

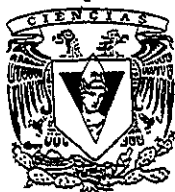


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCIÓN DEL DAÑO ESPONTÁNEO E INDUCIDO
AL ADN POR MEDIO DE ELECTROFORESIS
UNICELULAR EN CÉLULAS DE ANEMIA DE FANCONI
Y DE ATAXIA TELANGIECTASIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
GUADALUPE RAZO AGUILERA



COMISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DIRECTOR DE TESIS:
BIOL. BERTHA MOLINA ALVAREZ

CIENCIAS
1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

261485



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Detección del daño espontáneo e inducido al ADN por medio de Electroforesis Unicelular en células de Anemia de Fanconi y de Ataxia Telangiectasia" realizado por Guadalupe Razo Aguilera

con número de cuenta 7455845-4 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Biól. Bertha Molina Alvarez	<i>Bertha Molina A.</i>
Propietario		
Propietario	Biól. Laura Gómez Laguna	<i>Laura G.</i>
Propietario	Dra. en C. Sara Frias Vázquez	<i>Sara Frias V.</i>
Suplente	Biól. Ma. Guadalupe Ordaz Téllez	<i>Ma. Guadalupe O.</i>
Suplente	M. en C. Silvia Patricia Pérez Vera	<i>Silvia P.</i>

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A la Biol. Bertha Molina, directora de esta tesis, por los conocimientos que me transmitió, la confianza que depositó en mí y por el gran apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo.

A la Dra. en C. Sara Frias y Dra. Victoria del Castillo, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis en el laboratorio a su cargo (Laboratorio de Citogenética. Departamento de Genética del Instituto Nacional de Pediatría).

A la Biol. Laura Gómez, M. en C. Silvia Patricia Pérez y Biol. Ma. Guadalupe Ordaz, por las sugerencias que me hicieron para mejorar este trabajo.

A la Biol. Beatriz Blanco y Biol. Ma. de la Luz Velasco por el apoyo que me brindaron durante la realización de esta tesis.

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AF	Anemia de Fanconi
AT	Ataxia-Telangiectasia
BLM	Bleomicina
DEB	Diepoxibutano
DS	Desviación estándar
EU	Electroforesis unicelular
EUA	Electroforesis unicelular alcalina
eV	Electrovolt
FACC	Gene del grupo AF(C)
FAA	Gene del grupo AF(A)
Gy	Gray
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
SCGE	Single cell gel electrophoresis
SFT	Suero fetal de ternera
SB	Síndrome de Bloom
UV	Luz ultravioleta
V	Volt
XP	Xeroderma Pigmentoso

INDICE

	Página
I.RESUMEN	1
II.INTRODUCCION	
1. ANEMIA DE FANCONI	
A) Características Clínicas.	2
B) Características Citogenéticas y Moleculares.	4
2. ATAXIA-TELANGIECTASIA	
A) Características Clínicas.	7
B) Características Citogenéticas y Moleculares.	9
3. MITOMICINA-C	11
4. RADIACION IONIZANTE	13
5. TECNICA DE ELECTROFORESIS UNICELULAR ALCALINA	15
III.JUSTIFICACION	17
IV.OBJETIVOS	18
V.HIPOTESIS	19
VI.METODOLOGIA	
1. Técnica de Transformación de Linfocitos.	20
2. Viabilidad Celular.	21
3. Densidad Celular.	21
4. Tratamiento de Linfoblastos de AF y Normal.	22
5. Tratamiento de Linfoblastos con Radiación gamma.	23
6. Electroforesis Unicelular Alcalina.	23
7. Análisis de Datos.	25
VII.RESULTADOS	26
VIII.DISCUSION	46
IX.CONCLUSIONES	51
X.BIBLIOGRAFIA	52

RESUMEN

La Anemia de Fanconi (AF) y Ataxia-Telangiectasia (AT) son enfermedades autosómicas recesivas que pertenecen al grupo de los Síndromes de Inestabilidad Cromosómica; se caracterizan porque a nivel celular presentan una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas por agentes mutagénicos específicos para cada una de ellas, además de una predisposición al desarrollo de cáncer.

El diagnóstico de estos síndromes se realiza por medio del análisis de aberraciones espontáneas e inducidas con el agente específico en cultivos de linfocitos. Dado que este análisis es muy laborioso y requiere un número considerable de células, en este trabajo se investigó si la Electroforesis Unicelular Alcalina (EUA) podría ser utilizada para medir el daño espontáneo e inducido al ADN en linfoblastos de AF y AT.

Para conocer el daño espontáneo e inducido se sembraron cultivos de las líneas linfoblastoides de AF(A, B, C y D), de AT(A, C, D, E, V1 y V2) y una normal. Las células de AF, se trataron con 40ng de Mitomicina-C/ml durante 24h y las de AT con 1Gy de rayos gamma. De todas las líneas con y sin tratamiento se hicieron minigeles y se procesaron para EUA. Por cada gel, se analizaron 50 células al microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560nm y se midió la migración del ADN.

Los resultados obtenidos indicaron que la EUA es una metodología útil para detectar el daño espontáneo e inducido en los linfoblastos de AF y AT, así como para demostrar el efecto corrector del plasma normal en células de AF tratadas con MMC; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de complementación, de los dos síndromes de inestabilidad cromosómica, ni con respecto al normal.

II.INTRODUCCION

La Anemia de Fanconi (AF) y Ataxia-Telangiectasia (AT), son enfermedades heredables que pertenecen al grupo de Síndromes de Inestabilidad Cromosómica; este grupo también incluye al Xeroderma Pigmentoso (XP) y Síndrome de Bloom (SB) (1).

Los Síndromes de Inestabilidad Cromosómica comparten las siguientes características:

- a) Se heredan de manera autosómica recesiva.
- b) Presentan una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas y/o inducidas por agentes mutagénicos específicos para cada uno de ellos.
- c) Presentan predisposición al desarrollo de cáncer (1).

I. ANEMIA DE FANCONI

A) Características Clínicas:

La Anemia de Fanconi (AF), fue descrita en 1927 por el Dr. Guido Fanconi, al reportar el caso clínico de 3 hermanos que desarrollaron anemia aplásica (2). En general, se caracteriza por presentar pancitopenia, hiperpigmentación de la piel, retraso en el crecimiento, malformaciones esqueléticas de radio y pulgares, anormalidades renales, genitales y oculares, así como diversos grados de retraso mental (1,2).

Se estima que 1 de cada 360,000 individuos norteamericanos, sufren este síndrome (1).

Las características clínicas descritas para los pacientes con AF son muy variables en presencia y severidad (1,2), entre las cuales se mencionan las siguientes:

a) Pancitopenia: la mayoría de los pacientes con este síndrome desarrollan pancitopenia entre los 5 y 10 años de edad; se caracteriza por una hipocelularidad o disminución progresiva de las células de la médula ósea, la cual puede manifestarse como una anemia aplásica, una leucopenia con granulocitopenia o una trombocitopenia (2,3).

b) Bajo peso al nacer: del 55 al 60% de los pacientes con AF presentan peso bajo al nacimiento y retardo en el crecimiento (2).

c) Alteraciones esqueléticas: aproximadamente el 60% de los casos presenta anomalías esqueléticas, tales como hipoplasia o ausencia de pulgar, ausencia de radio, microcefalia y microftalmia. También pueden encontrarse cambios radiológicos en los centros de osificación o adelgazamiento de las falanges (2).

d) Pigmentación de piel anormal: el 75% de los pacientes presentan una hiperpigmentación caracterizada por manchas color café, de forma y tamaño irregular con un diámetro máximo de 4cm y como una despigmentación en áreas muy pequeñas con un diámetro de 0.5cm (2).

e) Alteraciones anatómicas: se reporta que en un 30% de los casos se observan alteraciones renales como riñón en herradura o pélvico. Asimismo, el 20% de los pacientes del sexo masculino muestran anomalías de genitales como hipoplasia y criptorquidia (1,2). También se ha reportado el hipogonadismo en el sexo femenino, pero en un porcentaje muy bajo (3%) (4).

f) Alteraciones del sistema nervioso central: se presentan estrabismo y retardo mental en el 25% y 20% respectivamente (2).

g) Predisposición al cáncer: los pacientes con AF muestran un alto riesgo para desarrollar cáncer, principalmente algún tipo de leucemia como la no linfoblástica aguda (1,2).

La mayoría de los pacientes muere en la edad infantil por pancitopenia severa, hemorragia, infecciones, por combinación de estas o por leucemia (5,6).

El tratamiento que se administra a los pacientes que presentan pancitopenia progresiva consiste de una terapia de sostén a base de transfusiones de células rojas, plaquetas o células blancas. También se emplean andrógenos, corticoesteroides y trasplante de médula ósea (5,7).

B) Características Citogenéticas y Moleculares:

A nivel celular, la AF cursa con una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas en comparación con las células normales, tales como rupturas cromatídicas, brechas, figuras radiales, translocaciones y endorreduplicaciones (5).

Además, se reporta que las células de estos pacientes, son sensibles a algunos agentes clastogénicos como Mitomicina-C (MMC), Diepoxibutano (DEB), Mostaza nitrogenada, 8-Metoxipsoralen + luz UV, Ciclofosfamida y Cis-diaminodicloroplatino, ya que al ser expuestas a estos agentes alquilantes presentan un incremento significativo de aberraciones cromosómicas, en comparación con las células de individuos sanos (8). Esta respuesta celular ha sido de gran utilidad para el diagnóstico de la enfermedad (9).

El defecto básico en las células de AF, se desconoce, sin embargo, algunos investigadores sugieren que puede deberse a:

- 1). Un defecto en la reparación del ADN (10,11).
- 2). Deficiencia de enzimas de protección contra radicales libres generados por el metabolismo del oxígeno (12).
- 3). Alteraciones en el transporte a través de la envoltura nuclear de la topoisomerasa-I (13,14).

Por otra parte, los experimentos sobre hibridación celular, transfección celular y sensibilidad a agentes alquilantes, llevaron a la determinación de 5 grupos de complementación designados como AF(A), AF(B), AF(C), AF(D) y AF(E) (15,16,17).

Estos grupos de complementación han sido caracterizados de la siguiente forma:

AF(A): los pacientes incluidos en este grupo, no presentan deformidades esqueléticas; la enfermedad se manifiesta tempranamente; muestra alta sensibilidad a la MMC; es deficiente en la reparación de rupturas de doble hebra y enlaces cruzados (17).

AF(B): pacientes con deformidades esqueléticas severas; la enfermedad se presenta tempranamente; muestra baja sensibilidad a la MMC; es deficiente en la reparación de rupturas de doble hebra (17).

AF(C): pacientes sin deformidades esqueléticas; la enfermedad se presenta tardíamente; muestra baja sensibilidad a la MMC; presenta reparación normal de rupturas de doble hebra (17).

AF(D): pacientes con algunas deformidades esqueléticas; la enfermedad se manifiesta tardíamente; muestra alta sensibilidad a la MMC (17).

AF(E): se ha descrito sólo en un paciente, por presentar bajo peso al nacimiento, microcefalia, hipoplasia del pulgar derecho y desarrollo de pancitopenia a los 3.5 años de edad. Las células de este paciente, mostraron hipersensibilidad a la MMC (16).

Strathdee y colaboradores en 1992, reportaron que el gene defectuoso en el grupo de complementación AF(C) designado como FACC, ha sido clonado y localizado en el cromosoma 9q22.3, este gene codifica para una proteína citosólica de 63kD (18,19,20).

Lo Ten Foe y colaboradores en 1996, mapearon los genes para los grupos AF(A) y AF(D), estos se localizaron en los cromosomas 16q24.3 y 3p22-26, respectivamente. El gene FAA codifica para una proteína de 163kD con localización nuclear (19,20).

Aún cuando se conoce el producto génico y la localización celular de los genes FACC y FAA, no se ha determinado su función porque no tienen homología con las proteínas conocidas (19,20).

Antes de la realización de los estudios sobre la clonación y el mapeo de los genes de los diferentes grupos de complementación, varios investigadores demostraron por distintas metodologías que el fenotipo celular podía corregirse parcialmente a través de estrategias como la cocultivación de células normales, la adición de plasma humano normal y de interleucinas. Así, Zakrzewsky y Sperling (1980) demostraron que cuando las células de pacientes AF se trataron con MMC y se cocultivaron con células normales, se observó una disminución en la frecuencia de aberraciones cromosómicas (21).

Más tarde, Carnevale y Frías (1985) encontraron que no sólo la cocultivación disminuyó la frecuencia de aberraciones, sino que la sola adición de plasma humano normal, produjo los mismos resultados. Esto hizo suponer la existencia de un factor difusible capaz de producir complementación (22). Rosselli y colaboradores (1992), reportaron que no es necesario el contacto celular entre las células AF y células normales para que se de la complementación, ya que las células AF al cultivarlas en medio condicionado por células normales, corrigen en parte la hipersensibilidad cromosómica (23).

Bajo la idea de que el factor de corrección pudiera involucrar a una proteína no específica relacionada con crecimiento celular y diferenciación, Rosselli y colaboradores (1992) probaron el efecto de diferentes citocinas. Encontraron que la adición de Interleucina-6 (IL-6) al medio de cultivo, aumentó la resistencia de las células AF a la toxicidad de la MMC y que las células AF mostraron una producción deficiente de IL-6, lo

cual les hizo suponer que puede estar relacionado con una de las características principales del síndrome que es la pancitopenia (23).

2. ATAXIA-TELANGIECTASIA

A) Características Clínicas:

La Ataxia-Telangiectasia (AT), fue descrita por Syllaba-Henner en 1926, Louis Bar en 1941, Boder y Sedwick en 1957, al reportar las características clínicas de 8 casos e incluir los resultados de la primera autopsia. En general, se caracteriza por anomalías dermatológicas, inmunológicas y genitales; además de un alto riesgo para el desarrollo de neoplasias (24).

Se estima que este síndrome lo padece 1 de cada 40,000 individuos (25).

Existe gran heterogeneidad en cuanto a las características clínicas observadas en los pacientes con AT, de las cuales las descritas con mayor frecuencia son las siguientes:

a) Anormalidades dermatológicas: se presentan entre los 4 y 6 años de edad como una telangiectasia en la región malar y esclerótica y en áreas expuestas al sol como cuello y dorso de pies y manos.

También se ha observado un cambio en la pigmentación (hipo e hiperpigmentación), que se manifiesta como manchas o lunares de color café con leche.

Además presentan otros cambios en la piel como pérdida de grasa subcutánea, disminución de elasticidad, atrofia y pelo grisáceo o canoso (25).

b) Alteraciones inmunológicas: se han descrito numerosos tipos de inmunodeficiencias en pacientes con AT como la disminución de los niveles de IgA, IgG ó IgE. También se ha reportado disminución en el número de células B y T, además de una ausencia o disminución en la respuesta a antígenos tales como tétanos y mitógenos (25).

c) Alteraciones neurológicas: en la mayoría de los casos se observa ataxia cerebelar progresiva y es evidente cuando los niños empiezan a caminar. Todos los pacientes sufren de disartria y la mayoría entra a una coreatosis manifiesta, hipotonía con pobres o ausentes reflejos del tendón profundo, apraxia de movimiento de ojos, nistagmus y rasgos característicos y una actitud postural.

El retardo mental se reporta en una tercera parte de los casos, pero es difícil de evaluar por la disartria (25).

d) Predisposición al cáncer: se estima que el 38% de los pacientes tienen el riesgo de desarrollar cáncer. La neoplasia que desarrollan es variable y la mayoría de los cánceres en pacientes con AT son linfoproliferativos: leucemia linfoide y linfomas tipo no-Hodgkin. Otros tumores incluyen carcinomas de tipo gástrico, células basales, hepatocelular y disgerminoma ovárico.

Los linfomas y leucemias generalmente aparecen antes de los 16 años, mientras que el carcinoma epitelial ocurre en pacientes que sobreviven a esta edad (25).

e) Otras características: la concentración de alfafetoproteína en el suero de estos pacientes se observa elevada. El hipogonadismo es también frecuente, especialmente la disgenesia ovárica en mujeres afectadas. El retardo en el crecimiento también es común (25).

El pronóstico de los pacientes con AT es malo, mueren prematuramente por neoplasia o enfermedad supurativa del pulmón. En un estudio realizado en Ankara,

Turquía, de 160 pacientes, 50 murieron durante el estudio a la edad promedio de 15 años (26).

B) Características Citogenéticas y Moleculares:

A nivel celular, los pacientes que padecen AT, presentan una alta frecuencia de rupturas cromatídicas e isocromatídicas, rearrreglos estructurales (particularmente translocaciones y figuras multiradiales) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH), en comparación con las células normales (25).

Los cromosomas involucrados con mayor frecuencia en rearrreglos cromosómicos en los linfocitos de estos pacientes son: 2, 6, 7, 8, 14, 22 y X. Entre estos, se ha observado un marcador específico que involucra a los cromosomas 7 y 14 por translocación (25).

Las células de pacientes AT presentan una gran sensibilidad a la exposición de algunos agentes clastogénicos tanto físicos como químicos lo que se manifiesta por un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas y muerte celular, tales como: Radiaciones ionizantes, Bleomicina (BLM), Diepoxibutano (DEB), 8-methoxypsoralen activado con luz UV y 5-methoxypsoralen (25).

El incremento en la radiosensibilidad mostrada por las células AT, ha sido una importante ayuda para el diagnóstico de esta enfermedad (27).

La naturaleza del defecto en las células AT ha sido de gran interés para muchos investigadores, así se ha sugerido que puede deberse a un defecto en la reparación del ADN, en la estructura de la cromatina o en la recombinación (27).

Por otra parte, en las células de los pacientes con AT se han distinguido 4 grupos de complementación designados como AT-A, AT-C, AT-D, AT-E y 2 variantes AT-V1 y AT-V2, basados en su radiosensibilidad y su capacidad de reparación.

Los grupos A, C, D y E son clínicamente idénticos y no se pueden distinguir uno del otro, excepto por medio de pruebas de complementación (24,27,28).

Los grupos V1 y V2, incluyen a pacientes con el Síndrome de Nijmegen (NBS) que es un síndrome de inmunodeficiencia, predisposición al cáncer, microcefalia y retardo mental; asociado a aberraciones cromosómicas que son características de AT, las translocaciones involucran a los cromosomas 2, 7, 14 y 22. Los pacientes con este síndrome no manifiestan ataxia o telangiectasia pero son incluidos como parte del espectro de AT porque son similarmente radiosensibles (29).

El grupo V1, también incluye al denominado AT_{Fresno}, el cual comparte las mismas características con NBS pero además presenta ataxia y telangiectasia (29).

Bajo la idea de que los grupos de complementación de AT (A, C, D, E) representan al menos 4 genes diferentes de AT, los cuales pudieran encontrarse en un mismo cromosoma o distribuidos en el genoma y con el objeto de identificar el defecto genético y la detección de portadores, Gatti y colaboradores en 1988, mediante técnicas de mapeo localizaron el gene de AT para el grupo AT-A en la parte distal del cromosoma 11, en la región q22-23. Posteriormente, Ziv y colaboradores en 1991 encontraron que el grupo AT-C, también se encuentra en la misma región (11q22-23) (30,31).

Por otra parte, Savitsky y colaboradores en 1995, reportaron que el gene ATM que tiene un transcrito de 12kb se encuentra mutado en los pacientes con AT de todos los grupos de complementación, lo que les hizo suponer que se trataba de un sólo gene que es responsable de este desorden (32). Sin embargo, Saar y colaboradores (1997) reportaron que este gene (ATM) excluye a los variantes AT-V1 y AT-V2, ya que sus experimentos demostraron que el gene para el Síndrome de Nijmegen o Variante de AT mapea en el cromosoma 8q21-22, el cual incluye a ambas variantes de AT(V1 y V2) (33).

3. MITOMICINA-C

La Mitomicina-C (MMC), es un agente clastogénico con propiedades antibacterianas y antitumorales, de gran interés en la investigación por su efecto citotóxico (34).

La MMC fue aislada de *Streptomyces caespitosus*, en forma de cristales azul violeta, tiene un peso molecular de 334g, es soluble en agua y en solventes orgánicos como el metanol, acetona, etc.(34).

Se sabe que la MMC es un agente alquilante bifuncional, con una estructura policíclica, la cual presenta 3 grupos potencialmente activos: una quinona, un carbamato y un anillo de aziridina (34-36).

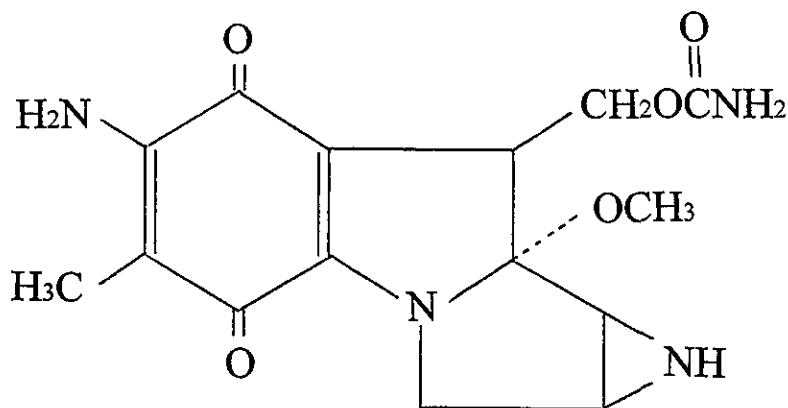


Fig. 1 Estructura policíclica de la MMC (35).

Algunos investigadores reportan que la acción antibiótica y antitumoral de la MMC se debe a que reacciona con el ADN y los mecanismos moleculares sugeridos para tal efecto, se basan en los siguientes procesos (37).

a) Activación de la MMC: la MMC en la naturaleza se encuentra en forma oxidada y para que actúe como un agente alquilante bifuncional necesita estar en forma reducida (38).

La reducción de la molécula se lleva a cabo mediante una enzima dependiente del NADPH, dando lugar a un compuesto denominado Aziridinomitoseno, el cual puede unirse a la molécula de ADN por cualquiera de sus 3 sitios activos (37).

b) Alquilación y formación de enlaces cruzados ADN-MMC: la alquilación del ADN por MMC se relaciona con la habilidad que tiene este agente para limitar el crecimiento de las células tumorales y esto se debe a que se une covalentemente de manera monofuncional o bifuncional al ADN para formar enlaces cruzados intra o interhebra, lo que impide que se lleve a cabo la replicación (37).

También se reporta que se forma un mayor número de enlaces cruzados cuando la molécula de ADN es rica en contenido de G + C (Guanina + Citosina), lo cual sugiere que hay una reacción preferencial del Aziridinomitoseno con el grupo Guanosina (39).

Debido al mecanismo que se lleva a cabo para la reducción de la MMC con la intervención de la enzima dependiente del NADPH, se desencadena una serie de reacciones en las que hay liberación de radicales hidróxilo (OH), los cuales rompen la molécula del ADN (37).

4. RADIACION IONIZANTE

La radiación ionizante es el acarreo de energía sin que sea necesaria la intervención de un medio de transporte. Esta puede ser mediante ondas electromagnéticas o por partículas como electrones, neutrones o iones (40).

La energía que es transferida por ondas electromagnéticas también puede ser descrita como paquetes discretos de energía llamados fotones o “quanta” (40).

Los rayos X y gamma, se encuentran incluidos entre las radiaciones ionizantes, ambos son transferidos por ondas electromagnéticas. Los rayos X son generados cuando los electrones acelerados interactúan con la materia, como efecto secundario de excitación o aceleración y desaceleración de los electrones. Los rayos gamma se generan por la desintegración nuclear de algún elemento radiactivo (40).

Aún cuando los rayos X y gamma son de la misma naturaleza, difieren en su poder de penetración, longitud de onda y frecuencia. Se reporta que los rayos gamma son más penetrantes ya que pueden atravesar una lámina de hierro o plomo de varios centímetros de espesor (10cm) (41).

Para medir la radiación ionizante se emplea el Gray (Gy), equivale a 1J/kg, el cual ha sido definido como la unidad de la dosis absorbida por el Sistema Internacional de Unidades (40).

Los rayos X y gamma son de gran importancia para el hombre por su aplicación médica (40).

Los efectos biológicos producidos por la radiación ionizante, dependen de factores físicos, químicos y biológicos, tales como: el tipo de radiación; la dosis absorbida y el

tiempo de exposición. Asimismo, el tipo de células, la cantidad de oxígeno en el medio y la fase del ciclo celular (40,42).

Los mecanismos moleculares sugeridos para la acción de la radiación ionizante, se basa en 2 teorías principales:

- a) Acción Directa o Teoría de Blanco.
- b) Acción Indirecta o Teoría de Difusión.

La Acción Directa sugiere que el daño causado por radiación se hace de manera directa sobre las moléculas intracelulares.

La Acción Indirecta sugiere que el daño es causado por la liberación de radicales libres como producto de la radiólisis del agua intracelular (40,43).

Independientemente del mecanismo de acción, en general, la radiación ionizante produce diversos tipos de daño en las biomoléculas, entre las que se encuentran: rupturas de enlace covalentes, modificación de la estructura y degradación de la molécula (42). Específicamente en el ADN, la radiación ionizante produce rupturas de una sola hebra, rupturas de doble hebra, daño de bases, pérdida de bases, zonas desnaturalizadas y enlaces cruzados intramoleculares (ADN-ADN y ADN-proteína) (40).

El tipo de ruptura en el ADN depende de la cantidad de energía absorbida, por ejemplo, para producir una ruptura de una hebra se requiere de 60 a 80eV mientras que para producir una ruptura de doble hebra se requiere de 1000 a 1800eV; por esta razón, la frecuencia de rupturas de una hebra es 10 veces mayor que las de doble hebra (42).

5. TÉCNICA DE ELECTROFORESIS UNICELULAR ALCALINA

La Técnica de Electroforesis Unicelular Alcalina (EUA), también conocida como “Ensayo Cometa” o Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE), fue propuesta por Singh y colaboradores en 1988 como un método para valorar daño y reparación en el ADN (44,45,46).

La EUA es una técnica sencilla que ofrece varias ventajas como: requiere un número pequeño de células (1-10,000), es muy sensible para detectar rupturas en el ADN de cadena sencilla y sitios sensibles a álcali, permite hacer una valoración intercelular en cualquier población de células eucarióticas, se obtienen resultados en poco tiempo y es muy económica (44,45,46).

La EUA básicamente consiste en embeber las células bajo estudio en un minigel de agarosa que se coloca en una solución de lisis (detergentes y altas concentraciones de sales), con el objeto de romper a las células y dejar libres los núcleos, el ADN de los núcleos se desnatura y desenrolla bajo condiciones alcalinas; posteriormente, se coloca en un campo electroforético en el cual se produce una migración del ADN de las células (desde el cátodo hacia el ánodo) que al ser neutralizadas, teñidas con bromuro de etidio y observadas bajo el microscopio de fluorescencia, se hace visible una imagen en forma de “cometa” con una cabeza (núcleo) y cola (ADN desplazado fuera del núcleo) fluorescente, cuya longitud e intensidad de fluorescencia de la cola del cometa están relacionados con el número de rupturas en la cadena del ADN inducidas por el agente probado (44).

La Electroforesis Unicelular (EU) es el resultado de la técnica original de Rydberg y Johanson (1978) quienes en sus experimentos observaron que los núcleos de células irradiadas con Rayos X, embebidas en agarosa y mantenidas bajo condiciones alcalinas, se mostraban difusos de manera dosis-dependiente. Asimismo, Ostling y Johanson observaron que al incluir un paso electroforético a células irradiadas con Rayos X,

embebidas en agarosa y mantenidas bajo condiciones neutras, el núcleo mostraba una extensión del ADN cuya longitud resultó dependiente de la dosis de radiación (47).

Singh y colaboradores en 1988 demostraron que la técnica es útil para detectar el daño producido al ADN en linfocitos humanos tratados con Rayos X (25 - 200rads) y H₂O₂ (9.1 - 291µm). Observaron que las condiciones neutras favorecieron la migración de rupturas de doble hebra, en tanto que con las condiciones alcalinas se detectaron rupturas de cadena sencilla y sitios sensibles a álcali. También observaron que en los linfocitos irradiados con 200rads de rayos X, la cinética de reparación se efectuaba dentro de los primeros 15 minutos posteriores al tratamiento (45).

Posteriormente, varios investigadores emplearon la técnica con el objeto de conocer su utilidad y el efecto de algunos agentes genotóxicos tanto físicos como químicos. Así Vijayalaxmi (1992) demostró que la técnica de EUA es sensible para detectar el daño en el ADN inducido por radiación ionizante (Rayos gamma) a concentraciones tan bajas como 0.5Gy en los linfocitos humanos de sangre periférica (48). Tice (1992), por su parte, evaluó el daño en linfocitos de pacientes con cáncer tratados con agentes alquilantes (ciclofosfamida y cisplatino) en distintos tiempos de la terapia y demostró que la técnica permite monitorear los niveles de daño durante la terapia (49). Asimismo, Anderson y colaboradores (1994) probaron el efecto de varios antioxidantes (Vitamina C, E, Similarin) y otros agentes productores de radicales de oxígeno (H₂O₂ y Bleomicina) en linfocitos humanos y observaron que la Vitamina C y Similarin proporciona un efecto protector al daño inducido por H₂O₂ y la Apo-transferrina y Deferoxamina mesilada, presenta un efecto protector al daño inducido por Bleomicina, por lo que concluyeron que la técnica de EUA es útil para examinar el daño producido en el ADN por antioxidantes y otros agentes (50).

III.JUSTIFICACION

El diagnóstico de la AF y AT se realiza por medio del análisis de aberraciones cromosómicas espontáneas e inducidas con el agente específico para cada enfermedad en cultivos de linfocitos.

Las aberraciones cromosómicas que se observan son: rupturas cromatídicas y cromosómicas, figuras radiales, anillos, dicéntricos y fragmentos céntricos y acéntricos; este estudio implica la realización de cultivos celulares de más de 48h y un análisis laborioso de más de 25 metafases por cada tratamiento.

Debido a que la EUA detecta rupturas de hebra sencilla y sitios sensibles al álcali podría ser una metodología adecuada para determinar el daño espontáneo e inducido al ADN en las células de AF y AT. Este método a diferencia del análisis de aberraciones cromosómicas permite analizar un mayor número de células en menor tiempo.

Por otra parte, tanto en la AF como en la AT existen diferentes grupos de complementación, sin embargo con el análisis de aberraciones cromosómicas no se ha podido diferenciar dichos grupos de complementación. Dado que la EUA es una técnica más sensible para detectar daño al ADN es posible que sea una metodología adecuada para diferenciar los grupos de complementación de la AF y la AT.

IV.OBJETIVOS

1. Objetivo General:

Conocer el daño al ADN espontáneo e inducido por agentes mutagénicos específicos en líneas linfoblastoides de AF y de AT, mediante la técnica de EUA.

2. Objetivos Específicos:

a) Conocer el daño al ADN espontáneo e inducido por MMC en células normales y de los grupos de complementación de AF, mediante la técnica de EUA.

b) Conocer el efecto de la adición de plasma humano normal en células normales y en los grupos de complementación de AF, tratadas previamente con MMC, mediante la técnica de EUA.

c) Conocer el daño al ADN espontáneo e inducido por radiación gamma en células normales y de los grupos de complementación de AT, mediante la técnica de EUA.

d) Conocer si hay diferencias en la migración del ADN en los grupos de complementación de AF y AT.

V.HIPOTESIS

Si la Electroforesis Unicelular Alcalina es una técnica sensible para detectar daño directo al ADN, entonces se podrá observar el daño espontáneo y el inducido por agentes clastogénicos como la MMC, en células de Anemia de Fanconi y el daño causado por radiación ionizante en células de Ataxia-Telangiectasia.

VI.METODOLOGIA

Los experimentos se realizaron con 4 líneas linfoblastoides de Anemia de Fanconi, 6 de Ataxia-Telangiectasia y 1 normal.

Las líneas linfoblastoides de AF de los grupos de complementación AF(A), AF(B), AF(C) y AF(D) fueron donadas por el Dr. Manuel Buchwald (Department of Genetics, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada); las de AT de los grupos de complementación AT-A, AT-C, AT-D, AT-E y las variantes AT-V1 y AT-V2 fueron donadas por el Dr. Richard A. Gatti (UCLA School of Medicine, Department of Pathology, Los Angeles, California). La línea normal fue establecida en el Laboratorio de Citogenética, del Instituto Nacional de Pediatría (INP), mediante la técnica de transformación de linfocitos con virus Epstein Barr, de un sujeto sano.

1. Técnica de Transformación de Linfocitos:

Se tomó una muestra de 10ml de sangre periférica con una jeringa estéril y heparinizada.

La muestra de sangre se colocó en 5ml de gradiente lymphoprep y se centrifugó 15min a 400 X g; la capa de linfocitos se lavó 2 veces con solución de Hank's y el paquete celular se resuspendió en 2ml de medio RPMI sin suplementar; esta suspensión se colocó en una caja de 24 pozos a los que se adicionaron 500µl de virus Epstein Barr, y se incubaron por 24h a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se retiró la mitad del medio (0.5ml) de cada pozo y se sustituyó por medio RPMI suplementado con suero fetal de ternera (SFT) al 10%. Esto se hizo de manera periódica hasta que las células mostraron cambios morfológicos tales como aumento de tamaño y la presencia de pseudópodos que permite que las células se asocien conformando cúmulos; cuando las células presentaron todas estas características se consideraron como células transformadas (51); entonces se

transfirieron a frascos de cultivo a los que se adicionaron 10ml de medio RPMI suplementado con SFT al 10% para su propagación.

2. Viabilidad Celular:

Se calculó el porcentaje de viabilidad celular de los cultivos de linfoblastos de AF y normal, antes y después de cada tratamiento.

Para ello, se preparó una solución con la suspensión celular y el colorante azul de tripano al 0.4% en una proporción 1:1; se colocó 10µl en el hemocitómetro y se procedió a contar las células con color (muertas) y sin color (vivas).

Con los datos obtenidos, se pudo calcular el porcentaje de viabilidad mediante la relación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Número de células sin color}}{\text{Número de células totales}} (100)$$

3. Densidad Celular:

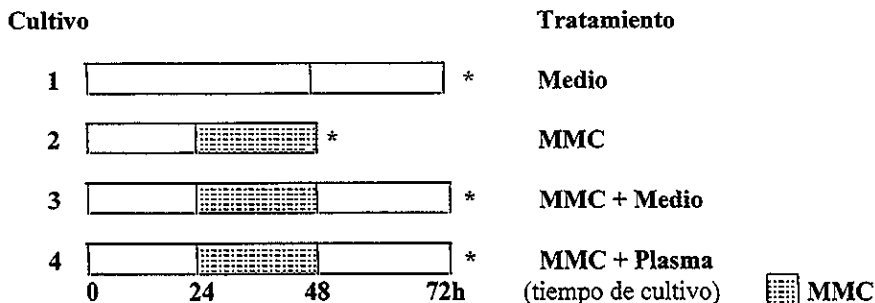
Para conocer la densidad celular se colocó una alicuota de la suspensión celular en el hemocitómetro, se contó el número de células presentes en los 4 cuadrantes y se procedió a hacer el cálculo de acuerdo a la siguiente relación (52):

$$\text{Densidad Celular} = \frac{\text{Número de células totales}}{\text{Número de cuadrantes}} (10,000) (\text{Factor de dilución})$$

4. Tratamiento de Linfoblastos de AF y Normal:

Se prepararon 4 tipos de cultivo, por duplicado, tanto para los linfoblastos de AF de los grupos de complementación AF(A), AF(B), AF(C) y AF(D), como del normal. Por cada tipo de cultivo y línea celular se sembraron 6×10^5 cél/ml en medio RPMI suplementado con SFT al 10% y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

En el siguiente esquema se representan los 4 tipos de cultivos realizados por duplicado en cada línea celular.



- A las 24h se agregó MMC (40ng/ml) a los cultivos 2, 3 y 4.
- A las 48h los cultivos 1, 3 y 4 se lavaron con Hank's.
- Los cultivos 1 y 3 se incubaron por 24h sólo en medio de cultivo con SFT al 10%.
- El cultivo 4 se mantuvo por 24h en presencia de medio con SFT al 10% y 20% de plasma humano normal.
- Se midió viabilidad celular, en los tiempos marcados en el esquema con asterisco (*), y se prepararon minigeles para ser procesados por medio de Electroforesis Unicelular.
- Se hizo una repetición por cada tratamiento y por cada línea celular.

5. Tratamiento de Linfoblastos con Radiación gamma:

Se prepararon cultivos por duplicado de linfoblastos AT de los grupos de complementación AT-A, AT-C, AT-D, AT-E y de los variantes AT-V1 y AT-V2, así como del normal.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en cultivo con medio RPMI suplementado con SFT al 10%, a 37°C y 5% CO₂.

Por cada línea celular se hicieron 2 tipos de preparaciones: Una sin tratamiento para conocer el daño espontáneo y otra para conocer el daño inducido por radiación gamma. Una vez que las células se embebieron en la agarosa de bajo punto de fusión, una de ellas se trató con 1Gy de rayos gamma provenientes de una fuente de Cobalto 60 (⁶⁰Co) e inmediatamente, tanto las células radiadas como las de sin tratamiento, se colocaron en una solución de lisis fría (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Na-Sarcosinato, Triton X-100 al 1%/DMSO 10%, pH 10 , a 4°C).

Se hicieron de 4-10 repeticiones por línea celular tanto para el daño espontáneo (células sin tratamiento) como para el daño inducido (células irradiadas).

6. Electroforesis Unicelular Alcalina:

a) Preparación de Minigeles:

Sobre un portaobjetos esmerilado se agregaron 120µl de agarosa regular (0.5% en PBS, a 50°C) e inmediatamente se colocó un cubreobjetos y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 3 ó 4min. Posteriormente, se retiró el cubreobjetos y se agregó una segunda capa con 75µl de agarosa de bajo punto de fusión (0.5% en PBS, a 37°C) mezclados con 5µl de muestra (aproximadamente 5000 células), se colocó un cubreobjetos y se dejó solidificar sobre una bolsa de hielo por 3min. Después de este

tiempo, se retiró el cubreobjetos y se agregó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión (0.5% en PBS, a 37°C), de igual manera, se dejó solidificar sobre una bolsa de hielo por 3min y se retiró el cubreobjetos con cuidado para no romper el gel formado.

Todos los minigeles, se colocaron en un recipiente con solución lisante (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Na-Sarcosinato, Triton X-100 al 1%/DMSO 10%, pH 10), se protegieron de la luz y se mantuvieron a 4°C al menos por una hora, antes de realizar la electroforesis.

b) Electroforesis:

Los minigeles se retiraron de la solución de lisis y se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal a la que se adicionó buffer de electroforesis (300mM NaOH, 1mM EDTA , pH 13) *hasta que las laminillas estuvieron completamente cubiertas*, se mantuvieron a temperatura ambiente y bajo obscuridad durante 20min con el fin de desenrollar y desnaturalizar el ADN. Inmediatamente se realizó la electroforesis con 25V y 300mA durante 20min, en ausencia de luz para evitar daño adicional.

Terminada la electroforesis, los minigeles se lavaron 3 veces con buffer de neutralización (0.4M Tris, pH 7.5), y se tiñeron con 50µl de bromuro de etidio (2µg/ml).

Todos los geles se codificaron y se observaron al microscopio de fluorescencia con un objetivo de 25X y filtro de excitación de 515-560nm.

Por cada gel y tratamiento, se analizaron 50 células y con un ocular micrométrico se midió la migración del ADN, considerando solamente la cola del cometa que se formó.

Se analizaron 2 geles por línea celular y por tratamiento.

7. Análisis de Datos:

Con los datos obtenidos, para las líneas linfoblastoides de AF, AT y normales, se calculó el promedio de migración (\bar{X}) y la desviación estándar (DS).

a) Líneas Linfoblastoides de AF:

Se representó gráficamente el número de células con respecto al nivel de migración del ADN y se utilizó la prueba estadística por Análisis de Varianza con el fin de comparar los promedios de la migración del ADN obtenidos por tratamiento y por línea celular.

Los datos correspondientes a las líneas linfoblastoides de AF y normal se dividieron en niveles de migración de 30 μ m cada uno. Por lo que en el primer nivel de migración quedaron las células con daño de 0-30 μ m, en el segundo nivel las células de 31-60 μ m y así sucesivamente.

b) Líneas Linfoblastoides de AT:

Los datos que se obtuvieron para las líneas linfoblastoides de AT y normal, se representaron en gráficas que muestran el promedio de migración del ADN (μ m) vs número de repeticiones tanto de las células sin tratamiento (daño espontáneo) como de las células tratadas con 1Gy de rayos gamma (daño inducido).

Se utilizó la prueba estadística “t” student, para comparar los promedios de migración del ADN obtenidos para las células irradiadas con 1Gy de rayos gamma y las no irradiadas de cada línea celular.

VII.RESULTADOS

1. Líneas Linfoblastoides de AF:

La Tabla I, muestra la viabilidad celular obtenida para las líneas linfoblastoides de AF(A, B, C y D) y del normal, antes de correr los geles de cada tipo de cultivo. En esta tabla, se puede observar que la viabilidad en todas las líneas celulares sin tratamiento, fue superior al 80%. Después del tratamiento con MMC, la viabilidad disminuyó en un 9% en las células normales y del 17% al 20% en las células de AF. Al dejar las células con medio de cultivo 24h después del tratamiento con MMC, la viabilidad disminuyó en un 35% en las células normales y del 33% al 45% en las células de AF, pero al adicionar al medio de cultivo 20% de plasma humano normal después del tratamiento con MMC, se observó que la viabilidad se mantuvo igual a la obtenida inmediatamente después de tratados con MMC en todas las líneas celulares.

TABLA I
VIABILIDAD CELULAR EN LINEAS LINFOBLASTOIDES NORMALES Y DE AF

LINEA CELULAR	SIN TRAT. (%)	MMC (%)	MMC + MEDIO (%)	MMC+PLASMA (%)
NORMAL	92	83	57	82
AF(A)	82	64	49	60
AF(B)	99	79	54	80
AF(C)	84	64	39	63
AF(D)	87	70	55	71

Los datos representan el porcentaje de células vivas después de cada tratamiento.
La concentración de MMC fue de 40ng/ml de medio de cultivo en todos los casos.

La Tabla II muestra los promedios de migración del ADN de las líneas linfoblastoides normal y de AF sin tratamiento (daño espontáneo) y con diferentes tratamientos (daño inducido). En las células sin tratamiento, se puede observar que las líneas AF(A), AF(C), y AF(D) presentan un promedio de migración similar al encontrado en la línea normal, mientras que en la línea AF(B) el promedio de migración fue menor.

Cuando se adicionó la MMC, en todas las líneas, el promedio de migración fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el observado en las células sin tratamiento; pero cuando se adicionó medio de cultivo por 24h a las células previamente tratadas con MMC el promedio de migración resultó mayor que el daño encontrado en las células sin tratamiento y ligeramente menor al que se observó con sólo MMC. Sin embargo, al adicionar medio de cultivo suplementado con plasma humano normal al 20%, todas las líneas celulares presentaron un promedio de migración del ADN significativamente menor ($p < 0.05$) que el de las células tratadas con MMC y muy similar al de las células sin tratamiento; excepto en AF(A) que mostró un promedio de migración mayor ($91.38\mu\text{m}$) y en AF(D) menor ($39.9\mu\text{m}$).

TABLA II
PROMEDIO DE MIGRACION DEL ADN EN LINFOBLASTOS NORMALES Y DE AF
SIN TRATAMIENTO Y CON DIFERENTES TRATAMIENTOS

LÍNEA CELULAR	SIN TRAT. $\bar{X}(\mu\text{m})/DS$	MMC $\bar{X}(\mu\text{m})/DS$	MMC + MEDIO $\bar{X}(\mu\text{m})/DS$	MMC+PLASMA $\bar{X}(\mu\text{m})/DS$
NORMAL	59.8 /30.6	109.38/28.62*	83.73/20.22*	57.46/16.67
AF(A)	50.16/12.44	149.15/43.05*	125.97/11.38*	91.38/ 1.43
AF(B)	33.3 /11.13	59.61/ 9.14*	57.55/20.03*	29.34/ 9.76
AF(C)	52.3 / 0.31	162.75/25.07*	113.29/ 7.03*	49.4/ 3.23
AF(D)	56.49/ 8.08	128.8 /52.08*	80.9/ 1.06*	39.9/ 4.41

Los promedios de migración del ADN se incrementaron después del tratamiento con MMC y disminuyeron después de 24hr de cultivo con medio, pero disminuyeron aún más en presencia de plasma humano normal.

*Diferencia significativa con respecto a la migración sin tratamiento.
 $p < 0.05$, análisis de Varianza.

En las figuras 2 y 3, se muestran las células sin daño y con daño, respectivamente.

En la figura 4 se representa la distribución del número de linfoblastos normales con respecto a su nivel de migración del ADN, sin tratamiento y con los diferentes tratamientos. Se observa que la migración de la mayoría de las células sin tratamiento (fig.4a), tendieron a distribuirse en los niveles de menor daño y muy pocas células llegaron al nivel máximo de migración, que corresponde al nivel 6 (150-180 μ m).

En relación al daño inducido por MMC (fig.4b), se observa que las células se distribuyeron entre el nivel de migración 2-8 (30-240 μ m). Mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los linfoblastos sin tratamiento.

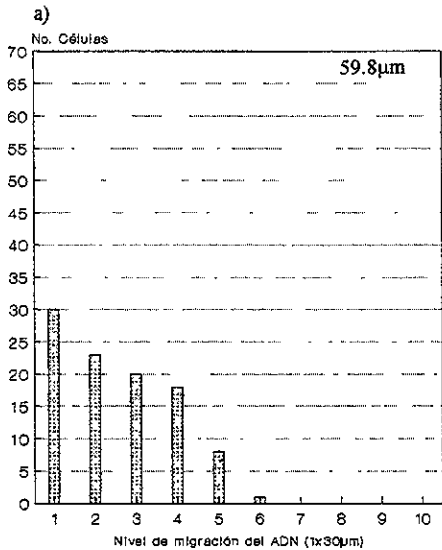
Las células a las que se adicionó medio de cultivo después del tratamiento con MMC (fig.4c) se distribuyeron entre los niveles 1 a 8 (0-240 μ m). No presentó diferencias significativas con respecto a las que tenían MMC, pero sí con respecto a las células sin tratamiento ($p < 0.05$).

Los linfoblastos a los que se adicionó medio de cultivo suplementado con plasma humano normal al 20%, después del tratamiento con MMC (fig.4d), se distribuyeron entre los niveles de migración 1 a 4 (0-120 μ m). No se encontraron diferencias significativas con respecto a las células sin tratamiento, pero sí con respecto al daño inducido con MMC y con respecto al tratamiento con medio de cultivo después de MMC ($p < 0.05$).

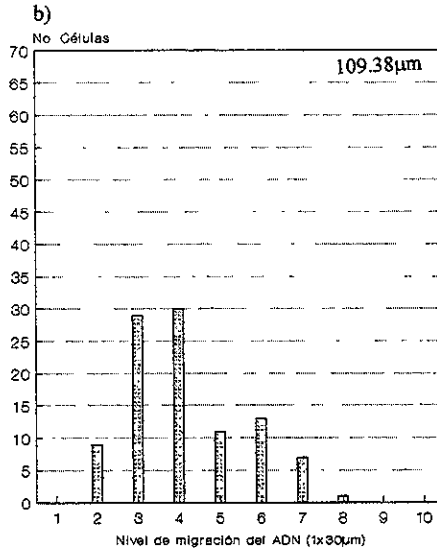
En las líneas linfoblastoides de AF (figuras 5-8), se observó un comportamiento similar a las células normales en respuesta a los diferentes tratamientos. Sin embargo, la línea AF(A) tratada con plasma humano normal (fig.5d) mostró una distribución de células entre los niveles de migración 1 a 7 (0-210 μ m), mientras que en las líneas AF(B), AF(C) y AF(D) el porcentaje de células que tendieron a distribuirse en el primer nivel de daño fue del 68%, 40% y 50% respectivamente (fig.6-8d).

En todas las líneas celulares de AF se encontraron diferencias significativas entre el daño en los linfoblastos sin tratamiento y el inducido con MMC ($p < 0.05$), asimismo entre los linfoblastos tratados con MMC y los tratados con 20% de plasma humano normal, después de MMC.

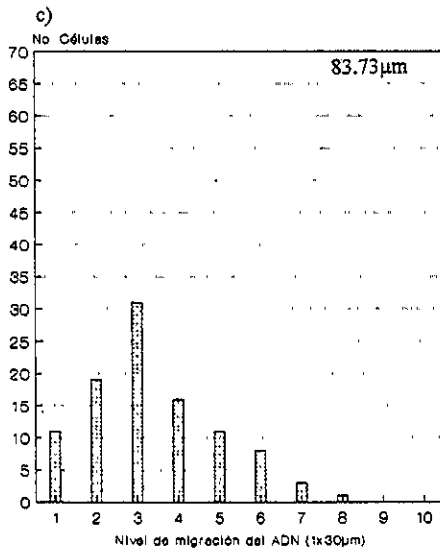
**NORMAL
SIN TRATAMIENTO**



**NORMAL
MMC**



**NORMAL
MMC + MEDIO**



**NORMAL
MMC + PLASMA**

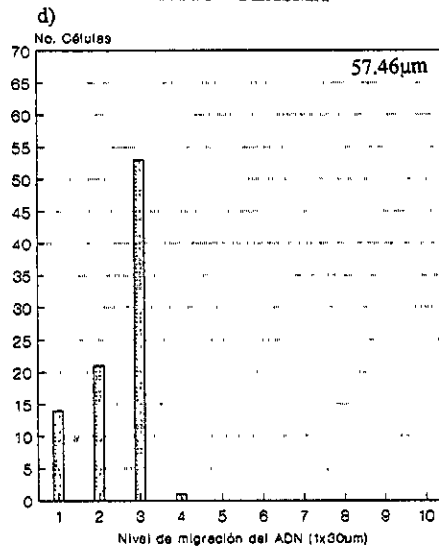
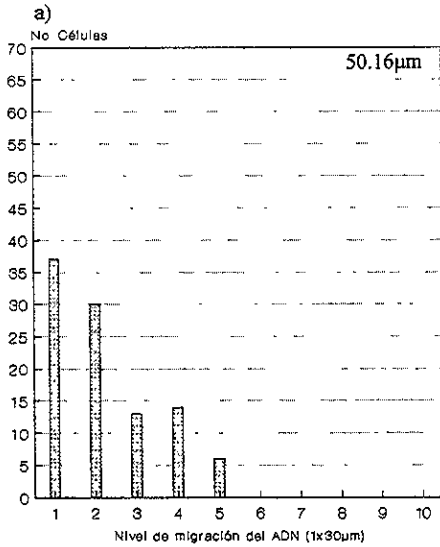
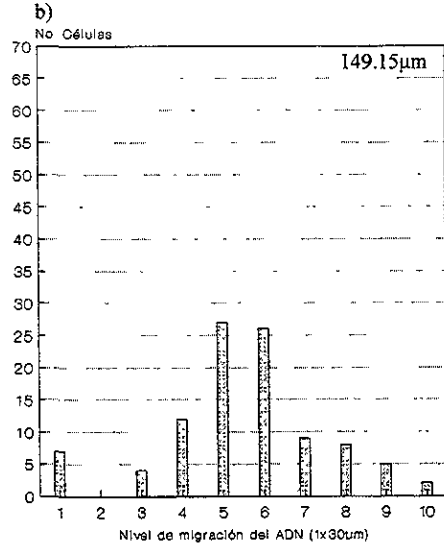


Fig. 4 Distribución del número de linfoblastos normales con respecto al nivel de migración del ADN. a) células sin tratamiento; b) células tratadas con 40ng MMC/ml de cultivo; c) células lavadas e reincubadas 24h en medio de cultivo; d) células lavadas, igual que c, pero incubadas 24h en medio suplementado con 20% de plasma humano normal.

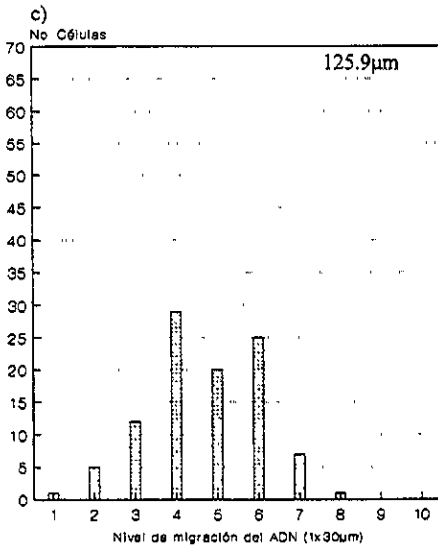
**AF(A)
SIN TRATAMIENTO**



**AF(A)
MMC**



**AF(A)
MMC + MEDIO**



**AF(A)
MMC + PLASMA**

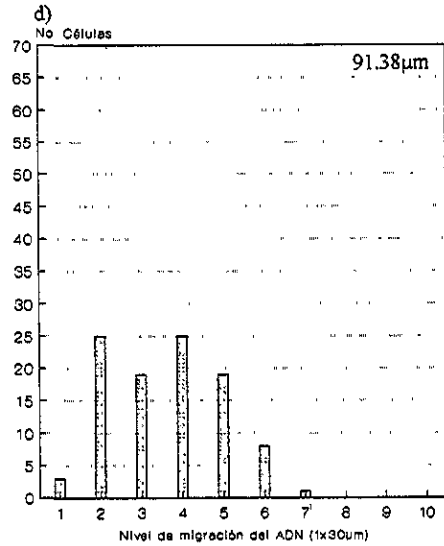


Fig. 5 Distribución del número de linfoblastos de AF(A) con respecto al nivel de migración del ADN. a) células sin tratamiento; b) células tratadas con 40ng MMC/ml de cultivo; c) células lavadas e reincubadas 24h en medio de cultivo; d) células lavadas, igual que c, pero incubadas 24h en medio suplementado con 20% de plasma humano normal.

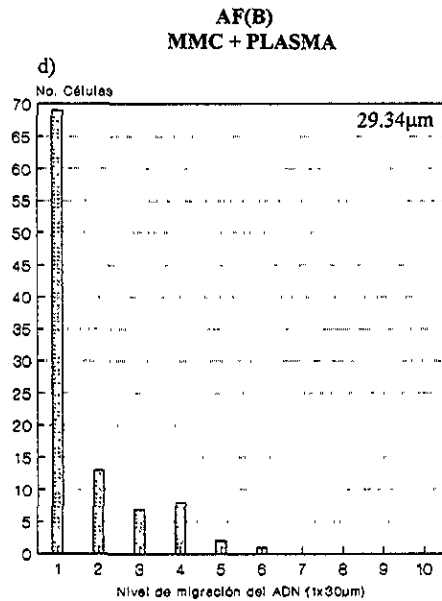
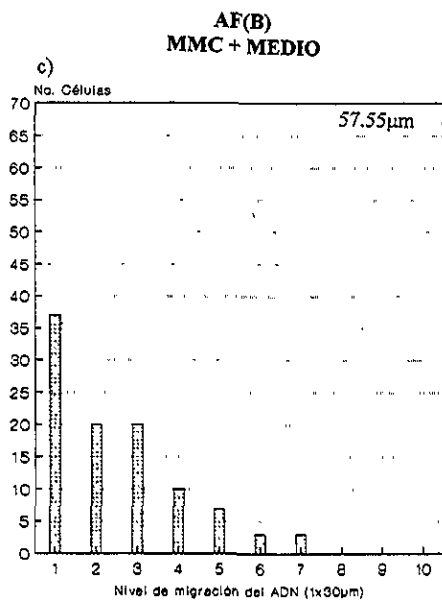
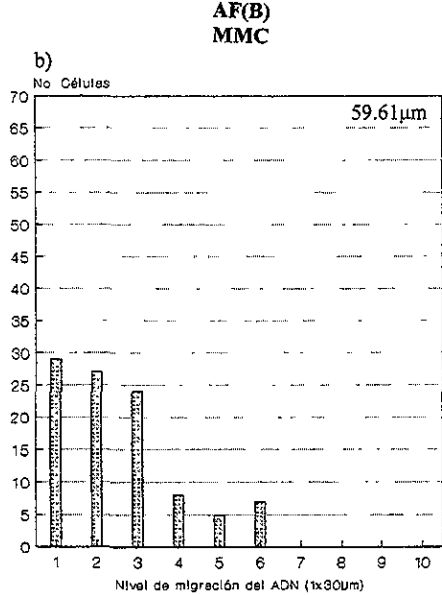
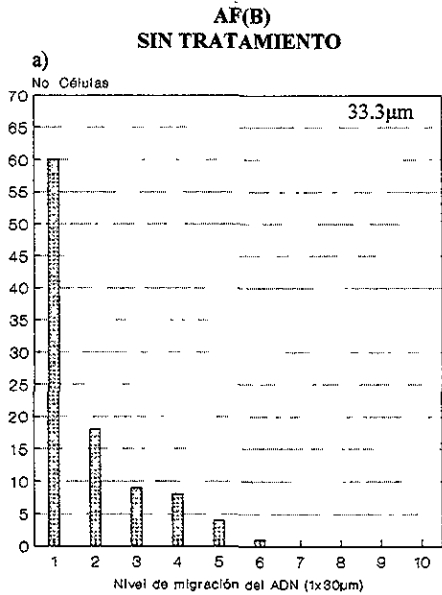
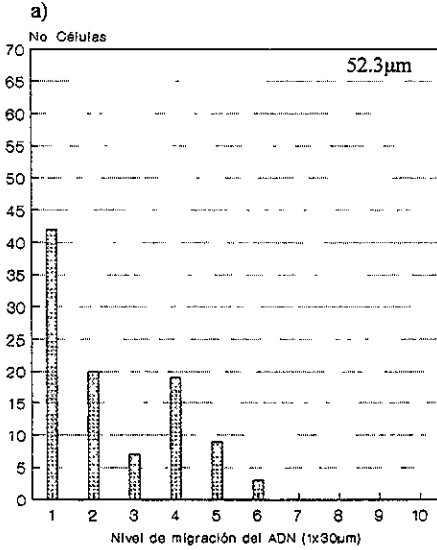
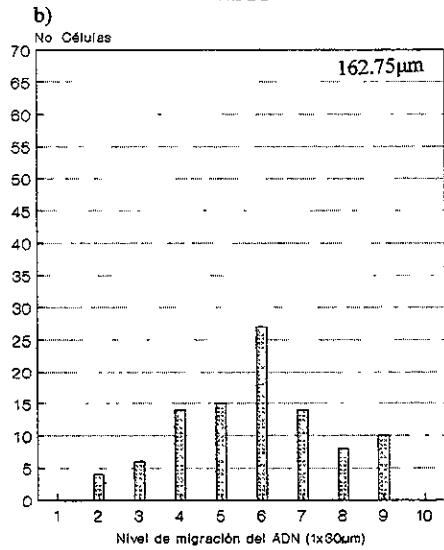


Fig. 6 Distribución del número de linfoblastos de AF(B) con respecto al nivel de migración del ADN. a) células sin tratamiento; b) células tratadas con 40ng MMC/ml de cultivo; c) células lavadas e reincubadas 24h en medio de cultivo; d) células lavadas, igual que c, pero incubadas 24h en medio suplementado con 20% de plasma humano normal.

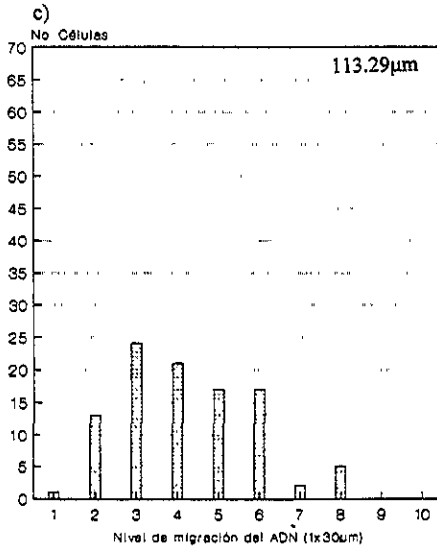
**AF(C)
SIN TRATAMIENTO**



**AF(C)
MMC**



**AF(C)
MMC + MEDIO**



**AF(C)
MMC + PLASMA**

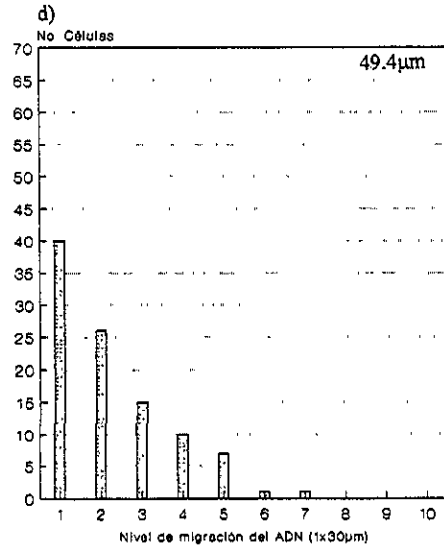
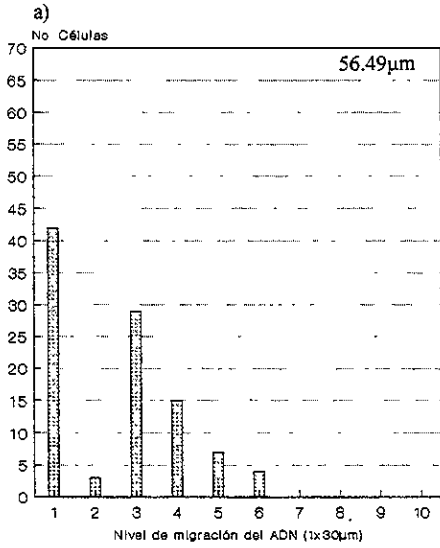
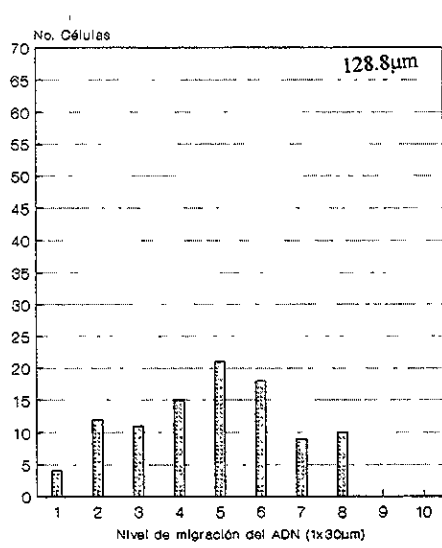


Fig. 7 Distribución del número de linfoblastos de AF(C) con respecto al nivel de migración del ADN. a) células sin tratamiento; b) células tratadas con 40ng MMC/ml de cultivo; c) células lavadas e reincubadas 24h en medio de cultivo; d) células lavadas, igual que c, pero incubadas 24h en medio suplementado con 20% de plasma humano normal.

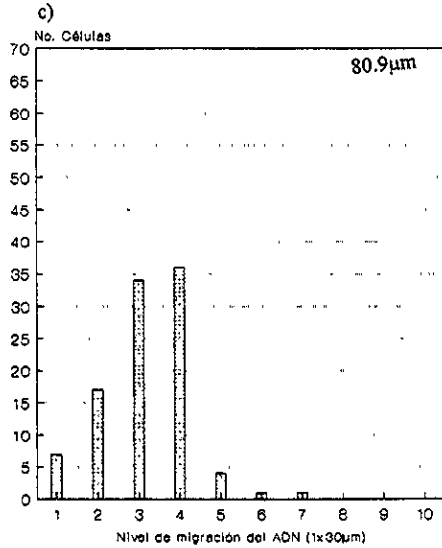
**AF(D)
SIN TRATAMIENTO**



**AF(D)
MMC**



**AF(D)
MMC + MEDIO**



**AF(D)
MMC + PLASMA**

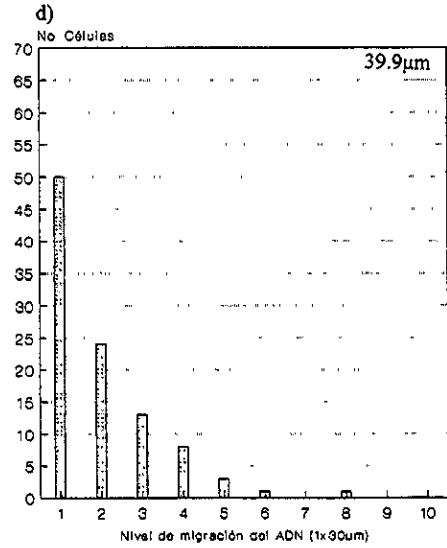


Fig. 8 Distribución del número de linfoblastos de AF(D) con respecto al nivel de migración del ADN. a) células sin tratamiento; b) células tratadas con 40ng MMC/ml de cultivo; c) células lavadas e reincubadas 24h en medio de cultivo; d) células lavadas, igual que c, pero incubadas 24h en medio suplementado con 20% de plasma humano normal.

2. Líneas Linfoblastoides de AT:

La tabla III muestra los promedios de migración del ADN espontáneo e inducido por 1Gy de rayos gamma en las líneas linfoblastoides normal y de AT (A, C, D, E y variantes V1 y V2). En relación al daño espontáneo, se observó que el promedio de migración del ADN fue muy similar en todas las líneas celulares (de 11.41 μ m a 44.42 μ m). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de complementación de AT, ni con respecto al normal.

En cuanto al daño inducido por 1Gy de rayos gamma, el promedio de migración se incrementó de manera significativa ($p < 0.05$) en todas las líneas celulares (AT y normal), alcanzando valores superiores a los 100 μ m.

TABLA III
PROMEDIOS DE MIGRACION DEL ADN ESPONTANEO E INDUCIDO POR 1Gy DE RAYOS
GAMMA EN LINEAS LINFOBLASTOIDES NORMAL Y DE AT, DE 4 A 10 REPETICIONES

LÍNEA CELULAR	DAÑO ESPONTANEO N MIGRACION ADN $\bar{X}(\mu\text{m})/\text{DS}$	DAÑO INDUCIDO N MIGRACION ADN $\bar{X}(\mu\text{m})/\text{DS}$
NORMAL	10 24.05/17.45	10 109.46/28.12*
AT-A	4 11.41/ 8.86	4 108.30/21.87*
AT-C	6 37.20/21.68	6 112.94/18.79*
AT-D	10 31.71/15.39	5 100.08/23.95*
AT-E	10 22.46/12.63	6 103.98/22.44*
AT-V1	10 32.63/22.14	6 106.09/24.01*
AT-V2	9 44.42/28.66	4 113.43/27.74*

Los datos representan el promedio de migración del ADN espontáneo e inducido por 1Gy de rayos gamma, en 50 células analizadas por repetición.

N=Número de repeticiones.

* $p < 0.05$, "t" student, con respecto al daño espontáneo.

La figura 9, representa la migración del ADN espontánea e inducida por 1Gy de rayos gamma obtenida para la línea normal. En esta figura, puede verse que hay gran variabilidad en cada una de las repeticiones. Sin embargo, es evidente que el daño inducido es significativamente mayor ($p < 0.05$) que el daño espontáneo.

Las líneas celulares de AT de los grupos de complementación (figuras 10-15) mostraron un comportamiento similar al encontrado en la línea normal. Asimismo, el daño inducido resultó significativo ($p < 0.05$) con respecto al daño espontáneo.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de complementación de AT ni con respecto al normal, tanto para el daño espontáneo como para el daño inducido por 1Gy de rayos gamma.

NORMAL

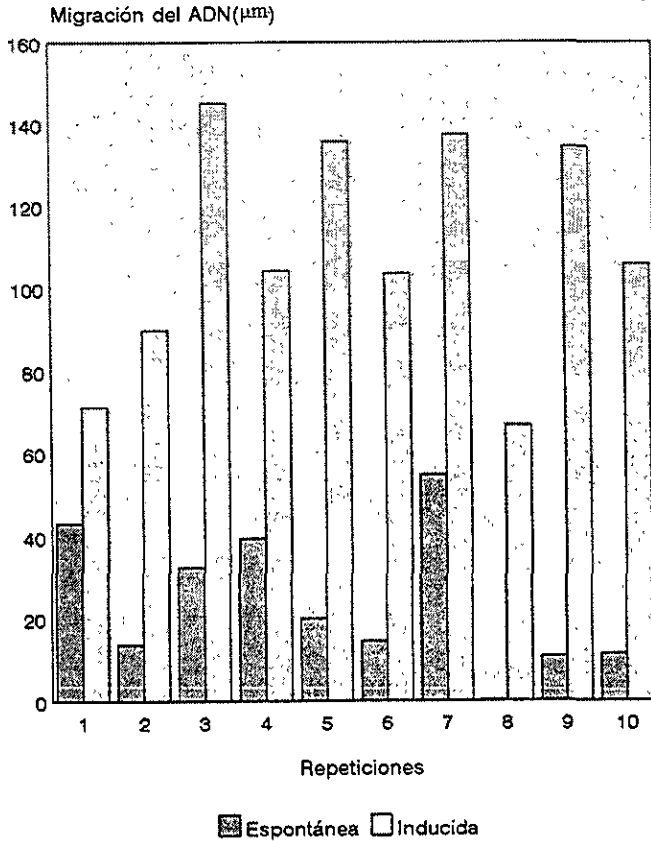


Figura 9.
Migración del ADN, en linfoblastos normales,
espontánea e inducida por 1Gy de Rayos gamma.

AT-A

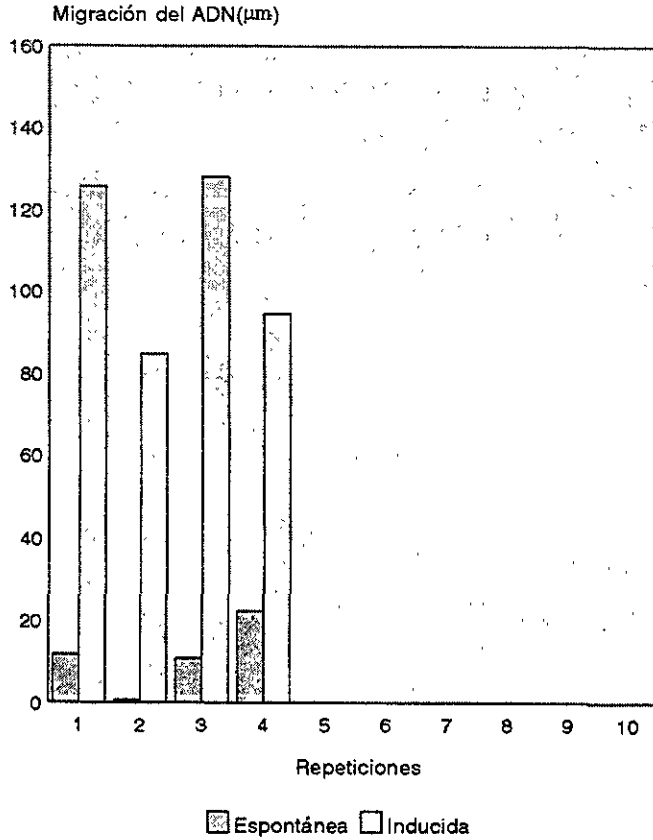


Figura 10.
Migración del ADN, en linfoblastos de AT-A,
espontánea e inducida por 1Gy de Rayos gamma.

AT-C

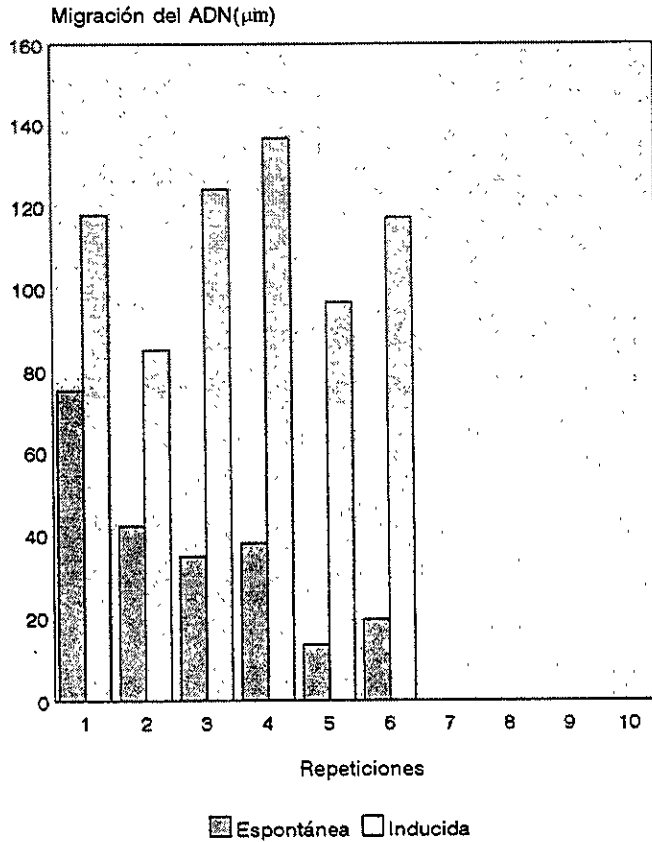


Figura 11.
Migración del ADN, en linfoblastos de AT-C,
espontánea e inducida por 1Gy de Rayos gamma.

AT-D

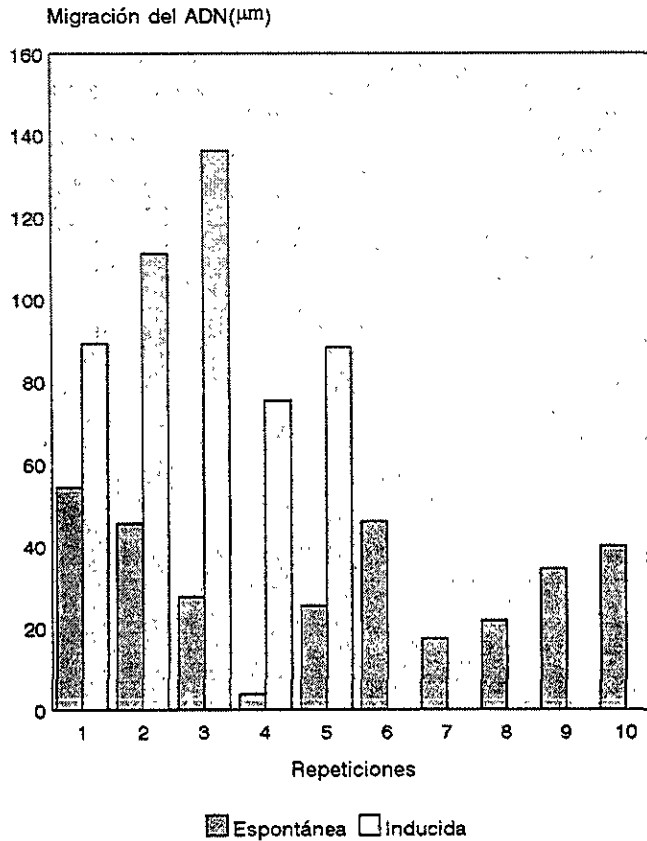


Figura 12.
Migración del ADN, en linfoblastos de AT-D,
espontánea e inducida por 1Gy de Rayos gamma.

AT-E

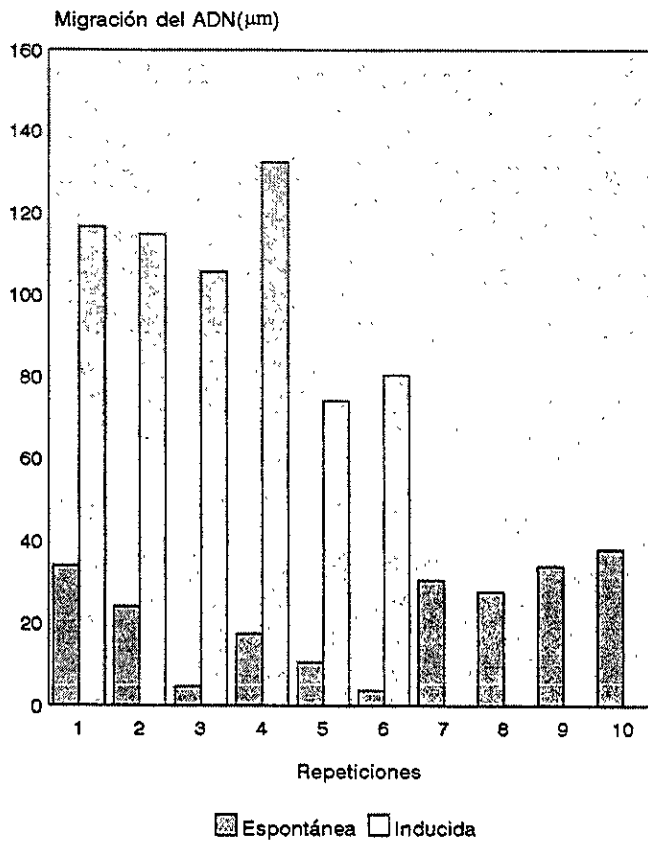


Figura 13.
Migración del ADN, en linfoblastos de AT-E,
espontánea e inducida por 1Gy de Rayos gamma.

AT-V1

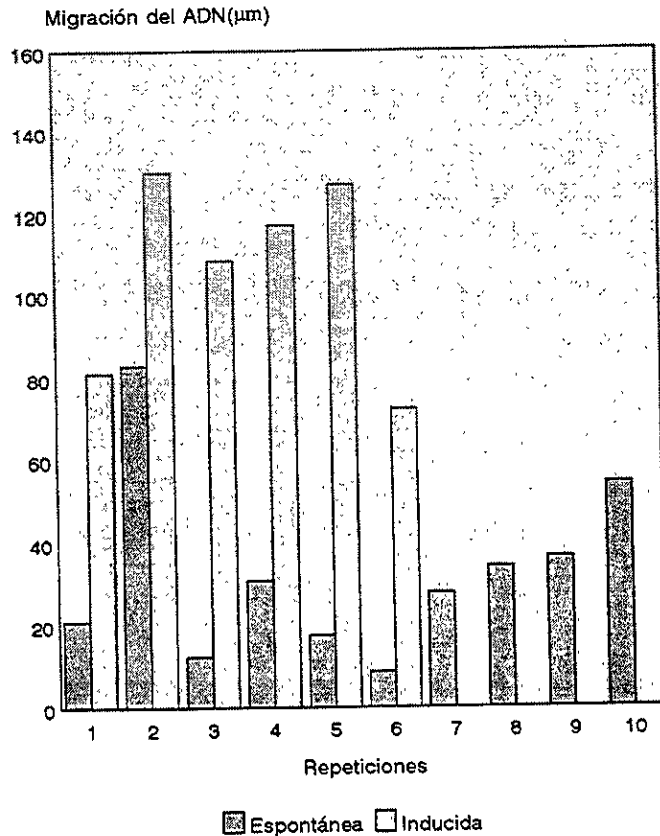


Figura 14.
Migración del ADN, en linfoblastos de AT-V1,
espontánea e inducida por 1Gy de Rayos gamma.

AT-V2

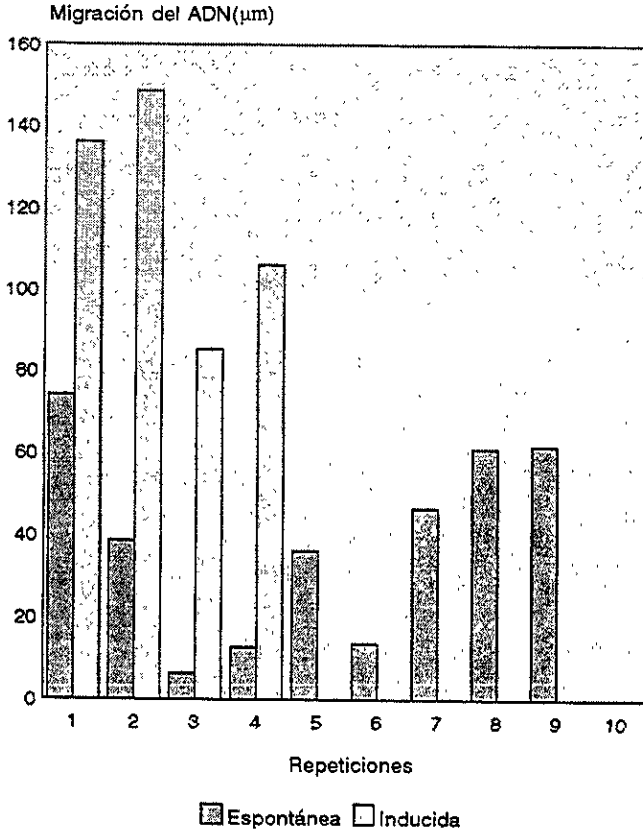


Figura 15.
Migración del ADN, en linfoblastos de AT-V2,
espontánea e inducida por 1Gy de Rayos gamma.

VIII.DISCUSION

La EU ha sido de gran interés para muchos investigadores en el campo de la biología, medicina y toxicología, debido a que es una técnica muy sensible para detectar el daño directo al ADN en células individuales. Las aplicaciones y variaciones de esta metodología son numerosas, actualmente se usa en estudios de reparación del ADN, para probar la genotoxicidad de diversos agentes y en el biomonitoreo. El principio de detección del daño se fundamenta en la presencia de rupturas en el ADN de doble hebra o de cadena sencilla, las condiciones neutras facilitan la detección de rupturas de doble hebra y las alcalinas evidencian las rupturas de cadena sencilla (53).

En este trabajo se utilizó la técnica de EUA de acuerdo a Singh y colaboradores (1988) para la detección de rupturas en el ADN de cadena sencilla y sitios sensibles a álcali en células individuales con el objeto de cuantificar el daño espontáneo e inducido en líneas linfoblastoides de AF y AT (54).

1. Líneas Linfoblastoides de AF:

Con la EUA fue posible detectar el daño al ADN en los linfoblastos sin tratamiento y con los diferentes tratamientos, tanto en la línea normal como en las líneas de AF, de los grupos de complementación AF(A), AF(B), AF(C) y AF(D). Es importante mencionar que de todas las líneas AF y normal, la línea AF(B) mostró una migración del ADN menor, tanto en las células sin tratamiento como en las células tratadas con MMC. Cabe aclarar que los experimentos con células AF(B) no se realizaron en paralelo con los demás grupos de complementación pero sí con una línea normal y el comportamiento observado con respecto a su control fue similar al de las otras líneas celulares: el promedio de migración en los linfoblastos sin tratamiento de la línea AF(B) y la normal fue de 33.3 μ m y 24.68 μ m, cuando se trataron con MMC la migración aumentó a 59.61 μ m y 73.25 μ m respectivamente.

Los resultados obtenidos para los linfoblastos (AF y normal) sin tratamiento y con los diferentes tratamientos mostraron gran variabilidad y promedios de migración del ADN mayores que los observados en estudios preliminares realizados con linfocitos de AF y normales en Go (no se muestran los datos), aún así, el daño producido por la MMC se hizo evidente en ambos tipos celulares.

Sin embargo, con la EUA no fue posible detectar diferencias entre los grupos de complementación de AF ni con respecto al normal, aún cuando se sabe que son genéticamente heterogéneos. Dado que hasta el momento se conocen 5 grupos de complementación y se han mapeado 2 genes diferentes en la AF, en el presente trabajo se esperaba encontrar niveles de daño al ADN que permitieran distinguir a los grupos de AF, pero esto no fue así; el daño encontrado en los linfoblastos de AF y normales fue mayor que el encontrado en linfocitos de AF y normales en Go (no se muestran los datos) y el promedio de migración al ADN entre las distintas líneas fue muy similar. Los factores que pudieron impedir la diferenciación en la respuesta al daño espontáneo e inducido en la AF pueden ser diversos, quizá influyeron: a) el tipo de células (células en proliferación continua), b) el daño al ADN producido por la MMC (enlaces cruzados) y c) las condiciones de la electroforesis unicelular (alcalina).

Con respecto a la primera posibilidad, Olive y colaboradores (1993), utilizaron la EUA para determinar tanto el daño inducido por rayos X como la reparación en células de diferentes fases del ciclo celular; encontraron heterogeneidad en sus resultados, pero observaron que las células en fase S no irradiadas mostraron un “momento de cola” mayor que las células que estaban en otra etapa del ciclo celular y sugirieron que esto podía deberse a la presencia de sitios de replicación activa (55). En el presente trabajo se usaron células transformadas y es posible que el gran daño observado se deba a que los linfoblastos se encontraban en proliferación continua, en las células que están en fase S existen fragmentos de Okazaki que pueden migrar igual que los fragmentos producidos cuando se daña al ADN.

En cuanto a la segunda posibilidad, se sabe que la MMC es un agente clastogénico, S dependiente, que induce la formación de enlaces cruzados. Dado que se sabe que las células de los grupos de AF presentan diferencias en la sensibilidad a la MMC, se esperaba que el nivel de daño permitiera distinguir los 4 grupos de AF; el factor que pudo enmascarar estas diferencias probablemente fue la forma en que se cuantificó el daño al ADN ya que sólo se midió la longitud de la cola del cometa con ocular micrométrico. Es posible que las colas de ADN de las distintas líneas tuvieran mayor o menor cantidad de ADN involucrado en el daño pero que midieran lo mismo, estas diferencias podrían demostrarse si se midiera el “momento de cola” o bien si se utilizara un análisis densitométrico.

La EUA detecta rupturas de cadena sencilla y sitios sensibles al álcali, la MMC induce daño de doble hebra (enlaces cruzados) cuando se pega al ADN y daño de hebra sencilla de manera indirecta por la liberación de radicales libres en su activación. Es posible que las diferencias de los grupos de AF pudieran evidenciarse bajo condiciones neutras de pH, que revelan daño al ADN de doble hebra, o bien utilizando un agente mutagénico químico y otro físico como lo realizaron Olive y colaboradores (1992) (56).

Por otra parte, debido a que la MMC es un agente alquilante citotóxico, se puede pensar que la muerte celular representó una fuente de variabilidad, sin embargo, al comparar la viabilidad (Tabla I) y la migración del ADN (Tabla II) de las células de AF y normal sin tratamiento y con diferentes tratamientos, se demostró que la viabilidad no influyó en la migración. Las células de AF y normal sin tratamiento mostraron una viabilidad superior al 80% y el promedio de migración observado en las líneas varió de 33.3 μ m a 59.8 μ m; después del tratamiento con MMC, la viabilidad disminuyó ligeramente y el promedio de migración se incrementó significativamente en todas las líneas celulares (59.61 μ m a 162.75 μ m). Al dejar las células 24h con medio de cultivo después del tratamiento con MMC, la viabilidad disminuyó todavía más, hasta en un 45%, pero el promedio de migración del ADN fue ligeramente menor que el observado inmediatamente después del tratamiento con MMC (57.55 μ m a 125.97 μ m); finalmente, al adicionar al

medio de cultivo 20% de plasma humano normal, se encontró una viabilidad similar a la observada después del tratamiento con MMC, pero promedios de migración del ADN menores ($29.34\mu\text{m}$ a $91.38\mu\text{m}$) y muy similares a los encontrados en las células sin tratamiento. Además, la forma del cometa que se observó en los experimentos no indica que se traten de células apoptósicas como lo han demostrado otros autores (57). Los cometas apoptósicos se pueden identificar en base a su forma, presentan un espacio entre el núcleo y la cola del cometa; esta falta de continuidad no fue observada en este trabajo, por lo que se descarta su influencia en los resultados obtenidos.

2. Líneas Linfoblastoides de AT:

En los linfoblastos de AT, la EUA permitió valorar el daño espontáneo e inducido por radiación gamma en los grupos de complementación AT-A, AT-C, AT-D, AT-E y las variantes AT-V1 y AT-V2, así como en el normal.

Cabe mencionar que el promedio de migración del ADN obtenido para la línea AT-A, fue menor que el de las otras líneas celulares, incluso que el de la línea normal, sin embargo sólo se realizaron 4 repeticiones y no fue posible corroborar el resultado por la pérdida de dicha línea celular.

Vijayalaxmi y colaboradores en 1992, valoraron el daño inducido por radiación en linfocitos humanos mediante EUA, parte de sus experimentos fueron realizados bajo las mismas condiciones que las empleadas en el presente trabajo. Sin embargo, el nivel de daño observado fue diferente, el promedio de migración del ADN para el daño espontáneo fue de $13.5 \pm 1.71\mu\text{m}$ y para el daño inducido de $57.1 \pm 4.22\mu\text{m}$, mientras que los promedios de migración que se obtuvieron para las líneas linfoblastoides de AT y normal, fueron del doble y además se observó una gran variabilidad en todas las líneas analizadas. Al igual que con las líneas de AF, es posible que estas diferencias se debieran al estadio del ciclo celular, ya que los linfocitos se encontraban en G_0 , en tanto que aproximadamente el 50% de los

linfoblastos se encontraban en fase S y probablemente los fragmentos de Okazaki contribuyeron a incrementar la migración del ADN y por tanto la variabilidad (58).

No se valoró viabilidad celular porque las células de todas las líneas linfoblastoides (AT y normal) fueron procesadas inmediatamente después de la radiación.

Con la EUA no se encontraron diferencias significativas entre las líneas linfoblastoides de los grupos de complementación de AT probablemente porque se demostró que no hay heterogeneidad genética entre ellos y que todos los grupos de AT (A, C, D y E) están codificados por el mismo gene (59).

IX.CONCLUSIONES

1. La EUA es útil para detectar el daño en el ADN en las células sin tratamiento y en las células tratadas con MMC de las líneas linfoblastoides de AF y normales.

2. La EUA no es un buen método para detectar diferencias entre los grupos de complementación de AF(A, B, C y D), ni con respecto al normal.

3. Con ésta técnica (EUA) se puede detectar el efecto corrector del plasma humano normal, aunque resultó ser generalizado en todas las líneas analizadas (AF y normal).

4. La EUA resultó útil para detectar daño espontáneo e inducido por 1Gy de rayos gamma en las líneas linfoblastoides de AT y normales.

5. No se observaron diferencias entre las líneas linfoblastoides de AT(A, C, D, E, V1 y V2), ni con respecto al normal.

X.BIBLIOGRAFIA

1. Cohen MM, Levy HP. Chromosome instability syndromes. *Advances in human genetics*. Harry Harris and Kurt Hirschhorn. Plenum Press. NY. 43-149, 1989.
2. Gordon-Smith EC, Rutherford TR. Fanconi anaemia constitutional, familial aplastic anaemia. *Baillière's Clin. Haematol.* 2(1):139-152,1989.
3. Hans W, Kunz MD. Hypoplastic anemia with multiple congenital defects (Fanconi syndrome) *Dep. Pediatrics*. NY University. College of Medicine. NY. 286-291,1952.
4. Alter PB. Fanconi's anaemia and its variability. *Br.J.Haematol.* 85:9-14,1993.
5. Kwee ML, Kuyt LP. Fanconi anemia in the Neantherlands. Fanconi anemia clinical cytogenetic and experimental aspects. TM Schroeder-Kurth, AD Auerbach, G Obe. Springer-Verlag. Berlin Heiderberg.1989.
6. Smith S, Marx MP, Jordaan CJ, van Niekerk CH. Clinical aspects of a cluster of 42 patients in South Africa with Fanconi anemia. Fanconi anemia clinical cytogenetic and experimental aspects. TM Schroeder-Kurth, AD Auerbach, G Obe. Springer-Verlag. Berlin Heiderbeg.1989.
7. Ebell W, Friedrich W, Kohne E. Terapeutic aspects of Fanconi anemia. Fanconi anemia clinical cytogenetic and experimental aspects. TM Schroeder-Kurth, AD Auerbach, G Obe. Springer-Verlag. Berlin Heiderberg. 1989.
8. Arwet F, Kwee ML. Chromosomal breakage in response to cross-linking agents in the diagnosis of Fanconi anemia. TM Schroeder-Kurth, AD Auerbach, G Obe. Springer-Velag. Berlin Heiderberg. 1989.
9. Frias S, Carnevale A, Del Castillo V. Utilidad de la prueba de exposición de linfocitos a Mitomicina C en el diagnóstico de anemia de Fanconi. *Rev. Invest. Clín. (Méx.)* 36:219-224, 1984.
10. Poon PK, O'Brien RL, Parker JW. Defective DNA repair in Fanconi's anaemia. *Nature* 250:223-225, 1974.
11. Fujiwara Y. Defective repair of Mitomycin C crosslinks in Fanconi's anemia and loss in confluent normal human and Xeroderma Pigmentosum cell. *Biochem. Biophys. Act.* 699:217-225, 1982.
12. Dallapiccola B, Porfirio B, Mokini V, Alimena G, Issacchi G, Gandini E. Effect of oxidants and antioxidants on chromosomal breakage in Fanconi anemia lymphocytes. *Hum.Genet.* 69:62-65, 1985.

13. Wnder E, Burghardt U, Lang B, Hamilton L. Fanconi's anemia: anomaly of enzyme passage through the nuclear membrane? *Hum.Genet.* 58:149-155, 1981.
14. Wnder E. Further studies on compartmentalisation of DNA-topoisomerase-I in Fanconi anemia tissue. *Hum. Genet.* 68:276-281, 1984.
15. Strathdee CA, Buchwald M. Molecular and cellular biology of Fanconi anemia. *Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 14(2):177-185, 1992.
16. Joenje H, Lo Ten Foe JR, Oostra AB, van Berkel CGM, Rooimans MA, Schroeder-Kurth T, Wegner RD, Guille JJP, Buchwald M, Arwet F. Classification of Fanconi anemia patientes by complementation analysis: evidence for a fifth genetic subtype. *Blood.* 86(6):2156-2160, 1995.
17. Digweed M, Zakrzewski-Lüdcke S, Sperling K. Complementation studies in Fanconi anemia using cell fusion and microinjection of mRNA. Fanconi anemia, clinical, cytogenetic and experimental aspects. TM Schroeder-Kurt, AD Auerbach, G Obe. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 236-253, 1989.
18. Strathdee CA, Duncan AMV, Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nature Genet.* 1:196-198, 1992.
19. Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, Alon N, Wijker M, Parker L, Lightfoot J, Carreau M, Callen DF, Savoia A, Cheng NC, van Berkel CGM, Strunk MHP, Guille JJP, Pals G, Kruyt FAE, Pronk JC, Arwert F, Buchwald M, Joenje H. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nature Genet.* 14:320-323, 1996.
20. D'Andrea AD. Fanconi anaemia forges a novel pathway. *Nature Genet.* 14:240-242,1996.
21. Zakrzewsky S, Sperling K. Antagonistic effect of cocultivation on Mitomycin C induced aberration rate in cells of a patient with Fanconi's anemia and in chinese hamster ovary cells. *Hum.Genet.* 56:85-88, 1980.
22. Carnevale A, Frías S. Efecto de la cocultivación y la adición de plasma normal sobre la respuesta a la Mitomicina C de los linfocitos de anemia de Fanconi. *Rev.Invest.Clin. (Méx.)* 37:31-34, 1985.
23. Rosselli F, Sanceau J, Wietzerbin J, Moustacchi E. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. *Hum.Genet.* 89:42-48,1992.
24. Gatti RA. Ataxia-Telangiectasia: Genetic studies. New concepts in immunodeficiency diseases. Gupta and C. Griscelli. John Wiley & Sons.1993.

25. Cohen MM, Levy HP. Chromosome instability syndromes. Advances in human genetics. Harry Harris and Kurt Hirschhorn. Plenum Press. NY. 43-149, 1989.
26. Bunday S. Clinical and genetic features of ataxia-telangiectasia. *Int.J.Radiat.Biol.* 66(6):S23-S29, 1994.
27. Taylor AMR, Byrd PJ, McConville CM, Tacker S. Genetic and cellular features of ataxia telangiectasia. *Int.J.Radiat.Biol.* 65(1):65-70, 1994.
28. Gatti RA. Speculations on the ataxia-telangiectasia defect. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 61:S10-S15, 1991.
29. Gatti RA. Molecular genetics of ataxia-telangiectasia. *Handbook Clin. Neurol.* 16(60):425-431, 1991.
30. Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NGJ, Lange K, Lathrop GM, Leppert M, Nakamura Y, O'Connell P, Paterson M, Salser W, Sanal O, Silver J, Sparkes RS, Susi E, Weeks DE, Wei S, White R, Yoder F. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature.* 336(8):577-580, 1988.
31. Sixth international workshop on ataxia telangiectasia. *Cancer Res.*54(15):6007-6010, 1994.
32. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NGJ, Taylor MR, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 268:1749-1753, 1995.
33. Saar K, Chrzanowska KH, Stumm M, Jung M, Nürnberg G, Wienker TF, Seemanová E, Wegner RD, Reis A, Sperling K. The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. *Am.J.Hum.Genet.* 60:605-610, 1997.
34. The Merck Index.(1989). An encyclopedic of chemicals drugs and biologicals. Merck & Co.INC.USA. 890-891.
35. Katzung, BG.(1986). *Farmacología básica y clínica. El manual moderno.* México.704-707.
36. Crooke ST.(1979). Mitomycin C: an overview. *Ac. Press.* NY. 1-4.
37. Lown JW.(1979).The molecular mechanism of antitumor action of the mitomycins. *Ac. Press.* NY. 5-25.

38. Iyer VN, Szybalski W. Mitomycins and porfiromycin: chemical mechanism of activation and cross-linking of DNA. *Science*. 14(3):55-58, 1964.
39. Basu AK, Hanrahan CJ, Malia SA, Kumar S, Bizanek R, Tomasz M. Effect of site-specifically located Mitomycin C-DNA monoadducts on in vitro DNA synthesis by DNA polymerases. *Biochem*. 32:4708-4718, 1993.
40. Jürgen K.(1990). *Biological radiation effects*. Springer-Verlag.1-17,104-119.
41. Burcham WE.(1974). *Física nuclear*. Reverté.18-27.
42. Schmelter RF. Nuclear medicine and the environment: radiation interactions. *Seminars in nuclear medicine*. XVI(2):87-105,1986.
43. Rabinowitz JL, Díaz JC.(1984). *Aplicaciones de los radioisótopos en química, biología y medicina*. Facultad de Medicina. UNAM. México. 151-161.
44. McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a european review. *Mutat.Res*. 288:47-63, 1993.
45. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp.Cell.Res*. 175:184-191, 1988.
46. Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Biol.React.Intern*. NY. 157-164, 1990.
47. Ahnström G. Techniques to measure DNA single-strand in cells: a review. *Int.J.Radiat.Biol*. 54:695-707, 1988.
48. Vijayalaxmi, Tice RR, Strauss GHS. Assesment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat.Res*. 271:243-252, 1992.
49. Tice RR, Strauss GHS, Peters WP. High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat.Res*. 271:101-113, 1992.
50. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutat.Res*. 307:261-271,1994.

51. Louie LG, King MC. A novel approach to establishing permanent lymphoblastoid cell lines: Epstein-Barr virus transformation of cryopreserved lymphocytes. *Am.J.Hum.Genet.* 48:637-638,1991.
52. Barch MS. (1991). *The act cytogenetics laboratory manual*. Reven Press.NY.137-138.
53. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat.Res.* 339:37-59,1995.
54. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp.Cell.Res.* 175: 184-191, 1988.
55. Olive PL, Banáth JP. Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat.Res. DNA Repair.* 294:275-283, 1993.
56. Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banáth JP. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp.Cell.Res.* 198:259-267, 1992.
57. Rosselli F, Ridet A, Soussi T, Duchaud E, Alapetite C, Moustacchi E. p53-dependent pathway of radio-induced apoptosis is altered in Fanconi anemia. *Oncogene.* 10:9-17, 1995.
58. Vijayalaxmi, Tice RR, Strauss GHS. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat.Res.* 291:243-252, 1992.
59. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NGJ, Taylor MR, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 268:1749-1753, 1995.