



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Estudio citogenético del efecto radioprotector
de la Histamina y el compuesto JNJ7777120

N° 582

Eric Alejandro Rhon Calderón

Tutor: Dr. Luis Francisco Rossi

Departamento de Investigaciones
2013

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

Efecto radioprotector de la Histamina y el compuesto JNJ7777120

Entre los tratamientos antitumorales más importantes se encuentra la radioterapia, que por no ser selectivo surge la necesidad de buscar agentes, llamados radioprotectores, que disminuyan la toxicidad, la mutagenicidad y otros efectos biológicos adversos que puedan causar las radiaciones ionizantes en los organismos vivos. Entre los radioprotectores probados, la histamina (amina biogénica, sintetizada en 1907) protege de manera significativa el intestino delgado contra los daños producidos por la radiación, disminuyendo el daño histológico y mejorando el tropismo de los enterocitos. Por diversas razones adversas de la histamina Johnson&Johnson desarrolló el compuesto JNJ7777120, droga caracterizada por presentar afinidad por los mismos receptores de la histamina.

A fin de probar la acción radioprotectora de la histamina y el compuesto JNJ7777120 se realizó el ensayo sobre modelos celulares de origen humano como puente entre los ensayos preclínicos en animales y humanos. Así como también se trabajó sobre modelos animales (ratas de la cepa Sprague Dawley). En dichos modelos, se analizó la actividad genotóxica de los dos compuestos, mediante dos técnicas: la evaluación de metafases, en búsqueda de aberraciones cromosómicas, y el recuento de micronúcleos. Nuestros resultados muestran la eficacia de la histamina en la radioprotección de tejidos radiosensibles, asimismo comprobamos que el compuesto JNJ7777120 es capaz de radioproteger el tejido en mayor medida que la histamina, al disminuir la frecuencia de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas.

Agradecimientos.-

- A la Universidad de Belgrano que me brindó toda la educación necesaria para elaborar el presente trabajo.
- A la Dra. María Susana Merani, quien dirigió este trabajo, por su esfuerzo, enseñanzas diarias, paciencia y sobre todo por el incentivo diario para trabajar arduamente todos los días.
- Al Dr. Luis Rossi, que me acompañó día a día en el laboratorio y me enseñó todo lo que necesité para llevar adelante el trabajo.
- A la Dra. Vanina Medina, de la facultad de bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por permitirme llevar a cabo mi investigación con material proveniente de su grupo de trabajo.
- Al Lic. Ezequiel Romero quien supo brindarme apoyo durante el desarrollo del trabajo.
- A la Lic. Carolina Meyer con su incondicional ayuda y conocimientos pude llevar adelante el trabajo.
- A Viviana y Fernando, por la disposición, colaboración y ayuda que me brindaron.
- A los jurados que evaluarán mi trabajo, con sus aportes y sugerencias me ayudarán a enriquecerme.
- A mi papá y a mis hermanos, que a pesar de estar lejos estuvieron apoyándome en cada momento.
- A mis compañeras de la carrera: Agustina, Mariana y Sofía, con quienes compartí clases y experiencias.
- Finalmente, a mis amigos por soportar mi pasión por investigar y por las ciencias.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	7
1.1 RADIOTERAPIA .-	8
1.1.2 <i>Efectos de la radiación ionizante</i> .-	9
1.2 RADIOPROTECTORES .-	10
1.2.1 <i>Histamina</i> .-	10
1.2.3 <i>JNJ7777120</i> .-	13
1.3 MICRONÚCLEOS .-	13
OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GENERAL .-	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .-	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 LÍNEAS CELULARES .-	15
3.1.1 <i>MCF7</i> .-	16
3.1.2 <i>MDA</i> .-	17
3.1.3 <i>Cultivo de las líneas celulares</i> .-	18
3.2 ESTUDIOS CITOGENÉTICAS EN MAMÍFEROS .-	18
3.3 CITOGENÉTICA .-	21
3.3.1 <i>Aberraciones cromosómicas</i> .-	21
3.4 CULTIVO CELULAR DE LINFOCITOS .-	25
3.4.1 SACRIFICIO DEL CULTIVO	25
3.4.2 <i>Preparación de los extendidos</i>	25
3.4.3 <i>Observación y selección de las metafases</i>	25
3.6 BANDEO C .-	26
3.7 DAPI C .-	27
3.8 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS .-	27
RESULTADOS	27
4.1 LÍNEA CELULAR .-	27
4.2 SANGRE PERIFÉRICA PRIMER CULTIVO .-	30
4.3 SANGRE PERIFÉRICA: SEGUNDO CULTIVO .-	33
4.4 EFFECTO DE LA HISTAMINA Y JNJ7777120 EN RATAS .-	35
4.4.1 <i>Aberraciones cromosómicas</i> .-	35
4.4.2 <i>Recuento de Micronúcleos</i> .-	36
4.5 EFFECTO DE LA HISTAMINA Y JNJ7777120 EN RATAS SACRIFICADAS 2 SEMANAS POST IRRADIACIÓN .-	37
DISCUSIÓN	39
LÍNEAS CELULARES	39
MDA	39
MCF – 7	39
SANGRE PERIFÉRICA HUMANA .-	40
RATAS	40
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXOS	49
8.1 SOLUCIONES :	49
8.1.1 <i>Medios de Cultivo</i> :	49
8.1.2 <i>Colchicina</i> :	49
8.1.3 <i>Suero</i> :	49
8.1.4 <i>Antibióticos</i> :	49
8.1.5 <i>Solución Hipotónica</i> :	49

8.1.6 <i>Fijador</i>	49
8.1.7 <i>Bandas C</i>	50
8.1.8 <i>Bandas C - Dapi</i>	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Acción de la radiación sobre células normales y sus posibles consecuencias.....	7
Figura 2: Penetrancia de la radiación ionizante	9
Figura 3: Estructura molecular de la histamina.....	10
Figura 4: Forma de acción de la histamina dentro de una célula.....	11
Figura 5: Estructura molecular del compuesto JNJ7777120.....	13
Figura 6: Formación de micronúcleos debido a la pérdida de cromosoma entero y fragmentos cromosómicos de tipo acrocéntricos en anafase mitótica.....	14
Figura 7: Imagen de la línea celular MCF – 7. Izq.: Crecimiento celular de baja densidad. Der: Crecimiento celular con una elevada densidad. Imagen del catálogo de ATCC.....	16
Figura 8: Imagen de la línea celular MDA – MB – 231. Izq.: Crecimiento celular de baja densidad. Der: Crecimiento celular con una elevada densidad. Imagen del catalogo de ATCC.....	17
Figura 9: Diseño experimental del trabajo con ratas. Imagen gentileza de la Dra. Medina.....	20
Figura 10: Aberraciones cromosómicas estructurales: clasificación y representación. (Savage, 1976)	22
Figura 11: Imagen de cromosomas coloreadas con carbol – fucsina.....	26
Figura 12: Cariotipo de la línea celular MDA – MB – 231 (Adenocarcinoma mamario humano). Tinción: carbol – fucsina.....	28
Figura 13: Cariotipo de la línea celular MCF – 7 (Adenocarcinoma mamario humano). Tinción: carbol – fucsina.....	29
Figura 14: Cariotipo con bandas C de la línea MCF – 7 (Adenocarcinoma mamario humano). Tinción: giemsa.....	30
Figura 15: Cariotipo de individuo masculino sin tratamiento e irradiado.....	32
Figura 16: Cariotipo de individuo masculino tratado con histamina e irradiado.....	32
Figura 17: Cariotipo de humano XY tratado con histamina e irradiado. Tinción Dapi – C.....	33
Figura 18: Cariotipo de médula ósea de rata XY, tratado con histamina e irradiado. Tinción: carbol – fucsina.....	35
Figura 19: Imagen de micronúcleo en extendido de intestino delgado. Tinción: May – Grünwald Giemsa.....	36
Figura 20: Imagen de micronúcleo en eritrocitos, frotis de sangre. Tinción: May – Grünwald Giemsa.....	37
Figura 21: Célula de intestino con micronúcleo. Tinción: May – Grünwald Giemsa.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Criterios definidos por el HUMN-Project para la selección de micronúcleos.....	27
Tabla 2: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de línea celular MDA (Adenocarcinoma mamario humano).....	28
Tabla 3: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de línea celular MCF - 7.....	29
Tabla 4: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de linfocitos de sangre periférica del 11/07/11.....	31
Tabla 5: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de linfocitos de sangre periférica del 05/09/11.....	31
Tabla 6: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de linfocitos de sangre periférica humana XY del 12/01/12.....	33
Tabla 7: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de linfocitos de sangre periférica humana XX del 12/01/12.....	34
Tabla 8: Porcentaje de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratas, 21/08/2012.....	35
Tabla 9: Recuento de micronúcleos en frotis de sangre e intestino, 21/08/2012.....	36
Tabla 10: Porcentaje de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratas, 05/09/2012.....	37
Tabla 11: Recuento de micronúcleos en frotis de sangre e intestino, 05/09/2012.....	38

Introducción

La radiación ionizante consiste en partículas, incluidos los fotones, que causan la separación de electrones de átomos y moléculas, la misma proviene del espacio exterior y se encuentra en todas partes. Está en el aire en forma de emisiones del radón radiactivo y su progenie. Los isótopos radiactivos que se originan de forma natural entran y permanecen en todos los seres vivos, lo cual es inevitable. De hecho, todas las especies de este planeta han evolucionado en presencia de la radiación ionizante. Aunque los seres humanos expuestos a dosis pequeñas de radiación pueden, no presentar de inmediato ningún efecto biológico aparente, no hay duda de que la radiación ionizante, cuando se administra en cantidades suficientes, puede causar daños (Stannard y Baalman, 1988)

Si bien la radiación ionizante puede ser perjudicial, también tiene muchas aplicaciones beneficiosas. El uranio radiactivo genera electricidad en centrales nucleares instaladas en muchos países. En medicina, los rayos X permiten obtener radiografías para el diagnóstico de lesiones y enfermedades internas. Los médicos, especializados en medicina nuclear, utilizan material radiactivo como trazadores para formar imágenes detalladas de estructuras internas y estudiar el metabolismo. En la actualidad se dispone de radiofármacos terapéuticos para tratar trastornos como el hipertiroidismo y el cáncer. Son utilizados los rayos gamma, haces de piones, haces de electrones, neutrones y otros tipos de radiación para tratar el cáncer (International Atomic Energy Agency, 2004). Los ingenieros emplean material radiactivo en las operaciones de registro de pozos petrolíferos y para medir la densidad de la humedad en los suelos. Los radiólogos industriales se valen de rayos X en el control de calidad para observar las estructuras internas de aparatos fabricados. Las señales en las puertas de salidas de edificios y aviones contienen tritio radiactivo para que brillen en la oscuridad en caso de fallo de la energía eléctrica. Muchos detectores de humo en viviendas y edificios comerciales contienen americio radiactivo (Eisenbud, 1965).

Estos numerosos usos de la radiación ionizante y de los materiales radiactivos mejoran la calidad de vida y ayudan a la sociedad de muchas maneras. Pero siempre se deben sopesar los beneficios de cada uso con sus riesgos. Estos pueden afectar a los trabajadores que intervienen directamente en la aplicación del material radiactivo, a la población en general, a las generaciones futuras y al medio ambiente, o a cualquier combinación de los grupos enumerados. Más allá de consideraciones políticas y económicas, los beneficios siempre deben superar a los riesgos cuando se trate de utilizar la radiación ionizante (International Atomic Energy Agency, 2004).

Se sabe que la radiación, por la incidencia de energía directamente o indirectamente a través de la radiólisis de moléculas de agua, que generan especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales reaccionan con las moléculas de ADN, causa la ruptura de la doble hélice de ADN (Natarajan et al., 1982) pudiendo originar aberraciones cromosómicas, que son en muchos casos consideradas como lesiones letales (Grđina, 2002).

El uso de la radiación siempre generó inconvenientes (figura 1) debido a su inespecificidad de acción y a sus efectos colaterales indeseables que aparecen inespecíficamente; sin embargo en medicina, la radioterapia hace uso de la radiación ionizante para tratar variadas afecciones entre ellas el cáncer.

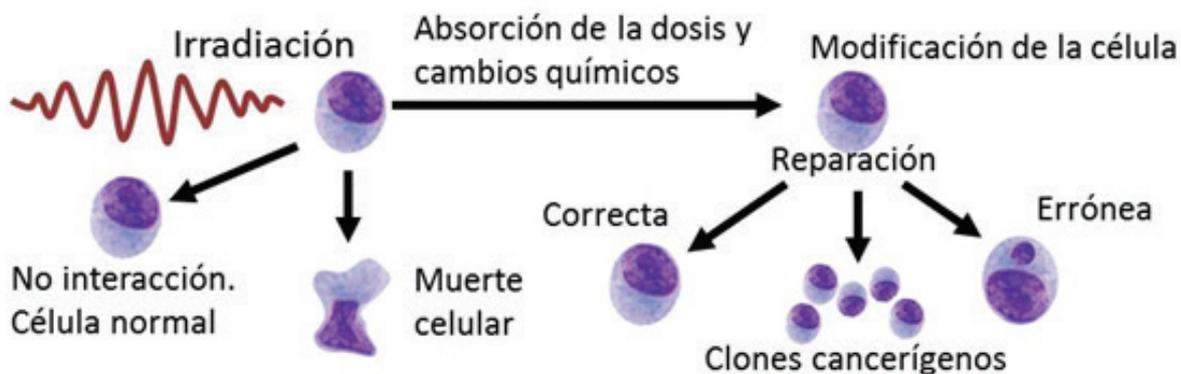


Figura 1: Acción de la radiación sobre células normales y sus posibles consecuencias.

En los últimos años los tratamientos contra el cáncer han realizado grandes progresos, sin embargo, tratamientos con metodología clásica como quimioterapia y radioterapia son aun hoy día muy usados para el tratamiento antitumoral.

La radioterapia se convirtió y es una terapia comúnmente usada para tratar determinados tipos de cáncer en humanos. Alrededor del 80% de los pacientes requieren en algún punto de su enfermedad tratamientos con radiación ya sea con fines curativos, como también paliativos de la enfermedad metastásica (Nair et al., 2001). Su uso se da bajo estricto control médico, tomando las consideraciones debidas, así como también advirtiéndolo a los pacientes sobre los efectos colaterales del mismo.

Una de las consideraciones que se tiene al usar a la radioterapia como alternativa contra el cáncer. Las células tumorales tienden a proliferar rápidamente, por lo general forman sus propios sistemas vasculares, debido a un aumento considerable de tamaño necesitan una elevada exposición de radiación resultando difícil tratarlos con una pequeña cantidad, por lo tanto es necesario prevenir el daño que van a sufrir las células normales circundantes a las células tumorales. De esta manera, el posible control del tumor va a depender de la tolerancia a la radiación de los tejidos normales lo que hace imprescindible identificar agentes que protejan selectivamente al tejido sano contra la radiación.

Los radioprotectores, históricamente surgen como respuesta a la necesidad de conservar y proteger a las células normales para que no se vean afectadas por la radiación; sin embargo dichos compuestos no deben causar efectos adversos de otra manera irían en contra de lo buscado (Weiss y Landauer, 2009).

Por lo tanto a pesar de sus beneficios y amplia variedad, son solo importantes aquellos radioprotectores que de alguna manera sean específicos, y que logren así proteger a las células normales, pero no haciendo extensiva dicha protección a las células tumorales.

A pesar de muchos años invertidos en la investigación de compuestos radioprotectores, solo unos pocos son utilizados en clínica en la actualidad, debido a su elevada toxicidad; es por esto que, el desarrollo de agentes efectivos y no tóxicos representan un reto para los oncólogos y radiobiólogos (Hall y Giaccia, 2006).

Tras un largo período de investigación estudiando la aplicación de distintos compuestos para la radioprotección de las células normales, estudios recientes demuestran que el tratamiento con histamina es capaz de modular selectivamente los efectos biológicos producidos por la Radiación Ionizante (RI), aumentando la tolerancia de tejidos sanos radiosensibles como lo son el intestino delgado, médula ósea y glándulas salivales mientras que aumenta la radiosensibilidad de células tumorales mamarias (Medina et al., 2006, 2007, 2010, 2011). Como así también, la histamina como dihidrocloruro (desarrollada como una formulación para administración subcutánea conocida como Ceplene), está siendo administrada en forma segura en numerosos ensayos clínicos como un adyuvante de la inmunoterapia demostrando ser bien tolerada (Yang y Perry, 2011). Estas características indican a la histamina como a un candidato adecuado para su uso como radioprotector químico. Dados los efectos pleiotrópicos de la histamina, actualmente el grupo de la Dra. Medina con quien se ha desarrollado en colaboración el trabajo experimental está estudiando el efecto radioprotector del compuesto JNJ7777120 que es un ligando de los receptores a histamina H4 (RH4) sintetizado por Johnsson&Johnsson.

Con el objetivo de profundizar el estudio del efecto radioprotector de la histamina y el compuesto JNJ7777120, se propuso estudiar de los mismos los efectos genotóxicos en combinación con la radiación ionizante

El trabajo desarrollado en este trabajo de tesis, se realizó en dos grupos de experimentación el grupo de trabajo del Laboratorio de Radioisótopos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, dirigido por la Dra. Vanina Medina, brindó la sangre, animales y realizó los tratamientos e irradió el material; mientras que en el Laboratorio de Biología cromosómica se procesaron las muestras y se llevó a cabo el estudio citogenético del efecto radioprotector de los dos compuestos.

1.1 Radioterapia.-

El uso médico de radiaciones ionizantes se conoce como radioterapia, que tiene como finalidad dañar células de un tejido. Este tipo de terapia es utilizada en enfermedades oncológicas, ya sea como tratamiento contra la metástasis así como también como tratamiento paliativo (Nair et al., 2001).

La irradiación terapéutica puede administrarse en forma de radioterapia externa (o de haz externo) o interna (como la braquiterapia o también la terapia con fuentes abiertas que incluyen a los radiofármacos metabolizables), siendo la radioterapia de haz externo la más utilizada para el tratamiento antitumoral (Hall y Giaccia, 2006).

Aunque efectiva, la terapia con radiación ionizante no es específica y puede dar lugar a numerosos efectos adversos. Cuanto mayor es la dosis administrada en un tumor, mayor será la probabilidad de realizar el control local del mismo, sin el cual no es posible que el proceso neoplásico se cure. Pero, este incremento en la dosis está condicionado por la lesión que la radioterapia produce en los tejidos sanos

que rodean al tumor. De esta manera el posible control del tumor va a depender de la tolerancia a la radiación de los tejidos normales (Emami et al., 1991).

Una de las claves para la eficacia de la radioterapia es lograr un efecto selectivo produciendo el máximo daño a las células tumorales sin afectar los tejidos normales del paciente (Barcellos-Hoff et al., 2005) (Hall y Giaccia, 2006).

A partir de diferentes abordajes es posible incrementar en forma segura la dosis de radiación en el tumor limitando la dosis que reciben los tejidos normales circundantes.

1.1.2 Efectos de la radiación ionizante.-

Los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes son el resultado de la deposición de energía en el material irradiado. Se denomina dosis a la cantidad de energía depositada por unidad de masa irradiada, la unidad de dosis absorbida aceptada por el Sistema Internacional de Unidades y Medidas es el Gray (Gy) y se define como la absorción de un joule de energía por kilogramo de masa irradiada.

Las radiaciones interactúan con el medio produciendo ionizaciones (cuando se arranca un electrón orbital) y excitaciones (en donde un electrón orbital pasa a un nivel superior de energía) al azar de los átomos y moléculas que componen el medio, dando origen a cambios fisicoquímicos que finalmente culminan en un efecto biológico (Edwards et al., 1997)(figura 2).

Radiación Ionizante

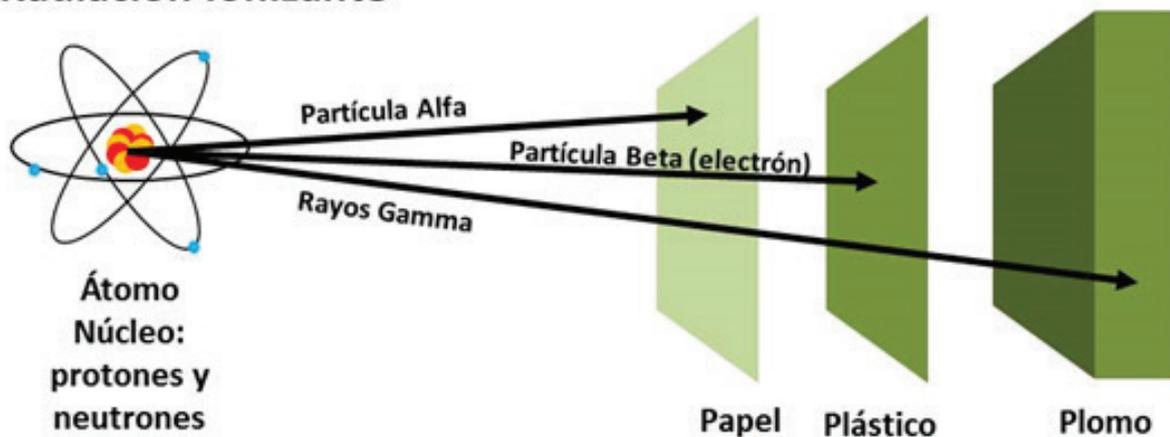


Figura 2: Penetrancia de la radiación ionizante

Cuando las radiaciones se absorben en el material biológico es posible que interactúen directamente produciendo la ionización y excitación de los átomos que componen las moléculas biológicas, produciendo por ejemplo ruptura de cadenas de ADN, y de este modo ejerciendo una acción directa.

Alternativamente, la radiación ionizante puede interactuar con otros átomos o moléculas en las células, particularmente con el agua, ya que los sistemas biológicos son sistemas esencialmente acuosos y se producen radicales libres como el radical hidroxilo, que son los responsables de producir el daño. Esto es conocido como acción indirecta de las radiaciones (Grdina et al., 2002).

Los efectos biológicos de la radiación resultan principalmente del daño del ADN, que es su blanco crítico. Las lesiones son rupturas de cadena simple y/o de doble cadena, destrucción de azúcares, formación de dímeros y alteración de bases.

Muchas alteraciones no producen la muerte celular directa, por lo que forman parte del deterioro celular subletal, mientras que otras lesiones, directas o por acumulación del daño subletal, llevan a la muerte celular. En cualquier caso la consecuencia final siempre será la muerte celular radioinducida, que es inespecífica y no selectiva (Hall y Giaccia, 2006).

Según el grado de severidad los daños al ADN inducen una respuesta a través de la activación o represión de distintas proteínas blanco. Estas últimas, activan puntos de control del ciclo celular arrestado temporariamente las células en fases del ciclo celular específicas para la reparación del daño al ADN y la recuperación de las células dañadas (Hall y Giaccia, 2006).

Por el contrario, las lesiones pueden ser irreparables originando desde mutaciones puntuales hasta aberraciones cromosómicas múltiples que conducen a la pérdida de la capacidad reproductiva por muerte mitótica (las células mueren cuando intentan dividirse), apoptosis o muerte celular programada, necrosis, senescencia o autofagia (Buttke and Sandstrom, 1994). La determinación de aberraciones cromosómicas es el indicador más tradicionalmente utilizado para evaluar genotoxicidad inducida por la radiación ionizante. El micronúcleo es un indicador indirecto de daño cromosómico que se origina durante la división celular, tanto por fragmentos acéntricos, cromátides enteras o cromosomas que no han sido incorporados en los núcleos hijos, al momento de la división y que requieren de una división celular para expresarse. Por lo tanto, la detección de la frecuencia de células portadoras de micronúcleos permite evaluar daño genotóxico (Mudry, M.D. et al., 2006)

1.2 Radioprotectores.-

Los radioprotectores son agentes químicos o farmacológicos que se caracterizan por disminuir la toxicidad, la mutagenicidad y otros efectos biológicos adversos que puedan causar las radiaciones ionizantes en los organismos vivos (Littlefield et al., 1993).

Históricamente, la idea de los radioprotectores surge en los Estados Unidos en 1959 como un programa que tenía como objetivo desarrollar agentes químicos capaces de proteger a los soldados ante un ataque nuclear. Gracias a esta idea en los años posteriores se lograron caracterizar alrededor de 4000 compuestos con posible capacidad radioprotectora (Bump y Malaker, 1998).

Los estudios desarrollados posteriormente permitieron concluir, entre otras cosas, que los compuestos que se consideren como radioprotectores deben ser administrados de manera previa a la irradiación de tal modo que se encuentren en las células antes del proceso mencionado. Además, la magnitud de la protección debe resultar proporcional a la cantidad del compuesto suministrado.

Los radioprotectores son capaces de actuar a través de uno o varios mecanismos. Entre ellos encontramos: la supresión de la formación de especies reactivas, detoxificación de las especies inducidas por la radiación, estabilización del blanco, y por reforzamiento de los sistemas de recuperación y reparación celular (Nair et al., 2001).

El uso clínico de los radioprotectores en radioterapia continúa plagado de incertidumbres fundamentalmente en relación con la posible protección del tumor y, por lo tanto, la disminución de la eficacia terapéutica.

La amifostina (con el nombre comercial de Ethylol) es hoy el único radioprotector aprobado por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de Estados Unidos para el tratamiento de la xerostomía (sensación subjetiva de sequedad de la boca). Este fosforotionato es tóxico y su período de acción es corto lo que limita su aplicación clínica. Además de esto, recientemente se ha reportado que la amifostina aumenta la actividad de la superóxidodismutasa – 2 en los tumores lo que podría provocar efectos deletéreos en la respuesta del tumor a la terapia fraccionada.

1.2.1 Histamina.-

La histamina es una amina biogénica (figura 3), que fue sintetizada en 1907 y caracterizada en 1910, sin embargo llevó 17 años poder demostrar su presencia en tejidos normales; se la considera como una de las moléculas más importantes que funcionan como mediadores en la comunicación entre células (MacGlashan, 2003).

Cuando se libera histamina, esta actúa de manera local o general a nivel de la musculatura lisa y de las glándulas. Contrae el músculo liso ubicado en bronquios e intestinos, pero relaja otras fibras lisas como las que están en los vasos sanguíneos.

La histamina también estimula secreción de ácido a nivel gástrico. En menor intensidad estimula las terminaciones nerviosas sensoriales y la formación del edema.

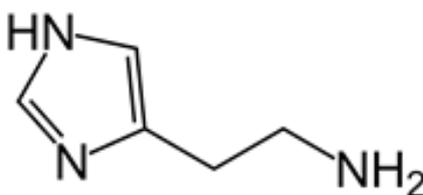


Figura 3: Estructura molecular de la histamina.

La relación entre la histamina y las reacciones anafilácticas fue realizada rápidamente en 1929, y se la identificó como una molécula que interviene en las respuestas anafilácticas en 1932, la relación con las células de la sangre fue realizada en años posteriores (Shahid et al., 2009). Y se encuentra documentada la evidencia de que la histamina cumple un rol en efectos inmunomoduladores y pro inflamatorios mediante la expresión de sus diferentes receptores (H1R, H2R, H3R y H4R), los cuales son una familia de proteínas con siete pasos transmembranales acoplados a una proteína G (Parsons y Ganellin, 2006)(figura 4).

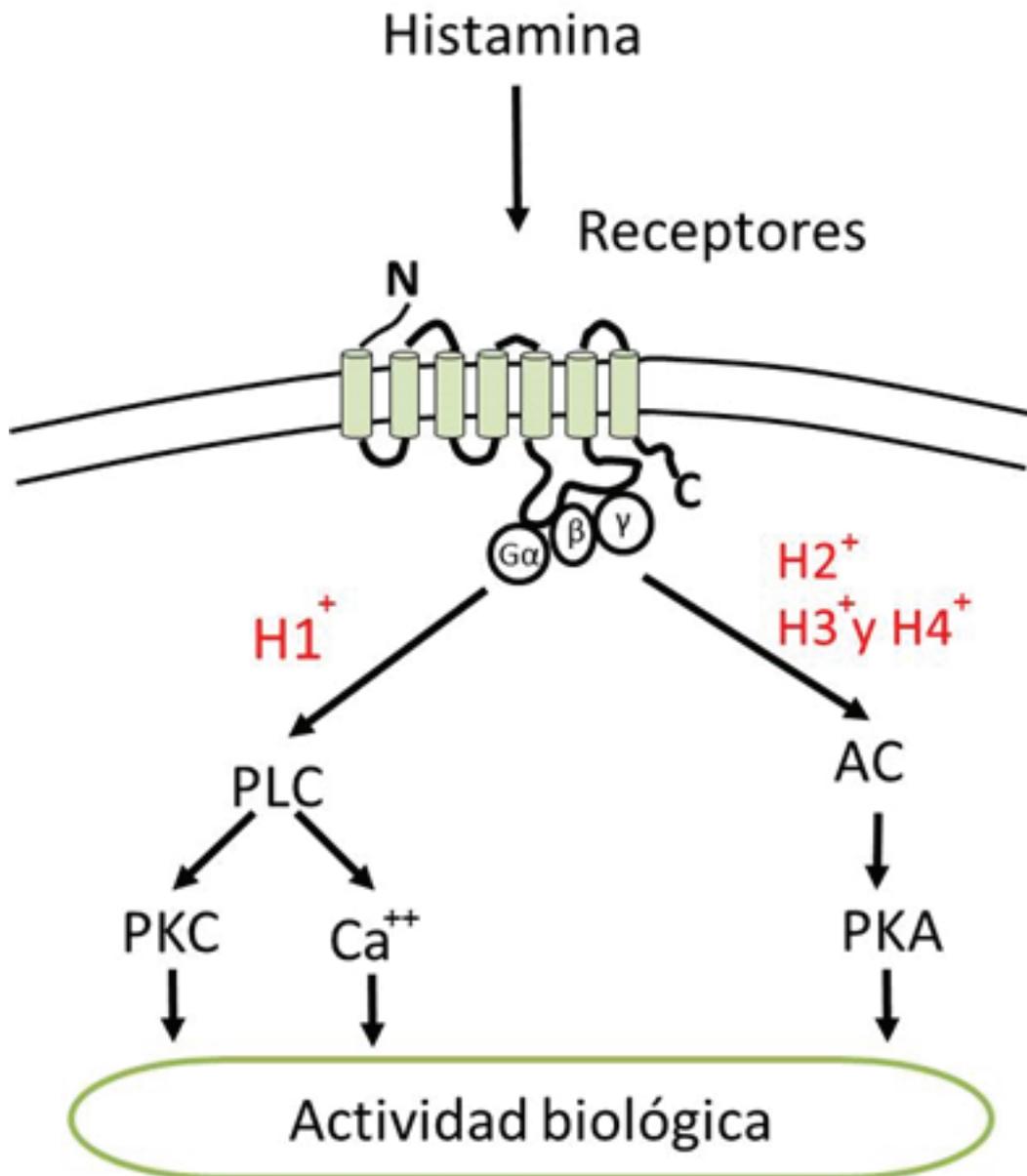


Figura 4: Forma de acción de la histamina dentro de una célula.

Se ha demostrado que el tratamiento con histamina (inyección subcutánea, 0,1 mg.Kg-1) protegió de manera significativa el intestino delgado de ratones contra los daños producidos por la radiación, disminuyendo el daño histológico y mejorando el trofismo de los enterocitos (Medina et al., 2007).

El tratamiento con histamina revierte completamente la disminución del número de criptas intestinales producida por la radiación ionizante, lo cual es importante para la recuperación del intestino delgado, debido a que se conservan las células madre que van a regenerar el tejido en etapas posteriores al cese de la radiación (Potten et al., 2002).

El efecto radioprotector de la histamina se corresponde con un incremento de la proliferación, que fue evidenciado por un aumento de la inmunoreactividad para los marcadores de proliferación bromodeoxiuridina (BrdU) y el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA). También, se observó una reducción

en el número de células apoptóticas por cripta y modificación en los niveles de enzimas antioxidantes que mejoraban la capacidad antioxidante del intestino (Medina et al., 2007).

Los eritroblastos de la médula ósea, se caracterizan por su elevada radiosensibilidad, después de la irradiación se observa un grado elevado de aplasia lo que resulta letal en el caso de una hemorragia o infección. La supervivencia de las células madre en médula ósea es un factor de suma importancia, ya que van a ser las responsables de repoblar la médula después de la radiación. La histamina demostró reducir la aplasia, al conservar células madres de médula ósea, una vez más se observa que la histamina produce un aumento de proliferación de las células de la médula ósea de rata y ratón (Medina et al., 2010).

También es sabido que no sucede lo mismo, porque a pesar de las mejoras que ha tenido la terapia con radiación, no se ha logrado disminuir el daño en las glándulas salivales, durante la radioterapia de cáncer de cabeza y cuello, lo cual causa efectos colaterales que resultan en la disminución de las funciones de las glándulas (Burlage et al., 2008).

La radiación disminuyó la salivación, pero el uso de histamina ayudó a prevenir dicha alteración funcional mediante la reducción de las células apoptóticas por campo en la glándula. Estudios recientes demostraron que la histamina previene marcadamente el daño de la radiación en la glándula submandibular, disminuyendo las alteraciones morfológicas e histológicas del órgano producidas por la radiación (Medina et al., 2011).

1.2.1.1 *Receptores de Histamina.-*

La histamina ejerce su acción sobre receptores específicos localizados en las células. Hay cuatro subtipos: H1, H2, H3 y H4.. Los receptores H1 y H2 están ampliamente distribuidos en la periferia y en el sistema nervioso central (SNC), los H3 están circunscritos en gran medida al SNC y juegan un importante papel en la localización presináptica, los receptores H4 se han descrito en células de origen hematopoyético (Akdis y Simons, 2006) y recientemente se ha detectado su expresión funcional en otros tipos celulares, que incluyen células tumorales (Medina y Rivera, 2010)

Debido a los diferentes subtipos de receptores para la histamina y los distintos patrones de sensibilidad en la respuesta efecto – receptor, se generan reacciones celulares “paralelas” y antagónicas que complican la interpretación de la respuesta global de un tejido.

1.1.2.2 *Receptores H1 y H2.-*

Los receptores H1 estimulan la broncoconstricción y la contracción intestinal, también se asocia con los fenómenos alérgicos (Akdis y Simons, 2006)

Los receptores H2 estimulan la secreción gástrica, producen la relajación del músculo liso en las vías respiratorias y vasculares, (Akdis y Simons, 2006)(Fitzsimons et al., 2002). La vasodilatación es mediada por los receptores H1 y H2 (Saligrama et al., 2012).

1.2.2.3 *Receptores H3 y H4.-*

Los receptores H3 se expresan predominantemente en el SNC, particularmente en los ganglios basales, hipocampo y corteza. Ellos actúan como autorreceptores en las neuronas histaminérgicas en donde regulan la liberación de histamina y modulan la de otros neurotransmisores.

Los receptores H3 generan efectos distintos, por un lado inhibe su propia síntesis y por otro inhibe la liberación de histamina en las terminaciones nerviosas, y por consiguiente inhibe la síntesis de la misma en el SNC, pulmones y piel (Bongers et al., 2007).

Los receptores H4 están en las células inmunitarias y de origen hematopoyético, como los eosinófilos y los neutrófilos, y también en las células gastrointestinales. La activación de estos receptores en los eosinófilos induce un cambio en la morfología de la célula, lo cual sugiere que la histamina al ser liberada induce el reclutamiento de eosinófilos (Dy y Schneider, 2004a).

1.2.3 JNJ7777120.-

El compuesto JNJ7777120 es un fármaco, desarrollado por Johnson&Johnson Pharmaceutical Research & Development. Esta droga se caracteriza por actuar como un antagonista potente y selectivo del receptor de histamina H4 (Thurmond et al., 2004).

Actúa a su vez como antiinflamatorio, y ha demostrado reducir procesos alérgicos en roedores (Zampeli y Tiligada, 2009).

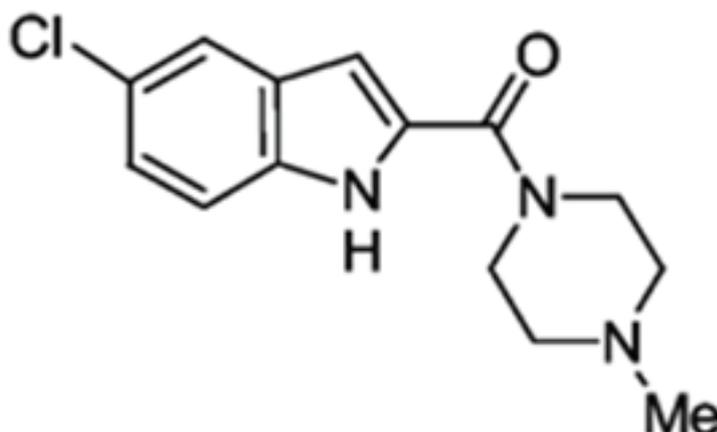


Figura 5: Estructura molecular del compuesto JNJ7777120

Aunque se ha designado originalmente al compuesto JNJ7777120 como un antagonista de referencia selectivo del receptor a histamina H4 humano, recientemente se ha demostrado que se comporta como un agonista parcial en otras especies ortólogas del receptor H4 (rata, ratón, perro) con respecto a la activación de la proteína Gi y también se comporta como un agonista parcial, reclutando la beta arrestina, en receptor H4 humano (Seifert et al., 2011) (Rosethorne y Charlton, 2010)

1.3 Micronúcleos.-

Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a alteraciones durante la replicación y posterior división del ADN, dichas alteraciones pueden ser producto de radiación o sustancias genotóxicas, causando roturas cromosómicas, que dan lugar a la pérdida del material genético o a un reparto no equitativo. Cuando esto ocurre, el material cromosómico que se desprende y que, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, produce una masa de cromatina de origen nuclear como un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado "micronúcleo" (MN), visible fácilmente al microscopio óptico (Fenech et al., 1999).

El material genético desprendido puede ser parte de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante anafase mitótica, por la imposibilidad de migración (Zalacain et al., 2005).

El uso de la técnica del recuento de MN como medida de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesta por primera vez por Countryman y Heddle en 1976, cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica (Countryman y Heddle, 1976). Más tarde, en 1985, el ensayo de genotoxicidad fue mejorado por Fenech y Morley, consiguiendo frenar el proceso de división celular cuando la célula sólo hubiese sufrido una división mitótica, para ello desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: *cytokinesis-block micronucleus*) cuyo fundamento es la utilización de un agente químico denominado citocalasina-B cuya función es impedir la citocinesis celular (Fenech y Morley, 1985).

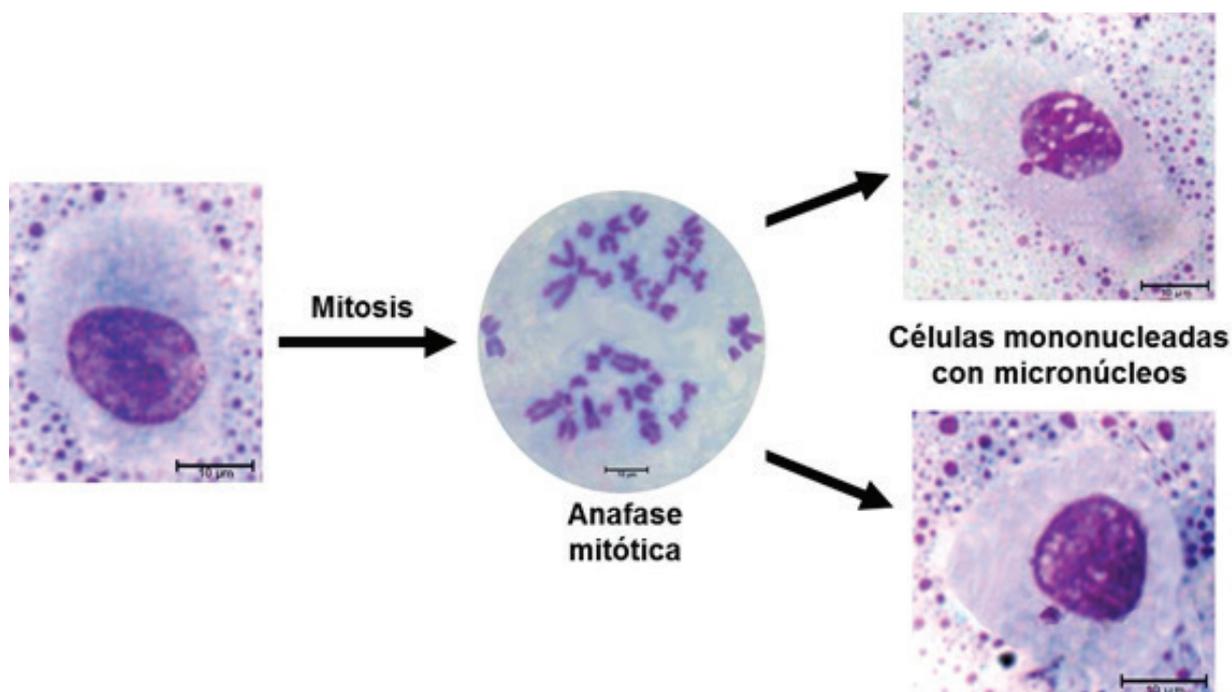


Figura 6: Formación de micronúcleos debido a la pérdida de cromosoma entero y fragmentos cromosómicos de tipo acrocéntricos en anafase mitótica.

La citocalasina-B es una molécula aislada del hongo *Helminthosporiumdematoideum*, que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis al imposibilitar la creación del anillo contráctil, constituido por microfilamentos de actina y miosina, necesario para la partición celular en telofase mitótica. Esta molécula no afecta a las fibras del huso ni a la división del núcleo, por lo que origina células binucleadas y que han sufrido una sola división (Fenech, 1993).

El año 1999 fue crucial para el ensayo de MN, ya que la técnica fue validada a nivel mundial y considerada como un biomarcador efectivo de daño en el ADN. Para la validación se creó un programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: *HUMAN MicroNucleus Project*), diseñado por Michael Fenech y Stefano Bonassi con el fin de recopilar las frecuencias basales de MN obtenidas en diferentes laboratorios y poblaciones del mundo. El principal objetivo consistió en identificar las fuentes y niveles de variabilidad capaces de influir en la frecuencia basal de micronúcleos en linfocitos humanos, comparar las distintas técnicas utilizadas para definir un protocolo estándar y realizar así un estudio prospectivo por parte de todos los laboratorios implicados e incluso intentar establecer una asociación entre la frecuencia de MN y enfermedades como el cáncer (Fenech et al., 1999)(Bonassi et al., 2001).

El ensayo de MN es una alternativa al test de aberraciones cromosómicas convencional, en el que se analizan las alteraciones presentes en metafases mitóticas y permite detectar aberraciones cromosómicas que responden a alteraciones de tipo estructural o alteraciones numéricas del agente en estudio (Zalacain et al., 2005).

El ensayo de MN es, por tanto, un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos.

Objetivos

2.1 Objetivo General.-

Evaluar mediante la utilización de técnicas citogenéticas el efecto de la histamina y el compuesto JNJ7777120 como radioprotectores del material cromosómico de las células normales y comparar los resultados de los dos para inferir cual de ellos proporciona mayor protección al tejido sano durante la radioterapia

2.2 Objetivos Específicos.-

- Individualizar el cariotipo de las líneas celulares: MDA y MCF – 7 provenientes del laboratorio de Radioisótopos de la Universidad de Buenos Aires.
- Obtener mediante el desarrollo de metodología específica bandas para la homologación de los pares cromosómicos, en las líneas celulares.
- Cuantificar, mediante rearrreglos cromosómicos, la respuesta a la aplicación de histamina y JNJ7777120.
- Armar y desarrollar una experiencia con un modelo animal a partir de la interpretación de los datos obtenidos en las experiencias anteriores.
- Cuantificar la respuesta humana a la aplicación de histamina y JNJ7777120 a través de cultivos de linfocitos de sangre periférica con posterior irradiación.
- Caracterizar la acción sistemática, mediante el análisis de aberraciones cromosómicas y el recuento de micronúcleos, de la inoculación de histamina y JNJ7777120 en ratas irradiadas y no irradiadas.
- Comparar los métodos de evaluación genotóxica, análisis de metafases y recuento de micronúcleos, destacando la probabilidad de desarrollo de manera aislada; así como también posibles ventajas y desventajas.

Materiales y métodos

3.1 Líneas celulares.-

Los estudios para determinar la citotoxicidad de un compuesto se realizan primero en una fase preclínica en la cual se trabaja sobre líneas celulares. Los modelos celulares de origen humano están llamados a desempeñar un papel puente entre los ensayos preclínicos en animales y los ensayos clínicos en el ser humano, por ser herramientas fiables para reconocer el comportamiento de una célula frente a un compuesto (Walen, 2002)

Las líneas celulares, se han utilizado fundamentalmente debido a sus características de inmortalidad, muy poca diferenciación e inhibición del crecimiento por contacto celular (Walen, 2002). Sin embargo, es poco lo que se ha estudiado del comportamiento citogenético de líneas celulares estables, lo que se evidencia por el escaso número de referencias sobre el tema.

Los genes de células tumorales a menudo están desregulados por reordenamientos genómicos. En consecuencia, el análisis de los cromosomas participantes ocupa ahora un papel clave en la caracterización y la identificación de líneas celulares tumorales. La citogenética puede ser usada para estudiar la naturaleza y la extensión de los rearrreglos de cromosomas inducida por la radiación o productos químicos ("clastogénesis"). Estas además permiten la caracterización por los sistemas de bandedo, entre otras técnicas citogenéticas (Macleod et al., 2011).

Para la determinación de los efectos de radioprotección por parte de determinados compuestos se realizó previamente la experimentación sobre líneas celulares y modelos animales.

Las líneas celulares que se utilizaron fueron dos líneas tumorales las cuales son comercializadas por ATCC (American Type Culture Collection), y después de distintos pasajes se encuentran en el Laboratorio de Radioisótopos de la Universidad de Buenos Aires donde el grupo de la Dra. Medina donó las células para su utilización en el estudio de metafases con el fin de caracterizar las posibles aberraciones o cambios en el número de cromosomas.

3.1.1 MCF7.-

Organismo: *Homo sapiens*, epitelio.

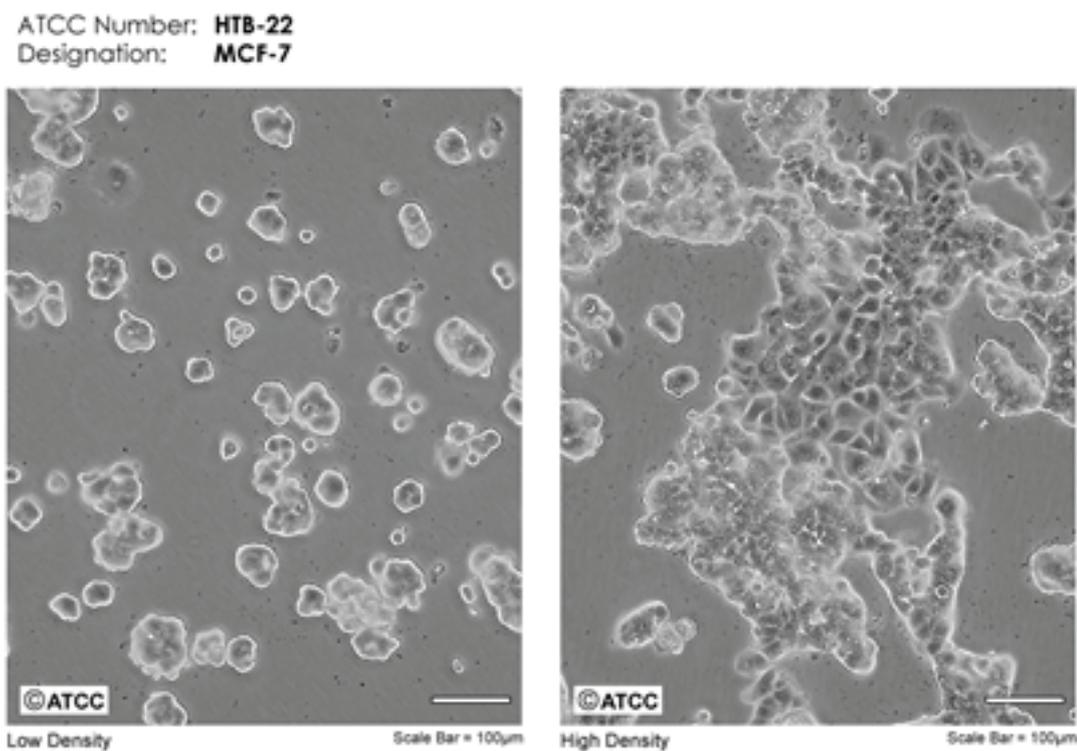


Figura 7: Imagen de la línea celular MCF – 7. Izq.: Crecimiento celular de baja densidad. Der: Crecimiento celular con una elevada densidad. Imagen del catálogo de ATCC.

Origen: Órgano: glándula mamaria, mama.
Enfermedad: adenocarcinoma.
Derivado de metástasis: derrame pleural.
Tipo celular: epitelio.

Análisis citogenético: Número modal = 82; rango = 66 a 87.

Línea celular femenina, donde el número de cromosomas posee un rango de triploidía hasta tetraploidía. Hay 29 a 34 cromosomas marcadores en cada metafase; 24 a 28 marcadores aparecieron en al menos 30% de las células, y generalmente los marcadores que estaban presentes como un submetacéntrico (M1) largo y 3 subtelocéntricos (M2, M3 y M4) largos fueron reconocidos en alrededor del 80% de metafases. El cromosoma 20 estaba ausente y el X era doble.

Edad: adulto de 69 años.
Género: Femenino.
Origen: Caucásico.

3.1.3 Cultivo de las líneas celulares.-

La obtención de metafases para poder observar cromosomas de las líneas celulares, se realizó a través del cultivo en monocapa de las respectivas líneas.

Previo a la experiencia se realizó la determinación del mejor tiempo de cultivo para el mayor número de metafases, para lo cual se recibió del laboratorio de radioisótopos de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires las dos líneas diferentes en condiciones.

El experimento se realizó en las mismas condiciones en que fueron mantenidas en sus lugares de origen es decir se cultivaron las dos líneas en medio RPMI 1640 con suero fetal Bovino al 10 % , los resultados mostraron que para la línea MCF – 7 habían completado la monocapa es decir el mayor recuento (), de 4×10^5 células/ml, ocurrió a las 24 horas. Y para el cultivo de células MDA el mayor recuento, $4,5 \times 10^5$ células/ml, se logró solo después de ocho horas de arresto y el transcurso de otras 40 horas posterior a la sincronización

Las líneas celulares se repicaron solo a monocapa completa, para lo cual se extrae completamente el sobrenadante. Se levanta la monocapa adicionando 3 – 5 ml de una solución de tripsina – versene con la cual se hizo un ligero lavado y luego se quitó inmediatamente dejando la monocapa apenas humedecida. Se deja actuar por unos minutos a 37°C .

Una vez que la monocapa comienza a desprenderse, se fuerza mediante ligeros golpes su total desprendimiento.

Se agregan 10 ml de medio RPMI 1640 y se pipetea suavemente hasta obtener una suspensión celular homogénea, la cual se divide en dos y se distribuye en frascos nuevos.

Se lleva a un volumen final de 3 ml por el agregado de medio, y se incuba a 37°C , es de vital importancia que no se muevan los frascos por las primeras 6 horas.

Al día siguiente, una vez alcanzado un índice celular alrededor de $4,5 \times 10^5$ células/ml se trató cada frasco de la siguiente manera:

1. No tratado: fueron inoculados con solución fisiológica estéril.
2. No tratado e irradiado: las células fueron irradiadas con una dosis de 5 Gy.
3. Tratado con histamina: cultivo fue tratado con histamina (s.c.) 0.1 mg/día.
4. Tratado con histamina e irradiado: cultivo fue tratado con histamina (s.c.) 0.1 mg/día y después fue irradiado con una dosis de 5 Gy.
5. Tratado con J77: cultivo fue tratado con JNJ7777120 (s.c.) 0.1 mg/día.
6. Tratado con J77 e irradiado: cultivo fue tratado con JNJ7777120 (s.c.) 0.1 mg/día y después fue irradiado con una dosis de 5 Gy.

Al día siguiente post-tratamiento se irradió el material.

Obtención de metafases para estudio citogenético a partir de la monocapa

Cuando las células llevan 48 horas en cultivo, se agregan 1 – 2 ml de suero fetal bovino, en las últimas horas de la tarde. Se procesa 16 – 18 horas más tarde, para lo cual se agrega 0.1 ml de colchicina ($10 \mu\text{g/ml}$) y se deja actuar durante 3 – 4 horas.

Antes de los 10 minutos de cumplirse el plazo, se efectúa la tripsinización del frasco con solución de tripsina – versene, previa extracción y conservación del sobrenadante que se utiliza para recoger la suspensión celular obtenida por los 2 ml de tripsina que se adicionaron al cultivo.

Se centrifuga cada tubo durante 10 minutos, se quita el sobrenadante y se agrega la solución hipotónica de KCl 0,563%, dejando actuar por 30 minutos, resuspendiendo dos veces en este tiempo.

Se centrifuga una vez más, se retira el sobrenadante y se agrega fijador (alcohol metílico absoluto – ácido acético glacial, 3:1) dejando actuar por 30 minutos.

Por último, se realizan 3 – 4 cambios sucesivos de fijador y se obtienen los extendidos por goteo, como se detalla más adelante para el cultivo de linfocitos.

3.2 Estudios citogenéticas en mamíferos.-

Los animales de laboratorio han sido utilizados desde los años 50, primero fueron utilizadas las ratas para después ampliar el rango de uso de los animales empleados en investigación.

Las ratas sirven como modelo animal, tanto por la facilidad de crianza como por su período de gestación y conocimiento de su genoma; además a diferencia del cultivo celular el uso de un animal modelo permite evaluar la respuesta de todo el sistema vivo (Venitt y Parry J.M., 1984).

En ellas se realizó:

1. El análisis de metafases buscando tanto rearrreglos numéricos como estructurales con el fin de observar alguna alteración cromosómica.
2. La búsqueda y recuento de la frecuencia de micronúcleos.

Las dos técnicas son comúnmente aplicadas en médula ósea; sin embargo, el bazo, riñón, hígado, embriones, órganos fetales y células germinales también pueden ser utilizados. En un estudio citogenético de rutina, de acuerdo a los requerimientos de las autoridades, el uso de la médula ósea es suficiente.

En estudios previos se han utilizado ratas como modelo para evaluar la funcionalidad del efecto radioprotector de un compuesto derivado de hojas de betel (Piper betel) Bhattacharya et al., 2005).

En otra experiencia la melatonina fue utilizada como radioprotector, la misma fue inyectada de manera intraperitoneal en ratones albinos, a posterior se realizó el sacrificio de los animales y se cuantificó el daño cromosómico y la cuantificación de los micronúcleos (Badr et al., 1999) sirviendo como uno de los puntos de partida para este trabajo .

Doce individuos machos de ratas Sprague- Dawley fueron utilizados para cada experiencia. Los animales, fueron caracterizados, criados y mantenidos en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, los mismos se mantuvieron en grupos de 5 animales por jaula de dimensiones: 50 cm x 30 cm x 30 cm (1500 cm²) con agua y comida ad libitum, a temperatura entre 22-23°C, con humedad cercana al 56%, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas de duración, pesando al día del sacrificio 300-400 g.

Se administró el tratamiento con histamina 24 horas antes de la irradiación y se continuó hasta el sacrificio de los animales, que resultó ser el 3° día post-irradiación como se detalla a continuación y se describió previamente (Medina et al., 2007).

Los animales se separaron en grupos (de 16 ratas cada uno).

1. No Tratado: fueron inoculados con solución fisiológica estéril por vía subcutánea.
2. No tratado e irradiado: animales irradiados en cuerpo entero con una dosis de 5 Gy que recibieron solución fisiológica (s.c.)
3. Tratados con histamina e irradiados: animales irradiados en cuerpo entero con una dosis de 5Gy y tratados con histamina (s.c.) 0.1 mg/kg día.
4. Tratados con histamina y no irradiados: animales tratados con histamina (s.c.) 0,1 mg/Kg.día.
5. Grupo Tratado con J77 no irradiado: animales tratados con JNJ7777120 (s.c.) 0,1 mg/Kg.día.
6. Tratado con J77 e irradiado: animales irradiados en cuerpo entero con una dosis de 5Gy y tratados con JNJ7777120 (s.c.) 0.1 mg/kg día.

Algunos estudios se realizaron 30 días post – irradiación siguiendo el mismo protocolo experimental (de 8 ratas cada uno). Todos los experimentos se realizaron conforme a las recomendaciones del Canadian Council on Animal Care para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Canadian council on animal care, 1993).

Los individuos irradiados, fueron expuestos a irradiación de cuerpo entero de 5 Gy con una fuente de ¹³⁷Cs de 189 Tera Bequerelio (TBq) (tasa de dosis: 7 Gy/minuto) (Equipo IBL 437C tipo H, CEBIRSA S.A.).

En la figura 9, se muestra el diseño experimental que se utilizó para los dos tratamientos.

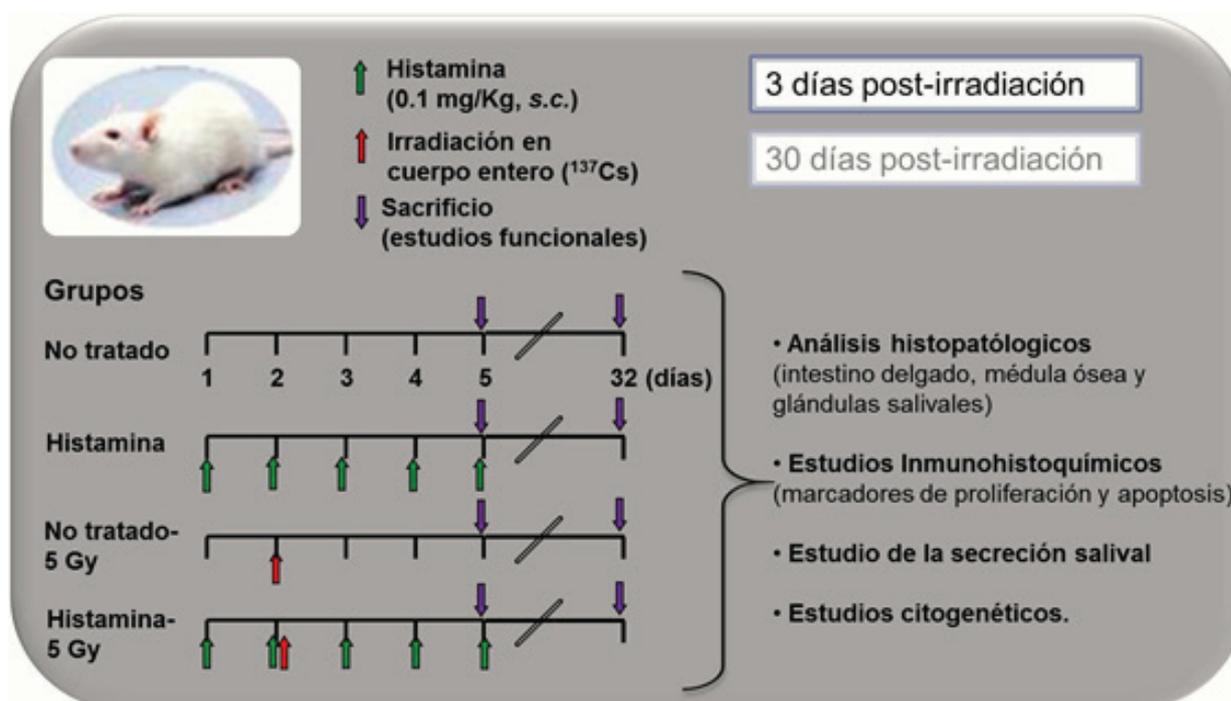


Figura 9: Diseño experimental del trabajo con ratas. Imagen gentileza de la Dra. Medina.

Tres horas antes del sacrificio de los animales, se procede a inyectar colchicina vía intraperitoneal (1 ug/ml; 0,1 ml/100 gr peso), de cada animal se extrajo bazo, intestino, fémur, testículo, epidídimo, extendido de sangre y raspado de mucosa bucal, las muestras fueron traídas al laboratorio el mismo día.

Bazo

Se disgrega el bazo, mediante el uso de tijeras obteniendo una suspensión celular del mismo, la cual se incuba en un volumen de solución hipotónica 0,07 M de KCl por 30 minutos a 37°C.

Transcurrido el tiempo, se centrifuga a 800 rpm durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se adiciona suavemente, por la pared del tubo, fijador (1 de ácido acético glacial: 3 de alcohol metílico absoluto) a igual volumen que la solución hipotónica descartada y se deja en heladera por 10 minutos antes de obtener los preparados.

Para la obtención de los extendidos se realiza el mismo procedimiento que se detalla en la página 39 en el cultivo de linfocitos de sangre periférica.

Intestino

Se incuba parte del intestino grueso en una solución hipotónica de 0,07 M de KCl por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se toma con una pinza y se realiza un corte longitudinal abriéndolo por la mitad.

Cuidadosamente con la pinza se apoya la superficie interna del intestino sobre el portaobjetos y se presiona, de tal manera que quedan las células epiteliales más superficiales en el vidrio.

Se deja secar al aire el preparado para su posterior coloración con May – Grünwald Giemsa.

Médula ósea

La médula ósea se obtiene después de la desinserción del fémur, para lo cual con tijeras se corta los extremos del hueso (epífisis) y se introduce una jeringa con 2ml. de solución hipotónica, la cual se hace correr a lo largo de la cavidad medular extrayendo las células de médula ósea dentro de un tubo cónico

Este se centrifuga a 800 rpm por 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se adiciona solución hipotónica de KCl 0,07 M que se dejó actuar por 20 minutos a 37°C.

Cumplido el tiempo de incubación se centrifuga a 800 rpm por 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se adiciona fijador Carnoy frío (1:3 ácido acético glacial, metanol) cuidadosamente por las paredes del tubo, a igual volumen que la solución hipotónica descartada. Se fija el pellet celular durante al menos 30 minutos en heladera, hasta que el botón celular ya fijado se haya transformado en una masa blanca. Luego está listo para la obtención de los preparados.

Para la obtención de los extendidos se realizó el mismo procedimiento que se detalla en la página 39 para el cultivo de linfocitos de sangre periférica.

3.3 Citogenética.-

El principio del análisis de metafases es evaluar las células en mitosis post-tratamiento, de tal manera que las aberraciones cromosómicas puedan ser evaluadas. El recuento de micronúcleos se realiza en células que han pasado su primera mitosis post-tratamiento, cuando los fragmentos de cromatina derivados de la ruptura de cromosomas que en la observación estos restos de cromatina se ven como que han formado pequeños núcleos fuera del núcleo principal.

El estudio de metafases se considera como uno de los más sensibles al momento de analizar citotoxicidad, sin embargo debe estar acompañado de otro tipo de experimentación que confirme los resultados obtenidos.

3.3.1 Aberraciones cromosómicas.-

Es un error durante la meiosis de los gametos o de las primeras divisiones del huevo y que provoca una anomalía de número o estructura de los cromosomas.

Estos cambios pueden ser observados en la metafase del ciclo celular y que tienen su origen en roturas (procesos clastogénicos) de las cadenas de ADN no reparadas o mal reparadas, entre otros factores.

Las aberraciones pueden ser de dos tipos: estructurales y numéricas. Las mismas se detallan a continuación.

3.3.1.1 Aberraciones cromosómicas numéricas.-

Defectos mitóticos, como el del huso, pueden llevar a una distribución inexacta de los cromosomas entre las células hijas las cuales resultan con un número cromosómico que se desvía del complemento diploide normal (Venitt y Parry, 1984).

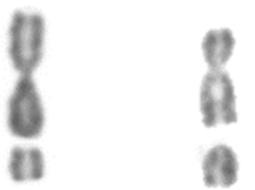
3.3.1.2 Aberraciones cromosómicas estructurales.-

Las aberraciones cromosómicas son cambios visibles al microscopio en la estructura de los cromosomas. Este puede ser ruptura de una de las cromátides resultando en la pérdida o delección de parte del material del cromosoma. El material deleccionado puede aparecer como fragmentos en las metafases.

La mayoría de las aberraciones son letales para las células debido a la pérdida de información genética vital o por razones mecánicas. Sin embargo, usualmente vienen acompañadas por alteraciones más estables como la translocación y pequeñas delecciones que resultan compatibles con la división celular.

Las principales aberraciones que se consideran producto del daño causado por la radiación o por acción de algún agente citotóxico se presentan en la siguiente tabla donde se define el proceso que ocurrió y se presente una ilustración o esquema (Savage, 1976):

A. Tipo cromosómica		Involucra las dos cromátides de un cromosoma en loci idénticos.
Tipo de Aberración	Diagrama	Comentario
(1) Gap (G) o lesión acromática		La región distal al gap está alineada con la región proximal. La región no coloreada tiene menor diámetro que una cromátide.
(2) Ruptura cromosómica (C) o deleción terminal		Involucra un solo cromosoma y, como todas las aberraciones del tipo cromosómica ocurre en cromosomas no replicados (G0 o G1) pero se ve en metafase. La parte céntrica del cromosoma delecionado puede no ser identificada. En la mayoría de células no se lo puede distinguir de ruptura isocromática así que se hace referencia a las dos como rupturas isolocus.
(3) Intercambio intracromosómico o entre cromosomas		Involucra dos o más lesiones en el mismo cromosoma o en diferentes cromosomas.
(a) Intercambio (entre cromosomas; C/C)	 Dicéntrico acompañado por el fragmento	Intercambio entre dos cromosomas en G ₁ . El fragmento es parte del intercambio y no debe ser considerado como un evento aislado.
(b) Intercambio (dentro de un cromosoma; C/C)		
(i) Entre brazos (cambio interno dentro del brazo)	 Anillo acompañado por fragmento.	El fragmento es parte del intercambio y no debe ser considerada como un evento aislado. Uno de los fragmentos debe ser asignado a cada anillo (o dicéntrico) y los fragmentos restantes se clasifican como deleciones isolocus.
(ii) Dentro de un brazo (intercambio dentro del brazo)	 Anillo Acéntrico	La parte céntrica de este intercambio puede no ser identificada. Pequeños anillos acéntricos (deleciones intersticiales diminutas).

B. Tipo cromátide		Usualmente involucran solo una cromátide de cada cromosoma excepto en la ruptura isocromática	
Tipo de Aberración	Diagrama	Comentario	
(1) Gap (g) o lesión acromática		Región no coloreada tiene menor diámetro que una cromátide.	
(2) Ruptura cromosómica (c) o deleción terminal	 Fragmento alineado	Región no coloreada tiene mayor diámetro que una cromátide.	
	 Fragmento desplazado	Fragmento casi invariable permanece asociado con el cromosoma de origen.	
(3) Ruptura isocromática (i) o deleción	 SU	Muestra una completa reasociación o unión entre cromátidas hermanas (SU) con ruptura de los extremos terminales.	
	 Nud Nup	Reasociación incompleta (no hay unión, Nu) ya sea proximal (p) o distal (d). Los fragmentos pueden estar alineados o desplazados. Donde el tipo de reunión no puede ser identificada, los fragmentos deben ser nombrados como deleciones de isolocus.	
(4) Intercambio			
(a) Intercambio (entre cromosomas c/c)			
(i) Asimétrico		Se produce un fragmento más una cromátide dicéntrica si la reasociación es completa. Muchas veces se la llama cuadrirradial.	

(ii) Simétrico		No conlleva a una cromátide dicéntrica o a un fragmento a menos que la reasociación sea incompleta.
(b) Cambio interno (dentro de un cromosoma ; c/c)		
		Se produce un fragmento.
(i) Entre brazos (cambio interno entre brazos)	Asimétrico	
		No se produce un fragmento si la reasociación fue completa.
	Simétrico	
(ii) Dentro de un brazo (cambio interno dentro de un brazo)		Muy a menudo permanece asociada con el cromosoma de origen.
	Delección diminuta o intersticial	
	Se forma	nto.
(c) Isocromátide/intercambio entre cromátides (i/c)	Dicéntrico trirradial	
		No se forma un fragmento si la reasociación fue completa.
	Monocéntrico trirradial	

Figura 10: Aberraciones cromosómicas estructurales: clasificación y representación. (Savage, 1976)

3.4 Cultivo celular de Linfocitos.-

La obtención de metafases para poder observar cromosomas correspondientes con la línea somática, se realizó a través del cultivo de linfocitos de sangre periférica, aplicando las técnicas desarrolladas por Moorhead et al., (1960) con modificaciones aplicadas en el laboratorio que demostraron ser eficaces en el cultivo de sangre.

Se contabilizó la cantidad de linfocitos por cada 100 células blancas, para proceder a calcular el valor de la cantidad de leucocitos necesarios a sembrar en el cultivo, concentrando o diluyendo de modo de obtener la concentración adecuada (600.000 a 1.200.000) de linfocitos por ml de cultivo.

Los cultivos se realizaron empleando el medio RPMI 1640 a pH 6,8-7, suplementados con suero fetal bovino al 10%, 0,25 ml de antibiótico y 0,25 ml de fitohemaglutinina. A este medio se le agregó el volumen de fracción blanca necesario para lograr la concentración adecuada de linfocitos y se incubó en estufa a 37°C por 72-96 horas.

3.4.1 Sacrificio del cultivo

El tiempo para el sacrificio del cultivo fue determinado evaluando a las 48 horas el índice blástico (IB, i.e. cantidad de linfoblastos sobre el total de linfocitos) del cultivo.

Cuando el IB alcanzó o fue superior a 50%, el cultivo fue sacrificado 24 horas más tarde (72 horas de cultivo), de lo contrario se procedió al sacrificio a las 96 horas. Para el sacrificio, se trató con un antimitótico colchicina Sigma (concentración final 1 µg/ml de cultivo), para detener el ciclo celular en estadio de metafase, y se continuó la incubación durante 2-3 horas a 37°C. Se centrifugó 5 minutos a 800 rpm, descartándose el sobrenadante.

Al botón celular se le agregó, resuspendiendo sin burbujear, solución hipotónica de KCl 0,075 M a 37°C, y se mantuvo a la misma temperatura por espacio de 15-20 minutos. Para descartar la solución hipotónica, se centrifugó durante 5 minutos a 800 rpm, agregándose luego suavemente y por las paredes el fijador frío (1:3) ácido acético – alcohol metílico absoluto.

Se dejó en hielo hasta el momento en el cual se alcanzó la fijación de todo el botón que se manifestó con el cambio de coloración del mismo. Por último, fueron realizadas cinco o más series de lavados con fijador fresco y frío.

3.4.2 Preparación de los extendidos

Una vez finalizados los lavados, se tomaron portaobjetos previamente seleccionados y tratados. Se colocaron sobre una capa de hielo durante unos minutos hasta que estuvieron totalmente empañados. Al retirar los portaobjetos del hielo, aprovechando el efecto de la pared fría, utilizando una pipeta Pasteur se dejó caer de 3 a 5 gotas de suspensión sobre el portaobjetos, logrando que las mismas se abran y cubran la totalidad de la superficie.

A continuación se secaron al calor del mechero, sin pasar por la llama (Claussen et al., 2002) y se colorearon con carbol-fucsina (Carr y Walker, 1961).

3.4.3 Observación y selección de las metafases

Las metafases fueron seleccionadas en un microscopio óptico (Leica 420DC), con el objetivo de 10X. Una vez seleccionadas las metafases, fueron ingresadas sus coordenadas en protocolo, en 5 de ellas se dibujaron y se contaron sus cromosomas.

Por cada número distinto contado y encontrado, se agregó al recuento efectuado 5 metafases más hasta llegar a completar un máximo de 25 metafases, el número de mayor frecuencia fue asignando al individuo como número diploide

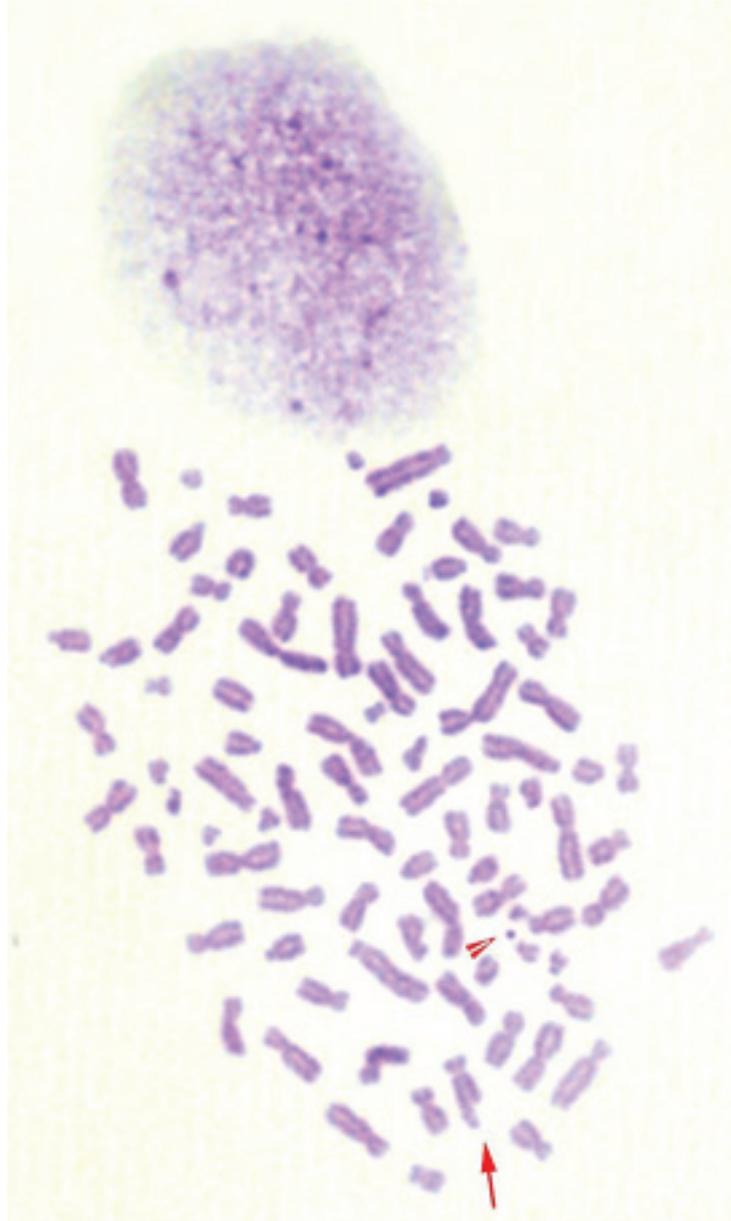


Figura 11: Imagen de cromosomas coloreadas con carbol – fucsina.

3.6 Bando C.-

Para poder detectar las regiones de heterocromatina constitutiva se aplica la técnica de bando C (Sumner, 1972), dichas regiones en general corresponden a DNA altamente repetido. Este marcador permite caracterizar cada especie por el número de bandas, localización y cantidad de heterocromatina C. Mediante este marcador es posible diferenciar especies (Panzera et al. 1997), determinar relaciones evolutivas (Panzera et al. 1995) e incluso detectar variabilidad poblacional (Panzera et al. 1992).

El estudio de los patrones de bando C en cada cromosoma se realiza en prometafase mitótica debido al menor grado de condensación cromosómica que existe en esta fase y que permite visualizar más detalles estructurales que los que se observan en metafase mitótica. También se pueden observar en metafase I y II de la meiosis.

A los preparados seleccionados por la morfología de sus metafases, se los incubó por 20 min. en HCl 0.2N a temperatura ambiente. Posteriormente fueron tratados con una solución sobresaturada de Ba(OH)₂ a 50°C durante 60 segundos y se incubaron durante una hora en una solución 2xSSC (solución salina concentrada) a 60 °C. Se colorearon en el colorante de Giemsa al 3% a pH 6,8 por un tiempo de 15 a 60 minutos.

3.7 Dapi C.-

La tinción de DAPI, tiene el mismo fundamento que el bandeado C, es decir que va a servir para observar las regiones altamente repetitivas de ADN dentro de los cromosomas. En general, se utiliza para observar los centrómeros, que son zonas ricas en heterocromatina (Heng y Tsui, 1993).

Para realizarla se somete el preparado a hidróxido de Bario por un tiempo determinado, después se lo pasa por una hora en 2xSSC, finalmente en lugar de usar el Giemsa, se coloca DAPI (molécula fluorescente), se fija el preparado con un cubreobjeto y finalmente se observa con el microscopio de fluorescencia (Verma y Babu, 1989).

3.8 Ensayo de micronúcleos.-

Para identificar y realizar un recuento de los MN presentes en sangre se utilizó un frotis de sangre periférica, el cual se coloreó con 20 gotas de solución May – Grünwald por 3 minutos. Transcurrido el tiempo se colocó igual cantidad de gotas de agua (20) mezclando con el colorante de May - Grünwald por balanceo suave del portaobjetos, por 1 minuto. Se volcó el contenido del portaobjetos y sin lavar, se cubre con el colorante de giemsa diluido al 3%, se dejó actuar por 15 – 20 minutos. Se lavó con agua corriente y se dejó secar.

En la tabla 1 se describen los criterios de selección utilizados para seleccionar los MN que presentan las características necesarias para ser reconocidos como tales y que el recuento sea fiable y objetivo (Fenech et al., 2003)

Criterios para micronúcleos
<ul style="list-style-type: none"> • El diámetro oscila entre 1/16 – 1/3 de la media del diámetro del núcleo principal. • No refractarios • Intensidad de tinción similar a los núcleos principales o superior • Forma similar a los núcleos de la célula binucleadas • No conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleadas • Pueden tocar los núcleos de la célula binucleadas para no solaparse con ellos

Tabla 1: Criterios definidos por el HUMN-Project para la selección de micronúcleos.

Resultados

4.1 Línea celular.-

Entre los experimentos que se realizaron se realizó el trabajo en líneas celulares para verificar el efecto de los compuestos y se hizo por única vez.

MDA (Adenocarcinoma mamario humano)

De un análisis de 10 metafases se puede observar en la tabla 2, que en las células de cultivo de línea celular MDA, las cuales fueron tratadas con histamina, el porcentaje en total de las aberraciones cromosómicas totales observadas en cultivo sin irradiar fue del 20% mientras en el irradiado se observó un 30%.

Sin embargo, al observar al cultivo tratado con J77 e irradiado el porcentaje de aberraciones cromosómicas fue del 20% incluso más bajo que el control irradiado que presentó un 40% de aberraciones cromosómicas.

Aberraciones (%/50 Metafasas)	MDA (Irradiadas)			MDA (No irradiadas)		
	H	J77	C	J77	C	H
Amplificación del cromosoma 2	10%	0%	0%	0%	0%	0%
Anillos	0%	0%	10%	0%	0%	0%
Dicéntricos	10%	10%	10%	20%	0%	20%
Fragmentos	0%	10%	20%	0%	0%	0%
Fusión	10%	0%	0%	0%	0%	0%
Aberraciones cromosómicas totales	30%	20%	40%	20%	0%	20%
Rango*	54 - 86	55 - 62	40 - 67	62 - 66	62 - 66	61 - 69

*: Rango de la línea 52 – 68

Tabla 2: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de línea celular MDA (Adenocarcinoma mamario humano).

La figura 12 permite observar los cambios y aberraciones que presentó el cariotipo de esta línea celular. Se debe tomar en cuenta que las aneuploidias o las aberraciones pueden estar asociadas al tipo celular que se tiene y no necesariamente van a tener que ver con los compuestos que se están estudiando. Esto se puede verificar siempre y cuando el número de cromosomas no entre dentro del rango presentado por ATCC al momento de adquirir la línea celular.

En esta experiencia no se realizó conteo de MN, debido a que no se la había considerado en su momento, sin embargo el estudio positivo de las aberraciones en esta línea celular puede ser tomado como suficiente para la inferencia del compuesto J77 con mejor efecto radioprotector.

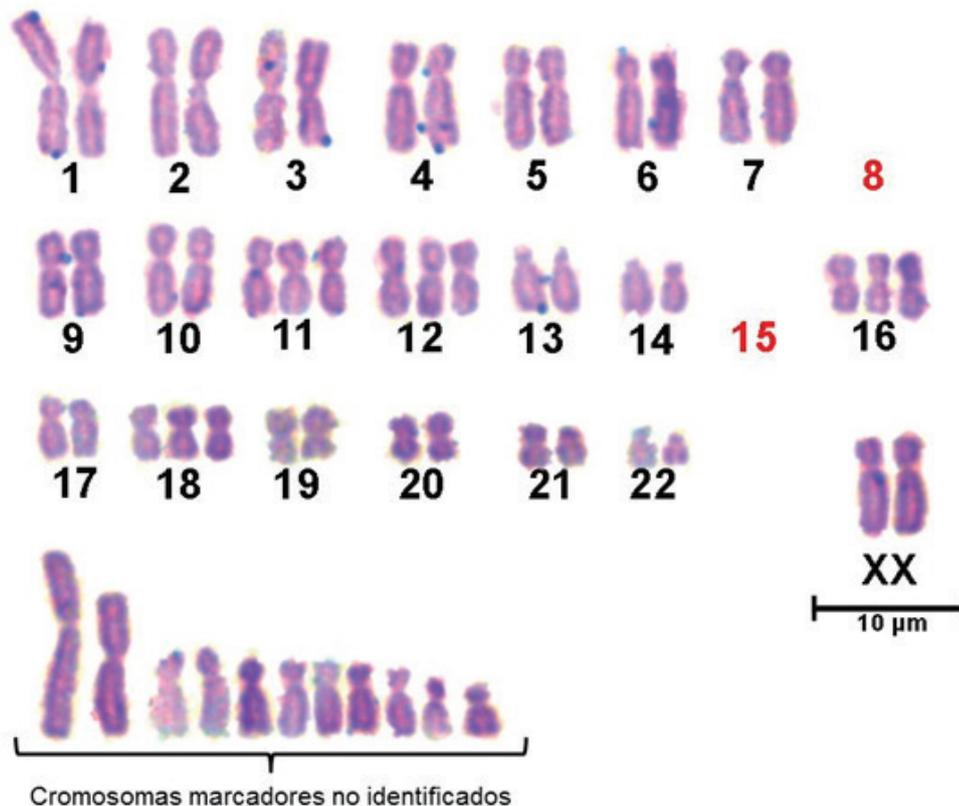


Figura 12: Cariotipo de la línea celular MDA – MB – 231 (Adenocarcinoma mamario humano). Tinción: carbol – fucsina.

MCF – 7 (*Adenocarcinoma mamario humano*)

Del análisis de 10 metafases se muestra en la Tabla 3, el porcentaje de aberraciones cromosómicas observadas para la línea celular MCF – 7 tratada con histamina e irradiada fue del 10%, en tanto que la línea celular que fue tratada con J77 presentó una marcada disminución de las aberraciones, siendo 0% en el análisis efectuado.

Este resultado está demostrando que J77 es mejor radioprotector en comparación a histamina, sin embargo no se debe tomar como seguro para su aplicación en medicina clínica hasta que no se haya realizado los otros ensayos preclínicos, que incluye al trabajo con modelos animales.

Los controles para omitir cualquier reacción cruzada o algún problema con el método, fueron: el control sin tratar ni irradiar, las líneas celulares tratadas con histamina y J77 sin irradiar; y por último el control irradiado.

Aberraciones (%/50 Metafases)	MCF 7 (Irradiadas)			MCF 7 (No Irradiadas)		
	H	J77	C	H	J77	C
Anillos	0%	0%	10%	0%	0%	0%
Dicéntricos	0%	10%	0%	20%	20%	10%
Fragmentos	0%	0%	0%	20%	0%	10%
Replicación	0%	10%	0%	0%	0%	0%
Rotura	0%	0%	0%	0%	0%	10%
Aberraciones cromosómicas totales	0%	20%	10%	40%	20%	30%
Rango	75 - 86	80 - 86	76 - 92	81 - 90	85 - 92	76 - 89

*: Rango de la línea 66 - 87

Tabla 3: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de línea celular MCF - 7.

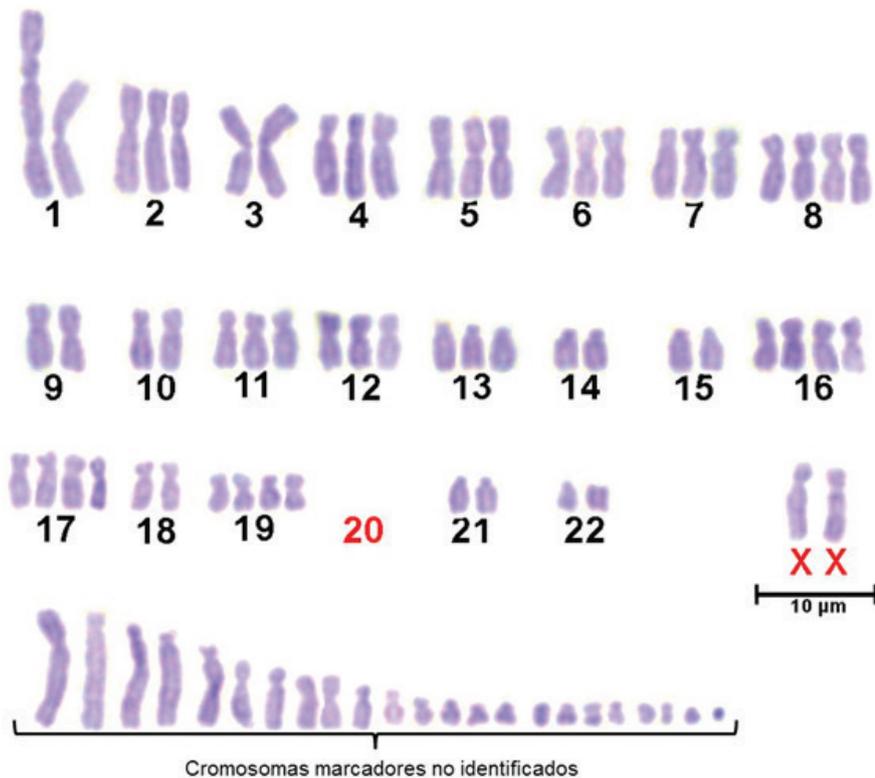


Figura 13: Cariotipo de la línea celular MCF – 7 (*Adenocarcinoma mamario humano*). Tinción: carbol – fucsina.

Debido al elevado número de cromosomas marcadores que no se pudieron ubicar en su respectivo lugar dentro del cariotipo, se procedió a realizar una experiencia con técnica de banda C

Se pudo caracterizar más a fondo la línea celular, con un mejor reconocimiento en el apareamiento por la homología, así como también se pudo caracterizar a los marcadores.

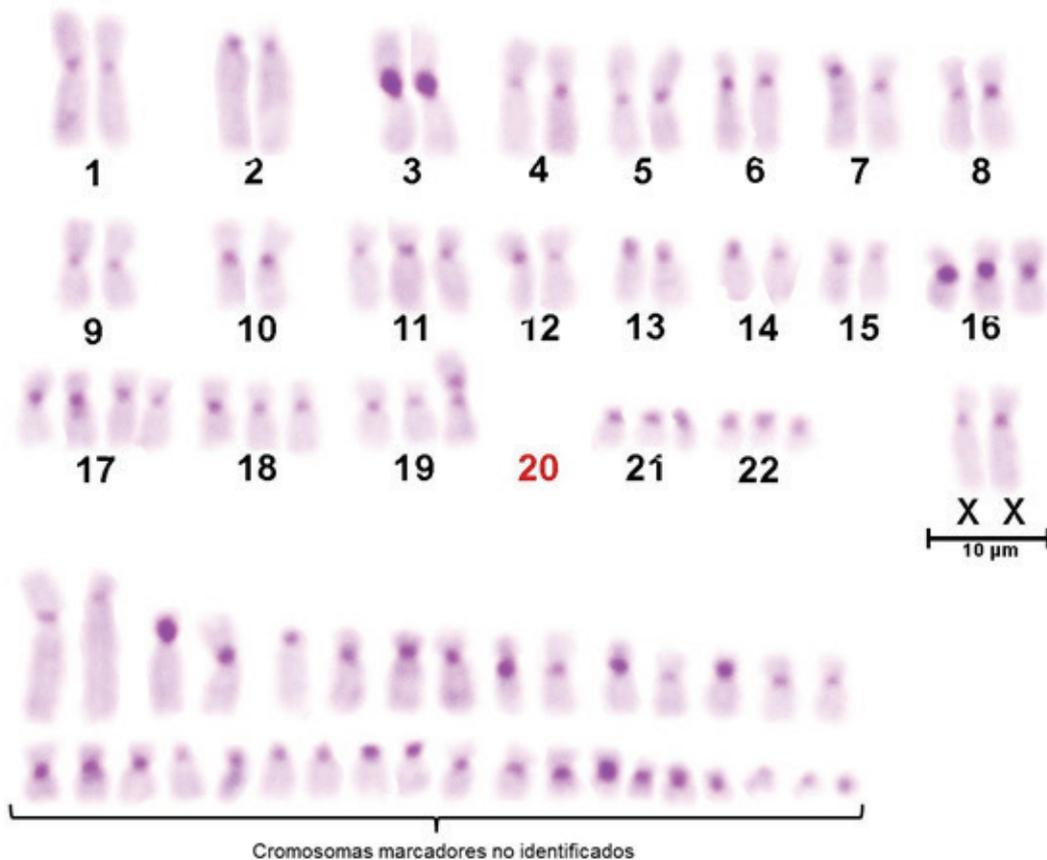


Figura 14: Cariotipo con bandas C de la línea MCF – 7 (Adenocarcinoma mamario humano). Tinción: giemsa.

4.2 Sangre periférica primer cultivo.-

Partiendo de los resultados arrojados por el experimento con la línea celular, se decidió realizar la misma experiencia con sangre periférica de humano, la cual fue donada por un integrante varón del grupo de la Dra., Medina; ellos realizaron el cultivo celular agregando concentraciones determinadas de las drogas motivo de la investigación.

El estudio por parte del laboratorio, consistió en el análisis citogenético de las células, a las cuáles además de realizar el respectivo conteo se las caracterizó en búsqueda de aberraciones cromosómicas, que permitan decir si hubo o no algún efecto por parte de las drogas que se pretende caracterizar.

Los resultados obtenidos muestran una vez más la radioprotección de las células por parte de la histamina así como también por parte del compuesto J77.

Así también, experiencias anteriores realizados en el laboratorio de la Dra. Medina mostraron que el efecto radioprotector de la histamina disminuye a medida que aumenta la concentración de la misma; lo cual indica y confirma el poder tóxico sobre las células. Gracias a esto se pudo determinar una concentración óptima de trabajo.

Los resultados se presentan a continuación en tablas, donde se analiza distintos tipos de aberraciones así como el conteo del número cromosómico.

En la tabla 4, se observa el porcentaje de aberraciones del cultivo de linfocitos de sangre periférica humana, de un individuo varón. A este cultivo se le adicionó una concentración determinada de histamina, así como también a otra alícuota se le adicionó una determinada cantidad de J77.

El cultivo con histamina e irradiado presentó 62,5% de aberraciones cromosómicas, mientras que el tratado con J77 e irradiado presentó 10% de aberraciones totales.

Linfocitos de sangre periférica humana (11/07/11)

Aberraciones (%/50 Metafases)	C (% / 10 metafases)	CI (% / 6 metafases)	H (% / 10 metafases)	HI (% / 8 metafases)	J77 (% / 10 metafases)	J77 - I (% / 10 metafases)
Amplificación	0%	0%	10%	0%	0%	0%
Rotura	0%	0%	30%	12,5%	10%	0%
Constricción	0%	0%	10%	0%	0%	0%
Fragmentos	0%	0%	0%	25%	0%	0%
Dicéntrico	0%	0%	0%	12,5%	0%	0%
Anillo	0%	0%	0%	12,5%	0%	10%
Unión cromátide	0%	16,67%	0%	0%	20%	0%
Otras	0%	0%	0%	0%	10%	0%
Aberraciones cromosómicas totales	0%	16,67%	40%	62,5%	40%	10%
Rango (2n)*	46	46	45 - 46	46 - 49	45 - 46	45 - 48

*: Rango normal 46

Tabla 4: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de linfocitos de sangre periférica del 11/07/11.

En la tabla 5, el porcentaje de aberraciones totales en el cultivo tratado con histamina e irradiado fue del 50%, mientras que el tratado con J77 e irradiado presentó un 12,5% de aberraciones totales.

El control irradiado, en esta ocasión presentó un 10% de aberraciones cromosómicas totales siendo menor al porcentaje de los otros cultivos con los compuestos radioprotectores.

En la figura 15, se observan aberraciones en el cromosoma 9 (dicéntrico) y el cromosoma 22 (tres cromosomas).

Linfocitos de sangre periférica humana (05/09/11)

Aberraciones (%/50 Metafases)	C2 (% / 10 metafases)	CI (% / 10 metafases)	H (% / 10 metafases)	HI (% / 8 metafases)	J77 (% / 8 metafases)	J77 - I (% / 8 metafases)
Amplificación	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Rotura	0%	0%	10%	0%	0%	0%
Constricción	0%	0%	0%	12,5%	0%	0%
Fragmentos	0%	0%	0%	12,5%	0%	0%
Dicéntrico	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Anillo	0%	10%	0%	0%	0%	0%
Unión cromátide	0%	0%	0%	12,5%	12,5%	0%
Cromátidas separadas	0%	0%	0%	12,5%	0%	0%
Otras	0%	0%	0%	0%	0%	12,5%
Aberraciones cromosómicas totales	0%	10%	10%	50%	12,5%	12,5%
Rango (2n)*	46	46	46	45 - 47	46	45 - 46

*: Rango normal 46

Tabla 5: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de linfocitos de sangre periférica del 05/09/11.

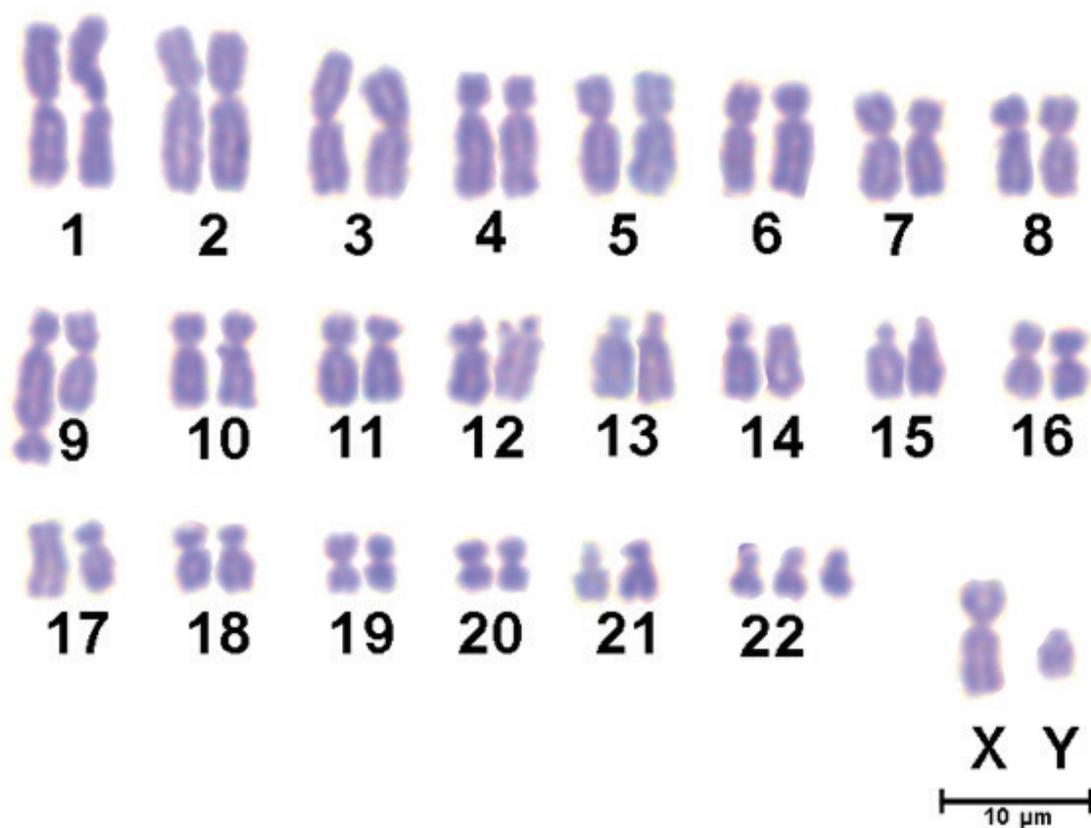


Figura 15: Cariotipo de individuo masculino sin tratamiento e irradiado

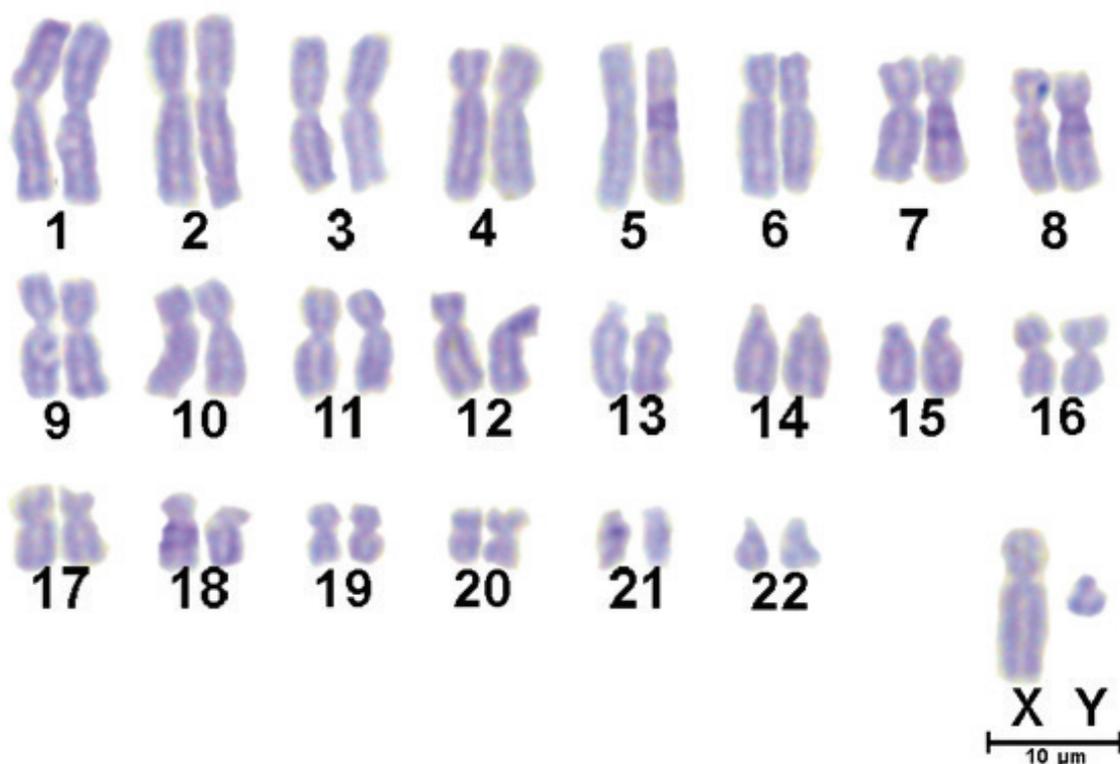


Figura 16: Cariotipo de individuo masculino tratado con histamina e irradiado.

En la figura 16, se presenta el cariotipo de un individuo XY tratado con histamina e irradiado. Se reconoce en el par 5 un cromosoma dicéntrico, considerado como una aberración cromosómica.

4.3 Sangre periférica: segundo cultivo.-

A pesar de los resultados obtenidos previamente, se realizó nuevamente un cultivo de linfocitos de sangre periférica, el cual fue realizado en el laboratorio de Radioisótopos y después entregado a nosotros para su respectivo sacrificio y análisis. Para diferenciar de la experiencia anterior se tomaron muestras de individuos humanos de diferentes sexo para observar si existe alguna diferencia en cuanto al tratamiento efectuado. Asimismo en el caso del cultivo de sangre de origen femenino, se inocularon diferentes concentraciones de histamina con el fin de verificar si realmente se está trabajando con la concentración ideal.

En la tabla 6, correspondiente al cultivo de linfocitos de sangre periférica humana de un individuo XY, se observa en el cultivo tratado con histamina e irradiado un 10% de aberraciones cromosómicas, mientras que el cultivo tratado con JNJ7777120 e irradiado presentó 30% de aberraciones.

Linfocitos de sangre periférica humana XY (12/01/12)						
Aberraciones (%/50 Metafases)	C (% / 5 metafases)	CI (% / 10 metafases)	H (% / 10 metafases)	HI (% / 10 metafases)	J77 (% / 10 metafases)	J77 I (% / 10 metafases)
Amplificación	0%	10%	0%	0%	0%	0%
Rotura	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Constricción	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Fragmentos	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Dicéntrico	0%	0%	10%	0%	0%	20%
Anillo	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Unión cromátide	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Otras	0%	0%	20%	10%	0%	10%
Aberraciones cromosómicas totales	0%	10%	30%	10%	0%	30%
Rango (2n)*	46	41 - 48	45 - 50	41 - 52	45 - 47	46 - 48

*: Rango normal 46

Tabla 6: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de linfocitos de sangre periférica humana XY del 12/01/12.

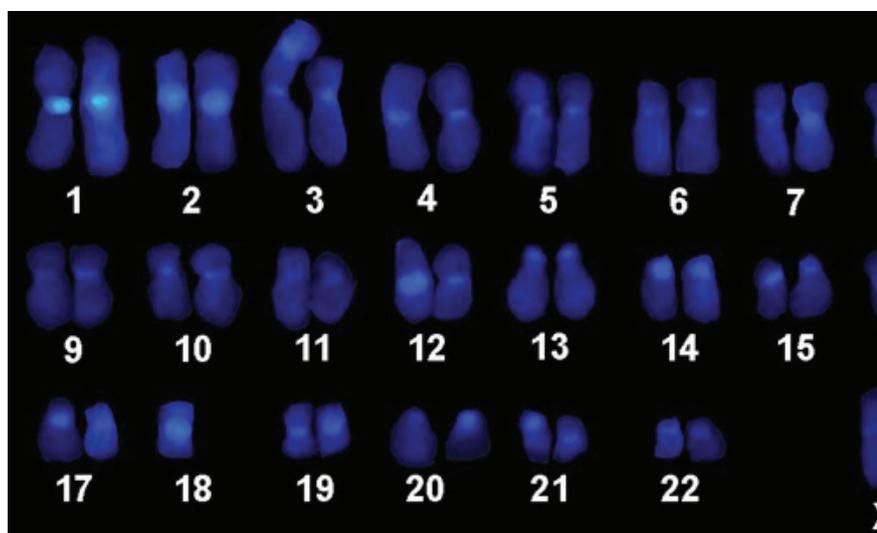


Figura 17: Cariotipo de humano XY tratado con histamina e irradiado. Tinción Dapi - C

La figura 17, teñido con DAPI – C muestra en el par tres un cromosoma dicéntrico el cual parece que se originó de una fusión entre el cromosoma 3 y 18. Sin embargo para poder asegurarlo sería necesario realizar otras técnicas como bandas G.

En la tabla 7, se encuentran expresados los porcentajes de aberraciones cromosómicas que fueron encontrados en el cultivo de linfocitos de sangre periférica humana de un individuo XX.

Además de tratar con J77 e irradiar al cultivo, otras alícuotas fueron tratadas con diferentes concentraciones de Histamina y también fueron irradiadas, para verificar la concentración óptima para la radioprotección

El cultivo de linfocitos de sangre periférica tratado con J77 e irradiado, presentó un 0% de aberraciones cromosómicas al igual que el control irradiado. Mientras que los cultivos tratados con histamina e irradiados fueron variando en la radioprotección presentando un mayor número de aberraciones cuando la concentración era más alta.

Linfocitos de sangre periférica humana XX (12/01/12)				
Aberraciones (%/50 Metafases)	C (% / 5 metafases)	CI (% / 10 metafases)	J77 (% / 10 metafases)	J77 - I (% / 10 metafases)
Amplificación	0%	0%	0%	0%
Rotura	0%	0%	0%	0%
Constricción	0%	0%	0%	0%
Fragmentos	0%	0%	0%	0%
Dicéntrico	0%	0%	0%	0%
Anillo	0%	0%	0%	0%
Fusión	0%	0%	0%	0%
Cromátidas separadas	0%	0%	0%	0%
Otras	0%	0%	0%	0%
Aberraciones cromosómicas totales	0%	0%	0%	0%
Rango (2n)*	46	44 - 47	45 - 47	45 - 47

*: Rango normal 46

Linfocitos de sangre periférica humana XX (12/01/12)						
Aberraciones (% / 50 Metafases)	H (10 µM) (% 10 metafases)	HI (10 µM) (% 10 metafases)	H (100 nM) (% 10 metafases)	HI (100 nM) (% 10 metafases)	H (10 nM) (% 10 metafases)	HI (10 nM) (% 10 metafases)
Amplificación	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Rotura	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Constricción	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Fragmentos	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Dicéntrico	0%	0%	0%	10%	0%	0%
Anillo	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Fusión	0%	0%	0%	0%	0%	10%
Cromátidas separadas	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Otras	10%	10%	0%	10%	0%	0%
Aberraciones cromosómicas totales	10%	10%	0%	10%	0%	10%
Rango (2n)*	45 - 47	45 - 47	44 - 47	45 - 49	46 - 48	45 - 47

*: Rango normal 46

Tabla 7: Porcentaje de aberraciones cromosómicas cultivo de linfocitos de sangre periférica humana XX del 12/01/12

4.4 Efecto de la histamina y JNJ7777120 en ratas.-

4.4.1 Aberraciones cromosómicas.-

A fin de determinar el efecto radioprotector de la histamina y el compuesto JNJ7777120 se trabajó con ratas de ocho semanas de edad, las cuales fueron tratadas como se mencionó en materiales y métodos.

En la tabla 8, se presentan los porcentajes de aberraciones que se observó en la médula ósea, las células madre pluripotenciales de la médula ósea son particularmente radiosensibles y luego de la irradiación en cuerpo entero, se observa un importante grado de aplasia. La supervivencia de las células madre determina la subsecuente repoblación de la médula ósea luego de la irradiación, por lo cual es de vital importancia verificar la radioprotección de estas células.

Médula Ósea						
Aberraciones (%/50 Metafases)	C	CI	H	HI	J77	J77I
Dicéntricos	0%	0%	0%	0%	0%	2%
Gap	0%	8%	0%	0%	0%	0%
Anillos	0%	0%	0%	2%	0%	0%
Duplicaciones	0%	0%	4%	0%	0%	2%
Otras	0%	6%	2%	4%	4%	0%
Total	0%	14%	6%	6%	4%	4%
MN / 100 céls.	0	15	-	10	5	5
2n*	42	37-45	40-44	40-42	37-45	40 - 43

Tabla 8: Porcentaje de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratas, 21/08/2012.

Además de la observación de aberraciones cromosómicas, se cuantificó el número de micronúcleos cada 100 células, valores que se expresan en la tabla 9.

En la figura 18, se presenta el cariotipo de una rata macho . Donde se observa un mayor número cromosómico, debido a la presencia de tres cromosomas en los pares 14 y 19.

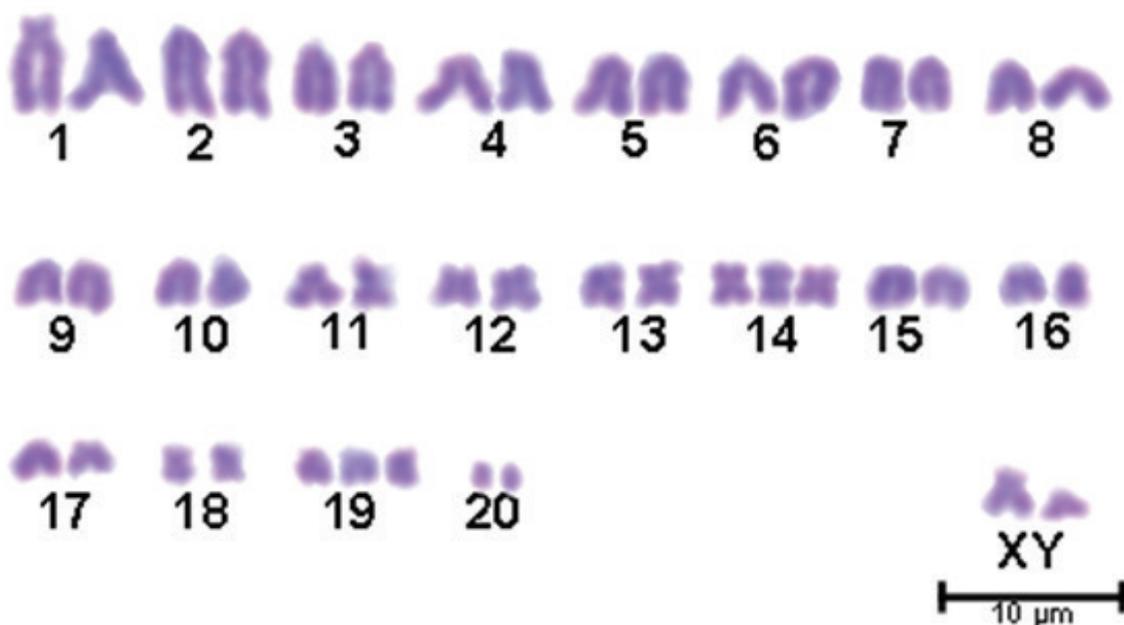


Figura 18: Cariotipo de médula ósea de rata XY, tratado con histamina e irradiado. Tinción: carbol – fucsina.

4.4.2 Recuento de Micronúcleos.-

En sangre periférica y en intestino, se procedió a realizar el conteo de micronúcleos, los portaobjetos fueron coloreados con MayGrünwald – Giemsa.

En la tabla 9 se observa el número de micronúcleos, donde se observa que el control presenta un bajo número de micronúcleos llegando incluso a ser cero, mientras que en los individuos tratados el número de micronúcleo fue mínimo llegando a valores de cero.

En el caso del frotis de sangre, durante el conteo hubo ciertos individuos de los cuales no se observó ningún linfocito lo cual se discutirá más adelante.

	Sangre		Intestino
	Eritrocitos (MN/1000 cels)	Linfocitos (MN/100 céls)	MN/100 céls
C	0	0	2
CI	1000	-	4
H	0	15	2
HI	400	-	5
J77	100	5	2
J77I	100	0	0

Tabla 9: Recuento de micronúcleos en frotis de sangre e intestino, 21/08/2012.

En el intestino se observó que en las ratas tratadas con histamina e irradiadas (HI) el número de micronúcleos fue menos que en las ratas irradiadas sin ningún tratamiento, sin embargo con el compuesto J77 el número fue menor que con histamina.

Figura 23 permite reconocer MN en células de extendido de intestino, mientras que la figura 24 corresponde a un frotis de sangre donde los eritrocitos presentan MN,

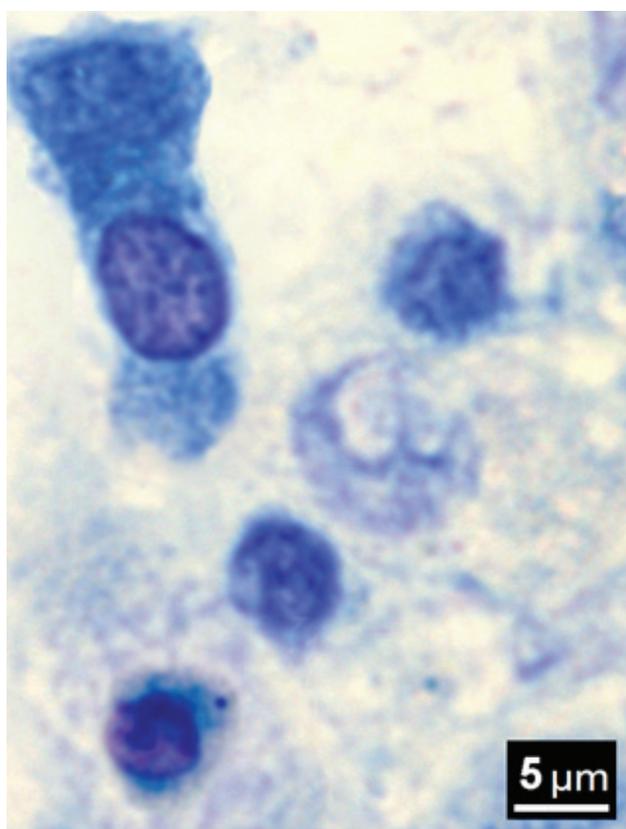


Figura 19: Imagen de micronúcleo en extendido de intestino delgado. Tinción: May – Grünwald Giemsa.

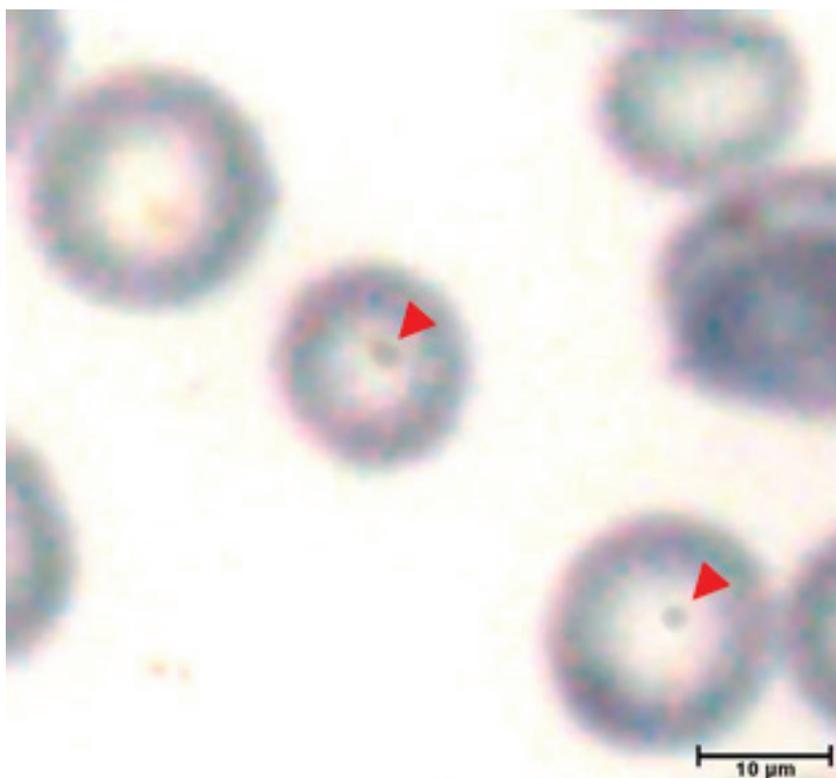


Figura 20: Imagen de micronúcleo en eritrocitos, frotis de sangre. Tinción: May – Grünwald Giemsa.

4.5 Efecto de la histamina y JNJ777120 en ratas sacrificadas 2 semanas post irradiación.-

Una vez que se terminó de cuantificar metafases y determinar el recuento de MN, se decidió realizar una experiencia con nueve ratas que fueron tratadas con histamina y J77 e irradiadas el mismo día que las ratas anteriores.

El sacrificio se realizó dos semanas post irradiación, siguiendo el protocolo previamente establecido.

Se recibieron médula ósea, bazo, intestino, testículo y frotis de sangre; se trabajó con médula ósea, frotis de sangre e intestino para el recuento de metafases y MN. (Tabla 10 y 11).

Médula ósea						
Alteraciones cromosómicas (%/50 Cmetafases)	C	C I	H	H I	J77	J77 I
Fusión	0%	–	20%	20%	0%	0%
Anillo	0%	–	0%	20%	0%	0%
Otras	0%	–	0%	0%	0%	0%
Total	0%		20%	40%	0%	0%
Rango 2n*	42	–	41 ± 1	42 ± 1	42 ± 1	41 ± 1

Tabla 10: Porcentaje de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratas, 05/09/2012

	Sangre		Intestino
	Eritrocitos (MN/1000 cels)	Linfocitos (MN/100 céls)	MN/100 céls
C	400	40	3
CI	500	60	6
H	400	70	3
HI	800	60	4
J77	100	30	3
J77I	500	50	2

Tabla 11: Recuento de micronúcleos en frotis de sangre e intestino, 05/09/2012

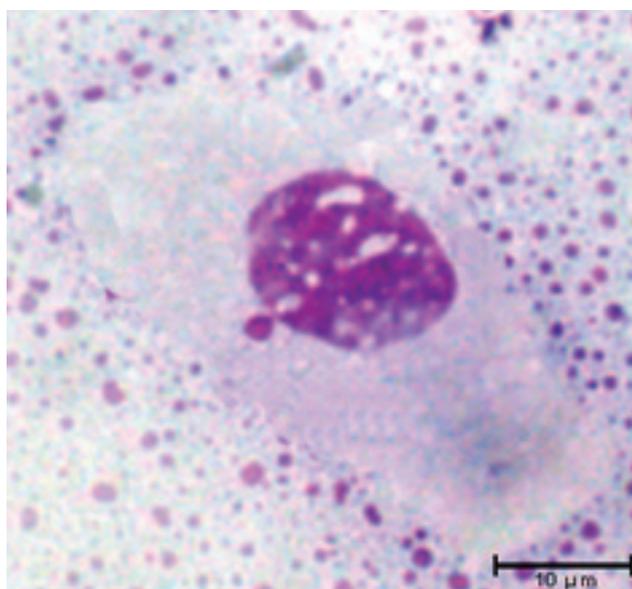


Figura 21: Célula de intestino con micronúcleo. Tinción: May – Grünwald Giemsa.

Los resultados observados, dos semanas post irradiación, demuestran que la médula ósea sufrió un daño irreparable por la acción de una elevada radiación razón por la cual no se pudo realizar un conteo en el individuo control irradiado. Sin embargo, se evidencia con el recuento de aberraciones y el de MN, que la médula ósea logra una mejor recuperación gracias a los tratamientos recibidos. Es importante mencionar que se obtuvo una mejor acción gracias al compuesto J77.

En la figura 25, se observa una célula de intestino con MN. Corresponde al individuo que es control y que también fue irradiado.

Discusión

Líneas Celulares

MDA

Para el catálogo ATCC Satya-Prakash y col. (1981) notificaron el perfil citogenético de la línea MDA, la cual presentó aneuploidía con un número cromosómico ($2n$) entre 52 y 68 cerca del rango triploide, con trisomías en la mayoría de los pares cromosómicos y ausencia de los cromosomas 8 y 15. Observaron once marcadores cromosómicos (caracterizados por no poseer homología con otro cromosoma), presentes casi de manera estable, en el 100% de las metafases (Satya-Prakash et al., 1981). Nuestros resultados muestran un $2n$ entre 40-67 para el control, valor similar al número cromosómico presentado por estos autores. A pesar de que el valor obtenido no es igual al perfil del catálogo ATCC (Satya-Prakash, et al. 1981) encontramos la misma presencia de trisomías en los pares cromosómicos y ausencia de los cromosomas 8 y 15. Los marcadores cromosómicos, debido a su reordenamiento, no pudieron ser homologables de acuerdo a lo establecido para la construcción del cariotipo humano ya que no se pudo realizar técnicas de tinción diferencial de bandas G

Al irradiar la línea control, se obtuvo un $2n$ entre 76 y 92; mientras que al tratar con el compuesto JNJ7777120 e irradiar las células el valor $2n$ estuvo entre 55 y 66, cercano al valor basal (Satya-Prakash et al., 1981). Al aplicar histamina con posterior irradiación de las células, el valor se encontró entre 54 y 86. Observamos que el valor $2n$ varía en menor proporción en relación al valor basal, al aplicar el compuesto JNJ7777120; mientras que, si bien con la histamina se obtuvo un menor número $2n$ en relación al control irradiado, este no se acercó al valor del control sin irradiar (40-67). Con estos valores pensamos que el efecto de la Histamina y JNJ7777120 es aumentar la sensibilidad en células, donde ocurrió una alteración cromosómica por la radiación ionizante. Nuestros resultados citogenéticos son concordantes con estudios histológicos y hormonales previos, donde el efecto de la histamina y el compuesto JNJ7777120 se explica como el aumento de la radiosensibilidad de las células tumorales (Medina et al., 2010 y 2011). Los valores para JNJ7777120 demuestran que este compuesto aumenta mucho más la sensibilidad a la radiación de las células transformadas, siendo más efectivo que el tratamiento con histamina.

Con respecto a las aberraciones cromosómicas, al ser una línea tumoral no se puede considerar como único inductor de daño cromosómico a la radiación ionizante, ya que por ser transformada la susceptibilidad a diferentes compuestos o agentes físicos es mayor (Mudry et al., 2006). Según nuestros experimentos las aberraciones disminuyeron al aplicar JNJ7777120, ya sea por la radioprotección o porque ocurrió un evento de transformación que llevó a la reparación o pérdida de los daños cromosómicos.

MCF – 7

La línea celular MCF-7, presenta a nivel citogenético un número cromosómico ($2n$) entre 66 – 87 con un rango triploide hasta tetraploide; 29 a 34 cromosomas marcadores, de los cuales 24 a 28 aparecieron en al menos 30% de las células y generalmente dentro de estos se encontraba un submetacéntrico largo (M1) y 3 subteloecéntricos largos (M2, M3 y M4) reconocidos en alrededor del 80% de metafases (Klein et al., 2005). El cromosoma 20 estaba ausente y el X era doble (Klein et al., 2005). Nuestro control presentó un número cromosómico ($2n$) entre 76 – 89, cercano al caracterizado por estos autores, con triploidias y tetraploidias. Se reconocieron los cuatro cromosomas marcadores estables descritos por Klein y col. (2005), y a partir de la técnica de banda C se pudo caracterizar otros marcadores en función de la heterocromatina presente.

Los valores obtenidos en nuestro trabajo, para el número cromosómico, difieren al valor basal dado por Klein y col. (2005), presentando nuestro control irradiado un $2n$ entre 76 – 92, el tratamiento con Histamina y posterior irradiación un $2n$ entre 81 – 90; y al aplicar JNJ7777120 se observó un $2n$ entre 85 – 92. Si bien el número cromosómico obtenido con histamina e irradiación se acercó al valor de nuestro control (76 – 89), se observó con este tratamiento un mayor número de aberraciones cromosómicas; mientras que usando JNJ7777120 se obtuvo una menor cantidad de aberraciones.

Con nuestro trabajo se muestra una alternativa ya observada en estudio histológicos y hormonales por otros grupos (Medina et al., 2008 y 2010) para la reducción de varios de los efectos adversos causados por la radiación ionizante, descritos por (Knowles y Selby, (2005), Pawlik y Keyomarsi (2004) y Steel (2002), mediante la aplicación de agentes que aumenten la sensibilidad de las células cancerígenas a la radiación.

Sangre Periférica Humana.-

La acción de los dos radioprotectores utilizados en el presente trabajo fue caracterizada previamente a través de estudios histológicos y hormonales (Medina et al, 2008). Si bien es la primera vez que se analiza citogenéticamente el posible daño a las células por aplicación de estos dos compuestos, observamos los mismos efectos obtenidos en trabajos previos realizados con intestino y glándula salival de rata (Medina et al., 2008 y 2010).

En sangre periférica, se puede utilizar como biomarcador a las aberraciones cromosómicas, que permiten detectar el efecto genotóxico de agentes químicos y físicos, como la radiación (Mudry et al., 2006). La disminución de la frecuencia de aberraciones (estructurales y numéricas) al aplicar radioprotectores evidencia una reducción de los efectos por parte de la radiación.

En los cultivos de sangre periférica no tratados e irradiados se observó un elevado porcentaje de aberraciones cromosómicas, mientras que en el cultivo tratado con histamina e irradiado se observó una leve disminución. En tanto que, al tratar con JNJ7777120 e irradiar se observó una mayor reducción de la frecuencia de aberraciones cromosómicas, lo cual indica que es el mejor tratamiento analizado para asegurar una mejor radioprotección del tejido. Estos resultados concuerdan con el análisis y la caracterización histológica-hormonal realizada en glándula salival e intestino por Medina y col. (2008, 2010).

Anteriormente se describió el efecto de los radioprotectores en líneas celulares, como agentes que aumentan la radiosensibilidad de las células transformadas, lo cual no ocurre en linfocitos de sangre periférica; donde las células normales tratadas e irradiadas con histamina no aumentaron su sensibilidad a la radiación, así como tampoco lo hicieron las células tratadas con JNJ7777120. En este caso el efecto de los compuestos, responden al concepto de radioprotector según Littlefield y col. (1993), donde el efecto ocurre sobre células normales y no sobre las transformadas protegiéndolas de los efectos mutagénicos de la radiación.

A pesar de que en trabajos previos al nuestro se utilizó una concentración de histamina específica (Medina et al., 2008 y 2010), nosotros realizamos un segundo cultivo de sangre periférica para probar la dosis ideal máxima, para observar un efecto radioprotector por histamina. Demostrando que existe una cantidad adecuada para garantizar dicho efecto, la cual una vez superada causaría reacciones adversas que afecten su acción, así como el tejido tratado.

Ratas

A partir de los resultados obtenidos en otros modelos, se decidió efectuar experiencias con ratas de la cepa Sprague Dawley, para observar la acción de la histamina y el compuesto JNJ7777120, donde obtuvimos resultados similares a otros trabajos (Medina et al. 2008, 2009). El modelo animal corroboró una afirmación observada en el cultivo de la línea celular y el cultivo de linfocitos, que es la no toxicidad de la dosis para los sistemas utilizados; esta dosis fue utilizada en trabajos previos por Medina y col. (2008, 2010). Nuestros resultados representan el análisis genotóxico necesario para poder aseverar que un compuesto es capaz de causar o no daño al ADN.

Los efectos adversos causados por la radiación ionizante son inevitables, siendo los órganos más afectados aquellos que presentan una mayor sensibilidad por su elevada proliferación; como lo son la médula ósea, el intestino delgado, entre otros órganos (Hall y Gaccia, 2006; Emamo et al., 1991; Erbil et al, 2005 y Steel, 2002). Observamos que la inoculación de Histamina evitó posibles efectos adversos causados por la radiación ionizante, en órganos con elevada tasa mitótica, preservando las características de los cromosomas tanto en médula ósea como en otros tejidos. Además, el uso del compuesto JNJ7777120, mostró una mejor radioprotección del tejido sano y disminuyó aun más las aberraciones cromosómicas, en comparación al tratamiento con histamina. Un porcentaje elevado de aberraciones, así como el cambio de número cromosómico, permite observar la incidencia que pueden tener determinados compuestos sobre el material genético (Mudry et al. 2006). Analizamos el efecto de la histamina como generadora de citoprotección frente al daño ocasionado por la radiación ionizante (Medina et al., 2008, 2010), efecto observado previamente en estudios histológicos y hormonales de rata y ratón. Utilizamos como biomarcadores a las aberraciones cromosómicas, debido a su efectividad para caracterizar agentes genotóxicos (Kliesch et al., 1981). En los estudios donde se está probando la posible acción de un compuesto y su efecto en los cromosomas, es importante realizar más de un ensayo de manera de poder comparar los resultados y realmente poder asegurar su posible beneficio (García Sagredo, 2008); es por esto que, adicional al estudio de aberraciones cromosómicas, se desarrolló la técnica de Micronúcleos caracterizada por su sencillez, la cual nos permitió observar la presencia de daños a nivel genético. Sin

embargo, uno de los problemas que representó el uso de esta técnica es el no poder justificar la formación de los micronúcleos, lo cual ya se expuso en la sección de introducción cuando se habla de micronúcleo y su mecanismo aun desconocido de formación (Fenech y Morley, 1985).

Las ratas irradiadas y tratadas con histamina y JNJ7777120, lograron conservar las características típicas de una médula ósea sana, afirmando la elevada potencialidad de la histamina para radioproteger a distintos tejidos tal y como fue observado en trabajos previos por Medina y col. (2007, 2010). Si bien debido a la aplicación de radiación, observamos que hubo una disminución considerable de número de células en la médula ósea, quedó la cantidad suficiente de las mismas que resistieron a la radiación por la acción de los agentes radioprotectores, estas células son capaces de repoblar nuevamente la médula ósea. Esto representa un importante avance y mejora en el tratamiento del cáncer con radioterapia, donde generalmente se destruye la médula ósea por su elevada sensibilidad (Ross et al. 2010).

El tratamiento con histamina y con JNJ7777120 en médula ósea, aumentó el número de componentes medulares, por efecto de una reducción en la aplasia medular inducida por la radiación ionizante; lo cual podría prevenir la congestión vascular y hemorragia tan características de la falla en la actividad de la médula ósea (Rose et al., 2011). Mudry y Nieves (2010) plantean que muchas de las aberraciones cromosómicas, ocurren en regiones de heterocromatina con distintos nivel de repetición o próximas a ellas y, otras en el límite entre una región de eucromatina y una región de heterocromatina. Trabajos previos, demuestran una acumulación de MN en sangre periférica después de diferentes tratamientos (Kliesch et al., 1981); sin embargo, debido a la corta vida de las células en sangre periférica (Carter et al., 1964) es aconsejable tomar otras células para el análisis de micronúcleos (Kliesch et al., 1981). En el presente trabajo se decidió observar los micronúcleos en intestino y médula ósea, que como se dijo antes son zonas de elevado recambio celular. El número de micronúcleos obtenidos en médula ósea, para los individuos tratados con los radioprotectores y posterior irradiación, puede considerarse como daño cromosómico con posibilidad de persistir en el tiempo (Fenech et al., 1981); razón por la cual es aconsejable un estudio post irradiación, con el fin de observar la disminución o prevalencia de los micronúcleos (Mudry et al., 2006). Si bien las aberraciones cromosómicas fueron bajas, el conteo de micronúcleos debe ser considerado como factor de daño genético, principalmente porque su mecanismo de formación no está dilucidado completamente; tal y como se expone en distintos trabajos (Mudry et al., 2006).

El compuesto JNJ7777120, todavía es nuevo en relación a que no se han hecho suficiente estudios para medir su acción, así como la respuesta sistémica. El tratamiento con JNJ7777120, aumentó la tolerancia de los tejidos sanos que presentan una mayor radiosensibilidad en comparación a la histamina. Es por eso que mediante la elaboración de una serie de pruebas preclínicas mostramos como funciona tanto en el modelo celular como en el animal. Sin embargo, queda por dilucidar el mecanismo de acción a nivel molecular así como su ruta metabólica, de tal manera que podamos entender mejor su actividad.

A partir de los resultados obtenidos, se realizó una experiencia dos semanas después de haber tratado e irradiado a los animales, donde obtuvimos un aumento considerable de las aberraciones cromosómicas en el tratamiento con histamina. La acumulación de eventos citogenéticos, particularmente la formación de aberraciones en tejidos con una elevada proliferación, no es deseable. Estas aberraciones pueden causar muerte celular o un arresto durante el ciclo celular (Jeggo et al. 2006). El control irradiado presentó aplasia total en medula ósea, ya que no se encontró ninguna forma celular; en tanto que, con la droga JNJ7777120 el porcentaje de aberraciones fue muy bajo y el número de cromosomas estuvo cerca del valor normal ($2n = 42$).

En el análisis de micronúcleos, se observó lo mismo que se había visto previamente, una prevalencia en el poder radioprotector por parte del compuesto JNJ7777120 con el cual se realizó un recuento de 2 MN cada 100 células, siendo este el menor valor observado. El compuesto JNJ7777120 no solo radioprotegió el tejido, sino que también logró preservar la estructura y funcionalidad de sus componentes logrando repoblar un tejido radiosensible como la médula ósea, así como también, controlar el número de aberraciones cromosómicas o errores que podrían afectar al organismo.

Se evidenció que los individuos tratados con JNJ7777120 lograron una recuperación de los tejidos al disminuir el número de aberraciones en comparación al control irradiado, y a los individuos tratados con histamina. De esta manera, se logró mantener las características de los tejidos gracias a la radioprotección brindada por los compuestos. Si bien el control mostró de manera natural un cierto número de MN, este valor se puede deber a una formación espontánea de los mismos (Fenech et al. 1981) o la acción de la colchicina inyectada 3 horas antes del sacrificio, que según Vanitt y Perry (1984) se debe a la formación de cristales en las células medulares. Observamos que el compuesto JNJ7777120 tiene mayor efecto radioprotector que la histamina, lo cual nos lleva a querer desarrollar más pruebas futuras con el fin de poder dilucidar su mecanismo de acción. En las experiencias donde el número de MN de los individuos tratados sea igual al del control se considerará como normal y no será elevado a nivel de genotóxico, por

otro lado si el número es mayor es indispensable considerar al compuesto como genotóxico (Mudry et al., 2006). En el estudio del intestino observamos un recuento de micronúcleos menor a 5, aquí nosotros destacamos el valor que se obtuvo para los individuos tratados con JNJ7777120 e irradiados, el cual fue de 0 MN por 100 células contadas; valor que resultó ser menor a todos incluso al del control. Es decir que una vez más se comprueba la eficacia de la radioprotección del compuesto JNJ7777120 sobre la acción de la histamina. El ensayo de MN demostró ser una poderosa herramienta para el testeo de la histamina, pero sobre todo mostró la eficacia del compuesto JNJ7777120, como un nuevo producto con acciones similares o mejores que la histamina (Mudry et al. 2006).

Cabe destacar que si bien presentamos una manera adicional para el estudio del efecto genotóxico de dos compuestos, aun quedan muchos vacíos por llenar, los cuales permitirán en un futuro la utilización de cualquiera de ellos como medicina para proteger al tejido contra la radiación, y permitir una vez más el uso de uno de los tratamientos contra el cáncer con mayor efectividad.

Conclusiones

- La radioterapia es una importante herramienta en el tratamiento contra el cáncer, es de vital importancia proteger al tejido no cancerígeno cuando se aplica la radioterapia a fin de minimizar los efectos adversos.
- Se observó, gracias a las experiencias realizadas, el efecto radioprotector de la histamina y el compuesto JNJ7777120 lo cual demuestra que se puede contrarrestar el efecto causado por la radioterapia.
- El compuesto JNJ7777120 presentó mejor actividad radioprotectora, en comparación con la histamina. lo cual se vio evidenciado en las distintas experiencias realizadas.
- Se homologaron los cromosomas observados a través de la construcción de cariotipos, así como se realizaron técnicas de bandeo que evidenciaron claramente la existencia de aberraciones.
- Se confirmó que la dosis de histamina, 0.1 mg/kg, es la necesaria para proteger de manera eficaz al tejido contra la radiación. Lo cual quedó claro con la experiencia donde se comparan distintas concentraciones de este tejido,
- Se cuantificó con éxito las aberraciones cromosómicas y se realizó un conteo de micronúcleos como factores que evidencian la acción de compuesto que pueden causar determinada toxicidad a las células.
- La culminación de este trabajo, lleva a realizar futuros estudios en los cuales se pueda verificar la real eficacia de la radioprotección por parte de los tejidos estudiados. Es decir que más adelante se podría pasar a culminar los estudios en animales, así como también pensar en el modelo animal.
- Se verificó que realmente la técnica de micronúcleos requiere de otras técnicas para poder asegurar los resultados que se obtuvieron, ya que hay compuestos que se utilizaron en la rutina, capaces de causar estas aberraciones.
- El modelo animal permitió observar como ocurre la reacción sistemática al inocular los radioprotectores, un paso necesario para su posible uso posterior en humanos.

Bibliografía

- ATCC: Catalog Search. (HTB – 22) MCF - 7. Catálogo [en línea].
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-22&Template=cellBiology>. Consulta [21 de abril 2012]
- ATCC: Catalog Search. (HTB – 26) MDA – MB - 231. Catálogo [en línea].
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-22&Template=cellBiology>. Consulta [21 de abril 2012]
- Agarwala, S.S., Hellstrand, K., Gehlsen, K., Naredi, P., 2004. Immunotherapy with histamine and interleukin 2 in malignant melanoma with liver metastasis. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 840–841.
- Akdis, C.A., Simons, F.E.R., 2006. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* 533, 69–76.
- Badr, F.M., El Habit, O.H., Harraz, M.M., 1999. Radioprotective effect of melatonin assessed by measuring chromosomal damage in mitotic and meiotic cells. *Mutat. Res.* 444, 367–372.
- Bajpayee, M., Pandey, A.K., Parmar, D., Dhawan, A., 2005. Current Status of Short-Term Tests for Evaluation of Genotoxicity, Mutagenicity, and Carcinogenicity of Environmental Chemicals and NCEs. *Toxicol. Mech. Methods* 15, 155–180.
- Barcellos-Hoff, M.H., Park, C., Wright, E.G., 2005. Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 5, 867–875.
- Barrios, L., Miró, R., Caballín, M.R., Fuster, C., Guedea, F., Subias, A., Egozcue, J., 1989. Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. *Cancer Genet. Cytogenet.* 41, 61–70.
- Bhattacharya, S., Subramanian, M., Roychowdhury, S., Bauri, A.K., Kamat, J.P., Chattopadhyay, S., Bandyopadhyay, S.K., 2005. Radioprotective property of the ethanolic extract of Piper betel Leaf. *J. Radiat. Res.* 46, 165–171.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Müller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno, A., 2001. HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31–45.
- Bongers, G., Bakker, R.A., Leurs, R., 2007. Molecular aspects of the histamine H3 receptor. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1195–1204.
- Bump, E.A., Malaker, K., 1998. Radioprotectors : chemical, biological, and clinical perspectives. CRC Press, Boca Raton.
- Burlage, F.R., Roesink, J.M., Kampinga, H.H., Coppes, R.P., Terhaard, C., Langendijk, J.A., Van Luijk, P., Stokman, M.A., Vissink, A., 2008. Protection of salivary function by concomitant pilocarpine during radiotherapy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 70, 14–22.
- Buttke, T.M., Sandstrom, P.A., 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 15, 7–10.

- Canadian Council On Animal Care (1993). Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Vol. 1, 2nd Edn. Ottawa ON: CCAC.
- Carr, D.H., Walker, J.E., 1961. Carbol fuchsin as a stain for human chromosomes. *Stain Technol* 36, 233–236.
- Carter, M.W., Matrone, G., Mendenhall, W., 1964. Estimation of the Life Span of Red Blood Cells. *J Gen Physiol* 47, 851–858.
- Claussen, U., Michel, S., Mühlig, P., Westermann, M., Grummt, U.-W., Kromeyer-Hauschild, K., Liehr, T., 2002. Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenet. Genome Res.* 98, 136–146.
- Countryman, P.I., Heddle, J.A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 41, 321–332.
- Danford, N., 1984. Measurement of levels of aneuploidy in mammalian cells using a modified hypotonic treatment. *Mutat. Res.* 139, 127–132.
- Dy, M., Schneider, E., 2004a. Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 393–410.
- Dy, M., Schneider, E., 2004b. Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 393–410.
- Edwards, S.M., Kent, C.R., McMillan, T.J., Steel, G.G., 1997. Hprt- mutation spectrum in a closely related pair of human bladder tumour cell lines after gamma-irradiation at different dose-rates. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 177–184.
- Eisenbud, M., 1965. Industrial Uses of Ionizing Radiation. *Am J Public Health Nations Health* 55, 748–759.
- Emami, B., Lyman, J., Brown, A., Coia, L., Goitein, M., Munzenrider, J.E., Shank, B., Solin, L.J., Wesson, M., 1991. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 21, 109–122.
- Erbil, Y., Oztezcan, S., Giriş, M., Barbaros, U., Olgaç, V., Bilge, H., Küçüçük, H., Toker, G., 2005. The effect of glutamine on radiation-induced organ damage. *Life Sci.* 78, 376–382.
- Falus, A., 2004. Histamine: biology and medical aspects. Karger.
- Fenech, M., 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 285, 35–44.
- Fenech, M., Chang, W., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534, 65–75.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S., 1999. The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428, 271–283.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147, 29–36.
- Fitzsimons, C., Engel, N., Policastro, L., Durán, H., Molinari, B., Rivera, E., 2002. Regulation of phospholipase C activation by the number of H(2) receptors during Ca(2+)-induced differentiation of mouse keratinocytes. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1785–1796.

- Grdina, D.J., Murley, J.S., Kataoka, Y., 2002. Radioprotectants: current status and new directions. *Oncology* 63 Suppl 2, 2–10.
- Gu, Y., Hasegawa, T., Kim, H., Suzuki, I., Mori, T., Yamamoto, Y., 2000. [Study of the radioprotective effects of TMG on teratogenic malformations in irradiated mice]. *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 60, 845–855.
- Hall, E.J., Giaccia, A.J., 2006. *Radiobiology for the radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Heng, H.H.Q., Tsui, L.-C., 1993. Modes of DAPI banding and simultaneous in situ hybridization. *Chromosoma* 102, 325–332.
- International Atomic Energy Agency, 2004. *Radiation, People And The Environment A Broad View Of Ionizing Radiation, Its Effects And Uses, As Well As The Measures In Place To Use It Safely*. Diane Pub Co.
- Jeggo, P.A., Löbrich, M., 2006. Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair (Amst.)* 5, 1192–1198.
- Kitchen, R., 2011. *Signs & symptoms of Bone Marrow Failure*. eHow Health. Demand Media, Inc. 1-4.
- Klein, A., Jung, V., Zang, K.D., Henn, W., Montenarh, M., Kartarius, S., Steudel, W.-I., Urbschat, S., 2005. Detailed chromosomal characterization of the breast cancer cell line MCF7 with special focus on the expression of the serine-threonine kinase 15. *Oncol. Rep.* 14, 23–31.
- Kliesch, U., Danford, N., Adler, I.-D., 1981. Micronucleus test and bone-marrow chromosome analysis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 80, 321–332.
- Knowles, M., Selby, P., 2005. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press.
- Leguit, R.J., Van Den Tweel, J.G., 2010. The pathology of bone marrow failure. *Histopathology* 57, 655–670.
- MacGlashan, D., 2003. Histamine: A mediator of inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112, S53–S59.
- MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Gould, D.H., 1980. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environ Mutagen* 2, 509–514.
- Macleod, R.A.F., Kaufmann, M., Drexler, H.G., 2011. Cytogenetic analysis of cancer cell lines. *Methods Mol. Biol.* 731, 57–78.
- Medina, V., Cricco, G., Nuñez, M., Martín, G., Mohamad, N., Correa-Fiz, F., Sanchez-Jimenez, F., Bergoc, R., Rivera, E.S., 2006. Histamine-mediated signaling processes in human malignant mammary cells. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1462–1471.
- Medina, V.A., Croci, M., Carabajal, E., Bergoc, R.M., Rivera, E.S., 2010. Histamine protects bone marrow against cellular damage induced by ionising radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 86, 283–290.
- Medina, V.A., Croci, M., Mohamad, N.A., Massari, N., Garbarino, G., Cricco, G.P., Núñez, M.A., Martín, G.A., Crescenti, E.J.V., Bergoc, R.M., Rivera, E.S., 2007. Mechanisms underlying the radioprotective effect of histamine on small intestine. *International Journal of Radiation Biology* 83, 653–663.
- Medina, V.A., Prestifilippo, J.P., Croci, M., Carabajal, E., Bergoc, R.M., Elverdin, J.C., Rivera, E.S., 2011. Histamine prevents functional and morphological alterations of submandibular glands induced by ionising radiation. *International Journal of Radiation Biology* 87, 284–292.

- Medina, V.A., Rivera, E.S., 2010. Histamine receptors and cancer pharmacology. *British Journal of Pharmacology* 161, 755–767.
- Mitchell, M.S., 2003. Immunotherapy as part of combinations for the treatment of cancer. *Int. Immunopharmacol.* 3, 1051–1059.
- Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M., Hungerford, D.A., 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20, 613–616.
- Mudry, M.D., Nieves, M., 2010. Primates sin frontera: una visión desde la citogenética evolutiva. *BAG. Journal of basic and applied genetics* 21, 0–0.
- Mudry, M.D., Carballo, M.A., Greizerstein, E., D'Aquino, M., Teves, S., Larripa, I., Papeschi, A., Prieto González, E., Folle, G., Abrevaya, X., 2006. *Genética Toxicológica. De los cuatro vientos*, Buenos Aires, Argentina.
- Nair, C.K., Parida, D.K., Nomura, T., 2001. Radioprotectors in radiotherapy. *J. Radiat. Res.* 42, 21–37.
- Natarajan, A.T., Obe, G., Altmann, H., 1982. DNA repair, chromosome alterations, and chromatin structure : proceedings of an international meeting held at Noordwijkerhout, The Netherlands, 23-25 April 1981. Elsevier Biomedical Press.
- Parsons, M.E., Ganellin, C.R., 2006. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol* 147, S127–S135.
- Pawlik, T.M., Keyomarsi, K., 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59, 928–942.
- Potten, C.S., Owen, G., Booth, D., 2002. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J. Cell. Sci.* 115, 2381–2388.
- Romero, A.I., Thorén, F.B., Aurelius, J., Askarieh, G., Brune, M., Hellstrand, K., 2009. Post-consolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in AML. *Scand. J. Immunol.* 70, 194–205.
- Rosethorne, E.M., Charlton, S.J., 2010. Agonist-Biased Signaling at the Histamine H4 Receptor: JNJ7777120 Recruits -Arrestin without Activating G Proteins. *Molecular Pharmacology* 79, 749–757.
- Saligrama, N., Noubade, R., Case, L.K., Del Rio, R., Teuscher, C., 2012. Combinatorial roles for histamine H1-H2 and H3-H4 receptors in autoimmune inflammatory disease of the central nervous system. *European Journal of Immunology* 42, 1536–1546.
- Satya-Prakash, K.L., Pathak, S., Hsu, T.C., Olivé, M., Cailleau, R., 1981. Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: High frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 3, 61–73.
- Savage, J.R., 1976. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet* 13, 103–122.
- Seifert, R., Schneider, E.H., Dove, S., Brunskole, I., Neumann, D., Strasser, A., Buschauer, A., 2011. Paradoxical Stimulatory Effects of the “Standard” Histamine H4-Receptor Antagonist JNJ7777120: the H4 Receptor Joins the Club of 7 Transmembrane Domain Receptors Exhibiting Functional Selectivity. *Molecular Pharmacology* 79, 631–638.
- Shahid, M., Tripathi, T., Sobia, F., Moin, S., Siddiqui, M., Khan, R.A., 2009. Histamine, Histamine Receptors, and their Role in Immunomodulation: An Updated Systematic Review. *The Open Immunology Journal* 2, 9–41.

- Stannard, J.N., Baalman, R.W.J., 1988. Radioactivity and health: A history (No. DOE/RL/01830-T59, 6608787).
- Steel, G.G., 2002. Basic clinical radiobiology. Arnold ; Oxford University Press, London; New York.
- Sumner, A.T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75, 304–306.
- Thurmond, R.L., Desai, P.J., Dunford, P.J., Fung-Leung, W.-P., Hofstra, C.L., Jiang, W., Nguyen, S., Riley, J.P., Sun, S., Williams, K.N., Edwards, J.P., Karlsson, L., 2004. A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 404–413.
- Venitt, S., Parry J.M., 1984. Mutagenicity testing: a practical approach. IRL Press.
- Verma, R.S., Babu, A., 1989. Human chromosomes. Pergamon.
- Walen, K.H., 2002. The origin of transformed cells: studies of spontaneous and induced cell transformation in cell cultures from marsupials, a snail, and human amniocytes. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 133, 45–54.
- Weiss, J.F., Landauer, M.R., 2009. History and development of radiation-protective agents. *Int. J. Radiat. Biol.* 85, 539–573.
- Yang, L.P.H., Perry, C.M., 2011. Histamine dihydrochloride: in the management of acute myeloid leukaemia. *Drugs* 71, 109–122.
- Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L., Patiño, A., 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 28, 227–236.
- Zampeli, E., Tiligada, E., 2009. The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. *Br. J. Pharmacol.* 157, 24–33.

Anexos

8.1 Soluciones:

8.1.1 Medios de Cultivo:

Los medios de cultivo utilizados fueron RPMI 1640 y MEM Modificado a pH 7. La preparación de los medios de cultivo se realizó a partir de preparados de aminoácidos y vitaminas comerciales liofilizados, los cuales fueron diluidos en agua tridestilada estéril de alta calidad obtenida a partir de filtros Milli-Q Millipore. Posteriormente los medios fueron filtrados a través de dos membranas clarificantes. Seguidamente fueron filtrados a través de una membrana de retención bacteriana y, finalmente, a través de una membrana de 0.22 µm para retención viral. A continuación, los medios de cultivo fueron fraccionados en flujo laminar en alícuotas de 8 ml y 4 ml en frascos de 50 ml que luego fueron debidamente cerrados con tapones de goma estériles y finalmente precintados.

8.1.2 Colchicina:

Se prepararon soluciones madre de colchicina de concentración 0.1 mg/ml, las cuales fueron conservadas a 4°C en frascos ampolla debidamente cubiertos con papel de aluminio. Para la obtención de la solución de colchicina con concentración óptima para el trabajo con los cultivos, se efectuaron diluciones 1:10 en solución fisiológica destilada estéril (concentración 10 µg/ml).

8.1.3 Suero:

Se utilizó suero fetal bovino de marcas Natocor y Bioser, los cuales se encuentran en estado líquido y condiciones de esterilidad.

8.1.4 Antibióticos:

Fitohemaglutinina (FHA): marca Sigma. Fue diluida 1:25 en solución fisiológica estéril. La mitogenicidad de la misma fue evaluada adicionando a un cultivo de linfocitos 0.1 ml, 0.2 ml y 0.3 ml de dicha dilución por cada 10 ml de medio de cultivo. Una vez establecida la dilución de mayor poder mitogénico, ésta fue utilizada hasta finalizar el stock.

Penicilina-Estreptomicina: preparada partir de agua bidestilada en las siguientes concentraciones:

- Penicilina G (sódica) 104 µl/ml diluida en 100 ml de agua bidestilada.
- Estreptomicina 50 µg/ml diluida en 100 ml de agua bidestilada.

Posteriormente, fue fraccionada debidamente en alícuotas de 2 ml para ser utilizada en los cultivos.

8.1.5 Solución Hipotónica:

La solución hipotónica fue preparada a partir de 1 litro de agua tridestilada con concentración KCL 0,007 Molar.

8.1.6 Fijador:

Se utilizó fijador Carnoy, compuesto por Metanol (Cicarelli) y Ácido Acético glacial (Cicarelli) en proporción 3:1.

8.1.7 Bandas C:

HCl 0,2N	1,6 ml HCl/100 ml H ₂ O destilada
Solución Ba(OH)₂ 5%	2,5 g/50 ml H ₂ O bidestilada

Solución 2xSSC:

NaCl	17,53 g
Citrato de Na • 2H ₂ O	8,82 g
H ₂ O bidestilada	1 l

Solución Giemsa 2% en “Buffer” fosfato Sorensen M/15 (pH:7.1)

Solución A “Buffer” Sorensen	70 ml
Sol A: KH ₂ PO ₄	4,54 gr/500 ml H ₂ O bidestilada
Solución B “Buffer” Sorensen	30 ml
Sol B: Na ₂ HPO ₄	5,94 gr/500 ml H ₂ O bidestilada

8.1.8 Bandas C - Dapi:

HCl 0,2N	1,6 ml HCl/100 ml H ₂ O destilada
Solución Ba(OH)₂ 5%	2,5 gr/50 ml H ₂ O bidestilada

Buffer McIlvaine's (pH 7.0):

Ácido Cítrico	0,63 g
Na ₂ HPO ₄	6,19 g
H ₂ O destilada	500 ml

DAPI (solución stock):

DAPI	1 mg
H ₂ O destilada	5 ml

DAPI (solución de trabajo):

DAPI (s.c. stock).....	50 µl
Buffer McIlvaine's (pH 7.0)	15 ml

