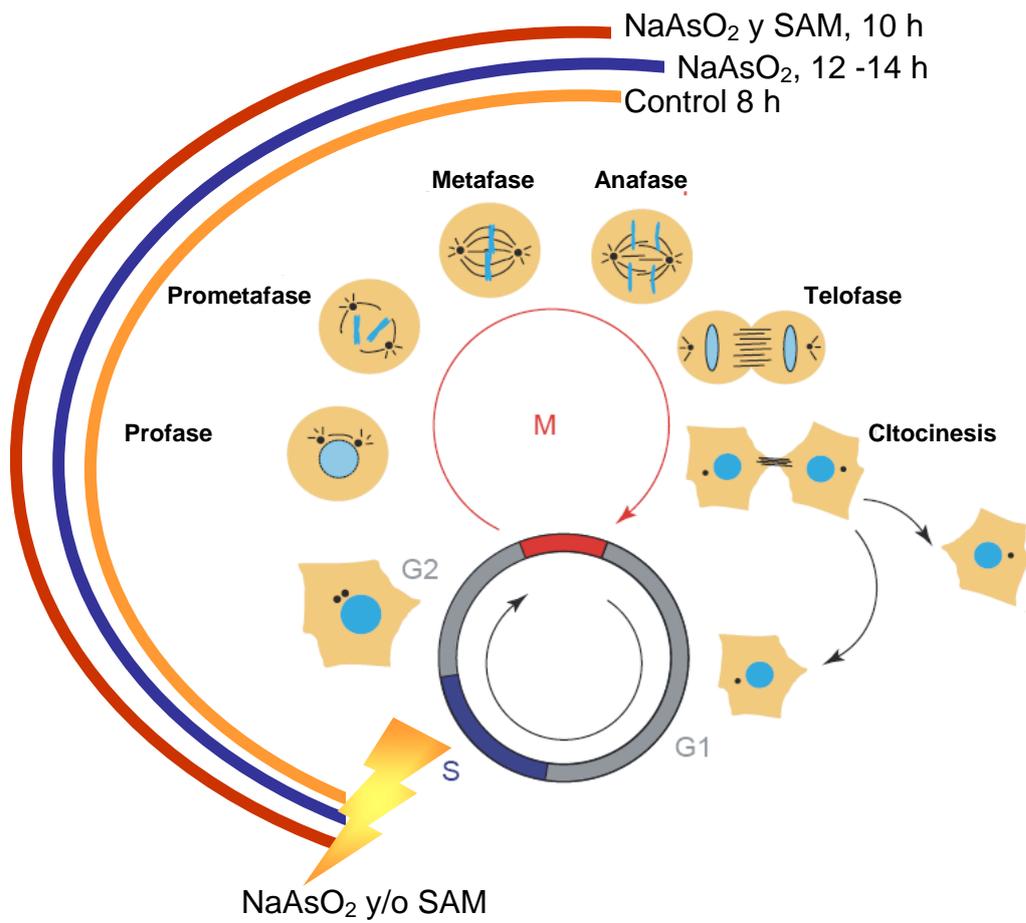
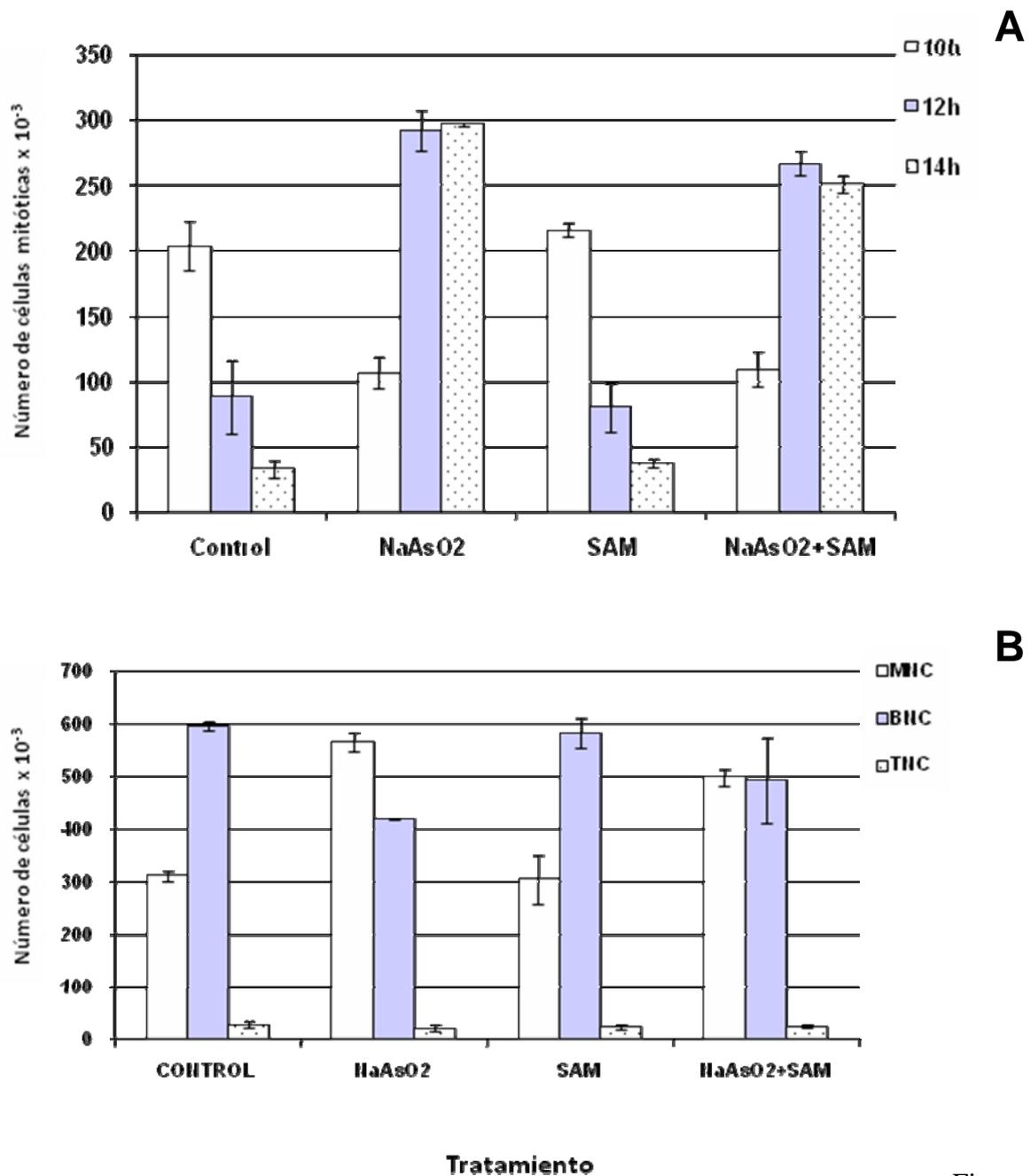


Figura 16.- Microscopía supravital de células HeLa H4-EGFP. Las flechas indican células mitóticas, A) control, B) células tratadas con NaAsO<sub>2</sub> y C) Células tratadas con NaAsO<sub>2</sub> y SAM.



**Figura 17.-** Representación esquemática del arresto en metafase que experimentan las células después del bloqueo doble de timidina y que son tratadas con arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>, 10 μM ●), NaAsO<sub>2</sub> y SAM (●), control (●).

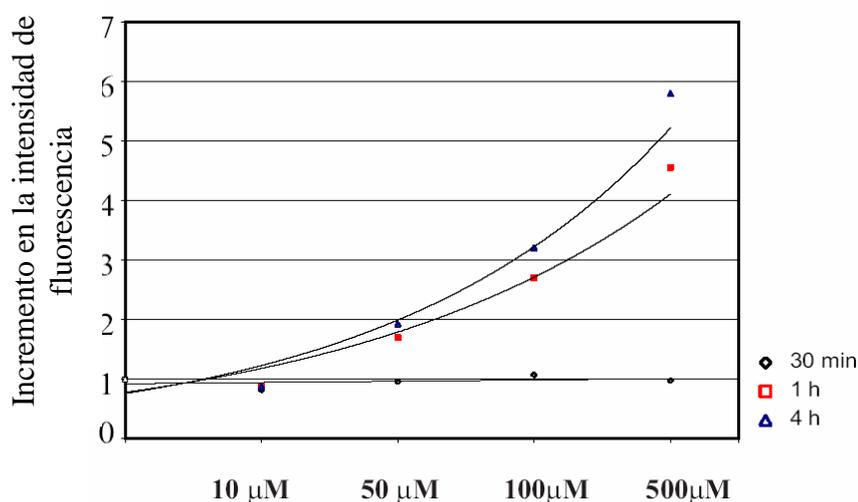


Fig

ura 18.- A) Frecuencia de células mitóticas a lo largo del tiempo en células HeLa sincronizadas y tratadas con arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>, 10 μM), SAM (170 nM) y la combinación. B) Cinética de proliferación celular en células HeLa no sincronizadas y tratadas durante 24 horas, células mononucleadas (MNC), binucleadas (BNC), polinucleadas (PNC) y mitosis en 1000 células.

*Evaluación del estrés oxidativo inducido por NaAsO<sub>2</sub>*

Dado que los efectos del  $\text{NaAsO}_2$  sobre los MT y centrosomas podría deberse a la generación de ERO, se investigó esta posibilidad. El análisis de ERO revela una curva dosis-respuesta de  $\text{NaAsO}_2$  y la inducción de ERO. Los resultados indican que  $\text{NaAsO}_2$  induce ERO de forma dosis y tiempo dependiente (Figura 20). Sin embargo, bajas concentraciones ( $10 \mu\text{M}$ ) no inducen la formación de ERO en proporciones detectables por el sistema utilizado. Las concentraciones iguales o por arriba de  $50 \mu\text{M}$  a tiempos mayores de 30 minutos incrementan significativamente ERO. Estos datos sugieren que la generación de radicales libres no está relacionada con las alteraciones en el huso mitótico y tampoco con las del ciclo celular.



**Figura 19.-** Estrés oxidativo inducido por arsenito de sodio a diferentes concentraciones ( $\text{NaAsO}_2$ , 10, 50, 100 y  $500 \mu\text{M}$ ) y a diferentes tiempos (30 minutos, 1, 2 y 4 horas)

**c) Evaluación de los efectos de SAM sobre la capacidad moduladora del  $\text{NaAsO}_2$  en la cromatina.**

*Citotoxicidad de  $\text{NaAsO}_2$  en células HepG2.*

Los efectos celulares del NaAsO<sub>2</sub> son dependientes de la dosis utilizada, tiempo de exposición y tipo celular. Por lo que se evaluó la citotoxicidad del NaAsO<sub>2</sub> en células HepG2 mediante la detección de anexina V por citometría de flujo.

Las células HepG2 fueron expuestas a NaAsO<sub>2</sub> durante 2, 4, 12 y 24 horas a diferentes concentraciones, 7.5, 10, 15, 50 y 100 µM. Se evaluó la inducción de apoptosis mediante la cuantificación de fluoresceína acoplada a anexina-V y la de yoduro de propidio. Los resultados muestran que especialmente a tiempos cortos de exposición el número de células apoptósicas se incrementa con respecto a la concentración de NaAsO<sub>2</sub>, lo que sugiere que la inducción de apoptosis por NaAsO<sub>2</sub> es dosis-dependiente (Tabla I y Figura 20). De igual forma esto fue observado para tiempos largos de exposición, 12 y 24 horas. De manera interesante se observó que las dosis más altas 50 y 100 µM indujeron necrosis en mayor proporción que la apoptosis. Estos datos muestran que los efectos citotóxicos del NaAsO<sub>2</sub> son dosis dependientes, especialmente a bajas concentraciones, sin embargo, es independiente del tiempo de exposición.

Los datos aquí descritos, así como los listados en la Tabla I, indican que los efectos citotóxicos del NaAsO<sub>2</sub> en este tipo celular son menores.

**Tabla I.-** Inducción de muerte por arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>) tiempo y dosis dependiente en células HepG2. Los números están dados en porcentajes.

<b>Tratamiento</b>
--------------------

Exposición (horas)	Células muertas	control	7.5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	15 $\mu$ M	50 $\mu$ M
		<b>2 h</b>	necrosis	0.42	0.46	0.49
	apoptosis	3.64	5.27	5.23	7.43	n.d.
<b>4 h</b>	necrosis	0.52	0.66	0.63	0.71	n.d.
	apoptosis	3.03	3.52	2.17	4.65	n.d.
<b>12 h</b>	necrosis	0.48	1.21	1.17	1.45	0.61
	apoptosis	1.05	2.63	3.10	3.54	3.87
<b>24 h</b>	necrosis	1.07	1.99	4.60	5.56	5.86
	apoptosis	2.41	5.89	4.37	4.52	3.62

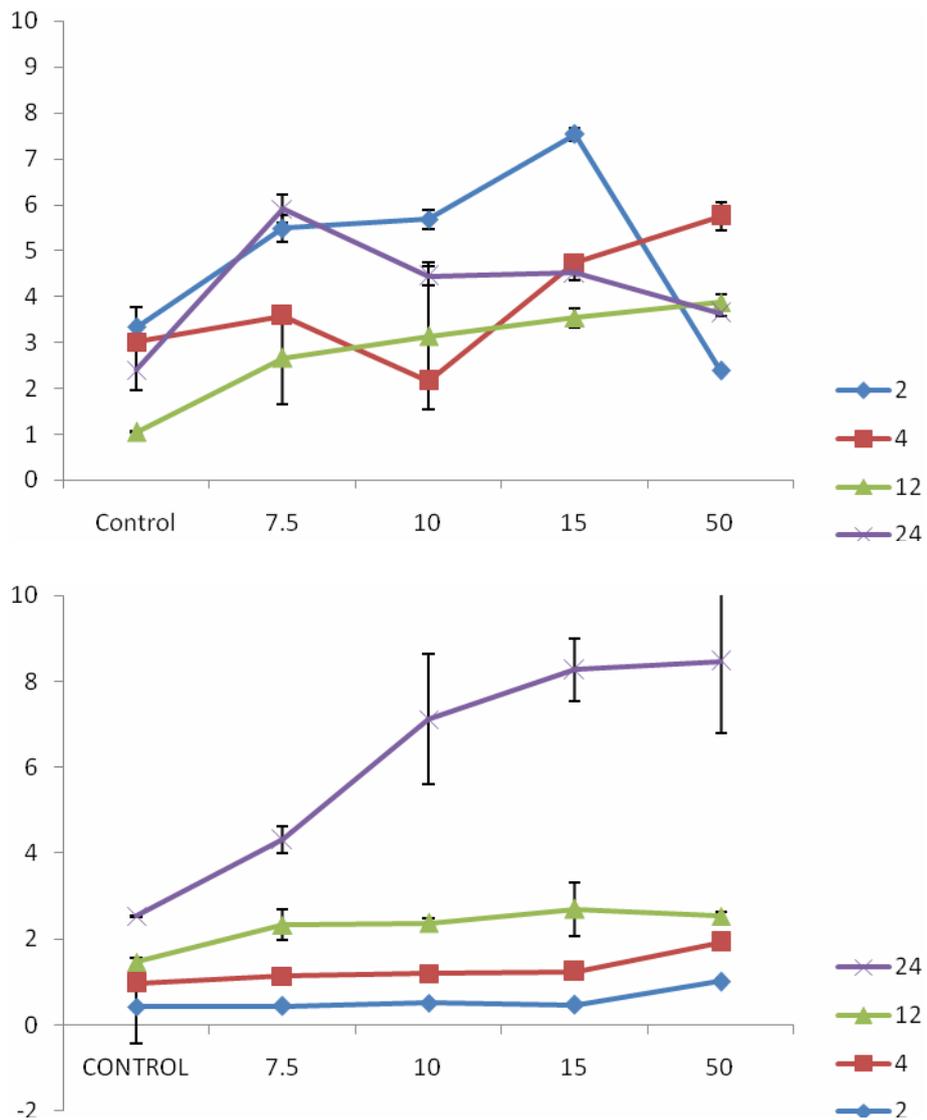


Figura 20.- A) Porcentaje de células apoptóticas inducidas por  $\text{NaAsO}_2$  con respecto al tiempo y la concentración. B) Porcentaje de células necróticas inducidas por  $\text{NaAsO}_2$  con respecto al tiempo y la concentración.

*$\text{NaAsO}_2$  no afecta el estado de metilación de histonas*

Al igual que las alteraciones en la metilación del ADN se relaciona con inestabilidad genética y en la modulación de la expresión génica, también lo han sido las alteraciones en las modificaciones de histonas.

Las modificaciones de histonas, son consideradas como reguladores importantes de la organización del genoma y la expresión génica. Por lo que se decidió analizar el estado de metilación global de histonas durante el tratamiento con  $\text{NaAsO}_2$ , para ello se realizaron IF de estas modificaciones de histonas, al igual que estudios de Western blot.

Se analizaron patrones de metilación de histonas que son característicos de cromatina activa, como la di y trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 ( $\text{H3K4me}_2$  y  $\text{H3K4me}_3$ ), en tanto que los que son característicos de cromatina inactiva son la di y trimetilación de la histona H3 en su lisina 9 ( $\text{H3K9me}_2$  y  $\text{H3K9me}_3$ ) o la trimetilación de la histona H4 en la lisina 20 ( $\text{H4K20me}_3$ ). Los análisis de las IFs revelan una distribución similar de los patrones de metilación global de las modificaciones de histonas, lo que sugiere que a este nivel el  $\text{NaAsO}_2$  no tiene una influencia (Figura 21). Estos datos se corroboraron por los análisis de Western blot.

Ya que durante el proceso de detoxificación del arsénico, este al ser metilado provoca la reducción en los niveles de SAM, se evaluó el efecto de la administración exógena de SAM sobre la modulación de la cromatina inducida por  $\text{NaAsO}_2$ , además como control positivo se utilizó 5-azacitidina ( $10 \mu\text{M}$ ). Los datos encontrados por Western blot revelan que la adición de SAM o la exposición a 5-azacitidina afectan los niveles globales de metilación de histonas (Figura 21 C).

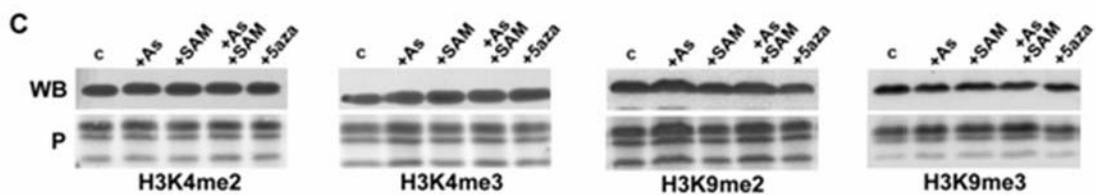
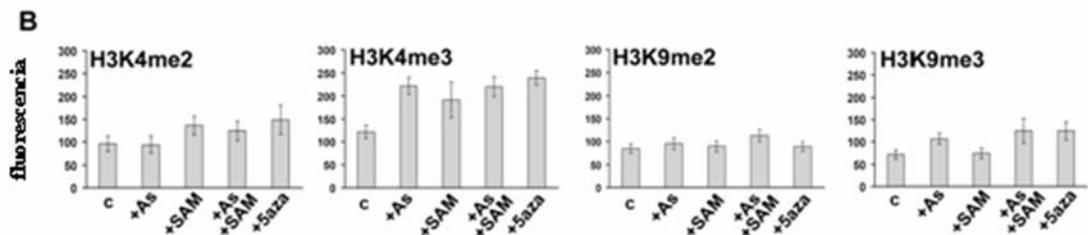
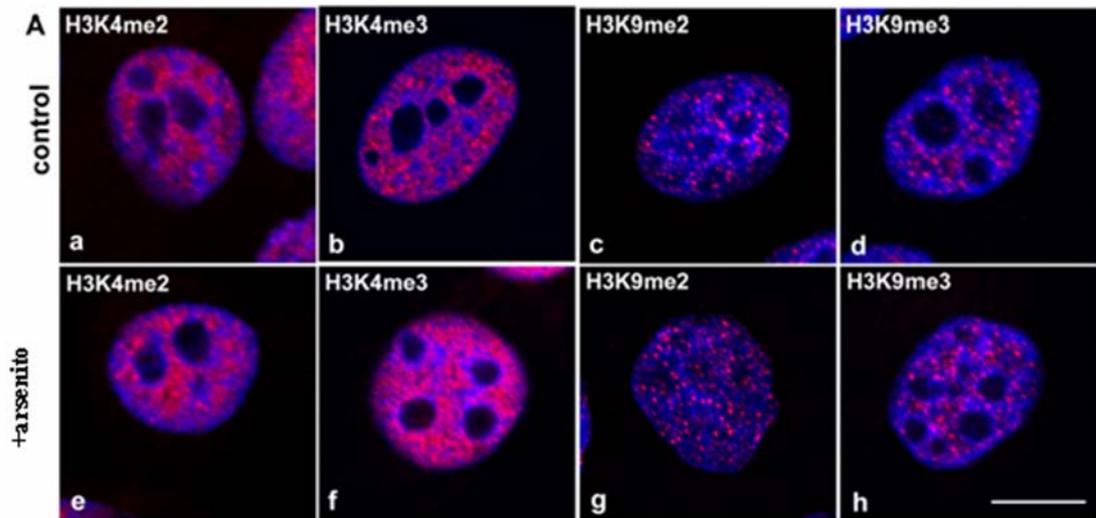
El análisis detallado de las IFs muestra un incremento en la fluorescencia en aquellas células tratadas con  $\text{NaAsO}_2$ , por lo que decidí evaluar la intensidad de fluorescencia emitida por las células expuestas a los diferentes tratamientos. Las intensidades relativas de fluorescencia se analizaron con el programa Leica Lite y los

datos obtenidos se muestran en la Tabla II. A excepción de las intensidades de fluorescencia de H3K4 dimetilado y H3K27 trimetilado, el resto de las modificaciones de histonas mostraron un incremento significativo respecto al tratamiento con NaAsO<sub>2</sub>. Además, se observó que la administración de SAM incrementa la fluorescencia de H3K4 dimetilado y trimetilado, H4K20 y H3K27 trimetilados. En tanto que el tratamiento con 5-azacitidina elevó considerablemente la fluorescencia de la mayoría de las modificaciones de histonas (Figura 21 B). Dado que los patrones de IF así como los datos de Western blot permanecieron idénticos aún después de los diferentes tratamientos, sin embargo, las intensidades relativas de fluorescencia fueron diferentes, se sugiere que este incremento puede deberse a un mejor acceso del anticuerpo a los nucleosomas debido a la apertura de la cromatina que los diferentes tratamientos inducen.

**Tabla II.-** Intensidades de fluorescencia de los patrones de metilación en células HepG2 después del tratamiento con arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>, 7.5 μM), SAM (170 nM), la combinación, y 5-azacitidina (5-aza, 10 μM).

Modificación de histonas	Tratamiento				
	Control	+NaAsO <sub>2</sub>	+SAM	+NaAsO <sub>2</sub> / +SAM	+ 5-aza

H3K4 me2	96.23 ± 16.6	94.42 ± 18.42 p=0.7164	<b>136.44 ± 19.72</b> p<0.0001	<b>124.79 ± 21.93</b> p<0.0001	<b>149.08 ± 32.01</b> p<0.0001
H3K4me3	121.81 ± 14.96	<b>222.001 ± 18.76</b> p<0.0001	<b>191.65 ± 38.53</b> p<0.0001	<b>219.917 ± 21.64</b> p<0.0001	<b>239.501 ± 14.84</b> p<0.0001
H3K9 me1	69.79 ± 10.12	<b>100.93 ± 22.86</b> p<0.0001	71.89 ± 10.79 p=0.5025	<b>88.25 ± 20.39</b> p=0.0007	<b>111.53 ± 27.88</b> p<0.0001
H3K9 me2	84.45 ± 9.99	<b>95.43 ± 12.96</b> p=0.0018	89.78 ± 11.74 p=0.097	<b>112.66 ± 13.44</b> p<0.0001	89.12 ± 10.32 p=0.1412
H3K9me3	72.11 ± 10.29	<b>107.28 ± 12.61</b> p<0.0001	74.31 ± 11.67 p=0.4166	<b>125.04 ± 27.89</b> p<0.0001	<b>124.57 ± 20.86</b> p<0.0001
H4K20me3	125.51 ± 13.46	<b>165.61 ± 20.27</b> p<0.0001	<b>152.72 ± 18.85</b> p=0.0012	134.94 ± 22.29 p=0.2544	<b>176.33 ± 22.65</b> p<0.0001
H3K27 me3	69.63 ± 16.19	63.51 ± 9.55 p=0.1657	<b>88.63 ± 15.62</b> p<0.0001	54.71 ± 9.89 p=0.003	83.3 ± 15.02 p=0.0044



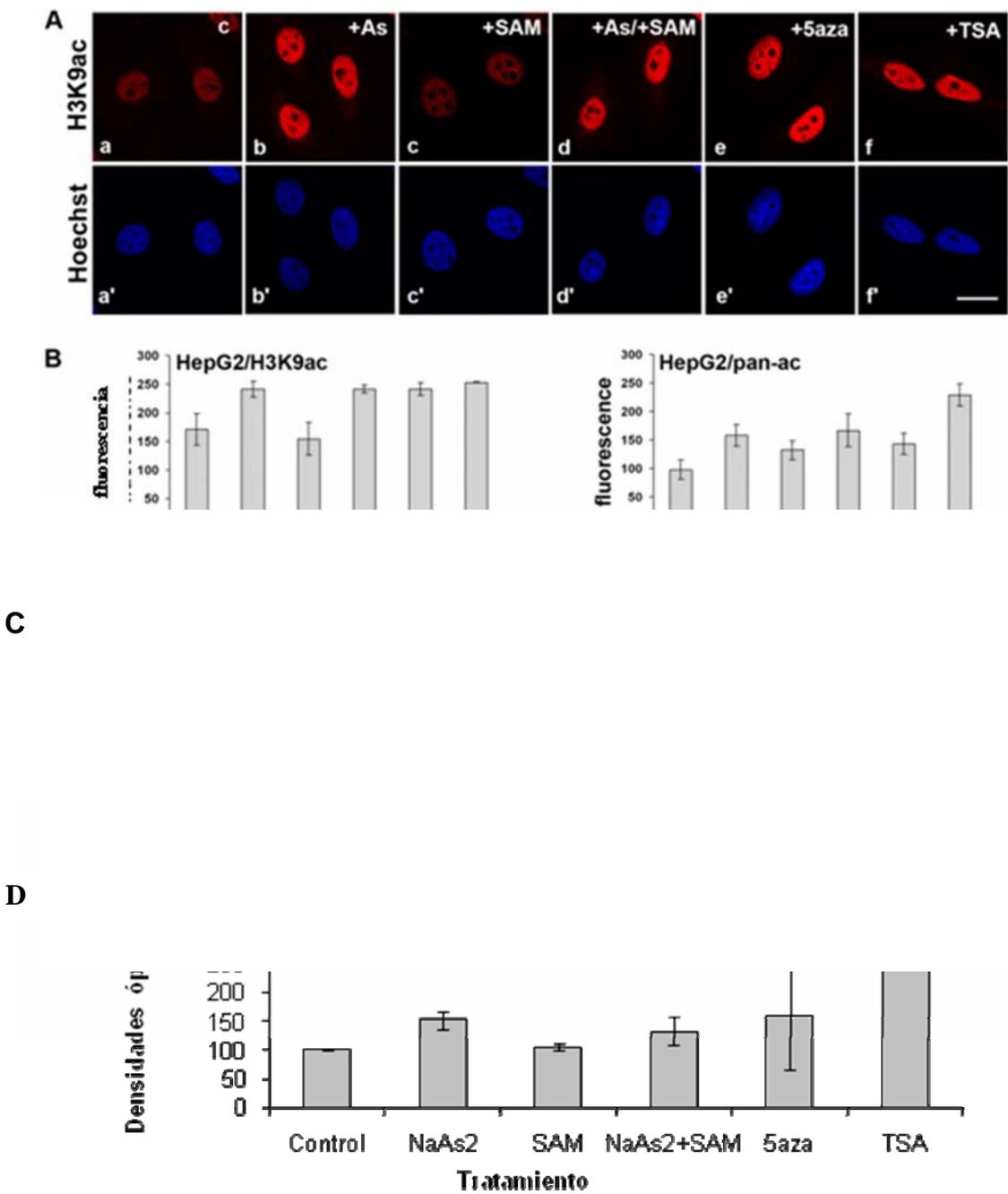
**Figura 21.-** El arsenito de sodio no altera el patrón de metilación de histonas. A) Análisis inmunofluorescente de los patrones de metilación de histonas, se ejemplifica las siguientes modificaciones, H3K4 me2, H3K4 me3, H3K9 me2 y H3K9 me3. B) Intensidad de fluorescencia de los patrones de metilación en células HepG2 después del tratamiento con arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>, 7.5 μM), SAM (170 nM), la combinación, 5-azacitidina (5-aza, 10 μM). C) Análisis por Western Blot (WB) de las modificaciones de histonas después del tratamiento con arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>, 7.5 μM), s-adenosil-L-metionina SAM (170 nM), la combinación, 5-azacitidina (5-aza, 10 μM).

#### *Inducción de acetilación de histonas por NaAsO<sub>2</sub>*

De manera similar a la metilación de histonas, se analizaron los patrones de acetilación de histonas. Como un marcador de la apertura de la cromatina se evaluó la acetilación de las histona 3 en la lisina 9 (H3K9ac), además de un marcador de acetilación global de proteínas (pan-lisina). Como control del experimento se utilizó tricostatina A (TSA, 100 nM) ya que este compuesto induce hiperacetilación de la cromatina.

El análisis de este efecto revela que NaAsO<sub>2</sub> incrementa significativamente la hiperacetilación de H3K9ac y pan-lisina (Figura 22) de manera similar al tratamiento con TSA. Además, el tratamiento con 5-azacitidina provoca cambios en los patrones de acetilación de H3K9 ac y pan-lisina. Estos resultados se corroboraron mediante Western blot y demuestran de manera clara que el NaAsO<sub>2</sub> al incrementar la acetilación de H3K9 induce la apertura de la cromatina, de manera similar al efecto promovido por los controles positivos, TSA y 5-azacitidina. Además, la hiperacetilación de proteínas en general, revela en la inmunodetección del anticuerpo panlisina (Figura 22), sugiere que tiene la capacidad de modificar diversos procesos celulares.

El tratamiento con SAM, no induce cambios significativos sobre los efectos moduladores del NaAsO<sub>2</sub>.



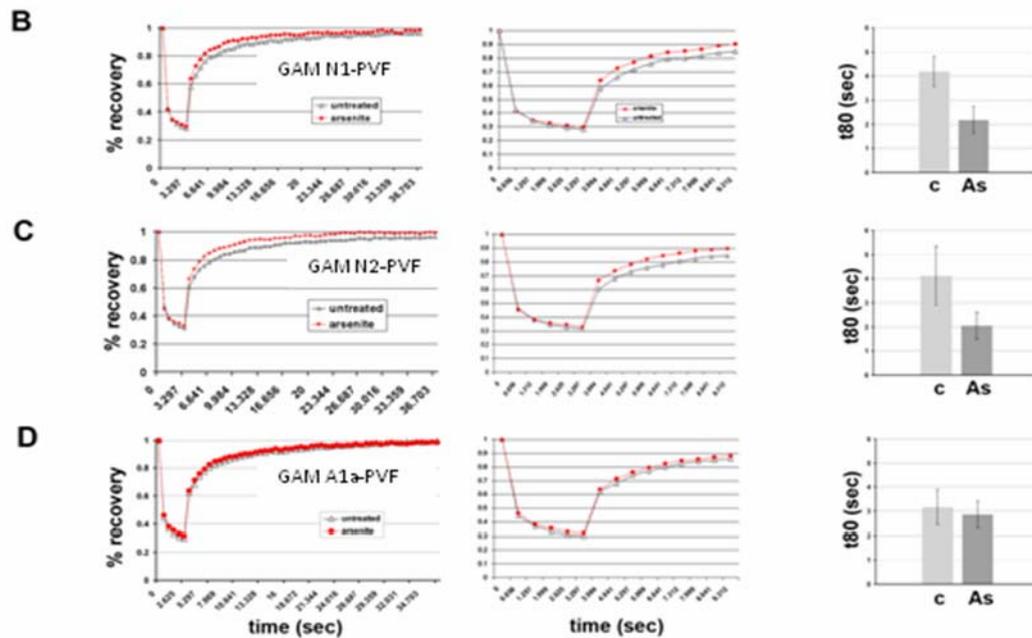
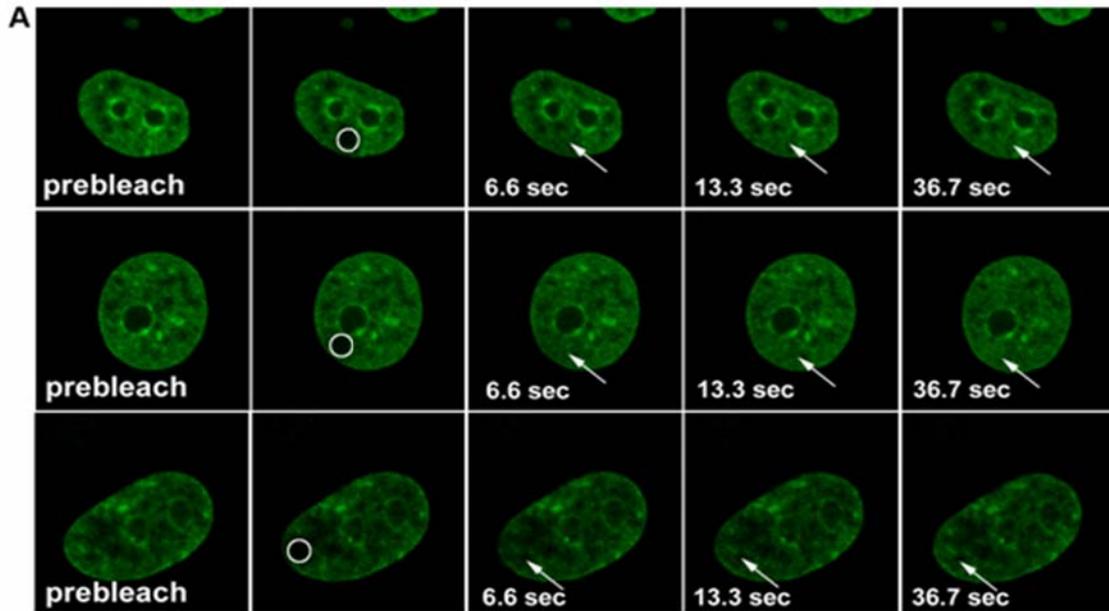
**Figura 22.-** El arsenito de sodio altera el patrón de acetilación de histonas. A) Análisis inmunofluorescente de los patrones de acetilación de la histona H3K9 ac y de proteínas

en general, B) Intensidad de fluorescencia de los patrones de metilación en células HepG2 después del tratamiento con arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ,  $7.5 \mu\text{M}$ ), s-adenosil-L-metionina (SAM,  $170 \text{ nM}$ ), la combinación, 5-azacitidina (5-aza,  $10 \mu\text{M}$ ). C) Análisis por Western Blot de las modificaciones de histonas después del tratamiento  $\text{NaAsO}_2$  ( $7.5 \mu\text{M}$ ), SAM ( $170 \text{ nM}$ ), la combinación, 5-azacitidina (5-aza,  $10 \mu\text{M}$ ) y tricostatina A (TSA,  $100 \text{ nM}$ ), D) Densidades ópticas promedio de los Western Blot para el análisis de la acetilación de histonas.

### *El $\text{NaAsO}_2$ eleva la movilidad de las proteínas GAM*

Las proteínas GAM (grupo de alta movilidad) son elementos estructurales de la cromatina, los cuales se unen dinámicamente al ADN y/o a los nucleosomas. La unión de las GAM a los nucleosomas (GAMN, grupo de alta movilidad nucleosomal) pueden bloquear el acceso a factores que modifican los extremos aminos terminales de las histonas. En tanto que el incremento en esta dinámica de unión de las proteínas GAMN a los nucleosomas sucede cuando la cromatina se encuentra abierta y más accesible a distintos factores reguladores y por lo tanto correlaciona con la activación transcripcional (Lim y cols., 2004). Para evaluar la influencia del  $\text{NaAsO}_2$  sobre la dinámica de estas proteínas remodeladoras de la cromatina, se diseñó un sistema en el cual se utilizó la sobreexpresión de las proteínas GAM en quimera con una PVF que sirve como reportero de la presencia de las proteínas GAM, la sobreexpresión se realizó en células HepG2. La dinámica de las proteínas se evaluó mediante FRAP después de la exposición de las células a  $\text{NaAsO}_2$  durante 12 h. Se evaluó la dinámica de tres GAMs, dos que se unen a los nucleosomas (GAM N1-PVF y GAM N2-PVF) y una tercera que se asocia al ADN (GAM A1-PVF). Los resultados de los análisis de FRAP se resumen en la figura 20. Brevemente, para poder calcular el tiempo de recuperación del 80 % de

fluorescencia esperada, es decir, el de los controles, se realizó una irradiación previa. Los valores para los controles fueron de  $4.19 \pm 0.63$  segundos para GAM N1-PVF,  $4.12 \pm 1.21$  segundos para GAM N2-PVF y  $3.17 \pm 0.73$  segundos para GAM A1-PVF. Después del tratamiento con  $\text{NaAsO}_2$ ,  $t_{80}$  se redujo a  $2.17 \pm 0.56$  seg para GAM N1-PVF ( $p < 0.0001$ ) y a  $2.05 \pm 0.56$  para GAM N2-PVF ( $p < 0.0001$ ) (Figura 23). Estos resultados indicaron que  $\text{NaAsO}_2$  incrementaba significativamente la dinámica de GAM N1 y N2. Sin embargo, cuando se analizó el comportamiento de GAM A1 después del tratamiento con  $\text{NaAsO}_2$  se observó que aunque hubo una reducción de la  $t_{80}$  a  $2.86 \pm 0.56$  segundos, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.22$ ), lo que indica que la dinámica de las proteínas que se unen directamente al ADN no es afectada por el tratamiento con  $\text{NaAsO}_2$ . En conjunto, estos datos sugieren que el  $\text{NaAsO}_2$  es capaz de modular las propiedades cinéticas de proteínas remodeladoras de la cromatina, actuando de manera preferencial sobre los nucleosomas.



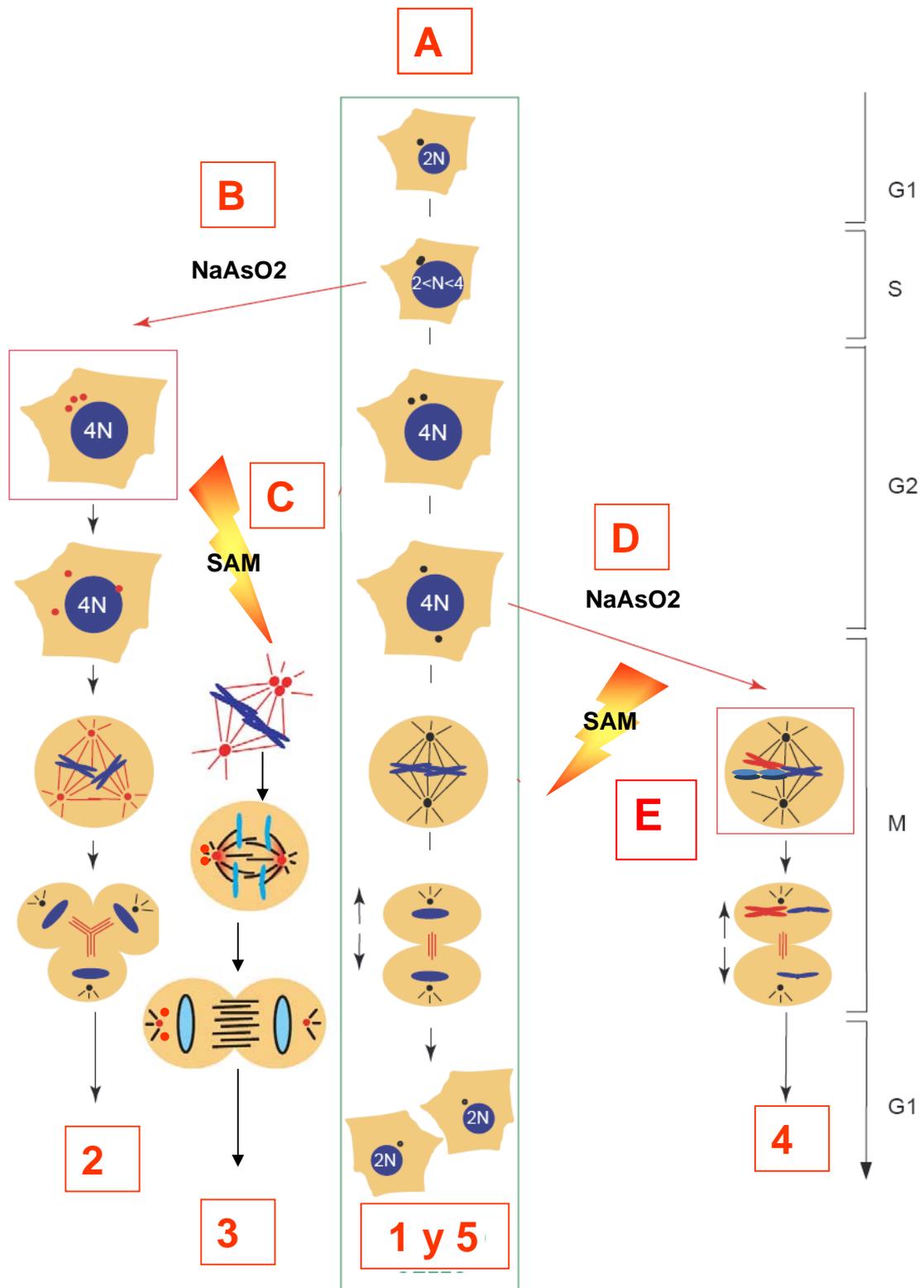
**Figura 23.-** Recuperación de la fluorescencia después de la irradiación láser (FRAP) en células HepG2 que expresan GAM N1-PVF, GAM N2-PVF y GAM A1-PVF en células sin tratamiento y tratadas con arsenito de sodio por 24 h ( $\text{NaAsO}_2$ ,  $7.5 \mu\text{M}$ ). Las células fueron irradiadas por aproximadamente 3.3 segundos en un área aproximada de  $4 \mu\text{m}$  representada en la imagen como un círculo.

## 9. CONCLUSIONES

No obstante que la inducción de aneuploidías tienen repercusiones importantes en la salud humana, los mecanismos por los cuales se genera este tipo de daño genético aún siguen siendo estudiados. Se piensa que existen diversas causas que pueden originar las aneuploidías, causas intrínsecas, como mutaciones en genes que codifican para proteínas que regulan la segregación cromosómica, o causas extrínsecas, como la nutrición o la exposición a agentes químicos. Es la exposición a agentes químicos de particular interés para nosotros, ya que los seres humanos estamos expuestos continuamente a una gran diversidad de compuestos que potencialmente representan un riesgo para la salud humana. Tomando como modelo al  $\text{NaAsO}_2$ , en el presente trabajo estudiamos el papel del donador universal de grupos metilo, SAM, en la prevención de la inducción de aneuploidías. Nuestros resultados muestran que SAM es capaz de reducir la frecuencia de cromosomas rezagados y por lo tanto de células aneuploides. Además de que estos efectos se relacionan con la capacidad de SAM de proteger contra las perturbaciones mitóticas inducidas por  $\text{NaAsO}_2$ , lo que sugiere un papel esencial de SAM durante la segregación cromosómica. Dado que SAM participa preferencialmente en las reacciones de transmetilación, una posibilidad de acción durante la mitosis podría ser la metilación de proteínas involucradas ya sea en la formación del huso mitótico, la segregación de los cromosomas, la separación de las cromátidas hermanas o inclusive en la degradación de algunas de estas moléculas. Sin embargo, otra posibilidad podría ser la participación de las regiones centroméricas y los cambios en la metilación de componentes de la cromatina a estos niveles, un acercamiento a esta idea fue abordada con la tercer estrategia utilizada en el presente trabajo, en donde estudiamos los cambios epigenéticos inducidos por  $\text{NaAsO}_2$  y la modulación de estos eventos por SAM. Nuestros datos sugieren que de manera global es factible la modificación epigenética

inducida por  $\text{NaAsO}_2$  y que además SAM posee una respuesta moduladora, por lo que en el futuro es de particular importancia el estudio de los patrones epigenéticos del centrómero en células expuestas a inductores de aneuploidías.

En general consideramos que nuestros resultados aportan información importante acerca de los mecanismos involucrados en la formación de células aneuploides, así como del papel de SAM en el control de la generación de las mismas y en la prevención de este daño (Figura 24). Además, nuestros datos abren nuevas alternativas en el estudio de las aneuploidías, perfilándose de manera peculiar el papel de los cambios epigenéticos a nivel del centrómero y su relación con la maquinaria de segregación cromosómica, lo que seguramente dará nuevos avances en el entendimiento de la generación de individuos aneuploides. Todo ello sin olvidar el potencial terapéutico que representaría el uso futuro de SAM en la prevención de aneuploidías, especialmente si consideramos que SAM ya es utilizado en la clínica para el tratamiento de diversas enfermedades hepáticas y neurológicas en seres humanos.



**Figura 24.-**Modelo que explica los posibles mecanismos de acción por lo cuales SAM reduce la inducción de aneuploidías (Explicación en la siguiente hoja).

**Explicación del modelo de los mecanismos de acción de SAM:**

A) Se refiere a la condición normal, en la que la célula cursa por cada una de las fases del ciclo celular sin mayor complicación. Es capaz de duplicar su información genética, así como su centrosoma durante la fase de síntesis (S), mientras que en la mitosis (M) esta segrega de manera adecuada sus cromosomas, teniendo como resultado (1) la formación de dos células hijas normales, es decir con igual información genética.

B) Sería el caso en el cual la célula es expuesta a los efectos tóxicos del arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) y como consecuencia tendría que durante la fase de S, la célula podría duplicar su centrosoma con errores, es decir, el  $\text{NaAsO}_2$  podría inducir la amplificación de centrosomas, lo que traería como consecuencia la formación de husos mitóticos multipolares durante la fase M. Esto a su vez provocaría la distribución anormal del material genético, generándose la formación de células hijas aneuploides (2).

C) En este caso tenemos a la célula expuesta a  $\text{NaAsO}_2$  pero también en presencia de la s-adenosil-l-metionina (SAM), lo que muy probablemente generaría que los centrosomas amplificados por acción de  $\text{NaAsO}_2$  pudieran de alguna forma coalescer y lograr formar husos mitóticos bipolares en la fase M. La formación de husos bipolares permitiría la repartición normal de los cromosomas a las células hijas, evitándose así la formación de células aneuploides (3).

D) En este caso tenemos nuevamente una célula expuesta a  $\text{NaAsO}_2$  pero a diferencia de B, aquí el efecto mayoritario del  $\text{NaAsO}_2$  sería sobre los microtúbulos (MT) y sobre las placas cinetocóricas por alteraciones en la estructura de la cromatina a nivel del centrómero es decir, ejercería sus efectos tóxicos en la fase M, con lo que se generaría el rezago de cromosomas completos o la orientación incorrecta de los mismos, de tal forma que el resultado sería la pérdida de cromosomas completos, con lo que se obtendrían células aneuploides (4).

E) En este caso, es la misma célula expuesta a  $\text{NaAsO}_2$  pero en presencia de SAM, por lo que SAM actuaría potencialmente a varios niveles, ya sea promoviendo la polimerización de los MT, la reestructuración de la cromatina a nivel del centrómero y de esta forma permitiendo el correcto alineamiento de las placas cinetocóricas y la correcta alineación de los cromosomas a la placa metafásica, de esta forma el resultado sería la generación de células hijas normales (5).

## 10. REFERENCIA

- Amor DJ, Choo KH.(2002) Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet*, 71(4):695-714.
- Axelrod J. (1971) Biochemical pharmacology of catecholamines and its clinical implications. *Trans Am Neurol Assoc*, 96:179-86.
- Barcelo H.A., Wiemeyer J.C., Sagasta C.L., Macias M., Barreira J.C. (1990) Experimental osteoarthritis and its course when treated with S-adenosyl-L-methionine. *Rev Clin Esp*, 187(2):74-78.
- Barnes J.A., Collins B.W., Dix D.J., Allen J.W. (2002) Effects of heat shock protein 70 (Hsp70) on arsenite-induced genotoxicity. *Environ Mol Mutagen*, 40(4):236-42
- Basso K, Russo A. (2000). Detection and characterization of micronuclei in a murine liver epithelial cell line, by application of the in vitro cytokinesis block MN assay and PRINS. *Mutagenesis*, (4):349-56.
- Bonassi S, Au WW. (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat Res*, 511(1):73-86.
- Boue J, Bou A, Lazar P (1975). Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology*, 12(1):11-26.
- Boulander-Gouaille, C. (1999) Focus on homocystein. Springer Verlag, France.
- Bottiglieri, T., Hyland, K. y Reynolds, E.H. (1994) The clinical potential of adomethionine (S- adenosylmethionine) in neurological disorders. *Drugs*, 48(2):137-152.
- Bremer J., Greenberg D. (1961) Methyltrasnferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin. *Biochim Biophys Acta*, 46: 205-216.

- Cantoni G.L. (1953) S-adenosylmethionine; a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and ATP. *J Biol Chem*, 204: 403-416.
- Cantoni G.L. (1956) Enzymatic mechanisms and biological significance of transmethylation reactions. En *Proceedings of the Third International Congress of Biochemistry* (ed C. Liebecq) Academic Press, NY: 233-237.
- [Chen F, Zhang Z, Leonard SS, Shi X](#). Contrasting roles of NF-kappaB and JNK in arsenite-induced p53-independent expression of GADD45alpha. *Oncogene*. 2001 Jun 14;20(27):3585-3589.
- [Chen F, Lu Y, Zhang Z, Vallyathan V, Ding M, Castranova V, Shi X](#). (2001) Opposite effect of NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase on p53-independent GADD45 induction by arsenite. *J Biol Chem*. 276(14):11414-11419.
- Chiang, P.K., Gordon, R.K., Tal, J., Zeng, G.C., Doctor, B.P., Pardhasaradhi, K. and Mc Cann, P.P (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB*, 10:471-479.
- Cimini D, Howell B, Maddox P, Khodjakov A, Degrossi F, Salmon ED. (2001). Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol*, 153(3):517-27.
- Cimino M., Vantini G., Algeri S., Curatola G., Pezzoli C., Stramentinoli G. (1984) Age-related modification of dopaminergic and beta-Adrenergic receptor system: restoration to normal activity by modifying membrane fluidity with S-adenosylmethionine. *Life Sci*, 34(21):2029-2039.
- [Degrossi F, Tanzarella C](#) (1998) Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. [Mutat Res](#). 203(5):339-345

- Duesberg P, Rasnick D. (2000) Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton*, 47(2):81-107.
- [Eastmond DA, Pinkel D.](#) (1990) Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutat Res.* 234(5):303-318.
- Feinberg, A.P. (2000). DNA methylation, genomic imprinting. En *DNA methylation and cancer*. P.A. Jones y P.K. Vogt (Edits). Springer.
- [Fenech M.](#) (1998) Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat Res.*404(1-2):155-165.
- Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 455(1-2): 81-95.
- Fenech, M. (2001) The role of Folic acid and Vitamin B<sub>12</sub> in genomic stability of human cells. *Mutat Res*, 475: 57-67.
- Fetrow C.W., Avila J.R.(2001) Efficacy of the dietary supplement S-adenosyl-L-methionine. *Ann Pharmacother*, 35(11):1414-1425.
- Finkelstein J.D., Martin J.J. (2000) Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol*, 32(4):385-389.
- Foss HM., Roberts CJ., Claeys KM., Selker EU. (1993). Abnormal chromosome behavior in *Neurospora* mutants defective in DNA methylation. *Science* 262 (5140) 1737-1741.
- [Fukasawa K.](#) Introduction. *Centrosome*. *Oncogene*. 2002 Sep 9;21(40):6140-5.
- Gebhart E., Arutyunyan R.M. (1991) *Anticlastogens in Mammalian and Human Cells*. Springer-Verlag, Germany, 125 pp.

- Gonzalgo M.L., Jones P.A. (1997) Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res*, 386(2):107-118.
- [Guttenbach M, Schakowski R, Schmid M.](#) (1994) Aneuploidy and ageing: sex chromosome exclusion into micronuclei. *Hum Genet.* 94(3):295-298.
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M. (1996). *Environ Mol Mutagen*, 28(3):167-75.
- Hassold T, Hunt P. (2001). *Nat Rev Genet*, 2 (4): 280-91.
- Harrer, M., Luhrs, H., Bustin, M., Scheer, U. and Hock, R. (2004) Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin. *J Cell Sci*, **117**, 3459-71.
- Healy S.M., Casarez E.A., Ayala-Fierro F., Aposhian H. (1998) Enzymatic methylation of arsenic compounds. V. Arsenite methyltransferase activity in tissues of mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 148(1):65-70.
- Hirata F., Axelrod J. (1980) Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science*, 209(4461):1082-1090.
- [Hobbs CA, Cleves MA, Lauer RM, Burns TL, James SJ.](#) (2002) Preferential transmission of the MTHFR 677 T allele to infants with Down syndrome: implications for a survival advantage. *Am J Med Genet.*113(1):9-14.
- James J, Pogribna M, Melnyk S, Wilson L, Gaylor W. (1999). *Am. J. Clin. Nutr.*, 70: 95-501.
- Jeanpierre M, Turleau C, Aurias A, Prieur M, Ledest F, Fischer A, Viegas-Pequignot E.(1993). An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet*, 2(6):731-5.

- Jeltsch A. (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem*, 3(4):274-293
- Johanning G.L., Heimbürger D.C., Piyathilake C.J. (2002) DNA methylation and diet in cancer. *J Nutr* 132(12):3814S-3818S.
- [Jordan MA, Wilson L.](#) (1999). The use and action of drugs in analyzing mitosis. *Methods Cell Biol.* 61:267-95. Review
- Jones P.A., Laird P.W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, 21(2):163-167.
- [Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M Jr, Lorge E, Norppa H, Surralles J, von der Hude W, Wakata A.](#) Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):167-172.
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surralles J, Vanhauwaert A, Wakata A. (2003) Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* 540(2):153-163.
- Ladino C.A., O'Connor C.M. (1992) Methylation of atypical protein aspartyl residues during the stress response of HeLa cells. *J Cell Physiol*, 153(2):297-304.
- [Lee CF, Liu CY, Hsieh RH, Wei YH.](#) Oxidative stress-induced depolymerization of microtubules and alteration of mitochondrial mass in human cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 May;1042:246-54.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. (1997). DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(6):2545-50.

- Leopardi P, Marcon F, Dobrowolny G, Zijno A, Crebelli R. (2002). Influence of donor age on vinblastine-induced chromosome malsegregation in cultured peripheral lymphocytes. *Mutagenesis*, 17(1): 83-8.
  
- Lewis, R. (1997) *Human Genetics Concepts & Applications*, 2nd ed., Dubuque IA, Wm. C. Brown, p. 55.
  
- Lim, J.H., Catez, F., Birger, Y., West, K.L., Prymakowska-Bosak, M., Postnikov, Y.V. and Bustin, M. (2004) Chromosomal protein HMGN1 modulates histone H3 phosphorylation. *Mol Cell*, **15**, 573-84.
  
- Lopes CS, Sunkel CE. (2003). The spindle checkpoint: from normal cell division to tumorigenesis. *Arch Med Res*, 34 (3): 155-65.
  
- Lu, S.C. (2000) S-adenosyl-L-methionine. *Int J Biochem Cell Biol*, 32: 391-395.
  
- Lu S.C. (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J*, 13(10):1169-1183.
  
- Lucock M. (2000). Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab*.71(1-2):121-38.
  
- Luhrs, H., Hock, R., Schaubert, J., Weihrauch, M., Harrer, M., Melcher, R., Scheppach, W., Bustin, M. and Menzel, T. (2002) Modulation of HMG-N2 binding to chromatin by butyrate-induced acetylation in human colon adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*, **97**, 567-73.
  
- Marshall RR, Murphy M, Kirkland DJ, Bentley KS.(1996) Fluorescence in situ hybridisation with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutat Res*. 372(2):233-245.

- Mass M.J., Wang L. (1997) Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res*, 386(3):263-277.
- Moephuli S.R., Klein N.W., Baldwin, M.T. y Krider, H.M. (1997) Effects of methionine on the cytoplasmic distribution of actin and tubulin during neural tube closure in rat embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(2):543-548.
- Nasmyth K. (2002). Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science*. 297(5581):559-65.
- Matzke MA, Mette MF, Kanno T and Matzke AJ: Does the intrinsic instability of aneuploid genomes have a causal role in cancer? *Trends Genet* 19: 253-256, 2003.
- Mudd S.H., Poole J.R. (1975) Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism*, 24(6):721-735.
- Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi B, Chen B.P, Chen D.J, Chatterjee A, Burma S. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 575-590.
- McNeely SC, Xu X, Taylor BF, Zacharias W, McCabe MJ Jr, States JC. Exit from arsenite-induced mitotic arrest is p53 dependent. *Environ Health Perspect*. 2006 Sep;114(9):1401-1406.
- . Nasmyth K: Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297: 559-565, 2002.
- Nordgren A, Heyman M, Sahlen S, Schoumans J, Soderhall S, Nordenskjold M, Blennow E. (2002) Spectral karyotyping and interphase FISH reveal abnormalities not detected by conventional G-banding. Implications for treatment stratification of

childhood acute lymphoblastic leukaemia: detailed analysis of 70 cases. *Eur J Haematol.* 68(1):31-41.

- [Ochi T, Nakajima F, Nasui M.](#) Distribution of gamma-tubulin in multipolar spindles and multinucleated cells induced by dimethylarsinic acid, a methylated derivative of inorganic arsenics, in Chinese hamster V79 cells. *Toxicology.* 1999 Aug 31;136(2-3):79-88.

- Ochi T (2002). Methylmercury, but not inorganic mercury, causes abnormality of centrosome integrity (multiple foci of gamma-tubulin), multipolar spindles and multinucleated cells without microtubule disruption in cultured Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res.* 499(1): 73-84.

- Osman E., Owen J.S., Burroughs A.K. (1993) Review article: S-adenosyl-L-methionine--a new therapeutic agent in liver disease? *Aliment Pharmacol Ther.* 7(1):21-28.

- [Pacchierotti F, Ranaldi R.](#) (2006) Mechanisms and risk of chemically induced aneuploidy in mammalian germ cells. *Curr Pharm Des.* (12):1489-1504.

- [Parry EM, Henderson L, Mackay JM.](#) (1995) Procedures for the detection of chemically induced aneuploidy: recommendations of a UK Environmental Mutagen Society working group. *Mutagenesis.* 10(1):1-14.

- [Parry JM, Al-Obaidly A, Al-Walhaib M, Kayani M, Nabeel T, Strefford J, Parry EM.](#) (2002). Spontaneous and induced aneuploidy, considerations which may influence chromosome malsegregation. *Mutat Res.* 504(1-2):119-129.

- Pascale R.M., Simile M.M., De Miglio M.R., Nufri A., Daino L., Seddaiu M.A., Rao P.M., Rajalakshmi S., Sarma D.S., Feo F. (1995) Chemoprevention by S-adenosyl-L-

methionine of rat liver carcinogenesis initiated by 1,2-dimethylhydrazine and promoted by orotic acid. *Carcinogenesis*, 16(2):427-430.

- Pfeifer G.P., Tang M., Denissenko M.F. (2000) Mutation hotspots and DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 249:1-19.

- Phair, R.D. and Misteli, T. (2000) High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, **404**, 604-9.

- Poirier, L.A. (1994) Methyl group deficiency in hepatocarcinogenesis. *Drug Metab Rev*, 6: 185-199.

- Poirier LA, Herrera LA, Wise C. (2003). On the chemical causation of methyl deficiency and its attendant pathologies. *Regulatory Research Perspectives Journal*, 3:1-37. [www.fda.gov/nctr/science/journals/text/vol3iss1/rrp0103.htm](http://www.fda.gov/nctr/science/journals/text/vol3iss1/rrp0103.htm)

- Ramírez T., Benitez-Bribiesca L., Ostrosky-Wegman P., Herrera L.A.(2001) In vitro effects of albendazole and its metabolites on the cell proliferation kinetics and micronuclei frequency of stimulated human lymphocytes. *Arch Med Res*, 32(2):119-22.

- Ramirez T., Garcia-Montalvo V, Wise C, Cea-Olivares R, Poirier L.A, Herrera L.A. S-adenosyl-L-methionine is able to reverse micronucleus formation induced by sodium arsenite and other cytoskeleton disrupting agents in cultured human cells. *Mutat. Res.* 528 (2003) 61-74

- Refsum H., Ueland P.M., Nygard O., Vollset S.E. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med*, 49:31-62.

- Rizwana R., Hahn P.J.(1999) CpG methylation reduces genomic instability. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 24):4513-4519.

- Russo A, Priante G, Tommasi AM. (1996). PRINS localization of centromeres and telomeres in micronuclei indicates that in mouse splenocytes chromatid non-disjunction is a major mechanism of aneuploidy. *Mutat Res.* 372(2):173-80.
- [Straus DS.](#) (1981) [Links](#) Somatic mutation, cellular differentiation, and cancer causation. *J Natl Cancer Inst.* 67(2):233-241.
- Stallcup M.R. (2001) Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene*, 20(24):3014-3020.
- Sewalt R.G., Lachner M., Vargas M., Hamer K.M., den Blaauwen J.L., Hendrix T., Melcher M., Schweizer D., Jenuwein T., Otte A.P. (2003) Selective interactions between vertebrate polycomb homologs and the SUV39H1 histone lysine methyltransferase suggest that histone H3-K9 methylation contributes to chromosomal targeting of Polycomb group proteins. *Mol Cell Biol*, 22(15):5539-5553.
- Schinstine M., Iacovitti L. (1997) 5-Azacytidine and BDNF enhance the maturation of neurons derived from EGF-generated neural stem cells. *Exp Neurol*, 144(2):315-325.
- Tabor C.W., Tabor H. (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem*, 53:749-790.
- [Tedeschi G, Cappelletti G, Negri A, Pagliato L, Maggioni MG, Maci R, Ronchi S.](#) Characterization of nitroproteome in neuron-like PC12 cells differentiated with nerve growth factor: identification of two nitration sites in alpha-tubulin. *Proteomics*. 2005 Jun;5(9):2422-2432.
- Thomas T, Thomas TJ.(2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*, 2001 58(2):244-258.
- Varela-Moreiras G., Alonso-Aperte E., Rubio M., Gasso M., Deulofeu R., Alvarez L., Caballeria J., Rodes J., Mato J.M. (1995) Carbon tetrachloride-induced hepatic injury is

associated with global DNA hypomethylation and homocysteinemia: effect of S-adenosylmethionine treatment. *Hepatology*, (4 Pt 1):1310-1305.

- Wang X., Thomas P., Xue J., Fenech M. (2004) Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro—evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutation Research* 551: 167–180

- Yamanaka K., Hayashi H., Tachikawa M., Kato K., Hasegawa A., Oku N., Okada S. (1997) Metabolic methylation is a possible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics. *Mutat Res*, 394(1-3):95-101.

- [Yih LH](#), [Tseng YY](#), [Wu YC](#), [Lee TC](#). Induction of centrosome amplification during arsenite-induced mitotic arrest in CGL-2 cells. [Cancer Res](#). 2006 Feb 15;66(4):2098-106.

- Zhao, C.Q., Young, M.R., Diwan, B.A., Coogan, T.P. and Waalkes, M.P. (1997) Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 10907-10912.

- Zollino M., Neri G. (1987) Protective effect of S-adenosylmethionine against the induction of chromosome fragile sites. *Acta Haematol*, 1:100-103.



ELSEVIER Mutation Research 626 (2007) 191–195

Short communication

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Mutation Research 626 (2007) 191–195



Genetic Toxicology and  
Environmental Mutagenesis

[www.elsevier.com/locate/gen tox](http://www.elsevier.com/locate/gen tox)

Community address: [www.elsevier.com/locate/mutres](http://www.elsevier.com/locate/mutres)

## Non-disjunction events induced by albendazole in human cells

Tzutzuy Ramírez<sup>a,b</sup>, David A. Eastmond<sup>c</sup>, Luis A. Herrera<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas-Instituto Nacional de Cancerología, México, D.F., México*

<sup>b</sup> *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, México*  
<sup>c</sup> *University of California in Riverside, Riverside, CA, USA*

Received 4 May 2006; received in revised form 14 September 2006; accepted 15 September 2006

Available online 19 October 2006

### Abstract

Albendazole (ABZ), a benzimidazole carbamate used for the treatment of several human helminthiasis has high affinity for tubulin, which results in an inhibition of microtubule polymerization, blocking several vital processes in the parasites, such as motility and nutrient uptake. The ability of ABZ to act as mitotic spindle poison leads to a potential risk for aneuploidy induction in exposed human beings. ABZ, as well as albendazole sulphoxide (ABZSO), its main metabolite, induce micronuclei in human cells in a dose-dependent manner. Despite recognition that ABZ and ABZSO increase micronucleus frequency, their potential as inducers of non-disjunction in human cells, an event considered more frequent than chromosome loss, and one of the main mechanisms involved in aneuploidy induction, has not been evaluated. In the present work, we investigated the ability of ABZ and ABZSO to induce non-disjunction in cultured human lymphocytes. Non-disjunction was scored by chromosome-specific FISH using a classical or alpha satellite probe for chromosomes 1 and 7, respectively. Significant increase in non-disjunction events that involved either chromosome were observed in cells treated with ABZ or ABZSO. Both ABZ and ABZSO induced non-disjunction at lower concentrations than those at which MN were observed. © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Aneuploidy; Benzimidazoles; Micronuclei

### 1. Introduction

Albendazole (ABZ) is a benzimidazole carbamate used for the treatment of several human helminthiasis due to its broad antiparasitic activity, efficacy, and low toxicity [1]. ABZ, as well as all benzimidazoles, has high affinity for tubulin, which results in an inhibition of microtubule polymerization [2]. Through inhibition of microtubule polymerization, ABZ blocks several vital