

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

**RESPUESTA ADAPTATIVA Y PAPEL DE ENZIMAS  
ANTIOXIDANTES EN LA PROTECCION FRENTE  
AL DAÑO CAUSADO POR RADIACION IONIZANTE  
EN CELULAS EUCARIOTICAS**

**Inmaculada Domínguez García  
TESIS DOCTORAL  
1993**

TD 254

TD  
284



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para  
que mi Tesis Doctoral \_\_\_\_\_

*Si*

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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



*Lucinda Domínguez*

Sevilla, a 14 de Marzo de 1995

**RESPUESTA ADAPTATIVA Y PAPEL DE ENZIMAS  
ANTIOXIDANTES EN LA PROTECCION FRENTE AL DAÑO  
CAUSADO POR RADIACION IONIZANTE EN CELULAS  
EUCARIOTICAS**

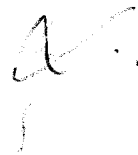
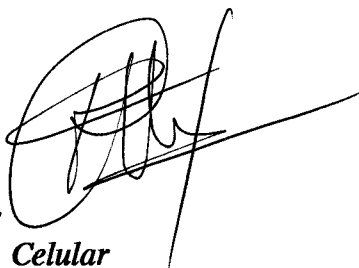
*Trabajo realizado en el Departamento de Biología Celular, Facultad de  
Biología, Universidad de Sevilla , para optar al grado de Doctora en  
Biología por la Licenciada*

**INMACULADA DOMINGUEZ GARCIA**

*Sevilla, 1993*

*Director y Ponente*

*Dr. Felipe Cortés Benavides  
Profesor Titular de Biología Celular  
Universidad de Sevilla*



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

---

Se ha registrado esta Tesis Doctoral  
a: 59 número 51 del libro  
con el número 1500  
Sevilla, 1980

---

El Jefe del Negociado de Tesis,

*Luis Raffette*

*A Juanqui*



*A mis padres*

## **ABREVIATURAS**

aa: aminoácidos

AC: Aberraciones cromosómicas

BLM: Bleomicina

CAT: Catalasa

CB: Método de bloqueo en citocinesis

Cyt B: Citocalasina B

dsb: Roturas de doble cadena en el ADN

FCS: Suero Fetal Bovino

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación

GST: Glutación S-transferasa

G6PD: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

[<sup>3</sup>H]TdR: Timidina tritiada

LET: Transferencia lineal de energía

LMSD: Ataque radical múltiple localizado

MMC: Mitomicina C

MMS: metil-metano-sulfonato

MN: Micronúcleos

MNNG: N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

pb: pares de bases

PCC: Condensación cromosómica prematura

RA: Respuesta adaptativa

RI: Radiación ionizante

SCE: Intercambios entre cromátidas hermanas

SOD: Superóxido dismutasa

ssb: Roturas de cadena simple en el ADN

TEM: Trietileno melamina

UDS: Síntesis no programada (reparadora) de ADN

UV: luz ultravioleta

<b>1 INTRODUCCION</b> . . . . .	1
<b>1.1 Daño oxidativo</b> . . . . .	3
1.1.1 Causas internas y externas . . . . .	3
1.1.2 Peróxido de hidrógeno. . . . .	4
- <i>Reacción de Fenton y Haber-Weiss</i> . . . . .	4
- <i>Producción de lesiones por peróxido de hidrógeno</i> . . . . .	5
- <i>Evidencias de la reacción de Fenton in vivo</i> . . . . .	5
- <i>Efectos genotóxicos</i> . . . . .	7
<b>1.2 Radiación ionizante y agentes radiomiméticos</b> . . . . .	8
1.2.1 Rayos X . . . . .	8
- <i>Modo de transferencia de la energía.</i> . . . . .	8
- <i>Acción directa e indirecta de la radiación ionizante; radiólisis del agua.</i> . . . . .	9
- <i>Reacciones de los radicales libres</i> . . . . .	10
- <i>Lesiones producidas por radiación ionizante</i> . . . . .	10
- <i>Alteraciones citogenéticas</i> . . . . .	12
1.2.2 Bleomicina . . . . .	15
- <i>Estructura de la molécula y formación del complejo activo</i> . . . . .	15
- <i>Tipos de lesiones</i> . . . . .	17
- <i>Efectos citológicos</i> . . . . .	18
<b>1.3 Tipos de defensas celulares frente al daño oxidativo</b> . . . . .	18
1.3.1 Antioxidantes no enzimáticos. . . . .	19
1.3.2 Enzimas antioxidantes. . . . .	20
- <i>Superóxido dismutasas</i> . . . . .	21
- <i>Glutación peroxidadasas</i> . . . . .	22
- <i>Catalasa</i> . . . . .	24
- <i>Enzimas antioxidantes secundarios</i> . . . . .	25
1.3.3 Reparación . . . . .	26
<b>1.4 La respuesta adaptativa</b> . . . . .	27
1.4.1 La respuesta adaptativa en bacterias: sistemas <i>ada</i> y <i>oxyR</i> . . . . .	27
1.4.2 La respuesta adaptativa al daño oxidativo en linfocitos humanos . . . . .	29

1.4.3 La respuesta adaptativa en otros tipos celulares . . . . .	34
1.4.4 La respuesta adaptativa <i>in vivo</i> . . . . .	35
<b>1.5 Objetivos . . . . .</b>	<b>37</b>
<b>2 MATERIALES Y METODOS . . . . .</b>	<b>38</b>
<b>2.1 Células vegetales . . . . .</b>	<b>38</b>
2.1.1 Crecimiento de las raíces . . . . .	38
2.1.2 Procedimiento de irradiación y tratamiento con timidina tritiada .	38
2.1.3 Fijación . . . . .	39
2.1.4 Tinción y modo de hacer las preparaciones . . . . .	39
2.1.5 Técnica autorradiográfica . . . . .	40
<b>2.2 Linfocitos humanos . . . . .</b>	<b>40</b>
2.2.1 Método de cultivo . . . . .	40
2.2.2 Análisis de aberraciones cromosómicas . . . . .	40
- <i>Tratamiento condicionante con peróxido de hidrógeno</i> . . . . .	40
- <i>Tratamiento challenge</i> . . . . .	41
- <i>Parada en metafase y fijación</i> . . . . .	41
2.2.3 Análisis para la detección de micronúcleos . . . . .	41
- <i>Tratamiento condicionante</i> . . . . .	41
- <i>Tratamiento challenge</i> . . . . .	42
- <i>Obtención de células binucleadas y fijación</i> . . . . .	42
2.2.4 Tinción y forma de hacer las preparaciones . . . . .	43
2.2.5 Análisis estadístico . . . . .	43
<b>2.3 Línea CL1 (Células de Hámster Chino) . . . . .</b>	<b>44</b>
2.3.1 Método de cultivo . . . . .	44
2.3.2 Comprobación de la actividad enzimática . . . . .	44
- <i>Ensayo enzimático</i> . . . . .	44
- <i>Ensayo de precipitación de ADN</i> . . . . .	45

2.3.3 Experimentos citogenéticos . . . . .	46
- <i>Test de aberraciones cromosómicas</i> . . . . .	46
- <i>Análisis de supervivencia</i> . . . . .	46
<b>2.4 Línea CHO6 (Células de Hámster Chino)</b> . . . . .	<b>47</b>
2.4.1 Método de cultivo . . . . .	47
2.4.2 Experimentos citogenéticos . . . . .	47
- <i>Preparación del enzima catalasa</i> . . . . .	47
- <i>Método de electroporación</i> . . . . .	48
- <i>Tratamiento y obtención de las preparaciones.</i> . . . . .	49
2.4.3 Comprobación de la actividad catalasa . . . . .	49
- <i>Ensayo de precipitación de ADN</i> . . . . .	49
<b>3 RESULTADOS</b> . . . . .	<b>52</b>
<b>3.1 Respuesta adaptativa en linfocitos humanos</b> . . . . .	<b>52</b>
3.1.1 Experimentos para la detección de aberraciones cromosómicas . . . . .	52
- <i>Efecto clastogénico de un tratamiento condicionante con</i> <i>peróxido de hidrógeno</i> . . . . .	52
- <i>Respuesta adaptativa inducida por un pulso simple con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> . . . . .	52
- <i>Efecto de múltiples pulsos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes del challenge con</i> <i>rayos X sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas.</i> . . . . .	54
- <i>Efecto de un pulso simple de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la frecuencia de</i> <i>aberraciones cromosómicas inducida por un tratamiento con</i> <i>bleomicina</i> . . . . .	57
3.1.2 Test de micronúcleos para el estudio de la respuesta adaptativa. . . . .	59
- <i>Efecto de un pulso simple de peróxido de hidrógeno sobre la</i> <i>frecuencia de micronúcleos observada tras un challenge con</i> <i>1.5 o 3.0 Gy de rayos X a distintos tiempos de recuperación en</i> <i>Cyt B</i> . . . . .	59
- <i>Efecto de un pulso simple con peróxido de hidrógeno sobre la</i> <i>frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos producida</i> <i>por un tratamiento con bleomicina</i> . . . . .	64
<b>3.2 Estudio de la respuesta adaptativa en células vegetales</b> . . . . .	<b>66</b>
3.2.1 Efecto de bajas dosis de rayos X sobre la frecuencia de aberraciones inducida por 1.5 Gy de rayos X . . . . .	66

3.2.2 Efecto de bajas dosis de [ <sup>3</sup> H]TdR incorporada en el ADN sobre la frecuencia de aberraciones inducida por 1.5 Gy de rayos X . . . . .	67
<b>3.3 Efecto de la glutatión peroxidasa sobre el daño producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y rayos gamma en la línea CL1 . . . . .</b>	<b>69</b>
3.3.1 Evaluación del daño cromosómico y supervivencia celular . . . . .	69
3.3.2 Detección de roturas de cadena en el ADN mediante el ensayo de precipitación . . . . .	70
<b>3.4 Efecto de la electroporación con catalasa sobre el daño en el ADN producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el daño cromosómico por rayos X . . . . .</b>	<b>72</b>
3.4.1 Evaluación del daño cromosómico . . . . .	72
3.4.2 Estimación del daño en el ADN por el ensayo de precipitación . . . . .	76
<b>4 DISCUSION . . . . .</b>	<b>79</b>
<b>4.1 Respuesta adaptativa a radiación ionizante en células de mamífero: evidencias citogenéticas y moleculares. . . . .</b>	<b>79</b>
<b>4.2 Diferentes respuestas a la bleomicina y los rayos X puestas de manifiesto tras un daño oxidativo . . . . .</b>	<b>84</b>
<b>4.3 La respuesta adaptativa en células vegetales. . . . .</b>	<b>87</b>
<b>4.4 Importancia relativa de la glutatión peroxidasa en la protección frente a la radiación ionizante . . . . .</b>	<b>89</b>
<b>4.5 Evidencias a favor y en contra del posible papel de la catalasa en la protección frente al daño inducido por rayos X . . . . .</b>	<b>91</b>
<b>5 CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>96</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA . . . . .</b>	<b>99</b>

## ***INTRODUCCION***

## 1 INTRODUCCION

A diferencia del ADN en procariotas, el ADN de eucariotas se caracteriza por el alto grado de organización de su estructura. Una célula diploide humana contiene unos  $6 \times 10^9$  pares de bases (pb) correspondientes a 180 cm de longitud, que están empaquetados en 46 cromosomas cuyo contorno total mide 200  $\mu\text{m}$ . *In vivo* el ADN está organizado y compactado en varios niveles por la ayuda de histonas en la estructura cromatínica. Los nucleosomas consisten en un núcleo de 140 pb enrolladas alrededor de un octómero de histonas que está a su vez formado por dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Las uniones entre nucleosomas (linkers) están formadas por 20-60 pb asociadas a la histona H1. La organización de la cromatina parece estar gobernada por el estado funcional de la secuencia de ADN subyacente. El ADN que se va a transcribir se encuentra en una estructura cromatínica más abierta y dinámica que las secuencias transcripcionalmente inactivas. De esta forma la información genética que la célula necesita es más accesible a las polimerasas.

El ADN está constantemente haciéndole frente al daño que amenaza la integridad del código genético. El daño en el ADN es inducido por numerosos agentes físicos y químicos, aparte de que la inestabilidad química del propio ADN le causa unas 10.000 depurinaciones espontáneas por célula y día. Durante el curso de la evolución, se han desarrollado distintos sistemas para salvaguardar la integridad de la información genética almacenada en el núcleo. La primera línea de defensa consiste en enzimas de detoxificación y compuestos que neutralizan los reactivos químicos. La organización de la cromatina en estructuras superiores protege también al ADN. A pesar de esto, el ADN se daña por causas internas o externas. El gran número de formas distintas de daño ha forzado a las células a tener distintos sistemas de reparación. La figura 1 muestra algunos de los tipos de lesiones más comunes y cómo se cree que son reparadas.



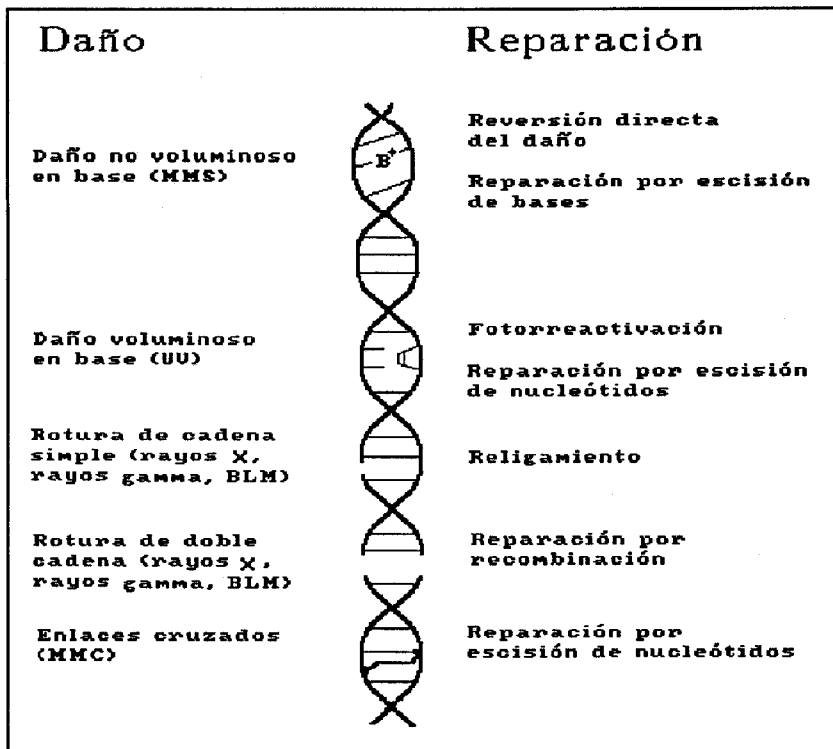


Fig. 1.- Principales tipos de lesiones y sistemas de reparación en el ADN (Ljungman,1990)

Existen también sistemas inducibles de reparación que se activan en situaciones de estrés. Un organismo unicelular está sometido a constantes cambios en el ambiente. Para sobrevivir necesita programas génicos inducibles que hagan frente a situaciones de estrés, de los que hay varios bien descritos. En eucariotas, aunque estos sistemas no sean tan primordiales (el ambiente de las células de mamífero no varía mucho), y sean mucho más difíciles de estudiar debido a la complejidad del genoma, se empieza a tener evidencias de su existencia.

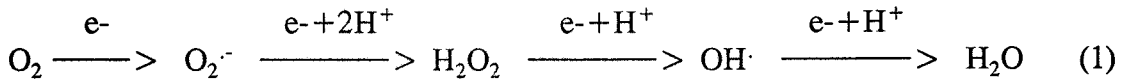
El alto grado de organización del ADN en las células eucarióticas hace necesaria la existencia de factores en la maquinaria de reparación que hagan a los enzimas de reparación accesibles al daño. Ljungman propone un modelo para explicar la activación de la cromatina cuando sea necesaria, que llamó "Chromatin Switch" y

que muestra la complejidad del ADN eucariota. El ADN está empaquetado en la estructura cromatínica donde las proteínas unidas al ADN protegen elementos reguladores, orígenes de replicación y ADN dañado que necesita ser reparado. Para que la célula pueda cambiar rápidamente su programa genético como respuesta a una situación de estrés o entrar en ciclo desde un estado de descanso, las secuencias reguladoras necesarias de ADN deben deshacerse de la protección proteica. En respuesta a cambios ambientales, las proteínas sensoriales o controladoras mandan señales al núcleo mediante señales de trasducción. En el núcleo, las señales que han llegado pueden activar las proteínas diana para que la cromatina se descondense. La descondensación de la cromatina capacitaría a factores que actúan en trans a encontrar los correspondientes elementos en cis para la inducción de genes de estrés o la preparación para la síntesis de ADN. También permite a las proteínas reparadoras encontrar al ADN dañado para un procesamiento posterior.

## **1.1 Daño oxidativo**

### **1.1.1 Causas internas y externas.**

Un radical libre se define como cualquier especie capaz de existencia independiente que contiene uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 1989). Las especies reactivas de oxígeno como superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) pueden generarse externamente durante la degradación oxidativa de derivados xenobióticos, exposición a contaminantes y a radiación ionizante, pero además se generan endógenamente durante el metabolismo oxidativo normal, por lo que son una consecuencia inevitable de la dependencia aeróbica. Casi todo el oxígeno consumido por el cuerpo humano se reduce tetravalentemente a agua por el complejo citocromo oxidasa en la mitocondria. Aproximadamente el 1% se reduce sin embargo univalentemente, produciéndose  $O_2^{\cdot-}$ , y una posterior reducción en esta vía daría peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo:

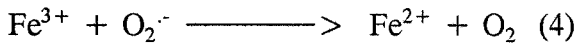
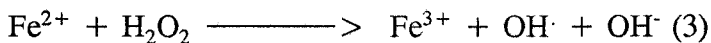
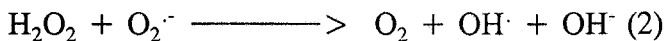


Estos radicales altamente reactivos pueden afectar en las células a proteínas , carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

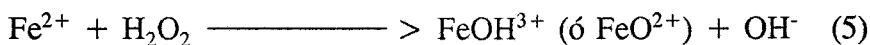
### 1.1.2 Peróxido de hidrógeno.

#### *-Reacción de Fenton y Haber-Weiss*

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una de las especies reactivas de oxígeno. Se forma por la dismutación espontánea o enzimática del radical superóxido, o por la reducción bivalente directa del oxígeno molecular (Sies, 1986). Puede atravesar las membranas celulares sin dificultad. Produce el daño a través de los radicales  $\text{OH}^{\cdot}$  que indirectamente se generan en las reacciones de Haber-Weiss (2) y Fenton (3) (se acepta en general que ni el  $\text{O}_2^{\cdot -}$  ni el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son capaces de reaccionar directamente con el ADN).



La reacción de Haber-Weiss(2) es un proceso cinéticamente muy lento (Halliwell, 1978) y requiere un metal de transición como catalizador. Si la reacción 4 se acopla a la de Fenton, las dos producen la de Haber-Weiss. El radical hidroxilo es uno de los más reactivos formados en sistemas biológicos y es capaz de reaccionar con prácticamente la totalidad de los componentes celulares. Su reactividad se ve sólo limitada por su capacidad de difusión (Hochstein y Atallah, 1988). Existen pruebas que indican que en la reacción de Fenton, además de  $\text{OH}^{\cdot}$ , se forman otras especies como el radical ferrilo, complejo formado por hierro y oxígeno.



*-Producción de lesiones por peróxido de hidrógeno*

En experimentos en que el ADN se expuso a  $H_2O_2$  más hierro (Rhaese y Freese, 1968) o  $H_2O_2$  solo (Demple y Linn, 1982), los principales productos observados fueron timina glicol, ssb (principalmente) y sitios libres de bases, sobre todo apurínicos.

Cuando el radical  $OH\cdot$  se genera por la reacción de Fenton el tipo de lesión del ADN se puede considerar que depende de la localización topológica del metal. Se pueden imaginar dos situaciones extremas. En la primera, el metal estaría libre disuelto, flotando alrededor de la molécula de ADN. Esta situación se ha estudiado exponiendo el ADN al complejo EDTA-Fe más  $H_2O_2$  y los resultados han mostrado que el radical  $OH\cdot$  rompe el esqueleto de ADN sin casi dependencia de la secuencia (Tullius y Dambroski, 1986). Probablemente los blancos principales sean los azúcares desoxirribosa en la superficie de ADN. Reacciones secundarias de los radicales desoxirribosa resultantes provocan eventualmente la rotura del esqueleto, principalmente por desintegración de los propios azúcares (Hertzberg y Dervan, 1984). La otra situación sería aquella en que el metal está fuertemente unido al ADN (Shires, 1982) y es un reactante de Fenton. El radical  $OH\cdot$  se generará muy cerca del sitio de reacción del ADN, con lo que sitios específicos de la molécula de ADN constituirían puntos favorables de ataque para el radical  $OH\cdot$ . Se llama sitio específico de reacción de Fenton a la circunstancia en que el metal de Fenton está unido al blanco del radical  $OH\cdot$  (Samuni y col., 1983). Se ha visto que los radicales  $OH\cdot$  viajan una media de 15 Å desde el sitio de formación al de reacción (Ward y col., 1985). Esta corta distancia (menor que el diámetro de la doble hélice de ADN) sugiere una reacción de sitio específico.

*-Evidencias de la reacción de Fenton in vivo*

Se ha visto que el Fe se une firmemente al ADN (Shires, 1982) y el complejo parece participar en Fenton (Floyd, 1981). Aunque no se ha demostrado que esto ocurra *in vivo*, sí hay evidencias que lo indican. En células de mamífero el  $H_2O_2$  no es

tóxico a baja temperatura en un rango de concentración que sí lo sería a 37°C (Ward, 1985), y se demostró que la toxicidad a esa temperatura se restauraba en determinadas condiciones que eran consistentes con un mecanismo de daño celular que dependiera de la reacción de Fenton y un ion metálico en su estado reducido.

Dizdaroglu y col. (1991) caracterizaron el tipo de lesiones en bases producido *in vivo* en células de mamífero por exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que eran las típicas de las inducidas por radicales hidroxilo. Los OH· puede que se generen *in vivo* tras el tratamiento de las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una reacción tipo Fenton mediada por metales de transición (Halliwell y Gutteridge, 1990). Sin embargo debido a su alta reactividad, los OH· deben generarse muy próximos al ADN de forma sitio-específica para provocar cualquier daño en el ADN *in vivo*. Los iones metálicos puede que estén unidos a la cromatina *in vivo*, y/o el estrés oxidativo puede que libere iones metálicos de sus sitios de almacenamiento con la consecuente unión a la cromatina (Halliwell, 1987).

Es probable que el Cu y el Fe sean los mediadores de la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajo condiciones fisiológicas. La mayor parte (aproximadamente el 75%) de los 4 g de Fe que se encuentran en un humano adulto está en la mioglobina y hemoglobina (Harrison y Hoare, 1980). Una cantidad muy pequeña se encuentra en proteínas que contienen Fe y proteínas de transporte. El resto reside en las proteínas de almacenamiento intracelular, ferritina y hemosiderina. De acuerdo con su extremadamente baja solubilidad bajo condiciones fisiológicas, los niveles de Fe en la sangre se ha confirmado que son virtualmente nulos (Gutteridge y col., 1981). El pequeño pool de Fe no unido a proteína, que entra en la célula, puede proporcionar el Fe para la reacción de Fenton. Esta podría ser la razón básica para el proceso natural de mantener el Fe libre al menor nivel posible. Sin embargo, niveles micromolares de Fe se han cuantificado en líquido sinovial y cerebral, pero no en el suero o plasma (Halliwell y Gutteridge, 1984). El Cu se ha visto que es menos abundante en el cuerpo humano y la cantidad total es menor de 100 mg. Es una parte integral de un gran

número de proteínas asociadas con reacciones rédox. Se ha sugerido que algunos de los sitios más vulnerables serían los localizados en las regiones de "dedo de Zn" de proteínas de unión al ADN (Sunderman y Barber, 1988). Aunque el Zn no sufre reacciones rédox, si este metal fuese reemplazado por iones metálicos que sí las sufren, podrían darse reacciones de radicales libres dañinas (Willson, 1988).

*-Efectos genotóxicos*

El  $H_2O_2$  induce daño en el ADN incluidas roturas de cadena simple y doble, daño en las bases, liberación de bases y cross-links (Villaume, 1987; Meneghini, 1988). La producción de las roturas en el ADN por peróxido depende del tipo celular y parece ser muy específica de las especies. La tasa de formación de roturas de ADN *in vivo* no es lineal con la concentración de peróxido de hidrógeno pero aumenta hasta un cierto rango de concentración que depende del tipo celular (Hoffmann y col., 1984). Una posible explicación es que el factor limitante sea la cantidad de metal unida a la cromatina, considerándola una reacción de Fenton de sitio específico. Distintos tipos celulares podrían tener distintas cantidades de Fe unido a la cromatina que explicaría los distintos niveles de saturación de roturas cromosómicas. Otra posibilidad es que el factor limitante sea el agente que reduce el metal a la forma requerida para la reacción de Fenton.

Tanto las aberraciones cromosómicas (AC) como los intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) pueden ser inducidos por especies activas de oxígeno, aunque existen diferencias en cuanto a los requerimientos (Esterving y Wang, 1984). Así parece que las roturas en el ADN producidas por  $H_2O_2$  pueden dar lugar a SCE, pero algún otro factor se requiere para las AC (Emerit y Cerutti, 1982; Emerit y col., 1985). El mecanismo de producción de SCE y AC por especies activas de oxígeno no se conoce todavía.

## 1.2 Radiación ionizante y agentes radiomiméticos

### 1.2.1 Rayos X

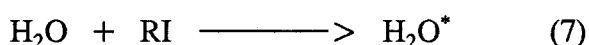
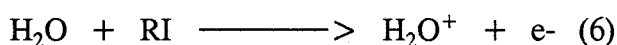
#### *-Modo de transferencia de la energía.*

El daño detectable en células vivas como consecuencia de una exposición a radiación ionizante es el resultado de una larga y compleja cadena de sucesos. El primero de ellos es la transferencia de la energía de la radiación a la materia que compone a los seres vivos. La principal forma por la que las radiaciones ionizantes disipan su energía en la materia es por eyección de orbitales electrónicos de los átomos. Los fotones de rayos X y  $\gamma$  son radiaciones electromagnéticas sin carga y sin masa. En sus interacciones con la materia, la energía de los fotones se transfiere por colisión generalmente con un orbital electrónico de un átomo del medio. Tras la colisión, un  $e^-$  puede o bien pasar a un orbital más retirado del núcleo y el átomo quedar excitado o, más comúnmente, salir del átomo con alta energía y velocidad, quedando ionizado. La energía dada al  $e^-$  se disipará de él al moverse en el medio y a la vez ionizará y excitará átomos con los que interactúe. Por tanto, el daño producido por los rayos X y  $\gamma$  es casi enteramente a través de  $e^-$  de alta velocidad eyectados de átomos. Puesto que la interacción de los fotones con la materia depende de la posibilidad de colisión con  $e^-$ , son capaces de penetrar profundamente en la materia.

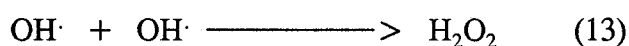
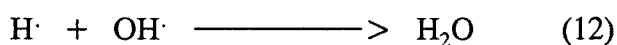
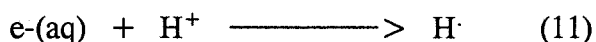
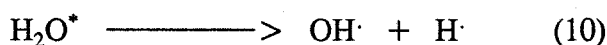
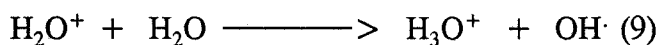
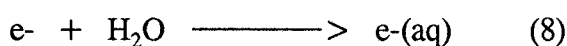
Las moléculas quedan en estados de alta energía cuando las radiaciones ionizantes las ionizan o excitan, adquiriendo una alta probabilidad de producir reacciones químicas para alcanzar estabilidad. Los efectos detectables de la radiación ionizante en las células dependen de qué moléculas son afectadas. Las moléculas que gobiernan o realizan una función celular determinada pueden ser blanco de la radiación y su función puede ser alterada o perdida. El blanco más importante es el ADN, debido a que almacena la información y dirige la actividad celular.

*-Acción directa e indirecta de la radiación ionizante; radiólisis del agua.*

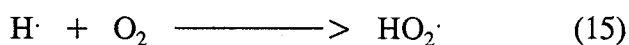
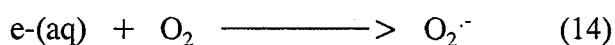
Cualquier molécula puede ser afectada por la radiación por acción directa, absorción directa de la energía quedando ionizada o excitada, o indirecta, cuando reacciona con una molécula o el producto de una molécula que ha interactuado directamente con la radiación. Puesto que la acción de la radiación es al azar, las moléculas que corren el mayor riesgo de interacción con las radiaciones son las presentes en mayor número, que son las de agua. En la radiólisis del agua la interacción de la radiación ionizante (RI) con el agua resulta en ionización (6) y excitación (7)



Tienen lugar reacciones en que se producen más radicales libres (8-11), y reacciones en que estos se neutralizan (12 y 13)



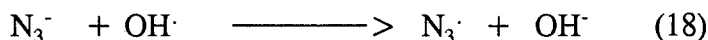
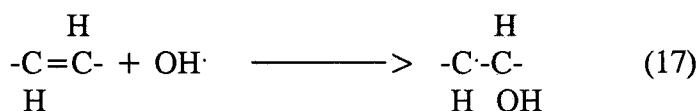
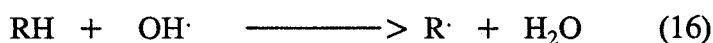
Quando el oxígeno está presente durante la irradiación, como es el caso normal, se producen radicales superóxido por la reacción entre e- hidratados y oxígeno molecular (14). El oxígeno a su vez secuestra átomos de H produciendo radicales hidropéroxido (15)



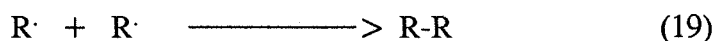


*-Reacciones de los radicales libres*

La reacción de los radicales libres con especies no radicales produce diferentes radicales libres que pueden ser más o menos reactivos que el radical original. Las distintas reacciones del radical hidroxilo pueden ser tomadas como ejemplo de reacciones de radicales libres. El radical OH· reacciona generalmente por extracción de H (16), adición (17) o transferencia de e- (18).



Estas reacciones son ejemplos de propagación, que terminan cuando dos radicales se combinan para formar un no radical por reacciones de combinación o desproporción



Puesto que los efectos permanentes de la radiación es más probable que ocurran tras cambios en las moléculas clave, y puesto que la acción directa en éstas es un suceso raro, la acción indirecta se cree que es el mecanismo más importante de producción de efectos biológicos por la radiación.

Para las radiaciones ionizantes, se ha propuesto que las especies activas de O<sub>2</sub> son responsables del 60-70% de las roturas en el ADN, AC, mutaciones y muerte celular (Okada y col., 1983).

*-Lesiones producidas por radiación ionizante*

El daño al ADN por especies activas de O<sub>2</sub> resulta en ssb, dsb, sitiosapurínicos y apirimidínicos y derivados de timina de anillo saturado. La mayoría de las roturas

de cadena producidas por radiación ionizante son causadas por roturas en las uniones fosfodiéster en una de las cadenas de polinucleótidos, pero la destrucción del anillo desoxirribosa puede resultar también en interrupciones de la cadena de fosfato-desoxirribosa. La presencia de ssb inducidas por radiación ionizante puede resultar en desnaturalización muy localizada en la vecindad de la rotura, incrementándose por ello la probabilidad de ataque mediado por radicales libres. Al igual que el daño en las bases, las roturas de cadena pueden resultar del efecto directo e indirecto. En el primer caso, la emisión de aproximadamente 9 eV de energía es suficiente para romper el esqueleto fosfato-desoxirribosa. En el caso del efecto indirecto, los radicales hidroxilo parecen ser de importancia en la hidrólisis de los puentes fosfodiéster. Los mecanismos químicos precisos de rotura de cadena por radiación son variados y complejos y son principalmente procesos radiolíticos. Pueden implicar ionización directa del puente fosfodiéster, o reacciones de fragmentación que impliquen bases o azúcares, acopladas a reajustes electrónicos que resultan en último caso en hidrólisis de puentes fosfodiésteres lábiles.

El mecanismo de formación de ssb en presencia de oxígeno está bien establecido. Se inicia por la formación de un radical en la desoxirribosa por pérdida de un átomo de H (ya sea por ionización directa y pérdida de protón o extraído por un radical  $\text{OH}\cdot$ ). Este radical reacciona con oxígeno formando un radical peroxi y una ssb subsecuente (von Sonntag, 1987). Está generalmente aceptado que las dsb son las responsables de las AC y otros efectos como mutación genética y muerte celular. Aunque el mecanismo completo de formación de dsb no se conoce, se han propuesto dos modelos. Los dos modelos coinciden en que cada ssb constituyente se forma por el mecanismo descrito; sin embargo se diferencian en el origen del segundo radical de azúcar en la otra cadena. Siddiqui y Bothe (1987) proponen que un radical simple puede iniciar la formación de una dsb. El radical desoxirribosa formado por el ataque del radical  $\text{OH}\cdot$  (o presumiblemente de una desoxirribosa directamente ionizada) se propone que inicia una serie de reacciones: a) reacción con oxígeno, b) reacción del producto radical que lleva a ssb, c) transferencia de radical a la cadena complementaria

(el extremo de la cadena rota sobre el que el radical reside extrae un átomo de H de la desoxirribosa de la cadena complementaria); d) reacción de este segundo producto radical para formar una segunda rotura de cadena. Por otra parte, Ward (1985) propone el concepto de ataque radical múltiple localizado (LMSD). La radiación ionizante provoca daño en el ADN vía ionizaciones directas y radicales OH $\cdot$ . En un medio celular, debido a la alta concentración de secuestradores, los radicales tienen una vida media de sólo 1 nseg y recorren distancias del orden de nm. Por ello reaccionan cerca del sitio en que se forman. Puesto que los radicales se forman en clusters en pequeños volúmenes de alta emisión local de energía, existe la posibilidad de este LMSD, de manera que el daño se produciría por concentraciones de ionizaciones y excitaciones en o muy cerca del blanco. Las consecuencias de estos mecanismos son diferentes, particularmente con respecto a las reacciones de precursores radicales con oxígeno, sensibilizadores o protectores. En el mecanismo LMDS las reacciones que forman las dos roturas de cadena ocurrirían simultáneamente, mientras que para el mecanismo simple ocurrirían secuencialmente.

#### *-Alteraciones citogenéticas*

El daño en el ADN por radiación ionizante puede llevar a alteraciones estructurales en los cromosomas. El ADN se rompe o por el paso de partículas ionizantes a través de él o por el ataque de productos de material celular irradiado, generalmente agua. La producción final de AC resulta del balance del daño inducido por radiación y de la reparación. La reparación puede reconstituir la configuración original del cromosoma (restitución), puede implicar la unión entre extremos ilegítimos para producir aberraciones tipo intercambio (reparación ilegítima), o la rotura puede permanecer abierta y dar deleciones.

La figura 2 muestra los distintos tipos de AC. Los intercambios pueden ser simétricos o asimétricos. Los intercambios simétricos, si se completan, no provocan problemas de separación en anafase. Se llaman aberraciones estables y son potencialmente más dañinas porque pueden perdurar a través de los sucesivos ciclos.

Los intercambios asimétricos se llaman inestables y son generalmente letales por implicar frecuentemente puentes dicéntricos que suponen problemas de separación insuperables.

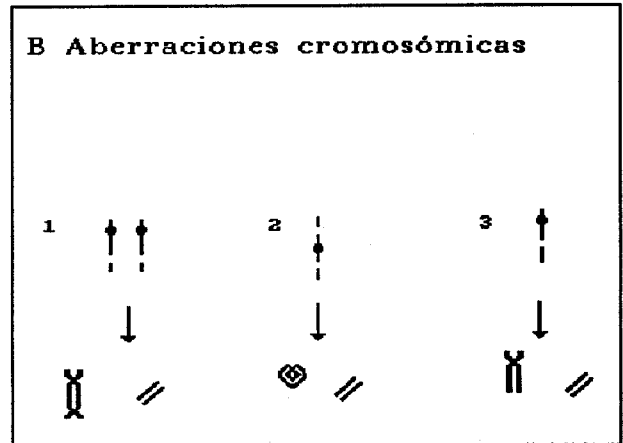
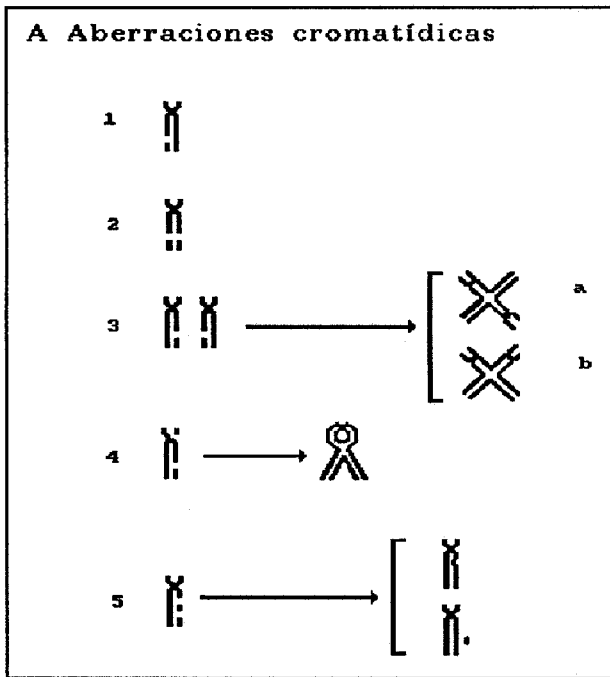


Fig. 2.- Tipos de aberraciones. A. Aberraciones cromatídicas: 1) Delección, 2) Isocromatídica, 3) Intercambios (a, simétrico; b, asimétrico), 4) Intracambio Interbrazo, 5) Intracambio Intrabrazo. B. Aberraciones cromosómicas: 1) Dicéntrico, 2) Anillo, 3) Delección.

El número de AC que requieren dos roturas (tipo intercambio) depende de la probabilidad de que la primera y la segunda ocurran cerca en el espacio, de forma que puedan interactuar, y el tiempo, de manera que la primera no se restituya antes de que se induzca la segunda. Tanto la LET (Linear Energy Transfer) como la tasa de dosis de la radiación son importantes en este tipo de AC. Una radiación ionizante de alta LET puede fácilmente producir las dos lesiones requeridas. En el mismo sentido, una radiación de alta tasa de dosis no permitirá la restitución de la primera rotura antes de que se haya producido la segunda. El número de AC que resulta de una rotura simple aumenta linealmente con la dosis, mientras que las resultantes de dos roturas incrementa con el cuadrado de la dosis. En general, las radiaciones de baja LET son menos eficientes rompiendo cromosomas que las de alta LET. A muy alta LET, la efectividad

puede disminuir; al aumentar la LET, la energía de las partículas se gasta rápidamente de forma que las partículas se mueven más lentamente y disminuye la posibilidad de alcanzar un cromosoma.

El número de AC que implican una sola rotura es independiente de la tasa de dosis o fraccionamiento de la misma; las AC complejas necesitan dos roturas abiertas al mismo tiempo, y por tanto disminuyen al disminuir la tasa de dosis o al fraccionar la dosis. En cuanto a las fases del ciclo,  $G_2$  es más radiosensible que S y  $G_1$ , dependiendo también el tipo de AC producidas de la fase en que las células están cuando reciben la radiación. Si las células se irradian en  $G_1$  se forman muchas AC complejas (dicéntricos y anillos), en S o  $G_2$  se producen simples.

El test de micronúcleos (MN) es otro test citológico de medida de daño en el ADN. Los MN se originan de fragmentos acéntricos o cromosomas enteros que no se incorporan en el núcleo de las células hijas en la mitosis y son visualizados como pequeños núcleos en la siguiente interfase celular. La producción de MN en linfocitos estimulados de sangre periférica se ha probado que es un indicador biológico sensible del daño cromosómico inducido por radiación ionizante (Countryman y Heddle, 1976; Fenech y Morley, 1985; Huber y col., 1983). Estudios recientes (Thomson y Perry, 1988; Eastmond y Tucker, 1989; Fenech y Morley, 1989) empleando inmunofluorescencia para cinetocoros en MN con anticuerpos anticinetocoro han mostrado que los MN inducidos por radiación derivan predominantemente de fragmentos acéntricos.

El método de bloqueo en citocinesis (CB) introducido por Fenech y Morley en 1985, es una modificación del test de MN y es muy usado en linfocitos humanos para identificar células que se han dividido una vez en cultivo. El reconocimiento de estas células es importante en estudios de exposición humana a agentes genotóxicos, porque los MN se forman de lesiones preexistentes en los linfocitos circulantes en reposo cuando las células se estimulan y se dividen en cultivo. El análisis se debe restringir

a tales células en segundo ciclo interfásico porque el incluir células que han completado más de una división resulta en una estimación inexacta de la frecuencia de MN. El método CB utiliza citocalasina B (Cyt B) que inhibe la división citoplásmica sin impedir la mitosis. Como consecuencia las células que se han dividido una vez son fácilmente identificables por la presencia de dos núcleos (binucleadas). Aunque la Cyt B inhibe la polimerización de los filamentos de actina, que es importante en la construcción de la red citoplásmica (McLean-Fletcher y Pollard, 1980), no se ha demostrado que interactúe con el mayor componente del huso mitótico, la tubulina. Comparado con los métodos clásicos citogenéticos de evaluación de daño cromosómico, el ensayo de MN es relativamente simple y permite un rápido conteo de un gran número de células.

### 1.2.2 Bleomicina

La bleomicina (BLM) es una de las drogas antitumorales radiomiméticas, es decir, que producen AC comparables a las inducidas por rayos X (Ohama y Kadotani, 1970), y como en el caso de la acción indirecta de la irradiación, la BLM induce también roturas en el ADN a través de la producción de radicales libres (Sausville y col., 1976). Debido al uso extensivo de esta droga en quimioterapia, su toxicidad genética tiene un significado práctico considerable.

#### *-Estructura de la molécula y formación del complejo activo*

Las bleomicinas son una familia de compuestos producidos por *Streptomyces verticillis*. La BLM es un glicopéptido que contiene varios aminoácidos inusuales y azúcares, y un amino terminal que varía entre los análogos de BLM. La molécula de BLM tiene dos componentes estructurales principales (Fig. 3), un componente bitiazol que se intercala parcialmente en la hélice de ADN separando las cadenas, así como unas estructuras pirimidínica e imidazólica, que son responsables de la activación dioxigénica y unión al Fe (Sugiura y col., 1983) formando un complejo activado capaz de liberar oxidantes dañinos en la proximidad de las cadenas de polinucleótidos

del ADN. Esto puede producir rotura de cadena o modificaciones estructurales que lleven a la liberación de bases libres o de sus derivados propenales.

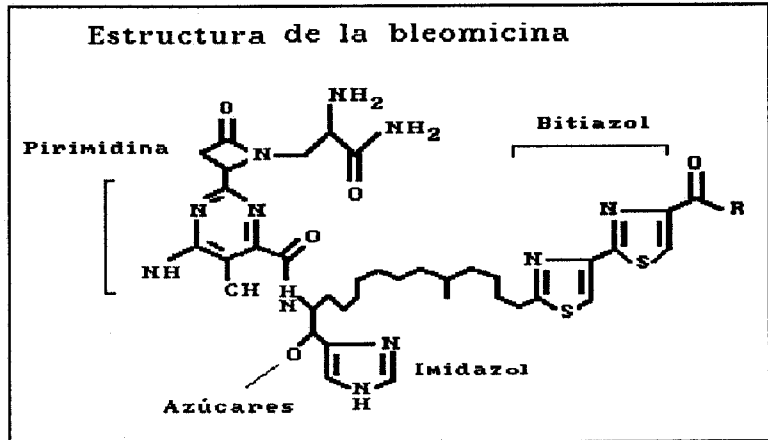


Fig. 3.- Estructura simplificada de la bleomicina que muestra los sitios activos. El anillo bitiazol se intercala en el ADN mientras las estructuras pirimidínica e imidazólica se unen al hierro y oxígeno.

La BLM se une a una variedad de metales que incluyen el cobre, manganeso, vanadio, hierro y cobalto. El complejo con Fe es probablemente el más importante *in vivo*, y ha sido por tanto el más investigado. La BLM se une simultáneamente al ADN y Fe(II) (Sausville y col., 1978) y en presencia de oxígeno molecular esto lleva a la liberación de radicales hidroxilo (Oberley y Buettner, 1979). La especie atacante que Burger y col.(1981) llamaron BLM activada, se forma en dos pasos (Fig. 4).

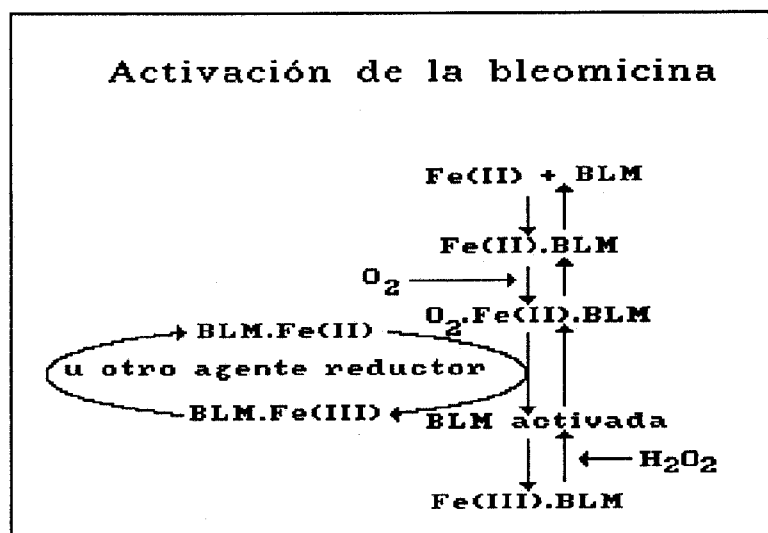


Fig. 4. Activación de la bleomicina por el oxígeno y el hierro.

Un complejo inicial  $O_2 \cdot Fe(II) \cdot BLM$  es transitorio y produce otra especie, BLM activada, por reducción de un solo  $e^-$ . La reducción del  $O_2 \cdot Fe(II) \cdot BLM$  a BLM activa se cree que la realiza el complejo  $Fe(II) \cdot BLM$ , pero también otros agentes pueden proporcionar el  $e^-$  simple. La BLM activada contiene dos equivalentes oxidativos adicionales comparada con  $Fe(II) \cdot BLM$ . La especie real implicada en la rotura de la cadena aún se desconoce.

*-Tipos de lesiones*

La BLM activada, o un producto de vida extremadamente corta, se cree que extrae el hidrógeno específicamente del C-4' de la desoxirribosa. El radical libre resultante en C-4' se rompe por una de las dos vías (Fig. 5): la independiente de oxígeno produce liberación de base y formación de sitio AP (sitios lábiles a álcali), la vía dependiente de oxígeno lleva a la liberación de propenal de base y rotura de cadena.

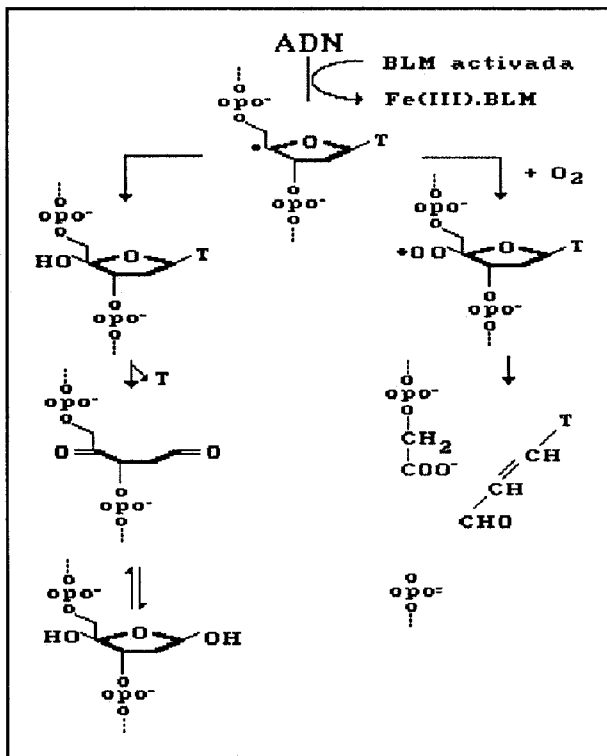


Fig. 5.- Química del daño inducido por bleomicina. Un radical inicial sobre el C-4' puede seguir una vía independiente de oxígeno (izquierda) dando lugar a la liberación de bases y formación de sitios AP, o la dependiente de oxígeno (derecha) que lleva a la liberación de propenal de base y rotura de cadena.



Bajo condiciones fisiológicas se forman los dos productos en una proporción de aproximadamente 1:1 (Povirk y col., 1977). Ambas lesiones se forman principalmente en pirimidinas en secuencias 5'-G-C-3' y 3'-G-T-5' (D'Andrea y Haseltine, 1978).

### *-Efectos citológicos*

Se sabe muy poco sobre la interacción de la BLM con células enteras, no estando claro cómo entra en las mismas. Varios estudios han mostrado que cuando las células en cultivo se incuban con BLM, sólo un 0.1% de la BLM presente en el medio entra realmente en las células (Miyaki y col., 1975; Roy y Horwitz, 1984), lo cual podría explicarse por la impermeabilidad de la membrana celular a este compuesto.

Aunque la BLM induce AC y MN, parece tener poco efecto sobre el nivel de SCE. La BLM actúa sobre los cromosomas de forma S-independiente, puesto que se vio que producía AC cuando se administraba en cualquier período de la interfase. Los tipos de AC producidos por tratamiento en distintas fases del ciclo eran los esperados de la producción de ssb y dsb.

La BLM no sólo induce aberraciones sino también aneuploidías (Vig y Lewis, 1978). El daño en el ADN por BLM se ha visto que se concentra en las regiones linker nucleosomales en núcleos aislados (Kuo y Hsu, 1978). Kuo (1981) vio que la BLM actuaba preferencialmente sobre cromatina transcripcionalmente activa.

### **1.3 Tipos de defensas celulares frente al daño oxidativo**

La acumulación de especies reactivas de oxígeno sería deletérea y tiene que ser prevenida, por lo que las células están equipadas con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para ello. La acción simultánea de los enzimas antioxidantes y compuestos antioxidantes de bajo peso molecular constituyen la primera línea de defensa celular en este sentido. La línea de defensa de los antioxidantes celulares puede, no obstante, ser sobrepasada y tener entonces lugar reacciones no deseables.

Un segundo mecanismo de defensa lo constituyen los distintos enzimas de reparación destinados a reconocer distintos tipos de lesiones. Estos enzimas pueden ser constitutivos, pero existen también sistemas de reparación inducibles en determinadas condiciones. Por último, a la cromatina eucariótica se le atribuye también un papel protector frente al daño oxidativo causado por radiación.

### 1.3.1 Antioxidantes no enzimáticos.

Las pequeñas moléculas antioxidantes no enzimáticas incluyen compuestos sulfhidrilo tales como glutatión y tioles; NADPH; ascorbato;  $\alpha$ -tocoferol;  $\beta$ -caroteno; bilirrubina; selenio; urato; butil-hidroxitolueno; butil-hidroxianisol, etc. (Halliwell y Gutteridge, 1985).

El glutatión (GSH,  $\gamma$ -glutamilcisteinglicina), un tiol tripéptico, es probablemente la defensa no enzimática más importante contra los radicales de oxígeno. Tiene un papel como cofactor en la reacción de la glutatión peroxidasa (GPx) y en la detoxificación por glutatión S-transferasa (GST). Además, el GSH sirve de cofactor en otras reacciones enzimáticas y como secuestrador directo de radicales hidroxilo.

Con respecto a las vitaminas, las tres que merecen ser mencionadas en este contexto son la vitamina A o retinol (cuyo precursor es el  $\beta$ -caroteno), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) y vitamina C (ácido ascórbico). El retinol, una de las vitaminas liposolubles, es esencial en la dieta humana. Se ha sugerido que el  $\beta$ -caroteno es anticarcinogénico (Halliwell y Gutteridge, 1989) y un secuestrador eficiente del oxígeno singlete (Foote y Denny, 1968). El retinol puede sufrir peroxidación de lípido. En este sentido el  $\alpha$ -tocoferol se considera generalmente más importante. A diferencia del retinol, el  $\alpha$ -tocoferol no se peroxida, sino que para la peroxidación de lípido formando radicales de vitamina E menos reactivos que no extraen átomos de hidrógeno de las membranas de lípidos de alrededor. Los radicales de vitamina E pueden ser reducidos otra vez a  $\alpha$ -tocoferol por la vitamina C. A diferencia de las otras dos vitaminas, la vitamina C

es poco soluble en lípidos, por lo que esta reacción probablemente ocurra en o cerca de la superficie de la membrana. El ascorbato es un agente reductor y su habilidad para donar e- puede ser muy importante para la detoxificación de varios radicales.

Las metalotioninas son proteínas de bajo peso molecular (menor que 10.000 Da). Tienen 61 o 62 aa, 20 de los cuales son residuos de cisteína (Hamer, 1986). Además de la fuerte unión a iones metálicos pesados, las metalotioninas son inducidas por ellos. Su alto contenido en cisteína sugirió que ellas, al igual que otros derivados de cisteína, podían actuar de radioprotectores (Bakka y col., 1982). Uno de los mecanismos moleculares de la protección podría ser la capacidad de las metalotioninas de actuar como secuestradores de radicales hidroxilo (Thornalley y Vasak, 1985).

Importantes antioxidantes del plasma son el ascorbato,  $\alpha$ -tocoferol y las proteínas unidas a metales de transición ceruloplasmina y transferrina. El ácido úrico (Ames y col., 1981) producto final de la degradación de la purina, se vio también que tenía una capacidad antioxidativa alta. Además a la bilirrubina (Stocker y col., 1987), producto final de la degradación del grupo hemo, así como a la albúmina (Halliwell, 1988) y la taurina (Wright y col., 1986), producto final del metabolismo de la metionina y cisteína, se les han asignado papeles en la protección contra el estrés oxidativo. Más recientemente, la carnosina y derivados de histidina (Hartman y col., 1988; Kohen y col., 1988) así como la creatinina (Glazer, 1988) se ha visto que poseen también actividades antioxidantes frente a radicales solubles en agua.

### 1.3.2 Enzimas antioxidantes.

Constituyen un grupo formado por la superóxido dismutasa dependiente de Cu y Zn (Cu,Zn SOD), superóxido dismutasa dependiente de Mn (Mn SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Estos enzimas funcionan para proteger contra los radicales de oxígeno producidos durante el metabolismo normal y tras daño oxidativo (Fig. 6). La SOD, CAT y GPx se consideran los enzimas

antioxidantes primarios, puesto que están implicados en la eliminación directa de especies activas de oxígeno. La GST, GR y G6PD son enzimas antioxidantes secundarios que ayudan en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno disminuyendo los niveles de peróxido (GST) o manteniendo un nivel estable de intermediarios metabólicos como glutatión (GR) y NADPH (G6PD) para los enzimas antioxidantes primarios.

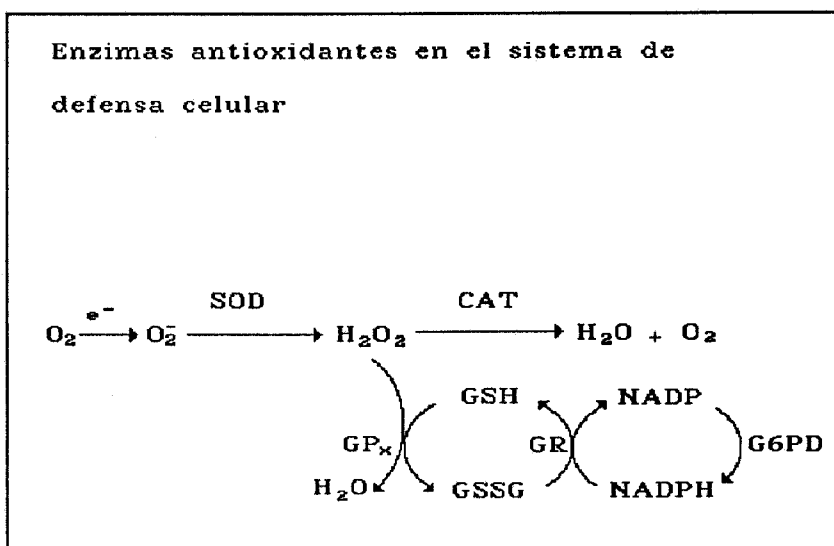


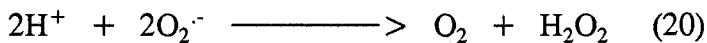
Fig.6.- Reacciones de los enzimas antioxidantes del sistema de defensa celular. Es muy importante para un buen equilibrio que las actividades estén concertadas.

### -Superóxido dismutasas

McCord y Fridovich (1969) descubrieron el efecto enzimático de la hemocupreina o Cu,Zn SOD. Este enzima es un dímero de  $PM=33.000$  Da que se encuentra en el citosol de todas las células de mamífero, más abundantemente en el hígado, riñones y eritrocitos (Marklund y col., 1982). La matriz mitocondrial contiene una Mn SOD de  $PM=85.000$  Da. Consiste en 4 subunidades y es similar a las SOD de bacterias (Weisiger y Fridovich, 1973). La actividad celular de este enzima es más baja que la del enzima Cu, Zn SOD.

Recientemente se ha aislado una SOD extracelular (Marklund, 1982, 1984). Su masa molecular (135.000 Da) es mayor que la de las SOD intracelulares. Este enzima glicosilada tetramérica contiene Cu y Zn y está estructuralmente relacionada con la Cu,Zn SOD intracelular (Hjalmarsson y col., 1987). Un papel fisiológico de la SOD extracelular es probablemente proteger superficies celulares del superóxido por unión a los proteoglicanos sulfatados en el glicocálix de las células y en la matriz intersticial (Karlsson, 1988).

Todas las SOD catalizan la reacción



Paradójicamente el producto de reacción ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), inactiva a las SOD (Bray y col., 1974, Marklund, 1984) y el sustrato (radical superóxido) inactiva los enzimas degradadores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la GPx (Blum y Fridovich, 1985) y la catalasa (Kono y Fridovich, 1982). Parece así importante que las actividades de la catalasa y GPx, estén concertadas con las de las SOD. De hecho se ha sugerido que si algún miembro del sistema se debilita, el sistema completo podría colapsarse (McCord, 1988).

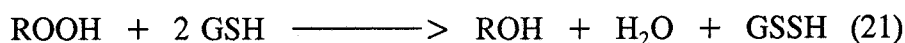
La Cu,Zn SOD es sensible a la cianida pero resistente al tratamiento cloroformo-etanol, justo al contrario que la Mn SOD. Los genes humanos que codifican la Cu,Zn SOD y Mn SOD se encuentran en los cromosomas 21q22.1 y 6q21, respectivamente (McAlpine y col., 1988).

#### *-Glutación peroxidasas*

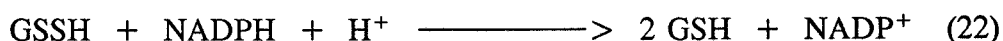
La GPx fue descubierta por Gordon Mills en 1957 como enzima degradador de peróxido de hidrógeno que protegía a la hemoglobina contra el daño oxidativo en eritrocitos. La GPx está formada por 4 subunidades. La masa molecular de las subunidades difiere según las especies pero ronda los 20.000 Da. Cada subunidad contiene una estructura selenocisteína (Forstrom y col., 1978), localizada en la

depresión poco profunda de la superficie de la molécula como sitio catalítico (Epp y col., 1983).

La GPx reduce todos los hidroperóxidos, excepto aquellos en que los obstáculos estéricos hacen que la reducción del grupo hidropoxi sea imposible. Los muchos sustratos hidroperoxi distintos se contrastan por los requerimientos específicos para la GPx como cofactor donante de hidrógeno (Flohé, 1982). La reacción de la GPx es:



El GSH se mantiene en el estado reducido en la célula por la glutatión reductasa de la siguiente manera:



La GPx se localiza en el citosol (70%) y matriz mitocondrial (30%) de todas las células de mamífero. Es más abundante en órganos tales como el hígado y los riñones, y en los eritrocitos (Marklund y col., 1982). Los inhibidores incluyen iodoacetato, cianida y radicales superóxido (Ketterer y col., 1987).

Se ha visto la existencia de otras varias GPx en la última década. La primera de ellas, fosfolípido hidroperóxido GPx, fue descubierta por Ursini y colaboradores (1985). Consiste en un monómero que contiene selenio (22.000 Da). Mientras este enzima reduce la mayoría de los sustratos de la GPx, a tasas distintas que el enzima clásico, también contiene actividad para los fosfolípidos hidroperóxidos, de la que el enzima clásico carece. Se ha descubierto recientemente una selenoglicoproteína que posee actividad GPx (Takahashi y Cohen, 1986; Maddipati y col., 1987). El enzima purificado del plasma humano es inmunológicamente distinto de la GPx de eritrocitos y se vio que consistía en 4 subunidades idénticas con una masa molecular total de aproximadamente 100.000 Da (Takahashi y col., 1987). Parece ser sintetizada y

secretada de las células hepáticas (Avissar y col., 1989). La especificidad de sustrato recuerda la del enzima clásico. Una cuestión sobre la función de este enzima *in vivo*, es cómo se las arregla con la baja concentración extracelular de GSH, puesto que el GSH es tan importante para que el enzima funcione. La concentración de GSH en el plasma humano es del orden de unos pocos micromolar (Wendel y Cikryt, 1980). Se vio que el fluido epitelial alveolar contenía 0.4-0.8 mM del glutatión total (GSH+GSSG) (Cantin y col., 1987), así como que casi todo el glutatión estaba en la forma reducida. Así parece probable que la GPx extracelular pudiera representar una importante línea de defensa contra los peróxidos a nivel local en el cuerpo.

El miembro más reciente de la familia de las GPx es otro enzima monomérico con una masa molecular de aproximadamente 22.000 Da, purificado de hígado de rata (Duan y col., 1988). El enzima recuerda a la fosfolípido hidroperóxido GPx en la especificidad de sustrato, pero su actividad hacia los fosfolípidos hidroperóxidos era mínima en ausencia de un detergente. La adición de detergente, sin embargo, aumentaba mucho esta actividad en contraste con el otro enzima monomérico.

El gen que codifica la GPx dependiente de Se se localiza en el cromosoma 3p13-q12 (MacAlpine y col., 1988).

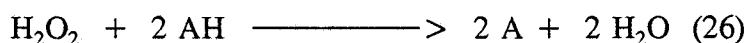
### *Catalasa*

La catalasa, el más antiguo de los enzimas identificados que mostró propiedades antioxidantes, se detectó en 1818 por el químico francés Jacques Thenard (de Duve, 1984) y Loew le dio nombre en 1901. Este autor estableció que la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por tejidos animales seguida de una liberación de oxígeno se debía a un enzima específico que llamó catalasa. La catalasa consiste en 4 subunidades. Cada subunidad tiene una masa molecular de 60.000 Da y contiene un grupo hemo [Fe(III)-protoporfirina] en el sitio activo como grupo prostético. La descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua es linealmente dependiente de la concentración de catalasa. A concentraciones fisiológicas de peróxido de hidrógeno (1-

100 nM), la catalasa desarrolla una actividad peroxidativa oxidando donantes de e- tales como metanol, etanol y fenoles. La reacción de la catalasa se puede resumir:



en el modo catalítico, y como:



en el modo peroxidativo, donde AH y AH<sub>2</sub> son distintos donantes de e-.

Se piensa que la catalasa se localiza principalmente en los microcuerpos que contienen peróxido de hidrógeno, que son los peroxisomas (80%) y en el citosol (20%). Las células más ricas en catalasa son los eritrocitos, las del hígado y riñón (Marklund y col., 1982). Los inhibidores de la CAT incluyen azida, cianida, 3-amino-1,2,4-triazol, glutatión reducido y ditiotreitól (Sun y Oberley, 1989). El gen que codifica la CAT humana se localiza en el cromosoma 11p13 (MacAlpine y col., 1988).

#### *-Enzimas antioxidantes secundarios*

Existen sistemas antioxidantes auxiliares que desempeñan un importante papel en la defensa antioxidante. Estos sistemas incluyen aquellos enzimas encargados de restaurar el estado redox de la célula tras la alteración sufrida por daño oxidativo. Entre ellos destacan los que mantienen los niveles intracelulares de GSH, como la glutatión reductasa, que reduce el GSSG a GSH (López-Barea y col., 1990), las responsables de la síntesis de GSH, y las del transporte de GSSG. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa regenera el NADPH que se consume en procesos tales como la reducción de glutatión, la reacción de Fenton, ciclos redox de compuestos que generan anión O<sub>2</sub><sup>-</sup>, etc. (Sies, 1986; Demple, 1991).



### 1.3.3 Reparación

Los mecanismos de reparación del ADN se han estudiado en procariotas con detalle. Aunque los intentos en células eucariotas han resultado más complicados, la mayoría de los mecanismos se han descrito en eucariotas, habiéndose encontrado actividad enzimática de los sistemas de reparación fotorreactivante, por escisión y post-replicativa.

Mayor interés presenta la reparación de ssb y dsb. Las ssb son unas de las lesiones más frecuentes producidas por radiación ionizante y agentes oxidantes. En la reparación de las ssb se pueden distinguir tres modalidades, dependiendo de la naturaleza química de la lesión. La primera es muy rápida y representa una pura reacción química. La segunda, algo más lenta, depende de la función de la ADN polimerasa, y la tercera se da sólo en células con un sistema recombinacional que funcione.

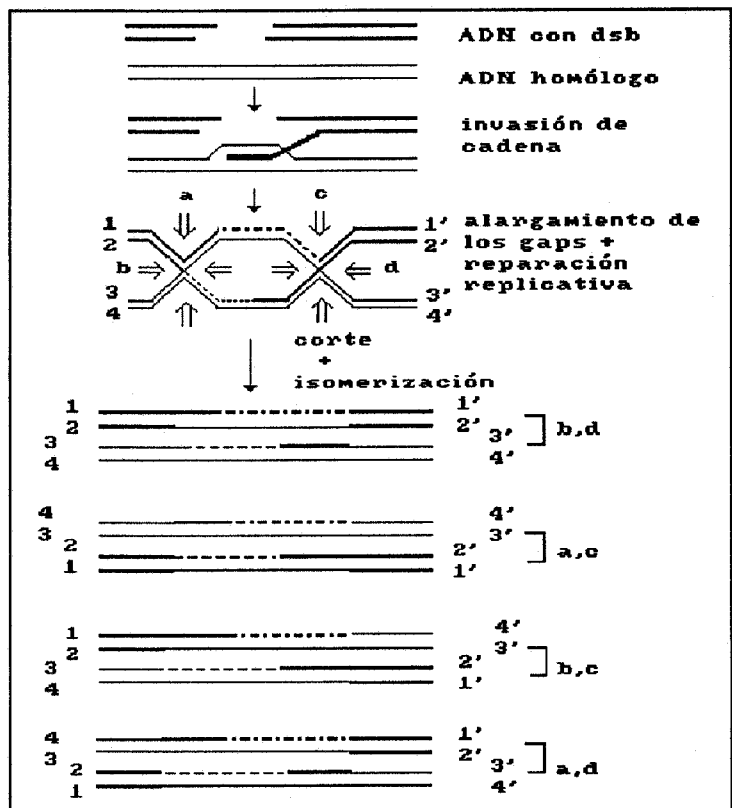


Fig. 7.- Esquema propuesto para la reparación de rotura de doble cadena en levaduras.

En cuanto a las dsb, otras de las lesiones más importantes producidas por radiación ionizante, no está claro cómo se reparan. La Fig. 7 muestra un modelo propuesto para este tipo de lesiones. Según el mismo, una cadena de ADN que contiene la dsb, invade la doble cadena del ADN homólogo, creándose un D-loop. Los gaps se alargan y rellenan por reparación replicativa. Las hebras nuevas se ligan al extremo de la dsb, formándose dos puntos de cruce que se pueden resolver por rotura de cadena simple y ligamiento, pudiéndose formar cuatro estructuras distintas.

#### 1.4 La respuesta adaptativa

La respuesta adaptativa (RA) es un fenómeno por el que células expuestas a bajas dosis de un agente causante de daño en el ADN (tratamiento condicionante), desarrollan una resistencia a una exposición posterior a una dosis alta del mutágeno (tratamiento challenge).

Aparte del sistema inducible SOS en *E. coli*, existen al menos dos mecanismos de reparación adaptativos inducibles bien descritos: el sistema *ada*, RA a daño alquilante, y el *oxyR*, RA a daño oxidativo (Walker, 1985). Se estudia ahora la existencia de sistemas inducibles similares en eucariotas.

Desde que Samson y Cairns (1977) demostraron la existencia de RA a agentes alquilantes en bacterias, consistente en la inducción de un sistema de reparación, el interés se ha ido centrando en la posible existencia de un sistema similar en células de mamífero, y en especial en la RA a radiación ionizante. En los últimos años, se ha descrito la RA en varios tipos celulares (procariotas, animales y vegetales), así como para distintos tipos de agentes mutagénicos (alquilantes y oxidantes).

##### 1.4.1 La RA en bacterias: sistemas *ada* y *oxyR*.

En 1977 Samson y Cairns obtuvieron las primeras evidencias del fenómeno denominado respuesta adaptativa. Observaron que si células de *E. coli* se exponían a

bajas concentraciones del agente metilante N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), se hacían resistentes a los efectos letales y mutagénicos de un tratamiento posterior con dosis más altas de este mutágeno. Esta resistencia se sabe ahora que es el resultado de una serie de procesos de reparación inducida, llamados colectivamente respuesta adaptativa. La regulación de la RA es independiente del sistema SOS y está controlada por el producto del gen *ada*.

Cuando las células se exponen a niveles bajos de agentes alquilantes se induce al menos la expresión de 4 genes, *ada*, *alkA*, *alkB* y *aidB*, que constituyen un regulón y forman parte de la respuesta adaptativa. El gen *ada* codifica la proteína Ada, que es la pieza clave de la respuesta adaptativa. Ada repara las principales lesiones premutagénicas inducidas por los agentes alquilantes ( $O^6$ -alkG y  $O^4$ -alkT) y activa la transcripción de los genes implicados en la respuesta adaptativa. En el fragmento carboxiterminal de la proteína reside una actividad  $O^6$ -metilguanina-DNA metiltransferasa que repara las lesiones  $O^6$ -meG y  $O^4$ -meT. La reparación tiene lugar por transferencia del grupo metilo a un residuo (Cys321) de la propia proteína (Olsson y Lindahl, 1980; Demple y col., 1985). La reacción de transferencia es irreversible por lo que se dice que Ada actúa como una proteína suicida (Volkert, 1988). Ada posee una segunda actividad metiltransferasa suicida que transfiere grupos metilos desde los metilfosfotriésteres al residuo Cys69. La metilación de Ada en la Cys69 produce un cambio conformacional que la convierte en un activador eficiente de la transcripción de los genes *ada*, *alkA*, *alkB* y *aidB* (Teo y col., 1986; Takano y col., 1988). Ada actúa como sensor en la inducción de la respuesta adaptativa y como regulador positivo de la transcripción (Shevell y col., 1990). Aunque los dos dominios que se generan en la proteólisis de Ada conservan sus respectivas actividades reparadoras, sólo la proteína intacta puede actuar como activador (Teo y col., 1986). El gen *alkA* codifica la  $N^3$ -metiladenina-ADN glicosilasa II (proteína AlkA o Tag II), que repara entre otras, la lesión  $N^3$ -meA. La expresión de este gen está regulada positivamente por el producto de *ada*. El producto del gen *alkB* es una proteína cuya función aún no se conoce (Kondo y col., 1986), así como se desconoce también el producto del gen *aidB*.

Demple y Halbrook observaron en 1983 que la exposición de *E. coli* a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno inducía resistencia a los efectos letales de una exposición posterior a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o a altas dosis de radiación ionizante. Se ha visto que en este proceso hay varios componentes regulatorios, producción de AppppA, alarmonas que pueden ser responsables de la inducción de 30 proteínas. Un componente consta del regulón *oxy R*, regulador positivo de 9 proteínas que se inducen con el peróxido de hidrógeno, de las cuales algunas son catalasa, peroxidasa, Mn superóxido dismutasa, glutatión reductasa y alquil hidroperóxido reductasa dependiente de NAD(P)H. Los datos experimentales de Storz y col., (1990) indican que las condiciones de estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no producen un aumento en la síntesis de la proteína OxyR, sino que provocan un cambio conformacional de las moléculas preexistentes. Sólo la forma oxidada de la proteína OxyR es capaz de activar la transcripción *in vitro*. Por tanto, OxyR actúa como sensor y como activador de este proceso.

Parece que al menos hay tres regulones que responden al estrés oxidativo: *oxyR*, proteínas inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no sujetas a regulación por *oxyR*, y finalmente lo que parece ser una clase de genes inducidos específicamente por radicales superóxido.

#### 1.4.2 La respuesta adaptativa al daño oxidativo en linfocitos humanos

El daño acumulativo por radicales libres durante el período de vida puede contribuir al desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento como cataratas, cáncer, artritis y enfermedades autoinmunes (Harman, 1986; Machlin y Bendich, 1987). Al contrario de estos efectos, la evidencia se va acumulando sobre la existencia de efectos positivos de bajas dosis de daño oxidativo. Por ej., los radicales libres celulares y las roturas de cadena asociadas se han implicado en la diferenciación (Sohal y col., 1988), proliferación (James y Makinodan, 1988) y señal de trasducción de membrana (Cerutti y col., 1988). Además la exposición a bajas dosis de oxidante en, o por debajo del rango fisiológico, se ha descrito que estimula o regula varios

procesos incluyendo aspectos de la defensa celular (Liteplo, 1988), reparación de ADN (Shadley y Wolff, 1987) y reactividad inmune (Anderson y Lefkovits, 1979).

En los últimos años se está acumulando cada vez más evidencia sobre la existencia de una "respuesta adaptativa" en células de mamífero análoga a la encontrada en *E. coli* (Samson y Cairns, 1977). El interés se centra en el estudio de la RA a radiación ionizante puesto que constituye una fuente real y potencial de daño ambiental al ADN celular.

En este sentido, los primeros trabajos los realizaron Olivieri y col. en 1984. Linfocitos humanos eran cultivados con [<sup>3</sup>H]TdR, que actúa como fuente de radiación crónica de bajo nivel, y después expuestos a 1.5 Gy de rayos X, observándose una producción de AC menor que la suma de las inducidas por la timidina y los rayos X por separado.

Varios autores han estudiado la RA a la radiación ionizante en linfocitos humanos introduciendo variaciones en distintos aspectos: tiempo entre tratamientos condicionante y challenge, agentes utilizados para ambos tratamientos así como tests citogenéticos empleados para la medida del daño. Se han ido así definiendo una serie de características de la RA, que se describen a continuación.

Existen pruebas de que la RA no está causada por un simple artefacto relacionado con el retraso en la progresión en el ciclo inducido por la radiación o variaciones en la radiosensibilidad de las células en las distintas fases del ciclo (Olivieri y col., 1984; Wiencke y col., 1986). Células femeninas marcadas con [<sup>3</sup>H]TdR se cocultivaron con células masculinas sin marcar, y se determinó la proporción de células de cada tipo que alcanzaba metafase (Wiencke y col., 1986). Los resultados mostraron que la [<sup>3</sup>H]TdR no selecciona en contra de una población de linfocitos radiosensible que les impida alcanzar metafase y contribuyan a la disminución de la producción de AC tras la exposición a rayos X.

Por otra parte, se ha demostrado que la RA no está mediada por factores difusibles. Células femeninas marcadas y con ello condicionadas se co-cultivaron con masculinas no marcadas y posteriormente fueron tratadas con dosis altas de rayos X. La producción de AC mostró que la RA estaba restringida a la población femenina (Wiencke y col., 1986).

En cuanto a la RA en  $G_0$  los resultados son especialmente contradictorios, y mientras algunos autores no pudieron observar adaptación en linfocitos en esta fase del ciclo celular (Shadley y col., 1987; Moquet y col., 1987; Wang y col., 1991) otros han observado lo contrario (Tuschl y col., 1983; Sanderson y Morley, 1986; Cai y Liu, 1990). En linfocitos humanos, la RA a 1.5 Gy de rayos X dados en  $G_2$  se podía inducir mediante un pretratamiento con dosis bajas de rayos X dadas en las fases S y  $G_1$  del ciclo, pero no en  $G_0$  (Shadley y col., 1987). Por el contrario, Cai y Liu (1990) estudiaron la respuesta adaptativa citogenética inducida por bajos niveles de radiación en linfocitos humanos y de conejo *in vitro* y encontraron que se podía inducir no sólo en  $G_1$ , S y  $G_2$ , sino también en  $G_0$ . Sanderson y Morley (1986) observaron que el tratamiento de linfocitos humanos en  $G_0$  con [ $^3$ H]TdR durante 6h no tenía efecto sobre la muerte celular inducida por 1.5 o 3.0 Gy de rayos X. Sin embargo, observaron reducciones a nivel de mutaciones pero no estudiaron la respuesta citogenética.

Se ha estudiado la duración de la RA una vez inducida y se ha visto que cuando se induce en linfocitos por 0.01 Gy de rayos X en fase S del ciclo celular frente a 1.5 Gy de rayos X, puede persistir hasta 3 ciclos (Shadley y col., 1987).

La RA parece inducirse con unas dosis de daño oxidativo muy limitadas tanto en el tiempo, dosis total condicionante, como tasa de dosis. Linfocitos humanos expuestos a bajas dosis de BLM se hicieron resistentes a un tratamiento posterior con altas dosis de rayos X, pero la adaptación no se producía cuando la dosis de BLM estaba fuera de determinado rango (Wolff y col., 1988). Linfocitos irradiados con 0.005 Gy de rayos X mostraban RA a un challenge con 1.5 Gy si el tratamiento condicionante

se llevaba a cabo a una tasa de dosis de 0.005-0.5 Gy/min , pero no cuando la misma dosis se administraba a una tasa por fuera de este intervalo (Shadley y Wiencke, 1989). Se ha propuesto que para que se induzca la RA, se deben de producir un número determinado de lesiones en un período de tiempo limitado (Shadley y Wiencke, 1989) pero un exceso de lesiones resulta en una saturación que inhibe la respuesta. Cuando se da una dosis alta a una alta tasa de dosis, se forman demasiadas lesiones en la unidad de tiempo requerida que lleva a una saturación del efecto que impide la respuesta. Alternativamente, puede que interactúen las lesiones eliminando la señal inductora y formando otros tipos de daño que no inducirán la respuesta (Shadley y Wiencke, 1989).

Diversos autores han obtenido evidencias sobre la llamada variabilidad interindividual que existe en la respuesta adaptativa. Linfocitos humanos de varios donantes expuestos a dosis bajas de distintos radioisótopos y sometidos a un challenge después con 0.5 Gy de rayos X, mostraron RA siendo la magnitud de la reducción en la frecuencia de AC variable entre los donantes, hasta el punto de presentar algunos de los donantes RA para algunos de los isótopos y no para otros (Sankaranarayanan y col., 1989). En otros estudios en que linfocitos humanos fueron expuestos a 0.01 o 0.05 Gy de rayos X (Schmid y col, 1989) o timidina tritiada y 0.01 Gy de rayos X (Bauchinger y col., 1989) como tratamiento condicionante y 1.5 Gy como challenge, no se pudo observar RA en ninguno de los donantes.

La RA al daño provocado por un determinado mutágeno se puede inducir mediante dosis adaptativas del mismo mutágeno o de otros que produzcan el daño de forma similar, característica que se conoce como resistencia cruzada. Así, linfocitos humanos pretratados con bajas dosis de [<sup>3</sup>H]TdR o rayos X mostraban reducción en la frecuencia de AC inducida por una dosis challenge de BLM (Vijayalaxmi y Burkart, 1988). Linfocitos humanos expuestos a bajas dosis de rayos X o de timidina tritiada y posteriormente tratados con altas dosis de timidina tritiada, BLM o MMC mostraban RA, mientras que no lo hacían si el challenge se daba con MMS (Wolff y col., 1988).

También en otros estudios se vio que el pretratamiento con peróxido de hidrógeno era capaz de reducir la frecuencia de AC provocada por un tratamiento posterior de 1.5 Gy de rayos X (Wolff y col., 1989).

En cuanto al enzima o enzimas implicados en este fenómeno, no se sabe mucho, pero las pruebas indirectas apuntan a un posible papel del enzima poli(ADP-ribosa)polimerasa. Puesto que este enzima interviene en la reparación (Skidmore y col., 1979; Durkacz y col., 1980) y su actividad se incrementa por las roturas de cadena del tipo de las producidas por timidina tritiada (Benjamin y Gill, 1980), se pensó en la posibilidad de que pudiera estar implicada en la RA. Wiencke y col., (1986) utilizaron 3-aminobenzamida (3AB), un inhibidor de la poli(ADP-ribosa)polimerasa, observando que en su presencia se eliminaba la RA si se añadía al cultivo en las dos primeras horas tras el challenge. El mismo resultado obtuvieron Shadley y Wolff (1987) en la RA a altas dosis de rayos X inducida con bajas dosis de este mismo agente. En 1989, Wolff y col. realizaron experimentos para ver si se sintetizaban enzimas nuevos que pudieran ser responsables de la RA. Expusieron las células a 0.01 Gy de rayos X a las 44 h de cultivo y después al inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida durante varios períodos tras el pretratamiento. Sólo cuando se inhibió la síntesis de proteínas en el período entre las 4 y 6 h, se impidió la RA, lo cual indica que es en este período cuando puede que se sintetice una proteína que podría participar en la adaptación. Se hicieron electroforesis bidimensionales de células controles e irradiadas y se vio que aparecían algunas proteínas en las irradiadas que no estaban en los controles y que eran posibles candidatas a ser enzimas adaptativos (Wolff y col., 1989).

La respuesta adaptativa se ha estudiado también utilizando tests de mutaciones. Así, la preexposición de células a [<sup>3</sup>H]TdR (Sanderson y Morley, 1986) o 0.01 Gy de rayos X (Kelsey y col., 1991) puede reducir o suprimir completamente el número de mutaciones *hprt* inducidas por la radiación en linfocitos humanos.



### 1.4.3 La respuesta adaptativa en otros tipos celulares

Aunque en menor grado que en linfocitos humanos, la RA se ha estudiado también en otros tipos celulares, principalmente células de hámster chino, células vegetales (*Vicia faba*) y levaduras.

Ikushima (1987) expuso células de hámster chino V79 a bajas dosis de radiación interna procedente de [<sup>3</sup>H]TdR, y vio que las células mostraban una RA a la inducción de daño cromosómico por una posterior dosis alta de rayos  $\gamma$ . Cuando se midió el daño con el test de SCE se encontró RA clara, mientras que con el test de MN en mononucleadas se obtuvo simplemente un efecto menor que aditivo. Los resultados sugerían que la adaptación al daño para SCE y la adaptación clastogénica son causados probablemente por sistemas de reparación inducibles distintos.

Laval (1988) obtuvo una protección en células CHO y de H4 de hepatoma de rata inducida mediante bajas dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frente a altas dosis de este agente y de rayos  $\gamma$ . Propuso que este aumento en la resistencia podría resultar de un aumento en la reparación del daño oxidativo o de un aumento en la actividad de los enzimas antioxidantes.

En levaduras ciertos genes se inducen selectivamente en respuesta a agentes que dañan el ADN (Treger y col., 1988). Mayor interés tienen los genes que responden al daño producido por radiación ionizante. Se ha visto que la radiorresistencia en levaduras se puede inducir por varios tipos de estrés incluidos los rayos  $\gamma$  (Mitchel y Morrison, 1984). Boreham y Mitchel (1991) han estudiado los principales mecanismos que confieren resistencia a la muerte celular por radiación ionizante en levaduras, encontrando como más probable la reparación recombinacional del ADN y el incremento de su capacidad inducida por daño en el ADN. Analizaron la naturaleza de las lesiones en el ADN generadas por radiación ionizante que inducen este mecanismo y vieron que: a) las lesiones producidas por radiaciones de baja LET eran más eficientes en inducir radiorresistencia a muerte celular que las de alta LET, lo cual

sugiere que las ssb son lesiones más importantes en la inducción de la radiorresistencia que las dsb; b) las radiaciones de alta LET inducían una reparación recombinacional menor que las de baja LET al suprimir menos eficientemente las mutaciones inducidas por MNNG; c) los radicales OH<sup>·</sup> derivados de la descomposición radiolítica del agua producen lesiones que inducían fuertemente este mecanismo de reparación recombinacional.

En lo que se refiere a células vegetales, se han utilizado principalmente células meristemáticas de *Vicia faba*. Heindorff y col. (1985) utilizaron dosis bajas de peróxido de hidrógeno y tert-butil hidroperóxido como tratamiento condicionante antes de un challenge con el herbicida hidrazida maleica (HM), observando una reducción de la frecuencia de AC inducida por HM. El efecto no se observaba si como tratamiento challenge se daba trietilenomelamina (TEM). También en *Vicia faba*, Heindorff y col. (1987) condicionando con bajas dosis de rayos X observaron una aparente RA al daño inducido por BLM y viceversa.

#### 1.4.4 La respuesta adaptativa *in vivo*

El efecto conocido como respuesta adaptativa parece ocurrir también *in vivo* en algunos sistemas. Cai y Liu (1990) encontraron que si ratones C57BL/6 eran expuestos a dosis de 0.02 Gy de rayos X unas 2.5-3 h antes de ser irradiados con 0.75 Gy, el número de roturas cromatídicas inducido por la dosis alta se reducía tanto en células de la médula ósea como en espermatozoides, y que la magnitud de la respuesta inducida por irradiación de todo el cuerpo era dosis-dependiente (a más baja dosis inductora, más reducción de la frecuencia de AC tras la dosis alta).

Wojcik y Tuschl (1990) utilizaron ratones a los que irradiaron durante varios días con bajas dosis de radiación ionizante. Midió la síntesis no programada (reparadora) de ADN (UDS) inducida por UV y los SCE inducidos por MMC, obteniendo valores de UDS mayores y frecuencias de SCE más bajas que en animales no adaptados.

James y col. (1991) expusieron ratones a bajas dosis de rayos  $\gamma$  y midieron la expresión constitutiva de roturas de cadena; la sensibilidad al daño en el ADN tras la exposición a altas dosis de irradiación *in vitro*; la reparación de roturas de cadena constitutivas e inducidas; la actividad del enzima poli(ADP-ribosa)transferasa y su sustrato el NAD. Los resultados indicaron que la expresión constitutiva de roturas disminuye significativamente tras la exposición crónica a bajas dosis de radiación; sin embargo, la capacidad reparadora tras la exposición a alta dosis no se incrementó con respecto a los controles, como se esperaba.

El que la respuesta adaptativa pueda ser más universal de lo que inicialmente se pensaba, puede estar también apoyado por los experimentos que han realizado Fritz-Niggli y Schaeppi-Buechi (1991) con *Drosophila melanogaster*. En ellos, las moscas pre-expuestas a 0.2 Gy de rayos X presentaban menos mutaciones dominantes letales en los oocitos inducidas por una dosis challenge de 4 Gy.

Liu y col. (1992) han obtenido también resultados positivos en conejos, observando respuesta adaptativa en los linfocitos cuando el cuerpo de estos animales era irradiado con rayos  $\gamma$  crónicamente (hasta una dosis máxima de 1.5 Gy) y expuesto a una dosis challenge de 1.5 Gy en  $G_0$  o en  $G_2$ .

Sin embargo, también *in vivo* los resultados son contradictorios. Así, Wojcik y col. (1992) no han encontrado respuesta adaptativa en embriones preimplantados de ratones cuando éstos eran expuestos a dosis condicionantes de 0.05 Gy de rayos X a las 50 h de la concepción y expuestos a la dosis challenge 6 h más tarde.

La existencia de una vía de reparación inducible por bajas dosis en células de mamífero podría tener mucha importancia para la evaluación del potencial mutagénico y carcinogénico de la radiación y de agentes ambientales químicos.

## 1.5 Objetivos

Se han abordado dos aspectos relacionados con la protección frente al daño cromosómico causado por radiación ionizante. Por una parte, hay una gran controversia sobre la existencia de respuesta adaptativa en células eucarióticas y las características de la misma, como pueden ser la variabilidad interindividual, duración del posible sistema de reparación inducible y bases moleculares del mismo, lo que nos ha llevado a realizar un estudio sobre este fenómeno en linfocitos humanos y células de *Allium cepa*. Para ello hemos realizado experimentos en los que se han empleado bajas dosis de un agente capaz de inducir daño oxidativo (como el peróxido de hidrógeno) como tratamiento condicionante, y altas dosis de rayos X o bleomicina como tratamiento challenge, utilizando para la evaluación del daño los tests de aberraciones cromosómicas en metafase y, en el caso de los linfocitos, de micronúcleos en células binucleadas.

Un segundo aspecto fundamental de interés tanto básico como aplicado, se relaciona con los resultados contradictorios obtenidos por distintos autores en cuanto a la importancia que tienen los radicales libres formados a través de la acción indirecta de la radiación ionizante en la producción del daño cromosómico. Se estudió el efecto que tenía un aumento en las actividades de los enzimas catalasa y glutatión peroxidasa sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas producida por radiación ionizante en células cultivadas de hámster chino. Puesto que este agente produce radicales libres como resultado del  $H_2O_2$  generado a través de su acción indirecta y los enzimas utilizados son capaces de eliminar el  $H_2O_2$ , sería posible determinar la importancia de estos radicales libres en la producción del daño cromosómico y por tanto, el papel que podrían jugar estos enzimas en la protección frente a la radiación ionizante.

## **MATERIALES Y METODOS**

## 2 MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Células vegetales

#### 2.1.1 Crecimiento de las raíces

Se utilizaron células meristemáticas radicales de *Allium cepa* ( $2n=16$ ). Los bulbos, seleccionados con un peso de entre 15 y 30 g, se dejaron crecer en oscuridad a 25°C en aproximadamente 70 ml de agua corriente filtrada y renovada cada 24 h. El nivel de oxígeno se mantuvo mediante un burbujeo continuo de aire saturado de humedad y con una tasa de 10 a 20 ml/min.

Los tratamientos de las raíces se llevaron a cabo cuando habían alcanzado unos 2 cm de longitud, tras 48 h de crecimiento.

#### 2.1.2 Procedimiento de irradiación y tratamiento con timidina tritiada

Las raíces, unidas aún a los bulbos, se irradiaron en agua con rayos X de 8 MeV, generados por un Acelerador Lineal de Electrones (Philips SL 75-20). La radiación se suministró según dos campos laterales opuestos sobre un fantoma de agua de dimensiones 31x31x25 cm, situando las raíces en línea media a una profundidad de 15.5 cm, como zona de mínimo gradiente de dosis. La tasa de dosis en línea media aproximada fue de 2.0 Gy/min en un campo de irradiación de 10x10 cm.

Los bulbos fueron expuestos a dosis condicionantes de 0.06 o 0.26 Gy y 12 h más tarde a un tratamiento challenge de 1.5 Gy. Las raíces se fijaron 17 h más tarde con objeto de que las células superaran el retraso producido por la irradiación y pudieran progresar en el ciclo celular para alcanzar la mitosis.

Cuando se utilizó [<sup>3</sup>H]TdR como tratamiento condicionante, las raíces fueron expuestas a una dosis de  $1.8 \times 10^4$  o  $7.2 \times 10^4$  Bq/ml (New England Nuclear; actividad específica 740.0 GBq/mmol) durante 6 h. Tras el marcaje las raíces se lavaron y se

dejaron recuperar en agua durante 6 h más antes de recibir el tratamiento challenge con rayos X.

### 2.1.3 Fijación

Tras los tratamientos, las raíces se incubaron durante 3 h en colchicina al 0.05%. Las raíces se separaron entonces de los bulbos y se introdujeron en una solución fijadora metanol-acético (3:1) a 5°C durante al menos 24 h.

### 2.1.4 Tinción y modo de hacer las preparaciones

Se utilizó la técnica de tinción desarrollada por Feulgen y Rossenbek (1924) modificada para el material vegetal por Kihlman en 1975.

Las raíces fijadas se lavan en agua destilada unos minutos, y se someten entonces a una hidrólisis ácida en HCl 1N a 60°C durante 7 minutos, evitándose en todo momento que la temperatura sobrepase los 62°C. Tras la hidrólisis, las raíces se tiñen durante 45 minutos en reactivo de Schiff, y posteriormente se sumergen en ácido acético al 45% en agua destilada.

Una vez teñidas las raíces se colocan 2 o 3 de ellas sobre un portaobjetos y con una lanceta se separa la zona correspondiente al meristemo apical radical, desechándose el resto de la raíz. Sobre el portaobjetos y con una gota de acético se maceran los meristemos. Una vez extendido el material se coloca encima un cubreobjetos, se cubre la preparación con papel de filtro y se presiona fuertemente sobre ella procurando que la fuerza aplicada sea normal a la superficie del portaobjetos para evitar deslizamientos laterales.

La puesta en definitivo se realizó según el método de Conger y Fairchild (1953). La deshidratación tiene lugar sumergiendo las preparaciones en dos cubetas Coplin que contienen etanol absoluto durante 5 minutos aproximadamente en cada una. Se dan entonces dos pasos de xilol y se añade a cada preparación una gota de resina

DPX, se cubre con un cubreobjetos y se dejan secar durante 48 h.

### 2.1.5 Técnica autorradiográfica.

Para comprobar la incorporación de la [<sup>3</sup>H]timidina en el ADN, algunas raíces fueron procesadas para autorradiografía. Las raíces se trataron con 5 $\mu$ Ci/ml de [<sup>3</sup>H]TdR (New England Nuclear; actividad específica 740.0 GBq o 20 Ci/mmol) durante 20 min, se lavaron y se irradiaron con 1.5 Gy de rayos X. Raíces controles sin irradiar e irradiadas se fueron fijando cada 3 h, siendo la última fijación a las 15h 20 min de empezar el tratamiento. La autorradiografía se realizó sumergiendo las preparaciones en emulsión Kodak NTB e incubándolas durante 10 días. Las preparaciones se revelaron en revelador Kodak D-19 y se fijaron mediante fijador ácido ultrarrápido Kodak.

## 2.2 Linfocitos humanos

### 2.2.1 Método de cultivo

Se llevó a cabo el cultivo de sangre completa de donantes sanos (0.5 ml por vial de cultivo) en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> en 4.5 ml de medio RPMI 1640 con un 10% de suero fetal bovino (FCS), 2mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50  $\mu$ g/ml de estreptomina y 2% de fitohemaglutinina (PHA) para estimular la entrada de los linfocitos en ciclo. Tras 24 h de estimulación los cultivos eran expuestos al tratamiento condicionante y 24 h después al tratamiento challenge.

### 2.2.2 Análisis de aberraciones cromosómicas

#### *-Tratamiento condicionante con peróxido de hidrógeno*

En un primer grupo de experimentos se administraron a los cultivos a las 24 h de haber sido estimulados, dosis de 25, 75 y 250  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min, tras lo cual se centrifugaron las células y se cambió el medio.



En el segundo grupo de experimentos, se dieron las mismas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las células a las 24, 30 y 36 h de haber sido estimuladas.

*-Tratamiento challenge*

Cuando consistió en irradiación con rayos X, se utilizó un acelerador lineal Philips SL 75-20. La radiación era de 8 MeV y la tasa de dosis de 2.0 Gy/min. En los dos grupos de experimentos (pulso simple y múltiple de peróxido de hidrógeno) los cultivos fueron expuestos a una dosis challenge con rayos X de 1.5 Gy 48 h después de haber sido estimulados con PHA.

En un tercer grupo de experimentos los cultivos, tras haber sido condicionados con dosis simples de peróxido, se sometieron a un tratamiento con bleomicina como tratamiento challenge. La solución stock de BLM se preparó disolviendo 15 unidades (U) de sulfato de BLM (Almirall) en 10 ml de suero fisiológico. De esta solución 1.5 U/ml se hizo la correspondiente dilución para ser administrada a los cultivos a una concentración final de 15 mU/ml de BLM.

*-Parada en metafase y fijación*

A las 4 h de haber recibido el tratamiento challenge, se suministró colcemida a los cultivos a una concentración de  $2 \times 10^{-5}$  M durante 3 h con objeto de detenerlas en metafase. Las células se centrifugaron durante 6 min a 1.200 rpm y tras decantar el sobrenadante se les dio un tratamiento hipotónico con 0.075 M de KCl (añadido gota a gota y resuspendiendo) durante 15 min a 37°C. Tras una nueva centrifugación y desechar el sobrenadante, se fijaron con metanol:acético (3:1) 3 veces.

### 2.2.3 Análisis para la detección de micronúcleos (MN)

*-Tratamiento condicionante*

Tras 24 h de estimulación de los cultivos mediante PHA, las células fueron sometidas a un tratamiento condicionante con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min con las mismas

concentraciones utilizadas en los experimentos para el análisis de aberraciones cromosómicas.

*-Tratamiento challenge*

Como dosis challenge de rayos X se utilizaron 1.5 o 3 Gy en las mismas condiciones descritas para AC y 15 mU/ml de BLM durante 4h.

*-Obtención de células binucleadas y fijación*

Para la obtención de células binucleadas se utilizó citocalasina B (Cyt B, Sigma), compuesto que tiene la propiedad de inhibir la polimerización de la actina bloqueando por tanto la citocinesis de células animales, con lo que se induce la aparición de células binucleadas. Se preparó una solución stock de Cyt B en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 2 mg/ml, que se mantuvo en el congelador a -80°C. En el momento de su utilización, la solución stock era diluida en PBS y administrada a los cultivos a una concentración final de 6 µg/ml.

En los experimentos con rayos X, la Cyt B se suministró a los cultivos inmediatamente después del tratamiento challenge. En aquellos cultivos irradiados con 1.5 Gy el tiempo de recuperación en Cyt B fue de 12 o 20 h, mientras que en aquellos expuestos a 3.0 Gy los períodos de recuperación fueron de 12, 20 o 30 h.

Cuando como tratamiento challenge se utilizó BLM, la Cyt B se administró a las células inmediatamente después del lavado del mutágeno, y las células se fijaron tras 20 h en Cyt B.

Las células fueron centrifugadas a 1.200 rpm durante 6 min tras la recuperación en Cyt B. Después de decantar el sobrenadante, se les dio un tratamiento hipotónico con 0.075 M KCl durante sólo 4 min a 37°C tras lo cual se fijaron.

#### 2.2.4 Tinción y forma de hacer las preparaciones

El pellet de la última centrifugación se resuspende en el volumen adecuado de fijador y se dejan caer dos gotas con una pipeta Pasteur sobre cada portaobjetos desde una distancia de aproximadamente medio metro. Una vez secas, las preparaciones se tiñen con Giemsa al 3% durante 4 a 6 min y se dejan secar toda la noche. La puesta en definitivo se realizó dándoles dos pasos en xilol y utilizando DPX antes de colocar los cubreobjetos.

#### 2.2.5 Análisis estadístico

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 repitieron al menos en dos donantes distintos.

En los experimentos llevados a cabo para evaluar el daño cromosómico, se contaron 100 metafases de cada duplicado. Puesto que la respuesta adaptativa se considera una vía de reparación inducible libre de error, sólo se tuvieron en cuenta las roturas cromatídicas e isocromatídicas a la hora del tratamiento estadístico, y por tanto no se consideraron las aberraciones de tipo intercambio, cuya frecuencia, por otra parte fue en general baja. En los experimentos con MN se contaron 1000 binucleadas para cada duplicado.

Para determinar si el número de aberraciones cromosómicas o de MN en aquellas células que habían recibido ambos tratamientos condicionante y challenge, era menor que el esperado según la suma de los efectos de cada tratamiento por separado, se utilizó el test t-student de una cola.

## **2.3 Línea CL1 (Células de Hámster Chino)**

### **2.3.1 Método de cultivo**

Cultivos stock de CL1 se mantuvieron en medio Ham's F-10 (NordCell, Sweden) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en aire húmedo. El medio fue suplementado con FCS al 5%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 1 mM de L-glutamina (NordCell). Las células se cultivaron durante 10 días en un medio con un contenido en FCS del 2% antes de cada experimento, con objeto de poder inducir después la actividad glutatión peroxidasa mediante la adición de selenito de una forma más eficaz. Se utilizó suero de una sólo partida cuyo contenido en Se había sido determinado anteriormente mediante un ensayo fluorimétrico empleando diaminonaftaleno (Lalaonde et al., 1982), detectándose una concentración de Se de 0.29 µM en el FCS que resultó en 6 nM en el medio control. La suplementación con Se de los cultivos se realizó añadiendo 100 nM de selenito (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, Sigma Chemical Co., USA). La suplementación con selenito durante 1 semana es la apropiada para la inducción de la máxima actividad glutatión peroxidasa (Sandström y col., 1987). El resto de las células se utilizaron como células controles sin suplementar. El medio era cambiado 3 veces a la semana y las células subcultivadas semanalmente para mantener los cultivos en crecimiento exponencial.

### **2.3.2 Comprobación de la actividad enzimática**

#### *-Ensayo enzimático*

Células de cultivos paralelos a los usados en cada experimento se recogieron y almacenaron a -80°C para el análisis enzimático. Tras ser descongeladas, las células se resuspendieron en 2 ml de tampón fosfato potásico 10 mM (pH 7.4) conteniendo 30 mM de KCl, fueron sonicadas durante 1 min en hielo y agitadas durante 30 min a 4°C. El homogenado se centrifugó a 20.000xg durante 15 min y el análisis enzimático se realizó en el sobrenadante.

El análisis de la actividad GPx se realizó a 37°C en 0.1 M de tampón HEPES-fosfato pH 7.4 con 1 mM EDTA, 2mM GSH reducido, 1 U/ml de GR, 0.16 mM NADPH, y 0.88 mM tert-butil hidroperóxido. Una unidad de actividad enzimática se define como la actividad que reduce 1 nmol de hidroperóxido por minuto. La concentración de GSH usada es comparativamente alta y la de hidroperóxido baja. Bajo estas condiciones la GPx dependiente de Se proporciona la mayor contribución a la actividad observada (Carmagnol y col., 1983).

El contenido total de proteína se determinó mediante un espectrofotómetro (Beckman DU 64) empleando la tinción con Azul Brillante de Coomassie G-250 (Bradford, 1976), para la que se empleó seroalbúmina humana como estándar.

#### *-Ensayo de precipitación de ADN*

El daño en el ADN se detectó mediante el ensayo de precipitación de ADN (Olive, 1988) modificado por el uso del doble marcaje (Sandström y Johanson, 1987), para la detección de roturas en el ADN. Cultivos de células suplementadas con Se y controles en crecimiento exponencial, se marcaron con 3.7 KBq (0.1  $\mu$ Ci) [ $^3$ H]timidina/ml o con 0.74 KBq (0.02  $\mu$ Ci) [ $^{14}$ C]timidina/ml; actividad específica 2.2 GBq (59 mCi)/mmol (Amersham International, England). El medio radiactivo se cambió a las 24 h por medio fresco durante una hora, tras lo cual se tripsinizaron las células y los cultivos suplementados con Se marcados con [ $^3$ H]timidina se mezclaron con los controles marcados con [ $^{14}$ C]timidina y viceversa. Suspensiones celulares de  $1.2 \times 10^6$  ( $4 \times 10^4$  células/ml) fueron expuestas a concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0, 21, 42, 63, 84 y 167  $\mu$ M en medio Ham's F10 tamponado con hepes (20 mM, pH 7.4) durante 10 min a 37°C. Después de centrifugar 2 min a 2000 rpm se tiró el sobrenadante y se pusieron inmediatamente en hielo para evitar la reparación. Las células se lavaron una vez con medio frío tamponado con hepes y después de centrifugar 2 min a 2000 rpm se obtuvieron del pellet muestras individuales de unas  $3 \times 10^5$  células /100  $\mu$ l de medio, las cuales se procesaron para la precipitación de ADN siguiendo el método de Olive (1988). Para ello se añadió a cada muestra 500  $\mu$ l de solución de lisis que contenía

SDS 2%, EDTA 10 mM, Tris 10 mM y NaOH 0.05 M, durante al menos 1 min. Después se añadió 500  $\mu$ l de ClK 0.12 M y se incubó durante 10 min a 65°C, y tras ello se pasaron los viales a hielo donde se les dejó precipitar durante una media hora. A continuación se centrifugaron los viales a 3.500 rpm a 4°C durante 10 min. Se decantaron los sobrenadantes en frascos de centelleo donde se les añadió 1 ml de HCl 0.05 M y 5 ml de líquido de centelleo. El precipitado se resuspendió en 2 ml de agua destilada a 65°C (en dos veces) y se le añadió el líquido de centelleo. Se midió la radiactividad en pellet y sobrenadante. Un incremento de la radiactividad en el sobrenadante significa un incremento en el número de roturas del ADN.

Para determinar si las diferencias en el porcentaje de precipitación de ADN entre células suplementadas y no suplementadas con Se fueron significativas estadísticamente, se utilizó la t-student apareada.

### 2.3.3 Experimentos citogenéticos

#### *-Test de aberraciones cromosómicas*

Cultivos de células suplementadas con Se y sin suplementar fueron expuestos a 2.5 Gy de rayos  $\gamma$  procedentes de  $^{60}\text{Co}$  a una tasa de dosis de 7.3 mGy/min. A las 12 h tras la irradiación, se suministró colcemida durante 2 h para detener las células en metafase, y tras un tratamiento hipotónico con 0.075M de KCl durante 2 min a 37°C, fueron fijadas de la misma manera que la descrita para los linfocitos con la diferencia de que la velocidad de centrifugación fue de 800-1000 rpm y sólo se hicieron dos fijaciones. Igualmente se hicieron las preparaciones, pero depositando las gotas de suspensión celular muy cerca del porta. La tinción y puesta en definitivo se realizó de la misma forma que la de linfocitos.

#### *-Análisis de la supervivencia celular*

Células CL1 suplementadas con Se y no suplementadas se expusieron a 37°C a 2.5 Gy de rayos gamma procedentes de  $^{60}\text{Co}$  a una tasa de dosis de 7.3 mGy/min.

Tras la irradiación fueron tripsinizadas, contadas y sembradas en un número de 300 células por placa. Tras 7 u 8 días las colonias se tiñeron con azul de metileno al 1% durante 45 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con agua y se dejaron secar a 45° C durante 2 h. Se contaron aquellas colonias con más de 50 células y se calculó la eficiencia en placa (PE) y fracción de supervivencia (SF):

$$PE = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias en placas controles}}{\text{n}^\circ \text{ total de células sembradas}} \times 100$$

$$SF = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colonias en placas tratadas}}{\text{n}^\circ \text{ de colonias en placas controles}} \times 100$$

## **2.4 Línea CHO6 (Células de Hámster Chino)**

### **2.4.1 Método de cultivo**

Las células fueron cultivadas en monocapa en medio McCoy's 5A suplementado con 10% de FCS, L-glutamina (2mM), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 µg/ml). Los cultivos crecieron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.4.2 Experimentos citogenéticos**

Se trató de ver si el enzima antioxidante CAT, introducido mediante electroporación en las células, proporcionaba alguna protección frente a la radiación ionizante, utilizando el test de AC para la medida del daño.

#### *-Preparación del enzima catalasa*

Se utilizó catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) de hígado bovino en suspensión cristalina en agua y estabilizada con un 0.01% de alquilbencildimetil amonio clorhídrico (Boehringer). La actividad específica del enzima era de 65.000 U/mg a

25°C con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato. El enzima se lavó con agua destilada 3 veces, centrifugando a 20.000 g durante 20 min cada vez. El pellet de la última centrifugación se disolvió en tampón Tris clorhídrico 50 mM, pH9 a una concentración de 1 mg/ml, repartiéndose en viales para su congelación a -80°C. Parte de esta CAT se disolvió a una concentración de 200 µg/ml, se filtró y se repartió a su vez en viales de 200 µl que se mantuvieron también a -80°C hasta ser descongelados en el momento de su utilización. En los experimentos citogenéticos las concentraciones de enzima utilizadas fueron de 25, 50 y 100 µg/ml.

*-Método de electroporación*

La Fig. 8 muestra el método de electroporación. Se tripsinizaron cultivos celulares confluentes y las células fueron centrifugadas a 800 rpm durante 8 min. Después de decantar el sobrenadante y lavar una vez con tampón Hepes, el pellet se resuspendió en este tampón a una concentración de  $2.5 \times 10^6$  células/ml para los experimentos de aberraciones cromosómicas, y  $5 \times 10^6$  células/ml para los de precipitación de ADN.

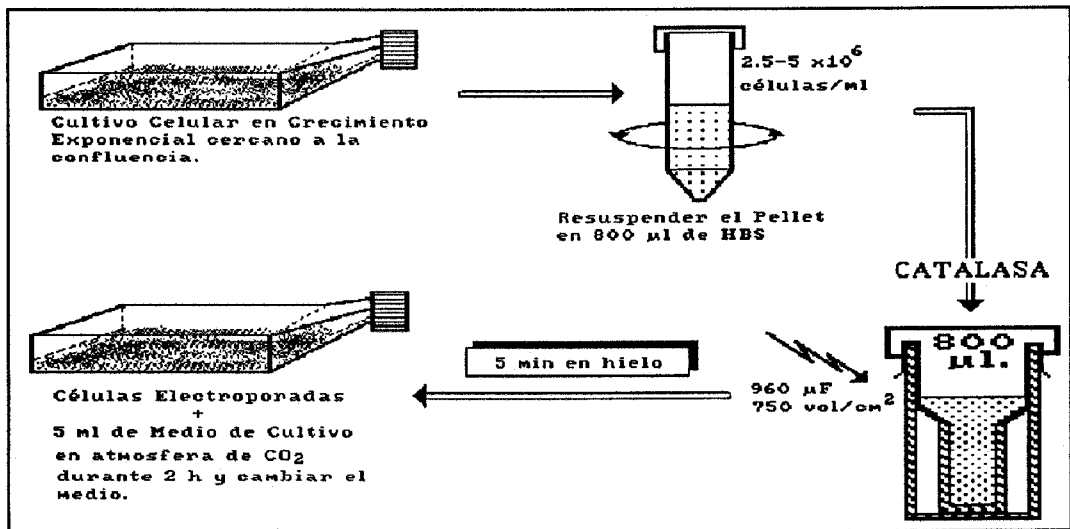


Fig. 8.- Esquema del protocolo seguido para la introducción de catalasa en células CHO6 mediante electroporación.



En cada cámara de electroporación (Bio-Rad Gene Pulser cuvette, 0.4 cm) se puso 800  $\mu$ l de esta suspensión celular, y también el enzima en los casos en que se requería (volumen del enzima de 16  $\mu$ l). Las cámaras se pasaron a hielo y seguidamente se electroporaron con una capacitancia de 960  $\mu$ FD y un voltaje de 300 V. Las cámaras permanecieron unos 10 min en hielo con el fin de mantener más tiempo los poros celulares abiertos, y después se sembraron en frascos de cultivo con medio.

*-Tratamiento y obtención de las preparaciones.*

Se tripsinizaron cultivos de células CHO6 en confluencia y se electroporaron suspensiones celulares de 800  $\mu$ l (en tampón Hepes) y  $2 \times 10^6$  células/cámara con concentraciones de CAT de 100, 50 o 25  $\mu$ g/ml o sin CAT, utilizando un volumen de CAT en cada cámara de 16  $\mu$ l. Se pasaron entonces las células a frascos de cultivo y a las 2 h se les cambió el medio. Las células se irradiaron con 1.5 Gy de rayos X a las 4 h de haber sido electroporadas, y 19 h más tarde se les administró colcemida durante 3 h.

El tratamiento hipotónico, fijación y obtención de las preparaciones, se realizó de la misma forma que para las células CL1.

#### 2.4.3 Comprobación de la actividad CAT

*-Ensayo de precipitación de ADN*

Cultivos celulares en crecimiento exponencial fueron expuestos a 2  $\mu$ Ci/ml de [ $^3$ H]TdR (New England Nuclear), actividad específica 740.0 GBq (20.0 Ci)/mmol durante 16-18 h. Las células se lavaron entonces con PBS, se tripsinizaron y se resuspendieron en tampón Hepes de electroporación a una concentración de  $4-4.5 \times 10^6$  células/ml. Las células fueron electroporadas con CAT a una concentración de 100  $\mu$ g/ml, o sin CAT, y se pasaron a frascos de cultivo. El medio se cambió a las 2 h de haber sido electroporadas, y 2 h más tarde se volvieron a tripsinizar para el ensayo de precipitación de ADN. Suspensiones celulares de  $1.2 \times 10^6$  células ( $1.2 \times 10^5$  células/ml)

fueron expuestas a 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en medio McCoy's 5A tamponado con hepes (20 mM, pH 7.4) durante 10 min a 37 °C. El ensayo se llevó posteriormente a cabo de la misma manera que la anteriormente descrita para células CL1. Asimismo se utilizó la t-student apareada para determinar si las diferencias entre los porcentajes de precipitación del ADN en células electroporadas con CAT y sin ella eran significativos estadísticamente.

## ***RESULTADOS***

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Respuesta adaptativa en linfocitos humanos

##### 3.1.1 Experimentos para la detección de aberraciones cromosómicas

*-Efecto clastogénico de un tratamiento condicionante con peróxido de hidrógeno.*

Dado que el  $H_2O_2$ , debido a su fuerte efecto oxidante, puede resultar muy tóxico y clastogénico para las células, se llevaron a cabo experimentos preliminares que nos indicaron que 25, 75 y 250  $\mu M$  de  $H_2O_2$  eran dosis condicionantes apropiadas, produciendo 9.5 roturas cromatídicas o menos en 100 células.

*-Respuesta adaptativa inducida por un pulso simple con  $H_2O_2$*

El protocolo experimental consistió en que cultivos de linfocitos de 3 donantes distintos fueron tratados con pulsos simples de las concentraciones elegidas de  $H_2O_2$ , y posteriormente expuestos a un tratamiento challenge con 1.5 Gy de rayos X (Fig. 9).

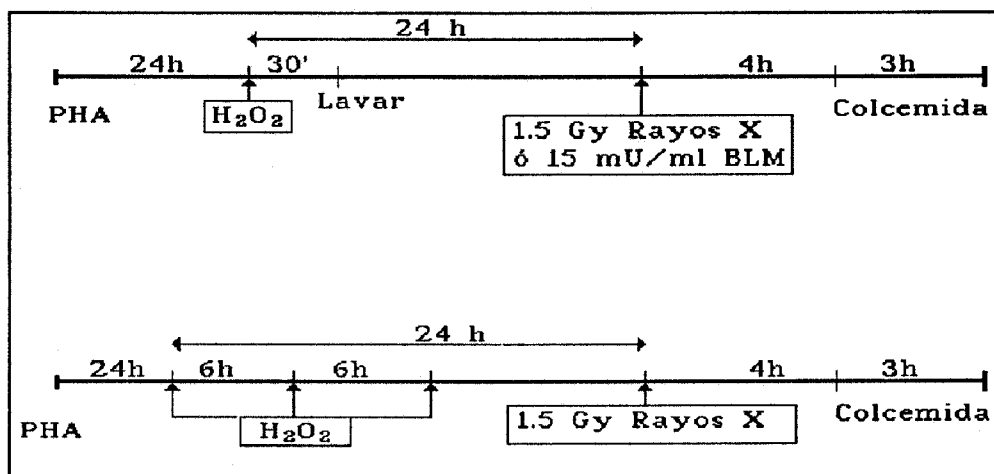


Fig. 9.- Protocolo para los experimentos de respuesta adaptativa en linfocitos humanos usando el test de aberraciones cromosómicas como medida de daño en el ADN. (A) Se dio un tratamiento condicionante con un pulso de 30 min de  $H_2O_2$  y un challenge con 1.5 Gy de rayos X o 15 mU/ml de BLM; (B) El tratamiento condicionante consistió en tres exposiciones a  $H_2O_2$  (cada 6 h, empezando 24 h después de la iniciación de los cultivos), y el challenge en 1.5 Gy de rayos X.

La tabla 1 muestra la frecuencia total de roturas cromatídicas e isocromatídicas (Fig. 10) observada tras el tratamiento condicionante con peróxido de hidrógeno, tratamiento challenge con 1.5 Gy de rayos X y los tratamientos condicionante y challenge consecutivos.

**Tabla 1. Efecto de un pulso simple con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas en linfocitos humanos por 1.5 Gy de rayos X.**

Donante	Tratamiento condicionante H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tratamiento challenge Rayos X	Roturas cromatídicas e isocromatídicas					
			observadas		esperadas <sup>a</sup>	Intercambios cromatídicos	IM	
			N <sup>º</sup>	%	%			
A	Ninguno	Ninguno	3	1.5	-	0	10.7	
	2.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	5	2.5	-	0	10.7	
	7.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	7	3.5	-	0	7.4	
	2.5x10 <sup>-4</sup> M	Ninguno	9	4.5	-	0	9.5	
	Ninguno	1.5 Gy	73	36.5	-	4	4.2	
	2.5x10 <sup>-5</sup> M	1.5 Gy	68	34	37.5 <sup>ns</sup>	3	4.8	
	7.5x10 <sup>-5</sup> M	1.5 Gy	50	25	38.5 <sup>b</sup>	1	4.9	
	2.5x10 <sup>-4</sup> M	1.5 Gy	43	21.5	39.5 <sup>b</sup>	4	6.4	
	B	Ninguno	Ninguno	0	0	-	0	4.5
		2.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	1	0.5	-	0	6.1
		7.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	3	1.5	-	0	4.2
		2.5x10 <sup>-4</sup> M	Ninguno	9	4.5	-	0	2.9
Ninguno		1.5 Gy	45	22.5	-	1	2.4	
2.5x10 <sup>-5</sup> M		1.5 Gy	38	19	23 <sup>c</sup>	0	2.8	
7.5x10 <sup>-5</sup> M		1.5 Gy	36	18	24 <sup>c</sup>	1	2.5	
2.5x10 <sup>-4</sup> M		1.5 Gy	41	20.5	27 <sup>c</sup>	0	3.0	
C	Ninguno	Ninguno	0	0	-	0	5.6	
	2.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	4	2	-	0	5.2	
	7.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	4	2	-	0	4.0	
	2.5x10 <sup>-4</sup> M	Ninguno	5	2.5	-	0	5.4	
	Ninguno	1.5 Gy	56	28	-	4	2.2	
	* 2.5x10 <sup>-5</sup> M	1.5 Gy	37	19.2	30 <sup>b</sup>	3	1.0	
	** 7.5x10 <sup>-5</sup> M	1.5 Gy	28	20	30 <sup>b</sup>	3	1.3	
	2.5x10 <sup>-4</sup> M	1.5 Gy	34	17	30.5 <sup>b</sup>	6	2.1	

<sup>a</sup> Suma de los dos tratamientos individuales menos el control.

<sup>b</sup> Frecuencia observada significativamente menor que la esperada (P<0.01) (t-Student de una cola).

<sup>c</sup> Frecuencia observada significativamente menor que la esperada (P<0.05).

<sup>ns</sup> Frecuencia observada no significativamente menor que la esperada.

En todos los casos se analizaron 200 células excepto:

\* 192

\*\* 140.

El pretratamiento con peróxido de hidrógeno resultó en una clara disminución de la producción de AC comparada con aquellas inducidas por el tratamiento con rayos X solo para los tres donantes analizados. La diferencia entre las frecuencias de aberraciones esperadas y observadas eran estadísticamente significativas (t-student de una cola), es decir, los resultados mostraban en todos los casos respuesta adaptativa.

Se analizó el índice mitótico (IM) con objeto de saber si el tratamiento condicionante producía un retraso significativo en el ciclo celular. El resultado de este análisis muestra el típico retraso producido por la radiación con respecto a los controles, pero sólo un ligero efecto negativo de las dosis condicionantes y no en todos los casos (Tabla 1).

*-Efecto de múltiples pulsos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes del challenge con rayos X sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas.*

Mientras que, como hemos visto, la respuesta adaptativa era evidente para el protocolo del pulso simple, cuando los linfocitos de dos de los donantes fueron expuestos a 3 pulsos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a intervalos de 6 h empezando a las 24 h de cultivo como tratamiento condicionante, y fueron posteriormente irradiados con 1.5 Gy de rayos X en G<sub>2</sub> (Fig. 9), no se observó la repuesta, es decir, las diferencias entre las frecuencias de AC esperada de los tratamientos individuales y las observadas para los tratamientos combinados no eran estadísticamente significativas (Tabla 2). Los tratamientos repetidos con peróxido de hidrógeno resultaron en una clara disminución de los valores del IM con respecto al control, siendo pues evidente en este caso la toxicidad.



**Tabla 2.** Efecto del tratamiento con varios pulsos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la frecuencia de AC inducidas en linfocitos humanos tratados posteriormente con 1.5 Gy de rayos X.

Donante	Tratamiento condicionante H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tratamiento challenge rayos X	Roturas cromatídicas e isocromatídicas			Intercambios cromatídicos	IM	
			observadas		esperadas <sup>a</sup>			
			n <sup>a</sup>	%	%			
A	Ninguno	Ninguno	4	2	-	0	8.2	
	2.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	4	2	-	0	6.5	
	7.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	3	1.5	-	0	5.2	
	2.5x10 <sup>-4</sup> M	Ninguno	10	5	-	0	5.7	
	Ninguno	1.5 Gy	38	19	-	3	2.4	
	2.5x10 <sup>-5</sup> M	1.5 Gy	40	20	19 <sup>ns</sup>	7	4.2	
	7.5x10 <sup>-5</sup> M	1.5 Gy	39	19.5	18.5 <sup>ns</sup>	4	2.3	
	2.5x10 <sup>-4</sup> M	1.5 Gy	45	22.5	22 <sup>ns</sup>	5	4.6	
	B	Ninguno	Ninguno	0	0	-	0	7.3
		2.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	7	3.5	-	0	3.7
7.5x10 <sup>-5</sup> M		Ninguno	4	2	-	0	4.4	
2.5x10 <sup>-4</sup> M		Ninguno	19	9.5	-	0	2.0	
Ninguno		1.5 Gy	36	18	-	4	2.4	
2.5x10 <sup>-5</sup> M		1.5 Gy	39	19.5	21.5 <sup>ns</sup>	1	2.9	
7.5x10 <sup>-5</sup> M		1.5 Gy	39	19.5	20 <sup>ns</sup>	1	2.0	
2.5x10 <sup>-4</sup> M		1.5 Gy	48	24	27.5 <sup>ns</sup>	2	1.2	

Las dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas se suministraron 3 veces a los cultivos celulares.

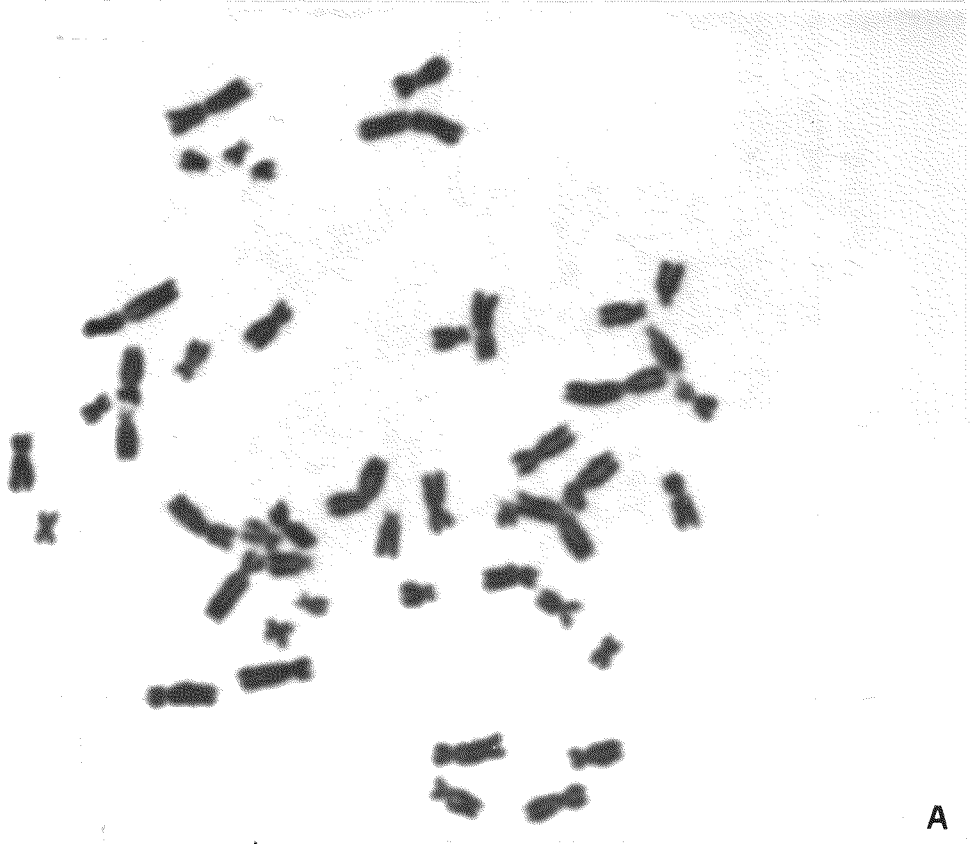
<sup>a</sup>Suma de los dos tratamientos individuales menos el control.

<sup>ns</sup> frecuencia observada no significativamente menor que la esperada (t-Student de una cola).

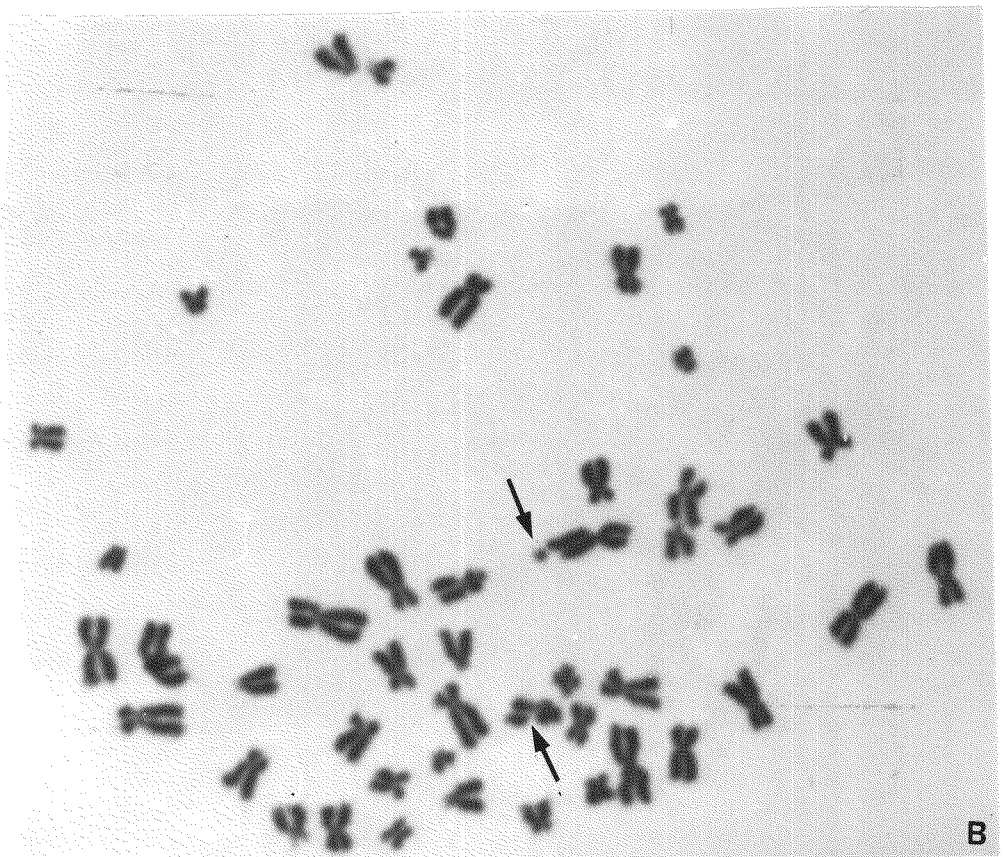
En todos los casos se analizaron 200 metafases.

*Figura 10.- Células metafásicas de linfocitos humanos. (A) Metafase normal; (B) Metafase tratada con 1.5 Gy de rayos X en la que se pueden observar roturas cromatídicas (→).*





A



B

*-Efecto de un pulso simple de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducida por un tratamiento con bleomicina.*

Se utilizó una dosis de 15 mU/ml de BLM como tratamiento challenge, que produjo entre un 52 y un 54.5% de AC. Se observó en general que, a diferencia del daño provocado por la radiación ionizante, el inducido por BLM se localizaba preferencialmente en determinadas células. La tabla 3 muestra la frecuencia de AC inducida por las dosis condicionantes de peróxido de hidrógeno, el tratamiento sólo con 15 mU/ml de BLM, y las frecuencias correspondientes a ambos tratamientos consecutivos, en los experimentos realizados según el protocolo que muestra la figura 9. En ninguna de las concentraciones y para ninguno de los donantes el análisis estadístico mostró la existencia de la respuesta adaptativa, sino todo lo contrario, es decir, un efecto sinérgico en la mayoría de los casos del pretratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el efecto clastogénico de la BLM (Tabla 3; Fig. 11)

**Tabla 3.** Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la frecuencia de AC inducida por 15 mU/ml de BLM.

Donante	Tratamiento condicionante H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tratamiento challenge BLM	Roturas cromatídicas e isocromatídicas				
			observadas		esperadas <sup>a</sup>	Intercambios cromatídicos	
			n <sup>o</sup>	%	%		
B	Ninguno	Ninguno	2	1	-	-	
	2.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	2	1	-	-	
	7.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	3	1.5	-	-	
	2.5x10 <sup>-4</sup> M	Ninguno	2	1	-	-	
	Ninguno	15 mU/ml	102	51	-	1	
	2.5x10 <sup>-5</sup> M	15 mU/ml	146	73	51 <sup>b</sup>	-	
	7.5x10 <sup>-5</sup> M	15 mU/ml	131	65.5	51.5 <sup>b</sup>	-	
	* 2.5x10 <sup>-4</sup> M	15 mU/ml	112	61.5	51 <sup>b</sup>	1	
	D	Ninguno	Ninguno	3	1.5	-	-
		2.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	4	2	-	-
7.5x10 <sup>-5</sup> M		Ninguno	1	0.5	-	-	
2.5x10 <sup>-4</sup> M		Ninguno	11	5.5	-	-	
Ninguno		15 mU/ml	105	52.5	-	2	
2.5x10 <sup>-5</sup> M		15 mU/ml	141	70.5	53 <sup>b</sup>	2	
7.5x10 <sup>-5</sup> M		15 mU/ml	136	68	51.5 <sup>b</sup>	1	
2.5x10 <sup>-4</sup> M		15 mU/ml	108	54	56.5 <sup>ns</sup>	3	

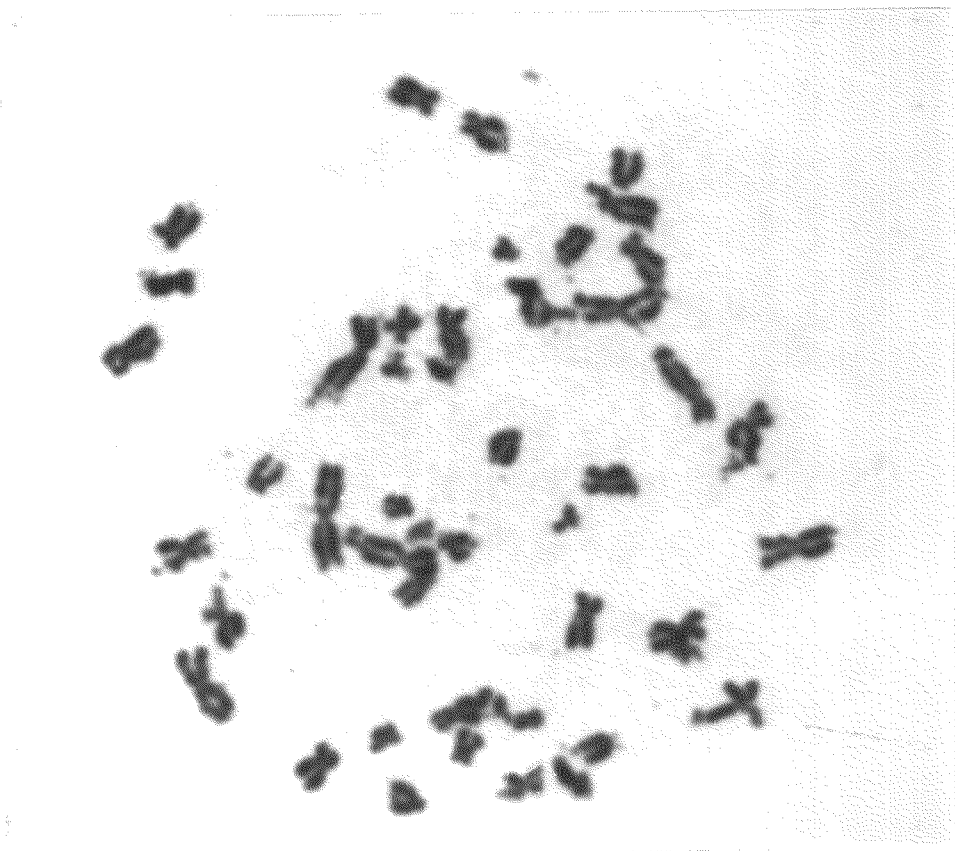
<sup>a</sup> Suma de los tratamientos individuales menos el control.

<sup>b</sup> Frecuencia observada significativamente mayor que la esperada (P<0.01)(t-Student de una cola)

<sup>ns</sup> Frecuencia observada no significativamente mayor que la esperada.

En todos los casos se analizaron 200 metafases excepto: \* 182.

*Figura 11.- Metafase de linfocitos humanos tratada con 15 mU/ml de bleomicina que muestra múltiples aberraciones.*



### 3.1.2 Test de micronúcleos para el estudio de la respuesta adaptativa.

Se ha visto que el empleo de 3  $\mu\text{g/ml}$  de Cyt B para la obtención de linfocitos binucleados, resulta en que una gran parte de las células escapan al bloqueo en citocinesis, mientras que utilizando 6  $\mu\text{g/ml}$ , más del 90% de las células estimuladas aparecen como binucleadas (Littlefield y col., 1989). Se empleó por tanto, una concentración de 6  $\mu\text{g/ml}$  de Cyt B que resultó ser eficaz en la inducción de células binucleadas (Fig. 12).

*-Efecto de un pulso simple de peróxido de hidrógeno sobre la frecuencia de micronúcleos observada tras un challenge con 1.5 o 3.0 Gy de rayos X a distintos tiempos de recuperación en Cyt B.*

Se analizó la frecuencia de MN en células binucleadas seleccionadas mediante Cyt B durante distintos tiempos de recuperación tras el challenge con rayos X (Fig. 13).

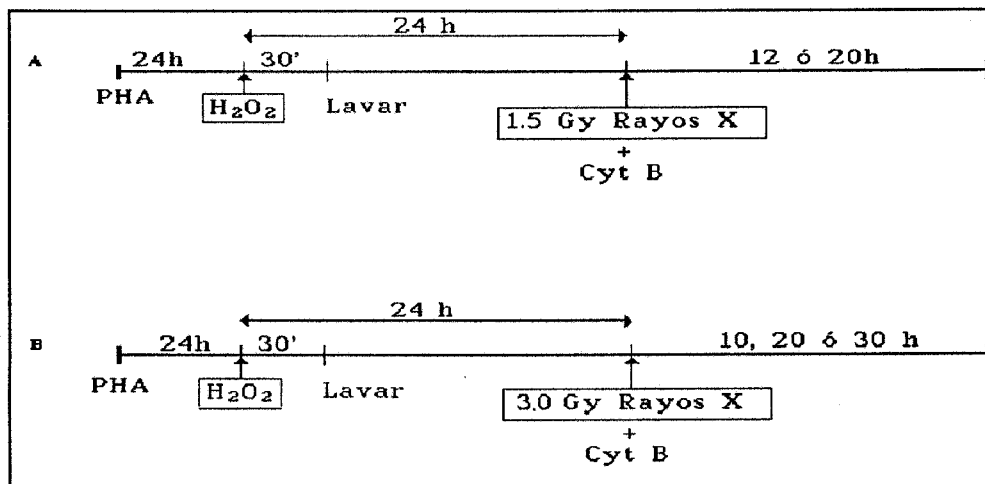


Fig. 13.- Protocolo para los experimentos de respuesta adaptativa en linfocitos humanos utilizando el análisis de micronúcleos en binucleadas como test de medida del daño en el ADN. (A) El tratamiento condicionante consistió en un pulso simple con distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y el challenge en la exposición de 1.5 Gy de rayos X, tras lo cual se añadió la Cyt B y se dejaron recuperar las células durante 12 o 20 h; (B) El tratamiento condicionante fue igual que en (A), variando la dosis challenge de rayos X que fue de 3.0 Gy, y el tiempo de fijación tras la administración de Cyt B que fue de 12, 20 y 30 h.

Las frecuencias de MN en binucleadas observadas tras el pretratamiento con peróxido de hidrógeno, el tratamiento challenge con rayos X y los tratamientos consecutivos con peróxido y rayos X se muestran en las tablas 4 (1.5 Gy como tratamiento challenge) y 5 (3.0 Gy como tratamiento challenge). Como se esperaba de los resultados previos de aberraciones cromosómicas, la producción de MN encontrada en células tratadas sólo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era similar, en general, para los diferentes tiempos de recuperación en Cyt B a la encontrada en los controles y claramente menor que la inducida por las dosis de rayos X utilizadas. La inducción de MN (Fig. 12) con 1.5 Gy de rayos X fue del 72.5 y 75.5 ‰ (según el donante) cuando el tiempo de recuperación en Cyt B fue de 12 h, y la frecuencia fue algo mayor a las 20 h. La tabla 4 muestra que para los tratamientos combinados, la diferencia entre las frecuencias de MN observada y esperada fue, en general, estadísticamente significativa para ambos donantes, es decir mostraron respuesta adaptativa.

La tabla 5 muestra los resultados de un protocolo experimental similar, pero utilizando un tratamiento challenge de 3 Gy de rayos X, y para 3 períodos de recuperación en Cyt B. De acuerdo con lo observado para 1.5 Gy de rayos X, pero más claramente incluso para 3.0 Gy, cuanto mayor era el tiempo de recuperación en Cyt B, mayor fue la frecuencia de MN observada, obteniéndose valores de 81.8 y 112 ‰ con 12 h de Cyt B, 191.5 y 167.5 ‰ con 20 h y 313.5 y 355 ‰ con 30 h de Cyt B. Con esta alta dosis, las células pretratadas con dosis adaptativas de peróxido de hidrógeno no exhibían reducciones estadísticamente significativas en la frecuencia de MN en los experimentos con 12 h de recuperación, sino que incluso a veces las frecuencias observadas eran mayores que las esperadas. Sin embargo, la respuesta adaptativa se hace evidente a tiempos de recuperación más largos (20 y 30 h), de forma que hay una reducción en la producción de MN de entre un 14.3 a un 24.7% en los experimentos de 30 h para todas las dosis condicionantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el donante D y del 28.5 al 30.7% con el mismo tiempo de recuperación para las dos dosis más altas condicionantes en el donante B.

**Tabla 4.** Efecto de un pulso simple de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la frecuencia de MN producida por un tratamiento posterior con 1.5 Gy de rayos X en linfocitos humanos observada a las 12 o 20 h de recuperación en Cyt B.

Donante	Tratamiento condicionante H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tratamiento challenge rayos X	12 h Cyt B			20 h Cyt B			
			Número de micronúcleos observado		Número de micronúcleos esperado <sup>a</sup>	Número de micronúcleos observado		Número de micronúcleos esperado <sup>a</sup>	
			n <sup>2</sup>	%		n <sup>2</sup>	%		
B	Ninguno	Ninguno	14	7	-	5	2.5	-	
	2.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	13	6.5	-	32	16	-	
	7.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	13	6.5	-	20	10	-	
	2.5x10 <sup>-4</sup> M	Ninguno	20	10	-	29	14.5	-	
	Ninguno	1.5 Gy	151	75.5	-	178	89	-	
	2.5x10 <sup>-5</sup> M	1.5 Gy	122	61	75 <sup>b</sup>	184	92	102.5 <sup>ns</sup>	
	7.5x10 <sup>-5</sup> M	1.5 Gy	104	52	75 <sup>b</sup>	160	80	96.5 <sup>b</sup>	
	2.5x10 <sup>-4</sup> M	1.5 Gy	96	48	78.5 <sup>b</sup>	178	89	101 <sup>ns</sup>	
	D	Ninguno	Ninguno	15	7.5	-	20	10	-
		2.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	18	9	-	22	11	-
7.5x10 <sup>-5</sup> M		Ninguno	17	8.5	-	11	5.5	-	
2.5x10 <sup>-4</sup> M		Ninguno	9	4.5	-	16	8	-	
Ninguno		1.5 Gy	145	72.5	-	230	115	-	
2.5x10 <sup>-5</sup> M		1.5 Gy	144	72	74 <sup>ns</sup>	171	85.5	116 <sup>b</sup>	
7.5x10 <sup>-5</sup> M		1.5 Gy	114	57	73.5 <sup>b</sup>	169	84.5	110.5 <sup>b</sup>	
2.5x10 <sup>-4</sup> M		1.5 Gy	113	56.5	69.5 <sup>c</sup>	186	93	113 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> Suma de los dos tratamientos individuales menos el control.

<sup>b</sup> Frecuencia observada significativamente menor que la esperada (P<0.01)(t-Student de una cola).

<sup>c</sup> Frecuencia observada significativamente menor que la esperada (P<0.05).

<sup>ns</sup> Frecuencia observada no significativamente menor que la esperada.

En todos los casos se analizaron 2000 células binucleadas.

**Tabla 5. Efecto de un pulso simple de peróxido de hidrógeno sobre la frecuencia de MN en linfocitos humanos inducida por 3.0 Gy de rayos X, observada tras 12, 20 y 30 h de recuperación en Cyt B.**

Donante	Tratamiento condicionante H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tratamiento challenge rayos X	12 h Cyt B			20 h Cyt B			30 h Cyt B			
			Número de micronúcleos observado n <sup>a</sup>	Número de micronúcleos esperado <sup>a</sup>		Número de micronúcleos observado n <sup>a</sup>	Número de micronúcleos esperado <sup>a</sup>		Número de micronúcleos observado n <sup>a</sup>	Número de micronúcleos esperado <sup>a</sup>		
				%	%		%	%		%	%	
B	Ninguno	Ninguno	14	7	-	17	8.5	-	8	4	-	
	2.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	13	6.5	-	34	17	-	14	7	-	
	7.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	13	6.5	-	23	11.5	-	20	10	-	
	2.5x10 <sup>-4</sup> M	Ninguno	20	10	-	22	11	-	9	4.5	-	
	Ninguno	3.0 Gy	*126	81.8	-	383	191.5	-	627	313.5	-	
	2.5x10 <sup>-5</sup> M	3.0 Gy	212	106	81.3 <sup>ns</sup>	323	161.5	200 <sup>b</sup>	632	316	316.5 <sup>ns</sup>	
	7.5x10 <sup>-5</sup> M	3.0 Gy	164	82	81.3 <sup>ns</sup>	353	176.5	194.5 <sup>c</sup>	457	228.5	319.5 <sup>b</sup>	
	2.5x10 <sup>-4</sup> M	3.0 Gy	143	71.5	84.8 <sup>c</sup>	324	162	194 <sup>b</sup>	435	217.5	314 <sup>b</sup>	
	D	Ninguno	Ninguno	22	11	-	17	8.5	-	14	7	-
		2.5x10 <sup>-5</sup> M	Ninguno	12	6	-	23	11.5	-	15	7.5	-
7.5x10 <sup>-5</sup> M		Ninguno	12	6	-	24	12	-	13	6.5	-	
2.5x10 <sup>-4</sup> M		Ninguno	21	10.5	-	19	9.5	-	20	10	-	
Ninguno		3.0 Gy	225	112.5	-	335	167.5	-	710	355	-	
2.5x10 <sup>-5</sup> M		3.0 Gy	200	100	107.5 <sup>ns</sup>	318	159	170.5 <sup>ns</sup>	609	304.5	355.5 <sup>b</sup>	
7.5x10 <sup>-5</sup> M		3.0 Gy	253	126.5	107.5 <sup>ns</sup>	236	162.4	171 <sup>ns</sup>	540	270	354.5 <sup>b</sup>	
2.5x10 <sup>-4</sup> M		3.0 Gy	**222	117.2	112 <sup>ns</sup>	297	148.5	168.5 <sup>b</sup>	539	269.5	358 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> Suma de los tratamientos individuales menos el control.

<sup>b</sup> Frecuencia observada significativamente menor que la esperada (P<0.01)(t-Student de una cola).

<sup>c</sup> Frecuencia observada significativamente menor que la esperada (P<0.05).

<sup>ns</sup> Frecuencia observada no significativamente menor que la esperada.

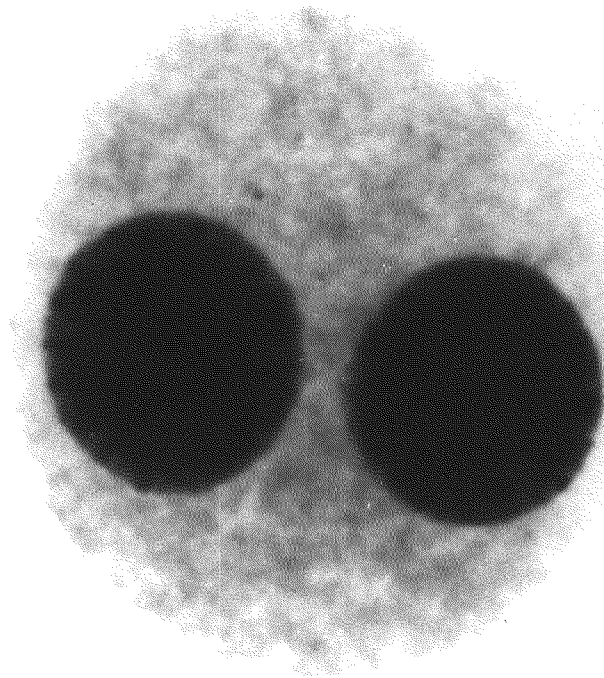
En todos los casos se analizaron 2000 células binucleadas, excepto:

\* 1539

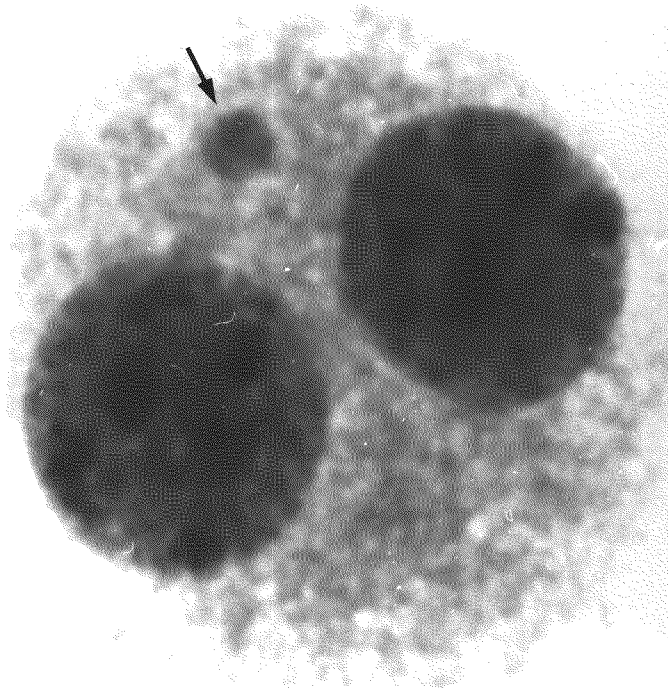
\*\*1894



*Figura 12.- Linfocitos humanos bloqueados en citocinesis. (A) Célula binucleada normal; (B) Célula binucleada tratada con rayos X que muestra un micronúcleo (→).*



A

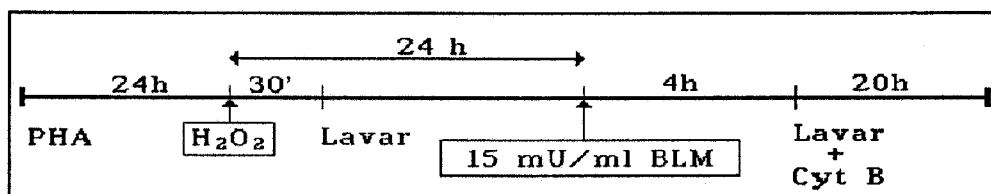


B

Adicionalmente, fue analizada la frecuencia de MN en células multinucleadas (con más de 2 núcleos), puesto que la proporción de ellas que aparecía era relativamente muy alta en los experimentos de 30 h de recuperación especialmente y se pensó en que pudiese existir alguna diferencia en comparación con las células binucleadas. Sin embargo, no se observó en ningún caso que existiesen diferencias (no se muestran los resultados).

*-Efecto de un pulso simple con peróxido de hidrógeno sobre la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos producida por un tratamiento con bleomicina.*

Experimentos preliminares mostraron que la adición a los cultivos de la BLM y Cyt B al mismo tiempo inhibía de alguna forma la acción de la BLM. Así, la frecuencia de MN que se obtuvo con este protocolo fue de 39 ‰ con 20 h de tratamiento, y la misma a las 30 h. Sin embargo cuando se suministró la BLM sola durante 4 h e inmediatamente tras el lavado se añadió la Cyt B la frecuencia de MN obtenida a las 20 h fue de 42 ‰ y de 95 ‰ a las 30 h. Se utilizó por ello este último diseño experimental dejando recuperar durante 20 h (Fig. 14).



*Fig. 14.- Protocolo para los experimentos de respuesta adaptativa a BLM en linfocitos humanos. El tratamiento condicionante se realizó de la misma forma que para los rayos X. El tratamiento challenge con 15 mU/ml de BLM se dio durante 4 h tras lo cual se lavó y se añadió la Cyt B, fijándose a las 20 h.*

En la tabla 6 se muestran los resultados de experimentos en que como tratamiento challenge se utilizó 15 mU/ml de BLM durante 4 h, tras lo cual, la BLM se lavó y se añadió inmediatamente Cyt B que estuvo presente durante 20 h. Mientras que en el donante D los resultados muestran que no se da la respuesta adaptativa claramente, en todo caso un pobre sinergismo para dos de las concentraciones de

peróxido de hidrógeno, en el donante B los resultados son confusos apareciendo respuesta adaptativa para dos de las concentraciones de  $H_2O_2$ , lo cual estaría en desacuerdo con los resultados obtenidos mediante el análisis de AC, aunque siempre teniendo en cuenta que se trata de poblaciones distintas.

**Tabla 6.** Efecto de un pulso simple de peróxido de hidrógeno sobre la frecuencia de micronúcleos observada tras un tratamiento con 15 mU/ml de bleomicina.

Donante	Tratamiento condicionante $H_2O_2$	Tratamiento challenge BLM	20 h Cyt B		
			Número de observado		micronúcleos esperado <sup>a</sup>
			n <sup>a</sup>	%	%
B	Ninguno	Ninguno	12	6	-
	$2.5 \times 10^{-5}$ M	Ninguno	15	7.5	-
	$7.5 \times 10^{-5}$ M	Ninguno	15	7.5	-
	$2.5 \times 10^{-4}$ M	Ninguno	12	6	-
	Ninguno	15 mU/ml	118	59	-
	$2.5 \times 10^{-5}$ M	15 mU/ml	66	33	60.5 <sup>b</sup>
	$7.5 \times 10^{-5}$ M	15 mU/ml	91	45.5	60.5 <sup>b</sup>
	$2.5 \times 10^{-4}$ M	15 mU/ml	106	53	59 <sup>ns</sup>
D	Ninguno	Ninguno	10	5	-
	$2.5 \times 10^{-5}$ M	Ninguno	13	6.5	-
	$7.5 \times 10^{-5}$ M	Ninguno	13	6.5	-
	$2.5 \times 10^{-4}$ M	Ninguno	12	6	-
	Ninguno	15 mU/ml	84	42	-
	$2.5 \times 10^{-5}$ M	15 mU/ml	101	50.5	43.5 <sup>ns</sup>
	$7.5 \times 10^{-5}$ M	15 mU/ml	103	51.5	43.5 <sup>*c</sup>
	$2.5 \times 10^{-4}$ M	15 mU/ml	85	42.5	43 <sup>ns</sup>

<sup>a</sup> Suma de los tratamientos individuales menos el control.

<sup>b</sup> Frecuencia observada significativamente menor que la esperada ( $P < 0.01$ ) (t-student una cola)

<sup>\*c</sup> Frecuencia observada significativamente mayor que la esperada ( $P < 0.5$ )

<sup>ns</sup> Frecuencia observada no diferente significativamente de la esperada.

### 3.2 Estudio de la respuesta adaptativa en células vegetales

#### 3.2.1 Efecto de bajas dosis de rayos X sobre la frecuencia de AC inducidas por 1.5 Gy de rayos X.

La dosis de 1.5 Gy de rayos X utilizada como tratamiento challenge produjo una frecuencia de AC del 46%, de la que un 11% correspondió a AC de tipo intercambio. Las células radicales fueron expuestas primero a dosis "adaptativas" de 0.06 o 0.26 Gy de rayos X, y 12 h más tarde fueron irradiadas con 1.5 Gy de rayos X (Fig. 15).

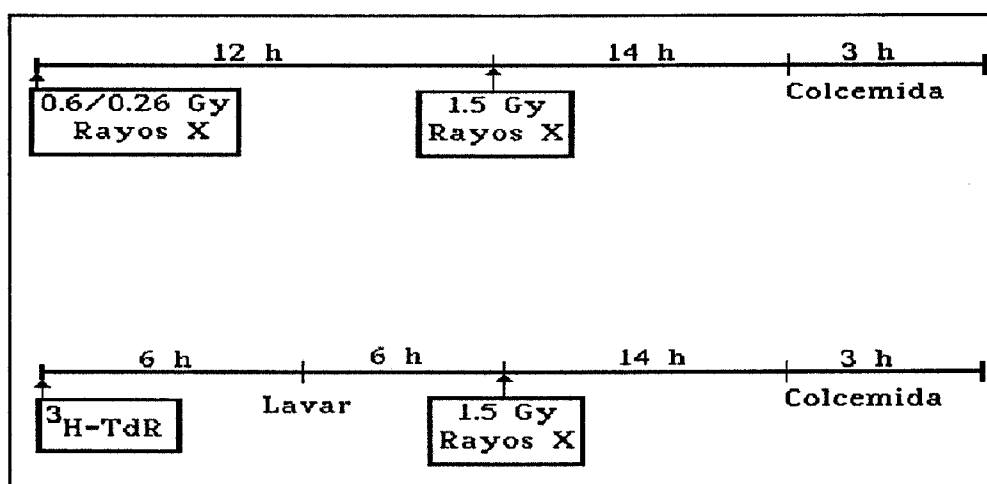


Fig. 15.- Protocolo experimental utilizado en *Allium cepa* donde como tratamiento condicionante se utilizó bajas dosis de rayos X o de timidina tritiada, y como challenge altas dosis de rayos X.

La tabla 7 muestra la frecuencia de AC observada para células controles, tratamientos condicionantes, challenge, tratamientos combinados, y la frecuencia esperada en este último caso. Como puede verse en la citada tabla, la respuesta adaptativa es evidente sólo cuando las células eran condicionadas con la dosis más alta de rayos X (0.26 Gy), que induce por sí una frecuencia moderada de roturas cromatídicas, de manera que la frecuencia de AC en las células sometidas a este pretratamiento y a la dosis challenge, era significativamente más baja que la esperada de los tratamientos por separado (t-student de una cola); sin embargo, con la dosis

condicionante más baja (0.06 Gy) la producción de roturas cromatídicas e isocromatídicas (Fig. 16) no fue significativamente distinta de la esperada.

### 3.2.2 Efecto de bajas dosis de [<sup>3</sup>H]TdR incorporada en el ADN sobre la frecuencia de AC inducida por 1.5 Gy de rayos X.

La [<sup>3</sup>H]TdR incorporada por las células emite radiación beta endógena capaz de afectar a la molécula de ADN. Cuando las células incorporaron [<sup>3</sup>H]TdR como tratamiento condicionante, lo cual se comprobó mediante la correspondiente autorradiografía, y fueron sometidas posteriormente al tratamiento challenge con rayos X, se obtuvo una respuesta adaptativa para ambas dosis de timidina tritiada, similar a la observada para 0.26 Gy de rayos X (Tabla 7).

**Tabla 7.** Efectos de bajas dosis de rayos X o [<sup>3</sup>H]TdR sobre la frecuencia de aberraciones cromatídicas inducidas en células radicales de *A. cepa* tratadas posteriormente con 1.5 Gy de rayos X.

Tratamiento condicionante	Tratamiento challenge (rayos X)	Número de células analizadas	Roturas cromatídicas e isocromatídicas			
			Observado		Esperado <sup>a</sup> %	Intercambios
			N°	%		
Ninguno	Ninguno	100	0	0.0	-	0
Ninguno	1.5 Gy	200	70	35.0	-	22
0.06 Gy rayos X	Ninguno	100	0	0.0	-	0
0.26 Gy rayos X	Ninguno	100	4	4.0	-	0
0.06 Gy rayos X	1.5 Gy	300	104	34.6 <sup>ns</sup>	35.0	15
0.26 Gy rayos X	1.5 Gy	200	59	29.5 <sup>b</sup>	39.0	4
1.8x10 <sup>4</sup> Bq/ml [ <sup>3</sup> H]TdR	Ninguno	100	1	1.0	-	1
7.2x10 <sup>4</sup> Bq/ml [ <sup>3</sup> H]TdR	Ninguno	100	2	2.0	-	2
1.8x10 <sup>4</sup> Bq/ml [ <sup>3</sup> H]TdR	1.5 Gy	200	56	28.0 <sup>c</sup>	36.0	1
7.2x10 <sup>4</sup> Bq/ml [ <sup>3</sup> H]TdR	1.5 Gy	200	55	27.5 <sup>b</sup>	37.0	2

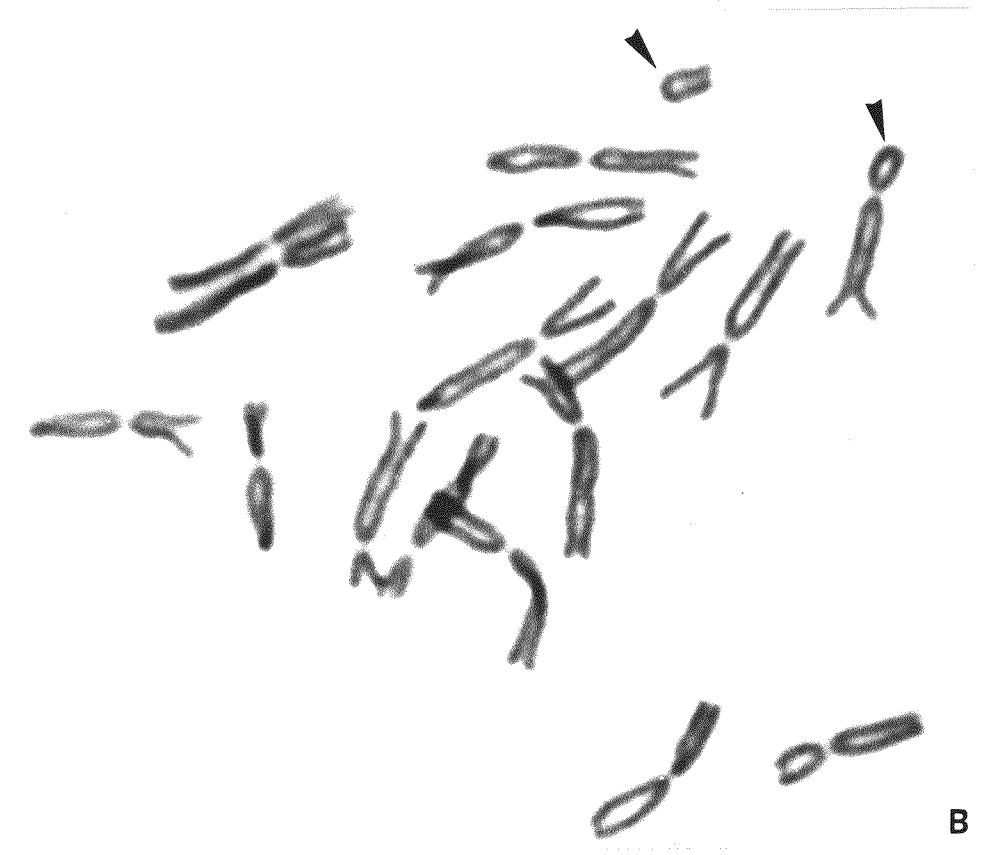
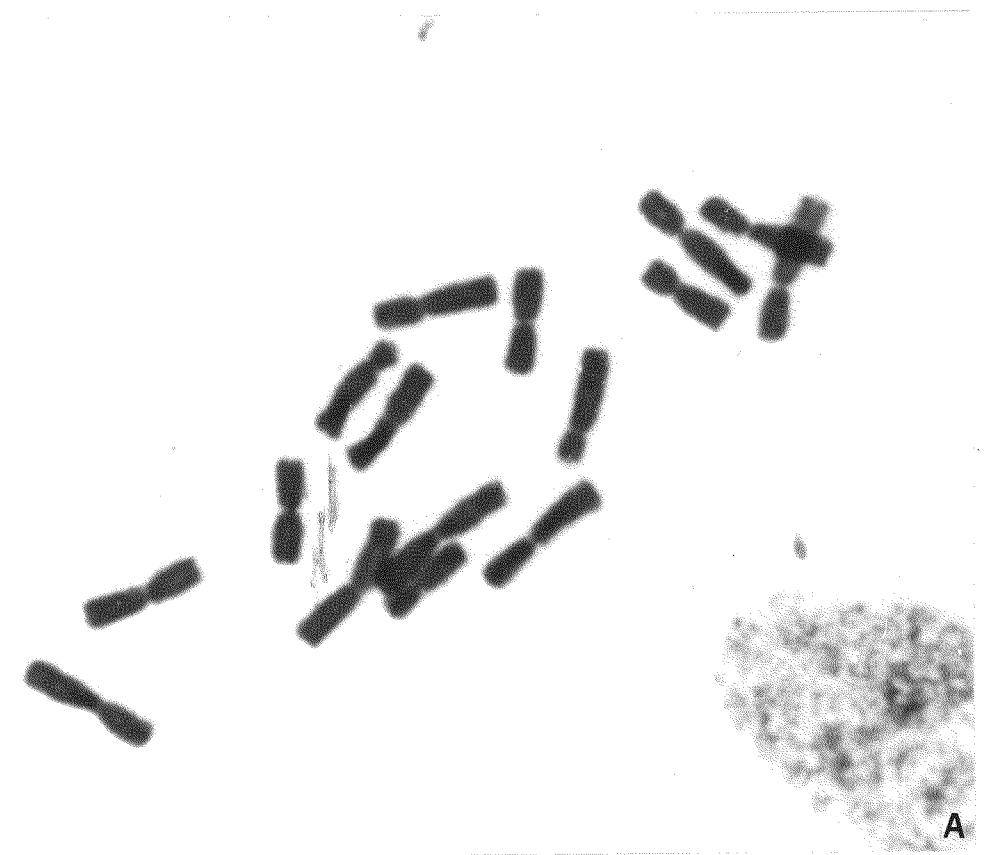
<sup>a</sup> Suma de los dos tratamientos individuales menos el control.

<sup>b</sup> Frecuencia observada significativamente menor que la esperada (P<0.01)(t-student de una cola)

<sup>c</sup> Frecuencia observada significativamente menor que la esperada (P<0.05).

<sup>ns</sup> Frecuencia observada no significativamente menor que la esperada.

*Figura 16.- Metafases de Allium cepa. (A) Metafase normal; (B) Metafase tratada con rayos X en la que se puede observar una aberración isocromatídica (▶).*





### 3.3 Efecto de la glutatión peroxidasa sobre el daño producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y rayos gamma en la línea CL1

Se ha descrito que la actividad GPx aumenta en varios tipos celulares mediante la suplementación con Se (Sandström y col., 1987). Nuestros resultados muestran que la actividad de este enzima en células CL1 suplementadas con Se aumentó unas 10 veces con respecto a la de células controles (25-40 U/mg proteína).

#### 3.3.1 Evaluación del daño cromosómico y supervivencia celular

La tabla 8 muestra la producción de aberraciones cromosómicas en células suplementadas y no suplementadas con Se, tanto para cultivos irradiados como no irradiados. Se observa un gran incremento en el porcentaje de AC en células suplementadas irradiadas (156.5%) con respecto a las que recibieron el mismo tratamiento sin haber sido suplementadas (61.4%). La diferencia más importante está en las aberraciones de tipo intercambio, pero también en las deleciones. Si comparamos el porcentaje de células dañadas inducidas por radiación, las diferencias entre células suplementadas y no suplementadas siguen siendo grandes aunque disminuyen. La tabla muestra asimismo, que no fue posible contar el mismo número de células en los dos casos, siendo mucho menor el que se pudo contar en células no suplementadas.

**Tabla 8.** Efecto de un tratamiento con rayos- $\gamma$  sobre la frecuencia de AC en células suplementadas y no suplementadas con Se.

Suplementación con Se	Rayos- $\gamma$ (Gy)	Número de células contadas	Del	Iso	Inter	Dic	Ani	%AC	%Células dañadas
+	0	200	1	5	1	12	0	9.5	8.5
-	0	185	2	14	0	10	1	14.6	10.27
+	2.5	145	54	103	41	18	11	156.5	51.72
-	2.5	83	4	35	0	10	2	61.4	34.9

Del= Deleción cromatídica; Iso= Aberración isocromatídica; Inter= Intercambios e intracambios; Dic=Dicéntricos; Ani= Anillos. Actividad GPx: Células no suplementadas con Se, 40 U/mg proteína; Células suplementadas con Se, 257 U/mg proteína.

La tabla 9 muestra la media de los resultados obtenidos en dos experimentos de supervivencia. Mientras la eficiencia en placa no difiere entre controles suplementados y no suplementados, la fracción de supervivencia en células suplementadas es claramente mayor, lo cual podría indicar una protección por parte de la GPx frente a la radiación ionizante dada a baja tasa de dosis.

**Tabla 9** Resultados de supervivencia

Suplementación con Se	Rayos- $\gamma$ (Gy)	
+	0	E.P. = 77.58%
-	0	E.P. = 73.58%
+	2.5	F.S. = 57.46%
-	2.5	F.S. = 24.15%

### 3.3.2 Detección de roturas de cadena en el ADN mediante el ensayo de precipitación

Células suplementadas y no suplementadas con Se fueron expuestas a distintas concentraciones de  $H_2O_2$ , tras lo cual se analizó el daño producido mediante el ensayo de precipitación de ADN. Los resultados obtenidos mediante el ensayo de precipitación de ADN muestran que las células suplementadas con Se presentaban menos roturas de cadena en el ADN (más porcentaje de ADN precipitado) que las células no suplementadas cuando se exponían a 42, 63, 84 y 167  $\mu M$  de  $H_2O_2$ , pero no a 0 o 21  $\mu M$  de  $H_2O_2$  (Fig. 17). Puesto que la actividad GPx se comprobó que estaba incrementada en células suplementadas con Se, y el  $H_2O_2$  es uno de los sustratos de este enzima, se puede atribuir la protección frente al  $H_2O_2$  a la GPx.

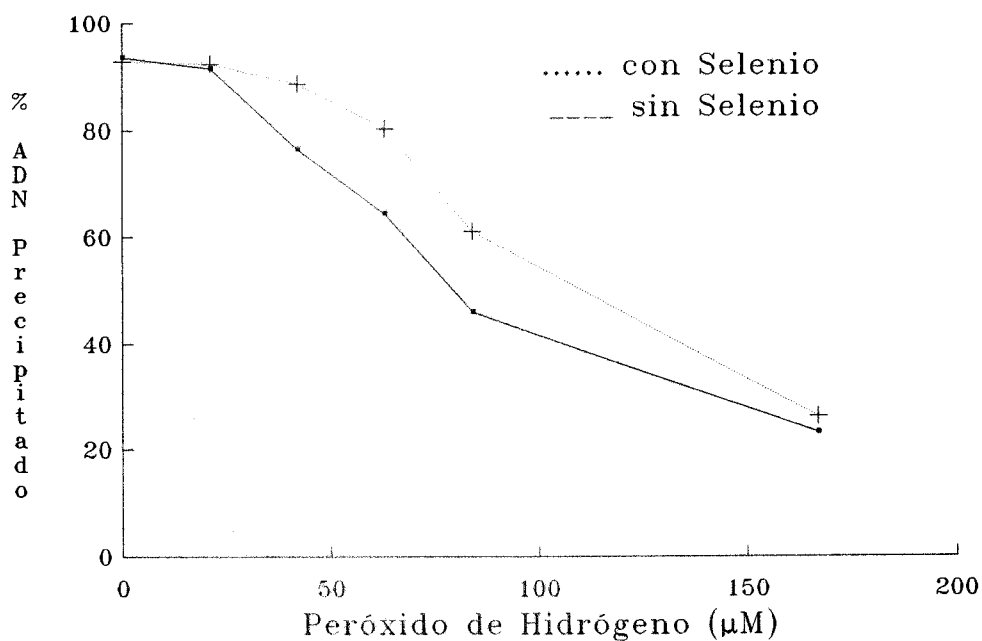


Fig. 17.- Porcentaje de ADN precipitado en células suplementadas (+) y no suplementadas (.) con Se expuestas a distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas (*t*-student apareada) para las concentraciones de 42, 63 y 84  $\mu\text{M}$  con  $P < 0.0001$  y para 167  $\mu\text{M}$  con  $P < 0.0058$ , pero no para 0 o 21  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.4 Efecto de la electroporación con catalasa sobre el daño en el ADN producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el daño cromosómico por rayos X

#### 3.4.1 Evaluación del daño cromosómico

La dosis de rayos X utilizada, 1.5 Gy, produjo una frecuencia de AC del 53.5% en células CHO6 electroporadas sin enzima (Fig. 18, 19 y 20). En la tabla 10 se muestran las frecuencias de aberraciones cromosómicas correspondientes a células electroporadas con distintas concentraciones de catalasa, y a células electroporadas con las mismas concentraciones de catalasa y expuestas después a rayos X. Se puede observar que la electroporación sola provoca algo de daño con respecto al control. Asimismo se puede observar un pequeño efecto negativo de la catalasa sobre las células. Con respecto a las células tratadas con catalasa y rayos X, no se observan diferencias significativas entre los valores observados y esperados para ninguna de las tres concentraciones del enzima.

**Tabla 10.** Efecto de la electroporación con catalasa sobre la frecuencia de aberraciones producida por 1.5 Gy de rayos X.

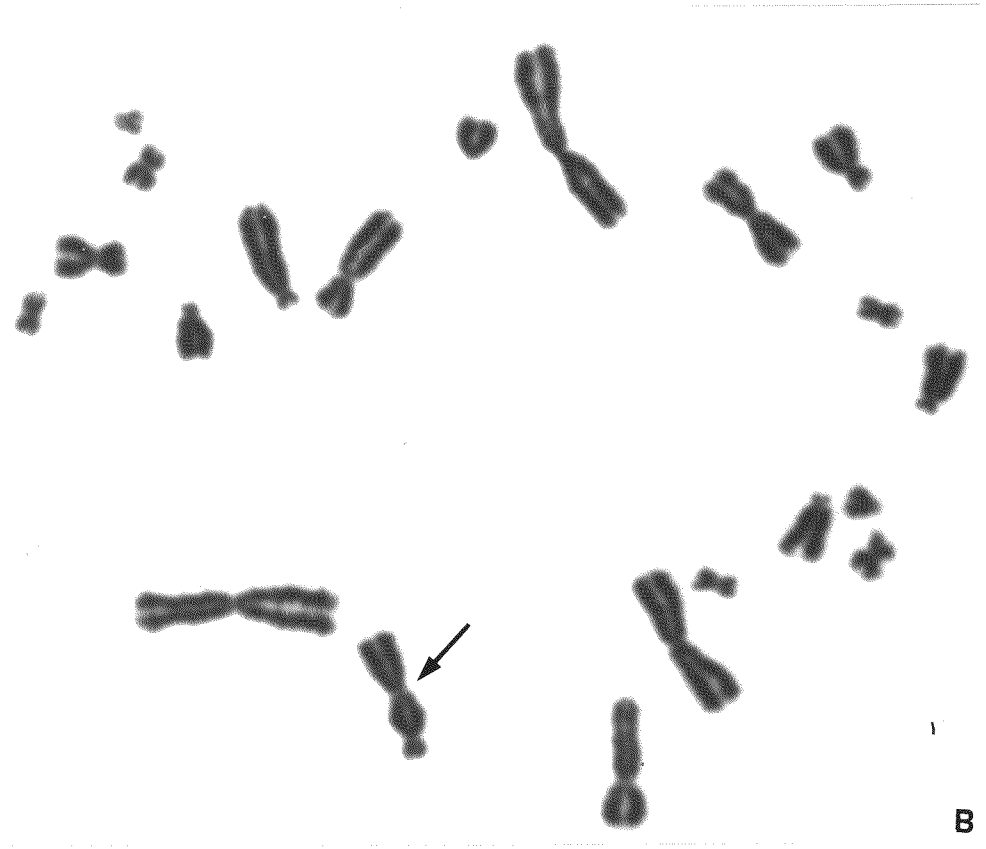
EP	Rayos X	Del	Iso	Inter	Dic	Ani	AC totales		
							Observado n <sup>2</sup>	Esperado %	
25µg/mlCat	-	8	18	4	9	0	39	19.5	-
50µg/mlCat	-	2	10	4	11	3	30	15	-
100µg/mlCat	-	17	15	10	10	3	55	27.5	-
25µg/mlCat	+	13	39	12	28	11	103	51.5	56.5 <sup>ns</sup>
50µg/mlCat	+	15	38	11	33	7	104	52	52 <sup>ns</sup>
100µg/mlCat	+	13	41	28	37	15	134	67	64.5 <sup>ns</sup>
+	+	12	36	25	27	7	107	53.5	-
-	-	1	4	-	10	1	16	8	-
+	-	2	15	8	7	1	33	16.5	-

<sup>ns</sup> Frecuencia observada no significativamente distinta de la esperada  
En todos los casos se analizaron 200 metafases

*Figura 18.- Células en metafase de CHO6. (A) Metafase normal; (B) Célula tratada con 1.5 Gy de rayos X en la que se observa un dicéntrico (→→).*



A

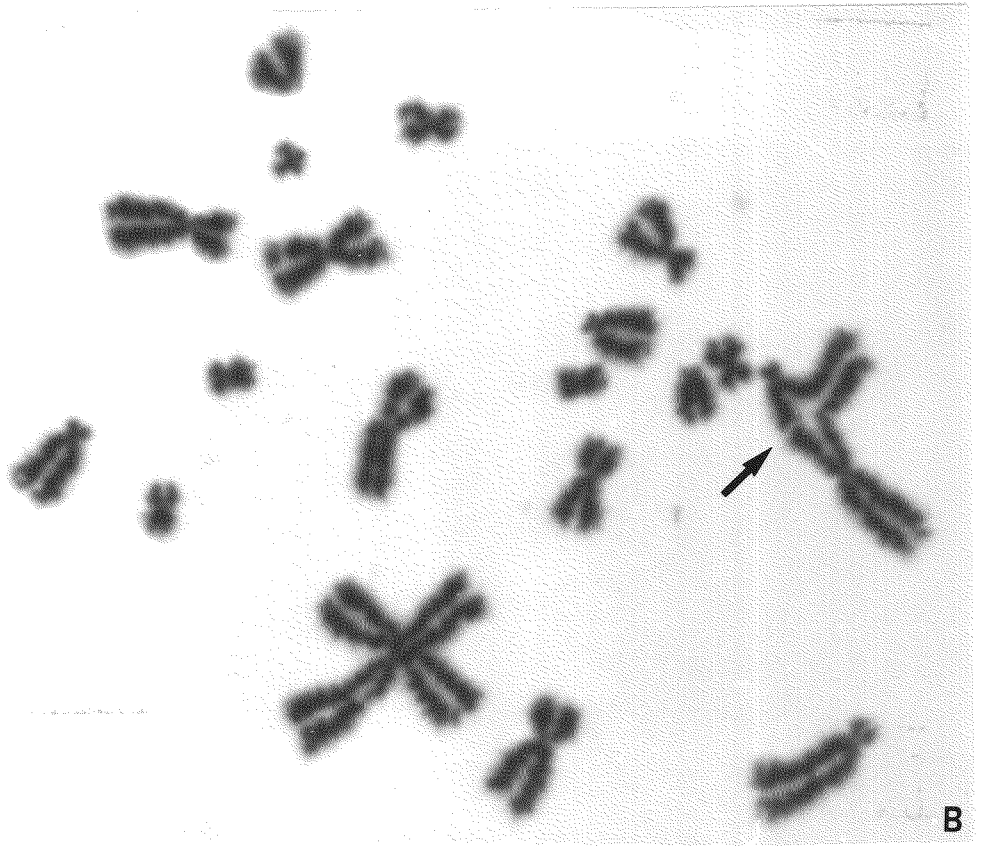


B

*Figura 19.- Células en metafase de CHO6 tratadas con 1.5 Gy de rayos X. (A) La metafase muestra un anillo (→) y un intercambio incompleto (▶); (B) Se puede observar un intercambio simétrico (⇔).*



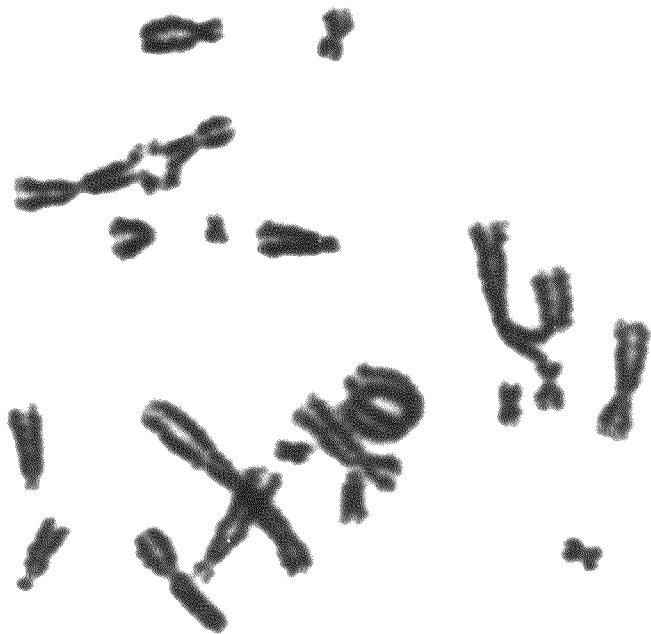
A



B



*Figura 20.- Células en metafase de CHO6 tratadas con 1.5 Gy de rayos X que muestran diversos tipos de aberraciones cromosómicas.*



### 3.4.2 Estimación del daño en el ADN por el ensayo de precipitación

La figura 21 muestra el porcentaje de ADN precipitado en células electroporadas con 100  $\mu\text{g/ml}$  de catalasa y células controles, y expuestas posteriormente a distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La cantidad de roturas parece estabilizarse por encima de 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , siendo similar a la producida por 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El porcentaje de ADN precipitado en células electroporadas con catalasa es significativamente mayor a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  que en las que no se electroporó la catalasa, lo cual indica una clara protección por parte de este enzima. Cuando la exposición consistió en 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sigue observándose protección aunque en menor grado, y las diferencias no son significativas a la concentración de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

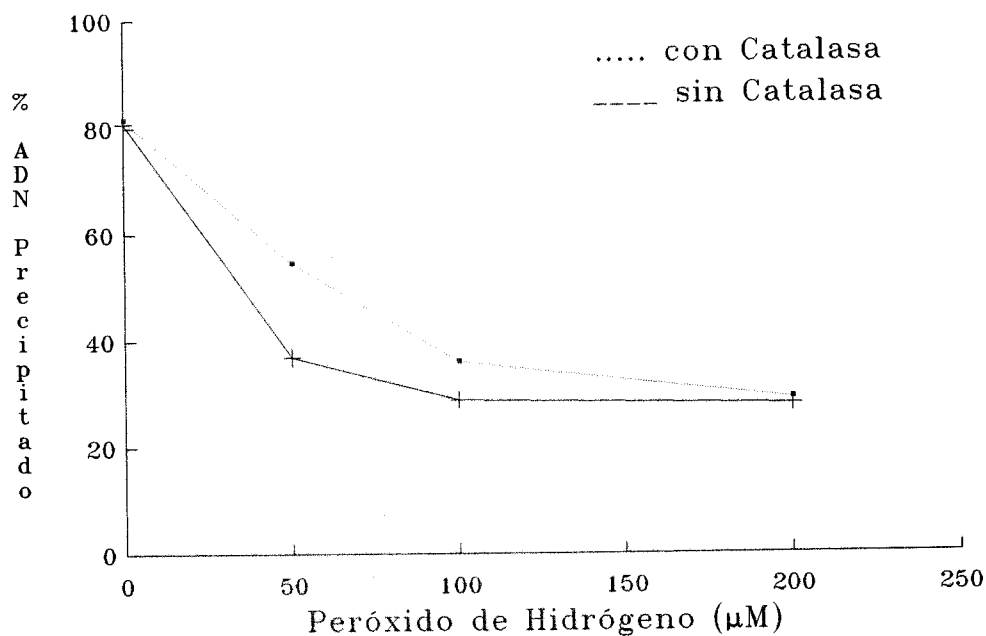


Fig. 21.- Porcentaje de ADN precipitado en células CHO6 electroporadas o no con catalasa y expuestas a distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas (*t*-student apareada) para las concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con  $P < 0.0015$  y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con  $P < 0.027$ , no observándose diferencias a la concentración de 200  $\mu\text{M}$ .

## *DISCUSSION*

## 4 DISCUSION

### 4.1 Respuesta adaptativa a radiación ionizante en células de mamífero: evidencias citogenéticas y moleculares.

Una característica del fenómeno adaptativo es la llamada resistencia cruzada, es decir, la posibilidad de condicionar un tipo celular al daño producido por un determinado mutágeno con dosis bajas de otro agente que produzca un tipo de daño similar. Así, se ha publicado que linfocitos humanos pretratados con bajas dosis de [<sup>3</sup>H]TdR o rayos X mostraban una reducción significativa en la frecuencia de AC inducida por una dosis challenge de BLM (Vijayalaxmi y Burkart, 1988). Por otra parte, en un estudio de similares características y objetivos, linfocitos humanos expuestos a bajas dosis de rayos X o de timidina tritiada y posteriormente tratados con altas dosis de timidina tritiada, BLM o el agente alquilante bifuncional MMC mostraban la respuesta, mientras que no lo hacían si el challenge se daba con el agente alquilante monofuncional MMS (Wolff y col., 1988). También en otros estudios de especial interés en el contexto del presente trabajo, se vio que el pretratamiento con peróxido de hidrógeno era capaz de reducir la frecuencia de AC provocada por un tratamiento posterior con 1.5 Gy de rayos X (Wolff y col., 1989).

Nosotros hemos observado la respuesta adaptativa en linfocitos de 3 donantes pretratados con un pulso simple de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 24 h antes del tratamiento challenge con 1.5 Gy de rayos X. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos previamente por Wolff y col., (1989) en linfocitos de dos donantes siguiendo un protocolo similar, con la diferencia de que nosotros hemos condicionado con un tratamiento más corto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min en vez de 3 h).

Nuestros resultados apoyan el que la reducción de AC en células pretratadas no se deba, como podría argumentarse, a la existencia de una subpoblación de linfocitos más sensible al daño oxidativo, a la que el pretratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no le permitiera

alcanzar metafase tras la exposición a rayos X, ya que el análisis del índice mitótico no muestra un claro efecto negativo en células pretratadas con respecto al control de rayos X sólo. Por otra parte, no se obtuvo respuesta adaptativa en ningún caso para ninguno de los donantes cuando el tratamiento condicionante consistió en repetidas exposiciones a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este resultado apoya la hipótesis de que la respuesta adaptativa no puede atribuirse a un retraso preferencial en el ciclo de las células más dañadas, puesto que si así fuera, la reducción de la frecuencia de AC sería más evidente en las células tratadas con pulso múltiple de peróxido. Algunos autores han publicado también resultados que permiten descartar los posibles artefactos antes mencionados, y que apoyan la existencia real del fenómeno, como es el caso de los estudios de Wiencke y col. (1986), quienes condicionaron linfocitos humanos con [<sup>3</sup>H]TdR antes de irradiar con rayos X.

Nuestra observación de que la respuesta adaptativa no se induce cuando se condiciona mediante pulsos múltiples de peróxido, puede ser explicado en base a los estrechos límites existentes en el tratamiento condicionante descritos por otros autores para que el fenómeno se manifieste, de manera que el hecho de condicionar con concentraciones de BLM por fuera de determinado rango (Wolff y col., 1988) o con dosis bajas de rayos X a tasas de dosis por fuera de determinados límites (Shadley y Wiencke, 1989), no induce la respuesta a un tratamiento posterior con 1.5 Gy de rayos X. Se ha propuesto que para que se de la RA, se debe producir un número determinado de lesiones en un período de tiempo limitado (Shadley y Wiencke, 1989) pero, por el contrario, un exceso de lesiones parece resultar en una saturación que inhibe la respuesta. Alternativamente, se ha sugerido la posibilidad de que interactúen las lesiones eliminando la señal inductora y formando otros tipos de daño que no inducirían la respuesta (Shadley y Wiencke, 1989).

Shadley y Dai (1992) han observado recientemente respuesta adaptativa citogenética en linfocitos humanos condicionados con bajas dosis de rayos X tras 5 h de estimulación y expuestos en el primer G<sub>1</sub> tras la estimulación a altas dosis de rayos

X. Estos resultados indican que la RA no está restringida a células en una determinada fase del ciclo celular cuando recibieron los tratamientos. El test de MN en células bloqueadas por Cyt B que nosotros hemos aplicado al estudio de la respuesta adaptativa nos ha permitido analizar el efecto de un pulso simple de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no sólo en células que estaban en la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular cuando recibieron el tratamiento challenge, sino en cualquiera de las fases del ciclo.

La posibilidad de analizar la respuesta adaptativa tras tiempos de recuperación más largos en Cyt B nos ha dado, por otra parte, la ventaja adicional de permitirles a las células tener el tiempo suficiente para pasar por mitosis y mostrarse como binucleadas aunque llevaran algún retraso en el ciclo, como suele ocurrir típicamente cuando las células son irradiadas. Nuestros resultados muestran claramente que la respuesta adaptativa es inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por tanto las células quedan protegidas frente a posteriores exposiciones a 1.5 o 3.0 Gy de rayos X. Para los experimentos de 3.0 Gy, sin embargo, esta respuesta no es evidente en los períodos de recuperación más cortos tras la exposición a rayos X (12 h), pero se hace evidente a tiempos de recuperación más largos (20 y 30 h). El interés de estos resultados consiste en que podrían indicar que las diferencias interindividuales en la expresión de respuesta adaptativa publicadas por diferentes autores (Bosi y Olivieri, 1989; Sankaranarayanan y col., 1989), podrían ser debidas a diferencias en el tiempo requerido para la llegada a mitosis de las células objeto de la protección inducida y con ello para la observación del fenómeno. El uso del método del bloqueo con Cyt B puede salvar ese obstáculo, y es por ello recomendable, en nuestra opinión, para el estudio del fenómeno adaptativo.

Con respecto al tipo de lesiones en el ADN que puedan ser importantes para inducir una eficaz reparación, es especialmente interesante el reciente trabajo de Boreham y Mitchel (1991) en levaduras. La reparación recombinacional del ADN y el incremento de su capacidad inducido por daño en el ADN, se cree que son los principales mecanismos que confieren resistencia a la muerte por radiación ionizante



en levaduras. Estos autores examinaron la naturaleza de las lesiones en el ADN generadas por radiación ionizante que inducen este mecanismo y encontraron evidencias de que las ssb en comparación con las dsb, eran las más eficientes en inducir radiorresistencia a muerte celular. Se ha postulado que las ssb alterarían la topología del ADN y se produciría por ello la respuesta. Puesto que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce principalmente ssb a través de radicales hidroxilo, que a su vez hemos visto que inducen radiorresistencia, es muy posible que en nuestro sistema se induzca algún sistema de reparación de características similares al inducido en levaduras (Boreham y Mitchel, 1991).

En cuanto a la base molecular se ha propuesto que el fenómeno adaptativo puede resultar de un incremento en la reparación del daño oxidativo y/o de un aumento en la actividad de los enzimas antioxidantes tales como catalasa o superóxido dismutasa (Laval, 1988).

Puesto que la poli(ADP-ribosa)polimerasa se ha implicado en la reparación (Skidmore y col., 1979; Durkacz y col., 1980) y su actividad se incrementa por la presencia de roturas de cadena del tipo de las producidas por la timidina tritiada (Benjamin y Gill, 1980), surgió la posibilidad de que este enzima interviniera en la respuesta adaptativa. La eliminación de la adaptación por el inhibidor de la poli(ADP-ribosa) polimerasa, 3-aminobenzamida (3-AB) descrita por Wiencke y col. (1986) en linfocitos humanos e Ikushima (1987) en células CHO parece implicar procesos de reparación en el fenómeno de adaptación. La poli(ADP-ribosa) puede que active a la ADN ligasa requerida para la reparación en células de mamíferos (Creissen y Shall, 1982) y la 3-AB puede que afecte el ligamiento durante la reparación (Morgan y Cleaver, 1983).

Recientemente se ha visto que la respuesta adaptativa citogenética podría requerir la síntesis de nuevas proteínas tras la exposición a bajas dosis de radiación ionizante (Youngblom y col., 1989, Wolff y col., 1989). Se ha visto previamente

(Shadley y col., 1987) que el pretratamiento con 0.01 Gy de rayos X no produce una disminución de la producción de AC inducida por 1.5 Gy hasta 4 h tras el pretratamiento. Para caracterizar los mecanismos a nivel molecular, Wolff y col. (1989) realizaron experimentos para ver si se sintetizaban enzimas nuevos que pudieran ser responsables de la RA. Expusieron las células a 0.01 Gy de rayos X a las 44 h de cultivo y después al inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida durante varios períodos tras el pretratamiento. Sólo cuando se inhibió la síntesis de proteínas en el período entre las 4 y 6 h, se impidió la RA, lo cual indica que es en este período cuando puede que se sintetice una proteína que pudiera participar en la adaptación. Electroforesis bidimensionales de células controles e irradiadas mostraron algunas proteínas en las irradiadas que no estaban en los controles y que eran posibles candidatas a ser enzimas adaptativos (Wolff y col., 1989). Los últimos trabajos en este sentido indican la existencia de una proteína que se une específicamente al ADN dañado por radiación (Wolff, 1992). Se han usado para estos estudios electroforesis monodimensionales (debido a la baja capacidad de carga de los geles bidimensionales) de proteínas de linfocitos expuestos a 0.01 Gy de rayos X, 6 h antes de la extracción de las proteínas. Tras la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa se añadió ADN plasmídico radiactivo y con roturas inducidas por la radiación debida a su contenido en  $^{32}\text{P}$ . Se detectaron varias bandas de proteínas que se unen a este ADN y se vio que esta unión no disminuía si se añadía en exceso ADN plasmídico roto pero no radiactivo. Parece así que una proteína de 30-35 KDa podría ser purificada y permitir la caracterización del gen.

#### **4.2 Diferentes respuestas a la bleomicina y los rayos X puestas de manifiesto tras un daño oxidativo**

La BLM es una de las pocas drogas antitumorígenicas descritas hasta la fecha que producen AC comparables, en diferentes aspectos, a las inducidas por rayos X (Ohama y Kadotani, 1970), por lo que se considera generalmente como un auténtico agente radiomimético. Se trata también de un agente S-independiente y, como en el caso de la acción indirecta de la irradiación, la BLM induce también roturas en el ADN a través de la producción de radicales libres (Sausville y col., 1976). Sin embargo, existen grandes diferencias entre ambos mutágenos y los mecanismos de acción de la radiación ionizante y la BLM son diferentes. La radiación ionizante, por su naturaleza, no se une al ADN, mientras la BLM se intercala y une a iones divalentes metálicos (Povirk y col., 1979). La radiación produce radicales libres por degradación directa del agua y materia orgánica (Chapman, 1980); la BLM genera al parecer, especies activas de oxígeno por mecanismos todavía no totalmente esclarecidos pero que se consideran diferentes (Burger y col., 1981). El daño por radiación en el ADN es típicamente al azar, mientras que la sensibilidad a la BLM está influenciada por la composición de bases del ADN (Takeshita y col., 1978) y la estructura de la cromatina (Vig y Lewis, 1978). Una diferencia adicional entre la radiación ionizante y la BLM es la velocidad de producción del daño. Este suceso está bien estudiado para la radiación ionizante (Chapman, 1980) y se sabe que ocurre muy rápidamente ( $1 \times 10^{-6}$  s). Aunque la BLM daña el ADN con una eficiencia más baja, no se tiene suficiente información. Por último, los dos agentes muestran, frecuentemente, diferencias en su actividad a nivel cuantitativo. Scott y Zampetti-Bosseler (1985) encontraron que a dosis equivalentes de citotoxicidad, la BLM inducía de 5 a 10 veces menos AC que la radiación ionizante y también menos retraso mitótico.

En los experimentos llevados a cabo por nosotros para la detección de MN, observamos en primer lugar que el tratamiento conjunto con BLM y Cyt B no fue efectivo. La reparación del daño del ADN empieza aproximadamente 15 min tras el

inicio del tratamiento con BLM en células CHO (López-Larrazza y col., 1990). La reparación no sólo implica el cierre de roturas sino muy probablemente la degradación de moléculas de BLM intercaladas en el ADN interrumpiendo las reacciones responsables de la generación de radicales libres. La persistencia de la BLM en el ambiente celular facilita el reemplazamiento de las moléculas de BLM degradadas por otras nuevas, mientras que se ha visto que el arreglo de las roturas era rápido y extenso cuando la BLM se quitaba del medio. El que nuestros resultados muestren un aumento del número de MN al aumentar el tiempo de recuperación en Cyt B cuando la BLM se ha quitado del medio, y por el contrario, el número de MN se estabilice a distintos tiempos de recuperación cuando ambos compuestos se suministran juntos y se dejan todo el tiempo, no estaría de acuerdo con los resultados de López-Larrazza y col. (1990), por lo que, en nuestra opinión, la Cyt B debe de inhibir de alguna forma la acción de la BLM cuando se suministran juntas al cultivo.

Los resultados obtenidos mediante el test de AC mostraron que ninguna de las concentraciones de  $H_2O_2$  utilizadas como tratamiento condicionante indujo la adaptación que protegiera frente al tratamiento posterior con 15mU/ml de BLM sino que, por el contrario, se observó un efecto sinérgico sobre el daño producido por BLM para todas las dosis de  $H_2O_2$  en el donante B y para dos de dichas dosis en el donante D.

Aunque existen evidencias de la resistencia cruzada que pueda existir entre BLM y otros agentes oxidativos en RA (Vijayalaxmi y Burkart, 1988; Wolff y col., 1988) y el mecanismo de producción del daño por BLM implique a los radicales  $OH\cdot$ , existen como hemos visto, grandes diferencias entre el modo de acción de ésta y los rayos X, por ejemplo. A diferencia de los rayos X que producen una mayor parte del daño inmediatamente, la BLM requiere tiempo para penetrar en las células y llegar al núcleo para unirse al ADN y provocar el daño. Varios estudios han mostrado que cuando las células en cultivo se incuban con BLM, sólo un 0.1% de la BLM presente en el medio entra realmente en las células (Miyaki y col., 1975; Roy y Horwitz, 1984). Esto hace

que el daño sobre las células tenga una distribución distinta de la Poisson, que es la característica de los rayos X. Por un lado, el posible sistema de reparación inducido por el  $H_2O_2$  no sería igual de eficaz, puesto que el daño está concentrado en determinadas células. Por otra parte, puesto que la eliminación del daño producido por la BLM no sólo implica la reparación del mismo, sino la destrucción de la molécula, podría ocurrir que simplemente el sistema inducido no fuera efectivo.

Cuando observamos los resultados de MN obtenidos con BLM, el sinergismo tiende a desaparecer, e incluso en algunas de las concentraciones de  $H_2O_2$  aparece respuesta adaptativa. Estos resultados pueden reflejar la irregularidad de la acción de la BLM, debido a la impermeabilidad de las células a ella, pero que puede que se manifieste en este test de MN más exageradamente debido a los posibles efectos de la Cyt B (que aunque no bien determinados, parece que existen). Por otra parte la inducción de un elevado número de MN en algunas de las células en comparación con la ausencia total de MN en otras, podría ocasionar en estas células con muchos MN el que se fusionaran algunos de ellos (Savage, 1988), lo cual interferiría también con los resultados.

Aparte de las características de la acción de la BLM, los resultados se pueden discutir también en base a las posibles causas de la variabilidad interindividual. Bosi y Olivieri (1989) propusieron que esta variabilidad en la respuesta adaptativa podría ser en parte debida a causas genéticas del donante y en parte a condiciones transitorias del donante o a variaciones en las condiciones de cultivo. De un estudio con 18 donantes utilizando [ $^3H$ ]TdR como tratamiento condicionante y rayos X como challenge, 4 de ellos no mostraron respuesta, y en alguno incluso el efecto fue sinérgico. Algunos de estos donantes no mostraron la respuesta adaptativa en experimentos sucesivos separados por intervalos de meses. Estos mismos autores en un trabajo posterior (Olivieri y Bosi, 1990), comprobaron que algunos donantes que en experimentos previos no habían mostrado la respuesta adaptativa, sí la mostraban ahora, y viceversa, y también que la adición de ciertos compuestos hormonales al

mismo tiempo del tratamiento condicionante, producía respuesta adaptativa en experimentos que en condiciones estándar no la mostraban. Esto apoya la idea de una posible dependencia de, al menos en parte, parámetros fisiológicos transitorios para la manifestación del fenómeno adaptativo.

Los casos de sinergismo, por otra parte, son difíciles de interpretar. Los sistemas de reparación inducidos y constitutivos son muy complejos, y como resultado de la inducción de varias enzimas sería posible un desequilibrio que afectara el resultado final de la reparación del daño (Olivieri y Bosi, 1990).

#### **4.3 La respuesta adaptativa en células vegetales.**

Existen pocos trabajos acerca de la posible respuesta adaptativa en células vegetales y los que hay se refieren principalmente a células meristemáticas de *Vicia faba*. En lo referente a radiación ionizante o agentes radiomiméticos Heindorff y col. (1987) obtuvieron que tanto rayos X como BLM (agentes S-independientes) podían producir una adaptación clastogénica en células meristemáticas de raíces de *V. faba*. Vieron asimismo, que estos dos agentes podían sustituirse entre ellos para producir la adaptación al otro agente (resistencia cruzada). En estudios previos, Rieger y col. (1985, 1986), obtuvieron resultados similares cuando usaron distintos agentes alquilantes S-dependientes como tratamientos condicionantes y challenge, por lo que parece claro que la adaptación clastogénica no se circunscribe al daño causado por radiación o similar.

En primer lugar, Heindorff y col. (1985) observaron una reducción en el número de AC inducidas por hidrazida maleica (HM) en células condicionadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tert-butilhidroperóxido. Esta reducción era evidente para distintos tiempos de recuperación tras el challenge, lo que descarta el que la posible influencia negativa del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la progresión en el ciclo celular sea la responsable del efecto de disminución de la frecuencia de AC en las células adaptadas. Por otra parte, la

adaptación no se daba cuando como challenge se daba trietileno melamina (TEM), por lo que estos autores concluyeron que una función de reparación inducible en células meristemáticas de *V. faba* actuaría específicamente sobre daño oxidativo en el ADN.

Nuestros resultados muestran respuesta adaptativa cuando las células fueron condicionadas con 0.26 Gy de rayos X y con las dos dosis de [<sup>3</sup>H]TdR probadas. Sin embargo no se obtuvo adaptación para la dosis condicionante de 0.06 Gy de rayos X. En nuestra opinión, el hecho de que la RA no se observe con la dosis condicionante de 0.06 Gy de rayos X puede deberse a los estrechos límites en que la respuesta adaptativa parece inducirse. Se han realizado algunos trabajos referente a este punto en linfocitos humanos, y se ha visto que la dosis condicionante debe de estar en un determinado intervalo de concentración (Wolff y col., 1988) si se trata de un agente químico, o de dosis con cierta tasa de dosis si se trata de un agente físico (Shadley y Wiencke, 1989).

Al margen de que aún se ignoren muchas cosas acerca del mecanismo molecular y la posible capacidad de respuesta adaptativa en los diferentes sistemas, parece claro que la misma es un fenómeno real que merece ser estudiado en otros tipos celulares vegetales bajo diferentes condiciones experimentales.

Parece por tanto que el estrés oxidativo no tiene que ser necesariamente negativo y se debe definir en términos de intensidad, cronicidad y capacidad antioxidante para predecir las consecuencias fisiológicas. El resultado biológico de la exposición a agentes oxidantes dependerá del balance dinámico entre la producción de radicales libres, defensa antioxidante y reparación del posible daño.

#### **4.4 Importancia relativa de la glutatión peroxidasa en la protección frente a la radiación ionizante**

Como vimos en la Introducción, la glutatión peroxidasa es uno de los enzimas celulares protectores frente al daño oxidativo, que cataliza la reducción del  $H_2O_2$  y de un amplio rango de hidroperóxidos a agua o los correspondientes alcoholes. Su actividad depende de la presencia de selenocisteína en el sitio activo. El suero del medio es la fuente de Se durante el cultivo celular normal, lo que significa que las células cultivadas en un medio con bajo contenido en suero tienen disminuida la actividad GPx. No obstante, dicha actividad puede incrementarse de manera controlada mediante la adición de selenito al medio de cultivo (Sandström y col., 1987).

Se ha visto que el Se puede inducir efectos genotóxicos, pero a la vez, exhibir propiedades potencialmente antimutagénicas y/o anticarcinogénicas (Shamberger, 1985). El mecanismo de toxicidad y mutagenicidad del selenito en bacterias y organismos superiores se cree que es el resultado de la interacción con grupos tioles que probablemente llevan a la destrucción de macromoléculas (Khalil, 1989).

Los resultados de nuestros experimentos de supervivencia indican que las células CL1 suplementadas con selenito quedan protegidas frente al efecto deletéreo de la radiación ionizante. En trabajos previos se ha visto que el tratamiento con selenito que incrementa la actividad GPx no protege, sin embargo, a las células de mamífero del efecto de la radiación ionizante (Sandström y col., 1989a). Una diferencia importante en nuestros experimentos si los comparamos con estos últimos, es que la dosis se ha dado en nuestro caso a una tasa mucho más baja (1:100) que la elegida por Sandström y col. (1989a) para sus experimentos. Si tenemos en cuenta que con esta tasa de dosis el tiempo de irradiación es bastante mayor, los radicales libres estarían presentes en el medio más tiempo porque se van generando poco a poco. La cinética de la GPx apoyaría el que el enzima fuese más eficiente en eliminar pequeñas cantidades de hidroperóxidos (Sandström y Marklund, 1990) que cantidades masivas generadas en



poco tiempo. En nuestra opinión, esto podría explicar la discrepancia entre nuestros resultados y los publicados por Sandström y col. (1989a).

Nuestros resultados indican que las células suplementadas con Se estaban protegidas contra la inducción del daño por  $H_2O_2$ , resultados que están de acuerdo con los de Sandström y col. (1989a y b) para otras líneas celulares y llevados a cabo en similares condiciones experimentales. Sin embargo, no se pudo observar tal protección frente al daño inducido por radiación cuando se utilizó el test de aberraciones cromosómicas como medida del daño. Por el contrario, se observó una potenciación aparente del daño en las células suplementadas con Se, lo cual representa una contradicción con los resultados que se esperarían según los obtenidos en los experimentos de supervivencia, puesto que está generalmente aceptado que las aberraciones cromosómicas son la mayor causa de muerte celular reproductiva (Roberts y Holt, 1985). Una posible explicación sería que no es posible relacionar de una forma simple, los datos de supervivencia con los de AC, ya que los experimentos de supervivencia se hicieron en la población total de células asincrónicas y los de AC implican a una pequeña subpoblación, aquellas células que llegaron a metafase entre las 12-14h después de la irradiación. Nuestros resultados muestran que el número de células irradiadas sin suplementar con Se que se pudo contar fue mucho menor que el de las suplementadas. Una posible explicación es que las células irradiadas y no suplementadas tengan en realidad más daño que el que aparentemente muestran los resultados de aberraciones cromosómicas, en un grado tal que no les haya permitido progresar en suficiente número a metafase. Cuando se han recogido las células para el análisis de aberraciones cromosómicas a la 12-14 h después de la irradiación, sólo relativamente pocas células no suplementadas sin defecto habrían sido capaces de llegar a metafase.

#### **4.5 Evidencias a favor y en contra del posible papel de la catalasa en la protección frente al daño inducido por rayos X**

Puesto que la catalasa es un enzima antioxidante que destruye  $H_2O_2$  produciendo  $O_2$  y  $H_2O$ , su posible papel protector para el ADN es evidente. El  $H_2O_2$  induce casi exclusivamente roturas de cadena simple en el ADN de manera dependiente de la dosis (Hoffman y Meneghini, 1979).

Nosotros hemos estudiado el efecto de la catalasa introducida en células CHO por electroporación sobre las roturas de cadena simple inducidas en el ADN como resultado de un tratamiento con  $H_2O_2$  (0-200  $\mu M$ ) administrado 4h más tarde, empleando para la detección de dichas roturas el ensayo de precipitación del ADN (Olive, 1988). Como pudimos ver, confirmando los resultados de Lambert y col. (1990), la catalasa exógena permanece activa dentro de la célula tras ser electroporada y protege claramente del daño en el ADN inducido por los radicales libres generados del  $H_2O_2$  cuando éste se suministró a las células a una concentración de 50  $\mu M$ . El efecto protector disminuye a la concentración de 100  $\mu M$   $H_2O_2$ , y no es evidente a 200  $\mu M$ . En nuestra opinión estos resultados parecen indicar una aparente saturación de la capacidad protectora de la catalasa al ir aumentando la cantidad de  $H_2O_2$  no viéndose disminuida en estos casos la producción de roturas. Esta interpretación está a su vez de acuerdo con el hecho de que a 100 y 200  $\mu M$  de  $H_2O_2$  el porcentaje de ADN precipitado, que es la medida indirecta del daño, sea prácticamente el mismo. Nuestros resultados están de acuerdo, en gran medida, con los obtenidos anteriormente por Sandström y col., (1989b) en células humanas, en las que un aumento en la concentración de glutatión peroxidasa inducido por selenito, proporcionaba protección frente al daño en el ADN inducido por  $H_2O_2$ . La protección que hemos observado frente al daño en el ADN producido por  $H_2O_2$  4h tras la introducción de la catalasa por electroporación es una demostración de que este método de permeabilizar células es muy útil para trabajar con factores reguladores introducidos en células a la vez que se mantiene la viabilidad (Lambert y col., 1990; Berglund y Starkey, 1991).

Puesto que la radiación ionizante resulta en radiolisis del agua, lo que a su vez lleva a la producción de daño a través de la generación de radicales hidroxilo del  $H_2O_2$ , sería de esperar que la presencia de catalasa activa exógena en el momento de la irradiación protegiera de este tipo de daño inducido por la radiación. Teniendo en cuenta la oportunidad que ofrece la técnica de la electroporación para introducir catalasa activa en células viables de mamífero, ha sido posible estudiar la importancia relativa de los radicales libres formados como consecuencia de la radiación en la producción de aberraciones cromosómicas.

Siguiendo un protocolo similar al usado en los experimentos anteriores, se electroporaron células CHO en presencia de distintas concentraciones de catalasa, y se irradiaron 4h más tarde con 1.5 Gy de rayos X. Como pudimos observar en los resultados no hubo reducción significativa en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en aquellas células electroporadas con catalasa antes de la irradiación comparado con aquellas que recibieron sólo los rayos X.

Existen estudios que apoyan la importancia del  $H_2O_2$  en la producción de aberraciones cromosómicas. Sasaki y Matsubara (1977) concluyeron que la inducción de aberraciones cromosómicas por radiación ionizante era en gran parte debida a la acción de radicales hidroxilo, y Parshad y col. (1980) vieron que la producción de aberraciones por luz fluorescente se explicaba por la acción de  $OH\cdot$  y  $H_2O_2$  que se formaban en las células. Sofuni y Ishidate (1984) obtuvieron conclusiones similares mediante la inducción de daño cromosómico en el sistema generador de superóxido xantina oxidasa e hipoxantina.

Por otra parte, coincidiendo con nuestros resultados para los rayos X, Peak y col., (1990) han obtenido evidencias de que el  $H_2O_2$  generado por radiación UVA no es importante en la muerte de células de mamífero como se ve comparando la supervivencia celular y las *ssb* tanto en CHO como en una variante de esta línea resistente al  $H_2O_2$  con niveles más altos de catalasa.

Link (1987) obtuvo en células epiteliales evidencias en cuanto a una aparente protección mediante la adición de catalasa extracelular frente a la muerte celular producida por rayos gamma. La importancia de las aberraciones cromosómicas, principalmente deleciones, en la muerte celular está bien establecida (Grote y col., 1981; Joshi y col., 1982) con lo que nuestros resultados parecen ser contradictorios con los de Link (1987). Sin embargo, aparte del daño al ADN, los peróxidos pueden ser tóxicos a través de distintos mecanismos (Halliwell y Gutteridge, 1989) como peroxidación de lípidos de membrana que puede resultar en pérdida de la barrera de difusión y lisis celular, o inactivación de gran número de enzimas por  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  y por ello, en nuestra opinión, los resultados obtenidos por Link no tendrían por qué implicar necesariamente daño en el ADN.

Parece importante que las actividades de la CAT y GPx estén equilibradas con la de la SOD. El  $H_2O_2$  inactiva la SOD (Bray y col. 1974; Marklund, 1984) y el radical superóxido inactiva los enzimas degradadores de  $H_2O_2$ , GPx (Blum y Fridovich, 1985) y CAT (Kono y Fridovich, 1982). Los enzimas antioxidantes trabajan cooperativamente, por lo que no cabe duda de que cualquier cambio importante en alguno de ellos puede romper este equilibrio y provocar alteraciones en las células. Así se ha visto que las actividades de la SOD, CAT, GPx y GR están alteradas en células tumorales (Oberley y Buettner, 1979). Esto podría, a nuestro juicio explicar el pequeño aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas observado en células electroporadas sólo con catalasa.

Teniendo en cuenta los resultados presentes y los de otros autores (Sandström y col., 1989; Peak y col. 1990), el  $H_2O_2$  generado como consecuencia de la radiolisis del agua no parece ser un factor importante para la producción de daño cromosómico y la muerte celular relacionada tras la radiación ionizante, aunque como vimos anteriormente, también existen resultados publicados por otros investigadores (Sasaki y Matsubara, 1977; Parshad y col., 1980; Sofuni e Ishidate, 1984) que parecen apoyar la hipótesis de la importancia relativa de los radicales libres en el daño cromosómico

producido por la radiación ionizante.

En nuestra opinión, esta controvertida cuestión merece ser estudiada en el futuro en otros tipos celulares y haciendo uso de diversos métodos, tanto a nivel citogenético como molecular.

## ***CONCLUSIONES***

## 5 CONCLUSIONES

1. La respuesta adaptativa a rayos X se puede inducir con bajas dosis de  $H_2O_2$  en linfocitos humanos, confirmando así los resultados de Wolff y col. (1989).

2. Los experimentos en que el pretratamiento consistió en repetidas exposiciones a  $H_2O_2$  apoyan: a) la existencia del fenómeno y no la explicación de que el fenómeno se deba a un retraso preferencial en el ciclo de las células más dañadas; b) la característica de saturación de la respuesta; c) los estrechos límites de concentración o dosis del tratamiento condicionante para que induzca la respuesta.

3. Los resultados obtenidos mediante el test de micronúcleos en binucleadas confirman los resultados obtenidos mediante el test de aberraciones e indican que: a) una causa de la variabilidad interindividual, ya descrita por otros autores, podría ser el tiempo necesario que cada individuo requiere para expresar la respuesta; b) la respuesta adaptativa es un fenómeno que puede ser puesto de manifiesto globalmente en el ciclo celular, y no tiene por qué estar restringido a aquellas células que estuvieran en determinada fase del ciclo cuando recibieron los tratamientos.

4. El  $H_2O_2$  tuvo en general un efecto sinérgico sobre el daño producido por bleomicina en linfocitos medido mediante el test de aberraciones cromosómicas, lo que evidencia las diferencias en el modo de acción entre esta droga radiomimética y la radiación ionizante.

5. Mediante el test de micronúcleos en binucleadas se puso en evidencia: a) una posible interacción entre la bleomicina y la citocalasina B cuando se administran conjuntamente; b) la irregularidad de la respuesta celular cuando las células fueron pretratadas con  $H_2O_2$  y expuestas posteriormente a bleomicina.

6. Nuestros resultados apoyan la existencia de respuesta adaptativa en células vegetales, mediante experimentos realizados en *Allium cepa* utilizando bajas dosis de [ $H^3$ ]TdR o de rayos X para inducir la respuesta a altas dosis de radiación ionizante, lo cual confirma resultados de distintos autores obtenidos en otros tipos celulares vegetales.

7. En conjunto, nuestros resultados parecen indicar que las roturas de cadena simple de ADN serían una lesión importante para la inducción de la respuesta adaptativa en células de mamíferos, lo cual estaría de acuerdo con lo observado recientemente en levaduras.

8. La glutatión peroxidasa inducida mediante Se en células CL1 protegió a las células frente a radiación ionizante dada a baja tasa de dosis como indicaron los resultados de los experimentos de supervivencia celular. La protección no fue evidente cuando se empleó el análisis citogenético debido probablemente a un retraso en el ciclo de las células más dañadas.

9. La introducción de catalasa mediante electroporación en células CHO6 resultó efectiva en la protección del ADN celular frente al  $H_2O_2$ , lo que indicó que el enzima estaba activo tras la electroporación; sin embargo no fue efectiva en la protección de las células frente al daño cromosómico inducido por rayos X, lo que muestra que a estas tasas de dosis, el  $H_2O_2$  producido por radiación ionizante no es importante en la inducción de aberraciones cromosómicas.



***BIBLIOGRAFIA***

## **6 BIBLIOGRAFIA**

- Anderson R.E. and I. Lefkovits (1979) In vitro evaluation of radiation-induced augmentation of the immune response, *Am. J. Pathol.*, 97: 456-472
- Ames B.N., R. Cathcart, E. Schwiers, and P. Hochstein (1981) Uric acid provides antioxidant defence in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6858-6862
- Avissar N., J.C. Whitin, P.Z. Allen, D.D. Wagner, P. Liegey and H.J. Cohen (1989) Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase: Cell of origin and secretion, *J. Biol. Chem.*, 264: 15850-15855
- Bakka A., A.S. Johnsen, L. Endresen and H.E. Rugstad (1982) Radioresistance in cells with high content of metallothionein, *Experientia*, 38: 381-383
- Bauchinger M., E. Schmid, H. Braselmann and U. Nahrstedt (1989) Absence of adaptive response to low-level irradiation from tritiated thymidine and X-rays in lymphocytes of two individuals examined in serial experiments, *Mutat. Res.*, 227: 103-107
- Benjamin R.C. and D.M., Gill (1980) Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA: A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks, *J. Biol. Chem.*, 255: 10502-10508
- Berglund, D.L. and J.R. Starkey, 1991, Introduction of antibody into viable cells using electroporation, *Cytometry*, 12: 64-67
- Boreham D.R. and R.E.J. Mitchel (1991) DNA lesions that signal the induction of radioresistance and DNA repair in yeast, *Radiat. Res.*, 128: 19-28
- Bosi A. and G. Olivieri (1989) Variability of the adaptive response to ionizing radiations in humans, *Mutat. Res.*, 211: 13-17
- Blum J. and I. Fridovich (1985) Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical, *Arch. Biochem. Biophys.*, 240: 500-508
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248-254
- Bray R.C., S.A. Cockle, E.M. Fielden, P.B. Roberts, G. Rotilio and L. Calabrese (1974) Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide, *Biochem. J.*, 139: 43-48

- Burger R.M., J. Peisach and S.B. Horwitz (1981) Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron and oxygen that degrades DNA, *J. Biol. Chem.*, 256: 11636-11644
- Cai L. and S.Z. Liu (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(1): 187-194
- Cantin A.M., S.L. North, R.C. Hubbard and R.G. Crystal (1987) Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione, *J. Appl. Physiol.*, 63: 152-157
- Carmagnol F., P.M. Sinet, and H. Jerome (1983) Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissues extracts, *Biochim. Biophys. Acta*, 759: 49-57
- Cerutti P., G. Krupitza, R. Larsson, D. Muehlematter, D. Crawford and P. Amstad (1988) Physiological and pathologic effects of oxidants in mouse epidermal cells, *Ann. NY Acad. Sci.*, 551: 75-82
- Chapman D.J. (1980) Biophysical models of mammalian cell inactivation by radiation. In: R.E. Meyn and H.R. Withers (Eds.), *Radiation Injury in Cancer Research*, Raven Press, New York, pp. 21-32
- Conger A.D. and L.M. Fairchild (1953) A quick-freeze method for making smear slides permanent, *Stain Technol.*, 28: 281-283
- Countryman P.I. and J.A. Heddle (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutat. Res.*, 41: 321-332
- Creissen D. and S. Shall (1982) Regulation of DNA ligase activity by poly(ADP-ribose), *Nature (London)*, 196: 271-272
- D'Andrea A.D. and W. Haseltine (1978) Sequence specific cleavage of DNA by the antitumor antibiotics neocarzinostatin and bleomycin, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 75: 3608-3612
- De Duve, C. (1984) Peroxisomes and sundry other microbodies. In: W.H. Freeman and Company, *A Guided Tour of the Living Cell*, New York, pp. 180-190
- Demple B. and S. Linn (1982) 5,6-saturated thymine lesions in DNA: production by ultraviolet light or hydrogen peroxide, *Nucleic Acids Res.*, 10: 3781-3789

- Demple B. and J. Halbrook (1983) Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*, *Nature* 304: 466-468
- Demple B.D., B. Sedgwick, P. Robins, N. Totty, M.D. Waterfield and T. Lindahl (1985) Active site and complete sequence of the suicidal methyltransferase that counters alkylation mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 2688-2692
- Demple B. (1991) Regulation of bacterial oxidative stress genes, *Annu. Rev. Genet.*, 25: 315-337
- Dizdaroglu M., Z. Nackerdien, B. Chao, E. Gajewski and G. Rao (1991) Chemical nature of in vivo DNA base damage in hydrogen peroxide-treated mammalian cells, *Arch. Bioch. Biophys.* 285(2): 388-390
- Duan Y., S. Komura, B. Fiszer-Szafarz, D. Szafarz and K. Yagi (1988) Purification and characterization of a novel monomeric glutathione peroxidase from rat liver, *J. Biol. Chem.*, 263: 19003-19008
- Durkacz, B.W., O. Omidiji, D.A. Gray and S. Shall (1980) (ADP-ribose)<sub>n</sub> participates in DNA excision repair, *Nature (London)*, 283: 593-596
- Eastmond D.A. and J.D. Tucker (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13: 34-43
- Emerit I. and P.A. Cerutti (1982) Tumor promoter phorbol 12-myristate 13-acetate induces a clastogenic factor in human lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79: 7509-7513
- Emerit I. (1984) Active oxygen species at the origin of sister chromatid exchanges. In: R. Tice and Hollaender (Eds.), *Sister Chromatid Exchanges*, Plenum, New York, pp. 127-140
- Emerit I., S.H. Khan and P.A. Cerutti (1985) Treatment of lymphocyte cultures with a hypoxanthine-xanthine oxidase system induces the formation of transferable clastogenic material, *J. Free Radicals Biol. Med.*, 1: 51-57
- Epp O., R. Ladenstein and A. Wendel (1983) The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution, *Eur. J. Biochem.*, 133: 51-69
- Esterving D. and R.J. Wang (1984) Sister chromatid exchanges and chromosomes aberrations in human cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and other photoproducts generated in fluorescent light-exposed medium, *Photochem. Photobiol.*, 40: 333-336

- Fenech M. and A.A. Morley (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.*, 147: 29-36
- Fenech M. and A.A. Morley (1989) Kinetochore detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss, *Mutagenesis*, 4: 98-104
- Flohé L. (1982) Glutathione peroxidase brought into focus. In: W.A. Pryor (Ed.), *Free Radicals in Biology* (ed. W.A. Pryor), Academic Press, New York, vol.5, pp. 223-254
- Floyd R.A. (1981) DNA-ferrous iron catalyzed hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99: 1209-1215
- Foote C.S. and R.W. Denny (1968) Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by  $\beta$ -carotene. *J. Am. Chem. Soc.*, 90: 6233-6235
- Forstrom J.W., J.J. Zakowski and A.L. Tappel (1978) Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine, *Biochemistry*, 17: 2639-2644
- Fridovich I. (1978) The biology of oxygen radicals, *Science*, 201: 875-880
- Fritz-Niggli H. and C. Schaeppi-Buechi (1991) Adaptive response to dominant lethality of mature (class A) and immature (class B) oocytes of *D. melanogaster* to low doses of ionizing radiation: Effects in repair proficient (yw) and repair-deficient strains (mei41<sup>D5</sup> and mus302<sup>D1</sup>), *Int. J. Radiat. Biol.*, 59: 175-184
- Glazer A.N. (1988) Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: A protective role for creatinine. *FASEB J.*, 2: 2487-2491
- Grote S.J., G.P. Joshi, S.H. Revell and C.A. Shaw (1981) A method for the scrutiny of live mammalian cells in culture and for the measurement of their proliferative ability after X-irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, 39: 377-394
- Gutteridge J.M.C., D.A. Rowley and B. Halliwell (1981) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts, *Biochem. J.*, 199: 263-265
- Halliwell B. (1978) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems, *FEBS Lett.*, 92: 321-326
- Halliwell B. (1987) Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB J.*, 1: 358-364

- Halliwell B. (1988) Albumin - an important extracellular antioxidant? *Biochem. Pharmacol.*, 37: 569-571
- Halliwell B. and J.M.C. Gutteridge (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals transition metals and disease, *Biochem. J.*, 219: 1-14
- Halliwell B. and J.M.C. Gutteridge (1985) *Free radicals in biology and medicine*, Oxford: Clarendon Press
- Halliwell B. and J.M.C. Gutteridge (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Second Edition. Oxford University Press, Oxford
- Halliwell B. and J.M.C. Gutteridge (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview, *Methods. Enzymol.*, 186: 1-85
- Hamer D.H. (1986) Metallothionein, *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 913-951
- Harman D. (1986) Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and disease processes. In: J.E. Johnson, R. Walford, D. Harman and J. Miguel (Eds.), *Free radicals, Aging, and Degenerative Diseases*, Liss, New York, pp. 3-49
- Harrison P.M. and R.J. Hoare (1980) *Metals in biochemistry*, London: Chapman and Hall
- Hartman P.E., Z. Hartman and M.J. Citardi (1988) Ergothioneine, histidine, and two naturally occurring histidine dipeptides as radioprotectors against  $\tau$ -irradiation inactivation of bacteriophages T4 and P22, *Radiat. Res.*, 114: 319-330
- Heindorff K., A. Michaelis, O. Aurich and R. Rieger (1985) Peroxide pretreatment of *Vicia faba* root-tip meristems results in "clastogenic adaptation" to maleic hydrazide but not to TEM, *Mutat. Res.*, 142: 23-27
- Heindorff K., R. Rieger, A. Michaelis and S. Takehisa (1987) Clastogenic adaptation triggered by S-phase-independent clastogens in *Vicia faba*, *Mutat. Res.*, 190: 131-135
- Hertzberg R.P. and Dervan P.B. (1984) Cleavage of DNA with methidiumpropyl-EDTA-iron(II): reaction conditions and product analyses, *Biochemistry*, 23: 3934-3945
- Hjalmarsson K., S.L. Marklund, Å. Engström and T. Edlund (1987) Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 6340-6344

- Hoffman M.E. and R. Meneghini (1979) Action of hydrogen peroxide on human fibroblasts in culture, *Photochemistry and Photobiology*, 30: 151-155
- Hoffman M.E., A.C. Mello-Filho and R. Meneghini (1984) Correlation between cytotoxic effect of hydrogen peroxide and the yield of DNA strand breaks in cells of different species, *Biochim. Biophys. Acta*, 781: 234-238
- Hochstein P. and A.S. Atallah (1988) The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer, *Mutat. Res.*, 202: 363-375
- Huber R., S. Streng, and M. Bauchinger (1983) The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry, *Mutat. Res.*, 111: 185-193
- Ikushima T. (1987) Chromosomal responses to ionizing radiation reminiscent of an adaptive response in cultured Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, 180: 215-221
- James S.J. and T. Makinodan (1988) T cell potentiation in normal and autoimmune-prone mice after extended exposure to low doses of ionizing radiation and/or caloric restriction, *Int. J. Radiat. Biol.*, 53: 137-152
- James S.J., S.M. Enger and T. Makinodan (1991) DNA strand breaks and DNA repair response in lymphocytes after chronic *in vivo* exposure to very low doses of ionizing radiation in mice, *Mutat. Res.*, 249: 255-263
- Joshi G.P., W.J. Nelson, S.H. Revell and C.A. Shaw (1982) X-ray induced chromosome damage in live mammalian cells and improved measurements of its effects on their colony forming ability, *Int. J. Radiat Biol.*, 41: 161-181
- Karlsson K. (1988) Extracellular-superoxide dismutase; association with glycosaminoglycans, Umeå Univ. Med. Dissert. New Series, 227
- Kelsey K.T., A. Memisoglu, D. Frenkel and H.L. Liber (1991) Human lymphocytes exposed to low doses of X-rays are less susceptible to radiation-induced mutagenesis, *Mutat. Res.*, 263: 197-201
- Ketterer B., K.H. Tan, D.J. Meyer and B. Coles (1987) Glutathione transferases: a possible role in the detoxification of DNA and lipid hydroperoxides. In: Mantle, T.J.; Pickett, C.B.; Hayes, J.D.(Eds.) *Glutathione S-transferases and carcinogenesis*. New York: Taylor and Francis, pp. 149-163
- Khalil A.M. (1989) The induction of chromosome aberrations in human purified peripheral blood lymphocytes following *in vitro* exposure to selenium, *Mutat. Res.*, 224: 503-506

- Kihlman B.A. (1975) Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations, *Mutat. Res.*, 31: 401-412
- Kohen R., Y. Yamamoto, K.C. Cundy and B.N. Ames (1988) Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in the muscle and brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 3175-3179
- Kondo H., Y. Nakabeppu, H. Kataoka, S. Kuhara, S. Kawabata and M. Sekiguchi (1986) Structure and expression of the *alkB* gene of *Escherichia coli* related to the repair of alkylated DNA, *J. Biol. Chem.*, 261: 15772-15777
- Kono Y. and I. Fridovich (1982) Superoxide radical inhibits catalase, *J. Biol. Chem.*, 257: 5751-5754
- Kuo M.T. (1981) Preferential damage of active chromatin by bleomycin, *Cancer Res.*, 41: 2439-2443
- Kuo M.T. and T.C. Hsu (1978) Bleomycin causes release of nucleosomes from chromatin and chromosomes, *Nature*, 271: 83-84
- Lalaonde L., Y. Jean, K.D. Roberts, A. Chapdelaine and G. Bleau (1982) *Clin. Chem.* 28: 172-174
- Lambert, H., Pankov, R., Gauthier, J. and Hancock, R. (1990) Electroporation - mediated uptake of proteins into mammalian cells, *Biochemistry and Cell Biology*, 68: 729-734.
- Laval F. (1988) Pretreatment with oxygen species increases the resistance of mammalian cells to hydrogen peroxide and gamma-rays, *Mutat. Res.*, 201: 73-79
- Link, E.M., 1987, *British Journal of Cancer*, Suppl. VIII, 110-112.
- Liteplo R.G. (1988) DNA (cytosine) methylation in murine and human tumor cell lines treated with S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors, *Cancer Lett.*, 39: 319-327
- Littlefield L.G., A.M. Sayer and E.L. Frome (1989) Comparisons of dose-response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytochinesis-arrested lymphocytes, *Mutagenesis*, 4(4): 265-270
- Liu S.Z., L. Cai and S.Q. Sun (1992) Induction of a cytogenetic adaptive response by exposure of rabbits to very low dose-rate  $\tau$ -radiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, 62(2): 187-190



- Ljungman M. (1990) The role of chromatin in the induction and repair of DNA damage, (Tesis Doctoral) Department of Radiobiology, Stocholm University
- López-Barea J., J.A. Barcena, J.A. Bocanegra, J. Florindo, C. García-Alfonso, A. López-Ruiz, E. Martínez-Galisteo and J. Peinado (1990) Structure, mechanism, function and regulatory properties of glutathione reductase, cap 11, pp 105-116, in: J. Viña (ed.), *Glutation: Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press. Boca Raton
- López-Larraza D., J C. de Luca and N.O. Bianchi (1990) The kinetics of DNA damage by bleomycin in mammalian cells, *Mutat. Res.*, 232: 57-61
- Machlin L.J. and A. Bendich (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients, *FASEB J.*, 1: 441-445
- Maddipati K.R., C. Gasparski and L.J. Marnett (1987) Characterization of the hydroperoxide-reducing activity of human plasma, *Arch. Biochem. Biophys.*, 254: 9-17
- Marklund S.L. (1982) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 7634-7638
- Marklund S.L. (1984) Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung, *Biochem. J.*, 220: 269-272
- Marklund S.L., N.G. Westman, E. Lundgren and G. Roos (1982) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues, *Cancer Res.*, 42: 1955-1961
- McAlpine P.J., C. Boucheix, A. J. Pakstis, L.C. Stranc, T.G. Barent and T.B. Shows (1988) The 1988 catalog of mapped genes and report of the nomenclature committee, *Cytogenet. Cell Genet.*, 49: 4-38
- McCord J.M. (1988) Free radicals and myocardial ischemia: Overview and outlook, *Free Radical Biol. Med.*, 4: 9-14
- McCord J.M. and I. Fridovich (1969) Superoxide dismutase : An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, 244: 6049-6055
- McLean-Fletcher S. and T.D. Pollard (1980) Mechanism of action of cytochalasin B on actin, *Cell*, 20: 329-341
- Meneghini (1988) Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells, *Mutat. Res.*, 195: 215-230

- Mills G.C. (1957) Hemoglobin catabolism: I Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobine from oxidative breakdown, *J. Biol. Chem.*, 229: 189-197
- Mitchel R.E.J. and D.P. Morrison (1984) An oxygen effect for gamma-radiation induction of radiation resistance in yeast, *Radiat. Res.*, 100: 205-210
- Miyaki M., T. Ono, S. Hori and H. Umezawa (1975) Binding of bleomycin to DNA in bleomycin-sensitive and -resistant rat ascites hepatoma cells, *Cancer Res.*, 35: 2015-2019
- Moquet L.E., D.C. Lloyd, J.S. Prosser and A.A. Edwards (1987) Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C after exposure of human lymphocytes to a low dose of X-radiation, *Mutat. Res.*, 180: 215-221
- Morgan W.F. and J.E. Cleaver (1983) Effect of 3-aminobenzamide on the rate of ligation during repair of alkylated DNA, *Cancer Res.*, 43: 3104-3107
- Oberley L.W. and G.R. Buettner (1979) Role of superoxide dismutase in cancer. A review, *Cancer Res.*, 39: 1141-1149
- Ohama K. and T. Kadotani (1970) Cytogenetic effects of bleomycin on cultured human leukocytes, *Jpn. J. Hum. Genet.*, 14: 293-297
- Okada S., N. Nakamura, and K. Sakai (1983) Radioprotection of intracellular genetic material. In: Nygaard, O.F.; Simic, M.G. (Eds.) *Radioprotectors and anticarcinogens*. New York:Academic Press, pp 339-356
- Olive, P.L., 1988, DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 11: 487-495.
- Olivieri G., J. Bodycote and S. Wolff (1984) Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine, *Science*, 223: 594-597
- Olivieri G. and A. Bosi (1990) Possible causes of variability of the adaptive response in human lymphocytes, in: G. Obe, A.T. Natarajan (Eds) *Chromosomal aberrations, basic and applied aspects*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany, pp. 130-138
- Olsson M. and T. Lindalh (1980) Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*: methyl group transfer from O<sup>6</sup>-methylguanine to a protein cysteine residue, *J. Biol. Chem.*, 255: 10569-10571

- Parshad R., W.G. Taylor, K.K. Sanford, R.F. Camalier, R. Gantt and R.E. Tarone (1980), Fluorescent light-induced chromosome damage in human LMR-90 fibroblasts, Role of hydrogen peroxide and related free radicals, *Mutat. Res.*, 73: 115-124
- Peak M.J., C.A. Jones, B.A. Sedita, E.J. Dudek, D.R. Spitz and J.G. Peak (1990) Evidence that hydrogen peroxide generated by 365 nm UVA radiation is not important in mammalian cell killing, *Radiat. Res.*, 123: 220-223
- Povirk L.F., W. Wübker, W. Köhnlein and F. Hutchinson (1977) DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin, *Nucleic Acids Res.*, 4: 3573-3580
- Povirk L.F., M. Hogan and N. Dattagupta (1979) Binding of bleomycin to DNA: intercalation of the bithiazole rings, *Biochemistry*, 19: 96-101
- Rhaese, H. and E. Freese (1968) Chemical analysis of DNA alteration, base liberation and backbone breakage of DNA and oligodeoxyadenylic acid induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxylamine, *Biochim. Biophys. Acta*, 155: 476-490
- Rieger R., A. Michaelis and I. Schubert (1985) Heat-shocks prior to treatment of *Vicia faba* root tip meristems with maleic hydrazide or TEM reduce the yield of chromatid aberrations, *Mutat. Res.*, 143: 79-82
- Rieger R., A. Michaelis and I. Shubert (1986) Reduction by heat shock of maleic hydrazide induced aberration yield is dependent on temperature and duration of heat pretreatment, *Mutat. Res.*, 174: 199-204
- Roberts C.J. and P.D. Holt (1985) Induction of chromosome aberrations and cell killing in Syrian hamster fibroblasts by gamma rays, X-rays and fast neutrons, *Int. J. Radiat. Biol.*, 48: 927-939
- Roy S.N. and S.B. Horwitz (1984) Characterization of the association of radiolabeled bleomycin A<sub>2</sub> with HeLa cells, *Cancer Res.*, 44: 1541-1546
- Samson L. and J. Cairns (1977) A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*, *Nature*, 267: 281-283
- Samuni A., J. Aronovitch, D. Gadinger, M. Chevion and G. Csapski (1983) On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions, A site-specific Fenton mechanism, *Eur.J. Biochem.*, 137: 119-129
- Sanderson B.J.S. and A.A. Morley (1986) Exposure of human lymphocytes to ionizing radiation reduces mutagenesis by subsequent ionizing radiation, *Mutat. Res.*, 263: 197-201

- Sandström B.R.E. and K.J. Johanson (1987) A direct assay for detection of chemically induced changes in the rejoining kinetics of radiation induced DNA strand breaks, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 14: 183-190
- Sandström B.E.R., J. Carlsson and S.L. Marklund (1987) Variations among cultured cells in glutathione peroxidase activity in response to selenite supplementation, *Biochim. et Biophys. Acta*, 929: 148-153
- Sandström, B.E., J. Carlsson and S.L. Marklund (1989a) Selenite-induced variation in glutathione peroxidase activity of three mammalian cell lines: no effect on radiation-induced cell killing or DNA strand breakage, *Radiation Research*, 117: 318-325
- Sandström, B.E., K. Grankuist and S.L. Marklund (1989b) Selenite-induced increase in glutathione peroxidase activity protects human cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage, but not from damage inflicted by ionizing radiation, *International Journal of Radiation Biology*, 56: 837-841
- Sandström B.E. and S.L. Marklund (1990) Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide, 271: 17-23
- Sankaranarayanan K., A.V. Duyn, M.J. Loos and A.T. Natarajan (1989) Adaptive response of human lymphocytes to two low-level radiation from radioisotopes or X-rays, *Mutat. Res.*, 211: 7-12
- Sasaki, M. S. and S. Matsubara (1977), Free radical scavenging in protection of human lymphocytes against chromosome aberration formation by gamma-ray irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, 56: 837-841
- Sausville E.A., J. Peisach and S.B. Horwitz (1976) A role for ferrous ion and oxygen in the degradation of DNA by bleomycin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 73: 814-822
- Sausville E.A., R.W. Stein, J. Peisach and S.B. Horwitz (1978) Effects of chelating agents and metal ions on the degradation of DNA by bleomycin, *Biochemistry*, 17: 2746-2754
- Savage J.R.K. (1988) A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations, *Mutat. Res.*, 207: 33-36
- Schmid E., M. Bauchinger and U. Nahrstedt (1989) Adaptive response after X-irradiation of human lymphocytes?, *Mutagenesis*, 4: 87-89

- Scott D. and F. Zampetti-Bosseler (1985) Relationship between chromosome damage, cell cycle delay and cell killing induced by bleomycin and X-rays , *Mutation Res.*, 151: 83-88
- Shadley J.D. and S. Wolff (1987) Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation, *Mutagenesis*, 2: 95-96
- Shadley J.D., V. Afzal and S. Wolff (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. and J.K. Wiencke (1989) Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity, *Int. J. Radiat. Biol.*, 56(1): 107-118
- Shadley J.D. and G. Dai (1992) Cytogenetic and survival adaptive responses in G<sub>1</sub> phase human lymphocytes *Mutat. Res.*, 265: 273-281
- Shamberger R.J. (1985) *Mutat. Res.*, 154: 29-48
- Shevell D.E., B.M. Friedman and G.C. Walker (1990) Resistance to alkylation damage in *Escherichia coli*: Role of the Ada protein in induction of the adaptive response, *Mutat. Res.*, 233: 53-72
- Shires T.K. (1982) Iron-mediated DNA damage and synthesis in isolated rat liver nuclei, *Biochem. J.*, 205: 321-329
- Siddiqui M.A. and E. Bothe (1987) Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration, *Radiat. Res.*, 112: 449-463
- Sies H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 25: 1058-1071
- Skidmore C.J., M.I. Davies, P.M. Goodwin, H. Halldorsson, P.J. Lewis, S. Shall and A. Ziace (1979) The involvement of poly(ADP-ribose)polymerase in the degradation of NAD caused by  $\tau$ -irradiation and N-methyl-N-nitrosourea, *Eur. J. Biochem.*, 101: 135-142
- Sofuni T. and M. Ishidate, (1984) Induction of chromosomal aberrations in cultured Chinese hamster cells in a superoxide-generating system, *Mutat. res.*, 140: 27-31
- Sohal R.S., R.G. Allen and C. Nations (1988) Oxidative stress and cellular differentiation, *Ann. NY Acad. Sci.*, 551: 59-73

- Stocker R., Y. Yamamoto, A.F. McDonagh, A.N. Glazer and B.N. Ames (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science*, 235: 1043-1046
- Storz G., L.A. Tartaglia and B.N. Ames (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation of oxidation, *Science*, 248: 189-194
- Sugiura Y., T. Suzuki, M. Otuska, S. Kobayashi, M. Ohno, T. Takita and H. Umezawa (1983) Synthetic analogues and biosynthetic intermediates of bleomycin, *J. Biol. Chem.*, 258: 1328-1336
- Sun Y. and L.W. Oberley (1989) The inhibition of catalase by glutathione, *Free Radical Biol. Med.*, 7: 595-602
- Sunderman F.W. and A.M. Barber (1988) *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 18: 267-271
- Takahashi K. and H. Cohen (1986) Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: Immunological investigations on cellular and plasma enzymes, *Blood*, 68: 640-645
- Takahashi K., N. Avissar, J. Whitin and H. Cohen (1987) Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: A selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, 256: 677-686
- Takano K., Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1988) Functional sites of the Ada regulatory protein of *Escherichia coli*; analysis by amino acid substitutions, *J. Mol. Biol.*, 201: 261-271
- Takeshita M., A.P. Grollman, E. Ohtusbo and H. Ohtusbo (1978) Interaction of bleomycin with DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 75: 5983-5987
- Teo I., B. Sedgwick, M.W. Kilpatrick, T.V. McCarthy and T. Lindahl (1986) The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*, *Cell*, 45: 315-324
- Thompson E.J. and P.E. Perry (1988) The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy, *Mutagenesis*, 3: 415-418
- Tornalley P.J. and M. Vasak (1985) Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals, *Bochim. Biophys. Acta*, 827: 36-44

- Treger J.M., K.A. Heichman and K. McEntee (1988) Expression of the yeast *UBI4* gene increases in response to DNA-damaging agents and in meiosis, *Mol. Cell. Biol.* 8: 1132-1136
- Tullius T.D. and B.A. Dambroski (1986) Hydroxyl radical "footprinting": high-resolution information about DNA-protein contacts and application to repressor and Cro protein, *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 83: 5469-5473
- Tuschl H., R. Kovac and H. Altmann (1983) UDS and SCE in lymphocytes of persons occupationally exposed to low levels of ionizing radiation, *Health Physics*, 45: 1-7
- Ursini F., M. Maiorino and C. Gregolin (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 839: 62-70
- Vig B.K. and R. Lewis (1978) Genetic toxicology of bleomycin, *Mutat. Res.*, 55: 121-145
- Vijayalaxmi and W. Burkart (1988) Resistance and cross-resistance to chromosome damage in human blood lymphocytes adapted to bleomycin, *Mutat. Res.*, 211: 1-5
- Volkert M.R. (1988) Adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage, *Env. Mol. Mutagen.*, 11: 241-255
- Von Sonntag, C. (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London
- Vuillaume M. (1987) Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation, *Mutat. Res.*, 186: 43-72
- Walker G.C. (1985) Inducible DNA repair systems, *Ann. Rev. Biochem.* 54: 425-457
- Wang Z.Q., S. Saigusa and M.S. Sasaki (1991) Adaptive response to chromosomal damage in in cultured human lymphocytes primed with low doses of X-rays, *mutat. Res.*, 246: 179-186
- Ward J.F. (1985) Biochemistry of DNA lesions, *Radiat. Res.*, 104: S103-S111
- Ward J.F., W.F. Blakeley and E.I. Jones (1985) Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radical from hydrogen peroxide, *Radiat. Res.*, 103: 383-392
- Weisiger R.A. and I. Fridovich (1973) Superoxide dismutase: Organelle specificity, *J.Biol. Chem.*, 248: 3582-3592

- Wendel A. and P. Cikryt (1980) The level and half-life of glutathione in human plasma, *FEBS Lett.*, 120: 209-211
- Wiencke J.K., V. Afzal, G. Olivieri and S. Wolff (1986) Evidence that the [<sup>3</sup>H]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
- Willson R.L. (1988) in *Zinc in Human Biology* (Mills, C.F. ed.), pp. 147-173, Springer-Verlag, Berlin
- Wojcik A. and H. Tuschl (1990) Indications of an adaptive response in C57BL mice pre-exposed in vivo to low doses of ionizing radiation, *Mutat. Res.*, 243: 67-73
- Wojcik A., K. Bonk, W.U. Müller, C. Streffer, U. Weissenborn and G. Obe (1992) Absence of adaptive response to low doses of X-rays in preimplantation embryos and spleen lymphocytes of an inbred mouse strain as compared to human peripheral lymphocytes: a cytogenetic study, *Int. J. Radiat. Biol.*, 62(2): 177-186
- Wolff S. (1992) Is radiation all bad? The search for adaptation, *Radiat. Res.*, 131: 117-123
- Wolff S., V. Afzal, J.K. Wiencke, G. Olivieri and A. Michaeli (1988) Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiations 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: 39-48
- Wolff S., J.K. Wiencke, V. Afzal, J. Youngblom and F. Cortés (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. In Baverstock, K.F. and Stather, J.W. (eds), *Low Dose Radiation, Biological Bases of Risk Assessment*. Taylor and Francis, London pp. 446-454
- Wright C.E., H.H. Tallan, Y.Y. Lin and G.E. Gaull (1986) Tayrine: Biological update, *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 427-453
- Youngblom J.H., J.K. Wiencke and S. Wolff, (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



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Física

D. Inmaculada Dominguez Garcia

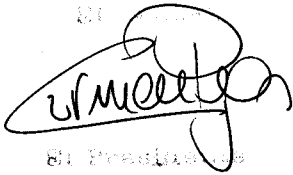
Respuesta adaptativa y papel de enzimas  
antioxidantes en la proteccion frente al daino  
causado por radiacion ionizante en estulos eucariotes.  
Apto "cum laude"

por unanimidad

10


mayo

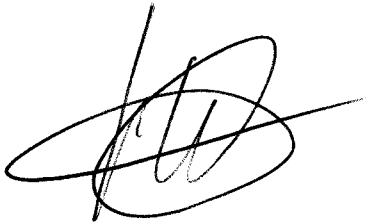
93

  
El Presidente

  
El Secretario

  
El Decano

J. F. Lillo  






## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Felipe Cortés, Director de esta Tesis el haber mostrado en todo momento gran interés y haber estado siempre dispuesto al diálogo y a la discusión científica, a Paula por ser capaz de escucharme incluso a altas de la madrugada, a Joaquín Piñero por las fotos y el ordenador. La colaboración de Juan Carlos Mateo fue indispensable para llevar a cabo las irradiaciones en el Centro de Oncología "Duques del Infantado", el cual facilitó los medios necesarios para ello. Mi familia me apoyó siempre y me dio los ánimos suficientes para acabarla, en especial Juanqui. También quiero dar las gracias a Björn Sandström por la técnica de precipitación de ADN y la estancia en Suecia, a D. Eduardo Tello Porras, Director del Departamento de Biología Celular, a D. Gregorio García Herdugo y a toda la gente que de alguna manera me ha ayudado.

Este trabajo se ha realizado por la concesión de una beca de la Junta de Andalucía en colaboración con la Caja de Ahorros de Granada para la formación del personal investigador.