

Alteraciones cromosómicas estructurales inducidas por bioflavonoides de la dieta en linfocitos de anemia de Fanconi

Structural Chromosomal Alterations Induced by Dietary Bioflavonoids in Fanconi Anemia Lymphocytes

Liliana Galeano*, Gonzalo Guevara*

Resumen

Introducción

La anemia de Fanconi es una enfermedad genética con herencia autosómica recesiva caracterizada por aplasia medular, predisposición a leucemia mieloide aguda, tumores sólidos y aumento en la inestabilidad cromosómica. Este síndrome puede considerarse como modelo biológico para analizar sustancias naturales con posible efecto genotóxico, difíciles de evaluar en células normales. Los objetivos de este estudio son describir y cuantificar las alteraciones cromosómicas estructurales inducidas por cinco flavonas, dos isoflavonas y una droga quimioterapéutica inhibidora de la topoisomerasa II, en cultivos de linfocitos de anemia de Fanconi a fin de determinar si existe un incremento en el número y tipo de daño cromosómico respecto al control.

Materiales y métodos

Se analizaron los cromosomas de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina M de una paciente con anemia de Fanconi. Se evaluaron 100 metafases de cada uno de los cultivos expuestos a las sustancias y control basal. Las alteraciones cromosómicas fueron documentadas con foto-

grafías convencionales y digitales mediante analizador de imágenes. Se utilizó la prueba de χ^2 para determinar diferencias significativas entre el daño cromosómico entre cultivos expuestos y no expuestos con un valor de $P < 0,05$.

Resultados

Se encontraron 431 alteraciones cromosómicas en 1000 metafases analizadas; la genisteína tuvo el mayor efecto genotóxico, seguida de la genistina, fisetina, kaenferol, quercetina, baicaleína y miricetina. Las anomalías más frecuentes fueron las rupturas cromatídicas, rupturas cromosómicas, brechas (gaps) cromatídicas y cromosómicas, intercambios cuadri-radiales, cromosomas dicéntricos y rearrreglos complejos.

Conclusión

Los bioflavonoides genisteína, genistina y fisetina, presentes comúnmente en la dieta, aumentaron el número de alteraciones cromosómicas de

Recibido: abril 25 de 2007

Aprobado: junio 1 de 2007

*Instituto Nacional de Cancerología ESE.

Grupo de Genética y Oncología Molecular.

Correo electrónico: bumorchis@yahoo.es

manera significativa respecto al control en linfocitos de anemia de Fanconi.

Palabras clave: anemia de Fanconi, alteraciones cromosómicas, bioflavonoides, topoisomerasa II.

Summary

Introduction

Fanconi anemia is an autosomal recessive disease characterized by a variety of congenital abnormalities, progressive bone marrow failure, increased chromosomal instability and higher risk to acute myeloid leukemia, solid tumors. This entity can be considered an appropriate biological model to analyze natural substances with possible genotoxic effect. The aims of this study were to describe and quantify structural chromosomal aberrations induced by 5 flavones, 2 isoflavones and a topoisomerase II chemotherapeutic inhibitor in Fanconi anemia lymphocytes in order to determine chromosomal numbers changes and/or type of chromosomal damage.

Materials and methods

Chromosomes stimulated by phytohaemagglutinin M, from Fanconi anemia lymphocytes, were analysed by conventional cytogenetic culture. For each chemical substance and controls,

one hundred metaphases were evaluated. Chromosomal alterations were documented by photography and imaging analyzer. To statistical analysis was used chi square test to identify significant differences between frequencies of chromosomal damage of basal and exposed cell cultured a *P* value less than 0.05.

Results

There were 431 chromosomal alterations in 1000 metaphases analysed; genistein was the more genotoxic bioflavonoid, followed in descending order by genistin, fisetin, kaempferol, quercetin, baicalein and miricetin. Chromosomal aberrations observed were: chromatid breaks, chromosomal breaks, chromatid and chromosomal gaps, quadriraterials exchanges, dicentric chromosome and complex rearrangements.

Conclusion

Bioflavonoids as genistein, genistin and fisetin, which are commonly present in the human diet, showed statistical significance in the number of chromosomal aberrations in Fanconi anemia lymphocytes, regarding the basal damage.

Key words: Fanconi Anemia, Chromosomal Alterations, Bioflavonoids, Topoisomerase II.

Introducción

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad genética con herencia autosómica recesiva (1) o ligada al sexo (2). Las principales características fenotípicas son aplasia medular progresiva, aumento en la inestabilidad cromosómica y predisposición a leucemia mieloide aguda y tumores sólidos (1-8).

La AF se presenta con baja frecuencia entre la población; se asocia con baja estatura, anomalías

esqueléticas en antebrazos, dedos, cadera y rodillas, malformaciones renales y coardiácas, manchas cutáneas "café con leche", microcefalia, retraso mental e hipogonadismo en varones (3-6).

Según los estudios de Kutler y col. (4), el promedio de vida de estos pacientes es de veinticuatro años, la probabilidad de desarrollar tumores sólidos a los cuarenta años es del 28% y la prevalencia de la aplasia medular es del 80%. Entre los tumores desarrollados, el 60% son hematoló-

gicos y entre los no hematológicos el más frecuente es el carcinoma de células escamosas. Hay que destacar que la expresividad es variable y que los síntomas no se presentan en todos los casos, por lo que el diagnóstico basado solo en la clínica no es completamente fiable; sin embargo, la inestabilidad cromosómica es constante, motivo por el cual se utiliza como método diagnóstico el ensayo citogenético de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica tras la exposición a mitomicina C (MMC) o diepoxibutano (DEB), a cuyos efectos son hipersensibles (2-5).

La AF es una enfermedad con heterogeneidad clínica y genética con al menos once genes diferentes involucrados que dan nombre a los grupos de complementación (tabla 1). No todos han sido clonados y caracterizados, y poco se sabe de sus funciones (9). Ninguno de ellos muestra homología con otras especies o con otros del genoma humano, excepto *FANG*, idéntico a *XRCC9* en el hámster, comprometido con la hipersensibilidad a los agentes inductores de enlaces cruzados (lesiones en el ADN) (10).

Aunque se desconoce el modo preciso en que las proteínas AF actúan, las evidencias muestran que el fenotipo de la AF es consecuencia de los defectos en la reparación del ADN (11-13). El gen más afectado es *FANCA* (tabla 1) debido a mutaciones que en su mayoría son grandes deleciones, favorecidas por recombinaciones sobre secuencias Alu (14, 15).

Uno de los hallazgos más importantes en los últimos años ha sido el descubrimiento que *FANCD1* es idéntico a *BRCA2* (16, 17), reforzando el concepto de que el defecto en la reparación de las dobles rupturas de ADN es crítico en la inestabilidad genómica y tumorigénesis presentes en la AF (18, 19).

La topoisomerasa II es una enzima nuclear que interviene en procesos de segregación cromosómica, recombinación, condensación y disyunción de cromátides hermanas; adicionalmente, relaja el estado topológico del ADN mediante cortes y religamientos de la doble cadena. Los inhibidores de topoisomerasa II actúan formando un complejo covalente intermediario entre la enzima y el ADN, inhibiendo su función y, en consecuencia, induciendo daño citotóxico (20-22). La droga más reconocida de este grupo es el etopósido, que se usa como agente terapéutico en tumores malignos (23-26).

Estudios recientes han considerado los bioflavonoides como inhibidores naturales de la topoisomerasa II (27). Estas sustancias se encuentran de forma ubicua en las flores y frutos de plantas, donde se han identificado más de 4000 variedades de los siguientes grupos: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonoles y flavanoles (27-30).

Dado que en la anemia de Fanconi se presenta un aumento en la inestabilidad cromosómica, secundario a las deficiencias en la maquinaria de reparación de las rupturas del ADN, esta enfermedad podría ser utilizada como modelo biológico para analizar sustancias con posible potencial genotóxico y difíciles de evaluar en células normales.

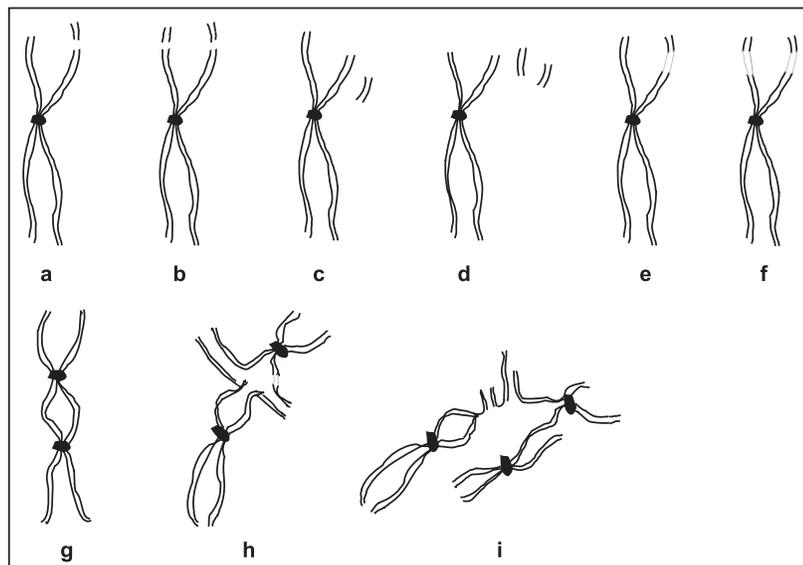
Este artículo pretende describir y cuantificar, mediante análisis citogenético convencional, las aberraciones cromosómicas estructurales (figura 1) inducidas en linfocitos, provenientes de un paciente con AF, por siete inhibidores naturales de topoisomerasa II: cinco flavonas (baicaleína, miricetina, quercetina, fisetina, kaenferol) y dos isoflavonas (genisteína y genistina), con el objetivo de determinar si estas sustancias aumentan el número y tipo de daño cromosómico con respecto al control.

Tabla 1. Genes involucrados en AF, localización, tamaño y prevalencia de cada uno de ellos

Gen	Localización	Número de exones	Aminoácidos	Prevalencia
FANCA	16q24.3	43	1455	66%
FANCB	Xp22.31	10	859	<1%
FANCC	9q22.3	14	558	12%
FANCD1/BRCA 2	13q12	27	3418	<1%
FANCD2	3p25.3	44	1451	<1%
FANCE	6p21.3	10	536	4%
FANCF	11p15	1	374	4%
FANG	9q13	14	622	12%
FANCI	ND	ND	ND	<1%
FANCI	ND	ND	ND	<1%
FANCL	2p16.1	14	375	<1%

ND: No definido

Figura 1. Alteraciones cromosómicas estructurales



a) Ruptura cromatídica con fragmento acéntrico alineado. b) ruptura cromosómica con fragmento acéntrico alineado. c) Ruptura cromatídica con fragmento acéntrico desplazado. d) Ruptura cromosómica con fragmentos acéntricos desplazados. e) Lesión acromática o gap cromatídico. f) Lesión acromática o gap cromosómico. g) Cromosoma dicéntrico. h) Intercambio quadri-radial. i) Rearreglo complejo (31-32).

Metodología

Se analizó una paciente con diagnóstico clínico de anemia de Fanconi y prueba de sensibilidad citogenética a mitomicina C. Se extrajeron 20 mL de sangre venosa periférica en tubos con heparina y se utilizaron 2 mL por cada exposición a 200 mM de los bioflavonoides, dimetilsulfóxido (DMSO, diluyente) (32) y a 0,017 mM de etopósido como control positivo (induce aproximadamente 10% de aberraciones cromosómicas en células normales) (31, 32) durante dos horas.

A continuación se hicieron cultivos adicionando 3,5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (enriquecido con L-glutamina), 1,5 mL de suero bovino fetal y 0,2 mL de fitohemaglutinina M. Después de 72 horas de incubación a 37 °C, se hizo la extracción de metafases agregando 0,1 mL de colcemid por cada mL de cultivo y resuspensión de las células en una solución hipotónica de cloruro de sodio (0,075 M). Una vez lavado el material cromosómico con una solución fijadora (metanol/ácido acético), se extendió sobre láminas de vidrio para la coloración con una solución de quinacrina al 0,5% (bandas Q).

Por último, se analizaron por cada ensayo 100 metafases en un microscopio con lámpara de fluorescencia y la observación de dos evaluadores independientes. Todas las aberraciones se documentaron mediante fotografías convencionales y digitales.

Se utilizó la prueba de χ^2 (statistix 7.0) para determinar diferencias significativas de las frecuencias del número y tipo de aberraciones cromosómicas entre los cultivos celulares expuestos a bioflavonoides y controles, con $P < 0,05$.

Resultados

El grupo de bioflavonoides conformado por genisteína, genistina y fisetina indujeron de

manera significativa un número mayor de alteraciones respecto al grupo de quercetina, baicaleína y miricetina, que no se diferenció respecto al control basal y exposición a DMSO (figura 2 y tabla 2). En general, todos los compuestos causaron rupturas cromatídicas; fisetina fue el bioflavonoide que las indujo con mayor frecuencia. En menor frecuencia se dieron las brechas cromosómicas y cromatídicas, reordenamientos complejos, intercambios cuadri-radiales y cromosomas dicéntricos (tabla 2).

Con respecto al control basal, la frecuencia de alteraciones cromosómicas aumentó con diferencias significativas en los cultivos celulares expuestos a genisteína (62%), genistina (56%), fisetina (55%) y kaenferol (46%). No hubo diferencias significativas entre el daño cromosómico basal y el inducido por DMSO, indicando que el diluyente no influyó en el aumento de las alteraciones cromosómicas.

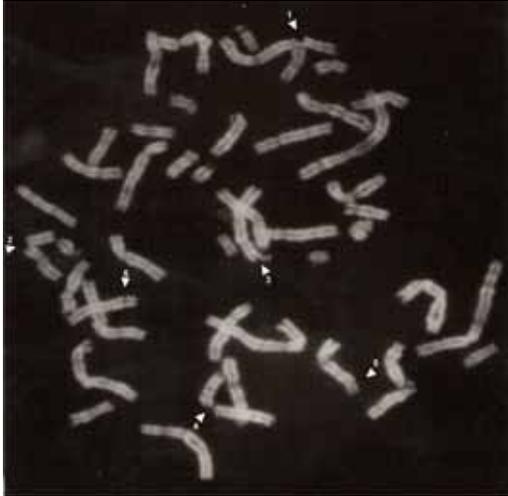
El etopósido no mostró diferencias significativas en la inducción de anomalías cromosómicas, comparado con las provocadas por genisteína, genistina, fisetina, baicaleína y kaenferol (tabla 2 y 3).

Las figuras 3-6 muestran ejemplos de alteraciones cromosómicas observadas con mayor frecuencia en el control basal y expuestos a bioflavonoides.

Discusión

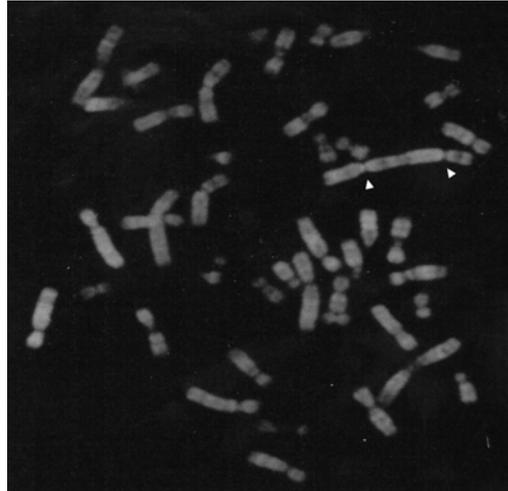
El mantenimiento de la estabilidad genética requiere de una serie de mecanismos complejos que involucra señalización y detención del ciclo celular hasta que la lesión sea reparada, o inducción a la apoptosis cuando este daño es irreversible. El daño en alguno de los genes involucrados en estas rutas conduce a la inestabilidad genética y a enfermedades que predisponen al cáncer.

Figura 3. Metafase del cultivo celular expuesto a genistina



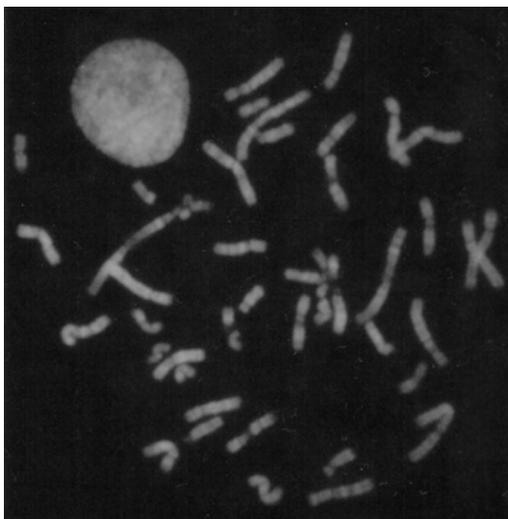
1) Ruptura cromatídica con fragmento acéntrico alineado. 2) Ruptura cromatídica con fragmento acéntrico desplazado. 3 y 4) Rupturas cromosómicas con fragmentos acéntricos desplazados. 5) "Gap cromatídico". 6) "Gap cromosómico".

Figura 4. Metafase del cultivo celular basal



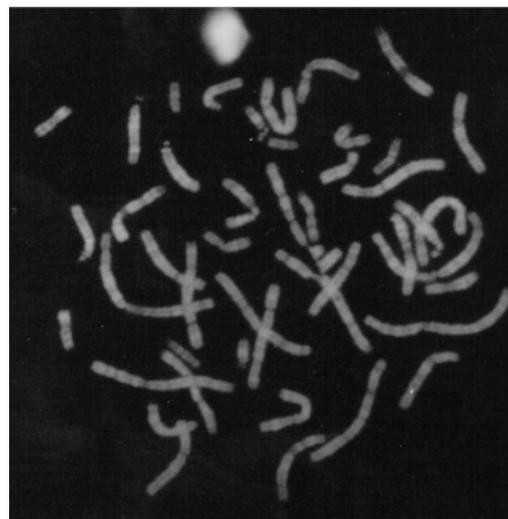
Cromosoma dicéntrico.

Figura 5. Metafase del cultivo celular expuesto a baicaleína



Intercambio cuadrirradial.

Figura 6. Metafase del cultivo celular expuesto a genisteína



Rearreglo complejo.

La AF se produce por mutaciones en cualquiera de los genes FANC (tabla 1) que conlleven inestabilidad genómica y predisposición a cáncer, principalmente leucemias. La deficiencia en la reparación del ADN se manifiesta por el aumento en el número de rupturas cromosómicas tanto espontáneas como después del tratamiento con mutágenos específicos. Hasta el momento existe una discusión sobre si los bioflavonoides son genotóxicos y carcinógenos, dado su débil acción sobre el ADN. En este sentido, la AF podría proporcionar un sistema más sensible para evaluar estos compuestos. Con base en dicho supuesto se realizó la investigación presentada en este artículo.

La escasa literatura que se refiere a la genotoxicidad de los bioflavonoides sugiere que las isoflavonas, como genisteína y genistina, son los más potentes. Esto concuerda con los resultados mostrados aquí sobre las células de anemia de Fanconi. Otra observación importante se relaciona con que la baicaleína, aunque indujo el mayor número de rearrreglos complejos, perteneció al subgrupo de menor daño cromosómico. Esto podría indicar que el tipo de daño, además de la dosis, depende de la subclase de bioflavonoide. Este mismo resultado lo hemos encontrado en células normales expuestas a baicaleína.

El uso de las células de anemia de Fanconi facilita la magnificación de la acción de los genotóxicos, sin que esto indique que la intensidad y el tipo de daño ocurran de igual manera en células normales que posean una maquinaria de reparación eficiente; sin embargo, no todos los individuos en una población tienen la misma eficiencia reparativa y ante prolongadas exposiciones, como sucede en la dieta, en individuos susceptibles podrían generarse dichos rearrreglos. Por el contrario, los compuestos que no induzcan incrementos en los rearrreglos cromosómicos en

células de anemia de Fanconi seguramente no lo harán en células normales.

Aunque las dosis empleadas en los ensayos son altas respecto al consumo diario de un individuo normal, el modelo de la anemia de Fanconi podría facilitar el análisis de dosis respuesta y posibles efectos de las concentraciones fisiológicas.

Es claro que la mayoría de bioflavonoides con acción genotóxica actúan a través de la inhibición de la topoisomerasa II, similar al etopósido. In vitro se ha demostrado que algunas flavonas e isoflavonas tienen la capacidad de romper el gen *MLL* en los mismos puntos donde lo hace el etopósido (27), relacionando de esta manera su posible responsabilidad en las traslocaciones que involucran este gen.

En conclusión, se requiere llevar a cabo más investigaciones en este sentido para confirmar que las células de anemia de Fanconi se pueden utilizar en la evaluación genotóxica. Además, este artículo demostró las bondades de este modelo empleando los bioflavonoides como débiles inductores de daño citogenético.

Tabla 2. Descripción del tipo y número de alteraciones cromosómicas del cultivo celular control y expuestos

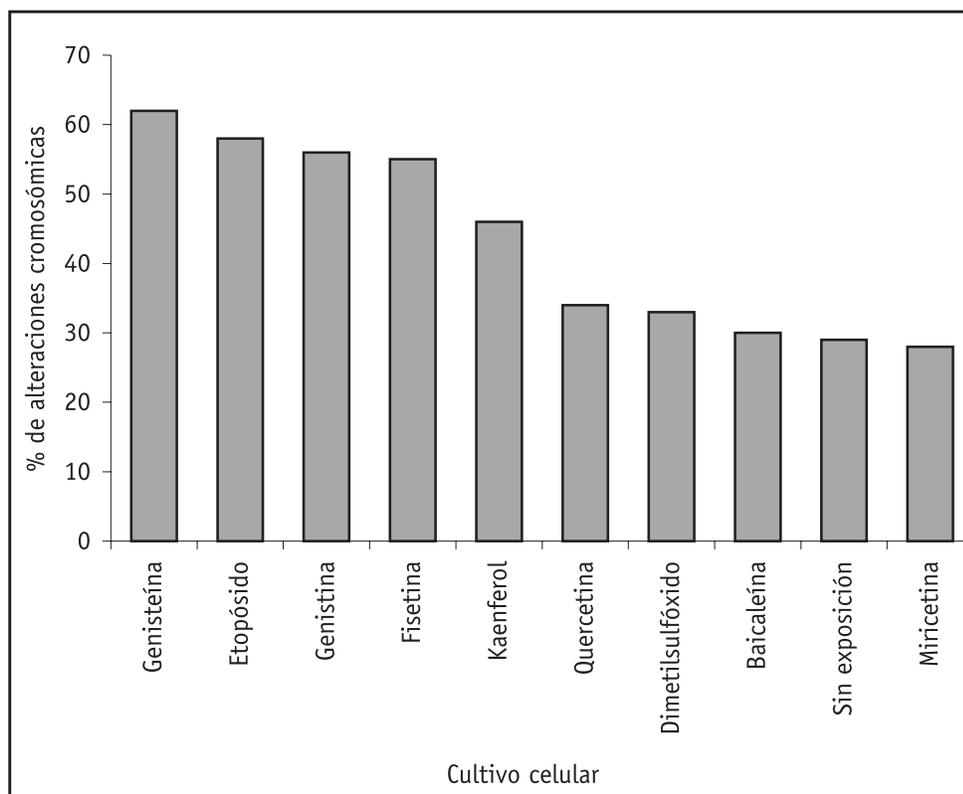
Tratamiento	Tipos de aberraciones cromosómicas										Total
	Ruptura cromatídica	Ruptura cromosómica	Brecha (gap) cromatídico	Brecha (gap) cromosómico	Intercambio cuadrirradial	Cromosoma	Rearreglos				
Control (basal)	10	8	7	2	0	1	1				29
Dimetilsulfóxido	20	8	3	2	0	0	0				33
Etopósido	22	18	14	3	0	1	0				58
Baicaleína	12	9	1	2	2	0	4				30
Quercetina	12	10	9	2	1	0	0				34
Kaenferol	21	13	5	7	0	0	0				46
Miricetina	15	5	5	3	0	0	0				28
Genisteína	26	14	7	14	1	0	0				62
Genistina	25	16	5	9	0	0	1				56
Fisetina	35	9	0	8	1	0	2				55
Total	198	110	56	52	5	2	8				431

Tabla 3. Comparación entre las sustancias respecto al número de alteraciones cromosómicas

Tratamiento	Control	Dimetilsulfóxido	Etopósido	Baicaleína	Quercetina	Kaenferol	Miricetina	Genisteína	Genistina	Fisetina
Control		0.5408	0.0000	0.8768	0.4466	0.0130	0.8755	0.0000	0.0001	0.0002
Dimetilsulfóxido			0.0004	0.6479	0.8809	0.0601	0.4425	0.0000	0.0011	0.0017
Etopósido				0.6687	0.0007	0.0894	0.0000	0.5637	0.7751	0.6687
Baicaleína					0.5443	0.0198	0.7553	0.0000	0.0002	0.0003
Quercetina						0.0833	0.3590	0.0001	0.0018	0.0028
Kaenferol							0.0084	0.0232	0.1572	0.2031
Miricetina								0.0000	0.0001	0.0001
Genisteína									0.3883	0.3151
Genistina										0.8869
Fisetina										

Los valores de P que aparecen sombreados en el recuadro indican diferencias significativas entre sustancias y control (basal).

Figura 2. Porcentaje de alteraciones cromosómicas de cada cultivo celular



Referencias

1. Dokal I. The genetics of Fanconi's anaemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000; 13(3): 407-25.
2. Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, *et ál.* X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 2004; 36(11): 1142-3.
3. Tischkowitz MD, Hodgson SV. Fanconi anaemia. *J Med Genet* 2003; 40:1-10.
4. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, *et ál.* A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 2003; 101: 1249-56.
5. D'Andrea AD, Grompe M. Molecular Biology of Fanconi Anemia: Implications for Diagnosis and Therapy. *Blood* 1997; 90: 1725-36.
6. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* 2003; 101: 822-26.
7. Tönnies H, Huber S, Köhl J-S, Gerlach A, Ebell W, Neitzel H. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood* 2003; 101: 3872-74.

8. D'Andrea AD. The Fanconi road to cancer. *Genes & Development* 2003; 17: 1933-36.
9. Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool N, Oostra AB, Mathew C, *et ál.* Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* 2004; 103: 2498-2503.
10. De Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, van Berkel CG, Bosnoyan-Collins L, Alon N, *et ál.* The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet* 1998; 20: 281-3.
11. Grompe M, D'Andrea AD. Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2253-59.
12. Woods CG. DNA repair disorders. *Arch Dis Child* 1998; 78: 178-184.
13. Buchwald M, Moustacchi E. Is Fanconi anemia caused by a defect in the processing of DNA damage? *Mutat Res* 1998; 408(2): 75-90.
14. Wijker M, Morgan NV, Herterich S, van Berkel CG, Tipping AJ, Gross HJ, *et ál.* Heterogeneous spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group A gene. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 52-9.
15. Levran O, Erlich T, Magdalena N, Gregory JJ, Batish SD, Verlander PC, *et ál.* Sequence variation in the Fanconi anemia gene FAA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13051-6.
16. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, *et ál.* Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 2002; 297: 606-9.
17. Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P, *et ál.* Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood* 2005; 105: 1329-36.
18. Mondovits B, Vermylen C, Brichard B, Cornu G. Fanconi's anemia and molecular biology research. *Arch Pediatr* 2001; 8: 853-60.
19. Tamary H, Bar-Yam R, Zemach M, Dgany O, Shalmon L, Yaniv I. The molecular biology of Fanconi anemia. *Isr Med Assoc J* 2002; 4(10): 819-23.
20. Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 1985; 54: 665-97.
21. Chen CL, Liu L. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994; 84: 191-218.
22. Liu L, Liu C-C, Alberts B. Type DNA topoisomerase: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell* 1980; 19: 697-707.
23. Hande KR. Etoposide pharmacology. *Semin Oncol* 1992; 19: 3-9.
24. Slevin ML. The clinical pharmacology of etoposide. *Cancer* 1991; 67: 319-29.
25. Maraschin J, Dutrillaux B, Aurias A. Chromosome aberrations induced by etoposide (VP-16) are not random. *Int J Cancer* 1990; 46: 808-12.
26. Corbett AH, Osheroff N. When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chem Res Toxicol* 1993; 6: 585-97.
27. Strick R, Strissel PL, boges S, Smith SL, Rowley JD. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4790-95.
28. Ross JA. Maternal diet and infant leukemia: a role for DNA topoisomerase II inhibitors? *Int J Cancer* 1998; 11: 26-28.
29. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 673-751.

30. Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, *et ál.* Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 2002; 504: 17-36.
31. Guevara G, Galeano L, Flórez A. Evaluación genotóxica del etopósido (VP-16) en cultivos celulares estimulados con fitohemaglutinina. *Revista Colombiana de Cancerología* 2002; 6: 23-32.
32. Galeano L. Localización y cuantificación del daño cromosómico inducido por inhibidores naturales de topoisomerasa II (bioflavonoides): apigenina, baicaleína, fisetina, genisteína, genistina, kaenferol, luteolina, miricetina y quercetina en linfocitos humanos. [tesis de maestría]. Bogotá: Universidad de los Andes; 2003.