

329
26J



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA
INDUCIDA POR MITOMICINA C IN VITRO.

M.E.P. - ZARAGOZA - U.N.A.M.



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

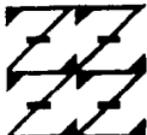
B I O L O G O

R E S E N T A :

DIVISION DE CIENCIAS
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN DE BIOLÓGIA
CAMPO 2

TERESITA DEL NIÑO JESUS MORALES SANCHEZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EDUARDO MADRIGAL BUJAJDAR

México, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A MI QUERIDA HERMANA LUPITA

Por todo el apoyo moral y económico que me presto durante todo el transcurso de mi Carrera Profesional. y principalmente por todo su amor y comprensión.

A MIS PAPAS:FRISCILIANO Y MARGARITA

Por haberme dado la vida, amor, apoyo y la mejor de las herencias: MI EDUCACION.

**A MI ESPOSO ENRIQUE Y A MIS QUERIDOS HIJOS-
KAROL ANGELICA Y LUIS ENRIQUE**

Por haberme dado el amor y el aliciente principal para poder realizarme profesionalmente.

**A MIS HERMANOS:ARTURO-JUAN-ROSA
PATRICIO-ALICIA-JORGE-LULU
Y ELENA.**

Por su gran motivación apoyó, consejos y entusiasmo para poder lograr una de mis metas.

**A MI DIRECTOR DE TESIS:
DR. EDUARDO MADRIGAL BUJAI DAR**

Por haberme guiado con seguridad y dedicación-
hasta lograr este trabajo profesional.

**A MI CO-DIRECTORA:
QBP. MARTHA CASSANI**

Por darme los conocimientos necesarios para la
realización del trabajo ,por dedicarme su tiempo
y por haberme asesorado en todos los aspectos.

**A LA MAESTRA EN CIENCIAS
SANDRA DIAZ BARRIGA**

Por su gran apoyo intelectual y haberme guiado
para la culminación de este trabajo profesional.

**A LA MAESTRA:
LOURDES CASTILLO GRANADOS**

Por su ayuda y motivación y principalmente por-
haber creído en mi.

A MIS COMPANERAS NORMA Y SILVIA

Que con gran entusiasmo me brindaron su apoyo,
sus valiosos consejos y agradable compañía.

AL JURADO ENRIQUE-LETICIA-CARLOS LUCILA.

Por haberme dedicado su tiempo y sus valiosas
sugerencias.

A TODOS AQUELLOS:MAESTROS Y COMPANEROS.

Que de alguna u otra foma contribuyeron a mi for-
mación profesional.

GRACIAS.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
LABORATORIO DE GENETICA DEL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA DE LA
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL,
BAJO LA DIRECCION DEL DR. EDUARDO
MADRIGAL BUJAJIDAR Y LA COASESORA LA
QBP. MARTHA CASSANI GALINDO.

RESUMEN

R E S U M E N

La Mitomicina C (MMC) es un antibiótico que se considera un derivado del uretano y la etilenamina. posee propiedades antibacterianas y antitumorales. se le considera un potente inductor de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) y un prototipo de agente alquilante biorreductivo para uso clínico.

Debido a que han surgido una serie de investigaciones acerca de la respuesta adaptativa (R.A) pero la mayoría de estas se han realizado con radiaciones estimandose el daño celular por medio de aberraciones cromosómicas ya sea en sistemas tanto in vivo como in vitro.

El presente trabajo se realizó en un sistema in vitro utilizando cultivos de linfocitos humanos estimulados con las siguientes dosis adaptativas de MMC: 5, 10 y 20 ng/ml y tratadas con 200 y 400 ng/ml-y dos diferentes tiempos de contacto de 4 y 1 hr respectivamente del mismo agente, evaluando posteriormente tanto el daño celular por medio del número de ICH, como el potencial genotóxico del antibiótico.

Los resultados mostrarón que no hubo diferencias estadísticamente significativas para las dosis de 5 y 10 ng/ml comparadas con sus testigos (dosis adaptativas más dosis de desafío) ni para la dosis de reto de 200 ng/ml para ambos donadores y la dosis de reto de 400 ng/ml.

Se concluye que la MMC es un agente capaz de inducir R.A y eficazmente a dosis de 5 y 10 ng/ml sin tener ninguna influencia la concentración y tiempo de contacto del antibiótico.

CONTENIDO

C O N T E N I D O

I. INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES Y MECANISMOS DE LA ACCION- DE LA MITOMICINA C.....	1
1.2. ABERRACIONES CROMOSOMICAS.....	5
1.3. INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS.....	7
1.4. RESPUESTA ADAPTATIVA	10

II. OBJETIVOS.....	15
--------------------	----

III.HIPOTESIS.....	16
--------------------	----

IV .MATERIALES Y METODOS

4.1 CURVA DOSIS RESPUESTA.....	17
4.2 RESPUESTA ADAPTATIVA INDUCIDA CON MITOMICINA C.....	20

V.RESULTADOS.....	26
-------------------	----

VI.DISCUSION.....	36
-------------------	----

VII.CONCLUSIONES.....	41
-----------------------	----

VIII.BIBLIOGRAFIA.....	42
------------------------	----

INTRODUCCION

MITOMICINA C (MMC)

El antibiótico fué inicialmente aislado de Streptomyces caespitosus en 1956 y se considera como un derivado del uretano y la etilenamina :Presenta una estructura policiclica con grupos altamente reactivos la cual se encuentra esquematizada en la figura 1.Posee propiedades antitumorales y antibacterianas debido a su interacción con el DNA, a la vez que actúa como agente alquilante bifuncional. La MMC inhibe selectivamente la síntesis de DNA,pero no afecta la síntesis de RNA y proteínas Reich y col.citado por (62) propusieron que la MMC actúa a través de la escisión de fibras de DNA y de ese modo previene la replicación. La despolimerización de DNA y la acumulación de fragmentos ácido-solubles implica al sistema de reparación de DNA polimerasa como posible blanco de la actividad de la mitomicina C (62).

Posteriormente se confirmó que este antibiótico es un inhibidor específico de la síntesis de DNA y se propuso que su acción química se debe a sus propiedades alquilantes. Iyer y Szibalsky sugirieron que la acción primaria de la mitomicina C es por entrecruzamiento entre el antibiótico y la molécula de DNA,produciendo posteriormente como acción secundaria la degradación del DNA(18).Sin embargo,el entrecruzamiento solamente se realiza después de la reducción de la molécula de MMC a derivados de hidroquinona-reductasa dependiente de NADPH(fig.2) (55).

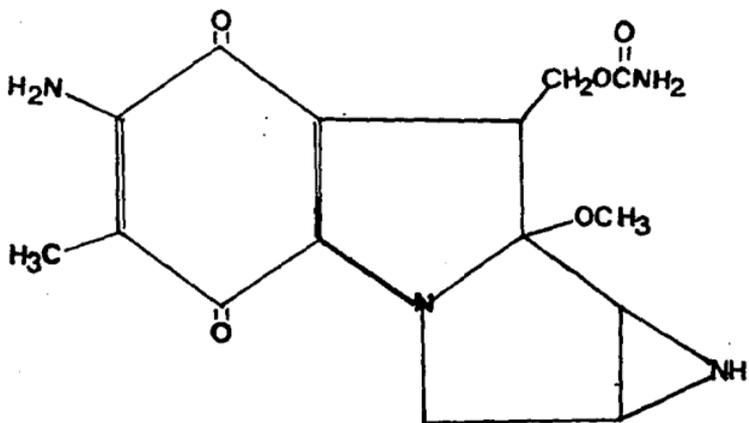


FIG:1.- Estructura química de la Mitomicina C.
(tomado de Stephan).

La activación reductiva del antibiótico MMC produce intermedios reactivos con la capacidad para producir entrecruzamientos entre hebras complementarias del DNA; tales entrecruzamientos se consideran las lesiones responsables de la citotoxicidad producida por dicho agente.

En tejidos humanos sólo una tercera parte del DNA muestra entrecruzamiento con el antibiótico(37). La formación de dicha alteración se correlaciona con la muerte celular debido a la dificultad para la separación de las fibras hermanas del DNA durante la replicación.

En resumen, la toxicidad puede explicarse por la formación de un agente alquilante bifuncional totalmente reducido que se entrecruza con el DNA, como se muestra en la fig.2. En presencia de oxígeno, el radical semiquinona formado después de la reducción de un electrón, puede transferir este electrón al oxígeno para generar el anión superóxido y regenerar la quinona oxidada .

La detección de superóxido y radicales hidróxilo después de la reducción de MMC en presencia de oxígeno coincide con el mecanismo de reacción indicada.

Una variedad de estudios han demostrado que citocromo C reductasa NADPH-dependiente y la xantina oxidada son capaces de activar a MMC en presencia o ausencia de oxígeno.

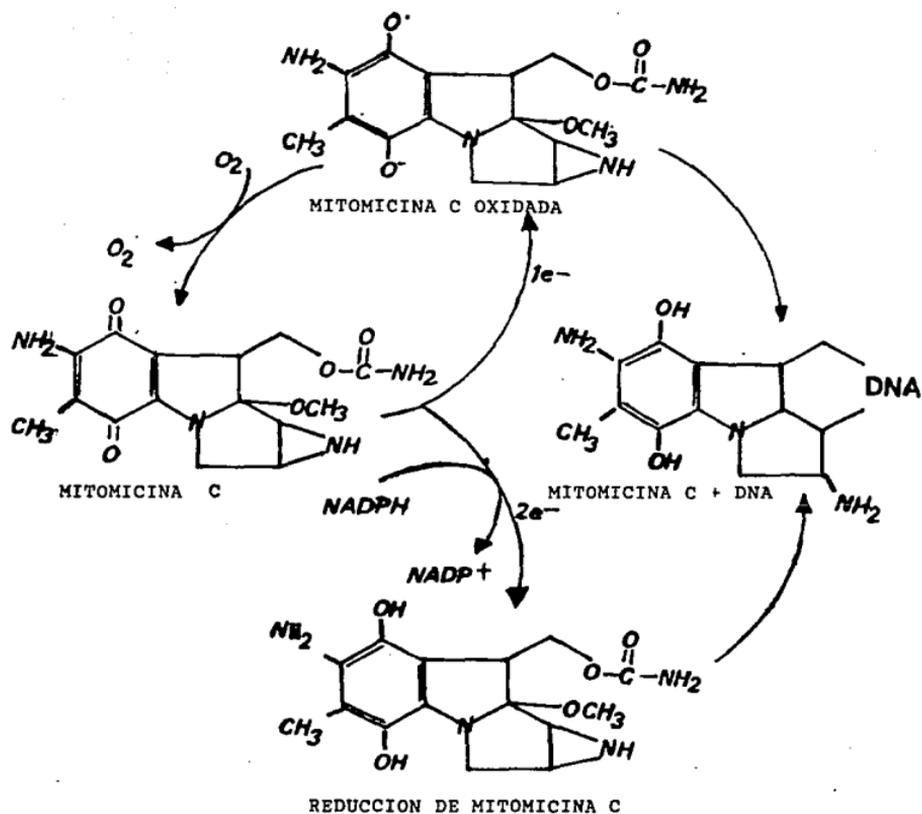


Fig.2.Vías de Bioactivación de la Mitomicina C.
(Tomado de Stephan 66).

EFFECTOS CITOGENETICOS PRODUCIDOS POR LA MMC

1.- Aberraciones cromosómicas.

Las aberraciones cromosómicas son alteraciones en la estructura o en el número de cromosomas .y son inducidas por diversos agentes como los mutágenos físicos (ejemplo, las radiaciones ionizantes) y químicos (ejemplo, los agentes alquilantes). El tipo de aberración dependerá de la etapa del ciclo celular en que incida el mutágeno así como del tipo de agente mutagénico empleado .Las radiaciones ionizantes pueden inducir rupturas, tanto en la cadena como en las bases del DNA y son efectivas en todas las etapas del ciclo celular; sin embargo, si el efecto se produce en la fase G1 se presentan aberraciones de tipo cromosómico y si el daño es en la fase G2 las aberraciones son de tipo cromatídico, en cambio, con los mutágenos químicos (que en general son efectuados en la fase S), la respuesta es diferente, formándose principalmente aberraciones cromatídicas sin importar la fase del ciclo celular en que se produce el daño(S,G).

Existen numerosas evidencias que confirman la genotoxicidad de la MMC, como son estudios en Vicia faba, donde se han observado diversos tipos de aberraciones cromosómicas. En este sistema la frecuencia de aberraciones no se afecta por anoxia, cambios de pH o temperatura (30,31,77). El tratamiento de leucocitos humanos en la fase G0,G1 o S también ha producido aberraciones cromosómicas similares a las detectadas en Vicia-faba .El rompimiento de cromosomas causado por la MMC se ha atribuido a la unión de fibras complementarias de DNA por enlaces covalentes (31) En Vicia faba las aberraciones cromosómicas inducidas por MMC se localizan comúnmente en las regiones heterocromáticas, con una frecuencia máxima de rompimiento en los cromosomas submetacéntricos.

En linfocitos humanos se demostró que la MMC induce preferencialmente brechas, rupturas y rearrreglos en las constricciones secundarias de los cromosomas 1,16 y particularmente en el cromosoma 9 (8,35). Los resultados anteriores indican que la heterocomatina es un sitio esencial para la producción de aberraciones cromatídicas inducidas por MMC y coincide con la observación de que los rompimientos se localizan en regiones ricas en guanina-citosina (G-C). Existe además un estudio comparativo entre varios laboratorios que trabajaron con cromosomas de ratón, el cual reveló que el 80% de todas las aberraciones se localizan en las regiones heterocromatídicas (36,64).

Las configuraciones cuadrirradiales constituyen un buen modelo para el estudio de aberraciones cromosómicas inducidas por la MMC. En este modelo la distribución de los sitios donde se presentan las aberraciones se ha correlacionado con los patrones de bandas; así Morad y col. encontraron que los intercambios coinciden con las bandas C en preraciones con quinacrina y determinaron que las constricciones secundarias de los cromosomas 1,9 y 16 son los más involucrados (36,).

2.- Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)

El intercambio de (ICH) refleja un intercambio de segmentos simétricos y equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma. La diferenciación de ICH se realizó inicialmente por Taylor en 1958, quien uso la incorporación de timidina tritiada (Hdt3) seguida por autorradiografía para demostrar la distribución semiconservativa del DNA entre las cromátidas hermanas(22,69).

Actualmente se han desarrollado diversos métodos para observar el ICH, que básicamente consisten en incorporar bromodesoxiuridina (BrdU) en lugar de la timidina en el DNA, al permitir dos ciclos de replicación sucesivos y finalmente aplicar una tinción fluorescente o bien usar una tinción permanente que incluye un colorante fluorescente y Giemsa. Kato y Perry citado por (27) determinaron que el ICH puede ser inducido con alta eficiencia por agentes alquilantes y también por ciertos colorantes unidos al DNA (Tabla 1). El factor común de éstos y otros agentes que elevan la frecuencia del ICH es una acción directa sobre el DNA, ya sea por alteraciones en la replicación o en la estructura, donde presumiblemente se involucra la ruptura y reunión del DNA; sin embargo, se conoce poco acerca de la base molecular de este proceso(9). Por lo anteriormente mencionado los ICH se consideran indicadores muy sensibles del daño producido en los cromosomas por agentes químicos.

TABLA 1. Ejemplos de mutagénos que inducen Intercambio de Cromátidas Hermanas(ICH)

Tipo de agentes	Ejemplos
Alquilantes	Etilmetanosulfato
	Mitomicina C (MMC)
Colorantes	Daunorobicina
Bases análogas	Bromodesoxiuridina
Irradiación	Brdu-luz ultravioleta o
	Timidina tritiada(Hdt3)
Virus	SV-40
Miscelaneos	Aceltaldehido

Tomado de Moquet (35)

En relación a la MMC se ha especulado que la alquilación en la posición orto 6 de la guanina puede ser una de las principales lesiones y también se ha sugerido la hipótesis alterna de que el entrecruzamiento DNA-proteínas puede ser la lesión fundamental .

De acuerdo a lo anterior, en células de pacientes con xeroderma pigmentosum se observa la misma respuesta que en células normales en cuanto a citotoxicidad y aberraciones cromosómicas, mientras que en células de pacientes con anemia de Fanconi son más susceptibles a ambos eventos, debido a que son deficientes en la reparación de entrecruzamiento DNA-DNA causado por MMC(14,17,45).

Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cuál se producen los ICH se han realizado numerosos estudios tanto "in vivo " como "in vitro", con una gran variedad de sustancias y en diferentes condiciones, cuyos resultados indican que el ICH es un eficiente indicador de daño genotóxico. Por lo que se refiere en particular a la MMC, independientemente de las condiciones de cultivo los ICH son más frecuentes que las aberraciones cromosómicas en un intervalo que varía de 0.7 a 200 veces (25,26,35,46).

3.- Respuesta Adaptativa (RA)

Se conoce como (RA) a la resistencia celular creada contra diversos agentes mutagénicos .La inducción de la respuesta ocurre cuando las células se exponen a concentraciones bajas de los agentes que lesionan al DNA, lo que provoca mayor actividad en un sistema de reparación y da como consecuencia una disminución en el daño al DNA, cuando las células se someten posteriormente a concentraciones-elevadas de los mismos o distintos agentes(Tabla No .2) (43,53).

El primer sistema en el que se observó este tipo de respuesta fue en mutantes de E. coli por Samsen y Cairns1977, al observar que dichos mutantes se acumulaban durante el crecimiento continuo de bacterias en presencia de bajas concentraciones de N-metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG). La reversión hacia histidina sólo se induce durante la primera hora del cultivo en un medio que contenía 1g de MNNG -y su frecuencia no se incrementó durante el resto del experimento el cuál se prolonga de 4 a 7 días. También se observó que esta resistencia no se presentaba cuando la síntesis de proteínas era inhibida por el clorafenicol por lo que al principio se propuso que una proteína era la responsable de la reparación del DNA cuando se producían lesiones mutagénicas.

Otro estudio en microorganismos mostró que una cepa de Vibrio - cholerae expuesta a dosis bajas de furazolidona por un período de entre 5 y 60 minutos fue 100% más resistente al efecto letal de una dosis de reto. o sea una dosis subsecuente casi 100 veces mayor, en relación a cultivos control no expuestos a las dosis adaptativas. Estas investigaciones también pusieron de manifiesto que la Respuesta Adaptativa es dependiente al tiempo de exposición pues la máxima respuesta se observó entre los 15 y 30 minutos (57)

TABLA 2**ANTECEDENTES ACERCA DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA**

TIPO CELULAR	AGENTE ESTIMULANTE	AGENTE DE RETO	OBSERVACION	RESULTADOS
1.- E. coli	MNNG	MNNG	MUTACIONES	POSITIVO
2.- Vibrio cholera	FURAZOLIDINA	FURAZOLIDINA	MUTACIONES	POSITIVO
3.- Linfocitos humanos	RAYOS X	RAYOS X	ABERRACIONES CROMOSOMICAS	POSITIVO
4.- Linfocitos humanos	BLEOMICINA	BLEOMICINA RAYOS X	ABERRACIONES CROMOSOMICAS	POSITIVO POSITIVO
5.- Linfocitos humanos	TIMIDINA TRITIADA	RAYOS X	ABERRACIONES CROMOSOMICAS	POSITIVO NEGATIVO HETEROGENICO (25% POSITIVO)
6.- FIBROBLASTO	MNNG	MNU	MICRONUCLEOS	NEGATIVO
7.- Linfocitos humanos	MNNG	MNNG	ICH	POSITIVO
		MMC		NEGATIVO
		ENU		NEGATIVO
8.- Linfocitos humanos	RAYOS X	MMC	ICH	NEGATIVO

Dentro de este mismo contexto se ha logrado determinar además de las bacterias algunas otras especies presentan respuesta adaptativa como en el caso también del virus SV-40 ,en el cuál se ha econtrado protección contra la toxicidad y mutagenicidad de agentes metilantes. Estudios posteriores han mostrado la presencia de un sistema similar en células de mamíferos.(2)

En 1984 Olivieri y col.(43), fueron los primeros en demostrar que un pretratamiento crónico de linfocitos humanos con timidina tritiada hace a las células menos susceptibles a la inducción de aberraciones cromosómicas por subsecuente dosis de desafío de rayos X. Resultados similares fueron encontrados por Sankaranarayana y col.(53) y Vijayalaxmi y Burkart(70), utilizando los mismos agentes soló variando las condiciones de adaptación y desafío.

Samson y Schwartz también demostraron que un pretratamiento con MNNG producía una disminución en la frecuencia de ICH así como también reducía la mortalidad celular como resultado de la acción posterior de los agentes metilantes MNNG o N-metil-N-nitrosurea (MNU) sobre células ovaricas en hamster chino.

Sobre un sistema de prueba "in vitro" principalmente empleando linfocitos humanos se ha determinado que la RA hacia las radiaciones ionizantes puede inducirse por dosis muy bajas de rayos X (0.01) durante la fase S del ciclo celular aunque al parecer esta misma respuesta se presenta cuando las células estan en otras etapas del ciclo celular.

No obstante, cuando los linfocitos fueron irradiados con una dosis de 0.01 a 0.05 Gy de rayos X antes de ser estimulados por fitohemaglutinina en G0 seguida de una dosis de reto de 1.5 Gy (150 rad) no presentaron la respuesta, en tanto que las células en G1 sometidas a las mismas dosis si la presentarán manifestándose como una disminución de los rompimientos cromatídicos. También se ha determinado que la respuesta adaptativa persiste por lo menos tres ciclos celulares después de su estimulación en cultivos de 66 a 72 hrs. con un incremento en metafases de 3a división (13,27,59).

Otro indicio relacionado con la respuesta adaptativa que es necesario resaltar es que la población humana parece ser heterogénea a dicho fenómeno, tanto en relación a las radiaciones ionizantes como a los agentes alquilantes y se ha determinado genéticamente (1,4,20,37).

Otro aspecto del tema es que la RA no se presenta únicamente al emplear la misma substancia como dosis adaptativa y de reto, sino que puede producirse empleando distintos agentes como por ejemplo en el caso de linfocitos humanos adaptados a dosis bajas de rayos X los cuáles muestran menos rompimientos cuando son tratadas con Bleomicina (72). También en ratones de la cepa C57BL inicialmente irradiados con 5 cGy día de rayos - X (dosis adaptativa), los linfocitos del bazo periódicamente extraídos (1,3,7 19 y 26 días) y tratados con MMC a una concentración de 10^{-7} M, los resultados mostraron una disminución en la producción del ICH comparado con los testigos (72). Relacionado con el experimento anterior tratamientos *in vitro* efectuados por Woole y col, producen una resistencia cruzada entre MMC y la luz ultravioleta presentándose una disminución en las lesiones cromatídicas e isocromatídicas.

Debido a que la Mitomicina C es el inductor más potente de Intercambio de cromátidas Hermanas (ICH) tanto in vivo como in vitro es por esto que seleccionó esta substancia

El principal interés de haber realizado este trabajo fue que recientemente ha sido observada una resistencia celular a diversos agentes antineoplásicos, la cuál crea problemas en la práctica clínica en el tratamiento de diversas neoplasias.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1.- Establecer la genotoxicidad de la mitomicina C en cultivos de linfocitos humanos mediante el análisis de la frecuencia del intercambio de cromátidas hermanas (ICH).
- 2.- Determinar la importancia de las dosis estimulantes y la de reto.
- 3.- Determinar si la Mitomicina C es capaz de inducir una respuesta adaptativa en linfocitos humanos, considerando como parámetro de evaluación el intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

HIPOTESIS

HIPOTESIS

Al exponer cultivos de linfocitos humanos a dosis bajas de Mitomicina C (dosis de adaptación y posteriormente a dosis mayores (dosis de reto), se observará una disminución en el daño celular (frecuencia de ICH) en comparación con cultivos de linfocitos que solo fueron expuestos a la dosis de reto.

Este fenómeno probablemente se establezca debido a la estimulación de mecanismos de reparación del DNA.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL Y METODOS

Curva Dosis -Respuesta

Cultivo de linfocitos tratados in vitro con cinco dosis de MMC..

I. Siembra:

- 1.- Se obtuvieron 10 ml. de sangre venosa usando una jeringa heparinizada, de un donador clinicamente sano del sexo femenino.
- 2.- Se preparó la cantidad necesaria de frascos de cultivo estériles cada uno con las siguientes sustancias:
 - a) 0.3 ml de solución estéril de bicarbonato de sodio al 4% por cada 10 ml de medio cultivo.
 - b) 0.5 ml de fitohemaglutinina.
 - c) 0.5 ml de sangre total.
 - d) 8.5 ml de medio ml de medio Mc. Coy 5A.
- 3.- A las 24 hrs. de cultivo a 37° C se agregó 45ul de bromodesoxiuridina y se volvió a incubar.
- 4.- A las 48 hrs se agregó MMC en concentraciones de 50,75,100,150 y 300 ng/ml y se volvió a incubar por 24 hrs. a 37° C.
- 5.- A las 23 hrs de incubación se agregó 0.25 ml de colchicina y se volvió a incubar 1 hr.

II. Cosecha:

- 1.- Se pasó el contenido de los frascos de cultivo a tubos de centrifuga marcados.
- 2.- Se centrifugó 10' a 1200 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en KCL 0.075 M a 37°C.
- 3.- Se incubo 20' a 37°C.
- 4.- Se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular.
- 5.- Se hizo la fijación y se agregó una mezcla recién preparada de metanol-ácido acético 3:1.
- 6.- Se dejó reposar 15', se centrifugó y se elimino el sobrenadante.

III. Preparación de laminillas

- 1.- Se desengrasaron los portaobjetos que permanecieron en alcohol etílico 96° por lo menos 2 hrs.
- 2.- En el tubo con la suspensión celular se dejo aproximadamente 1 ml de fijador, se resuspendió con pipeta Pasteur y se dejó caer de 2-3gotas sobre el portaobjetos a una distancia aproximada de 20cm.
- 3.- Se secó al aire y se dejó madurar durante dos dias a temperatura ambiente o por dos horas a 60°C.

IV. Tinción:

- 1.- Las laminillas se sumergieron en un vaso de Coplin con colorante de Hoechst 33258 por 40'.
- 2.- Se lavó con agua de la llave y se secó a 60° C por 15'.
- 3.- Se agregó a las laminillas unas gotas de citrato-fosfato pH 7.0 cubriendolas con cubreobjetos y se expusó a la luz negra por 40'.
- 4.- Se lavó con agua de la llave y se secó en la estufa a 60°C por 15'.
- 5.- Las laminillas se sumergieron en un vaso de Coplin conteniendo solución salina-citrato por 20' a 60°C.
- 6.- Se lavo con agua de la llave y se secó a 60°C por 15'.
- 7.- Se tñó con colorantes de Giemsa al 2% en amortiguador de Sorensen a pH 6.8.

V.Observación de laminillas

- 1.- Se observaron 30 mitosis de segunda división por cada dosis para establecer la frecuencia de ICH.
- 2.- Se observaron 1000 células paraderminar el índice mitótico..
- 3.-Se observaron 1000 células de (1a,2a y 3a división) para deter_minar la proliferación celular.

RESPUESTA ADAPTATIVA INDUCIDA CON MITOMICINA C (Fig.3).

Cultivo de linfocitos humanos tratados con tres dosis bajas y una de reto de 200 ng/ml de MMC (Experimento 1).

I.-Siembra :

1.-Se obtuvo 10 ml de sangre venosa usando una jeringa hepari nizada de dos donadores del sexo femenino con edades de 25 y 26 años.

2.-Se preparó la cantidad necesaria de frascos de cultivo estériles, para tener cuatro series de frascos de cultivo.

Cada uno tuvo las siguientes sustancias

- a) 0.3 ml de solución estéril de bicarbonato de sodio al 4% por cada 10 ml de medio de cultivo.
- b) 05 ml de fitohemaglutinina
- c) 05 ml de medio Mc.Coy.5A.

Por cada serie se efectuó una siembra por duplicado, correspondiendo la primera para observar el comportamiento de la respuesta adaptativa la segunda para el testigo de la dosis de reto, la tercera para los testigos de la dosis estimulante y la cuarta para el testigo negativo.

3.- El cultivo en que se observó la Respuesta Adaptativa (RA) tuvo una preincubación de 45 hrs a 37°C, una vez que concluyó este tiempo se adicionaron las dosis adaptativas o estimulantes (5, 10 y 20 ng /ml) y se continuó la incubación a 37°C por 24 hrs.

1.-	P	S	C	B	H
	0	45	69	73	120 h
2.-	P	S	B		H
	0	45	73		120 h
3.-	P		C	B	H
	0		69	73	120 h
4.-	P			B	H
	0			73	120 h
5.-	P	S	C	B	H
	0	45	69	70	117 h
6.-	P	S		B	H
	0	45		70	117 h
7.-	P		C	B	H
	0		69	70	117 h
8.-	P			B	H
	0			70	117 h

FIG. 3. Protocolo seguido en el presente estudio de RESPUESTA ADAPTATIVA.

1 a 4 = Experimento 1 (Dosis estimulante de MMC:5,10 y 20 ng/ml - dosis de desafío : 200 ng/ml por 4 h).

5 a 8 = Experimento 2 (Dosis estimulante de MMC:5,10 y 20 ng/ml - dosis de desafío: 400 ng/ml por 1 h).

P= Fitohemaglutinina S= Dosis estimulante C= Dosis de desafío.

B= Bromodesoxiuridina. H= Cosecha.

4.- Al finalizar este tiempo se adicionó la dosis de reto (200 ng/ml). por cuatro hrs únicamente. A continuación se lavó las células con medio de cultivo a pH 7.0 por dos ocasiones de la siguiente forma:

- a) Se virió el contenido de los frascos de cultivo en tubos con tapón de rosca y se centrifugó 10' a 1500 rpm.
- b) Se quitó el sobrenadante y se agregó 5ml de medio Mc.Coy con Bicarbonato y se agitó para romper el botón celular.
- c) Se centrifugó 10' a 1500 rpm y se eliminó el sobrenadante.

5.- Se resembraron las células en 9ml de medio Mc Coy conteniendo bicarbonato y fitohemaglutinina. Se agregó 45ul de 5-Bromodesoxi uridina (18 ng/ml) y se dejó actuar 48 hrs a 37°C.

6.- Una hora antes de concluir el tiempo de incubación se agregó 0.2 ml de colchicina.

El procedimiento para los testigos fue similar a lo antes descrito con las siguientes excepciones. En el caso del testigo para la dosis de reto se adicionó a los frascos de esta serie únicamente la MMC (200ng/ml) en el caso de los testigos de las dosis adaptativas se agregó únicamente MMC en las dosis estimulantes de 5, 10 y 20 ng/ml, por lo que se refiere al testigo negativo no se adicionó MMC.

II. Cosecha:

1.- Se pasó el contenido de los frascos de cultivo a tubos de centrifuga marcados.

2.- Se centrifugó 10' a 1200 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en KCL 0.075M.

3.-Se incubó 20'a 37°C.

4.-Se centrifugó. se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular.

5.-Se hizo la fijación agregando una mezcla recién preparada de metanol-ácido acético 3:1.

6.-Se dejó reposar 15',se centrifugó y se eliminó el sobrenadante

7.-Se agregó nuevo fijador, se dejó reposar 15',se centrifugó y se eliminó el sobrenadante (se repitió este procedimiento hasta que el sobrenadante quedó claro).

8.-Se agregó nuevo fijador, se resuspendió y se guardó en el refrigerador hasta la preparación de las laminillas.

III. Preparación de laminillas :

1.- Se desengrasaron los portaobjetos en alcohol etílico por lo menos 2 hrs.

2.-En el tubo con la suspensión celular se dejó aproximadamente un ml. de fijador. se resuspendió con pipeta Pasteur y se dejó caer dos gotas sobre el portaobjeto a una distancia aproximada de 20 cm.

3.- Se secó al aire y se dejó madurar las laminillas dos días a temperatura ambiente o dos horas a 60°C.

IV.Tinción:

- 1.- Se sumergieron las laminillas en un vaso de Coplin con colorante de Hoechst 33258 por 40'.
- 2.- Se lavó con agua de la llave y se secó a 60°C por 15'
- 3.- Se agregó a las laminillas unas gotas de buffer citrato-fosfato pH 7.0, se colocó un cubreobjetos y se expuso a la luz negra por 40'
- 4.- Se lavó con agua de la llave y se secó en la estufa a 60°C por 15'
- 5.- Las laminillas se sumergieron en un vaso de Coplin conteniendo una solución salina-citrato por 20 a 60°C.
- 6.- Se lavó con agua de la llave y se secó a 60°C por 15'.
- 7.- Se tiñó con colorante de Giemsa al 25% en amortiguador de Sorensen pH 6.8.

V.Observación de laminillas:

- 1.- Se observarán 30 mitosis de segunda división por dosis para establecer la frecuencia de ICH.
- 2.- Se observarán 1000 células para determinar el índice mitótico
- 3.- Se observarán 1000 células (1a, 2a y 3a división) para determinar la proliferación celular.

Cultivo de linfocitos humanos tratados con tres dosis bajas y una de reto MMC(400 ng/ml). EXPERIMENTO 2.

La única diferencia de este experimento con el anterior, se refiere a que en este caso se utilizó una dosis de reto de 400 ng/ml, con un tiempo de exposición de una hora.

En lo que corresponde a los siguientes pasos se procedió de igual manera que en el experimento 1.

TRATAMIENTO ESTADISTICO

- Se utilizó el análisis de Xi cuadrada para analizar la variación inter- individual para cada dosis de MMC.
- Se aplicó ANOVA (Análisis de Varianza) con clasificación doble para encontrar las diferencias de un experimento con otro.

Los parámetros que se utilizaron fueron:

- Se calculó el Valor esperado =Valor de DA +Valor de DR - Valor del testigo negativo.:

DR=dosis de reto, DA=dosis adaptativa

- Se calculó el índice de replicación (IR), para determinar la duración de la proliferación celular.

$IR = \frac{M1 + 2M2 + 3M3}{100}$ (donde M1, M2, M3) son porcentajes de metafases en primera, segunda y tercera división respectivamente.

- Se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$\% I = \frac{\text{No. de ICH por célula en la presencia de MMC}}{\text{No de ICH por célula en la ausencia de MMC}}$

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- EFECTO DE LA MITOMICINA C (MMC)

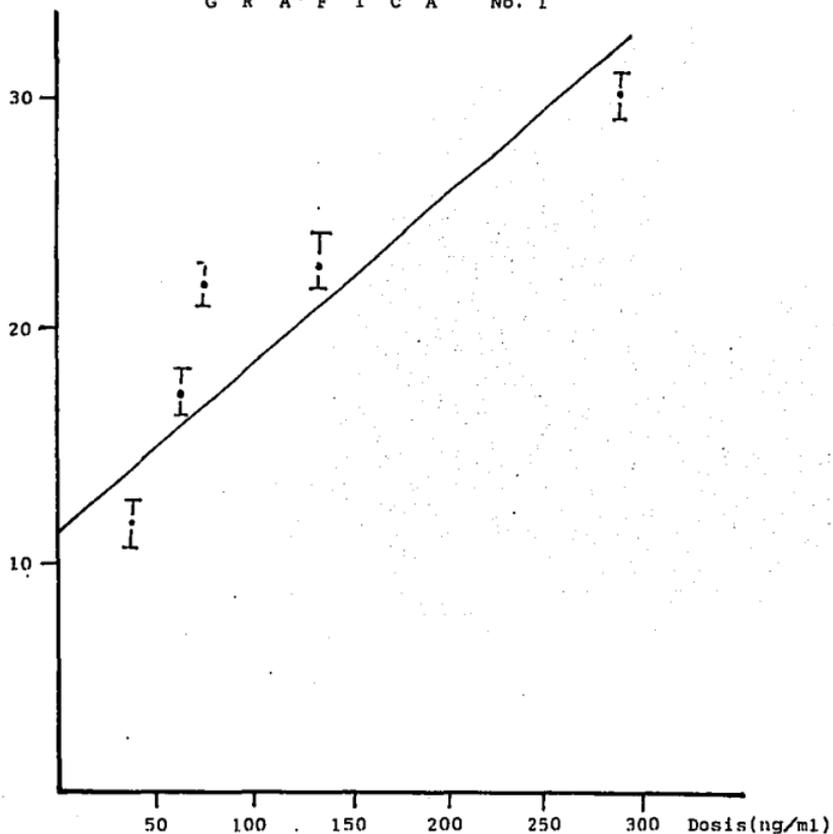
El primer aspecto a analizar fué el comportamiento de la MMC sobre los linfocitos humanos. En la tabla número 3 podemos observar los parámetros utilizados que fueron el intercambio de cromátidas hermanas (ICH), índice mitótico (IM) y el índice de replicación (IR), El cuál nos permite estimar la velocidad de la proliferación celular. También podemos observar que las dosis utilizadas fueron de 0,50,75,100,150 y300 ng/ml .El valor promedio fue de ICH 7.3 ± 0.42 para el testigo negativo y dicho valor aumenta proporcionalmente con el incremento de la dosis .Para 75ng ml de MMC se presentó un incremento de 2.5 veces en relación al testigo negativo y ya para la última dosis (300 ng/ml) la MMC aumentó la frecuencia de ICH más de cuatro veces estableciendose una relación dosis dependiente con la concentración de la MMC.

El análisis de Xi cuadrada fue usada para analizar la variación interindividual para cada dosis de MMC. La correlación probada muestra que las frecuencias de ICH aumentan con una función lineal de las dosis de MMC ($r=0.921, y=0.0742x+11.39$), mostrando una diferencia significativa con relación al testigo negativo a partir de la dosis de 75 ng/ml ($p=0.01$).

En la gráfica 1 se presentan los resultados con un análisis de regresión lineal.

En cuanto al IM se observó una disminución de 1 a 05 indicando que con la dosis de 300 ng/ ml la división celular se abate considerablemente probablemente por la alta toxicidad de la MMC para las células.

G R A F I C A No. 1



FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS PRODUCIDAS POR LA MITOMICINA C EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS

ANALISIS DE REGRESION LINEAL; $Y = 0.0742x + 11.39$
 $r = 0.921$

T A B L A 3

FRECUENCIAS DE INTERCAMBIO DE CRÓMATIDAS HERMANAS (ICH) PRODUCIDAS POR MITOMICINA C (MMC) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS.

DOSIS ng/ml	X ± ee	ICH	IM %	PROLIFERACION CELULAR			IR
				1a	2a	3a	
0	7.3	0.42	1.0	19	60	21	2.02
50	13.0*	0.75	1.4	27	60	13	1.87
75	18,5*	0.59	1.1	37	62	7**	1.82
100	23.8*	1.07	1.2	39	57	4**	1.65
150	23.8*	0.97	1.0	43	53	4**	1.61
300	31.3*	1.37	0.5	43	56	1**	1.56

e.e= Error estandar de la media X

I.M.=Índice Mitotico

IR=Índice de repli-
cación.

* Diferencia significativa con t de student $p=0.01$ vs Testigo negativo.

** Diferencia significativa con Xi cuadrada $p=0.01$ vs Testigo negativo .

Ei análisis de regresión lineal para el I.M; $y=0.0742 + 11.39$

$r=0.921$

Finalmente el valor de IR disminuyó de manera significativa con relación al testigo negativo a partir de la dosis de 75 ng/ml, al mismo tiempo que se presentó un incremento de metafases en 2a división (Tabla 3).

De acuerdo a los resultados anteriores, para el estudio de la RA, se seleccionaron como dosis adaptativas (DA) tres valores por abajo de 50 ng/ml, los cuales fuerón 5, 10 y 20 ng/ml y como dosis de reto (DR) se seleccionaron una dosis por abajo de 300 ng/ml (200 ng/ml) y una por arriba a este valor 400 ng/ml). En la tabla 4 y 5 esta indicado el nivel de RA empleando las dosis anteriores de reto, así como el comportamiento de la RA entre los dos donadores. En la tabla 4 se presentan los resultados para la dosis de reto de 200 ng/ml en ambos donadores.

En la primera columna se presenta la media de ICH para el testigo negativo y testigos de las dosis adaptativas, en la siguiente se encuentran los resultados para el testigo de la dosis de reto y los problemas del donador 1, continuando las columnas en el mismo orden para el donador 2.

Al aplicar ANOVA (Análisis de Varianza) con clasificación doble y T de Student se encontró que sólo hubo diferencias significativas al comparar al testigo negativo con el de reto y al testigo de 20 ng/ml con el tratamiento de 20 ng/ml más la dosis de 200 ng/ml para ambos donadores

Para la dosis de reto de 400 ng/ml sólo hubo diferencia significativa con el testigo negativo y el de reto (Tabla 5), debido a que las frecuencias de ICH de los controles positivos (sólo dosis de reto) tienden a ser altos mientras que las dosis adaptativas no.

TABLA 4

FRECUENCIAS DEL INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS OBSERVADAS EN LA RESPUESTA ADAPTATIVA INDUCIDA CON MITOMICINA C EN EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS

D.E.	DONADOR 1						DONADOR 2									
	ng/ml	ICH	+	e.e.	ng/ml	ICH	+	e.e.	ng/ml	ICH	+	e.e.				
	To	8.26 *		0.52	P200	20.16		0.55	To	6.73 *		0.42	P200	15.06		0.99
	T5	8.60 ^		0.60	P5 + 200	10.39 ^"		0.64	T5	7.83 ^		0.55	P5 + 200	8.2^		0.51
	T10	10.73^"		0.43	P10 + 200	10.9^"		0.63	T10	8.76^"		0.65	P10 + 200	9.26^"		0.66
	T20	11.11*^"		0.40	P20 + 200	14.5^"		0.83	T20	10.53^"		0.61	P20 + 200	11.0^"		0.61

e.e. = error estandar

* Significativo respecto a su problema (P) después de aplicar ANOVA con clasificación doble y T de student.

^ Significativo respecto a Mitomicina c después de aplicar T de student p=0.01

" Significativo respecto a su testigo negativo (To) después de aplicar T de student p=0.01

TABLA 5

**FRECUENCIAS DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS OBSERVADAS
EN LA RESPUESTA ADAPTATIVA INDUCIDA CON MITOMICINA C
EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS**

ng/ml	DONADOR 1					DONADOR 2					
	ICH	+ e.e.	ng/ml	ICH	+ e.e.	ng/ml	ICH	+ e.e.	ng/ml	ICH	+ e.e.
T0	7.8*	0.39	P400	17.86	1.04	T0	7.4*	0.39	P 400	17.83	0.91
T5	8.0^	0.51	P5+400	8.3^"	0.49	T5	7.7^	0.40	P 5 + 400	9.6^"	0.50
T10	11.0^"	0.48	P10+400	12.5^"	0.66	T10	10.4^"	0.81	P10 + 400	10.7^"	0.56
T20	12.3^"	0.45	P20+400	15.6^"	0.78	T20	13.1^"	0.56	P20 + 400	13.9^"	0.72

e.e.= Error estandar

* Significativo respecto a su problema (p) despues de aplicar ANOVA con clasificación doble y T de Student.

^Significativo respecto a Mitomicina C después de aplicar T de Student p=0.01

"Significativo respecto a su testigo negativo (To) después de aplicar T de Student p=0.01

En testigos negativos(solo dosis de adaptación) la frecuencia de ICH fue ligeramente variable para ambos tratamientos y ambos donadores;como en el caso del donador 1 con la dosis de reto de 200 ng/ml que muestra para T0 una $\bar{X}=8.26$ y T5 $\bar{X}=8.6$ de ICH;aunque las diferencias son muy pequeñas en ambos sujetos se sigue conservando en todas las concentraciones utilizadas que la frecuencia de ICH son dependientes de la concentración de MMC.Una disminución de 30 a 50 % de ICH inducida por MMC fue observada en cultivos de ambos sujetos (Tabla 6),en comparación el valor esperado el cual se obtuvo con la sig.formula :

Valor esperado=Valor DA+Valor DR-Valor del testigo negativo.

En la tabla 6 se encuentran resumidos los resultados de ambos tratamientos y donadores,la primera columna indica el tipo de tratamiento,la siguiente la media de ICH observado para cada tratamiento con su error standar,después el valor que se hubiera esperado y la última columna presenta los porcentajes de inhibición que se obtuvieron .

En la misma tabla se pone de manifiesto que al comparar los valores de ICH observados con los esperados,la diferencia para ambos donadores es notoria ya que el valor observado es muy inferior al -esperado.En el ensayo con la dosis de 200 ng/ml la mínima inhibición fue de 36.98% para el donador 1 y para el donador 2 fue de 34.70% y la máxima fue de 49.26% y 42.09% respectivamente, mientras que el ensayo con la dosis de reto de 400 ng/ml el porcentaje de inhibición mínima para el donador 1 fue de 30.22% y para el donador 2 de 30.30% mientras que la máxima fue de 53.8% y 45.90% respectivamente.

Este fenómeno se observa más claramente en las gráficas 2 y 3 en las que se comparan por medio de barras los valores obtenidos para cada grupo de tratamientos.

TABLA 6

RESPUESTA ADAPTATIVA INDUCIDA POR MITOMICINA C INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS OBSERVADAS EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS

	DONADOR 1				DONADOR 2				
	TRATAMIENTO ng/ml	ICH OBSERVADO	e.e.	ICH ESPERADO	INHIBICION %	ICH OBSERVADO	e.e.	ICH ESPERADO	INHIBICION %
33	TESTIGO (0)	8.2 ^b	0.52			6.73	0.92		
	MMC (200)	20.1 ^b	0.55			15.06	0.99		
	MMC.DA(5)	8.1 ^a	0.60			7.83 ^a	0.55		
	MMC.DA(10)	10.73 ^{a,b}	0.43			8.76 ^{a,b}	0.65		
	MMC.DA(20)	11.11 ^{a,b}	0.40			10.53 ^{a,b}	0.61		
	MMC.DA + DR (5 + 200)	10.39 ^{a,b}	0.64	20.50	49.26	8.2 ^a	0.51	14.16	42.09
	MMC.DA + DR(10 + 200)	10.99 ^{a,b}	0.63	22.63	51.43	9.26 ^{a,b}	0.66	15.09	38.63
	MMC.DA + DR(20 + 200)	14.5 ^{a,b}	0.83	23.01	36.98	11.0 ^{a,b}	0.61	16.86	34.70
	TESTIGO(0)	7.8	0.39			7.43	0.39		
	MMC (400)	17.8 ^b	1.04			17.83	0.91		
	MMC.DA(5)	8.0 ^a	0.51			7.73 ^{a,b}	0.40		
	MMC.DA(10)	11.0 ^{a,b}	0.48			10.46 ^{a,b}	0.81		
	MMC.DA(20)	12.34 ^{a,b}	0.45			13.1 ^{a,b}	0.56		
	MMC.DA + DR(5 + 400)	8.33 ^a	0.49	18.06	53.8	9.6 ^{a,b}	0.50	17.1	43.27
	MMC.DA + DR(10 + 400)	12.53 ^{a,b}	0.66	21.06	40.5	10.76 ^{a,b}	0.56	19.83	45.90
MMC.DA + DR (20 + 400)	15.63 ^{a,b}	0.78	22.40	30.22	13.96 ^{a,b}	0.72	20.03	30.30	

DA= DOSIS DE ADAPTACION

DR= DOSIS DE RETO

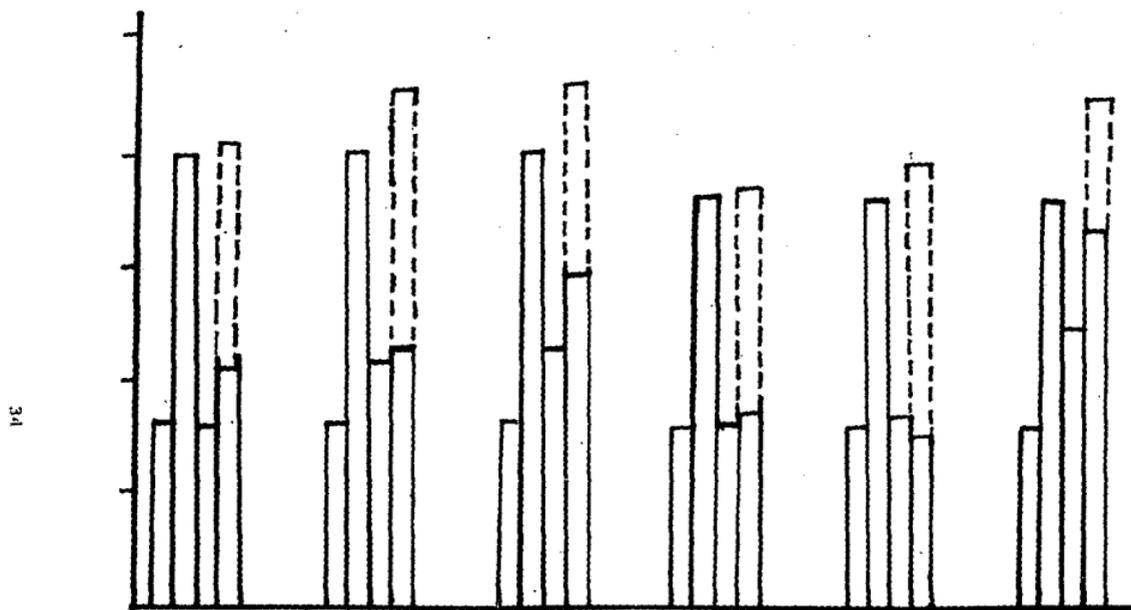
e.e.= ERROR ESTANDAR

VALOR DE ICH ESPERADO= VALOR OBTENIDO CON LA DA + VALOR OBTENIDO CON LA DR - VALOR DEL TESTIGO

a- SIGNIFICATIVO RESPECTO A MITOMICINA C

b- SIGNIFICATIVO RESPECTO A SU TESTIGO

GRAFICA No. 2



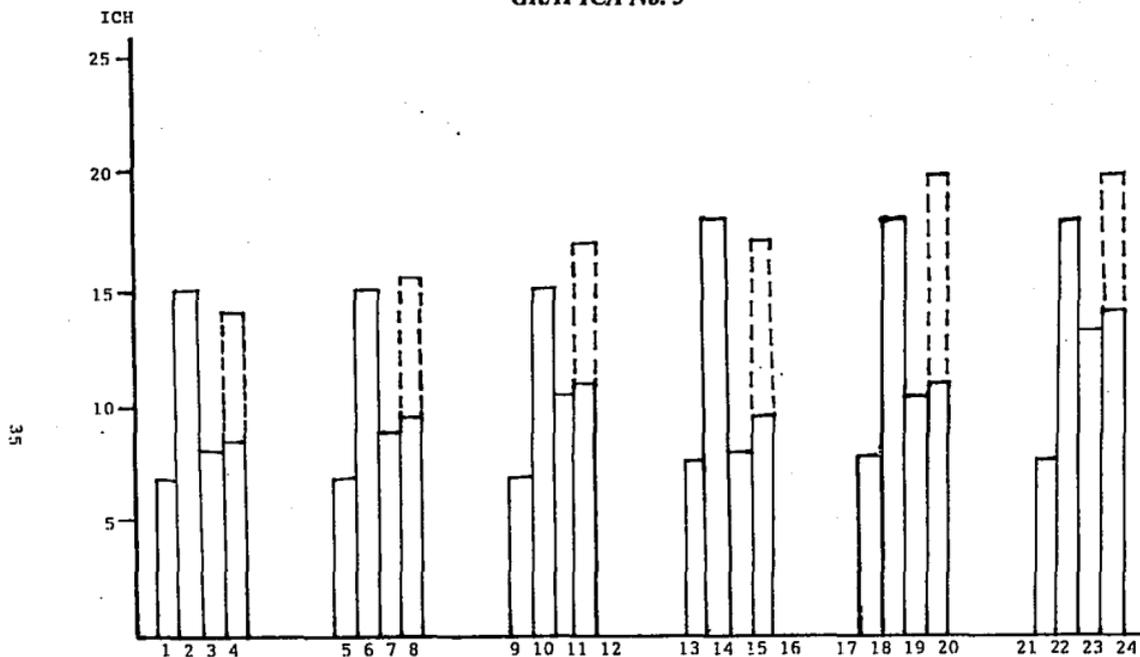
Respuesta adaptativa producida por la mitomicina C. Intercambio de cromátidas hermanas en el donador 1.

ICH OBSERVADO

ICH ESPERADO

1, 2, 3, 4=0, 200, 5, 5+200, 5, 6, 7, 8=0, 200, 10, 10+200, 9, 10, 11. 12=0, 200, 20, 20+200, 13, 14, 15, 16=0, 400, 5, 5+400, 17, 18, 19, 20=0, 400, 10, 10+400, 21, 22, 23, 24=0, 400, 20, 20+400.

GRAFICA No. 3



Respuesta adaptativa producida por la mitomicina C. Intercambio de cromátidas hermanas en el donador 2.

———— ICH OBSERVADO

----- ICH ESPERADO

1. 2, 3, 4=0, 200, 5. 5+200, 5, 6, 7, 8=0, 200, 10, 10+200, 9, 10, 11, 12=0, 200, 20, 20+200, 13, 14, 15, 16=0, 400, 5, 5+400, 17, 18, 19, 20=0, 400, 10, 10+400, 21, 22, 23, 24=0, 400, 20, 20+400.

DISCUSSION

DISCUSION

Recientemente han surgido una serie de investigaciones para ver si es posible inducir un mecanismo de reparación y determinar el tipo de lesiones clastogénicas que pudiera afectar. La mayoría de estas se han realizado utilizando como agentes estimulante la radiación y estiman el daño celular por medio de aberraciones cromosómicas ya sea en bacterias, plantas, linfocitos o fibroblastos humanos. Este trabajo ha utilizado el mutagénico químico MMC para evaluar el potencial de este antibiótico como inductor de RA evaluandose el daño celular por medio del ICH que se considera un indicador extremadamente sensible de cromosomas dañados (69).

Los resultados mostrados en las tablas 4 y 5 demuestran la capacidad de los linfocitos humanos para inducir un mecanismo de reparación previa exposición de MMC y posterior desafío a dosis mayores del antibiótico con lo que se demuestra que se llevo a cabo el proceso denominado Respuesta Adaptativa(RA), consistente en que se presentan diferencias no muy grandes en el número de ICH antes y después del tratamiento.

Efectos similares fueron observados por Samson y Cairns en 1970 en cultivos de *E. coli*, que fueron expuestos a dosis bajas de MNNG y desafiadas con una dosis mayor de agentes alquilantes encontrandose una marcada diferencia entre los efectos letal y mutagénico en células adaptadas comparados con los controles no adaptados(53).

El mismo efecto se ha observado en linfocitos humanos y algunas bacterias estimuladas con radiaciones de bajo nivel y posteriormente desafiados con dosis mayores del mismo o diferente agente estimulante en los que se ha obtenido menor frecuencia de aberraciones que las esperadas (4,20,54,59). En este trabajo los resultados de RA son similares en ambos donadores y ambos tratamientos aunque los valores fueron significativamente diferentes. es decir, que aunque se manejaron las mismas condiciones de cultivo y tratamientos los números de ICH son variables debido a que se ha demostrado que existe una heterogeneidad entre individuos, reflejo de una diferente sensibilidad al antibiótico y también a que dos tratamientos no pueden tener la misma cantidad de células (4,37,54).

La mejor respuesta RA se obtuvo con la dosis de desafío de 400 ng/ml y una hora de contacto con la MMC, ya que para ambos donadores no hubo diferencia significativa con ninguna de las tres dosis estimulantes más las dosis de desafío, efecto sí se observó con la dosis de 200 ng/ml en la cual sí hubo diferencia significativa con la dosis estimulante de 20 ng/ml para ambos donadores, por lo cual podemos generalizar diciendo que para ambos tratamientos y donadores si fue posible inducir una RA, independiente - mente del tiempo y concentración de la MMC con los linfocitos obteniendose la mejor RA se obtuvo con las dosis estimulantes de 5 y 10- ng/ml .

La esencia de este fenómeno es una preexposición preeliminar con una dosis baja prácticamente no mutagénica de agentes químicos o radiaciones lo que provoca una resistencia significativa de las células a la acción desafiante del mismo u otro agente (19,62). Se ha observado que con dosis muy altas del agente estimulante utilizadas como dosis de adaptación no hay RA, como es el caso de fibroblastos humanos estimulados con 1 microlitro de solución 0.1 M de MNNG a intervalos de 12 hrs, por nueve tratamientos y después de dos a tres horas desafiados con MNU (20,28)

La R.A. se debe a la inducción de un sistema enzimático reparador en el cual las células retienen una memoria de exposición manifestada por la expresión de algunas proteínas que pueden ser candidatas potenciales para reparar DNA (53,63,70), indicando que involucra la inducción de uno o mas genes en respuesta a la exposición de bajos niveles de agentes alquilantes.

En E.coli se ha mantenido por años que la O-6-metilguanina (O-6-meG) es la más importante lesión premutagénica inducida en DNA por agentes alquilantes y en la reparación de dicha lesión se involucra una adaptación mutagénica manifestandose en un aumento en los niveles de O-6-meG-DNA-metiltransferasa (10,13)

En la R.A participan por lo menos cuatro genes el gen ADA que actúa como consecuencia de la baja exposición y posee actividad de metiltransferasa y de activador transcripcional o regulador de la R.A por la propia metilación sobre la reparación de metilfosfotriester en el DNA (57,60) La enzima O-6 meG-DNA-metiltransferasa es transportada al aceptar guanina y demetila los residuos meG inducida por las dosis de reto (10,20,44,46,61).

La O-6-meG-DNA- metiltransferasa también repara la O-4-metilguanina aunque mas lentamente. También se han involucrado tres genes más que actúan en la R.A y son el gen Alk que induce la 3 metiladenina-DNA glicosilasa, la cual repara la lesion citotóxica de 3 metiladenina o bien O-2-metiltiamina y O-2-metilcitosina y en baja proporción la N-7-metilguanina (20,21,39,44,46).

Los genes alk B y Aid hacen a las células más resistentes a la muerte celular pero su mecanismo de acción permanece desconocido E.coli también con tiene otros genes de reparación que no pertenecen a la RA como son el gen OGT que repara las lesiones O-metilguanina y O-4 metil- tiamina y el gen Tag 1 que sólo repara lesiones 3-metiladenina(20).

Hay una gran evidencia para la existencia de una posible RA en linfocitos humanos similar a la encontrada en E.coli (Samson y Cairns 1977) y células de roedores (Samson y Schwartz citado por 53) ya que las enzimas DNA-metiltransferasa y glicosilasa se ha encontrado en linfocitos humanos,placenta.tejido fetal humano y células tumorales humanas sin estimular.cuando las células son estimuladas se inducen de 20 a 3000 moléculas más por célula y se han visto incrementos de 100 veces o más los niveles de O-6-meG DNA-metiltransferasa(13,20).También la O-6-alquilguanina se ha considerado una lesión de importancia en células y tejidos de mamíferos.En cultivos de células de mamíferos la O-6 metiguanina es implicada en mutagénesis por agentes alquilantes (12,40),y es una evidencia considerable que la O-6 alquilguanina puede ser involucrada en la producción de tumores en experimentos con animales por carcinógenos alquilantes.En general,los agentes alquilantes que producen poca O--6 alquilguanina en DNA son carcinógenos débiles.

En resumen, diferente proporción en la reparación de esta lesión en tejidos blanco tienen un efecto profundo sobre la producción de tumores(66,72,74). Por ejemplo la producción de tumores en cerebro de ratas jóvenes tratadas con N-etil-N-nitrosurea es correlacionada con la persistencia de O-6-alquilguanina en el órgano blanco.

Similarmente,tratamientos crónicos con N-metil-N-nitrosurea da como resultados tumores neurales en experimentos con animales y es acompañada por una acumulación progresiva de O-6 metilguanina en el cerebro sin ninguna acumulación en otro tejido (30).Es bien conocido que ciertos tejidos y células pueden remover la O-6 metilguanina y O-6-etilguanina de DNA(5-7,23,24,29,30,41,48,51,56,65,67).Una actividad enzimática que transfiere el grupo O-6-alquil a cisteína,formando S-alquilcisteína en una molécula aceptora,esta presente en una variedad de mamíferos,incluyendo tejidos humanos(3,11,16,33,34,42,49,50,70,74).

Se ha encontrado gran actividad de transferasa en: hígado de hamster que contiene aproximadamente 22000 moléculas por célula, en hígado de rata aproximadamente 60000 por célula en hígado humano de 600,000 a 900,000 por célula

En cultivos celulares humanos aproximadamente 100,000 moléculas por célula. La actividad de transferasa y acceptor son aparentemente producidas por la misma proteína(11) y las propiedades bioquímicas de bacterias y humanos son similares. En varios estudios se ha encontrado que la RA es similar a la de E. coli (74). En células de hamster chino, virus SV-40 expuestas a dosis bajas de MNNG hace a las células más resistentes a la inducción de ICH (34).

CONCLUSIONES

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Se determinó que la Mitomicina C tiene un efecto dosis dependiente sobre la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas.
- 2.- Se observó una Respuesta Adaptativa empleando a la Mitomicina C como agente estimulante.
- 3.- Las dosis estimulantes con las que se observó una mejor respuesta adaptativa fueron 5 y 10 ng/ml de Mitomicina C.
- 4.-La concentración en el tiempo es una determinante crítica para obtener la Respuesta Adaptativa. En este caso con 20 ng/ml, la respuesta declina.
- 5.- No se observaron diferencias significativas en la Respuesta de ambos donadores.
- 6.- El fenómeno de la Respuesta Adaptativa se debe probablemente a la inducción de un sistema de reparación.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1.-Bauchinger, Schmid, E. and Braselma, H. (1989). Absence of adaptive response to low level irradiation from tritiated thymidina experiments. *Mutation. Res.* 227, 103-107.

2.-Bhattacharya, R. (1989). An adaptive response of Vibrio Cholerae strain ogawa 154 to furazolidone. *Mutation. Res.* 225. 43-47.

3.-Bogden, J.M., Eastman, A., and Bresnick, E. (1981). A system in mouse liver for the repair of O-6 methylguanine lesions in methylated DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 3089.

4.-Bosi, A., and Olivieri G. (1989). Variability of the adaptive response to ionizing radiation in humans. *Mutation. Res.* 211, 13-17.

5.-Buecheler, J., and Kleihues, P. (1977). Excision of O-6 methyl-guanine from DNA of various mouse tissues following a single injection of N-methyl-N-nitrosourea. *Chem. Biol. Interact.* 16. 327.

6.-Bukley, J. D., O' Conner, P. J and Craif, A. W. (1979). Pretreatment with acetylamonofluorene enhances the repair of O-6 met- thylguanine in DNA. *Nature.* 281. 403.

7.-Chu. Y-H., Craig. A., W., and O' Conner, B. J. (1981). Repair of O-6 methylguanine in rat liver DNA is enhanced by pretreatment with single or multiple doses of aflatoxin B1. *Br. j Cancer.* 43, 850.

8.-Cohen, M. M. and M. Shaw. (1964). Effect of mitomycin C on human chromosome, *J. Cell. Biol.* 23, 386-395.

9.-Evans. H. J. (1977)Molecular Mechanims in the induction of chromosome aberrations. Genet. Toxicol. 2, 35-52.

10.-Evansen, G.,y Seeberg E (1982) adaptation to Alkylation resistance involves the induction of a DNA glycosilasa. Nature 296:773 -775.

11- Foota, R. S., and Mitra. S. (1983) .Quantiations of O-6 methylguanine -DNA methyltransferase in Hella cells.Mutations Res. 119-221

12.-Friedberg E. C. and Will. F. (1985).DNA repair New York.cap. 111-140.

13.- Frosina ,G.(1985) the current evidence for an adaptive response to alkylating agents in mammalian cell, with special reference to experiments with in vitro cell cultures.Mutations Res 154, 85-100

14.-Ghislain D.Kramma.O (1983).Influence of varioe mitogena onthe yields of sister chromatid exchanges, induced by chemicals, in human lymphocytes.Mutation. Res. 111, 161-170.

15.-Goth, R. and Rajewsky, M (1974). Pesistence of O-8 ethylguanine in rat brain DNA: correlation with nervous system especific carcinogenesis by ethylnitrosourea. Proc.Natl.Acad. Sca(USA). 71,639.

16.-Harris , A., Marran, P., and Lindahl, T.(1983). O-6 methylguanine -DNA methyltransferase of human lymphoyd cells. Cancer.Res.43, 3247.

17.-Ishii. Y. (1981) Nature of the mitomycin induced lesion causing sister chromatid exchange.Mutation . res. 91. 51-55.

18.-Iyer. V. N..and Szibalsky W.(1963).A molecular mechanism of mitomycin action and linkage of complementary DNA strands.Proc.Nat. Acad.Sci. 50. 355-362.

19.-Jeffery.Shadley D and Guoging D.(1992).Cytogenetic and survival adaptive reponses in G1 phase human lymphocytes Mutation.Res.265, 273-281.

20.-Karran, P.C.F. Arlett and Broughton B.C.(1982). An adaptive response to the cytotoxic effects N-Methyl-Nitrosourea is aparently absent in normal human fibroblasts.biochimie.64,717-721.

21.-Karran P., Hjeingren T y Lindhal T (1982).induction of a DNA glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptive response toalkylating agents.Nature (London).296,770-773-22.

22.-Kato,Shimada.H (1975). Sister Chromatid exchanges induced by mitomycin c; a new method of detecting DNA damage at cromosomal level .Mutation. res 28, 459- 464.

23.-Kim ,J., and Dipa D(1985) Ultraviolet light exposure induces a hereditable sensitivity to the induction of SCE by mitomycin C.Mutation.Res. 149, 437 442..

24.-Kleihues. P., and Margison G.P. (1976). Exhaustion and recovery of repair excision of O-6 methylguanine from rat liver DNA.Nature 259,153.

25.-Kram,D. Scheider,L and Nakanishi Y(1979).Spontaneous and induced by mitomycin C sister chomatid exchanges.Mutation Res.60,- 339-347

26.-Latt, S.A. (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71: 3162- 3166.

27.-Latt, S. A. (1981). Sister chromatid exchange formation. Ann, rev. Genet. 15, 11-55.-

28.-Lemaitre, M., Renard, A., and Verly, W. G. (1982). Common chromatid factor involved in the repair of O-6 methylguanine and O-6-ethylguanine lesion in the DNA. FEBS. Lett 144, 242.

29.-Lin, A. H. , and Sartorelli A.C (1976). in cancer chemotherapy. Am Chem Soc. 4., 71-72.

30.- Margison, G. P. and Kleihues, P. (1975). Chemical carcinogenesis in the nervous system: preferential accumulation of O-6-methyl-guanine in rat brain DNA during repetitive administration of methyl nitrosourea. Biochem. J. 148, 521.-

31.- Matsuura, M., Tanifuji S and Saho T (1963). Effect of mitomycin C on the frequency of chromosome aberrations produced by x rays. Am. Nat. 97, 191-193.

32.- Merz, T. (1961). Effect mitomycin on lateral root chromosomes of Vicia faba. Science. 133, 329-330.

33.- Metha, J., R. L. Ludlum, D.B. and Verly, W. G. (1981). Repair of O-6-ethylguanine in DNA by a chromating fraction from rat liver: transfer of the ethyl group to and acceptor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 78, 676.

34.- Montesano, R., Bresil, H., Drevon, C., and Piccoli, C. (1982). DNA repair in mammalian cells exposed to multiple doses of alkylating agents. Biochimie. 64, 591.

35.- Moquet, J. E. and Edwards, A (1987). Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C after exposure of human lymphocytes in G0 to a low dose of x radiation. Mutation. Res. 176,143-146.

36.- Morad, M., Jonasson J and Lindstan J(1973). Distribution of mitomycin C induced breaks on human chromosomes. Hereditas. 74; 273-278.

37.- Morimoto, K., and Mizuno, M (1986). Adaptation-like response to the chemical induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes. Human. Genet. 73;81-85.

38.- Nagasawa, H., and Fornae, A.J. (1988). Recovery of mitomycin C-treated mouse 10TI/2 cells during confluent holding. Mutation Res. 198; 153-160.

39.- Nakabappu, Y. Kondo, H. and Sekiguchi, M. (1984). Cloning and characterization of the alk A gene of Escherichia coli the encodes 3-methyladenine DNA glycosylase II. J. Biol. Chem. 259,13723-13729.

40.- Newbold, R. F., Warren, W., and Amos, J.(1980). Mutagenicity of carcinogenic methylating agents is associated with a specific DNA modification. Nature 283,596.

41.- Nicoll, J., Swan, P., and Pegg, A.(1975). Effect of dimethylnitrosamine on persistence of methylated guanines in rat liver and kidney DNA. Nature, 254-261.

42.- O'Conner, P.J., and Margison, G.P. (1981). The enhanced repair of O-6-alkylguanine in mammalian systems. In chromosome damage and repair. E Seeberg and K. Kleppe. eds., p 233. New York Plenum.

43.- Olivieri, G., Bodycote, J. and Wolff, S. (1984). Adaptive response of human lymphocytes to low concentration of radioactive thymidine. *Science*. 233, 594-597-

44.- Olsson, M., and Lindhal, T. (1980). Repair of Alkylated DNA in Escherichia coli: methyl group transfer from O-6-methylguanine to a protein cysteine residue. *J. Biol. Chem.* 255, 10659- 10571.

45.- Painter, R. B. (1980). A replication Model for sister chromatid exchange. *Mutation Res.* 70. 337-341.

46.- Parry, and Evans, H. (1975). Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258, 121-125.

47.- Pegg, A. E. (1978). Enzymatic removal of O-6-methylguanine from DNA by mammalian cells extracts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 84, 186.

48.- Pegg, A. E. and Balog, B. (1979). Formation and subsequent excision of O-6-ethylguanine from DNA of rat liver following administration of diethylnitrosamine. *Cancer Res.* 39, 503:

49.- Pegg, A.E., and Perry, W. (1981). Stimulation of transfer of methyl grup from O-6-methylguanine in DNA to protein by rat liver extracts in response to hepatotoxins. *Carcinogenesis*. 2, 1195.

50.- Pegg, A. E., Roberfroid, M., Vond, Bahr, C. and Montesano, R. (1982). Removal O-6-methylguanine from DNA by human liver fractions. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* . 79,51-62.

- 51.- Renard, A., and Verly, W. G. (1980). Kinetic analysis of O-6-ethylguanine disappearance from DNA catalyzed by the chromatin of rat liver. FEBS Lett 122, 271.
- 52.- Reyes C.P. (1983) Bioestadística Aplicadas Ed Trillas, (128,135)
- 53.- Samson, L., and Cairns J. (1977). A new pathway for DNA repair in Escherichia coli. Nature (London). 267, 281-283.
- 54.- Sankaranarayanan, K. A., Duyn, V and Natarajan A.T. (1989). Adaptive response of human lymphocytes to low concentration of radioisotopes. Mutation Res. 211, 7-12.
- 55.- Sartorelli, A. C. (1986). The role of mitomycin antibiotics in the chemotherapy of solid tumors, Biochem. Pharmacol. 35, 67-69.
- 56.- Scherer, E., Steward, A. P. and Emmelot, P. (1977). Kinetics of formation of O-6-ethylguanine in, and its removal from, liver DNA of rats receiving dimethylnitrosamine. Chem. Biol. Interact. 19, 1.
- 57.- Schwartz, J. L., Samson L. (1983). Mutation induction in chinese hamster ovary cells after chronic pretreatment with MNNG. Mutation. Res. 119, 393-397.
- 58.- Sedwick, B. and Vaughan, P. (1991). Widespread adaptive response against environmental methylating agents in microorganism. Mutation. Res. 250, 211-221.
- 59.- Shadley, J. D., and Wolff, S. (1987). Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X-rays to human lymphocytes. Radiat. Res. 111, 511-517.

60.-Shadley, J. D., and Wolff.S. (1987). Very low of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis*. 2, 95-96.

61.- Shevel, E.,Friedman B and, Walker.G. (1990). Resistance to alkilation damage in *Escherichia coli*: role of the Ada Protein in induction of the adaptive response. *Mutation. Res.* 233,53-72.

62.- Shiva. S., Terawaki W and Kamawata.J (1959). Selective inhibition of formation of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli* by mitomyn C, *Nature*. 183, 1056-1057.

63.- Shugin, X., and Jacobson.D.(1989). Increased Chromosomal radiosensitivity in patients undergoing radioimmunoglobulin therapy. *Mutation. Res.* 227, 39-45.

64.- Sinkus, A. J. (1969). Effect of mitomycin C on chromosomes in human cell cultures. *Genetika*,11,933-940.

65.- Smith, G. J., Kaufman, D.G., and Grisham, J. W. (1980). Decreased excision of O-6 methylguanine and N-7. methylguanine durin the S phase in 10 T1/2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 92, 787.

66.-Stephan C.K., Stanley,T.C(1979). Current Status and new developments.Academic Press.

67.- Swan, P. F., and Mace, R. (1980). Changes in O-6-methylguanine disappearance from rat liver DNA during chronic dimethylnitrosamine administration. A possible similarity between the system removing O-6-methylguanine from DNA in rat liver and in *Escherichia coli* adpted to N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Chem. Biol. Interact.* 31, 239.

68.- Swan, P. F., and Magge, P. N. (1979). Induction of rat kidney tumours by ethyl methylsulfonate and nervous tissue tumours by methylmethane sulfonate. Proc. Natl. Sci. (USA) 71, 639.

69.- Taylor J. H. (1958). Sister Chromatid differentiation. Genetics. 43, 515-521.

70.- Teo, I. A., AND Karran, P. (1982). Excision of O-6-methylguanine from the DNA by human fibroblasts determined by sensitive competition method. Carcinogenesis. 3,923.

71.- Vijayalaxmi, S. F.,. Mindek G and. Burkart W (1990). Adaptive response to low doses of X-rays in human blood lymphocytes. Mutation Res. 243. 53-56.

72.- Vijayalaxmi, and. Burkart..W (1989). Resistance and cross resistance to chromosome damage in human blood lymphocytes adapted to bleomycin. Mutation Res. 211, 1-5.

73.- Walsteein, E. A., Cap, E. H., Bender, M.A., and Setlow, R. B. (1982). Abilities of extracts of human in lymphocytes to remove O-6-methylguanine from DNA. Mutation. Res. 45,405.

74.- Waldstein, E. A., Cao, E-H and Setlow, R. b. (1982). Adaptive increase of O-6methylguanine-acceptor protein Hela cells following N-methyl-N-nitrosamine-N-nitrosoguanidine treatment. Nucleic. Acids. Res. 10,4595.

75.- Wang Z. Q., and Sasaki S (1991). Adaptive response to chromosome damage in cultured human lymphocytes primed with low doses of X-rays. Mutation Res. 246, 179-186.

76.- Wojzcick, A., and Tuschl, H (1990). Indications of an adaptative response in C-57 BL mice pre-exposed in vivo to low doses of ionizing radiation. Mutation Res. 243, 67-73.

77.- Wolff, S. (1982). Chromosome aberration, SCE, and the lesions that produce them. Mutation. Res. 58, 345-346.