

Universidad de Sevilla
Departamento de Biología Celular

**MODULACIÓN DEL DAÑO CROMOSÓMICO PRODUCIDO POR
DIFERENTES AGENTES INDUCTORES DE ROTURAS DE
DOBLE CADENA EN EL ADN**

María José Flores Sanabria
Tesis Doctoral
1998

TD
240

TD-381



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Modulación del daño cromosómico producido por diferentes agentes inductores de roturas de doble cadena en el ADN sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado: ^{MA} José Flores Samabria

Sevilla, a 12 de Febrero de 1998

LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
21 NOV. 1997
ENTRADA N.º 128

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrado con Dpto. T. nº
al nº 23 número 139 del libro
correspondiente.

Sevilla, 20 NOV. 1997
El Jefe del Negociado de Teatr.

Pereza Raffello

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Dpto. de Biología Celular
Facultad de Biología

10-12-97
21-11-97

10 de Diciembre de 1997

SECRETARÍA DE

[Handwritten signature]



R. 15994



MODULACIÓN DEL DAÑO CROMOSÓMICO PRODUCIDO POR DIFERENTES AGENTES INDUCTORES DE ROTURAS DE DOBLE CADENA EN EL ADN

Trabajo realizado en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctora en Biología por la Licenciada

María José Flores Sanabria

Sevilla, 1998

Directores

*Dr. Felipe Cortés Benavides
Catedrático de Biología Celular
Universidad de Sevilla*

*Dra. Trinidad Ortiz Sallés
Profesora Titular de Biología Celular
Universidad de Sevilla*

A mis padres

A Paco

Esta tesis ha contado con el apoyo de muchas personas y no quisiera dejar de expresarles mi más sincero agradecimiento:

A los Doctores *Felipe Cortés* y *Trinidad Ortiz* por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por la orientación y formación científica de ellos recibidas y por la ayuda que en todo momento me han prestado.

Al Dr. *Joaquín Piñero* por su ayuda con los micronúcleos y los ordenadores.

Al Dr. *Juan Carlos Mateos*, por esas tardes “aceleradas” sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible y sin cuya presencia, la irradiación de las células hubiera sido mucho menos agradable. A los responsables del *Centro Regional de Oncología “Duques del Infantado”*, quienes facilitaron los medios necesarios para ello.

A *Francisco, Alfredo y Tarik* por su ayuda desinteresada para extraer la sangre a las vacas y conejos.

Al Dr. *Gregorio García*, Director del Departamento, por su ayuda con el “odioso” papeleo.

A *Manoli* por su sincera amistad, por ser tan calurosa en invierno y en verano, por las discusiones metafísicas de los últimos meses sobre “error estándar” sí o no... y por su espíritu crítico (aunque a veces pueda confundirse con ganas de llevar la contraria).

A *Manolo “el pelao”* por su gran amistad a lo largo de estos años y los muchos momentos que pasamos juntos durante estos años, por aquellos sábados en el campo y por las cenas en la venta “Chiquitín”.

A *Nuria, Inma y M^a Ángeles* por ser tan buenas compañeras de laboratorio estos años.

A *Paula* por enseñarme que el “morao” es bonito y por los viernes de copitas y tapas con Alberto y Pepe.

A *M^a Paz* por su sincera amistad y por saber encontrar todos los puntos y las comas, éstos que nadie ve.

A *David* por alegrar el laboratorio y por su ayuda en la corrección de la tesis.

A *mis padres* por haberme aguantado tantos años y haberme dado la oportunidad de llegar hasta aquí.

A *Paco*, en especial, por haber estado siempre a mi lado confiando en mí más que yo misma y por ese regalo de reyes tan especial. Sin olvidar su inestimable ayuda en la confección y corrección del manuscrito (infinita paciencia...).

Quiero dar las gracias también a todos mis compañeros del Departamento de Biología Celular por los buenos momentos que hemos disfrutado juntos y a todas aquellas personas, a las que no he nombrado y que de una u otra manera, me ayudaron en la realización de este trabajo.

Este trabajo se ha realizado gracias a la concesión de una beca predoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia para la formación de personal investigador, así como a los fondos para investigación recibidos de la Unión Europea (FI3P-CT92-0031 y FI4P-CT95-0001), de la DGICYT (PB93-0734 y CE93-0006), del Ministerio de Educación y Cultura (UE96-0034) y de la Junta de Andalucía (PAI).

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA RADIACIÓN IONIZANTE	2
1.1.1. Efectos biológicos de la radiación ionizante	2
1.1.2. Lesiones producidas por la radiación ionizante	4
1.2. AGENTES QUÍMICOS RADIOMIMÉTICOS: BLEOMICINA	5
1.2.1. Estructura de la bleomicina	6
1.2.2. Incorporación de la bleomicina en la célula	7
1.2.3. Modo de acción y lesiones producidas por la bleomicina	7
1.2.4. Efectos citológicos de la bleomicina	9
1.3. MECANISMOS DE DEFENSA CELULAR FRENTE AL DAÑO EN EL ADN	10
1.3.1. Reparación del ADN	10
1.3.1.1. <i>Reparación de las roturas de cadena simple</i>	11
1.3.1.2. <i>Reparación de las roturas de doble cadena</i>	12
1.3.2. Ligasas de ADN	15
1.3.2.1. <i>Ligasas procarióticas</i>	17
1.3.2.2. <i>Ligasas eucarióticas</i>	18
a. <i>Ligasa I</i>	19
b. <i>Ligasa II</i>	19
c. <i>Ligasa III</i>	20

<i>d. Ligasa IV</i>	20
1.4. MODULACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN	21
1.4.1. La respuesta adaptativa	21
<i>1.4.1.1. La respuesta adaptativa en procariotas</i>	22
<i>1.4.1.2. La respuesta adaptativa en eucariotas</i>	23
<i>a. Características generales de la respuesta adaptativa</i>	23
<i>b. Inducción de la respuesta adaptativa</i>	24
<i>c. Influencia del ciclo celular y vida media de la respuesta adaptativa</i>	25
<i>d. Mecanismo de la respuesta adaptativa</i>	26
1.4.2. Modulación del daño en el ADN con enzimas de reparación	27
1.5. OBJETIVOS	30
2. MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.1. MATERIAL EXPERIMENTAL	32
2.2. CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO	32
2.2.1. Linfocitos humanos, bovinos y de conejo	32
2.2.2. Fibroblastos de ovario de hámster chino (CHO6)	32
2.3. ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DEL DAÑO EN EL ADN	33
2.3.1. Ensayo de aberraciones cromosómicas	33
2.3.2. Ensayo de micronúcleos	34
2.3.3. Electroforesis de células aisladas en gel de agarosa (SCGE) o “ensayo del cometa”	35
2.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	36
2.4.1. Respuesta adaptativa a los rayos X	36

2.4.1.1. Linfocitos humanos en G_0	36
<i>a. Tratamiento condicionante</i>	37
<i>b. Tratamiento de prueba</i>	37
2.4.1.2. Linfocitos bovinos y de conejo estimulados	38
<i>a. Tratamiento condicionante</i>	38
<i>b. Tratamiento de prueba</i>	38
2.4.1.3. Obtención de células binucleadas, fijación y tinción	39
2.4.2. Modulación del daño inducido por bleomicina con ligasa del fago T4	40
2.4.2.1. Electroporación	40
2.4.2.2. Modulación del daño en fibroblastos de hámster chino	40
<i>a. Estudio dosimétrico de la bleomicina</i>	41
<i>b. Tratamientos</i>	41
<i>c. Obtención de colonias, fijación y tinción</i>	42
<i>d. Obtención de metafases, fijación y tinción</i>	43
2.4.2.3. Modulación del daño en linfocitos humanos en G_0	44
<i>a. Aislamiento de los linfocitos</i>	44
<i>b. Estudio dosimétrico de la bleomicina</i>	45
<i>c. Tratamientos</i>	45
<i>d. Obtención de los cometas, tinción y análisis</i>	45
2.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	47
2.5.1. Linfocitos	47
2.5.2. Fibroblastos	47
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.1. RESPUESTA ADAPTATIVA A LOS RAYOS X	48
3.1.1. Respuesta adaptativa en linfocitos humanos en G_0	50

3.1.2. Respuesta adaptativa en linfocitos bovinos y de conejo estimulados	58
3.1.3. Consideraciones generales	62
3.2. MODULACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR BLEOMICINA CON LIGASA DEL FAGO T4	65
3.2.1. Fibroblastos de ovario de hámster chino	66
<i>3.2.1.1. Estudio dosimétrico del efecto de la bleomicina sobre la supervivencia celular</i>	66
<i>3.2.1.2. Efecto de la ligasa de T4 sobre las aberraciones cromosómicas inducidas por bleomicina</i>	68
<i>3.2.1.3. Efecto de la ligasa de T4 sobre la capacidad de la bleomicina en la inducción de muerte celular</i>	73
3.2.2. Linfocitos humanos en G₀	76
3.2.3. Consideraciones generales	81
4. CONCLUSIONES	85
5. BIBLIOGRAFÍA	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales tipos de lesiones producidas en el ADN por la radiación ionizante y drogas genotóxicas	1
Figura 2. Radiolisis del agua	3
Figura 3. Estructura de la bleomicina	6
Figura 4. Activación de la bleomicina	8
Figura 5. Modo de acción de la bleomicina	9
Figura 6. Mecanismos de reparación del ADN	11
Figura 7. Reunión directa de una rotura de cadena simple	12
Figura 8. Modelos propuestos para la reparación por recombinación de las roturas de doble cadena	13
Figura 9. Posibles funciones de la quinasa dependiente de ADN (DNA-PK) en la reparación de las roturas de doble cadena	15
Figura 10. Reunión de extremos libres catalizada por las ligasas de ADN	16
Figura 11. Tipos de aberraciones observadas en este trabajo	33
Figura 12. Origen de los micronúcleos	34
Figura 13. Aspecto de los núcleos tras el ensayo del cometa	36
Figura 14. Linfocitos bloqueados en citocinesis por efecto de la citocalasina B	51
Figura 15. Protocolo experimental para estudiar la respuesta adaptativa en linfocitos humanos condicionados en G ₀ con H ₂ O ₂	52
Figura 16. Protocolo experimental para estudiar la respuesta adaptativa en linfocitos humanos condicionados en G ₀ con una dosis baja de rayos X	55
Figura 17. Protocolo experimental para estudiar la respuesta adaptativa en linfocitos bovinos y de conejo condicionados con H ₂ O ₂	59
Figura 18. Protocolo experimental para estudiar el efecto de la bleomicina en la supervivencia de la línea CHO6	67
Figura 19. Efecto de la bleomicina en la supervivencia celular	68
Figura 20. Protocolos experimentales para observar la posible modulación del efecto de la bleomicina con la ligasa del fago T4 en la línea celular CHO6	69

Figura 21. Células metafásicas de la línea CHO6 tratadas con bleomicina, donde se muestran distintos tipos de aberraciones	72
Figura 22. Efecto del tratamiento simultáneo con bleomicina y ligasa en la supervivencia celular de la línea CHO6	75
Figura 23. Protocolo experimental para observar la modulación del efecto de la bleomicina con ligasa de T4 en linfocitos humanos en G ₀	76
Figura 24. Estudio dosimétrico de la bleomicina con el ensayo del cometa	77
Figura 25. Resultado del cometa en linfocitos humanos	78
Figura 26. Distribución de los momentos celulares de linfocitos en el ensayo del cometa	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Respuesta adaptativa en linfocitos humanos condicionados en G ₀ con 250 μ de H ₂ O ₂ a distintos tiempos antes de la estimulación	53
Tabla 2. Respuesta adaptativa en linfocitos humanos condicionados en G ₀ con 2 cGy de rayos X a distintas tasas de dosis antes de la estimulación	56
Tabla 3. Respuesta adaptativa en linfocitos bovinos condicionados con distintas dosis de H ₂ O ₂ 48 horas después de la estimulación	60
Tabla 4. Respuesta adaptativa en linfocitos de conejo condicionados con distintas dosis de H ₂ O ₂ 48 horas después de la estimulación	61
Tabla 5. Modulación del daño cromosómico inducido por bleomicina con ligasa del fago T4 en células CHO6 electroporadas y fijadas 19h (A) ó 22h (B) después	71
Tabla 6. Supervivencia celular de la línea CHO6 con diferentes controles de electroporación (EP)	74
Tabla 7. Análisis de los cometas en linfocitos humanos en G ₀ electroporados con bleomicina y ligasa	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AP:	Sitios abásicos (“Apurinic/Apyrimidinic sites”)
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
ATP:	Trifosfato de adenosina (“Adenosine triphosphate”)
BLM:	Bleomicina
BrdU:	Bromodesoxiuridina
Cyt B:	Citocalasina B (“Cytochalasin B”)
dC:	Desoxicitidina
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA-PK:	Quinasa dependiente de ADN (“DNA-dependent protein kinase”)
EDTA:	Tetra-acetato de etilendiamina (“Ethylenediamine-tetraacetic Acid”)
Ep:	Eficiencia en placa
EP:	Electroporación
FdU:	Fluordesoxiuridina
FPG:	Tinción de fluorescencia mas Giemsa (“Fluorescence plus Giemsa”)
FS:	Fracción de supervivencia
[³ H]-TdR:	Timidina tritiada
LET:	Transferencia lineal de energía (“Linear energy transfer”)
LMDS:	Regiones con daño múltiple localizado (“Locally multiply damaged sites”)
MNNG:	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
NAD:	Dinucleótido de nicotinamida adenina (“Nicotinamide adenine dinucleotide”)
NMN:	Mononucleótido de nicotinamida (“Nicotinamide mononucleotide”)
PBS:	Solución salina fosfato (“Phosphate buffer saline”)
PHA:	Fitohemaglutinina (“Phytohemagglutinin”)
Pi:	Pirimidina
PPi:	Pirofosfato (“Pyrophosphate”)
rpm:	Revoluciones por minuto
SCGE:	Electroforesis de células aisladas (“Single-cell gel electrophoresis”)
UV:	Radiación Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La estructura primaria del ADN está sometida a constantes alteraciones químicas y de secuencia de los nucleótidos que amenazan su integridad, principalmente como consecuencia de errores introducidos durante la replicación, recombinación y reparación del mismo. Asimismo, determinadas condiciones de temperatura y pH pueden dar lugar a una cierta inestabilidad genómica. Igualmente, el ADN reacciona fácilmente con gran variedad de compuestos químicos y un menor número de agentes físicos, muchos de los cuales están presentes en el medio ambiente. Cada una de las modificaciones de la estructura molecular del material genético capaz de alterar el funcionamiento normal de la célula se considera como daño al ADN, y puede ser clasificado como daño endógeno o exógeno (figura 1).

<u>Agente</u>		<u>Lesión</u>
UV		Dímeros de pirimidina
Radiación ionizante		Roturas de cadena (dobles y simples)
Bleomicina		Alquilación de las guaninas
Agentes alquilantes		Enlace cruzado ADN-proteína
Alquilantes		Daño en las bases
Radiación ionizante		Enlace cruzado ADN-ADN
Cisplatino / alquilantes		Intercalación
Radiación ionizante		Rotura mediada por la topoII
Antraciclinas		Rotura mediada por la topoI
m-AMSA		
Camptotecina		

Figura 1. Principales tipos de lesiones producidas en el ADN por la radiación ionizante y drogas genotóxicas.

Los principales agentes endógenos que dañan el ADN suelen ser enzimas o los productos de las mismas, que dan lugar a despurinaciones, despirimidinaciones, daño en las bases, producción de aductos o roturas de cadena. Los agentes oxidantes se producen en la célula por distintos procesos asociados con el metabolismo aeróbico, por lo que el daño oxidativo parece ser el daño endógeno más significativo, con una frecuencia de 10^4 lesiones por célula y día en humanos. Por otro lado, el ADN también puede ser dañado por diferentes agentes exógenos físicos o químicos.

1.1. LA RADIACIÓN IONIZANTE

Entendemos por radiación todo agente físico que se propaga a través del espacio cediendo energía al medio que atraviesa. La radiación ionizante es aquella radiación que posee la propiedad de arrancar electrones de los átomos de las sustancias que atraviesa, formando iones y alterando así las propiedades físico-químicas del medio atravesado.

Existen dos tipos de radiaciones ionizantes, electromagnéticas y corpusculares. Dentro de las primeras se incluyen los rayos X, que liberan su energía en forma de fotones sin carga ni masa dando lugar a la formación de moléculas excitadas o ionizadas. La energía de los fotones se transmite por colisión, generalmente con electrones de otros átomos. Tras la colisión, un electrón puede pasar a un orbital más alejado del núcleo (excitación), o más comúnmente salir del átomo con alta velocidad y energía (ionización). Esta energía se disipa en el medio ionizando y excitando los átomos con los que interacciona.

De todas las biomoléculas que pueden ser dañadas por la radiación ionizante, la más importante es el ADN, ya que es portadora de la información genética y dirige la actividad celular. Las alteraciones producidas dependen de la dosis de radiación, la cual está relacionada con la transferencia lineal de energía (LET), que se define como la energía depositada por una partícula por distancia recorrida. Los rayos X y γ son radiaciones de baja LET por lo que depositan poca cantidad de energía a lo largo de su trayectoria, pero con suficiente energía cinética como para atravesar grandes distancias (alto poder de penetración). Por el contrario, las radiaciones de alta LET, como neutrones y partículas α , depositan grandes cantidades de energía en su trayectoria y atraviesan distancias más cortas. La efectividad de una dosis dada aumenta con la densidad de la ionización, es decir, con la LET.

1.1.1. Efectos biológicos de la radiación ionizante

La exposición de las células a la radiación ionizante provoca distintos fenómenos como consecuencia del daño en el ADN, de los cuales los más importantes son la inducción de mutaciones, la transformación y la muerte celular (Iliakis, 1991).

El daño en el ADN puede ser el resultado directo de la interacción de la radiación sobre los componentes del ADN, o bien ser producido indirectamente por la transferencia de energía

a través de especies reactivas formadas por la radiación. El agua es el principal constituyente de los sistemas biológicos, por lo que el efecto indirecto resulta, en gran parte, de la acción de la radiación sobre las moléculas de agua (Kiefer, 1990).

Cuando una molécula de agua absorbe la energía de la radiación ionizante se ioniza o se excita descomponiéndose rápidamente (figura 2). También se dan reacciones secundarias en las que se originan nuevos radicales libres y en las que se neutralizan otros. Los electrones liberados en la ionización del agua pueden reaccionar con otras moléculas de agua formándose electrones hidratados (e^-_{aq}), los cuales a su vez pueden reaccionar para dar lugar a nuevos radicales. Entre los principales productos formados se encuentran los radicales hidrógeno ($\cdot H$) e hidroxilo ($\cdot OH$), ambos con electrones desapareados y altamente reactivos. Cuando el oxígeno está presente reacciona con los electrones acuosos y los átomos de hidrógeno originando radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e hidroperóxido ($\cdot HO_2$), que son también muy inestables y reaccionan formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Reacciones primarias



Reacciones secundarias

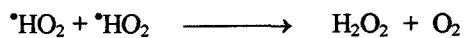
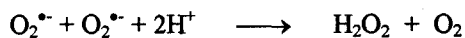
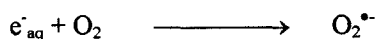
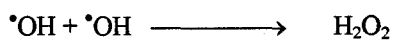
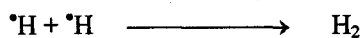
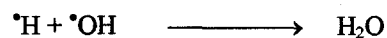
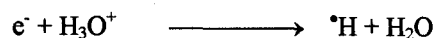
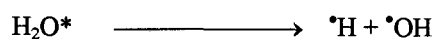
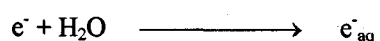
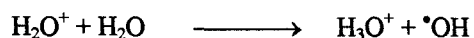


Figura 2. Radiolisis del agua.

La descomposición del H_2O_2 incrementa la producción de radicales hidroxilo ($\cdot OH$) que reaccionan también con especies no radicales, siendo los principales responsables del daño en el ADN. El radical hidroxilo es uno de los más reactivos en los sistemas biológicos, y es capaz

de reaccionar prácticamente con la totalidad de los componentes celulares (Davies, 1995). Como consecuencia, el ADN puede sufrir pérdida de bases (sitios abásicos), modificación de las mismas o alteraciones en la doble hélice. Las alteraciones en la doble hélice incluyen distorsiones de la misma, roturas de cadena (simple y doble) y enlaces cruzados (Halliwell y Aruoma, 1991). Se ha estimado que aproximadamente un 65% del daño se debe al ataque de los radicales hidroxilo frente a un 35% producido por la acción directa de la radiación (Ward, 1988).

1.1.2. Lesiones producidas por la radiación ionizante

La exposición a radiación ionizante da lugar a la formación de distintas lesiones en el ADN, como son daño en los azúcares (que normalmente terminan en roturas de cadena), daño en las bases y formación de enlaces cruzados (intracatenarios o con proteínas asociadas). Además, la radiación ionizante produce directamente roturas de cadena (simple y doble), la mayoría de las cuales se generan por la rotura de los enlaces fosfodiéster.

Las lesiones producidas por la radiación pueden originarse de forma aislada, o junto a otras lesiones del mismo o distinto tipo, dando lugar en este caso a lesiones complejas. Las lesiones complejas son causadas por un ataque radical múltiple localizado, que produce sitios con lesiones agrupadas (LMDS) tras una exposición a rayos X (Ward, 1988). Estas lesiones complejas representan para las células un problema más serio que las simples, ya que pueden ser irreparables o requerir mecanismos de reparación más complejos, como el de recombinación. Si estas lesiones no se reparan correctamente, pueden dar lugar a aberraciones cromosómicas, deleciones, amplificaciones, etc.

De las lesiones producidas por la radiación ionizante, la rotura de doble cadena es la principal responsable de la inducción de aberraciones cromosómicas y puede conducir a la muerte celular (Frankenberg-Schwager y Frankenberg, 1990; Obe y col., 1992).

Las roturas de doble cadena se pueden producir por la inducción de una rotura simple en cada cadena, bien de forma directa, o bien por la inducción de lesiones en las bases si su reparación implica la formación de roturas de cadena simple. Una combinación de los procesos anteriores también da lugar a una rotura de doble cadena. Es por tanto, en último término, el efecto al que conducen la mayoría de las lesiones directas en el ADN.

El mecanismo de formación de roturas de cadena simple está bien establecido, y se inicia con la formación de un radical en la desoxirribosa por pérdida de un átomo de hidrógeno (ya sea por ionización directa y pérdida del protón, o extraído por un radical hidroxilo). Este radical reacciona con el oxígeno formando un radical peroxil y una rotura (von Sonntag, 1987).

Se han propuesto dos mecanismos posibles por los que se originaría una rotura de doble cadena: ataque de un solo radical y ataque múltiple. Siddiqi y Bothe (1987) propusieron que un solo radical puede iniciar la formación de una rotura de doble cadena. El primer radical desoxirribosa formado por el ataque del radical hidroxilo (o por la ionización directa del azúcar) iniciaría una serie de reacciones para formar la segunda rotura. Por otra parte, según la hipótesis del ataque radical múltiple, la rotura de doble cadena se produciría por el ataque simultáneo de varios radicales. En la célula, debido a la alta concentración de secuestradores, los radicales recorren distancias de nanómetros, por lo que reaccionan muy cerca del sitio donde se forman, de forma que el daño se produciría por concentraciones de ionizaciones y excitaciones en el blanco o muy cerca del mismo (Ward, 1988). Para el mecanismo de un solo radical, las reacciones que forman las dos roturas de cadena se darían secuencialmente, mientras que en el del ataque múltiple se darían simultáneamente.

La mayoría de las roturas inducidas por la radiación ionizante se caracteriza por presentar extremos inusuales. Aunque la mayoría de los extremos 5' presenta un grupo fosfato, los extremos 3' no suelen presentar el grupo hidroxilo usual, sino un grupo fosfato o fosfoglicolato (Henner y col., 1982).

1.2. AGENTES QUÍMICOS RADIOMIMÉTICOS: BLEOMICINA

Se pueden clasificar como agentes radiomiméticos aquéllos que se comportan de manera similar a la radiación ionizante, induciendo lesiones de naturaleza parecida en el ADN. Son mutágenos con capacidad para inducir aberraciones sin necesidad de la replicación del ADN y actúan, por tanto, de manera S-independiente, igual que las radiaciones ionizantes.

La bleomicina es una droga antitumoral radiomimética (Umezawa y col., 1966) utilizada en quimioterapia y, debido al uso extensivo de la misma, su toxicidad genética tiene un significado práctico considerable. Los principales efectos de esta droga en el material genético

son la producción de aberraciones cromosómicas y la inhibición del crecimiento celular (Vig y Lewis, 1978); esta actividad citotóxica está asociada a su capacidad para unirse al ADN y romperlo en presencia de iones metálicos (Byrnes y col., 1990). Generalmente, las lesiones inducidas por la bleomicina son similares, en su naturaleza y forma de reparación, al daño producido por la radiación ionizante. De forma similar a la acción indirecta de la radiación ionizante, esta droga induce roturas en el ADN a través de la producción de radicales libres (Sausville y col., 1976).

1.2.1. Estructura de la bleomicina

La bleomicina es un glicopéptido aislado de *Streptomyces verticillus* que contiene varios aminoácidos y azúcares poco frecuentes y un grupo amino terminal que varía en los distintos análogos. La molécula tiene dos componentes estructurales principales (figura 3), un componente bitiazol, que se intercala parcialmente en la hélice de ADN separando las cadenas, y unas estructuras pirimidínica e imidazólica, que son responsables de la activación dioxigénica y de la unión al metal (Sugiura y col., 1983).

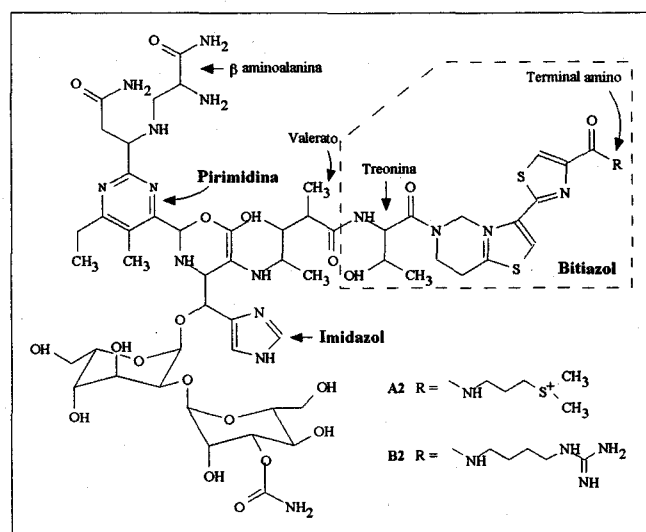


Figura 3. Estructura de la bleomicina. La línea discontinua delimita la parte de la molécula que se intercala en la doble hélice de ADN. A2 y B2 representan los radicales que varían en dos análogos de la misma.

1.2.2. Incorporación de la bleomicina en la célula

La bleomicina es una molécula hidrofílica de gran tamaño, por lo que la membrana plasmática limita considerablemente su entrada al interior de la célula (Poddevin y col., 1991). Cuando se incuban células en cultivo con bleomicina, solo aproximadamente un 0.1% de la droga presente en el medio entra realmente en las células, y de esta cantidad solo un 20% llega a penetrar en el núcleo (Roy y Horwitz, 1984). Como consecuencia, se necesitan concentraciones muy altas y mucho tiempo de exposición para inducir en la población celular un daño comparable al producido por los rayos X. Por otra parte, la acción de la bleomicina no es uniforme en la población celular, como consecuencia de la variabilidad celular en la captación de esta molécula (Östling y Johanson, 1987). Asimismo, la bleomicina puede ser degradada por una hidrolasa específica (Umezawa y col., 1974; Povirk y Austin, 1991), cuya actividad varía en los distintos tipos celulares (Müller y Zahn, 1977).

Sin embargo, la citotoxicidad de la bleomicina se potencia considerablemente y su efecto es más homogéneo en la población cuando se permeabilizan las membranas de células en cultivo (Johnston y Bryant, 1993; Belehradek y col., 1994). La electroporación es una de las técnicas más efectiva en la permeabilización de las células. Esta técnica consiste en la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje muy breves en las células, de manera que se forman poros temporales en las membranas que permiten el paso de grandes moléculas, normalmente inaccesibles al interior celular.

La electroporación permite el paso de las moléculas de bleomicina a través de las membranas tanto en células en cultivo (Poddevin y col., 1991) como en animales (Belehradek y col., 1991). Cuando estos últimos autores aplicaban pulsos eléctricos sobre zonas con tumores en ratones, observaban un aumento de la actividad antitumoral de dicha droga.

1.2.3. Modo de acción y lesiones producidas por la bleomicina

Esta droga se une a distintos iones metálicos de transición como son el cobalto, cobre, hierro, manganeso y vanadio, formando complejos capaces de activar al oxígeno y romper el ADN (Petering y col., 1990). El complejo bleomicina-Fe es el más conocido y el más investigado por su importancia *in vivo*.

La activación del oxígeno se produce por la formación de un complejo ternario de la bleomicina con el Fe(II) y el O₂, que provoca la liberación de radicales hidroxilo. Este complejo se reduce entonces dando lugar a la bleomicina activada, con capacidad para romper el ADN (figura 4). El electrón necesario puede ser donado por el complejo Fe(II)-bleomicina o por otros agentes reductores. Alternativamente, la bleomicina activada se puede formar por la oxidación del complejo Fe(III)-bleomicina (Burger y col., 1981).

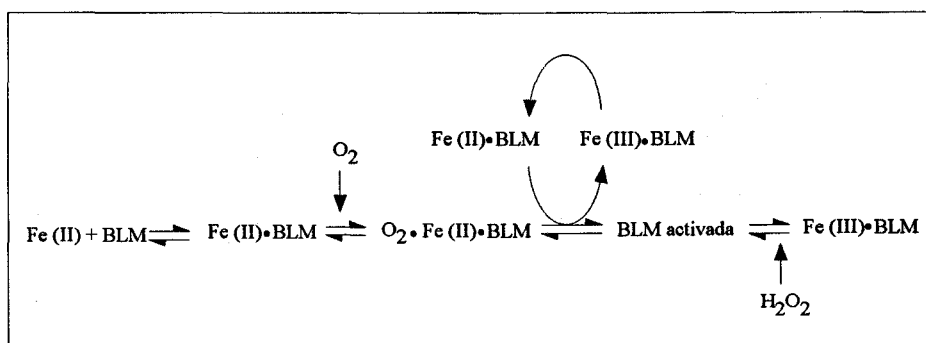


Figura 4. Activación de la bleomicina.

La bleomicina activada extrae específicamente el hidrógeno del C4' de la desoxirribosa, rompiéndose el radical resultante por dos vías distintas (figura 5). En una ruta independiente del oxígeno, la hidroxilación del C4' da lugar a la formación de un sitio abásico (AP) (figura 5A). Mediante un segundo mecanismo, la unión del oxígeno al C4' forma un radical peroxil que se descompone originando una rotura con extremos 5'-fosfato y 3'-fosfoglicolato (figura 5B) (Giloni y col., 1981). Ambas lesiones se forman principalmente en pirimidinas (Pi) en secuencias G-C y G-T (D'Andrea y Haseltine, 1978), preferentemente en las zonas internucleosomales (Tounekti y col., 1993). En condiciones fisiológicas, ambos productos se forman con la misma frecuencia (Povirk y col., 1977).

Además de estas lesiones simples, la bleomicina induce con una frecuencia muy alta sitios AP con una rotura en la cadena complementaria, así como roturas de doble cadena (Povirk y col., 1977). La mayoría de estas roturas de doble cadena presentan extremos romos o extensiones 5' de una sola base sin aparear (Povirk y col., 1989). Asimismo, presentan en su mayoría extremos "no limpios", es decir, no se originan roturas con extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo, sino 5'-fosfato y 3'-fosfoglicolato. Recientemente se ha demostrado que este tipo

de roturas son mutagénicas, dando lugar a sustituciones de bases y deleciones en secuencias repetidas directas (Dar y Jorgensen, 1995).

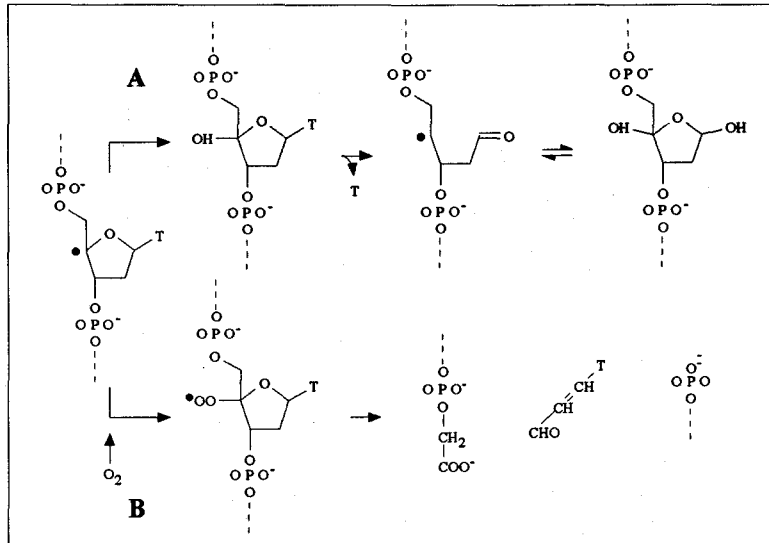


Figura 5. Modo de acción de la bleomicina. Un radical inicial sobre el C4' puede seguir una vía independiente del oxígeno (A) dando lugar a la formación de sitios AP, o la dependiente del oxígeno (B), que lleva a la liberación de un propanal de base y a una rotura. T= Timina

En general, solamente una de las dos roturas simples que forman la rotura de doble cadena (rotura primaria) sigue la especificidad normal G-Pi. La rotura secundaria se daría en la cadena complementaria tras la reactivación de la bleomicina durante la primera rotura (Povirk y col., 1989).

1.2.4. Efectos citológicos de la bleomicina

El espectro de efectos genotóxicos inducidos por la bleomicina es similar al de la radiación ionizante. Esta droga induce tanto aberraciones cromosómicas como micronúcleos en células en cultivo para los distintos sistemas estudiados, y recientemente se ha comprobado que el número de intercambios entre cromátidas hermanas aumenta cuando las células se electroporan en presencia de bleomicina (Povirk y Austin, 1991; Obe y col., 1994).

A diferencia de la mayoría de los mutágenos químicos, la bleomicina actúa de manera S-independiente, produciendo aberraciones cuando se administra en cualquier periodo de la interfase. Por otra parte, se ha observado que la bleomicina es un agente aneugénico, es decir, que no solo induce aberraciones estructurales sino también aneuploidías (Vig y Lewis, 1978).

1.3. MECANISMOS DE DEFENSA CELULAR FRENTE AL DAÑO EN EL ADN

Las células, a lo largo de la evolución, han desarrollado distintos sistemas de defensa para protegerse del daño en el ADN que, o bien evitan su producción, o bien lo eliminan. La primera línea de defensa la componen enzimas detoxificantes y compuestos que neutralizan los agentes químicos reactivos (Friedberg, 1985) pero aun así, el ADN continúa siendo dañado, dando lugar en algunos casos a una parada de la transcripción y la replicación. Así, un segundo mecanismo de defensa lo constituyen las distintas enzimas de reparación, cuya expresión puede ser constitutiva o inducible en determinadas condiciones.

1.3.1. Reparación del ADN

Las células están constantemente expuestas a agentes que causan distintas formas de daño al ADN y poseen métodos complejos y efectivos para reparar dicho daño. La reparación puede ser definida como la respuesta celular que tiene como objetivo el restablecimiento de la secuencia normal de nucleótidos (Wassermann, 1994), si bien en general se incluyen dentro del término todas las respuestas celulares que eliminan los efectos perjudiciales del daño en la célula, aunque no se recupere necesariamente la secuencia original de nucleótidos.

A medida que se desarrollaron organismos más complejos con genomas mayores y tiempos de generación más largos, se incrementó la efectividad de la reparación del ADN. Estos mecanismos están regulados por múltiples genes y existen diferentes rutas, dependiendo del tipo de daño inducido. La mayor parte del conocimiento sobre la reparación del ADN se ha obtenido en bacterias y levaduras, y más recientemente en roedores y humanos gracias a la existencia de diferentes líneas mutantes deficientes en reparación.

Los principales mecanismos de reparación se han conservado a través de la evolución y actúan contra un amplio espectro de agentes genotóxicos. Podrían resumirse en tres grandes grupos (figura 6): reparación por eliminación directa del daño, reparación por escisión y reparación por recombinación (Wassermann, 1994). Las roturas de doble cadena o de cadena simple forman parte del último paso en la mayoría de los mecanismos de reparación, por lo que existe un gran interés en conocer cómo se reparan estas lesiones.

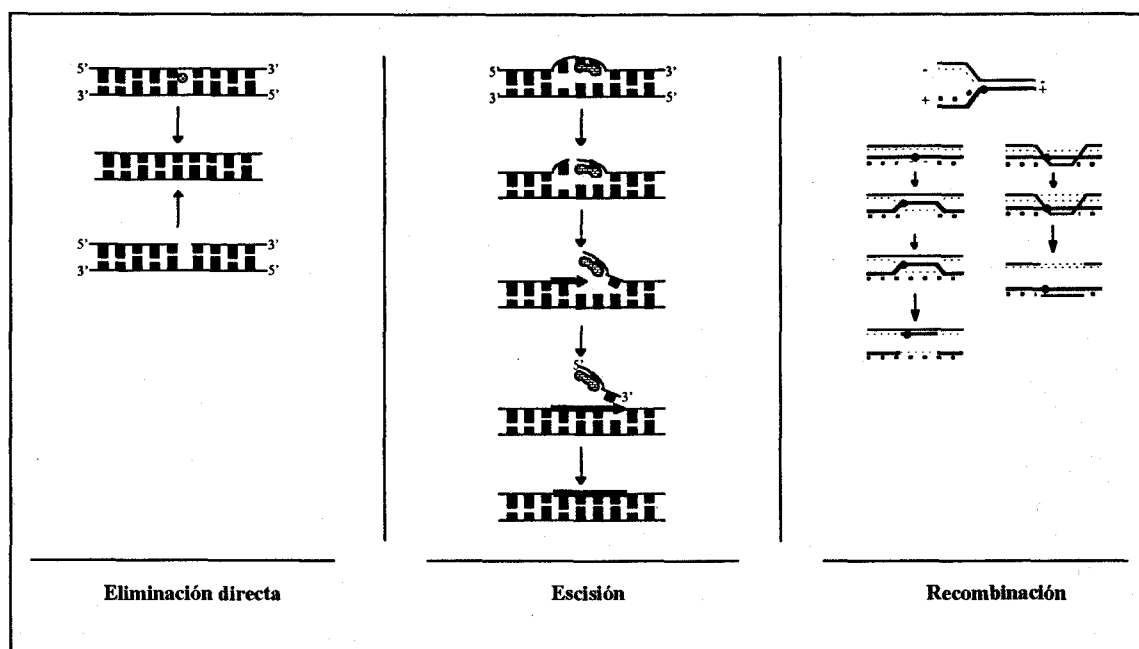


Figura 6. Mecanismos de reparación del ADN. Existen tres reacciones fundamentales implicadas en el procesamiento del daño en el ADN: eliminación directa del daño, escisión y recombinación.

1.3.1.1. Reparación de las roturas de cadena simple

La radiación ionizante produce roturas de cadena simple, cuya reparación no es un proceso sencillo y puede tener lugar mediante los tres mecanismos ya descritos. De cualquier manera, las células son capaces de reparar en gran medida y con gran fiabilidad este tipo de lesión.

Las roturas de cadena simple que presentan extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato pueden ser reparadas por la simple reunión de ambos extremos catalizada por las ligasas de ADN. La ligasa de ADN es una enzima altamente específica, ampliamente distribuida, y tiene un papel muy importante en la mayoría de las rutas bioquímicas que requieren la reunión de roturas de

cadena en el ADN (Lehman, 1974). Todas las ligasas necesitan extremos libres en la doble cadena de ADN y la presencia de extremos adyacentes 3'-hidroxilo y 5'-fosfato (Kornberg y Baker, 1992), de modo que solamente las roturas con estas características son susceptibles de ser reparadas directamente (figura 7).

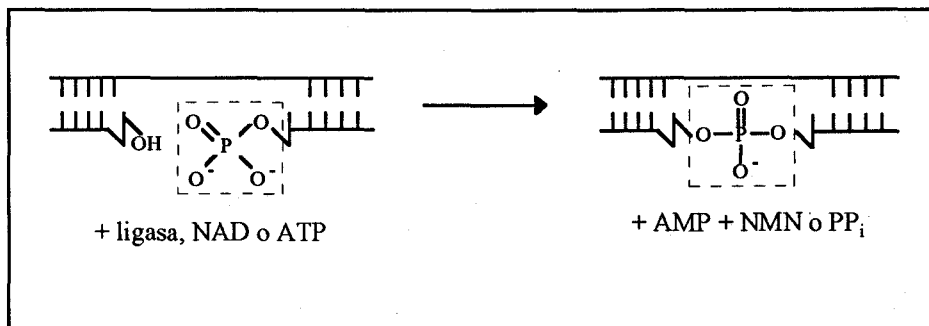


Figura 7. Reunión directa de una rotura de cadena simple. La ligasa cataliza la unión de roturas con extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato adyacentes. La enzima de *E. coli* requiere como cofactor NAD, mientras que la del fago T4 y las enzimas eucarióticas requieren ATP.

En muchos casos, y dependiendo del agente inductor del daño, estas lesiones no presentan la estructura correcta para la actuación de las ligasas, por lo que es necesaria la intervención de diferentes enzimas de reparación antes de la ligación.

1.3.1.2. Reparación de las roturas de doble cadena

Las roturas de doble cadena son lesiones que pueden originarse espontáneamente durante los procesos celulares (Gellert, 1992), o como resultado de la exposición a agentes genotóxicos como la radiación ionizante, radicales oxidantes y drogas usadas en quimioterapia, como la bleomicina (Ward, 1988; Povirk y Austin, 1991).

Se ha demostrado en numerosos estudios que las roturas de doble cadena son lesiones que pueden dar lugar a aberraciones cromosómicas, mutaciones y transformación celular, e incluso provocar la muerte celular si no se reparan correctamente (Natarajan y Obe, 1984; Bryant y Ritches, 1989; Miles y Meuth, 1989; Frankenberg-Schwager y Frankenberg, 1990; Jeggo, 1990; Iliakis, 1991). Dado que las células no toleran extremos libres de ADN, los extremos rotos de esta molécula se unen generalmente a otros extremos rotos libres y son

altamente recombinogénicos y potencialmente mutagénicos durante la síntesis del ADN o la mitosis (Weaver, 1995), de ahí que actualmente el estudio de los mecanismos de su reparación presente gran interés.

La reparación de este tipo de lesiones ha sido estudiada en profundidad en bacterias y levaduras, y se sabe que se lleva a cabo principalmente por recombinación homóloga. Se han propuesto varios modelos para explicar este tipo de reparación. Un paso común para todos es la degradación exonucleolítica a ambos lados de la rotura, lo que origina extremos 3' libres de cadena simple. Según el modelo de Szostak y colaboradores (1983), una cadena de ADN, que contiene la rotura de doble cadena, invade la doble cadena del ADN homólogo. Se crea así un entrecruzamiento que se desplaza por reparación replicativa, dando lugar a una estructura de Holliday que al resolverse puede originar dos grupos de productos distintos (figura 8A).

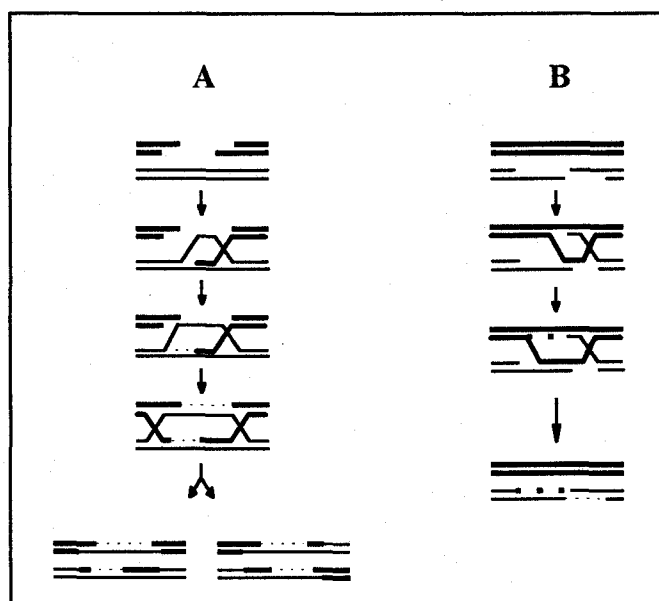


Figura 8. Modelos propuestos para la reparación por recombinación de las roturas de doble cadena. (A) Modelo de Szostak y colaboradores, 1983. (B) Modelo de Belmaaza y Chartrand, 1994.

Sin embargo, los datos obtenidos en distintos organismos parecían contradecir este modelo, por lo que Belmaaza y Chartrand (1994) propusieron un modelo alternativo para estos organismos en el que no se forma la estructura de Holliday. Según este modelo, la cadena que está siendo sintetizada se libera del entrecruzamiento y se aparea de nuevo con el segundo extremo libre que no ha invadido la cadena molde (figura 8B). En procariotas y eucariotas

inferiores, por tanto, hay un fuerte vínculo entre reparación de las roturas de doble cadena y recombinación, de manera que la mayoría de los mutantes en reparación de roturas de doble cadena lo son también en recombinación (Jeggo, 1990).

En células de mamíferos, sin embargo, no se da recombinación homóloga con tanta frecuencia, y las roturas de doble cadena parecen ser reparadas predominantemente por mecanismos que no dependen de la homología existente entre las cadenas (Jackson y Jeggo, 1995; Daza y col., 1996). Existen, en principio, dos mecanismos de reparación de las roturas de doble cadena, uno que implicaría la reunión directa de los extremos, el cual no requeriría regiones homólogas extensas, y un segundo mecanismo recombinacional (Jeggo, 1990; Thompson, 1996).

De este modo, se ha propuesto que la reparación de las roturas de doble cadena en eucariotas superiores se lleva a cabo, al menos en parte, por la reunión simple de las cadenas, en vez de por recombinación homóloga, implicando la formación de un complejo que mantenga los extremos juntos, o que al menos evite su degradación antes de la ligación (Jeggo, 1990; Thode y col., 1990). Un hecho que confirmaría esta hipótesis ha sido el descubrimiento de que en células de mamíferos se necesita una quinasa de proteínas dependiente de ADN (DNA-PK) y su cofactor (Ku), tanto para la reparación de las roturas de doble cadena como para la recombinación V(D)J, mecanismo de recombinación específica de sitio del sistema inmune de eucariotas superiores (Getts y Stamato, 1994; Rathmell y Chu, 1994). Aunque el mecanismo bioquímico exacto no está aun completamente caracterizado, en el proceso de reparación de las roturas de doble cadena el heterodímero Ku, que se une a extremos libres de ADN, promueve de alguna manera la reunión de los extremos rotos por un mecanismo independiente de homología en el ADN. La reunión completa de los extremos necesita además la actividad quinasa de la subunidad catalítica DNA-PK_{cs} (Blunt y col., 1995; Peterson y col., 1995). Dada la alta radiosensibilidad de los mutantes defectivos en la recombinación V(D)J, éste parece ser el principal mecanismo de reparación de las roturas de doble cadena en mamíferos.

El complejo de la DNA-PK tendría distintas funciones en la reparación de las roturas de doble cadena (figura 9). Como componente enzimático, la DNA-PK actuaría fosforilando diferentes moléculas, tanto activando como inactivando proteínas y factores implicados en la reparación del ADN. Se ha demostrado que, *in vitro*, esta proteína fosforila e inactiva la maquinaria de transcripción si está cerca de la rotura (Kuhn y col., 1995). Por otro lado, la

DNA-PK podría actuar como señal de daño celular, dando lugar a la síntesis de proteínas que actúen directa o indirectamente en la reparación del ADN (Jackson y Jeggo, 1995).

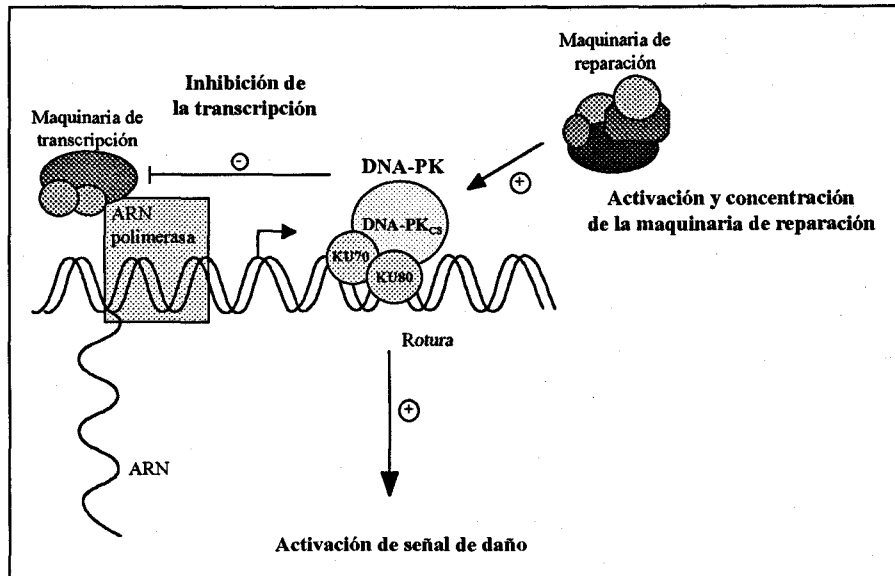


Figura 9. Posibles funciones de la quinasa dependiente de ADN (DNA-PK) en la reparación de las roturas de doble cadena.

Como componente estructural, este complejo protegería los extremos de las roturas de la acción de nucleasas y actuaría como factor de alineación entre los extremos que van a ser unidos. La subunidad DNA-PK_{cs} puede ser también un componente estructural y actuaría concentrando en las proximidades de las roturas distintos factores y enzimas implicados en la reparación (Jackson y Jeggo, 1995).

1.3.2. Ligasas de ADN

Independientemente del mecanismo exacto de reparación de las roturas en el ADN, las ligasas son componentes esenciales en la unión de las cadenas. El último paso de la reparación es la ligación de los nucleótidos recién incorporados a la cadena preexistente, esto es, el sellado de la muesca que queda tras la síntesis de ADN. Este proceso es catalizado por las ligasas de ADN, enzimas que participan también en procesos como la recombinación o la replicación del material genético (Lehman, 1974).

Las ligasas de ADN [poli(desoxirribonucleótido):poli(desoxirribonucleótido) ligasa] catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato adyacentes en ADN de doble cadena. La reacción de unión requiere la presencia de un catión divalente y un cofactor, que puede ser ATP (trifosfato de adenosina) en el caso de las ligasas eucarióticas y las de bacteriófagos, o NAD (dinucleótido de nicotinamida y de adenina) para las ligasas bacterianas.

Esta reacción tiene lugar en tres pasos, con la participación de dos intermediarios covalentes (figura 10). El primer paso consiste en la reacción de la enzima con el NAD o ATP para dar lugar a una adenilato ligasa y mononucleótido de nicotinamida (NMN) o pirofosfato (PP_i), respectivamente. El grupo AMP (monofosfato de adenosina) se transfiere posteriormente al ADN mediante una unión pirofosfato con el extremo 5'-fosfato de la rotura. Por último, este extremo es atacado por el extremo 3'-hidroxilo formándose una unión fosfodiéster.

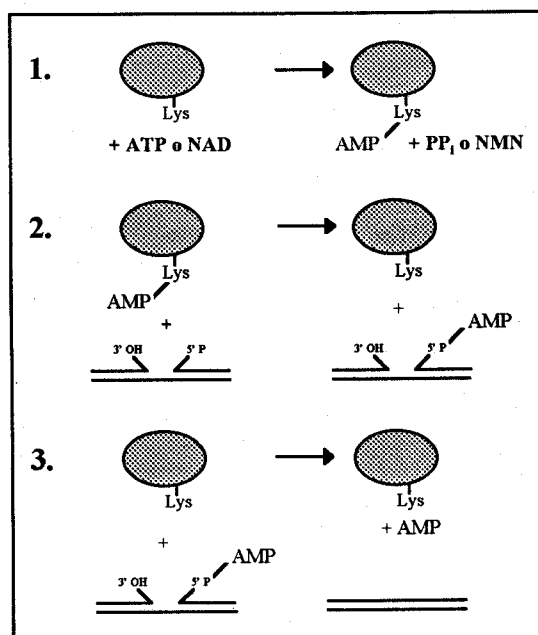


Figura 10. Reunión de extremos libres catalizada por las ligasas de ADN. 1) La ligasa interacciona con el ATP o el NAD para formar un complejo enzima-AMP. 2) El grupo AMP se transfiere al extremo 5'-fosfato. 3) La enzima cataliza la formación de una unión fosfodiéster, liberándose AMP.

Estas enzimas fueron descubiertas en *E. coli* en varios laboratorios simultáneamente (Cozzarelli y col., 1967; Gefter y col., 1967; Gellert, 1967; Olivera y Lehman, 1967; Weiss y

Richardson, 1967), y posteriormente se demostró su existencia en células eucarióticas, en las que se han descrito múltiples formas de la enzima (Aoufouchi y col., 1992; Ramos y col., 1997; Tomkinson, 1997).

1.3.2.1. Ligasas procarióticas

Las ligasas de ADN procarióticas más estudiadas son las producidas por *E. coli*. La ligasa de *E. coli* es una proteína monomérica de aproximadamente 77 KDa, que emplea como cofactores Mg^{2+} y NAD en la reacción de ligación y es producto del gen *ligA*⁺ (Lehman, 1974). Esta ligasa cataliza la unión de extremos 3' y 5' en moléculas de ADN de doble cadena, uniendo extremos cohesivos o muescas en una de las dos hebras, y puede actuar también como una endonucleasa dependiente de AMP, aunque la tasa de esta segunda reacción es extremadamente baja y se requieren grandes cantidades de enzima para su detección (Lehman, 1974).

La ligasa inducida en *E. coli* por la infección del fago T4 es la denominada ligasa del fago T4, y consiste también en una sola cadena polipeptídica cuyo peso molecular oscila entre 63 y 68 KDa (Lehman, 1974). Al igual que la enzima de *E. coli*, esta ligasa cataliza la síntesis de uniones fosfodiéster entre extremos 3' y 5' adyacentes pero, a diferencia de la anterior, emplea ATP como cofactor. La secuencia de reacción es la misma, liberándose pirofosfato en vez de NMN en el primer paso (figura 10).

Ambas enzimas presentan también distinta especificidad de sustrato. La ligasa de T4 puede catalizar la unión de cadenas híbridas ADN-ARN y además puede promover la reunión de dos moléculas de ADN con extremos romos, aunque a una menor tasa que la unión de las roturas de cadena simple (Lehman, 1974).

Se ha observado que la proteína recA aumenta la tasa de ligación de la ligasa de T4, y se cree que es debido a la capacidad que presenta la proteína de *E. coli* para unirse al ADN formando un agregado proteína-ADN que facilita la ligación (Rusche y col., 1985). Por otro lado, Ray y colaboradores (1996) han demostrado que la histona H1 presenta un patrón específico de inhibición de ambas ligasas. La unión de más de dos moléculas de H1 a un fragmento de ADN cuya longitud es comparable a la del nucleosoma inhibe significativamente estas enzimas *in vitro*. Si la histona H1 mostrara un patrón similar de inhibición en las ligasas

eucarióticas, la presencia de niveles fisiológicos de H1 (una molécula por nucleosoma) podría no inhibir la ligación durante la reparación o replicación del ADN. El aumento de los niveles de esta histona en ciertas regiones podría afectar a estos procesos, aunque el posible papel fisiológico de la misma sobre las ligasas eucarióticas está aún por dilucidar.

Las ligasas de ADN son enzimas esenciales para la replicación, reparación y recombinación en *E. coli*. Se ha descrito la existencia de mutantes para ambos tipos de ligasa (*E. coli* y T4), aunque la primera puede sustituir funcionalmente a la inducida por el fago T4 (Gellert y Bullock, 1970).

1.3.2.2. Ligasas eucarióticas

Los organismos procarióticos parecen poseer una sola clase de ligasa de ADN, que funciona en replicación, reparación y recombinación. Por el contrario, los estudios llevados a cabo en eucariotas han revelado la existencia de más de una clase de ligasa de ADN (revisado por Tomkinson, 1997). En *Saccharomyces cerevisiae* (Ramos y col., 1997), *Drosophila melanogaster* (Takahashi y Senshu, 1987) y *Xenopus laevis* (Aoufouchi y col., 1992) existen dos tipos distintos de ligasa, y se han descrito cuatro clases diferentes en células de mamíferos, denominadas ligasa I, II, III y IV (Wei y col., 1995; Robins y Lindahl, 1996; Tomkinson, 1997).

Las ligasas de ADN eucarióticas emplean como cofactor de la reacción de ligación ATP, no habiéndose descrito hasta el momento ninguna dependiente de NAD. Se ha demostrado que todas las ligasas de ADN forman un intermediario covalente enzima-AMP, y este intermediario ha sido aislado también para muchas ligasas eucarióticas. Éstas, al igual que las enzimas bacterianas, transfieren el grupo AMP al ADN mediante una unión pirofosfato que es sometida a un ataque nucleofílico por el extremo 3'-hidroxilo para completar la reacción (figura 10) (Lasko y col., 1990).

a. Ligasa I

La primera y más estudiada de las ligasas de mamíferos es la ligasa I de timo de ternera. La ligasa I es una proteína monomérica de aproximadamente 130 KDa, que presenta un alto grado de homología con las ligasas de levaduras (Lasko y col., 1990).

El ARNm de la ligasa I ha sido detectado tanto en células quiescentes como proliferantes, aunque su contenido es mayor en estas últimas. La expresión del ARNm coincide con la primera fase S tras la estimulación de células quiescentes (Montecucco y col., 1992). La principal función de la ligasa I parece ser la unión de los fragmentos de Okazaki (Li y col., 1994; Prigent y col., 1994), aunque la presencia de niveles basales en células quiescentes indica también su posible participación en la reparación del ADN. Además, tanto la actividad enzimática como la expresión del gen se inducen cuando se irradian fibroblastos humanos primarios con radiación ultravioleta. Esta inducción, que es dosis-dependiente, se produce 24 horas después de la irradiación, cuando ya no es activa la reparación por escisión, lo que sugiere que la enzima sería activada por el daño no eliminado por dicha maquinaria de reparación (Montecucco y col., 1995). Por otro lado, la sensibilidad de la línea de fibroblastos humanos 46BR (defectuosa en la ligasa I) a la radiación ionizante sugiere que esta ligasa también estaría implicada en la reparación de las roturas en el ADN (Tomkinson, 1997).

b. Ligasa II

La ligasa II es una proteína de aproximadamente 72 KDa purificada de hígado y timo de ternera, cuyas propiedades bioquímicas difieren de las de la ligasa I. Al igual que la ligasa del fago T4, es capaz de unir cadenas híbridas de ADN y ARN (Lindahl y Barnes, 1992), lo que la diferencia de la ligasa I.

Esta enzima, a diferencia de la ligasa I, aparece en una baja concentración en células en proliferación, representando tan solo el 5-20% de la actividad ligasa total observada en células de mamíferos en división (Lasko y col., 1990). Su función fisiológica parece estar relacionada con la reparación del ADN. La actividad de esta enzima es independiente del estado proliferativo de la célula y aumenta con el daño en el ADN (Creissen y Shall, 1982), lo que apoya la hipótesis de un posible papel en al menos algunas formas de reparación del ADN.

Asimismo, la regulación de la actividad ligasa II durante la espermatogénesis indica su participación en la recombinación meiótica (Higashitani y col., 1990).

c. Ligasa III

En 1991, Tomkinson y colaboradores detectaron dos actividades ligasas distintas a la ligasa I, que catalizaban la unión de sustratos híbridos ADN-ARN. Las propiedades bioquímicas de una de ellas eran idénticas a las de la ligasa II. Sin embargo, las propiedades cromatográficas, físicas y catalíticas de la otra actividad diferían claramente de las ligasas I y II. Esta nueva ligasa es la denominada ligasa III.

La ligasa III de mamíferos es un polipéptido de 100 KDa cuyo papel fisiológico no está claro, aunque pudiera ser similar al de la ligasa II. Se ha observado que esta ligasa copurifica con el producto del gen XRCC1, implicado en la reparación de las roturas de cadena simple en el ADN, lo que sugiere un posible papel de la ligasa III en reparación (Caldecott y col., 1994).

La ligasa III humana presenta una amplia región de homología con la ligasa II bovina, por lo que se cree que la ligasa II pudiera ser una forma de menor peso molecular de la ligasa III originada por una corte en ambos extremos de la proteína, aunque no se puede excluir la posibilidad de que la ligasa II esté codificada por un gen distinto (Tomkinson, 1997).

d. Ligasa IV

Se ha purificado y clonado un cuarto tipo de ligasa humana (ligasa IV). Esta enzima, de peso molecular similar al de la ligasa III (96 KDa), copurifica con la misma y, aunque aun no se ha establecido su papel fisiológico, funciona, al igual que las otras enzimas, ligando roturas simples en ADN de doble cadena de manera dependiente de ATP (Wei y col., 1995).

1.4. MODULACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

La célula posee diversos mecanismos de protección frente a las lesiones producidas en el ADN por mutágenos endógenos o exógenos. Tanto los organismos procarióticos como los eucarióticos son capaces de regular estos mecanismos de defensa, de manera que existen sistemas inducibles de reparación que se activan en situaciones de estrés.

Esta protección puede ser regulada exógenamente, bien activando de algún modo la propia maquinaria de reparación celular o bien proporcionando a la célula cantidades adicionales de determinadas enzimas implicadas en dicha reparación, como sería el caso de las ligasas que acabamos de describir.

1.4.1. La respuesta adaptativa

En células sometidas a estrés se inducen distintas respuestas celulares. Cuando se exponen células a dosis bajas de un agente que daña el ADN (tratamiento condicionante), a menudo éstas desarrollan una resistencia a la exposición posterior a una dosis alta de dicho mutágeno (tratamiento de prueba). Este proceso se denomina en general respuesta adaptativa.

Se trata de un fenómeno muy extendido que ha sido descrito en distintos organismos (bacterias, levaduras, plantas y animales), así como para distintos agentes mutagénicos de naturaleza física (radiaciones ionizantes) o química (agentes alquilantes y oxidantes).

La existencia de la respuesta adaptativa se demostró por primera vez en bacterias, en las que se observó la inducción, mediante dosis bajas de agentes alquilantes, de un sistema específico de reparación que protegía a las células contra dosis más altas administradas posteriormente. Los estudios se han centrado en la posible existencia de un mecanismo similar en eucariotas, en particular en células de mamífero y especialmente en relación al daño causado por la radiación ionizante. Aunque no han sido ampliamente caracterizados, los efectos celulares y genéticos provocados por dosis bajas de radiación son de gran interés, ya que es más probable una exposición de los organismos a dosis bajas (radiactividad natural, diagnóstico, etc) que una exposición accidental a altas dosis (accidente nuclear, por ejemplo).

1.4.1.1. La respuesta adaptativa en procariotas

Los primeros conocimientos de interés sobre los procesos implicados en la respuesta adaptativa, así como las posibles enzimas responsables, se obtuvieron en organismos procarióticos. En éstos se ha caracterizado la respuesta adaptativa a diferentes agentes.

En 1977, Samson y Cairns demostraron la existencia de una fuerte respuesta adaptativa en *E. coli* tras la exposición a agentes alquilantes. Células expuestas a dosis relativamente bajas del agente alquilante MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) se mostraban resistentes a los efectos mutagénicos y letales de un tratamiento posterior con dosis normalmente tóxicas de dicho mutágeno. Esta resistencia es el resultado de una serie de procesos de reparación inducida denominados colectivamente respuesta adaptativa, que es independiente de la respuesta SOS y requiere la síntesis *de novo* de proteínas. En células expuestas a niveles bajos de agentes alquilantes se induce la expresión de, al menos, cuatro genes (*ada*, *alkA*, *alkB*, *aidB*) que codifican diferentes enzimas de reparación, entre las que se incluyen la alquiltransferasa Ada y la glicosilasa AlkA. Ada repara las principales lesiones inducidas por los agentes alquilantes y a la vez actúa como regulador positivo de los genes implicados en la respuesta adaptativa (Shevell y col., 1990). Los productos de los genes *alkB* y *aidB* son dos proteínas cuya función bioquímica no está aún bien caracterizada (Volkert y Nguyen, 1984; Kondo y col., 1986), aunque el producto del gen *aidB* es homólogo a varias deshidrogenasas de acetil CoA de mamíferos (Landini y col., 1994).

Otra respuesta adaptativa bien caracterizada en bacterias es la respuesta al daño oxidativo. La exposición de *E. coli* a bajas dosis de H₂O₂ reduce la toxicidad de una exposición posterior a altas concentraciones de este agente o a dosis altas de radiación ionizante (Demple y Halbrook, 1983). En esta adaptación está implicado el regulón *oxyR*, regulador positivo de nueve genes. La forma oxidada de la proteína OxyR (debido a la exposición al H₂O₂, por ejemplo) es capaz de activar la transcripción de estos genes, que codifican entre otras enzimas una catalasa, una alquil hidropéroxido reductasa, una glutatión reductasa, una proteína de unión no específica al ADN y una proteína de choque térmico (Davies, 1995). Otro regulón, *soxR*, también parece estar implicado en este tipo de respuesta en *E. coli*. Cuando las células son expuestas al ion superóxido, este regulón activa genes que codifican, entre otras, una superóxido dismutasa y una exonucleasa (Davies, 1995).

1.4.1.2. *La respuesta adaptativa en eucariotas*

Actualmente se sabe que la respuesta adaptativa también se da en diferentes organismos eucarióticos. Se han llevado a cabo estudios de la adaptación a distintos agentes tóxicos como son timidina tritiada, radiación ionizante y agentes alquilantes, así como al estrés oxidativo, en distintos tipos celulares.

La adaptación a la radiación es posiblemente el proceso más estudiado en eucariotas y particularmente en linfocitos humanos. La respuesta al daño generado por la radiación ionizante es de especial interés, ya que constituye una fuente real y potencial de daño medioambiental al ADN celular. Los primeros experimentos en la inducción de la adaptación a dosis bajas de radiación ionizante se realizaron en linfocitos humanos pretratados con timidina tritiada (Olivieri y col., 1984). La timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ -TdR) actúa como una fuente de radiación crónica de bajo nivel, y cuando las células se exponían posteriormente a 1.5 Gy de rayos X se observaba una reducción en la producción de aberraciones cromosómicas en células que habían incorporado el radioisótopo. Posteriormente, los trabajos llevados a cabo por distintos autores han ido definiendo la respuesta adaptativa en diversos tipos celulares y con diferentes agentes inductores de daño en el ADN.

a. Características generales de la respuesta adaptativa

La respuesta adaptativa no es lo que se suele llamar un artefacto relacionado con un retraso en el progreso en el ciclo inducido por la radiación, o bien con variaciones en la radiosensibilidad de las células en las distintas fases del ciclo (Olivieri y col., 1984; Wiencke y col., 1986; Wolff, 1996). Células femeninas tratadas con $[^3\text{H}]$ -TdR se cocultivaron con células masculinas sin tratar, y los resultados mostraron que la $[^3\text{H}]$ -TdR no selecciona en contra de una población celular radiosensible que no alcance metafase y contribuya a la disminución de la producción de aberraciones cromosómicas tras la exposición a la radiación (Wiencke y col., 1986). Recientemente, los resultados obtenidos al pretratar linfocitos humanos con bajas dosis de rayos X han llevado a la misma conclusión (Wolff, 1996). Combinando los tratamientos se observó que el porcentaje de células femeninas y masculinas que alcanza la metafase permanece constante independientemente del tratamiento recibido.

Cortés y colaboradores (1990b) demostraron también que la respuesta adaptativa no se debía a un retraso en el ciclo de las células más dañadas, puesto que cuando se condicionaron linfocitos humanos con tres pulsos seguidos de H_2O_2 en vez de uno solo (lo cual induce a pensar en un mayor retraso) no se obtuvo una reducción significativa en el número de aberraciones cromosómicas.

Existe una adaptación cruzada con distintos agentes inductores de daño en el ADN. La respuesta adaptativa al daño producido por un determinado mutágeno se puede inducir mediante dosis adaptativas del mismo agente o de otros que induzcan el daño de forma similar. Linfocitos humanos pretratados con dosis bajas de [3H]-TdR o rayos X mostraban una reducción significativa en la frecuencia de aberraciones inducidas por una dosis alta o de prueba de bleomicina (Vijayalaxmi y Burkart, 1989). Otros estudios han mostrado que el tratamiento con H_2O_2 era capaz de reducir tanto el número de aberraciones como el de micronúcleos provocados por un tratamiento posterior con rayos X (Wolff y col., 1989; Cortés y col., 1990b; Domínguez y col., 1993).

También parece existir una variabilidad en la adaptación a bajas dosis de mutágenos entre distintos individuos. Se han observado tanto disminuciones significativas como un efecto nulo en el daño inducido por una dosis alta de radiación, dentro del mismo o entre distintos donantes condicionados (Sankaranarayanan y col., 1989; Olivieri y Bosi, 1990). Para tratar de explicar estos resultados, Olivieri y Bosi (1990) han propuesto que podrían ser consecuencia del estado fisiológico de las células en el momento de la exposición a la dosis condicionante.

b. Inducción de la respuesta adaptativa

La inducción de una respuesta adaptativa a la radiación ionizante parece depender tanto de la dosis total como de la tasa de dosis a la que se administra, de manera que solamente unas determinadas tasas de dosis son capaces de inducir la respuesta (Shadley y Wiencke, 1989). En linfocitos irradiados con una dosis baja de rayos X se inducía la adaptación a una dosis de prueba posterior si el tratamiento condicionante se administraba a una tasa de dosis concreta. De forma parecida a la radiación ionizante, cuando se condicionaban linfocitos humanos con dosis bajas de bleomicina o H_2O_2 solamente se inducía la respuesta adaptativa en un rango determinado de concentraciones (Wolff y col., 1989).

Hasta el momento, los procesos moleculares que originan la adaptación no se conocen con detalle. Trabajos realizados en células de mamíferos (Marples y Joiner 1993; Marples y col., 1994) demuestran que las radiaciones de alta LET son menos eficientes en la inducción de radiorresistencia que las de baja LET para los mismos niveles de muerte celular, lo que sugiere que las roturas de cadena simple son lesiones más importantes en la inducción de radiorresistencia que las roturas de doble cadena. Por otro lado, en levaduras se ha demostrado que dosis condicionantes de neutrones son menos eficientes que los rayos X en la inducción de una protección frente a la muerte celular y frente a las mutaciones producidas por una exposición a dosis altas de rayos X, y que la anoxia reduce la eficiencia del condicionamiento con bajas dosis de rayos X (Boreham y Mitchel, 1991). Todo ello sugiere que el daño producido por los radicales libres y radiación de baja LET pudiera ser particularmente efectivo en la inducción de radioprotección. Así, probablemente las roturas de cadena simple por sí mismas serían la señal inductora de la protección a través de un aumento en la capacidad de reparación recombinacional del ADN. Otros autores han demostrado que dosis bajas de H_2O_2 , que induce principalmente roturas de cadena simple, protegen eficazmente a las células de mamíferos frente a un daño posterior por radiación ionizante (Sen Gupta y Bhattacharjee, 1988; Cortés y col., 1990b; Domínguez y col., 1993), lo que apoya la hipótesis anterior.

c. Influencia del ciclo celular y vida media de la respuesta adaptativa

La mayoría de los estudios en linfocitos humanos se han llevado a cabo en células estimuladas, observándose en general una adaptación en todas las fases del ciclo. Sin embargo, los resultados en G_0 son especialmente contradictorios, y mientras algunos autores no han observado adaptación en esta fase del ciclo celular (Shadley y col., 1987; Moquet y col., 1989; Wang y col., 1991), otros han demostrado que la respuesta adaptativa se puede inducir en células quiescentes (Sanderson y Morley, 1986; Cai y Liu, 1990; Liu y col., 1992; Barquinero y col., 1995, 1996). Una vez inducida la respuesta se ha observado que se requiere al menos un intervalo de 4 a 6 horas entre la exposición a la dosis condicionante y a la dosis de prueba para detectar reducciones en el número de aberraciones en linfocitos humanos (Shadley y col., 1987); además, parece ser que la respuesta puede persistir durante tres ciclos celulares. Cai y

Liu (1990) demostraron también que la respuesta adaptativa podía volver a ser inducida si la dosis condicionante se repetía en el tercer ciclo.

d. Mecanismo de la respuesta adaptativa

La naturaleza molecular del mecanismo responsable de la respuesta adaptativa aún no ha sido esclarecida, aunque es bien sabido que se requiere la síntesis de proteínas *de novo* para la inducción de la misma. Youngblom y colaboradores (1989) observaron que cuando trataban linfocitos humanos con cicloheximida 4 ó 6 horas después del condicionamiento no se inducía la respuesta adaptativa, lo que indicaba que en ese momento se estaba sintetizando alguna proteína necesaria para la adaptación. De hecho, en linfocitos humanos se ha detectado síntesis de proteínas durante las primeras horas tras la dosis condicionante (Wolff y col., 1989).

En células de ovario de hámster chino también parece haber un aumento en la síntesis de al menos 20 proteínas durante la adaptación a H_2O_2 , entre las cuales no se incluyen actividades de enzimas antioxidantes como catalasa, glutatión peroxidasa o superóxido dismutasa (Wiese y col., 1995). Asimismo, en linfocitos humanos preirradiados con una dosis baja de rayos X aparecen ARNm que no están presentes en las células control (Wolff, 1996) y que podrían corresponder a posibles genes de reparación implicados en la adaptación. Por otro lado, en las células no irradiadas existen también ARNm que no aparecen en las preadaptadas, que quizá pudieran ser transcritos de genes reguladores negativos de la reparación del ADN, por lo que la respuesta podría ser atribuible bien a la inducción de nuevas enzimas o a la inhibición de represores presentes en células no preadaptadas (Wolff, 1996).

Se ha demostrado que la respuesta adaptativa puede ser bloqueada por la 3-aminobenzamida tras el tratamiento de prueba (Wiencke y col., 1986; Shadley y Wolff, 1987), lo que sugiere un posible papel de la actividad poli(ADP-ribosa)polimerasa en la reparación de las lesiones del ADN, ya que dicho compuesto inhibe a la enzima.

La expresión de la quinasa C de proteínas se incrementa después de una exposición a distintas dosis de radiación ionizante (Woloschak y col., 1990). Asimismo, el calcio intracelular activa a la quinasa C (Hallahan y col., 1994), por lo que el hecho de que agentes quelantes de calcio o el antagonista TM8 impidan la adaptación en linfocitos apoya el posible papel de la activación de la quinasa C en la expresión de la respuesta adaptativa (Wojewodzka y col.,

1994). Estos resultados parecen indicar que la ruta mediada por dicha enzima es un paso clave en la transducción de la señal inducida por la dosis condicionante.

La activación de la quinasa C iniciaría una cascada de fosforilación que daría lugar a la inducción de genes (genes de respuesta temprana). Los productos de estos genes regularían la expresión de otros genes que contribuirían en sí al efecto protector dando lugar a una reparación más eficiente del daño potencialmente letal inducido por la dosis alta o de prueba. En cualquier caso, la naturaleza y función de las posibles proteínas implicadas aún no están claramente definidas, ya que se ha demostrado que cuando se exponen levaduras a dosis condicionantes de H_2O_2 se incrementa la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes (Davies y col., 1995), de manera que se podría decir que la resistencia al estrés oxidativo estaría determinada tanto por la capacidad antioxidante de la célula, como por la actividad de enzimas implicadas en reparación.

1.4.2. Modulación del daño en el ADN con enzimas de reparación

La reparación puede ser regulada exógenamente suministrando a las células un aporte extra de determinadas enzimas implicadas en este proceso, aunque este tema no parece estar tan bien caracterizado como ocurre con la respuesta adaptativa.

Investigaciones recientes nos vienen demostrando que extractos celulares o proteínas específicas implicadas en la reparación del ADN son capaces de activar la reparación en ADN aislado. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que extractos de células HeLa son capaces de reunir las roturas inducidas en el ADN aislado de una línea celular de carcinoma de pulmón, siendo la eficiencia similar a la observada en células completas (Cheong y col., 1996; Cheong e Iliakis, 1997). Por otra parte, se han obtenido resultados similares con ADN aislado de procariontes, donde se ha conseguido reparar por recombinación roturas de doble cadena con extractos de proteínas purificadas de *E. coli* (Morel y col., 1997).

En este sentido, se logró un gran avance en la modulación del daño en el ADN con enzimas de reparación en células intactas. Líneas celulares mutantes defectuosas en reparación recuperan su fenotipo silvestre cuando se tratan con extractos celulares de células no defectuosas. En células de *Xeroderma pigmentosum* se ha conseguido corregir el defecto en la reparación por escisión inyectando en las mismas extractos de células humanas eficientes en

reparación (HeLa) o de un grupo distinto de complementación, detectándose distintos niveles de corrección del fenotipo mutante con los diferentes grupos de complementación (Vermeulen y col., 1986).

También se ha conseguido revertir el fenotipo mutante con proteínas purificadas en vez de extractos celulares. Células del grupo de complementación XP-E (que carece de una proteína de unión a zonas dañadas del ADN) revierten cuando se les inyecta la proteína humana purificada (Keeney y col., 1994). Asimismo, cuando se permeabilizan las células y se les da la enzima de reparación en la que son defectuosas éstas recuperan su capacidad para reparar. Tsongalis y colaboradores (1990) han demostrado que se puede corregir el defecto en la reparación por escisión en células de *Xeroderma pigmentosum* defectivas en el paso de rotura de cadena del ADN por ataque endonucleolítico, cuando éstas son electroporadas con endonucleasas procedentes de células normales.

Hasta ahora hemos visto que en líneas celulares mutantes defectivas en algún paso de la reparación, el ADN es susceptible de ser reparado por extractos celulares o enzimas aisladas de células eficientes en reparación. Sin embargo, las ligasas de ADN aisladas de organismos procarióticos son también capaces de reparar el daño residual no reparable en células eucarióticas normales.

Las enzimas de restricción son agentes radiomiméticos que inducen roturas de doble cadena en el ADN. Distintos investigadores han mostrado que al introducir ligasa del fago T4 simultáneamente con enzimas de restricción en células en cultivo, se incrementa la capacidad de reparación del daño de dichas células, observándose la respuesta a nivel de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y supervivencia celular.

Durante y colaboradores (1991) analizaron la supervivencia celular tratando fibroblastos de ratón (C3H10T1/2) permeabilizados con ligasa del fago T4 junto con la enzima de restricción PvuII (que induce roturas con extremos romos), y observaron que la ligasa aumentaba considerablemente la supervivencia hasta cierto nivel, ya que se pudo observar una saturación en la actividad de dicha enzima con dosis altas de la misma.

Por otro lado, también se ha demostrado la capacidad de la ligasa del fago T4 para reunir las roturas inducidas por PvuII en fibroblastos de hámster chino permeabilizados con estreptolisina O (Bryant y Johnston, 1993). En células CHO6 y xrs5 tratadas simultáneamente con la enzima de restricción y con la ligasa disminuía el daño cromosómico inducido por la

enzima de restricción, medido como micronúcleos en células binucleadas, comparado con el inducido por PvuII solamente.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la ligasa del fago T4 es capaz de reunir tanto extremos romos como extremos cohesivos producidos por enzimas de restricción en células CHO6, aunque estos últimos son ligados con una mayor eficiencia (Ortiz y col., 1995). Estos autores proponen que la ligasa es activa dentro de la célula por un largo periodo de tiempo (aproximadamente 20 horas), puesto que era capaz de reducir el número de aberraciones de tipo cromatídico, aparentemente inducidas por las enzimas varias horas después de la electroporación. Los resultados obtenidos parecían indicar que la reparación de las lesiones no era propensa al error, ya que la ligasa disminuía tanto el número de aberraciones de tipo deleción como el de tipo intercambio, lo que sugería que la ligación de las roturas resultaba en la restitución correcta de la estructura original del cromosoma, no ocurriendo, por tanto, una reunión incorrecta con otra rotura de doble cadena presente en el mismo o en otro cromosoma distinto.

1.5. OBJETIVOS

El estudio del daño en el ADN, así como de los mecanismos de reparación de dicho daño, es de particular importancia para la salud humana y de los seres vivos en general. Es importante, por tanto, caracterizar la posible respuesta frente a una exposición a la radiación ionizante medioambiental bien natural o accidental. Comparados con dosis altas, los efectos celulares y genéticos de dosis bajas de radiación no se conocen en profundidad, aunque en diferentes organismos se ha demostrado la existencia de un posible mecanismo que protege a las células frente a una agresión posterior, la denominada respuesta adaptativa. Existe gran controversia sobre su existencia en linfocitos humanos quiescentes y por otro lado, aunque se han llevado a cabo muchos estudios sobre la respuesta adaptativa en células humanas en estado proliferativo, son más escasos los que se han realizado en cultivos primarios de otros organismos de interés con riesgo de una posible exposición a radiación medioambiental.

Por otro lado, la potenciación de la reparación del ADN puede ser regulada exógenamente mediante el aporte de enzimas implicadas en dicho proceso. En nuestro laboratorio se había observado previamente que la introducción de una ligasa de origen procariótico (ligasa de ADN del fago T4) disminuye el daño residual (imposible de reparar por la maquinaria de reparación celular) producido por enzimas de restricción en fibroblastos de hámster chino en cultivo.

Teniendo en cuenta lo anterior, los objetivos del presente trabajo han sido:

- 1) Comprobar la existencia de la respuesta adaptativa en linfocitos humanos en G_0 cuando éstos son adaptados con peróxido de hidrógeno o una dosis baja de rayos X antes de irradiarlos con una dosis alta de este agente clastogénico. Para evaluar el daño se empleó el ensayo de micronúcleos en células binucleadas.
- 2) Analizar la inducción de este fenómeno en linfocitos estimulados de vaca y de conejo, utilizando igualmente el ensayo de micronúcleos en células binucleadas.
- 3) Comprobar si la ligasa del fago T4 es capaz de cooperar con la propia maquinaria celular en la reparación del daño producido por bleomicina tanto en fibroblastos de hámster chino

(CHO6) como en linfocitos humanos. En este caso se introdujeron mediante electroporación tanto la droga como la enzima, estudiando en las células CHO6 el efecto de la ligasa en la frecuencia de aberraciones cromosómicas y muerte celular producidas por la bleomicina. Con objeto de estudiar la modulación del daño producido por la bleomicina mediante ligasa exógena en linfocitos humanos no estimulados, empleamos la electroforesis de células individuales, comúnmente denominada “ensayo del cometa”.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL EXPERIMENTAL

Como material experimental se emplearon cultivos primarios de linfocitos de mamíferos (humanos, bovinos y de conejo) obtenidos de sangre periférica de varios donantes y animales sanos, así como una línea celular establecida (CHO6) procedente de fibroblastos de ovario de hámster chino.

2.2. CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO

2.2.1. Linfocitos humanos, bovinos y de conejo

Los cultivos se realizaron a partir de sangre extraída por punción venosa con un frasco de vidrio estéril (Venoject, Terumo) heparinizado (1% p/v). Se mezcló sangre completa de donantes sanos (10 ml) con 90 ml de medio RPMI 1640 (Bio◇Whittaker) suplementado con suero fetal bovino (Gibco) al 10%, 2 mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina. Para estimular la división celular de los linfocitos, normalmente en fase estacionaria (G_0), se añadía a los cultivos fitohemaglutinina al 2% (v/v) (GIBCO). Las células se cultivaron en suspensión en frascos de vidrio estériles (Pyrex) en un incubador a 37 °C y con una atmósfera del 5% de CO_2 .

2.2.2. Fibroblastos de ovario de hámster chino (CHO6)

Las células se cultivaron en monocapa en frascos de Roux (Nunc) y se dejaron crecer en las mismas condiciones de concentración de CO_2 y temperatura descritas para los linfocitos. El medio de cultivo utilizado fue McCoy's 5A (Bio◇Whittaker) suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina (2 mM), penicilina (50 U/ml) y estreptomina (50 µg/ml). Todos los experimentos se iniciaron cuando las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial.

2.3. ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

2.3.1. Ensayo de aberraciones cromosómicas

Uno de los efectos citológicos más claros de los distintos agentes mutagénicos es la producción de daño en los cromosomas. Las roturas en el ADN pueden dar lugar a alteraciones estructurales en los cromosomas, denominadas aberraciones cromosómicas. Las aberraciones cromosómicas pueden clasificarse en aberraciones de tipo cromatídico o cromosómico, según afecten a una sola cromátida o a ambas (al mismo nivel) en el cromosoma, lo cual depende del tipo de daño inducido y la fase del ciclo en que ha tenido lugar. Así, los agentes se pueden clasificar, según el tipo de lesión que produzcan, en S-dependientes o S-independientes. Los primeros inducen lesiones que han de pasar por una fase S para poder ser visualizadas como aberraciones de tipo cromatídico. Los agentes S-independientes, como los rayos X y compuestos radiomiméticos, por el contrario, producen aberraciones cromatídicas cuando se exponen las células en la fase G₂, aberraciones de tipo cromosómico en G₀ o G₁ y ambos tipos de aberraciones en la fase S, dependiendo de si la zona implicada se ha replicado o no al producirse la lesión en el ADN (figura 11).

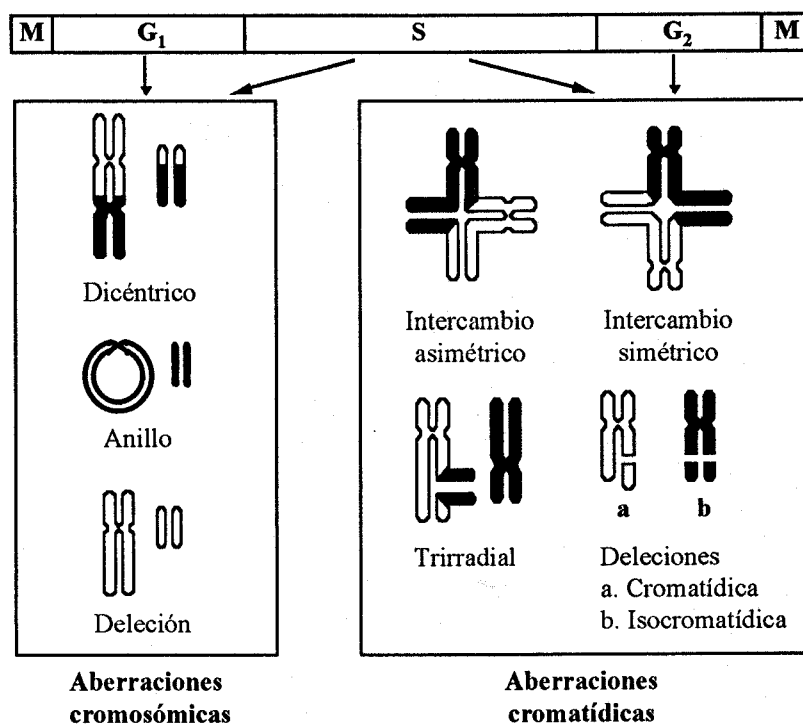


Figura 11. Tipos de aberraciones observadas en este trabajo

La producción final de aberraciones cromosómicas resulta del balance del daño inducido y de la eficacia y exactitud en la reparación de las lesiones. La reparación puede reconstruir la configuración original del cromosoma (restitución), puede provocar la unión entre extremos ilegítimos (aberraciones de tipo intercambio) o puede dar lugar a deleciones al quedarse la rotura abierta.

2.3.2. Ensayo de micronúcleos

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros que no se incorporan al núcleo de las células hijas durante la mitosis, como resultado de una rotura cromosómica (clastogénesis) o defectos en el huso mitótico (aneugénesis). Presentan las mismas propiedades que el núcleo principal, y están envueltos por una membrana nuclear, aunque son de un tamaño mucho menor (figura 12).

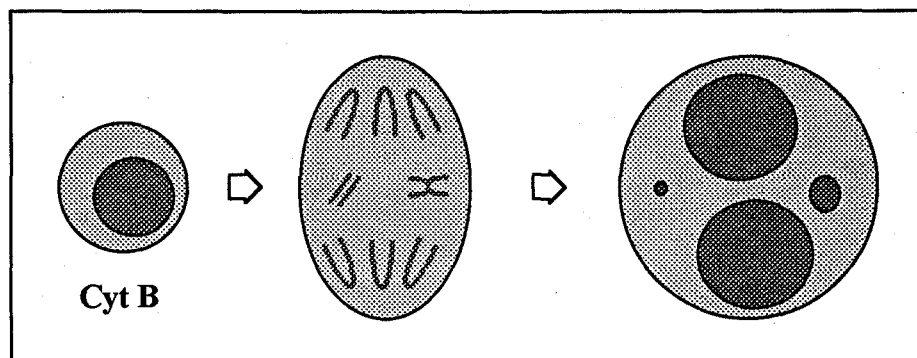


Figura 12. Origen de los micronúcleos. Los micronúcleos se originan a partir de cromosomas enteros o de fragmentos de cromosomas que no se incorporan al núcleo de las células hijas durante la mitosis. Las células que son tratadas con citocalasina B, y que por tanto han dividido su núcleo una sola vez, aparecen como binucleadas. Los micronúcleos se cuentan solamente en estas células, evitándose así la estimación incorrecta del daño que supondría incluir en el recuento los linfocitos que no se han dividido (mononucleados).

El análisis de los micronúcleos en linfocitos en cultivo es un método frecuentemente aplicado como indicador biológico muy sensible del daño cromosómico inducido por la radiación ionizante o agentes químicos, ya que la metodología es simple y permite una valoración rápida de un gran número de células, mientras que el ensayo de aberraciones cromosómicas requiere bastante experiencia.

Solamente las células que se han dividido pueden expresar los micronúcleos, por lo que esta técnica daría lugar a una estimación errónea del daño si no se identifican claramente las células que han sufrido un ciclo de división. Incluir células que se han dividido más de una vez puede resultar también en una estimación incorrecta del daño (Fenech, 1993). En este sentido, el método de bloqueo en citocinesis introducido por Fenech y Morley en 1985 ha mejorado notablemente la fiabilidad de la técnica.

Para identificar las células que se han dividido una sola vez se bloquea la citocinesis con citocalasina B (Cyt-B). Esta droga, aislada del hongo *Helminthosporium dematoidium*, impide la polimerización de la actina necesaria para la separación de las células hijas tras la telofase (Carter, 1967), de manera que las células se muestran como binucleadas, lo que las hace fácilmente identificables en la población total de linfocitos (figura 12).

2.3.3. Electroforesis de células aisladas en gel de agarosa (SCGE) o “ensayo del cometa”

El ensayo del cometa es un método rápido, sensible y fácilmente reproducible para determinar las roturas inducidas en el ADN por distintos agentes mutagénicos en células eucarióticas (Fairbairn y col., 1995). La ventaja principal de este método es que no es necesario un número alto de células para realizarlo y es un ensayo muy útil para trabajar en células quiescentes, ya que no requiere células proliferativas para poder observar el daño.

La técnica fue descrita por primera vez por Östling y Johanson en 1984 como una técnica microelectroforética que permitía visualizar directamente el daño en el ADN en células individuales. Estos autores tomaron una suspensión de células incluidas en agarosa y la depositaron en un portaobjetos; posteriormente lisaron las células y las sometieron a una electroforesis, tras lo cual observaron que los fragmentos de ADN migraban desde el núcleo original hacia el ánodo, siendo más pronunciada la migración en células irradiadas.

En 1988 Singh y colaboradores modificaron la técnica usando una solución de lisis muy alcalina, para conseguir un ADN más limpio y libre de histonas. El tratamiento alcalino seguido de una electroforesis también a pH elevado permite detectar tanto las roturas dobles y simples como los sitios lábiles a álcali. La migración del ADN depende del tamaño de los fragmentos y del número de éstos, de forma que cada célula tiene la apariencia de un cometa (figura 13).

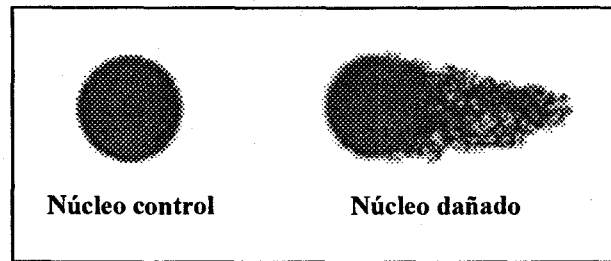


Figura 13. Aspecto de los núcleos tras el ensayo del cometa. Tras la lisis celular y la electroforesis los núcleos control tienen un aspecto redondeado, mientras que los dañados adquieren la forma de un cometa, ya que los fragmentos de ADN migran hacia el ánodo.

2.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

2.4.1. Respuesta adaptativa a los rayos X

2.4.1.1. Linfocitos humanos en G_0

La respuesta adaptativa se ha estudiado siguiendo dos protocolos distintos para el tratamiento condicionante. En un primer grupo de experimentos, dicho tratamiento consistió en una dosis de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) administrada en G_0 a distintos tiempos antes de la estimulación de las células con el agente mitogénico fitohemaglutinina (PHA). En el segundo grupo, las células se condicionaron irradiándolas con una dosis baja de rayos X, administrada a distintas tasas de dosis.

En experimentos previos se había observado que una dosis de $250 \mu M$ de H_2O_2 era efectiva como condicionante para inducir una clara respuesta adaptativa en linfocitos humanos estimulados sin ser tóxica (Cortés y col., 1990b; Domínguez y col., 1993), por lo que optamos por emplearla como dosis condicionante en linfocitos sin estimular. Respecto a la dosis condicionante de rayos X, elegimos 2 cGy, dosis que habían usado otros autores en distintos tipos celulares para estudiar la inducción de la respuesta adaptativa a dosis altas de radiación, con resultados en principio contradictorios (Shadley y col., 1987; Cai y Liu, 1990; Wang y col., 1991).

a. Tratamiento condicionante

Las células se mantuvieron en el incubador con una atmósfera del 5% de CO₂ a 37°C hasta que fueron condicionadas. Cuando se empleó H₂O₂ como tratamiento condicionante, las células se expusieron durante 30 min. a una dosis de 250 µM de este agente a distintos tiempos (6.5, 3.5 ó 0.5 horas) antes de la estimulación. Durante los 30 min., los cultivos también permanecieron en el incubador a 37°C y con una atmósfera del 5% de CO₂.

Una vez condicionadas, las células se lavaron con medio fresco y se cultivaron con fitohemaglutinina al 2% para estimularlas. Las células control y las que solo iban a recibir el tratamiento de prueba fueron procesadas del mismo modo (centrifugación y lavado), excepto la adición de H₂O₂ al medio. El H₂O₂ se preparó en agua destilada a la concentración deseada a partir de una solución concentrada 10 M y se aplicó a las células en tubos de centrifuga estériles.

El tratamiento condicionante con rayos X se administró justo antes de estimular el cultivo y consistió en la irradiación de las células con 2 cGy de rayos X a diferentes tasas de dosis (1, 10 ó 20 cGy/min.). Para irradiar se empleó un acelerador lineal Philips SL 75-20, con 8 MeV de energía.

Inmediatamente después del condicionamiento con rayos X se añadió fitohemaglutinina a los cultivos, se pasaron al incubador y se cultivaron en frascos de vidrio estériles. Las células control y las que solo iban a recibir el tratamiento de prueba fueron manipuladas del mismo modo excepto que no eran irradiadas con la dosis baja de rayos X.

b. Tratamiento de prueba

Para ambos grupos de experimentos, transcurridas 30 horas de estimulación los cultivos se expusieron al tratamiento de prueba, que consistió en la irradiación de las células con 1.5 Gy de rayos X con el mismo acelerador lineal empleado para el tratamiento condicionante, a una tasa de dosis de 2 Gy/min. Tras ser irradiadas, las células se pasaron de nuevo al incubador y se dejaron crecer en medio completo con citocalasina B (Sigma) hasta su fijación, entre 24 y 30 horas después.

2.4.1.2. Linfocitos bovinos y de conejo estimulados

Para estudiar en estas células la respuesta adaptativa decidimos seguir el mismo protocolo que previamente se había comprobado que era útil para estudiar la adaptación a los rayos X de linfocitos humanos estimulados y condicionados con H_2O_2 (Domínguez y col., 1993). Experimentos preliminares mostraron que estas células eran más sensibles a los rayos X y al peróxido que los linfocitos humanos, por lo que se bajaron las dosis de ambos agentes. Asimismo, comprobamos que el tiempo que permanecían estimulándose antes del tratamiento condicionante influía en el número de células binucleadas que encontrábamos, por lo que decidimos aumentar el tiempo de estimulación de 24 horas, que era el empleado con linfocitos humanos, hasta 48 horas. Así nos asegurábamos una proliferación celular idónea.

a. Tratamiento condicionante

La sangre completa se mezcló con el medio completo y la fitohemaglutinina para estimular la entrada de los linfocitos en ciclo. Las células se cultivaron en frascos de vidrio estériles y se dejaron crecer en un incubador a $37^\circ C$ y con una atmósfera del 5% de CO_2 . Tras 48 horas de estimulación los cultivos se expusieron al tratamiento condicionante con H_2O_2 .

Los linfocitos bovinos se trataron con 5, 25, y 50 μM de H_2O_2 , mientras que las dosis elegidas para condicionar los linfocitos de conejo fueron 25, 50 y 75 μM . Las características del tratamiento condicionante fueron las mismas que las descritas para los linfocitos humanos en el apartado anterior.

b. Tratamiento de prueba

Los cultivos se expusieron 24 horas después del condicionamiento a un tratamiento de prueba con 1 Gy de rayos X (en lugar de los 1.5 Gy empleados para los linfocitos humanos) usando el mismo acelerador lineal. Tras el tratamiento de prueba las células se cultivaron durante 24 horas más en medio completo al que se le añadió citocalasina B para obtener células binucleadas, de forma similar a como habíamos procedido con los linfocitos humanos.

2.4.1.3. Obtención de células binucleadas, fijación y tinción

Inmediatamente después del tratamiento de prueba, se añadió al medio citocalasina B para bloquear la citocinesis y observar los micronúcleos en células binucleadas. La citocalasina B, como ya se ha comentado anteriormente, tiene la propiedad de inhibir la polimerización de la actina bloqueando por tanto la citocinesis, con lo que se induce la aparición de células binucleadas. Esta droga se preparó como una solución concentrada en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) a una concentración de 2 mg/ml, que se mantuvo a -80°C . En el momento de su utilización, se diluyó en PBS y se administró a los cultivos a una concentración final de $6\mu\text{g/ml}$. Se ha comprobado que con esta dosis de citocalasina B más del 90% de células estimuladas aparecen como binucleadas (Littlefield y col., 1989).

Una vez transcurridas las horas de recuperación en citocalasina B, se recogieron las células en tubos de plástico de 10 ml de fondo cónico y se centrifugaron a 1200 rpm durante 6 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió con suavidad, tras lo cual fueron sometidas a un choque hipotónico muy suave (1 min. en CIK 0.075 M a 37°C). Tras una nueva centrifugación en idénticas condiciones, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en solución fijadora de metanol:ácido acético glacial recién preparada (3:1 v/v), en la que se mantuvieron a 4°C al menos 10 min., tras los cuales se volvieron a centrifugar y se lavaron con PBS a 4°C . Por último, las células se fijaron en una mezcla de metanol:ácido acético glacial (6:1 v/v), manteniendo siempre la temperatura a 4°C . Previamente se había comprobado que estas condiciones de fijación eran las idóneas para obtener células binucleadas con el citoplasma en muy buen estado de conservación, lo cual es fundamental para una correcta evaluación.

El precipitado de la última centrifugación se resuspendió en el volumen adecuado de fijador, se tomaron algunas gotas de la suspensión de células fijadas con una pipeta Pasteur y se vertieron sobre portaobjetos de cristal humedecidos (4°C). Las preparaciones se dejaron secar en cajas de madera sobre una placa calefactora a 37°C durante al menos 24 horas. La tinción se realizó con Giemsa (Merck) al 3% en tampón fosfato Sörensen (PO_4KH_2 60 mM, $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ 60 mM, pH 6.8) durante 4-6 min. Una vez realizada la tinción, las preparaciones se dejaron secar a 37°C y se pusieron en definitivo, dándoles 2 pasos en Xilol (Panreac) antes de colocar los cubreobjetos con el medio de montaje DPX (Fluka).

2.4.2. Modulación del daño inducido por bleomicina con ligasa del fago T4

2.4.2.1. Electroporación

Tanto la bleomicina (Almirall) como la ligasa del fago T4 (Promega) se introdujeron en las células usando un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad) conectado a un extensor de la capacitancia. Las células se centrifugaban y después de decantar el sobrenadante y lavar con medio sin completar, se contaban usando un contador de células (Coulter counter, modelo Z1) y se resuspendían en este mismo medio a una concentración aproximada de $2-2.5 \times 10^6$ células/ml. En cada cámara de electroporación (Bio-Rad Gene Pulser cuvette, 0.4 cm) se ponían 800 μ l de esta suspensión celular, así como bleomicina, ligasa y sus correspondientes tampones cuando se requería, completando hasta un volumen de 820 μ l con medio de cultivo. Las células se electroporaban con una capacitancia de 960 μ F y un voltaje de 750V/cm y se dejaban las cámaras unos minutos en hielo con el fin de mantener los poros celulares abiertos. Posteriormente, las células se pasaban a frascos con 5 ml de medio completo, manteniéndose en el incubador hasta ser procesadas según la técnica que se fuera a emplear.

La solución concentrada de bleomicina se preparó a una concentración de 1.5 U/ml en CINA al 0.9% y se mantuvo a -20°C hasta el momento de su uso, en el que se diluía para obtener la concentración adecuada. Tanto la ligasa de T4, disuelta en tampón de almacenamiento (Tris-ClH 10 mM pH 7.4, ClK 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 0.1 mM, glicerol 50% v/v) como el tampón de ligación (Tris-ClH 300 mM pH 7.8, DTT 100 mM, ATP 10 mM) se mantuvieron también a -20°C hasta su utilización.

2.4.2.2. Modulación del daño en fibroblastos de hámster chino

En este tipo celular, la posible ayuda en la reparación con ligasa exógena sobre el daño inducido por bleomicina se analizó utilizando ensayos de supervivencia celular (clonogenicidad) y recuento de aberraciones cromosómicas (clastogénesis) para los distintos tratamientos. Los ensayos de supervivencia celular nos aportan una medida directa de la fracción de células capaz de formar macrocolonias, es decir, de continuar dividiéndose normalmente después de ser expuestas a un agente que dañe el ADN.

a. Estudio dosimétrico de la bleomicina

Con intención de analizar la capacidad de la electroporación para permitir la entrada de la molécula de bleomicina al interior celular, se hicieron experimentos previos tratando las células con varias dosis de dicho antibiótico con o sin electroporación, y analizando la supervivencia celular.

Para este experimento, las células fueron procesadas para ser electroporadas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, y se utilizaron dosis de bleomicina de 75, 150, 300, 600, 1200, 2400 y 4800 nU. Tras la electroporación las cámaras se dejaron en hielo 5 min. y seguidamente las células se pasaron a tubos de centrifuga que se dejaron en el incubador a 37°C durante 30 min. Las suspensiones celulares se diluyeron entonces para el estudio de la supervivencia celular, sembrándose 300 células por placa (Costar) con 5 ml de medio completo en el control negativo y 600 células en el resto de los tratamientos. Las células se cultivaron una semana en el incubador a 37°C con un 5% de CO₂ en aire humidificado.

Estas mismas dosis de bleomicina se aplicaron en otras cámaras llevadas paralelamente con las anteriores y no sometidas al choque eléctrico, con el fin de comparar con las electroporadas. En este caso se sembraron 300 células por placa y las colonias se dejaron crecer también durante una semana.

b. Tratamientos

Tanto la bleomicina como la ligasa se introdujeron por electroporación en las células siguiendo el protocolo ya descrito. A 800 µl de suspensión celular se le añadió el volumen apropiado para tener una dosis de bleomicina de 300 nU (dosis cuya eficacia se había probado previamente) más las unidades deseadas de ligasa de T4 (6, 12 y 18 U). Asimismo, se realizaron diferentes controles de supervivencia celular electroporando las células en medio de cultivo, o bien con los tampones de la ligasa y ClNa o con las distintas dosis de ligasa.

Tras la electroporación se pasaron las células a hielo 5 min. y después a tubos de centrifuga que permanecieron en el incubador durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, un pequeño volumen de estas suspensiones se diluyó y procesó para los estudios de la supervivencia celular de la misma manera descrita anteriormente.

En los mismos cultivos donde se analizó la supervivencia, las células restantes se procesaron para realizar posteriormente un estudio de las aberraciones cromosómicas. Las células se sembraron en multipocillos (Nunc) con 5 ml de medio fresco completo, el cual se cambió 2 horas después. Para analizar la producción de aberraciones cromosómicas, 16 horas después la electroporación, en un caso, ó 19 horas en un segundo grupo de células, se añadió colcemida al medio a una concentración de 2×10^{-7} M para detener las células en metafase y se realizaron fijaciones 3 y 6 horas después del tratamiento con la colcemida. De esta forma se observaron las aberraciones inducidas 19, 22, 25 y 28 horas después de la electroporación.

La solución concentrada de colcemida (10^{-5} M) se preparó en agua destilada y se mantuvo a 4°C hasta el momento del uso, en el que se añadió al cultivo el volumen necesario para tener la concentración adecuada.

c. Obtención de colonias, fijación y tinción

Transcurrida una semana de cultivo se procedió a la fijación y tinción de las colonias. Para ello, se desechó el medio de las placas y se trataron durante 10 min. con metanol puro, se lavaron brevemente con tampón fosfato Sörensen y se tiñeron con Giemsa al 10% en ese mismo tampón durante 5 minutos. Una vez eliminado el exceso de Giemsa con agua destilada, las placas se dejaron secar a 45°C durante 2 horas. Se contaron aquellas colonias que presentaban más de 50 células, usando para ello un contador de colonias (Bioblock, modelo 50300), y se calculó la eficiencia en placa (E_p) y la fracción de supervivencia (FS) utilizando las siguientes fórmulas:

$$E_p = \frac{\text{Nº de colonias observadas en placas controles}}{\text{Nº total de células sembradas}}$$

$$FS = \frac{\text{Nº de colonias observadas en placas tratadas}}{\text{Nº de colonias sembradas en placas tratadas} \times E_p} \times 100$$

d. Obtención de metafases, fijación y tinción

Las células se recogieron en tubos de plástico de 10 ml y se centrifugaron a 800 rpm durante 6 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió con suavidad, tras lo cual las células fueron sometidas a un choque hipotónico con CIK 0.075 M a 37°C durante 2 min. Tras una nueva centrifugación en idénticas condiciones, se desechó el sobrenadante, se resuspendieron las células en solución fijadora de metanol:ácido acético glacial recién preparada (3:1 v/v) y se volvieron a centrifugar. Esta fijación se repitió una segunda vez.

El precipitado de la última centrifugación se resuspendió en el volumen adecuado de fijador, se tomaron algunas gotas de la suspensión de células fijadas con una pipeta Pasteur y se vertieron sobre portaobjetos humedecidos. La tinción con Giemsa y montaje con DPX se realizó de la forma ya descrita para las células binucleadas.

La electroporación induce un considerable retraso en el ciclo, por lo que normalmente hay que dejar transcurrir tiempos largos entre el tratamiento y la fijación. Sin embargo, también cabría esperar que un porcentaje de células poco afectadas por la electroporación pudieran llegar a la segunda mitosis. Para comprobar que solamente se analizaba la primera mitosis después de la electroporación, un grupo de células fue cultivada en presencia de bromodesoxiuridina (BrdU) 5 μ M, desoxicitidina (dC) 100 μ M y fluorodesoxiuridina (FdU) 1 μ M (Sigma) hasta su fijación 22 horas después del tratamiento.

Todas las soluciones concentradas (BrdU, 10⁻³ M; FdU, 10⁻⁴ M; dC, 10⁻² M) se prepararon en agua destilada en condiciones estériles y se mantuvieron a 4°C hasta el momento del uso, en el que se añadió al cultivo el volumen necesario para tener la concentración adecuada.

La BrdU es un análogo de la timidina con un átomo de Br en la posición 5 del anillo de pirimidina capaz de incorporarse en el ADN. El método de tinción del ADN bromosustituido que se utiliza en nuestro laboratorio (Cortés y col., 1987) es una adaptación de la técnica de fluorescencia más Giemsa (FPG) de Perry y Wolff (1974). Para ello, las preparaciones ya secas se sumergieron en una solución del fluorocromo Hoechst 33258 (Sigma) a una concentración final de 0.5 μ g/ml en tampón Sørensen, durante 20 min. en oscuridad. A continuación se lavaron los portaobjetos brevemente en tampón Sørensen para eliminar los restos del fluorocromo, se colocó un cubreobjetos a cada uno y se pusieron sobre una placa calefactora

previamente calentada a 57°C. Seguidamente se sometieron durante 7 min. a irradiación con luz ultravioleta con una lámpara que emite a una longitud de onda de 360 nm (Sylvania, modelo F15T8BLB) para provocar la desnaturalización de las cromátidas bromosustituidas, se lavaron de nuevo en tampón Sörensen para desprender los cubreobjetos y se tiñeron con Giemsa al 3% disuelto en el mismo tampón durante 6 min., tras lo cual los portaobjetos se secaron y pusieron en definitivo con DPX.

La solución concentrada de Hoechst se preparó a 1 mg/ml en agua destilada y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Tras dos ciclos de división, la cromátida sustituida en ambas hebras con BrdU presenta menor afinidad por el colorante que su cromátida hermana, que está monosustituida, y presenta finalmente una coloración más clara. De esta manera podemos distinguir aquellas células que se han dividido más de una vez por la presencia de una cromátida de color más claro y otra de un color violeta más intenso (tinción diferencial entre cromátidas hermanas).

2.4.2.3. Modulación del daño en linfocitos humanos en G₀

Para comprobar si la ligasa del fago T4 podía reducir el daño inducido por la bleomicina en linfocitos humanos en G₀, aplicamos un gradiente de Ficoll-Paque (Seromed) a la sangre para aislar la fracción de linfocitos. Los linfocitos aislados de sangre periférica se electroporaron con la dosis apropiada de bleomicina, sola o junto a 6, 12 ó 18 U de ligasa del fago T4, de acuerdo con el método ya descrito. El efecto de la ligasa en la posible reparación se observó en preparaciones procesadas para el ensayo del cometa (SCGE) y se analizó por densitometría.

a. Aislamiento de los linfocitos

La sangre periférica heparinizada se mezcló al 50% con medio sin completar y se depositaron 5 ml de esta mezcla muy lentamente, para que no se mezclasen, sobre 3 ml de Ficoll en tubos de centrifuga de plástico. Los tubos se centrifugaron durante 10 min. a 2000 rpm de manera que se establece un gradiente en el que los linfocitos aparecen como una capa intermedia, que se recogió con mucho cuidado y se lavó varias veces con medio sin completar.

Tras varios lavados, las células aisladas se dejaron reposar en el incubador aproximadamente una hora en un frasco de Roux para seleccionar los linfocitos, que permanecían en suspensión. Éstos se contaron, y a continuación se les dio el tratamiento.

b. Estudio dosimétrico de la bleomicina

Para elegir una dosis adecuada para detectar un nivel daño en el ADN susceptible de ser modulado con la ligasa de T4, los linfocitos aislados se electroporaron como se ha descrito previamente con 300 nU, 3 μ U y 6 μ U de bleomicina. Tras la electroporación, las cámaras se dejaron en hielo durante 5 min. y las células se pasaron a tubos de centrifuga, permaneciendo en el incubador durante 2 horas, tras lo cual se procesaron para el ensayo del cometa. Estos experimentos nos permitieron determinar que la dosis más apropiada en nuestras condiciones de trabajo era de 6 μ U.

c. Tratamientos

Los tratamientos fueron de 6 μ U de bleomicina sola o combinada con 6, 12 ó 18 U de ligasa de T4, así como los correspondientes controles de ligasa sola y de los diferentes tampones. Las cámaras permanecieron aproximadamente 5 min. en hielo con el fin de mantener los poros celulares abiertos, y después las células se pasaron a tubos de plástico con medio completo, manteniéndose en el incubador durante 2 horas, tras lo cual se procesaron para el ensayo del cometa.

Para evaluar la viabilidad celular después del tratamiento se utilizó una solución de azul tripán (Gurr's) al 0.4% en PBS. Se consideran células vivas aquellas que se ven refringentes al microscopio.

d. Obtención de los cometas, tinción y análisis

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento se tomó el volumen necesario para tener unas 10^5 células, que fueron procesadas para la electroforesis de células aisladas (SCGE) o ensayo del cometa.

Se cubrieron portaobjetos completamente esmerilados (Franceschi, Italia) con 150 μ l de una primera capa de agarosa con punto de fusión normal (FMC) al 0.5% en PBS a 45°C. Inmediatamente se taparon con un cubreobjetos y se mantuvieron a 4°C durante 10 min. para que solidificara la agarosa. Mientras, la suspensión celular se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. y se eliminó el sobrenadante. A continuación se le quitó el cubreobjetos a la primera capa de agarosa, el precipitado celular se mezcló bien con 100 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad) al 0.7% a 37°C y se extendió rápidamente sobre la primera capa. Se colocó de nuevo un cubreobjetos y se dejó 8 min. a 4°C.

Transcurrido este tiempo, y después de retirar el cubreobjetos se cubrió la segunda capa con 100 μ l de agarosa de bajo punto de fusión a 37°C y, tras poner otro cubreobjetos, los portas se colocaron de nuevo a 4°C durante 8 minutos.

Una vez solidificada la tercera capa de agarosa, se sumergieron los portas en una solución de lisis de membranas de pH muy alcalino recién preparada. Esta solución está formada por un tampón de lisis (CINa 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris-ClH 10 mM, N-Laurosilsarcosinato 0.77% p/v, NaOH 0.25 M, pH 10) al que se le añadió 10% (v/v) de DMSO y 1% (v/v) de Tritón X-100 (Fluka) en el momento de utilizarla. Los portaobjetos se mantuvieron en esta solución a 4°C y en oscuridad toda la noche para que se produjera la lisis del material celular, tanto de las membranas plasmáticas como de las nucleares, así como de restos citoplasmáticos y algunas de las proteínas nucleares.

Tras la lisis celular, los portas se colocaron sobre una cubeta de electroforesis que se llenó con tampón de electroforesis recién preparado (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH>12). Los portaobjetos se dejaron en el tampón durante 20 min. para permitir el desenrollamiento del ADN antes de la electroforesis, que se realizó a 4°C durante 20 min. a 25 V y 300 mA.

Una vez terminada la electroforesis se lavaron los portaobjetos una o dos veces con tampón de neutralización frío (Tris-ClH 0.4 M, pH 7.5) durante 5 min. para eliminar las sales y detergentes que podrían interferir con la tinción posterior. Una vez lavados, se vertieron 30 μ l de bromuro de etidio sobre los portaobjetos y se colocó un cubreobjetos, guardándose las preparaciones en una cámara húmeda a 4°C.

La solución concentrada de bromuro de etidio (Sigma) se preparó a una concentración de 10 mg/ml en agua destilada y se mantuvo a temperatura ambiente. La solución de uso se preparó también en agua destilada a 3 μ g/ml.

Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia y se fotografiaron con una película fotográfica de 400 ASA. Los negativos se escanearon empleando un escáner Mustek, modelo MFS-12000CX.

Como parámetro para analizar el nivel de daño en el ADN se empleó el momento de los cometas, definido como el producto del porcentaje de ADN presente en la cola por la longitud de la misma (Singh y col., 1988). El porcentaje de ADN se midió como la densidad óptica de la cola cuantificada con el programa de análisis de imágenes PCBAS versión 2.0, y como longitud de la cola se tomó la medida que va desde la mitad del núcleo hasta el final de la misma, empleando el mismo programa anterior.

2.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

2.5.1. Linfocitos

Con objeto de determinar si las diferencias observadas entre los distintos valores obtenidos eran estadísticamente significativas se empleó el test *t*-Student de una cola. Todos los cultivos se establecieron por duplicado y se analizó el mismo número de células de cada duplicado para cada tratamiento. Todos los experimentos se realizaron con linfocitos procedentes de al menos dos donantes sanos distintos. En los experimentos con micronúcleos se contaron 1000 células binucleadas por cada duplicado, y en el ensayo del cometa se analizaron 25 células por duplicado, utilizando siempre portaobjetos codificados.

2.5.2. Fibroblastos

En los experimentos llevados a cabo para evaluar las aberraciones cromosómicas se contaron 100 metafases de cada tratamiento. Para determinar si el número de aberraciones cromosómicas en aquellas células que habían sido tratadas con bleomicina y ligasa era menor que el inducido solamente por la bleomicina se utilizó también el test *t*-Student de una cola. En todos los casos se utilizaron portaobjetos codificados. Asimismo, los experimentos se realizaron por triplicado para confirmar la validez de los resultados obtenidos, y los datos referidos a las medias de varios experimentos se dan con su correspondiente error estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESPUESTA ADAPTATIVA A LOS RAYOS X

Es bien sabido que la radiación ionizante natural (entendido esto, por ejemplo, en el caso de ciertas zonas en las que el suelo es rico en uranio o radón), en diagnóstico clínico o accidental, puede afectar al normal funcionamiento de los organismos vivos, e incluso llegar a causar su muerte, dependiendo de la dosis y la naturaleza de la radiación. Por ello, es un objetivo fundamental la identificación de los mecanismos moleculares por los cuales se produce el daño celular, así como las vías de reparación de dicho daño para tratar, por una parte, de optimizar la protección ante el mismo y, por otro lado, de diseñar estrategias a aplicar en caso de sobreexposición accidental a radiación ionizante. El estudio de los efectos causados en las células al someterlas a dosis bajas merece especial atención, ya que ello refleja una situación que se da con mayor frecuencia en la realidad que el caso de una exposición aguda (normalmente solo se da accidentalmente).

El daño producido en el ADN por la radiación y otros agentes genotóxicos puede provocar diferentes y complejas respuestas en las células, incluyendo la inducción de la expresión de una gran variedad de genes implicados en distintos procesos moleculares, como el control del crecimiento celular y la reparación del ADN (Walker, 1985; Fornace, 1992). Se ha demostrado que cuando la bacteria *E. coli* se expone a dosis crónicas muy bajas de un agente químico alquilante u oxidante, se induce una vía de reparación llamada adaptativa que repara el ADN sin cometer errores, de manera que la bacteria resiste mejor el efecto de una dosis aguda posterior (Samson y Cairns, 1977; Demple y Halbrook, 1983). La existencia en mamíferos de mecanismos inducibles similares podría tener gran significado para una evaluación precisa del potencial mutagénico y carcinogénico de la radiación ionizante.

Diferentes investigadores han demostrado la existencia de la respuesta adaptativa a la radiación en levaduras (Boreham y Mitchel, 1991), células vegetales (Cortés y col., 1990a), *Drosophila melanogaster* (Schäppi-Büchi, 1994), embriones de pollo (Tempel y Schleifer, 1995) y diferentes células de mamífero (Liu y col., 1992; Shadley, 1994; Marples y Joiner, 1995), lo que sugiere que este tipo de respuesta no se limita solamente a sistemas celulares o condiciones muy específicas, sino que existe una variedad de sistemas biológicos capaces de desencadenar dicho mecanismo de defensa.

Otra característica importante que presenta la respuesta adaptativa es la denominada adaptación cruzada, ya que se ha demostrado la adaptación a la radiación ionizante para distintos agentes condicionantes siempre que éstos induzcan un tipo de daño similar al producido también por el agente de prueba. De este modo, se ha descrito la inducción de protección frente a radiación cuando se condicionan linfocitos humanos con peróxido de hidrógeno o una dosis baja de rayos X (Cortés y col., 1990b; Domínguez y col., 1993; Wojewodzka y col., 1994). También se ha observado protección frente al daño inducido por bleomicina en linfocitos humanos condicionados con una dosis baja de rayos X o de timidina tritiada (Wolff y col., 1988) o en personas expuestas en su trabajo a radiación ionizante (Barquinero y col., 1995, 1996).

Un factor importante a tener en cuenta es el estado de proliferación en que se encuentran las células en el momento de inducir la respuesta. La mayoría de los estudios sobre respuesta adaptativa a los rayos X realizados en humanos se han llevado a cabo en linfocitos estimulados, existiendo en general una gran coincidencia en cuanto a los resultados positivos de diferentes autores (Olivieri y col., 1984; Domínguez y col., 1993; Rigaud y Moustacchi, 1994; Shadley, 1994; Wolff, 1996). Teniendo en cuenta que en los organismos pluricelulares la mayoría de las células no se encuentran en estado proliferativo, existe el interés de estudiar si las células quiescentes (G_0) son capaces de expresar también esta respuesta. Respecto a este último punto, los estudios realizados han aportado resultados bastante contradictorios. Shadley y colaboradores (1987) observaron que, al condicionar linfocitos humanos con dosis bajas de rayos X (1cGy ó 5cGy), éstos mostraban una adaptación (medida como producción de aberraciones) a una dosis alta (1.5 Gy) administrada en G_2 , solamente cuando el condicionamiento se administraba en G_1 , en S o en G_2 . Por otro lado, estudiando el número de intercambios entre cromátidas hermanas producidos por mitomicina C, Moquet y colaboradores (1989) no encontraron adaptación en células pretratadas con 1cGy de rayos X en G_0 , pero sí en G_1 . Wang y colaboradores (1991) tampoco observaron una reducción en el número de aberraciones inducidas por 3 Gy de rayos X empleando una dosis condicionante de 2cGy en G_0 .

Sin embargo, se han observado resultados positivos cuando se condicionan las células en G_0 , tanto *in vitro* como *in vivo*. De este modo, Cai y Liu (1990) comprobaron que una dosis de 1cGy de rayos X podía inducir una respuesta adaptativa a nivel citogenético a 1.5 Gy de rayos X en linfocitos humanos y de conejo no solamente en G_1 , S o G_2 , sino también en G_0 .

Respecto a los estudios realizados *in vivo*, Liu y colaboradores (1992) observaron la inducción de una respuesta adaptativa a nivel citogenético frente a rayos X en linfocitos de conejo cuando éstos eran expuestos a dosis bajas de rayos γ . Asimismo, Barquinero y colaboradores (1995, 1996) han demostrado que linfocitos humanos de personas ocupacionalmente expuestas a dosis bajas de radiación ionizante (X y γ) mostraban una respuesta adaptativa a los rayos γ , así como a bleomicina, cuando se administran posteriormente como tratamiento de prueba.

3.1.1. Respuesta adaptativa en linfocitos humanos en G_0

Con objeto de analizar este fenómeno, hemos estudiado la respuesta adaptativa en linfocitos humanos condicionados en G_0 con H_2O_2 o con una dosis baja de rayos X similar a la empleada por otros autores, siendo después estimulados con fitohemaglutinina y tratados posteriormente con rayos X a una dosis de 1.5 Gy. En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio se había comprobado que 250 μM de H_2O_2 es una dosis apropiada como condicionante para inducir una respuesta adaptativa en linfocitos humanos estimulados, resultando en una clara protección frente al daño cromosómico inducido posteriormente por rayos X (Cortés y col., 1990b; Domínguez y col., 1993). Por ello, elegimos dicha dosis para el tratamiento condicionante en linfocitos sin estimular (G_0).

El empleo de la técnica de bloqueo en citocinesis para analizar el daño en forma de micronúcleos en células binucleadas, nos ofrece la ventaja de recoger células que han estado expuestas al tratamiento de prueba con la dosis alta de rayos X en distintas fases del ciclo celular. Estas células, además, han tenido la oportunidad de superar cualquier retraso necesario para reparar antes de entrar en mitosis y aparecer como binucleadas en la interfase siguiente (figura 14).

Como se muestra en la figura 15, se sometieron cultivos de sangre completa a un pulso de 30 min. con 250 μM de H_2O_2 a distintos tiempos (6.5, 3.5 ó 0.5 horas) antes de la estimulación con fitohemaglutinina. Transcurridas 30 horas, las células fueron expuestas al tratamiento de prueba con 1.5 Gy de rayos X e inmediatamente después se pusieron en presencia de 6 $\mu g/ml$ de citocalasina B de 24 a 30 horas para bloquear la citocinesis y observar los micronúcleos en células binucleadas. Se ha descrito que esta dosis de citocalasina B es muy eficaz, obteniéndose más de un 90% de células binucleadas (Littlefield y col., 1989).

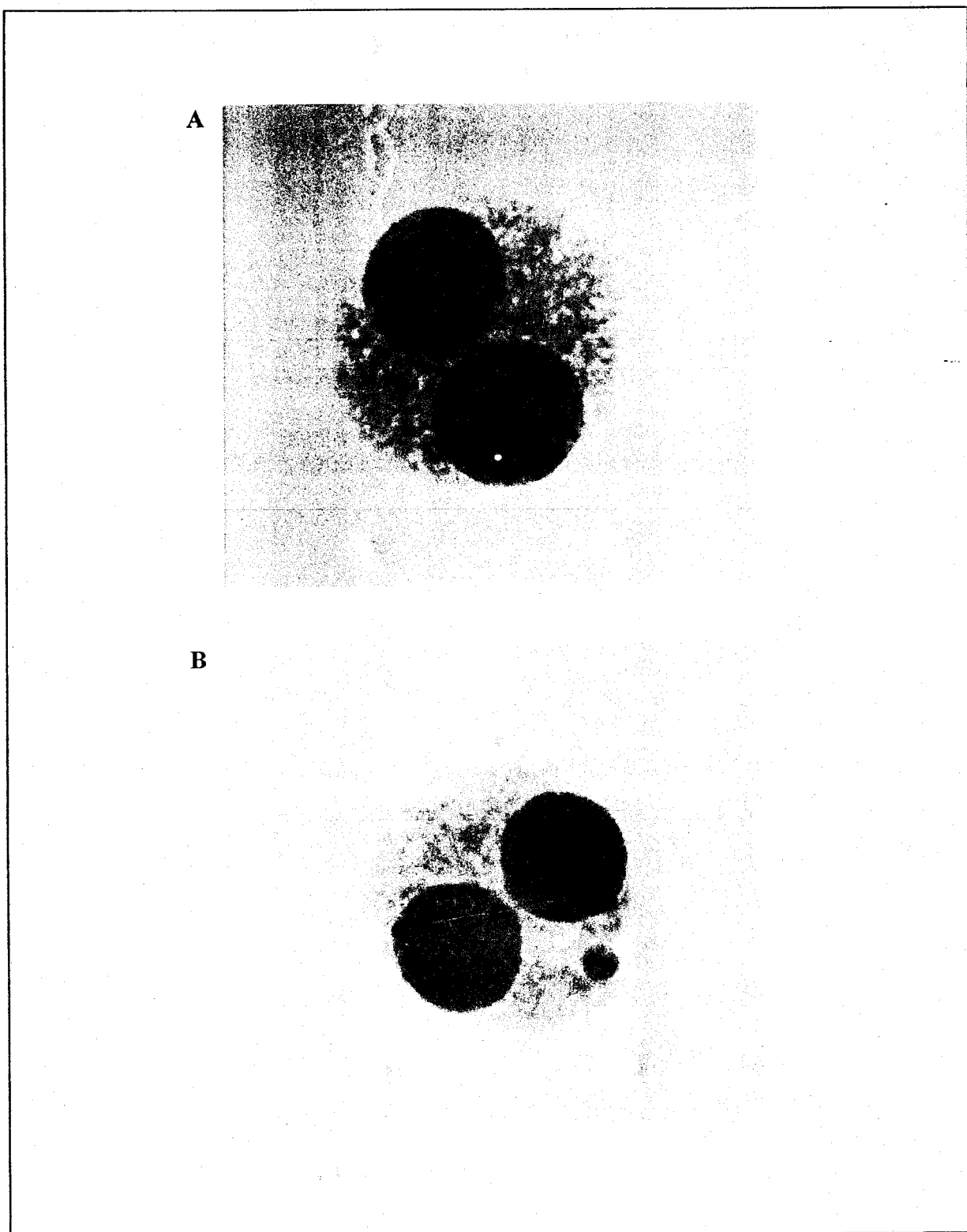


Figura 14. Linfocitos bloqueados en citocinesis por efecto de la citocalasina B. (A) Célula binucleada normal (aparentemente no dañada). (B) Célula binucleada que muestra un micronúcleo (célula dañada).

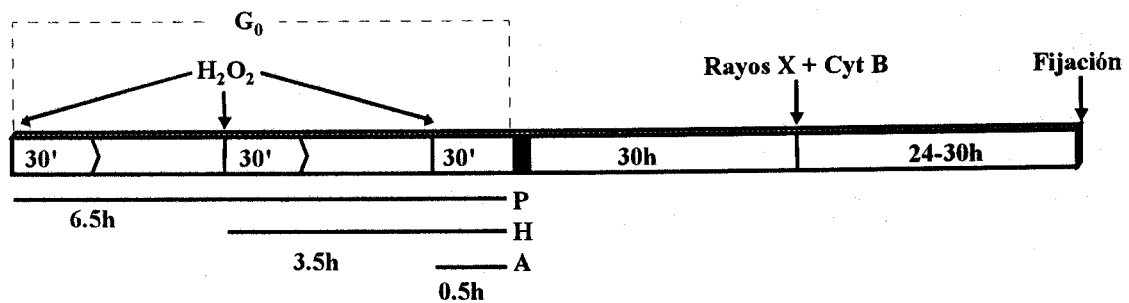


Figura 15. Protocolo experimental para estudiar la respuesta adaptativa en linfocitos humanos condicionados en G_0 con H_2O_2 . Linfocitos de tres donantes se trataron con $250 \mu M$ de H_2O_2 en forma de un único pulso de 30 min. a distintos tiempos antes de la estimulación con PHA. El tratamiento de prueba (1.5 Gy de rayos X) se administró 30 horas después de la estimulación y las células se fijaron tras permanecer de 24 a 30 horas en presencia de Cyt B, administrada inmediatamente después de irradiar.

La tabla 1 muestra las frecuencias de micronúcleos en células binucleadas tras el tratamiento condicionante con H_2O_2 en G_0 , el tratamiento de prueba con 1.5 Gy de rayos X aplicado 30 horas después de la estimulación y ambos tratamientos combinados. Se muestran los resultados obtenidos para tres donantes. Las células empleadas como control negativo recibieron exactamente el mismo tratamiento que las demás excepto la dosis de peróxido o de rayos X.

La frecuencia de micronúcleos en células tratadas solamente con H_2O_2 era claramente menor que la inducida por la dosis de prueba de rayos X utilizada. El control tenía una frecuencia de micronúcleos mucho menor que las células tratadas con rayos X y muy similar entre los distintos donantes, siendo 10.5, 12 y 10.5%. Cabe destacar, sin embargo, la variabilidad existente en la inducción de micronúcleos con 1.5 Gy de rayos X para nuestros donantes, obteniéndose una frecuencia de 146.5% para el donante A, 264% para B y 303.5% para C. Estos datos estarían de acuerdo con los obtenidos por otros autores, quienes observaron distinta sensibilidad a los rayos X en linfocitos humanos obtenidos de diferentes donantes (Catena y col., 1994). La sangre completa contiene distintas sustancias capaces de actuar como secuestradores de los radicales producidos por la radiación, y la concentración de dichas moléculas podría variar en los linfocitos cultivados en sangre completa para los distintos individuos. Además, los linfocitos presentan distinta sensibilidad a los rayos X según la fase del ciclo celular en que se encuentren (Kiefer, 1990; Catena y col., 1994), por lo que no es de extrañar que las células de los distintos donantes, si son irradiadas en distintos momentos del

ciclo celular, presenten diferencias en el nivel de daño inducido por radiación como consecuencia de la distinta respuesta interindividual al mitógeno.

Tabla 1.
Respuesta adaptativa en linfocitos humanos condicionados en G₀ con 250 µM de H₂O₂ a distintos tiempos antes de la estimulación.

Donante	Tratamiento condicionante (H ₂ O ₂)	Tratamiento de prueba (Rayos X)	Número de micronúcleos		
			Observados		Esperados ^a
			Nº	%	%
A	-	-	21	10.5	-
	6.5 h	-	17	8.5	-
	3.5 h	-	20	10.0	-
	0.5 h	-	35	17.5	-
	-	1.5 Gy	293	146.5	-
	6.5 h	1.5 Gy	218	126.5 ^{c*}	144.5
	3.5 h	1.5 Gy	152	85.7 ^{b**}	146.0
	0.5 h	1.5 Gy	140	70.0 ^b	153.5
B	-	-	24	12.0	-
	6.5 h	-	12	6.0	-
	3.5 h	-	12	6.0	-
	0.5 h	-	15	7.5	-
	-	1.5 Gy	528	264.0	-
	6.5 h	1.5 Gy	308	154.0 ^b	258.0
	3.5 h	1.5 Gy	351	175.5 ^b	258.0
	0.5 h	1.5 Gy	327	163.5 ^b	259.5
C	-	-	21	10.5	-
	6.5 h	-	25	12.5	-
	3.5 h	-	17	8.5	-
	0.5 h	-	15	7.5	-
	-	1.5 Gy	607	303.5	-
	6.5 h	1.5 Gy	404	202.0 ^b	305.5
	3.5 h	1.5 Gy	406	203.0 ^b	301.5
	0.5 h	1.5 Gy	434	217.0 ^b	300.5

a. Suma de los dos tratamientos individuales menos el control.

b. Frecuencia observada significativamente menor que la esperada ($p < 0.01$) (*t*-Student de una cola).

c. Frecuencia observada significativamente menor que la esperada ($p < 0.05$).

En todos los casos se analizaron 2000 células binucleadas excepto: * 1723 ** 1772

En los tratamientos combinados de peróxido de hidrógeno y rayos X, la frecuencia esperada de micronúcleos se calculó como la suma de los dos tratamientos individuales menos el control. Independientemente de la variabilidad observada previamente respecto al daño producido por rayos X en los distintos donantes, la diferencia entre la frecuencia de micronúcleos esperada y la observada para estos tratamientos combinados fue, en todos los

casos, estadísticamente significativa, con un valor de $p < 0.01$, excepto para el donante A cuando se condicionaba con peróxido 6.5h antes de la estimulación (tabla 1), siendo en este caso $p < 0.05$ utilizando el test *t*-Student. Podemos decir, por tanto, que los linfocitos humanos condicionados con H_2O_2 en G_0 mostraban una clara respuesta adaptativa al tratamiento de prueba con 1.5 Gy de rayos X administrado 30 horas después de la estimulación, observándose reducciones en la producción de micronúcleos respecto al valor esperado que oscilaban entre un 12.5% y un 54.5% aproximadamente para los donantes analizados.

Por otra parte, podemos afirmar que, dentro de los horarios establecidos en nuestro protocolo experimental, el tiempo transcurrido entre el pulso de H_2O_2 y el momento de la estimulación no parece ser un factor que influya en la inducción de la respuesta, ya que ésta se induce incluso en el caso de haber condicionado las células 6.5 horas antes de la estimulación, siendo similar en los tres tiempos (6.5, 3.5 ó 0.5 horas antes de añadir la fitohemaglutinina). No obstante, en el donante A parece haber una relación dependiente del momento del condicionamiento en respuesta a los rayos X, aunque se trata de una excepción respecto a los demás donantes. Se ha propuesto que, tras recibir la dosis condicionante, se activarían una serie de señales celulares que actuarían como una señal de alarma (implicando la actividad de una quinasa C) que llegaría al núcleo y resultaría en la activación de una serie de genes que llevaría a una reparación más eficaz del daño infligido por la dosis de prueba. Es posible que tanto esta señal como los productos génicos permanezcan activos en el citoplasma hasta que irradiamos las células, lo que explicaría que las células presenten la respuesta adaptativa independientemente del tiempo transcurrido entre el condicionamiento y la dosis de prueba. Por otro lado, se ha propuesto que la respuesta adaptativa no parece depender solamente de una reparación más eficiente del daño inducido por la dosis alta de mutágeno, sino de un balance entre esta reparación y un nivel menor de daño inicial producido por la dosis alta, de forma que la dosis adaptativa podría inducir un cambio en la conformación de la cromatina que la haría más resistente a la dosis de prueba (Wojewodzka y col., 1994; Tempel y Schleifer, 1995; Wojcik y col., 1996). Este cambio en la conformación de la cromatina, a su vez, puede ser originado como resultado de la expresión de nuevos genes tras la adaptación, y se ha comprobado que persiste durante, al menos, 21 horas en linfocitos humanos estimulados y condicionados con H_2O_2 o con rayos X (Wojewodzka y col., 1994).

Nuestros resultados, por tanto, demuestran que la respuesta adaptativa a los rayos X puede ser inducida en G_0 con peróxido de hidrógeno, siendo la magnitud de esta respuesta, en

general, mayor que la obtenida por otros autores con la misma dosis de H_2O_2 cuando se administra en linfocitos humanos estimulados, siguiendo un protocolo similar y midiendo el daño mediante el ensayo de micronúcleos en células binucleadas (Domínguez y col., 1993).

En segundo lugar, quisimos investigar si una dosis baja de rayos X era capaz de activar también este sistema de defensa celular frente a la exposición posterior a una dosis mayor de rayos X en linfocitos quiescentes, ya que los resultados de distintos autores son contradictorios, como ya mencionamos anteriormente.

Para este tipo de experimentos, el condicionamiento se administró justo antes de estimular el cultivo (figura 16), administrándose el tratamiento de prueba (1.5 Gy de rayos X) después de estimular, de forma similar al protocolo anterior. Para condicionar las células se empleó una dosis de 2 cGy de rayos X administrada a distintas tasas de dosis (1, 10 y 20 cGy/min.) de forma similar a otros autores, pero empleando el método de bloqueo en citocinesis, que había dado tan buenos resultados cuando se condicionaron con H_2O_2 tanto linfocitos humanos en G_0 como estimulados.

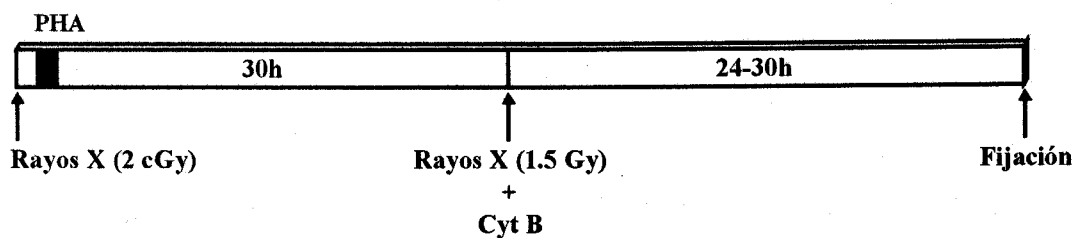


Figura 16. Protocolo experimental para estudiar la respuesta adaptativa en linfocitos humanos condicionados en G_0 con una dosis baja de rayos X. Linfocitos de tres donantes se trataron con 2 cGy de rayos X a distintas tasas de dosis (1, 10 y 20 cGy/min.) antes de la estimulación con PHA. El tratamiento de prueba con 1.5 Gy de rayos X se administró 30 horas después de la estimulación y las células se fijaron tras permanecer de 24 a 30 horas en presencia de Cyt B, administrada inmediatamente después de irradiar.

En la tabla 2 podemos observar los resultados obtenidos con los distintos tratamientos: control, condicionamiento con 2 cGy de rayos X (a distintas tasas de dosis antes de la estimulación con fitohemaglutinina), tratamiento de prueba con 1.5 Gy de rayos X y los tratamientos combinados (2 cGy + 1.5 Gy).

La dosis condicionante de rayos X por sí sola produjo una frecuencia baja de micronúcleos, independientemente de la tasa de dosis empleada, siendo, como era de esperar, mucho menor que la frecuencia producida por el tratamiento de prueba, que resultó en 273%

para el donante A, 289.5‰ para el B y 233.5‰ para el donante C. Al contrario de lo observado en el experimento anterior, en este caso no parece existir una diferencia tan acusada en cuanto al daño inducido por la dosis alta de rayos X entre los distintos donantes.

Tabla 2.

Respuesta adaptativa en linfocitos humanos condicionados en G_0 con 2 cGy de rayos X a distintas tasas de dosis antes de la estimulación.

Donante	Tratamiento condicionante (Rayos X)	Tratamiento de prueba (Rayos X)	Número de micronúcleos			
			Observados		Esperados ^a	
			Nº	‰	‰	
A	-	-	10	5.0	-	
	1 cGy/min.	-	17	8.5	-	
	10 cGy/min.	-	21	10.5	-	
	20 cGy/min.	-	23	11.5	-	
	-	1.5 Gy	546	273.0	-	
	1 cGy/min.	1.5 Gy	483	241.5 ^b	276.5	
	10 cGy/min.	1.5 Gy	530	265.0 ^{ns}	278.5	
	20 cGy/min.	1.5 Gy	502	251.0 ^b	279.5	
	B	-	-	10	5.0	-
		1 cGy/min.	-	17	8.5	-
10 cGy/min.		-	11	5.5	-	
20 cGy/min.		-	9	4.5	-	
-		1.5 Gy	579	289.5	-	
1 cGy/min.		1.5 Gy	515	257.5 ^b	293.0	
10 cGy/min.		1.5 Gy	644	322.0 ^{ns}	290.0	
20 cGy/min.		1.5 Gy	545	272.5 ^{ns}	289.0	
C	-	-	15	7.5	-	
	1 cGy/min.	-	17	8.5	-	
	10 cGy/min.	-	27	13.5	-	
	20 cGy/min.	-	14	7.0	-	
	-	1.5 Gy	467	233.5	-	
	1 cGy/min.	1.5 Gy	379	189.5 ^b	234.5	
	10 cGy/min.	1.5 Gy	533	266.5 ^{ns}	239.5	
	20 cGy/min.	1.5 Gy	500	250.0 ^{ns}	233.0	

a. Suma de los dos tratamientos individuales menos el control.

b. Frecuencia observada significativamente menor que la esperada ($p < 0.01$) (*t*-Student de una cola).

ns. Estadísticamente no significativo.

En todos los casos se analizaron 2000 células binucleadas.

En general, solamente las células condicionadas a la tasa de dosis más baja, 1 cGy/min., mostraron adaptación al tratamiento de prueba con 1.5 Gy de rayos X de forma consistente, siendo la diferencia entre los micronúcleos observados y esperados estadísticamente significativa con $p < 0.01$. Aunque el donante A muestra la respuesta también para la mayor tasa

de dosis, esto parece representar un hecho aislado. La disminución en la frecuencia de micronúcleos observados frente a los esperados oscila en este caso entre un 4.8 y un 19.1%, siendo, por tanto, de menor magnitud que la diferencia observada cuando las células eran condicionadas con H_2O_2 . Cuando se emplearon tasas de dosis más altas (10 y 20 cGy/min.) no se veía una diferencia estadísticamente significativa entre el número de micronúcleos observado y el esperado, siendo incluso los valores observados mayores que los esperados en algunos casos (tabla 2).

Actualmente no existe una clara explicación para los resultados contradictorios obtenidos por los diferentes autores; sin embargo, centrándonos en el daño cromosómico, nuestros resultados parecen apoyar los datos previamente publicados por otros autores condicionando con una dosis baja de rayos X, aunque en este último caso, el nivel de daño no fue evaluado mediante el ensayo de micronúcleos en células binucleadas. Cai y Liu (1990) observaron una respuesta adaptativa en linfocitos humanos y en linfocitos de conejo condicionados en G_0 con una dosis baja de rayos X administrada a una tasa de dosis de 1cGy/min., lo que concuerda con nuestros resultados. Por otra parte, en otros trabajos donde no parece existir respuesta ni en linfocitos en G_0 (Shadley y col., 1987; Wang y col., 1991) ni estimulados (Schmid y col., 1989), se han empleado dosis totales condicionantes de rayos X similares a las nuestras (1, 2 ó 5 cGy) pero a tasas de dosis mayores, de 20 cGy/min. (empleada también por nosotros con resultado negativo) y 40 cGy/min., lo cual parece de nuevo confirmar nuestros resultados cuando condicionamos las células con altas tasas de dosis de rayos X.

Se ha propuesto que la falta de respuesta adaptativa en linfocitos en G_0 pudiera ser debida a que los linfocitos estimulados presentan un mayor nivel de reparación que los quiescentes (Shadley y col., 1987), aunque nuestros resultados no concuerdan con ello, ya que hemos podido observar una clara adaptación a los rayos X cuando los linfocitos en G_0 se condicionaron con H_2O_2 hasta 6.5 horas antes de la estimulación (tabla 1). Respecto a los linfocitos estimulados, también se ha propuesto que la dosis condicionante ha de administrarse en un determinado rango para que se induzca la respuesta adaptativa, es decir, se debe producir un número determinado de lesiones en un periodo de tiempo limitado (Shadley y Wiencke, 1989), de manera que si se da una dosis determinada a una tasa de dosis alta se formarían demasiadas lesiones por unidad de tiempo, dando lugar a una saturación que impediría la inducción de la respuesta adaptativa. Asimismo, las lesiones podrían interaccionar eliminando la señal inductora y originando otro tipo de lesiones que no inducirían la respuesta.

Nuestros resultados parecen apoyar esta hipótesis también en linfocitos en G_0 . Por otro lado, si una dosis condicionante se administra a una tasa de dosis demasiado baja, las lesiones no serían lo suficientemente numerosas como para producir la señal inductora.

De nuestros resultados podemos por tanto concluir que los linfocitos humanos no estimulados y condicionados con una dosis baja de rayos X pueden mostrar una respuesta adaptativa a los rayos X, considerando como medida del daño la producción de micronúcleos en células binucleadas. Esta adaptación parece depender de la tasa de dosis y no alcanza, en ningún caso, el nivel observado en las células tratadas con peróxido de hidrógeno como condicionante. Este hecho podría explicarse por la existencia de un umbral en el nivel de las lesiones necesarias para inducir la radioprotección, que a su vez depende del tipo de agente empleado para el condicionamiento, ya que el espectro y tipo de daño en el ADN varía según el agente.

3.1.2. Respuesta adaptativa en linfocitos bovinos y de conejo estimulados

Aunque se han llevado a cabo muchos estudios sobre la respuesta adaptativa en humanos, son más escasos los que se han realizado en cultivos primarios de otros organismos de interés con riesgo de una posible exposición a radiación medioambiental. Cai y Liu (1990), mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas, han demostrado que los linfocitos de conejo mostraban una respuesta adaptativa a los rayos X cuando eran condicionados con una dosis baja de rayos X en distintas fases del ciclo celular (G_0 , G_1 , S y G_2), y esta respuesta se ha observado también a nivel de aberraciones cromosómicas en conejos condicionados *in vivo* con rayos γ (Liu y col., 1992). En este sentido, una vez probada la existencia de la respuesta adaptativa a los rayos X en linfocitos humanos condicionados en G_0 con H_2O_2 nuestro interés fue estudiar este fenómeno en linfocitos estimulados de otros organismos, evaluándolo mediante el método del bloqueo de la citocinesis. Para este estudio comparativo elegimos el cultivo de linfocitos procedentes de dos especies distintas, vacas y conejos.

Con ambos tipos de linfocitos decidimos seguir el mismo protocolo que previamente se había comprobado que era útil para estudiar la adaptación a los rayos X en linfocitos humanos condicionados con H_2O_2 una vez estimulados (Domínguez y col., 1993). Experimentos preliminares mostraron que estas células eran más sensibles que los linfocitos humanos tanto al

peróxido de hidrógeno como a los rayos X, produciéndose una alta tasa de muerte celular, por lo que tuvimos que reducir las dosis de ambos agentes (condicionante y de prueba). Asimismo, se aumentó el tiempo de estimulación de 24 horas, que era el empleado con linfocitos humanos, hasta 48 horas, ya que habíamos comprobamos que el tiempo que permanecían estimulándose antes del condicionamiento influía en el número de células binucleadas que encontrábamos.

Los linfocitos bovinos se estimularon con fitohemaglutinina durante 48 horas, tras las cuales se sometieron a un pulso de 30 min. con las concentraciones elegidas de H_2O_2 (5, 25 y 50 μM). Transcurridas 24 horas se expusieron al tratamiento de prueba con 1 Gy de rayos X, y tras permanecer 24 horas más en presencia de citocalasina B se fijaron las células (figura 17).

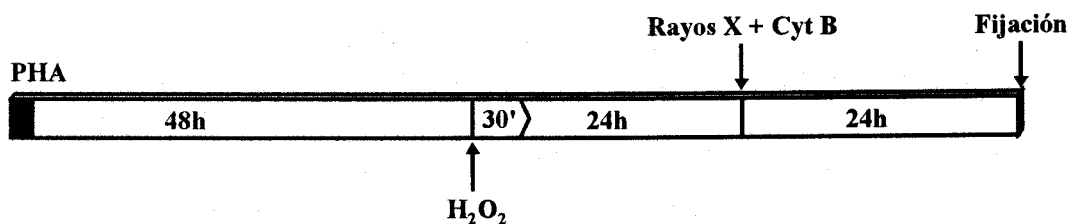


Figura 17. Protocolo experimental para estudiar la respuesta adaptativa en linfocitos bovinos y de conejo condicionados con H_2O_2 . Linfocitos de dos animales se sometieron a un pulso de 30 min. con distintas concentraciones de H_2O_2 (5, 25, 50 y 75 μM) 48 después de la estimulación. El tratamiento de prueba (1 Gy de rayos X) se administró 24 horas después del condicionamiento y las células se fijaron tras permanecer 24 horas en presencia de Cyt B, administrada inmediatamente después de irradiar.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la producción de micronúcleos en células binucleadas para dos animales con los distintos tratamientos: control, H_2O_2 , rayos X y la combinación de ambos. Se puede observar que uno de los animales (A) presenta un nivel basal de micronúcleos alto y parece ser muy sensible al peróxido de hidrógeno, dándose una frecuencia muy alta de micronúcleos con el tratamiento condicionante (hasta un 79.5% con 25 μM de H_2O_2), valor aproximadamente 5 veces mayor que lo observado con la misma dosis de H_2O_2 en linfocitos humanos estimulados (Dominguez y col., 1993) y 6 veces mayor que en el animal B. Sin embargo, la sensibilidad a los rayos X no parecía variar entre los dos animales, produciéndose un número similar de micronúcleos, 139% en el animal A y 145% en el B. De todos modos, a pesar de esta sensibilidad por parte

de uno de los animales al H₂O₂, éste mostró la respuesta adaptativa para todas las dosis de H₂O₂ empleadas.

Tabla 3.
Respuesta adaptativa en linfocitos bovinos condicionados con distintas dosis de H₂O₂ 48 horas después de la estimulación.

Animal	Tratamiento condicionante (H ₂ O ₂)	Tratamiento de prueba (Rayos X)	Número de micronúcleos		
			Observados		Esperados ^a
			Nº	%	%
A	-	-	38	19.0	-
	5 µM	-	33	16.5	-
	25 µM	-	159	79.5	-
	50 µM	-	114	57.0	-
	-	1 Gy	278	139.0	-
	5 µM	1 Gy	216	108.0 ^b	136.5
	25 µM	1 Gy	319	159.5 ^b	199.5
	50 µM	1 Gy	271	135.5 ^b	177.0
B	-	-	16	8.0	-
	5 µM	-	23	11.5	-
	25 µM	-	25	12.5	-
	50 µM	-	30	15.0	-
	-	1 Gy	290	145.0	-
	5 µM	1 Gy	178	89.0 ^b	148.5
	25 µM	1 Gy	172	86.0 ^b	149.5
	50 µM	1 Gy	187	93.5 ^b	152.0

a. Suma de los dos tratamientos individuales menos el control.

b. Frecuencia observada significativamente menor que la esperada ($p < 0.01$) (*t*-Student de una cola).

En todos los casos se analizaron 2000 células binucleadas.

En ambos animales, para los tratamientos combinados, la diferencia entre el número observado de micronúcleos y el esperado fue siempre estadísticamente significativa, con $p < 0.01$, lo que indica que estas células muestran una respuesta adaptativa a los rayos X cuando son condicionadas con H₂O₂ pese a la sensibilidad a este agente observada en uno de los animales (A). El pretratamiento con H₂O₂ resultó en una clara disminución de la producción de micronúcleos, aunque la diferencia entre las frecuencias de micronúcleos esperadas y observadas era mayor en el animal B (de menor sensibilidad al peróxido), alcanzándose valores de hasta un 42.5% de reducción del daño.

Lu y colaboradores (1993) examinaron la respuesta adaptativa al estrés oxidativo en células vasculares endoteliales procedentes de vacas condicionando con H₂O₂ y empleando

este mismo agente como tratamiento de prueba. Estos autores observaron que las células expuestas a 40 y 80 μM de H_2O_2 mostraban mayor viabilidad y menor nivel de daño cuando se trataban posteriormente con 1 mM de peróxido de hidrógeno. Por otro lado, Cortés y colaboradores (1990b) y Domínguez y colaboradores (1993) comprobaron la existencia de respuesta adaptativa a los rayos X en linfocitos humanos estimulados y condicionados con H_2O_2 . Nuestros resultados concuerdan con los datos expuestos anteriormente y podemos decir, por tanto, que los linfocitos bovinos muestran una clara respuesta adaptativa a los rayos X cuando se condicionan con peróxido de hidrógeno.

Los linfocitos de conejo, contrariamente a lo observado en linfocitos bovinos, no son tan sensibles al H_2O_2 , por lo que se siguió un protocolo experimental igual al anterior, con distintas dosis de H_2O_2 . Las dosis elegidas en este caso fueron 25, 50 y 75 μM , dos de las cuales eran iguales a las empleadas en los linfocitos bovinos y una más alta. La dosis de prueba fue también de 1 Gy de rayos X (figura 17; tabla 4).

Tabla 4.
Respuesta adaptativa en linfocitos de conejo condicionados con distintas dosis de H_2O_2 48 horas después de la estimulación.

Animal	Tratamiento condicionante (H_2O_2)	Tratamiento de prueba (Rayos X)	Número de micronúcleos		
			Observados		Esperados ^a
			Nº	%	%
A	-	-	9	4.5	-
	25 μM	-	9	4.5	-
	50 μM	-	9	4.5	-
	75 μM	-	13	6.5	-
	-	1 Gy	556	278.0	-
	25 μM	1 Gy	443	221.5 ^b	278.0
	50 μM	1 Gy	301	150.5 ^b	278.0
	75 μM	1 Gy	486	243.0 ^b	280.0
B	-	-	12	6.0	-
	25 μM	-	6	3.0	-
	50 μM	-	10	5.0	-
	75 μM	-	10	5.0	-
	-	1 Gy	592	296.0	-
	25 μM	1 Gy	427	213.5 ^b	293.0
	50 μM	1 Gy	409	204.5 ^b	295.0
	75 μM	1 Gy	468	234.0 ^b	295.0

a. Suma de los dos tratamientos individuales menos el control.

b. Frecuencia observada significativamente menor que la esperada ($p < 0.01$) (*t*-Student de una cola).

En todos los casos se analizaron 2000 células binucleadas.

Como se puede observar en la tabla 4, la frecuencia de micronúcleos producidos por el H_2O_2 es menor que en los linfocitos bovinos (tabla 3), lo que es indicativo de una menor sensibilidad de estas células al agente oxidante. Sin embargo, el número de micronúcleos producidos por 1 Gy de rayos X es aproximadamente 2 veces mayor en las células de conejo (278 y 296 ‰, según el animal). Esta sensibilidad a los rayos X se había descrito en linfocitos de conejo cuando Cai y Liu (1990) estudiaron la respuesta adaptativa en linfocitos humanos y de conejo. Analizando las aberraciones cromosómicas, observaron valores aproximadamente 2.5 veces mayores en el porcentaje de aberraciones cromatídicas para estos últimos cuando fueron irradiados con la dosis de prueba de 1.5 Gy.

En nuestro caso, ambos animales mostraron una respuesta de similar magnitud, oscilando las diferencias entre valores observados y esperados para los tratamientos combinados (condicionamiento con peróxido + dosis alta con rayos X) entre un 13.2% y 45.8%. Es decir, que de forma parecida a los experimentos anteriores con linfocitos humanos en G_0 (tabla 1) y linfocitos bovinos estimulados (tabla 3), cuando los linfocitos de conejo son condicionados con H_2O_2 la diferencia entre la frecuencia de micronúcleos observada y la esperada para los tratamientos combinados fue estadísticamente significativa para ambos animales ($p < 0.01$). Por tanto, mostraban respuesta adaptativa para todas las dosis de H_2O_2 empleadas, aunque no se observó dosis-dependencia (tabla 4).

Nuestros resultados indican que los linfocitos de conejo previamente estimulados expresan la respuesta adaptativa frente a los rayos X cuando son condicionados con H_2O_2 , lo cual apoya los resultados obtenidos previamente tanto *in vitro* como *in vivo* (Cai y Liu, 1990; Liu y col., 1992). Podemos decir, por tanto, que esta respuesta adaptativa observada a nivel citogenético podría ser un mecanismo de defensa celular universal frente a los daños medioambientales que reciben los organismos (Cortés y col., 1990a, 1990b; Boreham y Mitchel, 1991; Liu y col., 1992; Schäppi-Büchi, 1994; Tempel y Schleifer, 1995).

3.1.3. Consideraciones generales

Aunque la base molecular exacta de la respuesta adaptativa no se conoce en profundidad, se ha propuesto que la resistencia inducida a la radiación ionizante podría ser debida a la

inducción de algún proceso molecular con la dosis baja, que daría lugar a una reparación más eficaz de los efectos de una dosis posterior más alta.

Para la expresión de la respuesta adaptativa parece ser que se requiere la síntesis *de novo* de proteínas, ya que la respuesta puede ser abolida tratando las células con el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida durante el periodo transcurrido entre la dosis condicionante y la de prueba (Youngblom y col., 1989). De hecho se ha detectado la presencia de proteínas recién sintetizadas durante las primeras horas tras el condicionamiento en linfocitos humanos y fibroblastos de ratón y hámster chino (Wolff y col., 1989; Wiese y col., 1995), y también se ha demostrado que las células irradiadas con 2 cGy presentan algunos ARNm que no aparecen en células no irradiadas (Wolff, 1996).

Las pruebas más directas de la posible participación de un sistema de reparación en la respuesta adaptativa derivan de los resultados obtenidos mediante la inhibición de la poli(ADP-ribosa)polimerasa, enzima implicada en la reparación cuyos niveles aumentan considerablemente cuando se producen roturas de cadena en el ADN. Esta enzima parece ser necesaria para que se induzca la respuesta adaptativa, ya que la inhibición de la misma mediante 3-aminobenzamida tras la dosis de prueba impide la respuesta adaptativa (Wiencke y col., 1986; Shadley y Wolff, 1987; Wojewodzka y col., 1994).

Otra enzima posiblemente implicada en la inducción de la respuesta adaptativa es la quinasa C, cuyos niveles se incrementan con la exposición a radiación ionizante (Woloschak y col., 1990). La presencia de quelantes de calcio o del antagonista TMB8 impide la adaptación en linfocitos humanos tratados con H_2O_2 o rayos X, lo que apoyaría la hipótesis de que la transducción de la señal inducida por la dosis condicionante implica la activación de la quinasa C, ya que esta enzima es activada por la presencia de Ca^{2+} intracelular (Wojewodzka y col., 1994). Así, la activación de la quinasa C iniciaría una cascada de fosforilación que llevaría a la inducción de genes de respuesta temprana. Los productos de estos genes, incluyendo factores de transcripción, podrían regular la expresión de otros genes que en última instancia contribuirían al efecto protector frente al daño en el ADN.

En cuanto a la señal inductora de esta respuesta, se ha especulado sobre los distintos tipos de lesiones que podrían ser responsables. Se ha observado que condicionando linfocitos humanos estimulados con enzimas de restricción, que inducen roturas de doble cadena en el ADN, se reduce el número de aberraciones producidas por 1.5 Gy de rayos X, lo que indicaría que las roturas de doble cadena podrían inducir la adaptación (Wolff, 1996). Sin embargo,

existen diferentes pruebas consistentes que sugieren que las roturas de cadena simple son mucho más eficientes como señal inductora de la radioprotección (Boreham y Mitchel, 1991; Marples y col., 1994; Marples y Joiner, 1995).

El daño inducido por los rayos X se atribuye parcialmente a la producción de radicales libres debido a la radiolisis del agua, que son originados también por el H_2O_2 (Ward, 1990) y dan lugar a la producción de roturas de cadena simple en el ADN, además de otro tipo de lesiones. Marples y colaboradores (1994) demostraron que las células V-79 desarrollaban radioprotección cuando eran irradiadas con radiación de baja LET (piones, $10-20 \text{ keV}/\mu\text{m}$) mientras que no era así cuando se irradiaban con radiaciones de alta LET (piones, $35 \text{ keV}/\mu\text{m}$), y concluyeron que la rotura de cadena simple podría ser la lesión inductora, ya que el número de roturas de cadena simple producidas por radiación de alta LET es mucho menor que en el caso de baja LET. Por otro lado, Marples y Joiner (1995) han demostrado que el tratamiento con H_2O_2 o rayos X como condicionante elimina la hipersensibilidad de células V-79 a dosis bajas de rayos X, lo que también implicaría que las roturas de cadena simple son las lesiones responsables de esta radioprotección. Asimismo, en levaduras se ha demostrado que las roturas de cadena simple son las lesiones implicadas en la inducción de radiorresistencia a la muerte celular (Boreham y Mitchel, 1991). Estos últimos autores propusieron que este tipo de roturas eran más eficientes en la inducción del sistema de reparación por recombinación que las roturas de doble cadena.

Nuestros resultados a nivel citogenético, tanto en linfocitos humanos en G_0 como en linfocitos bovinos y de conejo estimulados, confirman esta última hipótesis, ya que el H_2O_2 induce casi exclusivamente roturas de cadena simple en el ADN, lo que concuerda con los resultados obtenidos por los anteriores autores a nivel de supervivencia celular, tanto en levaduras como en fibroblastos de hámster chino (Boreham y Mitchel, 1991; Marples y col., 1994; Marples y Joiner, 1995).

Los resultados obtenidos en G_0 respecto a la diferencia que hay en el nivel de inducción de la respuesta con H_2O_2 y rayos X también confirmarían esta hipótesis, ya que la producción de las roturas de cadena simple varía considerablemente entre los rayos X y el H_2O_2 , siendo mucho mayor para este último agente (Ward y col., 1985). La radiación ionizante, además de dañar directamente el ADN, produce principalmente grupos de radicales que dan lugar a ataques múltiples localizados en el ADN, mientras que no ocurre lo mismo con el H_2O_2 (Ward y col., 1985). De esta manera, la diferencia observada podría ser debida a que las lesiones

inducidas directamente con el H_2O_2 son mucho más eficientes para inducir el sistema de reparación responsable de la posterior radiorresistencia.

Por otro lado, se ha postulado que las roturas de cadena simple podrían alterar la topología de la molécula de ADN, lo que induciría la respuesta. Como el H_2O_2 da lugar a las roturas de cadena simple a través de los radicales hidroxilo, que a su vez inducen radiorresistencia (Boreham y Mitchel, 1991), es probable que en nuestro sistema se induzca algún sistema de reparación de características similares al descrito.

3.2. MODULACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR BLEOMICINA CON LIGASA DEL FAGO T4

Los mecanismos de reparación del ADN, desarrollados en el curso de la evolución para hacer frente a lesiones de efectos deletéreos, son de una importancia fundamental en la estabilidad del material genético. Esta protección puede ser inducida exógenamente activando la propia maquinaria de reparación celular (como hemos mostrado en los apartados anteriores), aunque también es posible conseguir que las células afronten un nivel de daño superior al habitual proporcionándoles un aporte adicional de enzimas implicadas en reparación.

Se ha demostrado que, cuando se tratan líneas celulares defectuosas en alguna enzima de reparación con enzimas procedentes del mismo tipo celular (eficiente en reparación), dichas células son capaces de reparar mejor (Vermeulen y col., 1986; Tsongalis y col., 1990; Keeny y col., 1994). Por otra parte, existen trabajos que han demostrado el efecto positivo de enzimas aisladas de organismos procarióticos (ligasa del fago T4) en la reparación de las roturas de doble cadena en líneas celulares de roedores eficientes en reparación (Durante y col., 1991; Bryant y Johnston, 1993; Ortiz y col., 1995). Sin embargo, no hemos encontrado ningún dato en este sentido con respecto a humanos, y más concretamente en linfocitos obtenidos de sangre periférica.

Nuestro propósito, por tanto, ha sido analizar el efecto de la ligasa de ADN del fago T4 en la reparación del daño inducido por un agente químico radiomimético (bleomicina), tanto en una línea celular procedente de hámster chino (CHO6) como en linfocitos humanos en cultivo.

La bleomicina, al ser una molécula de gran tamaño, es un agente químico poco permeable en células intactas, por lo que su efecto no es uniforme en la población celular.

Cuando se administra en cultivo, tan solo aproximadamente un 0.1% de la bleomicina es incorporada por las células, y de esta cantidad tan solo un 20% alcanza el núcleo (Roy y Horwitz, 1984). Consecuentemente, la acción de esta droga es muy variable en la población celular (Östling y Johanson, 1987), por lo que no es de extrañar que los análisis de la distribución intercelular de las aberraciones cromosómicas muestren una sobredispersión, observándose un alto número de células que no presentan apenas daño mientras que otras aparecen muy dañadas (Dresp y col., 1978; Cortés y col., 1993).

Para resolver este problema, distintos autores han empleado recientemente diferentes métodos de permeabilización celular, obteniendo un efecto mucho mayor y más homogéneo de esta droga que en células no permeabilizadas. Johnston y Bryant (1993) examinaron el daño cromosómico inducido por bleomicina en fibroblastos de ovario de hámster chino (CHO-K1) permeabilizados con la toxina bacteriana estreptolisina-O y observaron un incremento en la efectividad biológica de la droga. Por otro lado, otros autores han demostrado recientemente que la electroporación es un método muy eficiente para introducir esta molécula en células de mamíferos demostrando una mayor citotoxicidad frente a la obtenida cuando no se aplica el pulso eléctrico (Tounekti y col., 1993; Belehradec y col., 1994).

Por estas razones, y teniendo en cuenta que la ligasa del fago T4 es también una macromolécula para la que las células son impermeables, decidimos emplear la electroporación como método para introducir ambos agentes en la célula con la intención de testar la posible modulación del daño inducido por bleomicina mediante ligasa exógena, tanto en la línea celular CHO6 como en linfocitos humanos en G₀. Electroporamos las células en presencia de ambas moléculas con el objetivo de que la célula que resultase permeabilizada tomase a la vez tanto la bleomicina como la ligasa.

3.2.1. Fibroblastos de ovario de hámster chino

3.2.1.1. Estudio dosimétrico del efecto de la bleomicina sobre la supervivencia celular

Con objeto de comprobar qué dosis de bleomicina era la apropiada para inducir un nivel de daño susceptible de ser modulado sin ser altamente tóxico para las células, se realizó una dosimetría en cultivos en paralelo electroporando la droga o añadiéndola al medio sin

electroporar. Para comprobar la efectividad de la electroporación en cuanto a favorecer la introducción de la bleomicina, se analizó la supervivencia celular de la línea CHO6.

Las células se trataron durante 30 min. con dosis crecientes de bleomicina, mediante electroporación o bien añadiéndola directamente al medio de cultivo sin electroporar, tras los cuales se diluyeron las células, y se sembraron para permitirles formar las colonias correspondientes (figura 18).

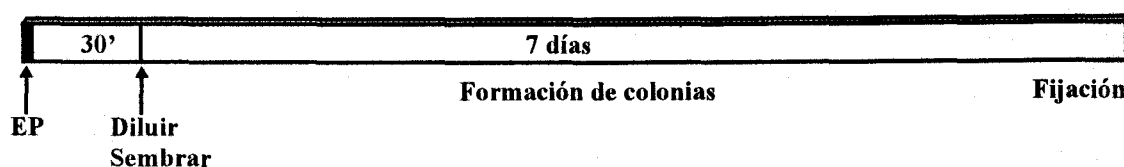


Figura 18. Protocolo experimental para estudiar el efecto de la bleomicina en la supervivencia de la línea CHO6. 800 μ l conteniendo aprox. 2.5×10^6 células se trataron con 75, 150, 300, 600, 1200, 2400 y 4800 nU de bleomicina bien electroporando (EP) o sin electroporar. Tras 30 min. de tratamiento las células se diluyeron y se sembraron, dejándose dividir durante una semana, tras lo cual se fijaron las colonias.

Teniendo en cuenta que la electroporación nos produce una muerte celular de aproximadamente un 50%, la fracción de supervivencia de los cultivos que habían sido tratados con bleomicina se calculó en relación a la eficiencia del cultivo electroporado o en relación a la del cultivo control (sin electroporar), dependiendo de si la bleomicina se introducía por electroporación o no.

Los resultados obtenidos muestran claramente que las células electroporadas con las distintas dosis de bleomicina presentaban un nivel menor de supervivencia que las no electroporadas (figura 19). Se puede comprobar como, con una misma dosis de bleomicina, y sobre todo a partir de 300 nU, la citotoxicidad de la droga aumenta de forma muy notable en las células permeabilizadas. Teniendo en cuenta estos datos, la dosis de la droga elegida para ensayar la posible modulación mediante ligasa exógena fue de 300 nU. Con esta dosis conseguíamos inducir una frecuencia de aberraciones cromosómicas (no se muestran los datos) y un valor de supervivencia celular susceptibles ambos de ser modulados. A la vez, esta dosis no tenía un efecto citotóxico tan alto como para impedir que las células llegaran a mitosis.

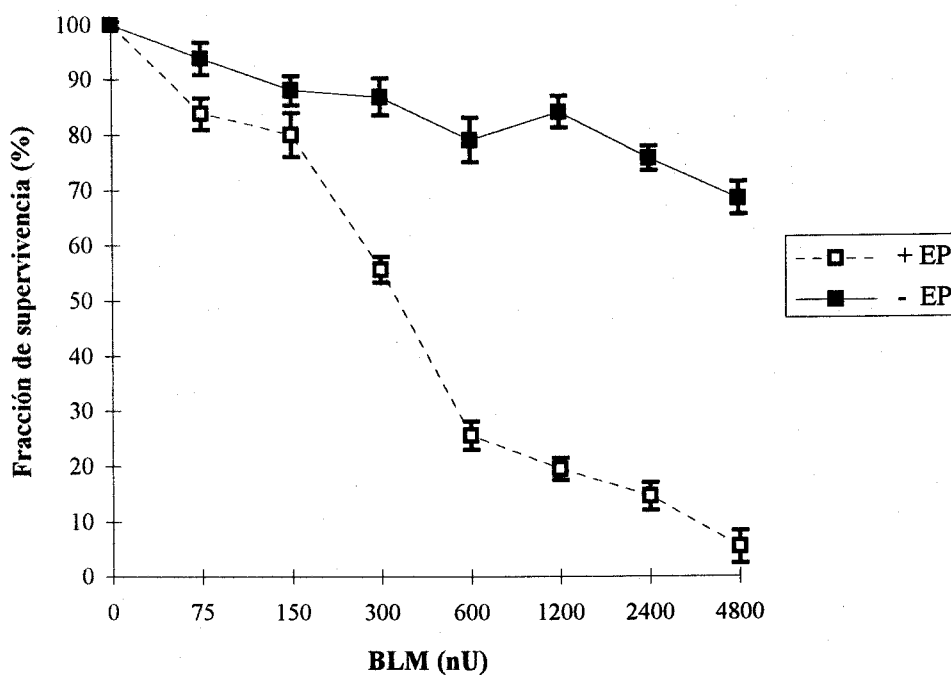


Figura 19. Efecto de la bleomicina en la supervivencia celular. Células CHO6 electroporadas (□) o sin electroporar (■) se trataron con distintas dosis de bleomicina y se midió la supervivencia celular (clonogenicidad) tras una semana de cultivo. Los diferentes puntos representan la media de tres experimentos independientes. Las barras representan el error estándar.

Una vez seleccionada la dosis apropiada, las células se electroporaron con bleomicina y ligasa del fago T4 para comprobar si la enzima era capaz de modular, al menos en cierta medida, el daño inducido por esta droga. Se realizaron tanto ensayos citogenéticos (análisis de la aberraciones cromosómicas) como de la capacidad clonogénica (análisis de la supervivencia celular).

3.2.1.2. Efecto de la ligasa de T4 sobre las aberraciones cromosómicas inducidas por bleomicina

Para estudiar el efecto de la ligasa en la modulación de las aberraciones cromosómicas inducidas por bleomicina, las células se electroporaron con 300 nU de bleomicina sola o conjuntamente con tres dosis distintas de ligasa de T4 (6, 12 y 18 U), y tras permanecer 30 min. en el incubador se sembraron, manteniéndose en cultivo durante 16 horas, tras las cuales

se añadió colcemida. Las células se fijaron 19 y 22 horas después de la electroporación para analizar la producción de aberraciones cromosómicas en células en metafase (figura 20A).

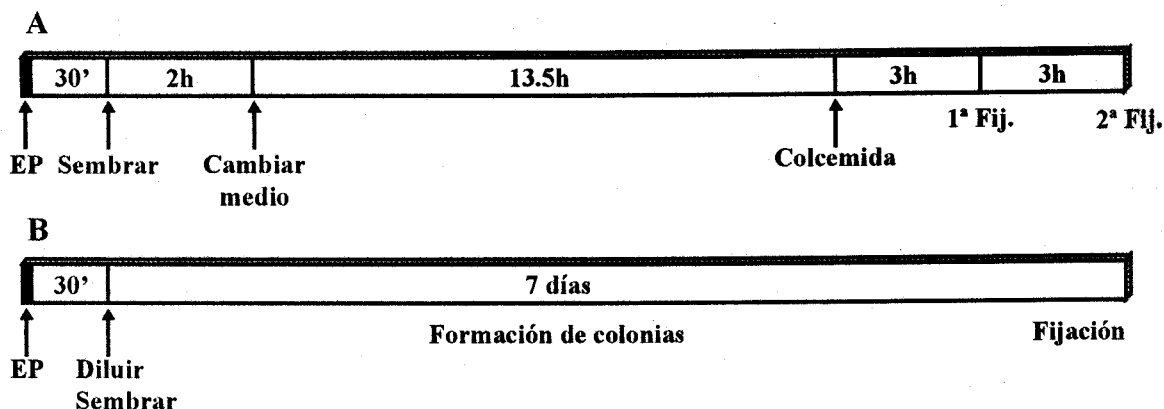


Figura 20. Protocolos experimentales para observar la posible modulación del efecto de la bleomicina con la ligasa del fago T4 en la línea celular CHO6. (A) Ensayo citogenético. Tras la electroporación, las células se sembraron y fijaron 19 ó 22 horas después (tras permanecer 3 horas en colcemida). (B) Ensayo clonogénico. De los mismos frascos anteriores, se tomó una alícuota que se diluyó. Las células se sembraron permaneciendo en las placas de cultivo durante una semana, tras la cual se fijaron las colonias.

El proceso de la electroporación induce un considerable retraso en las células proliferativas (Morgan y col., 1990) y éstas tienen distintos puntos de parada en el ciclo celular para reparar lo mejor posible el daño antes de replicar su ADN y entrar en mitosis (Kauffman y Paules, 1996), por lo que para los ensayos citogenéticos se emplearon varios tiempos de fijación (19, 22, 25 y 28 h). El número de aberraciones inducidas por la bleomicina disminuía considerablemente en las dos últimas fijaciones (no se muestran los datos), lo que indicaba que no estábamos recogiendo la subpoblación celular más afectada por la bleomicina. Así, 19 ó 22 horas nos resultaron tiempos óptimos de fijación para un tratamiento en G₁ de células electroporadas.

Por otro lado, teniendo en cuenta que en nuestro protocolo experimental el tiempo transcurrido entre la electroporación y la fijación es muy largo, podría resultar que algunas células menos afectadas por el tratamiento pudieran progresar más rápidamente en el ciclo celular, dando lugar a la aparición de segundas mitosis, diluyendo así el daño real. Para asegurarnos de que esto no estaba ocurriendo, se realizaron cultivos en paralelo en presencia de BrdU (ver materiales y métodos). Estas células fueron procesadas mediante la técnica FPG y comprobamos que, para nuestros tiempos óptimos de fijación, más de un 95% de las células

no mostraban tinción diferencial, por lo que podemos decir que estábamos analizando las primeras metafases después de llevar a cabo la electroporación.

En la tabla 5 podemos observar el número de aberraciones en 100 células, así como el porcentaje de células dañadas. Para la dosis de bleomicina empleada (300 nU) se observó un 44% y un 53% de metafases dañadas a las 19 y 22 horas, respectivamente, tras la electroporación, mostrando la mayoría de estas metafases de 1 a 3 aberraciones. Estos resultados demuestran la homogeneidad existente entre la población permeabilizada para la bleomicina, que es un punto importante a tener en cuenta cuando lo que se pretende es incorporar al interior celular dos moléculas diferentes, ya que tenemos que partir de la base de que ambas moléculas (bleomicina y ligasa) son incorporadas por la misma célula. Nuestros resultados confirman los datos aportados por otros autores (Tounekti y col., 1993; Belehradec y col., 1994; Tounekti y col., 1995) e indican que la electroporación es un método muy eficiente para introducir bleomicina en células de mamíferos, permitiéndonos reducir muchísimo la dosis empleada de bleomicina y evitando el problema de la sobredispersión del daño en la población celular.

Las roturas de doble cadena en el ADN son, en última instancia, las lesiones responsables de las aberraciones cromosómicas (Natarajan y Obe, 1984; Obe y col., 1992). Distintos autores han demostrado que la ligasa del fago T4 es capaz de reparar parte del daño inducido por diferentes enzimas de restricción (con extremos romos o cohesivos), quizás mediante la ligación simple de las roturas de doble cadena inducidas por estas enzimas, lo que resulta en un aumento de la supervivencia celular y en una disminución de la frecuencia de micronúcleos o de aberraciones cromosómicas (Durante y col., 1991; Bryant y Johnston, 1993; Ortiz y col., 1995). Estos últimos autores, observando la proporción relativa de deleciones y aberraciones de tipo intercambio, han sugerido que este mecanismo podría no ser propenso al error.

La bleomicina induce en el ADN roturas de doble cadena con extremos romos o con extensiones 5' sin aparear y, como consecuencia, es un buen inductor de aberraciones cromosómicas. Estas aberraciones pueden ser tanto de tipo cromosómico como cromatídico, dependiendo del momento del ciclo en que actúe la bleomicina (agente S-independiente, como los rayos X o γ). En estos experimentos solamente se analizaron aquellas células que se encontraban en G₁ durante el tratamiento. Nuestros resultados citogenéticos muestran que, mientras que para la dosis más alta de ligasa (18 U) no se incrementaba el número de aberraciones cromosómicas respecto al control, en los tratamientos combinados (bleomicina +

ligasa) la ligasa de T4 disminuía considerablemente la frecuencia de aberraciones inducidas por la bleomicina para ambos tiempos de fijación (tabla 5).

Tabla 5.
Modulación del daño cromosómico inducido por bleomicina con ligasa del fago T4 en células CHO6 electroporadas y fijadas 19h (A) ó 22h (B) después.

Tratamiento		Aberraciones en 100 células						
Bleomicina (nU)	Ligasa (U)	MA	DC	Inter	Dic	Anillos	Del	Aberraciones totales
A								
a	-	4	5	-	-	-	-	5
	18	5	4	-	1	-	-	5
	300	44	4	1	25	13	65	108
	300	39	3	2	32	15	30	82 ^b
	300	37	3	-	25	4	48	80 ^b
	300	42	7	-	30	10	38	85 ^b
B								
a	-	5	4	1	-	-	-	5
	18	4	3	1	1	-	-	5
	300	53	11	7	45	10	69	142
	300	48	10	-	35	15	50	110 ^b
	300	44	1	3	31	13	50	98 ^b
	300	40	5	7	14	14	43	83 ^b

a. Los controles negativos se electroporaron en presencia de una mezcla del tampón de almacenamiento, de ligación y ClNa 0.9%.

b. Diferencia estadísticamente significativa respecto al tratamiento con bleomicina sola ($p < 0.01$) (Test *t*-Student de una cola).

Abreviaturas: **MA**, metafases anómalas; **DC**, deleciones cromatídicas; **Inter**, intercambios cromatídicos; **Dic**, dicéntricos (se incluyen los policéntricos con más de dos centrómeros, teniendo en cuenta que 1 policéntrico = n dicéntricos, donde $n = n^\circ$ total de centrómeros - 1); **Del**, deleciones cromosómicas.

La mayoría de las aberraciones observadas eran de tipo cromosómico, como era de esperar por la producción de roturas de doble cadena en una fase previa a la replicación del ADN, aunque también se observan algunas aberraciones de tipo cromatídico (tabla 5; figura 21). Estos resultados parecen deberse a la capacidad de la bleomicina para inducir roturas de cadena simple que necesitan pasar por una ronda de replicación para dar lugar a las aberraciones cromatídicas (Povirk y Austin, 1991; Dar y Jorgensen, 1995).

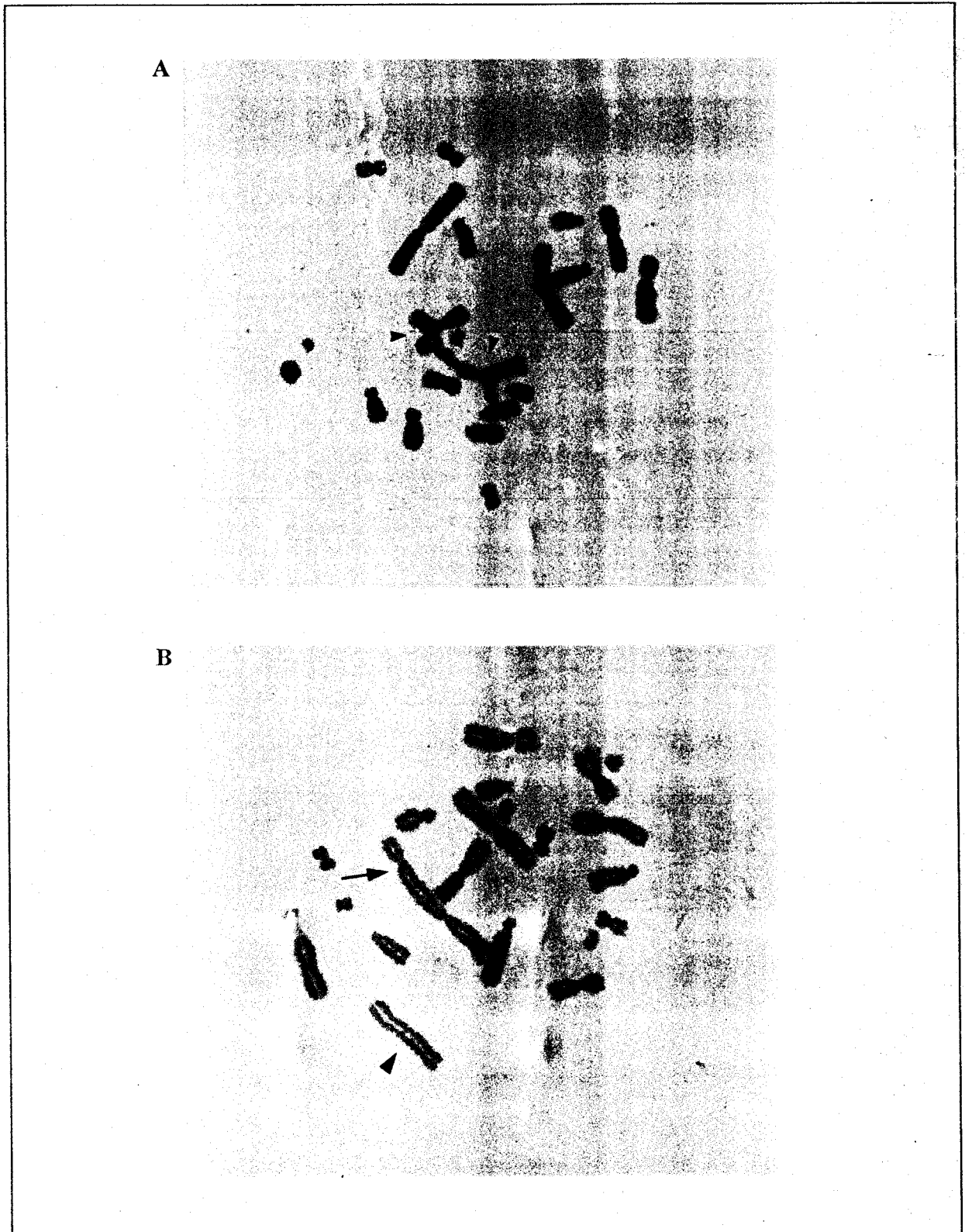


Figura 21. Células metafásicas de la línea CHO6 tratadas con bleomicina, donde se muestran distintos tipos de aberraciones. (A) Metafase donde se observan dos intercambios cromatídicos (➤). (B) Metafase que muestra un dicéntrico (→) y su deleción (◄).

La posibilidad de que la bleomicina permanezca activa en el interior de las células durante el tiempo suficiente como para inducir roturas de doble cadena en S o G₂ podría descartarse, puesto que la bleomicina activa, al menos *in vitro*, presenta una vida media muy corta, aproximadamente de 2 min. a 4°C (Burger y col., 1981); además, en la célula existen hidrolasas específicas que la degradan (Umezawa y col., 1974).

La diferencia entre las aberraciones inducidas por la bleomicina y por los tratamientos combinados (bleomicina + ligasa) es estadísticamente significativa para un test *t*-student con $p < 0.01$. Esta reducción en el número total de aberraciones para los tratamientos combinados afecta principalmente a las aberraciones de tipo cromosómico. El efecto positivo de la ligasa de T4 se nos muestra más claramente para el tiempo más largo de fijación (22 horas), observándose una reducción de hasta un 40% aproximadamente en el número total de aberraciones con la mayor dosis de ligasa y una aparente dosis-dependencia en la frecuencia total de aberraciones.

Las células con un nivel de daño considerable han de reparar parte del mismo para poder superar los distintos puntos de control del ciclo celular antes de entrar en mitosis (Kaufmann y Paules, 1996). De esta manera se explicaría el hecho de que observemos un menor número de aberraciones para el tiempo de fijación más corto, ya que pueden existir células con un nivel tan alto de daño que no alcanzan la metafase en el periodo de tiempo transcurrido entre la electroporación y la primera fijación (19 horas).

3.2.1.3. Efecto de la ligasa de T4 sobre la capacidad de la bleomicina en la inducción de muerte celular

Las roturas de doble cadena, como hemos observado, pueden originar aberraciones cromosómicas si no se reparan correctamente. Estas reorganizaciones cromosómicas pueden llegar a afectar a genes esenciales, lo que llevaría a la muerte celular, y por tanto, a la pérdida de la capacidad clonogénica (Iliakis, 1991). Además, pueden activarse protooncogenes al perderse el control de los mismos por el cambio de localización cromosómica, colocándose bajo la influencia de un determinado promotor.

La bleomicina se ha empleado normalmente en quimioterapia para matar las células en estado activo de proliferación (tumores) (Carter, 1978; Carter y col., 1978; Souhami y col.,

1997). Una vez dentro de la célula, esta droga es altamente citotóxica (Tounekti y col., 1993) y produce principalmente roturas de cadena en el ADN de forma similar a los rayos X. Ambos agentes inducen una elevada tasa de muerte celular, por lo que un incremento en la supervivencia celular sería un buen indicador de una correcta reparación del daño.

Para ver el efecto de la ligasa de T4 en el nivel de muerte celular inducido por bleomicina, en paralelo a los ensayos citogenéticos hemos estudiado la capacidad clonogénica para los distintos tratamientos con 300 nU de bleomicina sola o con 6, 12 ó 18 U de ligasa de T4 siguiendo el protocolo experimental de la figura 20B. La fracción de supervivencia para los distintos tratamientos se calculó respecto al control de electroporación, considerando este valor como el 100% de supervivencia (no se muestra). Las distintas dosis de ligasa empleadas no afectaban a la supervivencia celular, obteniéndose valores muy similares a los de las células electroporadas solamente con medio, como muestra la tabla 6, en la que los valores de supervivencia se han referido a la eficiencia en placa de células sin electroporar.

Tabla 6.
Supervivencia celular de la línea CHO6 con diferentes controles de electroporación (EP).

Tratamiento	Fracción de supervivencia (%) \pm ES
EP con medio	52.30 \pm 2.66
EP con C1Na 0.9% + tampones de la ligasa	51.10 \pm 1.52
EP con 6 U de ligasa	57.10 \pm 1.83
EP con 12 U de ligasa	53.05 \pm 2.68
EP con 18 U de ligasa	55.50 \pm 2.43

Los controles de la ligasa llevan su correspondiente tampón de ligación, suministrado por el fabricante y C1Na 0.9%.

ES. Error estándar de la media de tres experimentos independientes.

Los ensayos clonogénicos nos muestran como la ligasa del fago T4 incrementa la supervivencia celular hasta en un 26% cuando se suministra a las células simultáneamente con bleomicina, como se puede observar en la figura 22. Así, 300 nU de bleomicina produjeron una muerte celular de un 56%, reduciéndose ésta hasta un 30% cuando se suministran 18 U de ligasa.

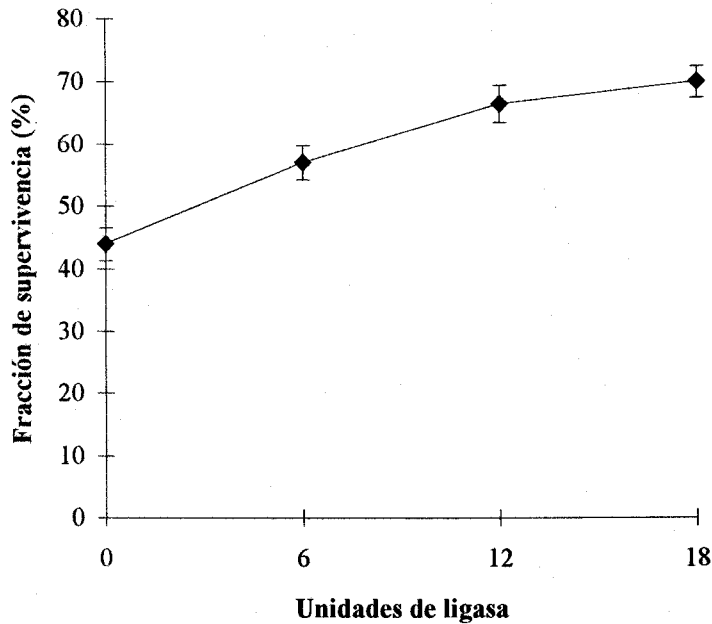


Figura 22. Efecto del tratamiento simultáneo con bleomicina y ligasa en la supervivencia celular de la línea CHO6. Las células se electroporaron con 300 nU de bleomicina y las dosis indicadas de ligasa de T4. Tras una semana de cultivo se contaron las colonias. Los diferentes puntos muestran la media de tres experimentos independientes. Las barras representan el error estándar.

Por otra parte, aunque las células que recibieron ligasa siempre mostraron valores más altos de supervivencia, parece existir una saturación en la actividad enzimática con las dosis superiores de ligasa. Para comprobar este resultado, probamos dosis de ligasa de 3 y 9 U observando que, mientras que 3 U tenía un efecto dosis-dependiente respecto a 6 U, los valores de 9, 12 y 18 U mostraban una saturación evidente (no se muestran los datos). Durante y colaboradores (1991), realizando ensayos de clonogenicidad para ver el efecto de la ligasa de T4 en fibroblastos de ratón (C3H10T1/2) tratados con una enzima de restricción (PvuII), observaron la existencia de esta saturación con 40 U de ligasa, una dosis mucho mayor que la nuestra, aunque esto pudiera ser debido al método empleado para introducir ambas enzimas en las células. Estos autores permeabilizaron las células mediante un choque osmótico, cuya eficiencia no está bien determinada, por lo que pudiera ocurrir que no todas las moléculas de ligasa hubieran sido incorporadas. En nuestro caso, al ser la electroporación un método muy eficiente para permeabilizar las células, con una menor cantidad de moléculas de enzima (9 U) hemos alcanzado ya dicha saturación.

La diferencia observada respecto a las aberraciones cromosómicas, donde no parece existir dicha saturación (tabla 5), podría ser debida a que con este ensayo citogenético

observamos la respuesta celular a tiempos cortos, de modo que pueden existir células que tengan un nivel de daño tal que les permita superar el punto de control G₂/M, de manera que se puedan observar en metafase, pero que morirán sin llegar a formar una colonia, ya que la cantidad de daño es tan alta que aunque actúe la ligasa exógena nunca se podrá reparar hasta un nivel que permita a la célula sobrevivir (figura 22).

Los datos obtenidos en células de hámster chino, por tanto, muestran que, aunque la ligasa exógena puede ayudar a reparar el daño inducido por bleomicina, no puede eliminarlo por completo.

3.2.2. Linfocitos humanos en G₀

Como hemos visto hasta ahora, siempre se han utilizado células proliferativas para modular el daño en el ADN con enzimas de reparación, por lo que otro de nuestros objetivos fue analizar la posible modulación del daño inducido por bleomicina con ligasa del fago T4 en un cultivo primario humano de células no proliferativas (linfocitos humanos en G₀). Actualmente, un método muy rápido y fácilmente reproducible que nos permite determinar las roturas de cadena en el ADN, así como las lesiones que se transforman en roturas a pH alcalino en células quiescentes, es el ensayo de la electroforesis de células aisladas, más conocido como “ensayo del cometa” (Fairbairn y col., 1995). Este método presenta además la ventaja de poder evaluar el daño en un número pequeño de células y nos permite hacer una distribución del daño a nivel individual.

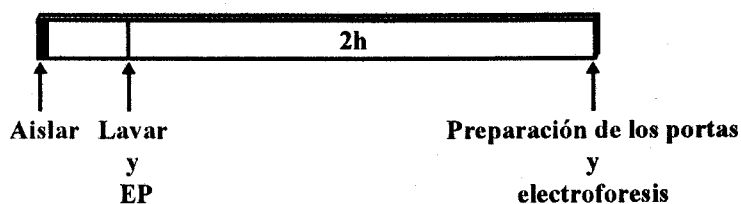


Figura 23. Protocolo experimental para observar la modulación del efecto de la bleomicina con ligasa de T4 en linfocitos humanos en G₀. Los linfocitos se aislaron con Ficoll-Paque, y se electroporaron aproximadamente 2.5×10^6 células con 6 μ U de bleomicina sola o conjuntamente con 6, 12 ó 18 U de ligasa. Tras 2 horas de tratamiento las células se procesaron para el ensayo del cometa.

La fracción de linfocitos (ver materiales y métodos) se electroporó con 6 μ U de bleomicina sola o en combinación con 6, 12 ó 18 U de ligasa de T4 (figura 23) y las células se mantuvieron durante 2 horas en el incubador, ya que se ha descrito que las células eficientes en reparación pueden reparar hasta un 90% del daño susceptible de ser reparado en las 2 horas posteriores a la inducción del mismo (Vyas y col., 1991; Tice y Strauss, 1995).

Transcurridas las 2 horas, las células se procesaron para el ensayo del cometa. Elegimos la dosis de 6 μ U por ser la que nos inducía una diferencia notable en el tamaño de las colas entre las células control y las tratadas con bleomicina, de manera que pudiéramos evaluar con fiabilidad una modulación positiva (figura 24). La viabilidad celular tras los diferentes tratamientos no resultó afectada de manera significativa. Como parámetro indicativo del daño en el ADN se empleó el momento de los cometas, que viene definido como el producto de la longitud de la cola del cometa por el porcentaje de ADN presente en la misma (intensidad de fluorescencia), dividido por 100. En la figura 25 podemos ver ejemplos de células con distinto nivel de daño, que muestran, por tanto, colas con distinta longitud e intensidad de fluorescencia (correspondientes a distintos momentos).

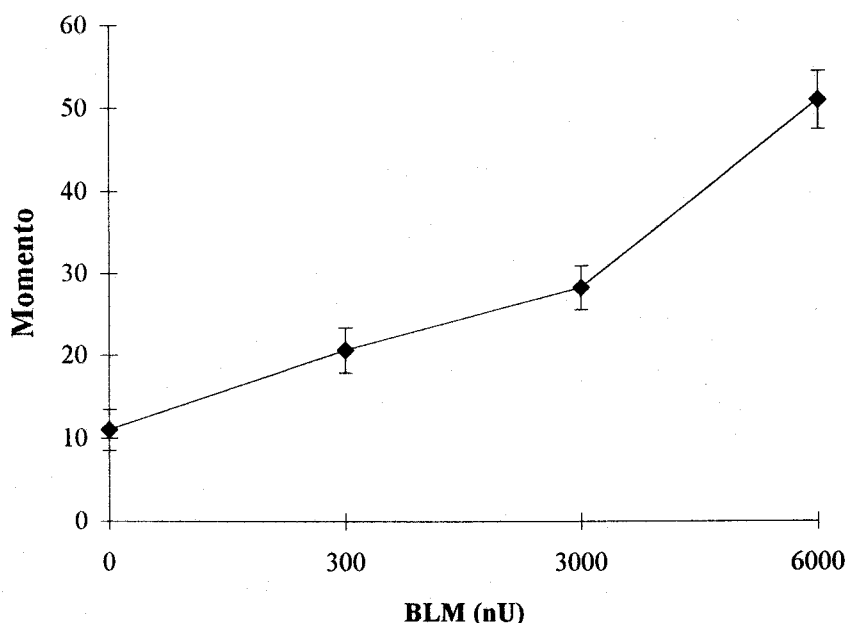


Figura 24. Estudio dosimétrico de la bleomicina con el ensayo del cometa. Los linfocitos se aislaron y se electroporaron con diferentes dosis de bleomicina, tras lo cual se dejaron en el incubador durante 2 horas antes de proceder a realizar el ensayo. Los diferentes puntos muestran la media de 50 células. Las barras representan el error estándar.

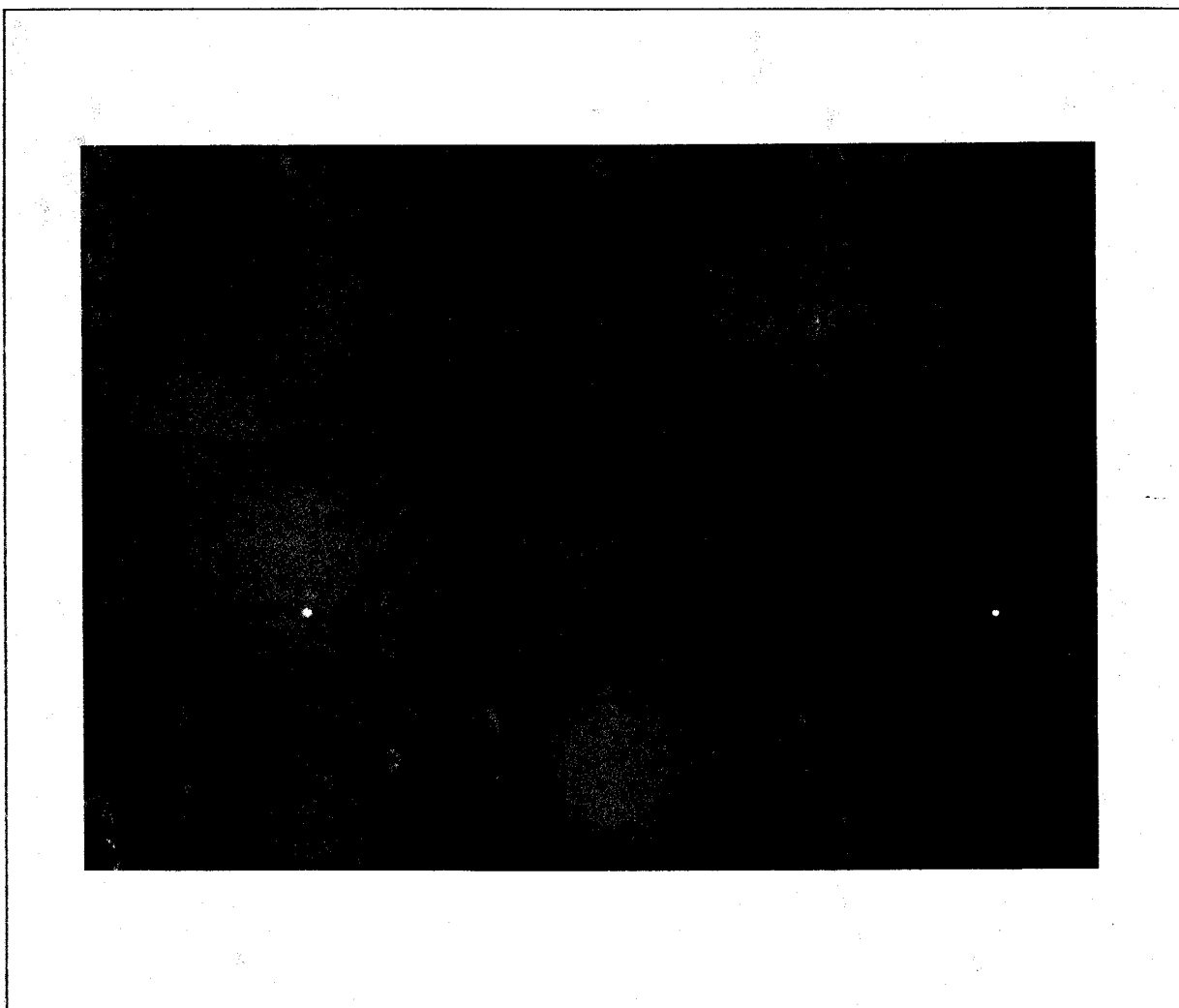


Figura 25. Resultado del ensayo del cometa en linfocitos humanos. Tras la lisis y electroforesis celular, las células se tiñeron con bromuro de etidio. Aquí se muestran varios cometas con distinto nivel de daño en el ADN, que se refleja en la distinta longitud e intensidad de las colas.

La lisis celular empleada ha sido una lisis alcalina a pH 10, y la electroforesis se ha llevado a cabo a pH > 12. A este pH el ADN que migra en la electroforesis es de una sola cadena, por lo que nos permite detectar tanto las roturas de doble cadena como las roturas de cadena simple, así como cualquier tipo de lesión que pueda transformarse en una rotura simple a este pH (sitios lábiles a álcali). Este ensayo ha sido empleado previamente para analizar el daño y la reparación del ADN en linfocitos humanos en G₀ expuestos *in vitro* tanto a radiación y como a bleomicina (Tice y Strauss, 1995).

Los resultados obtenidos con este ensayo se muestran en la tabla 7, en la que se presenta la media del momento para los distintos tratamientos en dos donantes. Podemos observar como una dosis de 18 U de ligasa por sí sola, no indujo un daño significativo, alcanzándose

valores en los momentos celulares similares a los controles. En cuanto a los tratamientos objeto de nuestra atención, la bleomicina da lugar a un momento celular aproximadamente 4 veces mayor que en el control electroporado para ambos donantes, lo que demuestra la alta citotoxicidad de esta droga una vez dentro de la célula (Poddevin y col., 1991; Johnston y Bryant, 1993; Tounekti y col., 1993).

Tabla 7.
Análisis de los cometas en linfocitos humanos en G₀ electroporados con bleomicina y ligasa.

Donante	Tratamiento		Momento ± ES
	Bleomicina (μU)	Ligasa (U)	
A	a -	-	12.40 ± 1.15
	-	18	13.05 ± 1.01
	6	-	56.42 ± 5.66
	6	6	23.16 ± 3.45 ^b
	6	12	28.09 ± 5.28 ^b
	6	18	20.89 ± 3.21 ^b
B	-	-	13.09 ± 1.48
	-	18	13.57 ± 0.66
	6	-	45.45 ± 5.63
	6	6	19.34 ± 1.85 ^b
	6	12	23.05 ± 2.83 ^b
	6	18	20.20 ± 1.72 ^b

ES. Error estándar. En todos los casos se analizaron 50 células.

a. Los controles negativos se electroporaron en presencia de una mezcla del tampón de almacenamiento, de ligación y CINa 0.9%.

b. Diferencia estadísticamente significativa respecto al tratamiento con bleomicina $p < (0.01)$ (Test *t*-student de una cola).

En los tratamientos combinados, para todas las dosis utilizadas de ligasa y en ambos donantes, la ligasa de T4 reducía el valor del momento comparada con la bleomicina sola, alcanzando niveles de reducción de ADN desplazado de hasta un 57% para el donante A y de un 54% para el donante B. La diferencia entre el momento obtenido para los tratamientos combinados (bleomicina + ligasa) y para la bleomicina era estadísticamente significativa, con $p < 0.01$ para un test *t*-Student de una cola, en todos los casos.

Tice y Strauss (1995) han demostrado que, mientras que la distribución del daño entre linfocitos tratados con radiación ionizante en G₀ era relativamente homogénea, cuando se administraba bleomicina al cultivo, dicha droga inducía un aumento significativo en la longitud

de la cola solo en un 10-20% de las células tratadas, e incluso se llegaba a una saturación de la droga a dosis muy bajas. Estos datos indican una heterogeneidad de la población en cuanto a la captación de la droga y son comparables a la sobredispersión del daño observada tanto a nivel de aberraciones cromosómicas (Dresp y col., 1978; Cortés y col., 1993) como de micronúcleos (Hoffmann y col., 1993).

Nosotros hemos electroporado bleomicina y hemos conseguido reducir la dosis empleada obteniendo un nivel de daño mayor y más homogéneo en la población celular. Aproximadamente un 80% de las células mostraban un incremento en el nivel de daño cuando se trataban con bleomicina, y este porcentaje se reducía cuando aquéllas eran tratadas simultáneamente con ligasa de T4, aunque en ningún caso llegaba a alcanzar el nivel de los controles (figura 26). Nuestros resultados con el ensayo del cometa, por tanto, demuestran la sensibilidad de esta técnica para medir el daño en el ADN así como la eficiencia de la electroporación.

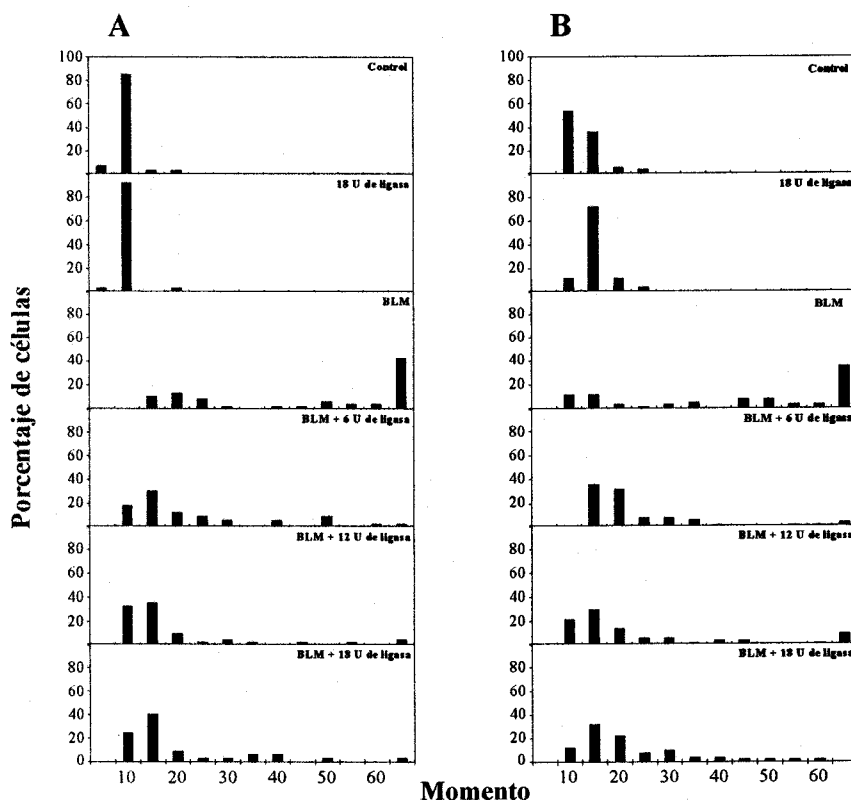


Figura 26. Distribución de los momentos celulares de linfocitos humanos en el ensayo del cometa. En la figura se presentan los datos para dos donantes, A y B.

Los resultados también muestran claramente que la ligasa del fago T4 es capaz de ayudar a reunir muchas de las roturas de cadena de ADN inducidas por la bleomicina en linfocitos humanos, tal como habíamos comprobado a nivel citogenético analizando las aberraciones cromosómicas en la línea celular CHO6. Como ya se había observado en la supervivencia de las células CHO6, en cuanto a esta reducción en el nivel de daño del ADN no parece existir una dependencia clara respecto a la cantidad de ligasa empleada. En este caso, la saturación en la actividad de la ligasa parece más evidente que en las células CHO6, alcanzándose un nivel de reunión de las roturas muy similar con las tres dosis empleadas.

Por otra parte, el momento celular nunca alcanzó los valores observados para el control en los tratamientos combinados, por lo que podemos decir que la ligasa de T4 es capaz de reunir solo parcialmente las roturas inducidas por la bleomicina en linfocitos humanos no estimulados.

3.2.3. Consideraciones generales

En conjunto, nuestros resultados están en concordancia con los estudios realizados con enzimas de restricción en cuanto a la capacidad de la ligasa del fago T4 para reunir roturas de doble cadena en células eucarióticas (Durante y col., 1991; Ortiz y col., 1995). Sin embargo, hemos podido observar que la porción relativa de daño reparado como resultado del tratamiento con ligasa de T4 es menor cuando las células se tratan con bleomicina. No podemos considerar que exista una explicación simple, ya que hay que tener en cuenta diversos factores.

Las enzimas de restricción inducen roturas de doble cadena en ADN con extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato, que son relativamente fáciles de reunir (enlace fosfodiéster). Sin embargo, tanto los rayos X como la bleomicina inducen principalmente roturas de doble cadena "no limpias", es decir, con extremos distintos a 3'-hidroxilo y 5'-fosfato. Se ha descrito que un 50% de las roturas inducidas por la radiación ionizante presentan extremos 3'-fosfoglicolato (Henner y col., 1983b), que son también inducidos con una frecuencia muy alta por la bleomicina (Dar y Jorgensen, 1995). De hecho, este tipo de terminaciones afecta a la reparación de dichas lesiones, que no pueden ser selladas por ligasas procarióticas *in vitro* con la misma eficiencia que los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato (Henner y col., 1983a; Gu y col.,

1996). Por otro lado, y a diferencia de los rayos X, la bleomicina no actúa al azar sobre el ADN, sino que corta preferentemente entre los nucleosomas (Kuo y Hsu, 1979; Tounekti y col., 1993), y recientemente, Ray y colaboradores (1996) han demostrado que la histona H1 inhibe en gran medida la actividad de las ligasas de origen procariótico, tanto la ligasa de *E. coli* como la del fago T4. Teniendo en cuenta lo anterior, tanto el tipo de rotura como la zona del ADN donde se ha producido parecen ser factores determinantes para explicar por qué el nivel de daño reparado es menor para la bleomicina que para las enzimas de restricción (Durante y col., 1991; Ortiz y col., 1995).

De cualquier forma, nuestros resultados muestran que la ligasa del fago T4 es muy efectiva en la reunión de las roturas inducidas por la bleomicina, con un incremento en la supervivencia celular de un 26%, y reducciones de hasta un 40% en el nivel de aberraciones para la línea celular CHO6 (figura 22; tabla 5) y de aproximadamente un 60% en el momento celular de los cometas en linfocitos humanos (tabla 7), no alcanzándose, en ningún caso, un 100% de efectividad en la reparación. Para ambos sistemas (fibroblastos de hámster chino y linfocitos humanos), nuestros resultados muestran una saturación en la actividad de la ligasa, aunque existen diferencias en cuanto a la dosis de enzima para la que se alcanza dicha saturación (figura 22; tabla 7).

La saturación observada podría ser debida a que la actuación de las ligasas en la reunión de las roturas de doble cadena depende a su vez del procesamiento o modificación de dichas roturas por la maquinaria de reparación antes de la ligación (Gu y col., 1996). Por tanto, podríamos pensar que la tasa de ligación no depende solamente de la capacidad de la ligasa para reunir los extremos, sino de la propia capacidad celular para procesarlos, además de la accesibilidad de la ligasa a la rotura susceptible de ser reparada.

En eucariotas superiores se ha propuesto que la reparación de las roturas de doble cadena se lleva a cabo en gran parte por la simple reunión de los extremos más que por recombinación homóloga, y se requiere la acción de distintas actividades enzimáticas previamente a la ligación (Jeggio, 1990). Asimismo, se ha demostrado *in vitro* que la ligasa del fago T4 es menos efectiva que extractos celulares en la reunión de roturas de doble cadena (Cheong e Iliakis, 1997), lo que de nuevo sugiere la necesidad de diferentes actividades presentes en dichos extractos en la reunión, además de la propia ligasa.

En células de mamíferos, la quinasa dependiente de ADN (DNA-PK) y su cofactor, el heterodímero Ku, se necesitan tanto para la reparación de las roturas de doble cadena

inducidas por radiación ionizante o bleomicina como para la recombinación V(D)J, que da lugar a la inmensa variabilidad en la formación de anticuerpos en los linfocitos B, así como en los receptores de membrana en los linfocitos T (Jeggo y col., 1995; Weaver, 1995; Errami y col., 1996). Por otro lado, la proteína Xrcc1, que está implicada en la reparación del ADN, estabiliza a la ligasa III en mamíferos, de manera que el nivel de ligasa se reduce cuando no está presente dicha proteína (Caldecott y col., 1994). De forma similar, en *E. coli*, la proteína Rec A se une a la molécula de ADN de forma que aumenta la tasa de ligación de fragmentos de restricción (con extremos romos o cohesivos) con ligasa del fago T4 (Rusche y col., 1985). Además, recientemente se ha propuesto un posible mecanismo en procariotas, diferente a la ligación, mediante el cual la ligasa del fago T4 podría reconocer, marcar y proteger cualquier extremo 5' hasta que se produzca un extremo 3'-hidroxilo. Este bloqueo de la enzima en el extremo 5' adenilado resultaría en un modo de acción muy eficaz, asegurando que la misma molécula de enzima que reconoce el extremo 5' lleva a cabo la ligación con su correspondiente 3'-hidroxilo (Rossi y col., 1997). Este mecanismo se podría tal vez extrapolar a eucariotas, en los cuales una ligasa actuaría de protección mientras otras enzimas de reparación procesan el extremo 3'-fosfato ó 3'-fosfoglicolato.

Teniendo en cuenta lo anterior, en nuestro modelo experimental de linfocitos humanos en G_0 y con la dosis de bleomicina empleada es posible que la saturación observada se deba a que en el tiempo de tratamiento (2 horas) las células solo pueden procesar con su propia maquinaria de reparación una cantidad de roturas susceptibles de ser selladas con 6 U de ligasa exógena, de manera que aunque se aumente la dosis de la enzima no vamos a apreciar una disminución significativa en el nivel de daño en el ADN. Sin embargo, cuando utilizamos células en estado proliferativo, hemos de tener en cuenta que éstas van a poder reparar a lo largo del ciclo celular (Jeggo, 1990; Friedberg y col., 1995), de manera que mientras que la ligasa exógena se mantenga activa dentro de la célula y la maquinaria de reparación esté disponible, dicha enzima seguirá ligando, por lo que la dosis para la que se alcanza la saturación es mayor. Por otra parte, no hay que olvidar que en las distintas fases del ciclo celular la cromatina presenta diferentes niveles de condensación, que pueden variar incluso con el nivel de daño inducido (Ljungman, 1990; Terzoudi y Pantelias, 1997), lo cual influye también en la accesibilidad del ADN a la ligasa para que ésta pueda alcanzar la rotura.

Finalmente, hay que destacar que los datos obtenidos en linfocitos en G_0 con el ensayo del cometa no demuestran que la modulación del daño inducido por bleomicina con ligasa del

fago T4 sea una reparación libre de error, ya que lo que observamos es solamente la reunión de las roturas sin poder distinguir si esta reunión es la correcta, por lo que estamos sobrevalorando la posible reparación. Una reunión incorrecta de las roturas daría lugar, si las células estuvieran en estado proliferativo, a la aparición de aberraciones de tipo intercambio en la siguiente metafase, que podrían llevar a la muerte celular. En nuestra opinión, si hemos de comparar los distintos ensayos utilizados, la conclusión que parece evidente es que dan información complementaria para analizar la posible reparación celular, por lo que sería recomendable no excluir ninguno de ellos en futuros estudios.

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

1. Es posible inducir la respuesta adaptativa en linfocitos humanos en G_0 , resultando dichas células protegidas contra el efecto clastogénico inducido por radiación ionizante una vez que han sido estimuladas. Esto lo consideramos de especial trascendencia, ya que una gran parte de las células de los organismos pluricelulares se encuentran en estado no proliferativo.
2. La respuesta adaptativa a la radiación ionizante parece ser un mecanismo generalizado de protección frente al daño oxidativo que se expresa en diferentes mamíferos, como indican los resultados obtenidos en linfocitos bovinos y de conejo condicionados con peróxido de hidrógeno, que resultaron adaptados frente al daño por radiación ionizante.
3. La ligasa del fago T4 puede cooperar con la maquinaria de reparación en células de mamíferos tanto proliferativas como en estado de quiescencia, para eliminar, al menos en parte, el daño residual inducido por bleomicina, normalmente no reparable por la propia maquinaria celular.
4. Los distintos ensayos empleados nos dan información complementaria respecto a la posible reparación de las roturas de doble cadena en el ADN y, en nuestra opinión, los experimentos de clonogenicidad nos dan la medida más exacta de una correcta reparación del material genético, lo cual resultaría, en último término, en una mayor supervivencia y capacidad proliferativa de las células.

BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- Aoufouchi, S., Prigent, C., Theze, N., Philippe, M. y Thiebaud, P. (1992) Expression of DNA ligases I and II during oogenesis and early development of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 152, 199-202.
- Barquinero, J.F., Barrios, L., Caballín, M.R., Miró, R., Ribas, M., Subias, A. y Egozcue, J. (1995) Occupational exposure to radiation induces an adaptive response in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 67, 187-191.
- Barquinero, J.F., Barrios, L., Caballín, M.R., Miró, R., Ribas, M., Subias, A. y Egozcue, J. (1996) Decreased sensitivity to the cytogenetic effects of bleomycin in individuals occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutat. Res.* 354, 81-86.
- Belehradek, J., Orlowski, S., Poddevin, B., Paoletti, C. y Mir, L.M. (1991) Electrochemotherapy of spontaneous mammary tumours in mice. *Eur. J. Cancer* 27, 73-76.
- Belehradek, J., Orlowski, S., Ramírez, L.H., Pron, G., Poddevin, B. y Mir, L.M. (1994) Electroporabilization of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin. *Bioch. Biophys. Acta* 1190, 155-163.
- Belmaaza, A. y Chartrand, P. (1994) One-sided invasion in homologous recombination at double-strand breaks. *Mutat. Res.* 314, 199-208.
- Blunt, T., Finnie, N.J., Taccioli, G.E., Smith, G.C., Demengeot, J., Gottlieb, T.M., Mizuta, R., Varghese, A.J., Alt, F.W., Jeggo, P.A. y Jackson, S.P. (1995) Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine *scid* mutation. *Cell* 80, 813-823.
- Boreham, D.R. y Mitchel, R.E.J. (1991) DNA lesions that signal the induction of radioresistance and DNA repair in yeast. *Radiat. Res.* 128, 19-28.
- Bryant, P.E. y Johnston, P.J. (1993) Restriction-endonuclease-induced DNA double-strand breaks and chromosomal aberrations in mammalian cells. *Mutat. Res.* 299, 289-296.
- Bryant, P.E. y Ritches, A.C. (1989) Oncogenic transformation of murine C3H10T1/2 cells resulting from DNA double-strand breaks induced by a restriction endonuclease. *Br. J. Cancer* 60, 852-854.
- Burger, R.M., Peisach, J. y Horwitz, S.B. (1981) Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron and oxygen that degrades DNA. *J. Biol. Chem.* 256, 11636-11644.

- Byrnes, R.W., Templin, J., Sem, D., Lyman, S. y Petering, D.H. (1990) Intracellular DNA strand scission and growth inhibition of Ehrlich ascites tumour cells by bleomycins. *Cancer Res.* 50, 5275-5286.
- Cai, L. y Liu, S.Z. (1990) Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells *in vivo* and *in vitro* by low-dose X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 58, 187-194.
- Caldecott, K.W., McKeown C.K., Tucker, J.D., Ljungquist, S. y Thompson, L.H. (1994) An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol. Cell. Biol.* 14, 68-76.
- Carter, S.B. (1967) Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 213, 261-264.
- Carter, S.K. (1978) Antitumor antibiotics: Thoughts for the future. *Recent Results Cancer Res.* 63, 298-303.
- Carter, S.K., Crooke, S.T. and Umezawa, H. (1978) *Bleomycin: Current Status and New Developments*. Academic Press, Tokyo, Japan.
- Catena, C., Villani, P., Conti, D. y Righi, E. (1994) Micronuclei and 3AB index in X-irradiated human lymphocytes in G₀ and G₁ phases. *Mutat. Res.* 311, 231-237.
- Cortés, F., Domínguez, I., Mateos, S., Piñero, J. y Mateos, J.C. (1990a) Evidence for an adaptive response to radiation damage in plant cells conditioned with X-rays or incorporated tritium. *Int. J. Radiat. Biol.* 57, 537-541.
- Cortés, F., Domínguez, I., Piñero, J. y Mateos, J.C. (1990b) Adaptive response in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide before irradiation with X-rays. *Mutagenesis* 5, 555-557.
- Cortés, F., Morgan, W.F. y Wolff, S. (1987) Effect of exogenous thymidine on sister-chromatid exchange frequency in Chinese hamster ovary cells with bromodeoxyuridine- and chlorodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Mutat. Res.* 192, 277-282.
- Cortés, F., Panneerselvam, N., Mateos, S. y Ortiz, T. (1993) Poly-D-lysine enhances the genotoxicity of bleomycin in cultured CHO cells. *Carcinogenesis* 14, 2543-2546.
- Cozzarelli, N.R., Melechen, N.E., Jovin, T.M. y Kornberg, A. (1967) Polynucleotide cellulose as a substrate for a polynucleotide ligase induced by phage T4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 578-586.

- Creissen, D. y Shall, S. (1982) Regulation of DNA ligase activity by poly(ADP-ribose). *Nature* 296, 271-272.
- Cheong, N. e Iliakis, G. (1997) *In vitro* rejoining of double strand breaks induced in cellular DNA by bleomycin and restriction endonucleases. *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 365-375.
- Cheong, N., Okayasu, R., Shah, S., Ganguly, T., Mammen, P. e Iliakis, G. (1996) *In vitro* rejoining of double-strand breaks in cellular DNA by factors present in extracts of HeLa cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 69, 665-677.
- D'Andrea, A.D. y Haseltine, W. A. (1978) Sequence specific cleavage of DNA by the antitumor antibiotics neocarzinostatin and bleomycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3608-3612.
- Dar, M.E. y Jorgensen, T.J. (1995) Deletions at short direct repeats and base substitutions are characteristic mutations for bleomycin-induced double- and single-strand breaks, respectively, in a human shuttle vector system. *Nucleic Acids Res.* 23, 3224-3230.
- Davies, J.M.S., Lowry, C.V. y Davies, K.J.A. (1995) Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 1-6.
- Davies, K.J.A. (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1-31.
- Daza, P., Reichenberger, S., Göttlich, B., Hagmann, M., Feldmann, E. y Pfeiffer, P. (1996) Mechanisms of nonhomologous DNA end-joining in frogs, mice and men. *Biol. Chem.* 377, 775-786.
- Demple, B. y Halbrook, J. (1983) Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* 304, 466-468.
- Domínguez, I., Panneerselvam, N., Escalza, P., Natarajan, A.T. y Cortés, F. (1993) Adaptive response to radiation damage in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide as measured by the cytokinesis-block micronucleus technique. *Mutat. Res.* 301, 135-141.
- Dresp, J., Schmid, E. y Bauchinger, M. (1978) The cytogenetic effect of bleomycin on human peripheral lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res.* 56, 341-353.
- Durante, M., Grossi, G.F., Napolitano, M. y Gialanella, G. (1991) Repair of potentially lethal damage by introduction of T4 DNA ligase in eucaryotic cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 963-971.

- Errami, A., Smider, V., Rathmell, W.K., He, D.M., Hendrickson, E.A., Zdzienicka, M.Z. y Chu, G. (1996) Ku86 defines the genetic defect and restores X-ray resistance and V(D)J recombination to complementation group 5 hamster cell mutants. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1519-1526.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. y O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-59.
- Fenech, M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ. Health. Perspect.* 101, 101-107.
- Fenech, M. y Morley, A.A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147, 29-36.
- Fornace, A.J. (1992) Mammalian genes induced by radiation; activation of genes associated with growth control. *Annu. Rev. Genet.* 26, 507-526.
- Frankenberg-Schwager, M. y Frankenberg, D. (1990) DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast. *Int. J. Radiat. Biol.* 58, 569-575.
- Friedberg, E.C. (1985) *DNA repair*, W.H. Freeman & Co., New York.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995) *DNA repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, D.C.
- Gefter, M.L., Becker, A. y Hurwitz, J. (1967) The enzymatic repair of DNA. I. Formation of circular lambda-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 240-247.
- Gellert, M. (1967) Formation of covalent circles of lambda DNA by *E. coli* extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 148-155.
- Gellert, M. (1992) V(D)J recombination gets a break. *Trends Genet.* 8, 408-412.
- Gellert, M. y Bullock, M.L. (1970) DNA ligase mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1580-1587.
- Getts, R.C. y Stamato, T.D. (1994) Absence of a Ku-like DNA end binding activity in the *xrs* double-strand DNA repair-deficient mutant. *J. Biol. Chem.* 269, 15981-15984.
- Giloni, L., Takeshita, M., Johnson, F., Iden, C. y Grollman, A.P. (1981) Bleomycin-induced strand-scission of DNA: mechanism of deoxyribose cleavage. *J. Biol. Chem.* 256, 8608-8615.

- Gu, X.Y., Bennett, R.A. y Povirk, L.F. (1996) End-joining of free radical-mediated DNA double-strand breaks *in vitro* is blocked by the kinase inhibitor wortmannin at a step preceding removal of damaged 3' termini. *J. Biol. Chem.* 271, 19660-19663.
- Hallahan, D.E., Bleakman, D., Virudachalam, S., Lee, D., Grdina, D., Kufe, D.W. y Weichselbaum, R.R. (1994) The role of intracellular calcium in the cellular response to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 138, 392-400.
- Halliwell, B. y Aruoma, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281, 9-19.
- Henner, W.D., Grunberg, S.M. y Haseltine, W.A. (1982) Sites and structure of gamma radiation-induced DNA strand breaks. *J. Biol. Chem.* 257, 11750-11754.
- Henner, W.D., Grunberg, S.M. y Haseltine, W.A. (1983a) Enzyme action at 3' termini of ionizing radiation-induced DNA strand breaks. *J. Bio. Chem.* 258, 15198-15205.
- Henner, W.D., Rodríguez, L.O., Hecht, S.M. y Haseltine, W.A. (1983b) gamma Ray induced deoxyribonucleic acid strand breaks. 3' Glycolate termini. *J. Bio. Chem.* 258, 711-713.
- Higashitani, A., Tabata, S., Endo, H. y Hotta, Y., (1990) Purification of DNA ligases from mouse testis and their behaviour during meiosis. *Cell Struct. Funct.* 15, 67-72.
- Hoffmann, G.R., Colyer, S.P. y Littlefield, L.G. (1993) Induction of micronuclei by bleomycin in G₀ human lymphocytes: I. Dose-response and distribution. *Environ. Mol. Mutagen.* 21, 130-135.
- Iliakis, G. (1991) The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *BioEssays* 13, 641-648.
- Jackson, S.P. y Jeggo, P.A. (1995) DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem. Sci.* 20, 412-415.
- Jeggo, P.A. (1990) Studies on mammalian mutants defective in rejoining double-strand breaks in DNA. *Mutat. Res.* 239, 1-16.
- Jeggo, P.A., Taccioli, G.E. y Jackson, S.P. (1995) Menage à trois: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK. *BioEssays* 17, 949-957.
- Johnston, P.J. y Bryant, P.E. (1993) Chromosome damage induced by nanomolar concentrations of bleomycin in porated mammalian cells. *Bioch. Pharmac.* 45, 569-572.

- Kaufmann, W.K. y Paules, R.S. (1996) DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J.* 10, 238-247.
- Keeney, S., Eker, A.P., Brody, T., Vermeulen, W., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. y Linn, S. (1994) Correction of the DNA repair defect in *Xeroderma pigmentosum* group E by injection of a DNA damage-binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 4053-4056.
- Kiefer, J. (1990) *Biological radiation effects*. Springer-Verlag, Berlin.
- Kondo, H., Nakabeppu, Y., Kataoka, H., Kuhara, S., Kawabata, S. y Sekiguchi, M. (1986) Structure and expression of the *alkB* gene of *Escherichia coli* related to the repair of alkylated DNA. *J. Biol. Chem.* 261, 15772-15777.
- Kornberg, A. y Baker, T. (1992) *DNA synthesis*, 2nd ed. W.H. Freeman & Co., New York.
- Kuhn, A., Gottlieb, T.M., Jackson, S.P. y Grummt, I. (1995) DNA-dependent protein kinase: a potent inhibitor of transcription by RNA polymerase I. *Genes Dev.* 9, 193-203.
- Kuo, M.T. y Hsu, T.C. (1979) Biochemical and cytological studies of bleomycin actions on chromatin and chromosomes. *Chromosoma* 68, 229-240.
- Landini, P., Hajec, L.I. y Volkert, M.R. (1994) Structure and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* adaptive response gene *aidB*. *J. Bacteriol.* 176, 6583-6589.
- Lasko, D.D., Tomkinson, A.E. y Lindahl, T. (1990) Eukaryotic DNA ligases. *Mutat. Res.* 236, 277-287.
- Lehman, I.R. (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* 186, 790-797.
- Li, C., Goodchild, J. y Baril, E.F. (1994) DNA ligase I is associated with the 21 S complex of enzymes for DNA synthesis in HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 22, 632-638.
- Lindahl, T. y Barnes, D.E. (1992) Mammalian DNA ligases. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 251-281.
- Littlefield, L.G., Sayer, A.M. y Frome, E.L. (1989) Comparisons of dose-response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. *Mutagenesis* 4, 265-270.
- Liu, S.Z., Cai, L. y Sun, S.Q. (1992) Induction of a cytogenetic adaptive response by exposure of rabbits to very low dose-rate gamma-radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 187-190.

- Ljungman, M. (1990) The role of chromatin in the induction and repair of DNA damage (Tesis Doctoral). Department of Radiobiology, Stockholm University.
- Lu, D., Maulik, N., Moraru, I.I., Kreutzer, D.L. y Das, D.K. (1993) Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress. *Am. J. Physiol.* 264, 715-722.
- Marples, B. y Joiner, M.C. (1993) The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiat. Res.* 133, 41-51.
- Marples, B y Joiner, M.C. (1995) The elimination of low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79-379A cells by pretreatment with X rays or hydrogen peroxide. *Radiat. Res.* 141, 160-169.
- Marples, B., Lam, G.K.Y., Zhou, H. y Skov, K.A. (1994) The response of Chinese hamster V79-379A cells exposed to negative pi-mesons: evidence that increased radioresistance is dependent on linear energy transfer. *Radiat. Res.* 138, 81-84.
- Miles, C. y Meuth, M. (1989) DNA sequence determination of γ -radiation-induced mutations of the hamster *aprt* locus. *Mutat. Res.* 227, 97-102.
- Montecucco, A., Biamonti, G., Savini, E., Focher, F., Spadari, S. y Ciarrocchi, G. (1992) DNA ligase I gene expression during differentiation and cell proliferation. *Nucleic Acids Res.* 20, 6209-6214.
- Montecucco, A., Savini, E., Biamonti, G., Stefanini, M., Focher, F. y Ciarrocchi, G. (1995) Late induction of human DNA ligase I after UV-C irradiation. *Nucleic Acids Res.* 23, 962-966.
- Moquet, J.E., Prosser, J.S., Edwards, A.A. y Lloyd, D.C. (1989) Sister-chromatid exchanges induced by mitomycin C after acute or chronic exposure of human lymphocytes to a low dose of X-rays. *Mutat. Res.* 227, 207-213.
- Morel, P., Cherny, D., Ehrlich, S.D. y Cassuto, E. (1997) Recombination-dependent repair of DNA double-strand breaks with purified proteins from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 17091-17096.
- Morgan, W.F., Ager, D., Chung, H.W., Ortiz, T., Phillips, J.W. y Winegar, R.A. (1990) The cytogenetic effects of restriction endonucleases following their introduction into cells by electroporation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 340, 355-361.

- Müller, W.E.G. y Zahn, R.K. (1977) Bleomycin, an antibiotic that removes thymine from double-stranded DNA. *Prog. Nucl. Acid. Res.* 20, 21-57.
- Natarajan, A.T. y Obe, G. (1984) Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations: III. Restriction endonucleases. *Chromosoma* 90, 120-127.
- Obe, G., Johannes, C., Schulte-Frohlinde, D. (1992) DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7, 3-12.
- Obe, G., Schunck, C. y Johannes, C. (1994) Induction of sister-chromatid exchanges by AluI, DNase I, benzon nuclease and bleomycin in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat. Res.* 307, 315-321.
- Olivera, B.M. y Lehman, I.R. (1967) Linkage of polynucleotides through phosphodiester bonds by an enzyme from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 1426-1433.
- Olivieri, G., Bodycote, J. y Wolff, S. (1984) Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223, 594-597.
- Olivieri, G. y Bosi, A. (1990) Possible causes of variability of the adaptive response in human lymphocytes. *Chromosomal Aberrations, basic and applied aspects*. G. Obe, A.T. Natarajan (eds), Springer-Verlag, Berlin, Germany, 130-138.
- Ortiz, T., Daza, P., Piñero, J. y Cortés, F. (1995) T4 DNA ligase modulates chromosome damage induced by restriction endonucleases through an error-free process. *Mutagenesis* 10, 399-402.
- Östling, O. y Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-298.
- Östling, O. y Johanson, K.J. (1987) Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *Int. J. Radiat. Biol.* 52, 683-691.
- Perry, P. y Wolff, S. (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156-158.
- Petering, D.H., Byrnes, R.W. y Antholine, W.E. (1990) The role of redox-active metals in the mechanism of action of bleomycin. *Chem. Biol. Interact.* 73, 133-182.

- Peterson, S.R., Kurimasa, A., Oshimura, M., Dynan, W.S., Bradbury, E.M., Chen, D.J., (1995) Loss of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase in DNA double-strand-break-repair mutant mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3171-3174.
- Poddevin, B., Orlowski, S., Belehradek, J. y Mir, L.M. (1991) Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochem. Pharmacol.* 42, 67-75.
- Povirk, L.F. y Austin, M.J.F. (1991) Genotoxicity of bleomycin. *Mutat. Res.* 257, 127-143.
- Povirk, L.F., Han, Y.H., y Steighner, R.J. (1989) Structure of bleomycin-induced DNA double-strand break: predominance of blunt ends and single-base 5' extensions. *Biochemistry* 28, 5808-5814.
- Povirk, L.F., Wübker, W., Köhnlein, W. y Hutchinson, F. (1977) DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin. *Nucleic Acids Res.* 4, 3573-3580.
- Prigent, C., Satoh, M.S., Daly, G., Barnes, D.E. y Lindahl, T. (1994) Aberrant DNA repair and DNA replication due to an inherited enzymatic defect in human DNA ligase I. *Mol. Cell. Biol.* 14, 310-317.
- Ramos, W., Tappe, N., Talamantez, J., Friedberg, E.C. y Tomkinson, A.E. (1997) Two distinct DNA ligase activities in mitotic extracts of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 25, 1485-1492.
- Rathmell, W.K. y Chu, G (1994) Involvement of the Ku autoantigen in the cellular response to DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7623-7627.
- Ray, E., Yaneva, J., Ivanchenko, M., van Holde, K. y Zlatanova, J. (1996) Linker histones inhibit T4 and *Escherichia coli* DNA ligases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 512-518.
- Rigaud, O. y Moustacchi, E. (1994) Radioadaptation to the mutagenic effect of ionizing radiation in human lymphoblasts: molecular analysis of *HPRT* mutants. *Cancer Res.* 5, 1924-1928.
- Robins, P. y Lindahl, T. (1996) DNA ligase IV from HeLa cell nuclei. *J. Biol. Chem.* 271, 24257-24261.
- Rossi, R., Montecucco, A., Ciarrocchi, G. y Biamonti, G. (1997) Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action. *Nucleic Acids Res.* 25, 2106-2113.

- Roy, S.N. y Horwitz, S.B. (1984) Characterization of the association of radiolabeled bleomycin A₂ with HeLa cells. *Cancer Res.* 44, 1541-1546.
- Rusche, J.R., Konigsberg, W. y Howard-Flanders, P. (1985) Isolation of altered recA polypeptides and interaction with ATP and DNA. *J. Biol. Chem.* 260, 949-955.
- Samson, L. y Cairns, J. (1977) A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature* 267, 281-283.
- Sanderson, B.J.S. y Morley, A.A. (1986) Exposure of human lymphocytes to ionizing radiation reduces mutagenesis by subsequent ionizing radiation. *Mutat. Res.* 164, 347-351.
- Sankaranarayanan, K., von Duyn, A., Loos, M.J. y Natarajan, A.T. (1989) Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutat Res* 211, 7-12.
- Sausville, E.A., Peisach, J. y Horwitz, S.B. (1976) A role for ferrous ion and oxygen in the degradation of DNA by bleomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 814-822.
- Schäppi-Büchi, C. (1994) On the genetic background of the adaptive response to X-rays in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 427-435.
- Schmid, E., Bauchinger, M. y Nahrstedt, U. (1989) Adaptive response after X-irradiation of human lymphocytes? *Mutagenesis* 4, 87-89.
- Sen Gupta, S. y Bhattacharjee, S.B. (1988) Induction of repair functions by hydrogen peroxide in Chinese hamster cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 53, 935-942.
- Shadley, J.D. (1994) Chromosomal adaptive response in human lymphocytes. *Radiat. Res.* 138, 9-12.
- Shadley, J.D., Afzal, V. y Wolff, S. (1987) Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X rays to human lymphocytes. *Radiat. Res.* 111, 511-517.
- Shadley, J.D. y Wiencke, J.K. (1989) Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity. *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 107-118.
- Shadley, J.D. y Wolff, S. (1987) Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis* 2, 95-96.

- Shevell, D.E., Friedman, B.M. y Walker, G.C. (1990) Resistance to alkylation damage in *Escherichia coli*: role of the Ada protein in induction of the adaptive response. *Mutat. Res.* 233, 53-72.
- Siddiqi, M.A. y Bothe, E. (1987) Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. *Radiat. Res.* 112, 449-464.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. y Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175, 184-191.
- Souhami, R.L., Craft, A.W., Van der Eijken, J.W., Nooij, M., Spooner, D., Bramwell, V.H., Wierzbicki, R., Malcolm, A.J., Kirkpatrick, A., Uscinska, B.M., Van Glabbeke, M. y Machin, D. (1997) Randomised trial of two regimens of chemotherapy in operable osteosarcoma: a study of the European Osteosarcoma Intergroup. *Lancet* 350, 911-917.
- Sugiura, Y., Suzuki, T., Otsuka, M., Kobayashi, S., Ohno, M., Takita, T. y Umezawa, H. (1983) Synthetic analogues and biosynthetic intermediates of bleomycin. Metal-binding, dioxygen interaction, and implication for the role of functional groups in bleomycin action mechanism. *J. Biol. Chem.* 258, 1328-1336.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J. y Stahl, F.W. (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25-35.
- Takahashi, M. y Senshu, M. (1987) Two distinct DNA ligases from *Drosophila melanogaster* embryos. *FEBS Lett.* 213, 345-352.
- Tempel, K y Schleifer, S. (1995) Adaptive response of the chicken embryo to low doses of x-irradiation. *Radiat. Environ. Biophys.* 34, 177-183.
- Terzoudi, G.I. y Pantelias, G.E. (1997) Conversion of DNA damage into chromosome damage in response to cell cycle regulation of chromatin condensation after irradiation. *Mutagenesis* 12, 271-276.
- Thode, S., Schäfer, A., Pfeiffer, P. y Vielmetter, W. (1990) A novel pathway of DNA end-to-end joining. *Cell* 60, 921-928.
- Thompson, L.H. (1996) Evidence that mammalian cells possess homologous recombinational repair pathways. *Mutat. Res.* 363, 77-88.
- Tice, R.R. y Strauss, G.H. (1995) The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13, 207-214.

- Tomkinson, A. (1997) Mammalian DNA ligases. *Base Excision Repair of DNA Damage*, Ian D. Hickson (ed.), Landes Bioscience.
- Tomkinson, A.E., Roberts, E., Daly, G., Totty, N.F. y Lindahl, T. (1991) Three distinct DNA ligases in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 266, 21728-21735.
- Tounekti, O., Belehradek, J. y Mir, L.M. (1995) Relationships between DNA fragmentation, chromatin condensation, and changes in flow cytometry profiles detected during apoptosis. *Exp. Cell Res.* 217, 506-516.
- Tounekti, O., Pron, G., Belehradek, J. y Mir, L.M. (1993) Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res.* 53, 5462-5469.
- Tsongalis, G.J., Lambert, W.C. y Lambert, M.W. (1990) Electroporation of normal human DNA endonucleases into *Xeroderma pigmentosum* cells corrects their DNA repair defect. *Carcinogenesis* 11, 499-503.
- Umezawa, H., Hori, S., Sawa, T., Yoshioka, T. y Tacheuchi, T. (1974) A bleomycin inactivating enzyme in mouse liver. *J. Antibiot. (Tokyo)* 27, 419-424.
- Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. y Okami, Y. (1966) New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.* 19, 200-209.
- Vermeulen, W., Osseweijer, P., de Jonge, A.J. y Hoeijmakers, J.H. (1986) Transient correction of excision repair defects in fibroblasts of 9 *Xeroderma pigmentosum* complementation groups by microinjection of crude human cell extracts. *Mutat. Res.* 165, 199-206.
- Vig, B.K. y Lewis, R. (1978) Genetic toxicology of bleomycin. *Mutat. Res.* 55, 121-145.
- Vijayalaxmi y Burkat, W. (1989) Resistance and cross-resistance to chromosome damage in human blood lymphocytes adapted to bleomycin. *Mutat. Res.* 211, 1-5.
- Volkert, M.R. y Nguyen, D.C. (1984) Induction of specific *Escherichia coli* genes by sublethal treatments with alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4110-4114.
- von Sonntag, C. (1987) *The chemical basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London.
- Vyas, R.C., Darroudi, F. y Natarajan, A.T. (1991) Radiation-induced chromosomal breakage and rejoining in interphase-metaphase chromosomes of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 249, 29-35.
- Walker, G.C. (1985) Inducible DNA repair systems. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 425-457.

- Wang, Z.Q., Saigusa, S. y Sasaki, M.S. (1991) Adaptive response to chromosome damage in cultured human lymphocytes primed with low doses of X-rays. *Mutat. Res.* 246, 179-186.
- Ward, J.F. (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 35, 95-125.
- Ward, J.F. (1990) The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int. J. Radiat. Biol.* 57, 1141-1150.
- Ward, J.F., Blakely, W.F. y Joner, E.I. (1985) Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. *Radiat. Res.* 103, 383-392.
- Wassermann, K. (1994) Intragenomic heterogeneity of DNA damage formation and repair: a review of cellular responses to covalent drug DNA interaction. *Crit. Rev. Tox.* 24, 281-322.
- Weaver, D.T. (1995) What to do at an end: DNA double-strand-break repair. *Trends Genet.* 11, 388-392.
- Wei, Y.F., Robins, P., Carter, K., Caldecott, K., Pappin, D.J.C., Yu, G.L., Wang, R.P., Shell, B.K., Nash, R.A., Schär, P., Barnes D.E., Haseltine W.A. y Lindahl, T. (1995) Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Mol. Cell Biol.* 15, 3206-3216.
- Weiss, B. y Richardson, C.C. (1967) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. I. Repair of single-strand breaks in DNA by an enzyme system from *Escherichia coli* infected with T4 bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 1021-1028.
- Wiencke, J.K., Afzal, V., Olivieri, G. y Wolff, S. (1986) Evidence that the [³H]thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent doses of X-rays involves the induction of a chromosomal repair mechanism. *Mutagenesis* 1, 375-380.
- Wiese, A.G., Pacifici, R.E. y Davies, K.J.A. (1995) Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 231-240.
- Wojcik, A., Sauer, K., Zölzer, F., Bauch, T. y Müller, W.U. (1996) Analysis of DNA damage recovery processes in the adaptive response to ionizing radiation in human lymphocytes. *Mutagenesis* 11, 291-297.

- Wojewodzka, M., Walicka, M., Sochanowicz, B. y Szumiel, I. (1994) Calcium antagonist, TMB-8, prevents the induction of adaptive response by hydrogen peroxide or X-rays in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 99-109.
- Wolff, S. (1996) Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents. *Mutat. Res.* 358, 135-142.
- Wolff, S., Afzal, V., Wiencke, J.K., Olivieri, G. y Michaeli, A. (1988) Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiation become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce double-strand breaks in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 53, 39-47.
- Wolff, S., Wiencke, J.K., Afzal, V., Youngblom, J. y Cortés, F. (1989) The adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionizing radiation: a case of induced chromosomal repair with the induction of specific proteins. *Low Dose Radiation, Biological Bases of Risk Assessment*. Baverstock, K.F. and Stather, J.W (eds) Taylor and Francis, London, 446-454.
- Woloschak, G.E., Chang-Liu, C.M. y Shearin-Jones, P. (1990) Regulation of protein kinase C by ionizing radiation. *Cancer. Res.* 50, 3963-3967.
- Youngblom, J.H., Wiencke, J.K. y Wolff, S. (1989) Inhibition of the adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionizing radiation by the protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Mutat. Res.* 227, 257-261.

Reunión de la Junta de Gobierno por los votos firmados
en el día de 25 de Enero, 1998, para otorgar el Título Doctoral de
D. MARÍA JOSÉ FLORES SANABRIA

tema: MODULACIÓN DEL DAÑO CROMOSÓMICO PRODUCIDO
POR DIFERENTES AGENTES INDUCTORES DE ROTURAS
DE DOBLE CADENA EN EL ADN

El título se otorga con el grado de APTO CON LAUDE
POR UNANIMIDAD

Fecha: 30 de ENERO 1998

Matilde A. Navarrete

~~El Vocal~~

El Vocal

Emilio Pérez

El Secretario

[Signature]

El Doctorado



501038608

FBI E TD / 381

1038608